

ГАЗОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ СВОБОДНЫХ ЖИРНЫХ КИСЛОТ В РОТОВОЙ ЖИДКОСТИ КАК ИНДИКАТОРЫ СОСТОЯНИЯ ОРГАНИЗМА

Рустамова С.М. таянч докторант,

Тошкент Давлат Стоматология институти

¹ rustamova.sabogul@mail.ru

Хаджиметов А.А. б.ф.д. профессор,

Тошкент Давлат Стоматология институт

² hadjimetov.aa@mail.ru ,

АННОТАЦИЯ: Многочисленными исследователями выявлен факт, что одну из главных ролей в возникновении воспаления пародонта играет инфекционный фактор, к которому следует отнести патогенную микрофлору, вегетирующую на зубах и десне, продукты её жизнедеятельности, токсины и эндотоксины, микробные ферменты. Среди прочих биологически активных веществ самым неоднозначным продуктом жизнедеятельности анаэробных бактерий можно считать короткоцепочечные жирные кислоты (КЖК), которые не только отражают активность микрофлоры в полости рта, но также обладают самостоятельным провоспалительным действием. КЖК участвуют в микроциркуляции, регуляции ионного обмена, секреции слизи, влияют на адгезию и размножение патогенной и условнопатогенной флоры, активируют местный иммунитет, фагоцитоз, восполняют энергетические потребности различных тканей, в первую очередь эпителия, влияют на пролиферацию и дифференцировку эпителиоцитов (1).

Целью настоящей работы являлась разработка способа подготовки образцов к анализу газовой хроматографии с масс-селективным детектированием позволяющего проводить определение КЖК в ротовой жидкости у здоровых лиц и больных хроническим генерализованным пародонтитом.

Ключевые слова: свободные жирные кислоты, хронический генерализованный пародонтит, газовая хроматография с масс-спектрометрией (ГХ-МСД).

ABSTRACT: Numerous researchers have revealed the fact that one of the main roles in the occurrence of periodontal inflammation is played by an infectious factor, which should include pathogenic microflora that vegetates on the teeth and gums, its waste products, toxins and endotoxins, microbial enzymes. Among other biologically active substances, short-chain fatty acids (SCFA) can be considered the most controversial product of the vital activity of anaerobic bacteria, which not only reflect the activity of microflora in the oral cavity, but also have an independent pro-inflammatory effect. SCFA are involved in microcirculation, regulation of ion exchange, mucus secretion, affect the adhesion and reproduction of pathogenic and opportunistic flora, activate local immunity, phagocytosis, replenish the energy needs of various tissues, primarily epithelium, affect the proliferation and differentiation of epitheliocytes.

The aim of this work was to develop a method for preparing samples for analysis by gas chromatography with mass-selective detection, which makes it possible to determine SCFA in oral fluid in healthy individuals and patients with chronic generalized periodontitis.

Keywords: free fatty acids, chronic generalized periodontitis (CGP), gas chromatography with mass spectrometry (GC-MSD).

Введение: Основной метод анализа состава РЖ - это газовая хроматография (ГХ) с пламенно-ионизационным детектированием, однако, в сочетании с масс-спектрометрией, метод ГХ имеет ряд неоспоримых преимуществ как в части надежности идентификации аналитов, так и чувствительности и селективности их определения. При этом, определение свободных жирных кислот в ротовой жидкости методом ГХ после

переэтерификации в метиловые эфиры может рассматриваться в качестве классического подхода (2).

Материал и методы исследования: В исследование были включены 18 больных со средней степенью хронической генерализованной пародонтитом в возрасте от 28 лет до 61 года, обратившихся в клинику ТГСИ. В группу сравнения были включены 12 пациентов без патологии пародонта. Исследование короткоцепочечных жирных кислот в ротовой жидкости проводили методом газовой хроматографии. Способ определения короткоцепочечных жирных кислот (уксусной C2, пропионовой C3, масляной C4, с изомерами) включал: процесс пробоподготовки и газохроматографический анализ. Эталонами работы были коммерческие наборы кислот-C2, C3, C4, изо-масляная, изовалериановая, капроновая и изо-капроновая кислоты. Состав КЖК ротовой жидкости определяли однократно, натощак, при первичном обследовании. Ротовую жидкость отбирали в эппендорфы и хранили до анализа в морозильной камере при -80°C . Перед исследованием, ротовую жидкость центрифугировали при 14000 об/мин. В течение 20 минут. Для выделения липидов, лиофилизированной фракции липидов 0,1 мл добавляли смесь, состоящий из 0,5 мл 0,9% раствора хлорида натрия и 2,5мл смеси хлороформ/метанол(2:1). Затем этой смеси прибавляли 10 мкл внутренних стандартов жирных кислот состоящий из 17:0 (2 $\mu\text{г}/\text{мл}$), 19:0 (0,5 $\mu\text{г}/\text{мл}$) и 23:0 (0,25 $\mu\text{г}/\text{мл}$). Через 5 минут полученную смесь центрифугировали при 16000 об/мин в течение 3 минут. Затем 10 мл нижней слой ЖК отделяют и переносят в пробирки Эппендорф, выпаривали под током азота. К полученному раствору прибавляли 1 мл 0.4 М раствора NaOH в метаноле, тщательно перемешивали в вортексе в течение 10 мин, затем смесь нагревают в течение 30 минут в водяной бане при 70°C , добавляют 55 мл 32% раствора соляной кислоты и 1,5 мл гексана. Полученной смеси добавляют 3 мл 3 Моль раствора хлористого натрия, отделяют гексановый слой. Раствору добавляют в соотношение 1:3 раствор сульфата натрия и оставляют на сутки, фильтруют и фильтрат вносят в газовый хроматограф. Анализ проводили методом газовой хроматографии, масс-

спектрометрии на приборе Agilent 5977B GC/MSD, масс-детектор Agilent 8890 GC. Применялись колонки HP-5MS Ultra inert 30 м × 250 мкм × 0,25 мкм. (каталожный номер Agilent 19091S-433UI). Программа термостат: 40°C в течение 1 минуты, затем 25°C/мин до 220°C, затем 10°C /мин до 240°C. В качестве газа носителя использовали водород (H₂) 1мл / мин, режим инъекции Split (20:1), температура источник 250 ° C, температура в транспортный линии 280 ° C . Задержка для устранения эффектов растворителя-3,5 мин, режим сбора данных SIM (3).

Результаты исследования : Анализ профилей КЖК с числом углеродных атомов C₂-C₄, вносящих основной вклад в общий пул кислот в ротовой жидкости у пациентов с ХГП, указывает на снижения в 2,5 раза относительно содержания пропионовой и уксусной кислоты кислоты, что говорит об уменьшении активности аэробного звена микроорганизмов — *E. coli*, стрепто- и стафилококков при увеличении активности анаэробного звена, в частности, родов пропионибактерий, бактероидов (в большей степени), родов *Clostridium*, *Fusobacterium* и т. п. (в меньшей степени). В настоящее время с учетом неинвазивности метода и многомерности возможного анализа использование оценки содержания короткоцепочечных жирных кислот в ротовой жидкости имеет важное диагностическое значение в пародонтологии.

Заключение. В ходе исследования ротовой жидкости у больных ХГП с использованием ГХ-МСД выявлено изменение абсолютного содержания короткоцепочечных жирных кислот. Выявлено снижение уровня уксусной кислоты до $0,26 \pm 0,02$ мг/г., пропионовой кислоты до $0,07 \pm 0,006$ мг/г, и масляной кислоты до $0,013 \pm 0,002$ мг/г. в ротовой жидкости пациентов с ХГП средней степени.

Литературные источники.

1. Ардатская М.Д. Клиническое значение короткоцепочечных жирных кислот при патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 2003. 48 с. Режим доступа: <https://search.rsl.ru/record/01004312054>.
2. Буланова, А.В. Хроматография в медицине и биологии: учебное пособие / А.В. Буланова, Ю.Л. Полякова; Федер. агенство по образованию. - 2-е изд. - Самара: Изд-во «Самарский университет», 2006. - 116 с.
3. Затевалов А.М., Гудова Н.В., Оганесян А.С., Селько- ва Е.П., Миронов А.Ю., Гречишникова О.Г Референсные значения короткоцепочечных жирных кислот в слюне у пациентов ОРИТ без респираторной патологии. Клиническая лабораторная диагностика. 2019;64(3):153-157