

## 02 Спектроскопические исследования изменений во вторичной структуре белков дентинной и десневой жидкостей по данным синхротронной ИК микроскопии

© П.В. Середин<sup>1</sup>, Д.Л. Голощапов<sup>1</sup>, Ю.А. Ипполитов<sup>2</sup>, Jitraporn (Pimm) Vongsivut<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Воронежский государственный университет,  
394036 Воронеж, Россия

<sup>2</sup> Воронежский государственный медицинский университет им. Н.Н. Бурденко,  
394036 Воронеж, Россия

<sup>3</sup> Australian Synchrotron (Synchrotron Light Source Australia Pty LTD),  
VIC 3168, Australia

e-mail: paul@phys.vsu.ru

Поступила в редакцию 14.05.2019 г.

В окончательной редакции 24.07.2019 г.

Принята к публикации 12.08.2019 г.

На основе данных ИК спектромикроскопии с использованием синхротронного излучения проведено исследование вторичной структуры белков дентинной и десневой жидкостей человека при развитии кариозного процесса в глубоких тканях дентина. Показано, что изменение формы профиля полосы Амид I в области  $1700\text{--}1605\text{ cm}^{-1}$  связано как с изменением соотношения интегральных интенсивностей вторичных структур  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -лист, так и положением компонент  $\beta$ -витки и  $\beta$ -лист в спектре. Установлено, что величина соотношения  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист как для дентинной, так и десневой жидкостей лежит ниже порогового уровня, при котором наблюдаются значительные изменения во вторичной структуре белков биологических жидкостей и однозначно свидетельствует о развитии патологии в твердой ткани. Обнаруженные нами особенности в профиле полосы Амид I биологических жидкостей ротовой полости совместно со спектральными маркерами развития кариозного процесса в дентине являются достоверными спектроскопическими сигнатурами патологии и могут быть детектированы с использованием десневой жидкости.

**Ключевые слова:** ИК микроскопия, синхротронное излучение, кариес дентина, спектроскопические сигнатуры патологических процессов.

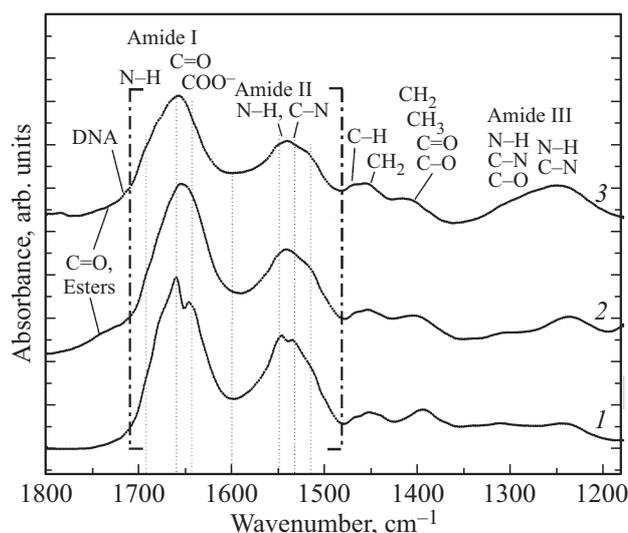
DOI: 10.21883/OS.2019.12.48686.159-19

### Введение

Одной из значимых и все еще нерешенных проблем терапевтической стоматологии является задача эффективной персонализированной диагностики патологических процессов в тканях дентина зубов человека [1]. Современные исследования показывают, что обнаружение инфицированного, склеротичного и измененного дентина возможно лишь на поздних стадиях развития кариеса [2,3]. Несвоевременное обнаружение патологических процессов в глубоких тканях дентина зачастую ведет к утрате части или всего зуба, а также является угрозой здоровья человека в целом [4–6]. Поэтому так активно развиваются методики раннего обнаружения патологий дентина методами оптической спектроскопии, основанных на скрининге препарированных тканей зубов [7–10]. Одновременно с этим обращают на себя внимание научные работы, в которых возникновение воспалительных процессов в ротовой полости детектируется с использованием носителей маркеров патологий (воспаления) — биологических жидкостей. В случае превентивной диагностики заболеваний дентина кариозного характера идеальным кандидатом на

роль объекта скрининга может выступить дентинная жидкость, которая играет весомую роль в развитии кариеса дентина [11]. Однако трудоемкость и практическая невозможность забора дентинной жидкости *in vivo* [12] является главным препятствием развития нового направления диагностики. Иссечение тканей эмали для забора дентинной жидкости, является нецелесообразным в случае, например, фиссурного кариеса, когда речь идет об определении наличия воспалительного процесса в дентине. Поэтому скрининг развития патологий в дентине требует определения воспалительных факторов в других биологических жидкостях ротовой полости — слюне, крови и жидкости из десневой борозды [13,14].

Извлечение жидкости из десневой борозды для диагностики патологий дентина является более простой задачей, а ее молекулярный анализ, с последующим выделением маркеров развития кариозного процесса в дентине, может быть выполнен с использованием техники молекулярной идентификации [13,15–17]. Для данных задач наиболее информативным и прецизионным методом, позволяющим регистрировать изменения мо-



**Рис. 1.** ИК спектры образцов крови (1), десневой (2) и дентинной (3) жидкостей человека. Вертикальными штрихпунктирными линиями обозначен диапазон проявления характеристических особенностей альбумина и глобулинов.

лекулярного состава объектов биологической природы, является ИК спектроскопия [18–21]. С использованием метода ИК спектроскопии могут быть зарегистрированы изменения, происходящие во вторичной структуре биологических жидкостей ротовой полости, т.е. в пространственной структуре их белков, при развитии определенной патологии [22,23]. В ряде передовых работ, посвященных поиску математических алгоритмов анализа спектральных полос амидных групп, уже продемонстрированы перспективы развития этого подхода для скрининга изменений в протеоме ротовой жидкости человека при развитии заболеваний [24,25]. Привлечение для этого данных высокоразрешающей ИК спектроскопии позволило, в частности, проанализировать уровень кариесорезистентности у пациентов с множественным кариесом [26]. В рамках описанного подхода на основе расчета минерал/органического, углерод/фосфатного, амидного и иных соотношений, определенных из данных математического анализа колебательных полос в ИК спектрах, появляется возможность проанализировать изменения, происходящие в белково/органической составляющей биологических жидкостей ротовой полости, а также определить стадию развития патологии твердых тканей зубов и парадонта [21,25–27].

Следует отметить, что в литературе нет информации о сопоставлении молекулярного состава дентинной и десневой жидкостей, а также данных об изменениях, происходящих в конформационном окружении их белков, при развитии патологических изменений в тканях дентина. Поэтому целью нашей работы стал поиск изменений во вторичной структуре белков дентинной и десневой жидкостей на основе данных их спектроскопических исследований.

## Материалы и методы исследования

В исследовании приняли участие 10 человек (5 мужчин и 5 женщин) в возрасте 22–28 лет. От каждого пациента с детектированным кариесом дентина были взяты три образца биологических жидкостей: дентинная жидкость, жидкость из десневой борозды и кровь из десны. Забор образцов биологических жидкостей ротовой полости был выполнен с использованием специализированной вакуумной установки и разработанных нами микрокапилляров, заполненных гомогенизированным порошком KBr. После забора образцов порошок KBr из микрокапилляров, содержащих биологические жидкости, высушивался при комнатной температуре.

Исследования молекулярного состава образцов дентинной жидкости, десневой жидкости и крови из десны человека были выполнены с использованием методики ИК спектроскопии с привлечением оборудования канала Инфракрасной Микроспектроскопии (ИРМ) (Австралийский синхротрон, Мельбурн, Австралия), спектрометра Bruker Vertex 80V с детектором, охлаждаемым жидким азотом (Bruker Optik GmbH, Германия) [28].

## Экспериментальные результаты и их обсуждение

Анализ полученных методом ИК спектроскопии данных показал, что спектры однотипных образцов внутри группы участников эксперимента содержат абсолютно один и тот же набор колебательных мод. При этом в ИК спектрах образцов внутри рассматриваемой экспериментальной группы наблюдались незначительные отличия в изменении интенсивности присутствующих колебательных полос. Поэтому в нашей работе представлены усредненные по группе участников эксперимента спектры образцов биологических жидкостей. Следует отметить, что процедура усреднения спектров по экспериментальной группе позволяет избежать случайных ошибок эксперимента и индивидуальных особенностей лиц в конкретной группе [27].

На рис. 1 приведены ИК спектры поглощения образцов крови, дентинной и десневой жидкостей пациентов в области  $1725\text{--}1190\text{ cm}^{-1}$ . Выделенная отдельно область амидных полос  $1710\text{--}1470\text{ cm}^{-1}$  указывает регион в ИК спектрах, используемый для анализа вторичной структуры белковой составляющей биологических жидкостей человека. Выбор границ данной области основан на анализе данных из работ [22–24], а также определен с учетом влияния колебаний сложного эфира  $\text{C}=\text{O}$  ( $1740\text{ cm}^{-1}$ ) и ДНК/РНК структур ( $1725\text{ cm}^{-1}$ ) на форму амидных полос. Анализ полученных данных и расшифровка ИК спектров были выполнены на основе литературных источников, в которых методом FTIR исследовались образцы биологических жидкостей ротовой полости, белки и аминокислоты [24,29–37]. Список активных колебаний в ИК спектрах образцов крови, дентинной и десневой жидкостей, а также частоты этих

**Таблица 1.** Активные колебания в спектрах образцов крови, дентинной и десневой жидкостей пациентов. Интенсивности колебательных полос в спектрах: + — слабая; ++ — средняя, +++ — сильная, ++++ — очень сильная

Принадлежность к молекулярной группе	Мода колебаний	Частота колебаний, $\text{cm}^{-1}$	Биологическая жидкость			Источник данных
			Кровь	Дентинная жидкость	Десневая жидкость	
Карбоновая группа эфира и ДНК	$>\text{C}=\text{O}$ валентные, $\text{C}=\text{O}$ валентные, характеристическая парно-базовая компонента ДНК	1738–1713	–	+	++	[15,27,30,32,36]
Белки вторичной структуры	$\beta$ -витки и $\beta$ -листы	1684	++	++	++	[24,36,37]
Белки вторичной структуры	Амид I $\beta$ -спираль	1663	++++	++++	++++	[24,29–32,37]
Белки	Амид I $\text{C}=\text{O}$ валентные и Амид II $\text{N}-\text{H}$ деформационные	1647–1642	++++	++++	++++	[24,29–31,38]
Белки, триптофан, метгемоглобин	Амид II, валентные $\text{CN}$ и $\text{CNH}$ деформационные	1548–1544	+++	+++	+++	[24,29–32,37]
Белки Амид II, гуанин	$\nu\text{C}=\text{N}$ , $\nu\text{C}=\text{C}$	1530–1525	+++	+++	+++	[24,29,32,37]
Белки, каротиноиды	$\text{CH}$ деформационные; $\nu\text{C}=\text{C}$ ; Амид II	1514–1504	++	++	++	[24,30,37,38]
Боковые цепи аминокислот, липиды и белки	Асимметричные деформационные $\text{CH}_2$	1469–1455	++	+++	++	[24,29,30,32,37]
Фибриноген, боковые цепи аминокислот, липиды и белки	Симметричные $\text{CH}_3$ деформационные, $\text{COO}$ валентные	1412–1396	++	++	++	[24,29,30,32,37]
Белки	Амид III $\text{C}-\text{N}$ валентные	1312–1310	+	++	+	[24,29,37]
Фосфодиэфирные группы в ДНК, белки	$\text{P}=\text{O}$ of $\text{PO}_2^-$ валентные, Амид III Асимметричные $\text{C}-\text{N}$ валентные	1250–1240	+	+++	++	[24,29–31,37]

колебательных мод и их принадлежность к конкретной молекулярной группе представлены в табл. 1.

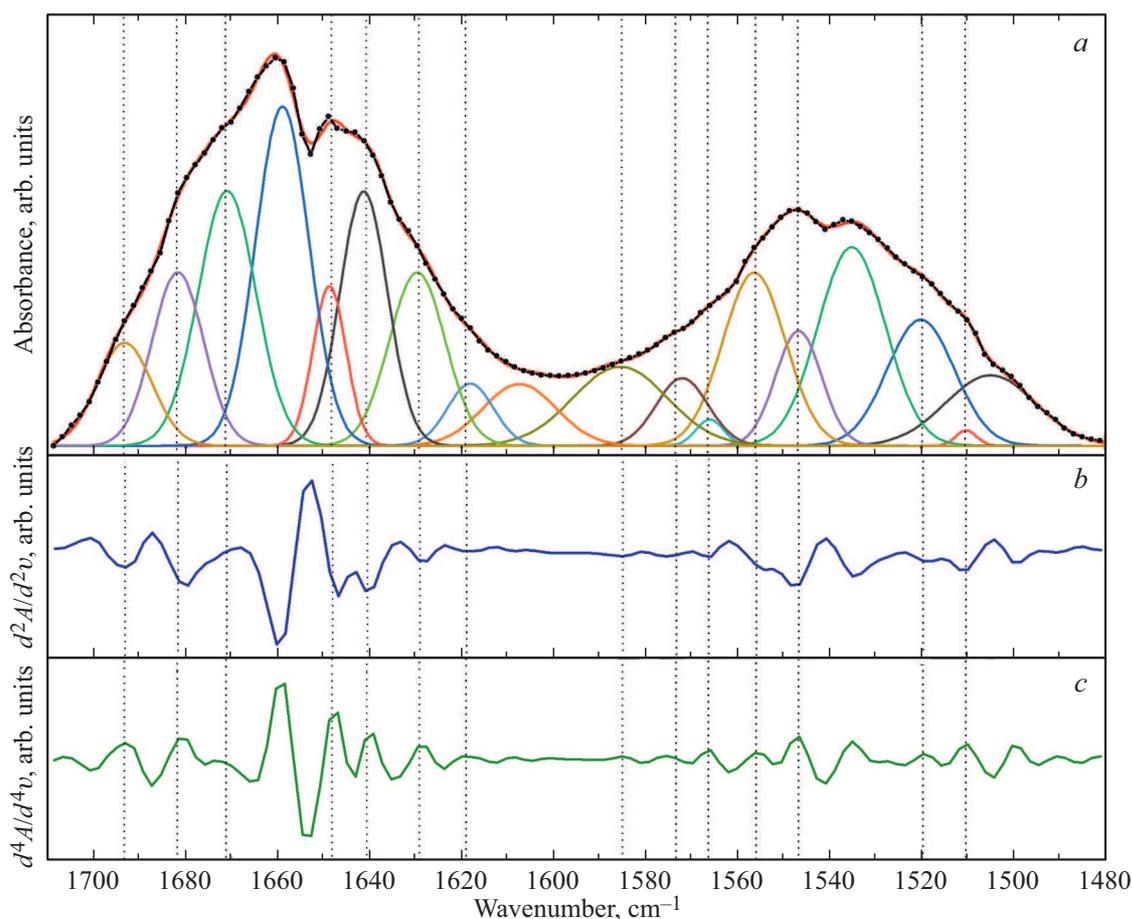
Из полученных нами экспериментальных данных (рис. 1, табл. 1) следует, что среди группы колебательных полос белков в ИК спектрах образцов крови, дентинной и десневой жидкостей могут быть выделены полосы вторичных амидов: Амид I (валентные колебания  $\text{C}=\text{O}$  в области  $1725-1590 \text{ cm}^{-1}$ ), Амид II ( $\text{N}-\text{H}$ -деформационные и  $\text{C}-\text{N}$ -валентные колебания в области  $1590-1500 \text{ cm}^{-1}$ ) и Амид III ( $\text{C}-\text{N}$ -деформационные,  $\text{N}-\text{H}$ -деформационные в области  $1350-1190 \text{ cm}^{-1}$ ), а также колебания  $\text{CH}_2/\text{CH}_3$ -групп, расположенные в области  $1480-1350 \text{ cm}^{-1}$  [38].

Отметим, что применение высококогерентного синхротронного излучения позволяет разрешить спектральные особенности амидных полос с большей точно-

стью [28,37,39]. Поэтому в наших экспериментальных спектрах, например в спектре крови (рис. 1, кривая I), можно наблюдать ряд особенностей у колебаний Амид I и Амид II, которые относятся к компонентам белковой фракции крови: альбумину и глобулинам [22,29,30,40]. Эти особенности, наблюдаемые как ряд дополнительных плеч у основных интенсивных колебательных мод, обозначены на рис. 1 вертикальными пунктирными линиями. Полученные нами данные о различном спектральном положении колебательных полос альбумина и глобулина находятся в согласии с результатами работ [32,40].

### Анализ вторичной структуры белков

Как показывает анализ публикаций последних лет, изучение белковых структур с использованием ИК спектроскопии и последующий математический ана-



**Рис. 2.** (a) — модельный и экспериментальный ИК спектры в области  $1710\text{--}1480\text{ cm}^{-1}$ , с гауссовыми компонентами, для образца крови, полученной из десны зуба с диагностированным кариесом дентина, (b) — вторая производная экспериментального ИК спектра, (c) — четвертая производная экспериментального ИК спектра.

лиз спектрального профиля амидных полос (Амид I, Амид II и Амид III), позволяет установить зависимость интенсивности компонент вторичной структуры белков от их пространственной структуры [41]. Поэтому область  $1750\text{--}1300\text{ cm}^{-1}$  в экспериментальных ИК спектрах биологических жидкостей ротовой полости (рис. 1, кривые 1, 2, 3) является предметом тщательного изучения [32,40]. Наличие или отсутствие ферментов, липидов, факторов воспаления и других структур в биологических жидкостях влияет на вторичную структуру их белков и, в свою очередь, отражается на профиле амидных полос в ИК спектрах [42]. Поэтому изменение в конформации белка (пространственной конфигурации белковой молекулы), регистрируемое методом ИК спектроскопии, может быть связано с конкретным типом воспалительного процесса [39], что весьма ценно для ранней диагностики широкого ряда заболеваний человека [22,41,43–45].

Как уже было отмечено ранее, изменения в молекулярном составе биологических жидкостей, в частности во вторичной структуре их белков, наиболее явным образом находят свое отражение в ИК спектрах в виде

особенностей в формы колебательных полос, относимых к Амид I и Амид II [40]. Поэтому в нашей работе для определения изменений во вторичной структуре белков образцов крови, дентинной и десневой жидкостей, взятых у пациентов с патологией глубоких тканей дентина кариозного характера, полосы Амид I и Амид II были разложены на компоненты с использованием гауссовых кривых. Пример такого разложения для образца крови представлен на рис. 2, a. При этом для выделения компонент в экспериментальном профиле использовались математические алгоритмы определения экстремумов с использованием второй и четвертой производной (рис. 2, b, c). Результаты моделирования, число компонент в модельном спектре и обнаруженные спектральные особенности сопоставлялись с данными из известных работ по анализу вторичной структуры белков сыворотки крови и десневой жидкости [23,32,41].

Важно отметить, что для анализа вторичной структуры белков мы детально рассмотрели только область  $1605\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$  полосы Амид I, поскольку входящие в нее связи C=O и C-N являются наиболее чувствительными к локальным изменениям, происходящим

**Таблица 2.** Компоненты вторичной структуры белков в полосе Амид I и их частоты колебаний ( $\text{cm}^{-1}$ ) для образцов сыворотки крови, десневой и дентинной жидкостей человека

N	Компоненты вторичной структуры полосы Амид I	Биологическая жидкость			Источник данных
		Кровь	Десневая жидкость	Дентинная жидкость	
I ( $A_I$ )	Аминокислотная боковая цепь	1607.4	1610.1	1608.0	[35,38,41–43]
II ( $A_{II}$ )	Аминокислотная боковая цепь	1618.1	1618.1	1618.1	[22,35,42,43]
III ( $\beta_{III}$ )	$\beta$ -складчатый слой	1629.6	1629.6	1627.7	[39,41,43]
IV ( $\beta_{IV}$ )	$\beta$ -складчатый слой	1641.3	1639.1	1637.4	[38,41–43]
V ( $R_V$ )	Неупорядоченная структура	1648.7	1648.3	1648.9	[38,41–43]
VI ( $\alpha_{VI}$ )	$\alpha$ -спираль	1658.9	1658.1	1658.6	[38,41–43]
VII ( $T_{VII}$ )	$\beta$ -виток	1672.1	1668.5	1668.5	[38,41–43]
VIII ( $\beta_{VIII}$ )	$\beta$ -лист антипараллельный + $\beta$ -виток	1681.7	1681.7	1681.7	[22,35,42,43]
IX ( $\beta_{IX}$ )	$\beta$ -лист антипараллельный	1693.3	1693.3	1695.2	[22,35,42,43]

в молекулярном составе и окружении биологических жидкостей человека. При этом в начальном приближении для построения модельных спектров биологических жидкостей ротовой полости принимались во внимание известные соотношения между компонентами вторичной структуры белка [22,42,44,46]. Разложение спектров на компоненты производилось по предложенной и опробованной в ряде работ методике [22,24,44] с учетом накладываемых ограничений и критических замечаний, касающихся вычисления количества максимумов в спектре, проведения фоновой линии и определения сходимости результата разложения [23]. Выработанный алгоритм математической обработки спектральных данных позволил найти необходимый критерий сходимости и воспроизводимости результатов моделирования, а также обеспечил однозначность разложения полосы Амид I у исследуемых образцов.

Следует отметить, что при анализе вторичной структуры белков и изменений в ней существует необходимость рассмотрения полного профиля ИК полосы Амид I [24]. Это обусловлено тем фактом, что при разложении лишь части профиля ИК полосы соотношение интенсивностей мод колебаний, относимых к компонентам  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -лист в структуре вторичных белков, может быть двукратно искажено [23]. В сложных случаях для корректных расчетов учет слабых спектральных особенностей возможен только при полнопрофильном анализе полосы [23,24]. Поэтому для изучаемых биологических жидкостей мы провели полнопрофильный анализ полосы Амид I с учетом полосы Амид II (рис. 2, a).

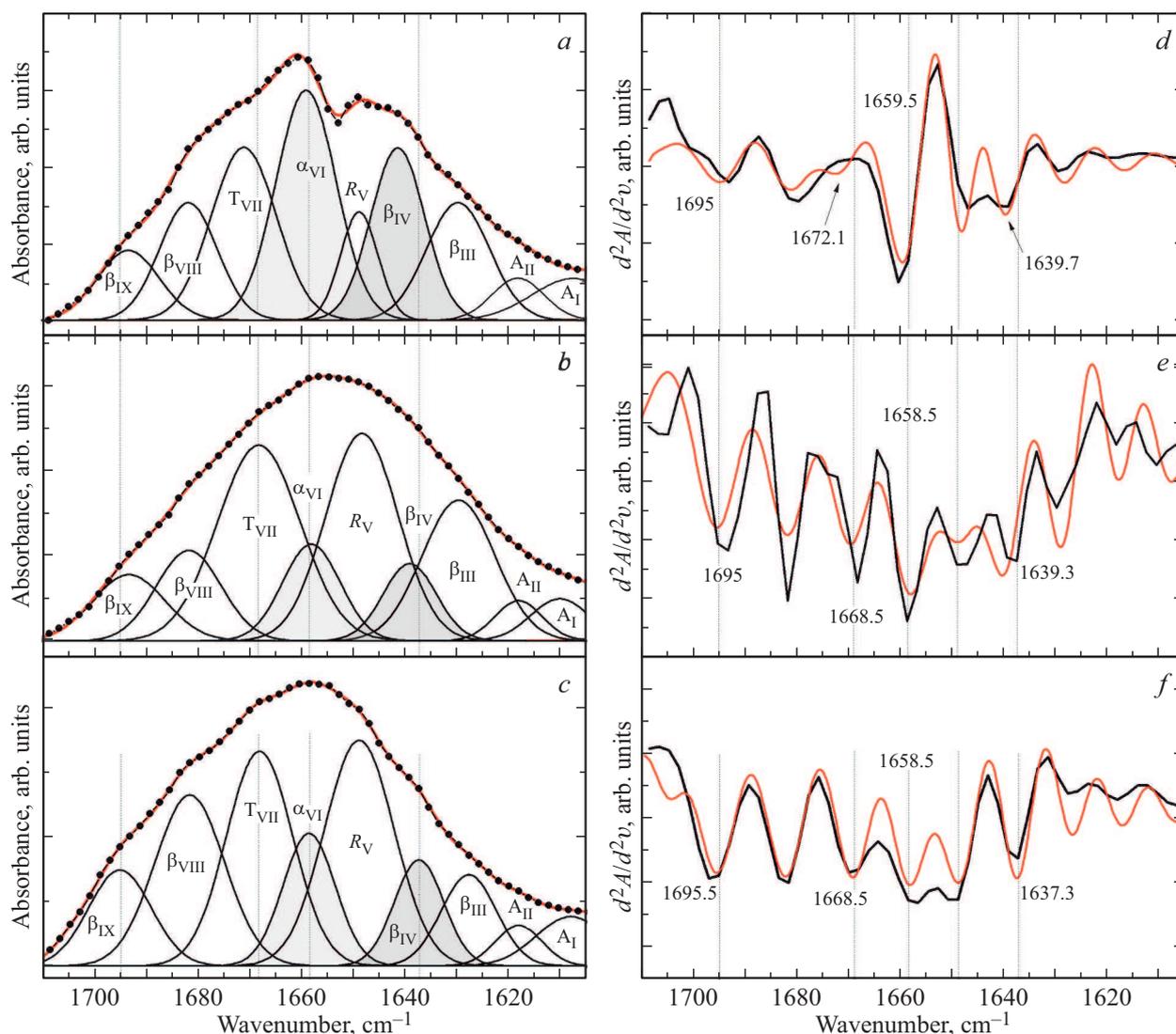
Обратим внимание на тот факт, что диапазон  $1660\text{--}1649\text{ cm}^{-1}$  является сложным для моделирования и часто соответствует перекрытию нескольких полос  $\alpha$ -спирали во вторичной структуре белков. Так, в работе [23] было показано, что при моделировании данной

области без разделения  $\alpha$ -спирали на компоненты достичь в модельных кривых однозначного соответствия между моделью и экспериментальным спектром не удастся. Поэтому в нашем расчете  $\alpha$ -спираль приводится как сумма двух высокоинтенсивных максимумов.

Анализируя полученные результаты моделирования, следует отметить следующие обнаруженные важные особенности. Тонкая структура полосы Амид I крови человека определяется в основном смешением альбуминовой (основной компоненты в составе) и глобулиновой фракции [22,40,45]. Как было показано в работе [42], при смешивании альбумина с ДНК и РНК происходит сдвиг полос вторичной структуры белков, поэтому в табл. 2 мы привели интервалы частот, где наблюдаются характеристические компоненты полосы Амид I, полученные в ходе обработки экспериментальных данных изучаемых биологических жидкостей.

Что же касается возможных частотных сдвигов в положении компонент вторичной структуры, относимых к  $\beta$ -виток и  $\beta$ -лист, то необходимо отметить, что данные компоненты слабо разрешимы, их форма и вид в каждом отдельном случае зависят от многих факторов. Поэтому при проведении разложения экспериментального спектра согласно рекомендациям из [23] мы опирались не только на условие сходимости модельной и экспериментальной кривой (рис. 3, a, b, c) и их производных (рис. 3, f, e, d), но также, как указывается в ряде работ [24,41–43], на наименьшее количество максимумов, с использованием которых, в пределах ошибки, можно провести моделирование.

Нужно сказать, что представленные на рис. 3, f, e, d графики производных экспериментальных и модельных кривых демонстрируют удовлетворительное соответствие в пределах точности эксперимента. Наибольшая разница между кривыми наблюдается на краях рассмат-



**Рис. 3.** Экспериментальная (точки) и модельная (красная кривая) полоса Амид I, ее гауссовы компоненты (слева, *a–c*), вторая производная экспериментальной (черные линии) и модельной (красные линии) полосы Амид I (справа, *d–f*) в спектрах образцов — крови из десны человека (*a, d*), жидкости из десневой борозды (*b, e*), дентинной жидкости (*c, f*).

риваемой области:  $1700$  и  $1610\text{ cm}^{-1}$ . Этот факт объясняется выбором для моделирования гауссовой функции, а также нелинейностью фона и статистическими особенностями экспериментального спектра.

### Анализ и обсуждение полученных результатов

Результаты разложения полосы Амид I на компоненты для образцов крови, дентинной и десневой жидкостей (рис. 3, *a, b, c* и табл. 2) показывают, что положение основных компонент вторичной структуры белков в этих образцах практически не изменяется. Данный факт обусловлен тем, что дентинная и десневая жидкости являются производными плазмы крови и схожи с ней по составу глобулярных белков. Единственное значимое смещение во вторичной структуре белков обнаруживается для компоненты  $\beta_{IV}$ -складчатый слой, которая

в спектре дентинной жидкости сдвинута на  $4\text{ cm}^{-1}$  в низкочастотную сторону относительно положения этой компоненты в ИК спектре образцов крови (табл. 2). Также смещение наблюдается и для компоненты  $\beta_{VIII}$ -витки, которая в спектре дентинной жидкости расположена около  $1668.5\text{ cm}^{-1}$ , а в спектре образцов крови локализована около  $1672.1\text{ cm}^{-1}$ . Результаты, представленные в табл. 2, показывают, что аналогичную тенденцию частотного сдвига компонент  $\beta$ -витки и  $\beta$ -лист можно обнаружить и у образцов десневой жидкости, относительно образца крови.

Как следует из работы [42], подобные сдвиги положения компонент вторичной структуры белка, например альбумина сыворотки крови человека (одной из составляющих всех исследуемых жидкостей), могут наблюдаться в присутствии определенных ферментов. Принимая во внимание данный факт, необходимо отме-

тять, что в спектрах дентинной и десневой жидкостей присутствуют моды сложного эфира, локализованные в области  $1738\text{ cm}^{-1}$ , что свидетельствует о кариесогенной патологии [27]. Поэтому частотный сдвиг компонент вторичной структуры  $\beta$ -витки и  $\beta$ -лист в спектре дентинной и десневой жидкостей может быть связан с изменением их молекулярного состава при развитии кариеса дентина.

Детальное рассмотрение полосы Амид I всех образцов (рис. 3, *a, b, c*) показывает, что основные изменения формы профиля обусловлены перераспределением интенсивностей компонент вторичной структуры белков  $\alpha$ -спираль, случайная спираль,  $\beta$ -витки и  $\beta$ -складчатый слой. Несмотря на достаточно большое процентное содержание неупорядоченных структур —  $R_v$ , положение компоненты  $\alpha$ -спираль в спектрах образцов биологических жидкостей практически не изменятся ( $\sim 1658\text{ cm}^{-1}$ , табл. 2), что отражает близость состава всех рассматриваемых жидкостей. С другой стороны, количественное содержание компонент белковой фракции в биологических жидкостях может различаться ввиду взаимодействия десневой и дентинной жидкостей с пораженными кариесом твердыми тканями зуба. Поэтому интенсивность компоненты  $\alpha$ -спираль по отношению к другим компонентам в полосе Амид I может изменяться (рис. 3, *a, b, c*).

Анализ данных математического моделирования показывает, что при развитии патологий дентина кариозного характера в образцах крови, десневой и дентинной жидкостях процентное содержание компоненты  $\alpha$ -спираль ( $\alpha\%$ ) во вторичной структуре белка не изменяется. Величина  $\alpha\%$  лежит в пределах 28% (кровь)—31% (десневая жидкость)—32% (дентинная жидкость), что значительно ниже той, которая наблюдается в норме для белка сыворотки крови (HSA) и должна быть в пределах 50–60% [44,47,48]. Данный факт является весомым индикатором изменений во вторичной структуре белка, сигнализируя о конформационных трансформациях, происходящих в органической составляющей биологических жидкостей пациентов при развитии кариеса дентина.

В то же время расчет важного для белков соотношения  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист показал, что наибольшие изменения во вторичной структуре наблюдаются в дентинной жидкости. В самом деле, соотношение  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист, как это было показано Jitto Titus и соавторами [22], является статистически значимым маркером развития воспалительных процессов. В работе [44] на примере альбумина сыворотки крови человека было доказано, что возникновение внутримолекулярных структур  $\beta$ -лист, связано с агрегацией белковых молекул, что, в свою очередь, отрицательно сказывается на функционировании белка. Математическая оценка спектральных данных для образцов сыворотки крови, проведенная в работе [22], показала, что в результате скрининга воспалительных процессов при развитии артрита соотношение  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист для вторичной структуры белка

должно принимать значения ниже уровня 3.9. Полученные нами результаты показывают, что коэффициент  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист для образца крови принимает значение  $\alpha_{VI}/\beta_{IV} = 1.5$ , для десневой жидкости  $\alpha_{VI}/\beta_{IV} = 1.32$  и для дентинной жидкости  $\alpha_{VI}/IV = 1.35$ , что значительно ниже порогового уровня. Для дентинной жидкости это соотношение принимает самое низкое значение, что связано со значительными изменениями в ее вторичной структуре из-за ее непосредственного контакта с тканью дентина.

Полученные в нашей работе результаты свидетельствуют о том, что развитие патологических процессов кариозного характера в дентине находит свое отражение в составе биологических жидкостей ротовой полости. Определенные изменения во вторичной структуре белка биологических жидкостей являются достоверными спектроскопическими сигнатурами патологии и могут быть легко детектированы без трудоемкого и нецелесообразного извлечения дентинной жидкости, поскольку одновременно присутствуют и в десневой жидкости, забор которой для скрининга не представляет собой столь сложной задачи.

## Заключение

На основе данных математического моделирования полосы Амид I и выделения в ней компонент вторичной структуры белков в образцах крови, десневой и дентинной жидкостей в работе установлено, что развитие патологических процессов кариозного характера в тканях дентина влияет на молекулярный состав биологических жидкостей ротовой полости человека, контактирующих с твердой тканью зуба. Изменение формы экспериментального профиля полосы Амид I связано с перераспределением интегральных интенсивностей компонент  $\alpha$ -спираль и  $\beta$ -лист вторичной структуры белка, а также частотным сдвигом компонент  $\beta$ -витки и  $\beta$ -лист.

Впервые показано, что во вторичной структуре белков образцов крови, десневой и дентинной жидкости не изменяется процентное содержание компоненты  $\alpha$ -спираль. Установлено, что  $\alpha$ -спираль/ $\beta$ -лист соотношение, рассчитанное из анализа вторичной структуры белков дентинной и десневой жидкостей, лежит ниже порогового уровня, при котором характерны значительные изменения во вторичной структуре белков биологических жидкостей человека, что в свою очередь однозначно свидетельствует о развитии патологии в тканях дентина.

Обнаруженные нами особенности в профиле колебательной полосы Амид I биологических жидкостей ротовой полости, совместно с обнаруженными спектральными маркерами развития кариозного процесса в дентине являются достоверными спектроскопическими сигнатурами патологии и могут быть легко детектированы на основе анализа только десневой жидкости.

## Благодарности

The part of this research was undertaken with The Infrared Microspectroscopy (IRM) beamline at the Australian Synchrotron.

## Финансирование

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 16-15-00003).

## Соблюдение этических стандартов

Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

## Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов

## Список литературы

- [1] Liu Y, Yao X, Liu YW, Wang Y // Caries Res. 2014. V. 48. N 4. P. 320. doi 10.1159/000356868
- [2] Ribeiro Figueiredo A.C., Kurachi C., Bagnato V.S. // Caries Res. 2005. V. 39. N 5. P. 393. doi 10.1159/000086846
- [3] Almahdy A., Downey F.C., Sauro S., Cook R.J., Sherriff M., Richards D., Watson T.F., Banerjee A., Festy F. // Caries Research. 2012. V. 46. N 5. P. 432. doi 10.1159/000339487
- [4] Rôças I.N., Alves F.R.F., Rachid C.T.C.C., Lima K.C., Assunção I.V., Gomes P.N., Siqueira J.F. // PLoS One. 2016. V. 11. N 5. doi 10.1371/journal.pone.0154653
- [5] Tanner A.C., Kressirer C., Faller L., Lake K., Dewhirst F., Kokarash A., Paster B., Frias-Lopez J. // J. Oral Microbiology. 2017. V. 9. N suppl. 1. P. 1325194. doi 10.1080/20002297.2017.1325194
- [6] Slimani A., Nouioua F., Panayotov I., Giraudeau N., Chiaki K., Shinji Y., Cloitre T., Levallois B., Gergely C., Cuisinier F., Tassery H. // International J. Experimental Dental Science. 2016. V. 5. N 1. P. 1. doi 10.5005/jp-journals-10029-1115
- [7] Salehi H., Terrer E., Panayotov I., Levallois B., Jacquot B., Tassery H., Cuisinier F. // J. Biophotonics. 2012. V. 6. N 10. P. 1. doi 10.1002/jbio.201200095
- [8] Seredin P., Goloshchapov D., Prutskij T., Ippolitov Y. // PLoS ONE. 2015. V. 10. N 4. P. 1. doi 10.1371/journal.pone.0124008
- [9] Seredin P.V., Goloshchapov D.L., Prutskij T., Ippolitov Yu.A. // Opt. Spectrosc. 2018. V. 125. N 5. P. 803. doi 10.1134/S0030400X18110267
- [10] Chen Q.G., Zhu H.H., Xu Y., Lin B., Chen H. // Laser Physics. 2015. V. 25. N 8. P. 085601. doi 10.1088/1054-660X/25/8/085601
- [11] Love R.M., Jenkinson H.F. // Critical Reviews in Oral Biology & Medicine. 2002. V. 13. N 2. P. 171. doi 10.1177/154411130201300207
- [12] Geraldeli S., Li Y., Hogan M.M.B., Tjaderhane L.S., Pashley D.H., Morgan T.A., Zimmerman M.B., Brogden K.A. // Arch. Oral Biol. 2012. V. 57. N 3. P. 264. doi 10.1016/j.archoralbio.2011.08.012
- [13] Barros S.P., Williams R., Offenbacher S., Morelli T. // Periodontol. 2000. 2016. V. 70. N 1. P. 53. doi 10.1111/prd.12107
- [14] Gao X., Jiang S., Koh D., Hsu C.-Y.S. // Periodontol. 2000. 2016. V. 70. N 1. P. 128. doi 10.1111/prd.12100
- [15] Xiang X.M., Liu K.Z., Man A., Ghiabi E., Cholakis A., Scott D.A. // J. Periodontal Research. 2010. V. 45. N 3. P. 345. doi 10.1111/j.1600-0765.2009.01243.x
- [16] Gupta G. // J. Med Life. 2013. V. 6. N 1. P. 7–13. PMID: 23599812
- [17] Carneiro L.G., Nouh H., Salih E. // J. Clinical Periodontology. 2014. V. 41. N 8. P. 733. doi 10.1111/jcpe.12262
- [18] Shaw R.A., Mantsch H.H. Infrared Spectroscopy in Clinical and Diagnostic Analysis // Encyclopedia of Analytical Chemistry. John Wiley & Sons, Ltd, 2006. P. 20.
- [19] Xiang X., Duarte P.M., Lima J.A., Santos V.R., Gonçalves T.D., Miranda T.S., Liu K.-Z. // J. Periodontology. 2013. V. 84. N 12. P. 1792. doi 10.1902/jop.2013.120665
- [20] Avraamova O.G., Ippolitov Y.A., Plotnikova Y.A., Seredin P.V., Goloshchapov D.V., Aloshina E.O. // Stomatologiya (Mosk). 2017. V. 96. N 2. P. 6–11. PMID: 28514339
- [21] Seredin P., Goloshchapov D., Kashkarov V., Ippolitov Y., Bambery K. // Results in Physics. 2016. V. 6. P. 315. doi 10.1016/j.rinp.2016.06.005
- [22] Titus J., Ghimire H., Viennois E., Merlin D., Perera A.G.U. // J. Biophotonics. 2018. V. 11. N 3. P. e201700057. doi 10.1002/jbio.201700057
- [23] Baldassarre M., Li C., Eremina N., Goormaghtigh E., Barth A., Baldassarre M., Li C., Eremina N., Goormaghtigh E., Barth A. // Molecules. 2015. V. 20. N 7. P. 12599. doi 10.3390/molecules200712599
- [24] Júnior C., Cesar P., Strixino J.F., Raniero L., Júnior C., Cesar P., Strixino J.F., Raniero L. // Research on Biomedical Engineering. 2015. V. 31. N 2. P. 116. doi 10.1590/2446-4740.0664
- [25] Elangovan S., Margolis H.C., Oppenheim F.G., Beniash E. // Langmuir. 2007. V. 23. N 22. P. 11200. doi 10.1021/la7013978
- [26] Fujii S., Sato S., Fukuda K., Okinaga T., Ariyoshi W., Usui M., Nakashima K., Nishihara T., Takenaka S. // Anal Sci. 2016. V. 32. N 2. P. 225. doi 10.2116/analsci.32.225
- [27] Seredin P., Goloshchapov D., Ippolitov Y., Vongsvivut P. // EPMA Journal. 2018. V. 9. N 2. P. 195. doi 10.1007/s13167-018-0135-9
- [28] Vongsvivut J., Pérez-Guaita D., Wood B.R., Heraud P., Khambatta K., Hartnell D., Hackett M.J., Tobin M.J. // Analyst. 2019. doi 10.1039/c8an01543k
- [29] Makhni T., Ilchenko O., Reynt A., Pilgun Y., Kutsyk A., Krasnenkov D., Ivasyuk M., Kukharsky V. // Ukrainian J. Physics. 2016. V. 61. N 10. P. 853. doi 10.15407/ujpe61.10.0853
- [30] Lopes J., Correia M., Martins I., Henriques A.G., Delgadillo I., da Cruz e Silva O., Nunes A. // J. Alzheimer's Disease. 2016. V. 52. N 3. P. 801. doi 10.3233/JAD-151163
- [31] Orphanou C.-M. // Forensic Science International. 2015. V. 252. P. e10. doi 10.1016/j.forsciint.2015.04.020
- [32] Matthäus C., Bird B., Miljković M., Chernenko T., Romeo M., Diem M. // Methods Cell Biol. 2008. V. 89. P. 275. doi 10.1016/S0091-679X(08)00610-9

- [33] *Badea I., Crisan M., Fetea F., Socaciu C.* // Romanian Biotechnological Letters. 2014. V. 19. N 6. P. 9817.
- [34] *Workman J., Weyer L.* Practical guide and spectral atlas for interpretive near-infrared spectroscopy. 2nd Edition. CRC Press, 2012. 209 p.
- [35] *Barth A.* // Biochimica et Biophysica Acta (BBA) — Bioenergetics. 2007. V. 1767. N 9. P. 1073.  
doi 10.1016/j.bbabi.2007.06.004
- [36] *Elkins K.M.* // J. Forensic Sciences. 2011. V. 56. N 6. P. 1580.  
doi 10.1111/j.1556-4029.2011.01870.x
- [37] *Seredin P.V., Goloshchapov D.L., Ippolitov Y.A., Kalivradzhiyan E.S.* // Russian Open Medical J. 2018. V. 7. N 1. P. e0106. doi 10.15275/rusomj.2018.0106
- [38] *Kong J., Yu S.* // Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai). 2007. V. 39. N 8. P. 549–559. PMID: 17687489
- [39] *Hoffner G., André W., Sandt C., Djian P.* // Reviews in Analytical Chemistry. 2014. V. 33. N 4.  
doi 10.1515/revac-2014-0016
- [40] *Guaita D.P., Ventura-Gayete J., Rambla C.P., Andreu M.S., de la Guardia M., Mateo S.G.* // Analytical and Bioanalytical Chemistry. 2012. V. 404. N 3. P. 649.  
doi 10.1007/s00216-012-6030-7N
- [41] *Stuart B.H.* Infrared Spectroscopy of Biological Applications // Encyclopedia of Analytical Chemistry. American Cancer Society, 2006. P. 31.
- [42] *Tajmir-Riahi H.A., N'soukpoé-Kossi C.N., Joly D.* // Spectroscopy. 2009. V. 23. N 2. P. 81. doi 10.3233/SPE-2009-0371
- [43] *Yang H., Yang S., Kong J., Dong A., Yu S.* // Nature Protocols. 2015. V. 10. N 3. P. 382. doi 10.1038/nprot.2015.024
- [44] *Huang Y.-T., Liao H.-F., Wang S.-L., Lin S.-Y.* // AIMS Biophysics 2016. V. 3. P. 247. doi 10.3934/biophy.2016.2.247
- [45] *Depciuch J., Sowa-Kućma M., Nowak G., Dudek D., Siwek M., Styczeń K., Parlińska-Wojtan M.* // J. Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2016. V. 131. P. 287.  
doi 10.1016/j.jpba.2016.08.037
- [46] *Petibois C., Gionnet K., Gonçalves M., Perromat A., Moenner M., Déléris G.* // Analyst. 2006. V. 131. N 5. P. 640.  
doi 10.1039/B518076G
- [47] *Guo H., Huang F., Li Y., Fang T., Zhu S., Chen Z.* // Analytical Letters. 2016. V. 49. N 18. P. 2964.  
doi 10.1080/00032719.2016.1166507
- [48] *de Cássia Fernandes Borges R., Navarro R.S., Giana H.E., Tavares F.G., Fernandes A.B., Silveira L., Jr.* // Research on Biomedical Engineering. 2015. V. 31. N 2. P. 160.  
doi 10.1590/2446-4740.0593