

МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

УДК 543.429.23: 616-073.584

©Коллектив авторов

КОЛИЧЕСТВЕННОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ КОНЦЕНТРАЦИЙ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ ЧЕЛОВЕКА МЕТОДОМ СПЕКТРОСКОПИИ ЯМР ^1H

Т.Н. Колоколова^{1}, Н.М. Сергеев¹, А.Ю. Корольков²*

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119992 Москва,

Ленинские горы, д. 1, стр. 3.; тел.: (495) 939-36-00, 939-48-82;

эл. почта: tatkol2003@mail.ru, sergeyev@nmr.chem.msu.ru

²Российский Университет Дружбы Народов, медицинский факультет, Москва.

Подобраны оптимальные условия регистрации спектров ЯМР ^1H мочи для достижения максимальной точности количественного анализа. Исследованы образцы мочи больных острым панкреатитом, представлены спектральные данные идентифицированных в моче метаболитов, приведены результаты их количественного определения. Показана перспективность использования спектроскопии ЯМР ^1H при изучении состава мочи с целью разработки новых лабораторных методов диагностики заболеваний.

Ключевые слова: метаболиты, моча, спектроскопия ЯМР ^1H , острый панкреатит.

ВВЕДЕНИЕ. Быстрое совершенствование импульсных спектрометров ЯМР высокого разрешения, использующих сверхпроводящие соленоиды для создания сверхсильных магнитных полей, привело в последние годы к многократному росту их чувствительности и разрешающей способности. Это открыло возможность анализа с помощью спектроскопии ЯМР большинства биологических жидкостей (моча, плазма крови, цереброспинальная жидкость, слюна, околоплодные воды, желчь, слезная жидкость и т.д.). Метод ЯМР позволяет одновременно определять в них сотни компонентов, в том числе важнейшие метаболиты (промежуточные и конечные продукты реакций метаболизма, представляющие собой небольшие органические молекулы с молекулярной массой до 2000 Да) и биомаркеры (специфические метаболиты, содержащиеся в биологической жидкости, по наличию или отсутствию которых можно судить об определенной патологии), и тем самым проводить более полную диагностику организма, обнаруживать на ранних стадиях различные патологии, в том числе, например, генетически обусловленные заболевания новорожденных, выявлять группы риска пациентов, предрасположенных к сердечно-сосудистым заболеваниям, отслеживать реакции организма на воздействия патогенов, токсических веществ и лекарственных препаратов в динамике [1-3]. Новые возможности ЯМР использованы медиками и биологами многих стран для создания эффективных методов исследования метаболизма, в медицинской диагностике и для решения прикладных задач в создании новых лекарственных препаратов.

* - адресат для переписки

Не менее быстрыми темпами одновременно с ЯМР развивались и другие аналитические методы, среди которых, в первую очередь, необходимо отметить масс-спектрометрию. Гибридные системы (газожидкостная хроматография – масс-спектрометрия (ГЖХ-МС) и высокоэффективная жидкостная хроматография – масс-спектрометрия (ВЭЖХ-МС)) при анализе биологических жидкостей составляют особенно полезное дополнение к ЯМР. Спектроскопия ЯМР ^1H высокого разрешения оказалась особенно подходящей для исследования составов биологических жидкостей, поскольку интенсивность сигналов в спектрах ЯМР пропорциональна количеству магнитных ядер, спектр которых регистрируется, и не зависит от того, в каком структурном окружении эти ядра находятся. Именно поэтому спектроскопия ЯМР ^1H позволяет определять одновременно сотни компонентов за относительно короткое время. В этом отношении метод ЯМР предпочтительнее масс-спектрометрии, которая, как правило, не позволяет в одном эксперименте одновременно количественно определять несколько компонентов разной химической природы. Еще одно несомненное достоинство ЯМР – его неdestructивность. Этот метод позволяет многократно использовать пробу и требует минимальной пробоподготовки. Спектр ЯМР содержит всю информацию о структуре определяемого соединения (химические сдвиги различных протонов, мультиплетность сигналов), достаточную для его надежной идентификации без привлечения других методов. Методы ЯМР отличаются от жидкостной хроматографии тем, что каждому отдельному метаболиту на хроматограмме соответствует только один сигнал, а в спектре ЯМР часто один метаболит дает несколько сигналов с определенной мультиплетностью, что позволяет более надежно идентифицировать химическое соединение и достоверно установить его структуру. Информацию о составе образца биологической жидкости получают из многокомпонентного спектра, который может быть использован для однозначного определения наличия или отсутствия определенного метаболита, так как в спектре ЯМР молекула дает обычно несколько резонансных сигналов с определенными химическими сдвигами, интенсивностями и константами спин-спинового взаимодействия. Кроме того, в спектре можно легко обнаружить новые сигналы метаболитов независимо от химических изменений, произошедших с молекулой в организме.

Основной недостаток ЯМР состоит в том, что по своей чувствительности он значительно уступает масс-спектрометрии и методам оптической спектроскопии. Однако этот недостаток в импульсном эксперименте можно преодолеть с помощью накопления спектра. Суммирование результатов при многократном прохождении спектра увеличивает отношение сигнал/шум в спектре пропорционально корню квадратному из числа прохождений. Поскольку каждое прохождение требует обычно не более 3-5 с, современный спектрометр ЯМР с рабочей частотой 400–600 МГц позволяет за относительно короткое время (порядка 10 мин) получить спектр, в котором можно обнаружить соединения в концентрациях до 10^{-8} М.

С помощью спектроскопии ЯМР ^1H мочи было выявлено несколько новых биомаркеров дисфункции почек: триметиламиноксид (ТМАО), диметиламин (ДМА), диметилглицин (ДМГ), 1-метилгистидин и 3-метилгистидин [4-6]. Так, например, в моче больных с хронической почечной недостаточностью отмечено увеличение концентрации креатинина, ТМАО и ДМА [7]. Спектроскопия ЯМР ^1H мочи широко используется также для обнаружения врожденных дефектов метаболизма [8-12]. Благодаря тому, что спектроскопия ЯМР ^1H является достаточно экспрессным методом определения различных метаболитов в биологических жидкостях, она имеет большие преимущества для изучения функционирования почек при отравлениях организма ядами. Например, её использовали при определении отравления организма фенолом [13], ацетилсалициловой кислотой [14], растворителем для краски [15]. На выявление отравления организма спиртами требуется всего 10-15 мин, что позволяет достаточно быстро провести лечение, или предотвратить развитие серьезных

расстройств. С помощью метода ЯМР по спектрам мочи лабораторных животных (мышей, крыс и т.д.) изучают фармакокинетику и токсичность лекарственных препаратов и ксенобиотиков [16-18].

В подобных исследованиях используют специальный подход для анализа спектров, основанный на свертке информации. Сначала отбирают группу “здоровых” пациентов (обычно от нескольких десятков до нескольких сотен) и измеряют спектры взятых у них образцов биожидкости в строго стандартных условиях. Затем каждый из зарегистрированных спектров преобразуют в гистограмму: при этом спектр разбивается на небольшие интервалы (например, с шагом 0,05 миллионной доли (м.д.)), в каждом из которых определяется интегральная интенсивность сигнала. При этом количество данных сокращается на несколько порядков без значительной потери информации. Затем все интегральные интенсивности из гистограмм переносят в сводную таблицу по спектрам для всех измеренных образцов. Полученную матрицу данных обрабатывают с помощью стандартных методов статистического анализа. Чаще всего используют метод главных компонент (МГК) (в англоязычной литературе – Principal Component Analysis (PCA)): компьютер определяет спектральные особенности, которые показывают наибольшую разницу между индивидуальными спектрами, и строит график в координатах этих главных компонент (факторное пространство), где один образец биологической жидкости представлен одной точкой. Для близких спектров анализ МГК дает точки, близко расположенные друг к другу в факторном пространстве. Образцы биологической жидкости здоровых людей группируются в виде отдельного кластера. Если какая-то точка сильно отклоняется от этого центрального кластера, то это говорит об аномальности данного образца, то есть о нарушении метаболизма (например, вследствие наличия заболевания) у человека. Эти образцы далее более подробно изучают с привлечением двумерной спектроскопии ЯМР с целью выявления природы аномалии [19]. Таким образом, на таком графике точки от аномальных образцов будут располагаться вне кластера биообразцов здоровых лиц. После выявления аномального образца тщательно изучают его спектр и сделают отнесение всех сигналов в нем, чтобы понять, какие именно отклонения в метаболизме имеют место в данном организме. Таким образом, при разработке экспрессных скрининговых методик на основе спектроскопии ЯМР ^1H , таких биологических жидкостей как моча и кровь, большее внимание уделяется качественным изменениям состава (в терминах “отсутствует” или “присутствует” какое-то определенное вещество – биомаркер патологии), или фиксируются полуколичественные изменения на уровне “много”, “мало” или “отсутствует”. По нашему мнению, такой подход не позволяет проводить серьезное сравнение данных метода ЯМР с данными других аналитических методов. Поэтому мы использовали в своей работе принципиально иной подход – определяли абсолютные концентрации отдельных метаболитов в моче. При этом возникает вопрос о точности результатов, полученных методом спектроскопии ЯМР ^1H .

Целью данной работы является верификация данных, полученных на основе спектроскопии ЯМР ^1H в качестве метода анализа метаболического состава биологических жидкостей человека на примере мочи, оптимизация условий регистрации спектров ЯМР ^1H водных образцов для проведения такого рода анализов. Это является необходимым шагом для выявления метаболических нарушений в организме и разработки эффективных методов диагностики и лечения патологий.

МЕТОДИКА.

Приготовление стандартного раствора ДСС с концентрацией 24,0 мМ. ДСС - натриевая соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновой кислоты в виде кристаллогидрата, $\text{C}_6\text{H}_{15}\text{O}_3\text{SSiNa}\cdot\text{H}_2\text{O}$, фирма “Acros Organics”, содержание основного вещества - не менее 99%. Раствор готовили растворением точной навески (0,1412 г) в дейтерированной воде (D_2O , процент дейтерирования 99,9%,

фирма “Aldrich”) в мерной колбе емкостью 25 мл. По отношению к сигналу ДСС при 0,64 м.д. методом интегрирования определяли интенсивности всех остальных сигналов в спектрах. ДСС необходим также для введения δ -шкалы химических сдвигов в спектрах ЯМР ^1H .

Образцы сравнения. Для отработки методики эксперимента использовался водный стандартный раствор креатинина с концентрацией 0,177 мМ (фирма “DiaSys”, Германия), из которого готовились два рабочих раствора.

1-ый рабочий раствор креатинина: 500 мкл 0,177 мМ раствора креатинина помещали в стандартную ЯМР ампулу (с диаметром 5 мм), содержащую 50 мкл 24,0 мМ раствора ДСС в D_2O .

2-ой рабочий раствор креатинина: 250 мкл 0,177 мМ раствора креатинина помещали в стандартную ЯМР ампулу, содержащую 25 мкл 24,0 мМ раствора ДСС в D_2O , добавляли 250 мкл дистиллированной воды и 25 мкл D_2O .

Исходный раствор аминокислот, содержащий 1,02 мМ глутамина и 0,82 мМ тирозина, готовили растворением их точных навесок в дистиллированной воде в мерной колбе емкостью 200 мл. Для приготовления раствора использовались глутамин (фирма “Sigma-Aldrich”, Германия, содержание основного вещества – не менее 99 %) и тирозин (фирма “Reanal”, Венгрия, квалификация “ч.д.а.”).

1-ый рабочий раствор аминокислот: 450 мкл исходного раствора помещали в стандартную ЯМР ампулу, содержащую 50 мкл 24,0 мМ раствора ДСС в D_2O .

2-ой рабочий раствор аминокислот: 150 мкл исходного раствора помещали в стандартную ЯМР ампулу, содержащую 50 мкл 24,0 мМ раствора ДСС в D_2O , добавляли 300 мкл дистиллированной воды.

Приготовление 0,2 М фосфатного буферного раствора с pH 7,5. Для приготовления 0,2 М раствора соли дигидрофосфата калия 2,72 г KH_2PO_4 (фирма “Диа-М”, квалификация “ос.ч.”) растворяли в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе емкостью 100 мл, доводили до метки водой. Для приготовления 0,2 М раствора соли гидрофосфата калия 3,48 г K_2HPO_4 (фирма “Диа-М”, квалификация “ос.ч.”) растворили в 50 мл дистиллированной воды в мерной колбе емкостью 100 мл, доводили до метки водой. Для приготовления 100 мл 0,2 М раствора калийного фосфатного буфера смешивали 16,0 мл 0,2 М раствора соли дигидрофосфата калия и 84,0 мл 0,2 М раствора соли гидрофосфата калия.

Приготовление образцов мочи для анализа методом ЯМР. Стандартные процедуры отбора проб мочи для клинических анализов в медицине хорошо отработаны [20, 21]. Их использовали и для отбора проб при анализах методом ЯМР.

16 образцов утренней мочи пациентов с разными степенями тяжести панкреатита были предоставлены для анализа хирургическим отделением городской больницы № 64 (г. Москва).

К точно отмеренному объему биологической жидкости (400-550 мкл) добавляли 150-250 мкл 0,2 М водного фосфатного буферного раствора с pH 7,5 с целью выведения pH на значения, близкие к нейтральным. Данный раствор переносили в стандартную ЯМР ампулу, содержащую точно отмеренный объем (55–100 мкл) 24,0 мМ раствора ДСС в D_2O .

Регистрация спектров ЯМР ^1H . Регистрацию спектров ЯМР проводили на спектрометре Bruker AVANCE с рабочей частотой 600 МГц при температуре 295 К с использованием инверсного датчик (^1H , ^{13}C , ^{15}N). Для подавления сигнала воды применяли специальные импульсные последовательности (преднасыщение и более сложные многоимпульсные последовательности), такие как *zgpr*, *noesypr1d*, *noesygppr1d*. При регистрации использовались 90° -ные импульсы.

Шкалу химических сдвигов калибровали по сигналу ДСС при 0,015 м.д.

Расчет концентраций метаболитов. Обработку спектров, коррекцию базовой линии и интегрирование резонансных сигналов проводили с использованием программы “XWINNMR” (версия 3.1). Концентрации метаболитов определяли по интегральным интенсивностям спектральных пиков, по сравнению с интенсивностью сигнала ДСС при 0,64 м.д., согласно формуле:

$$c = \frac{I}{I(\text{ДСС})} \times c(\text{ДСС}) \times \frac{2}{q} \times \frac{V_{\text{ДСС}}}{V} \quad (1)$$

где c - концентрация метаболита, ммоль/л;

I и $I(\text{ДСС})$ - интегралы данного сигнала метаболита и сигнала ДСС, соответственно;

$V_{\text{ДСС}}$ - объем раствора ДСС, добавленного к биожидкости, мкл;

V - объем биожидкости, взятой для анализа, мкл;

2 - число эквивалентных протонов в CH_2 -группе ДСС, дающих сигнал при 0,64 м.д.;

q - число эквивалентных протонов метаболита, дающих данный сигнал;

$c(\text{ДСС})$ - концентрация раствора ДСС в D_2O , ммоль/л.

Результаты из n параллельных измерений ($\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_n$) представлены в виде

среднего значения (\bar{x}) и его доверительных границ $\left(\bar{x} \pm \frac{t(P, f)s(x)}{\sqrt{n}} \right)$ для заданной

вероятности (P), где t - коэффициент Стьюдента для доверительной вероятности P и числа степеней свободы f ($f = n-1$). Среднее значение (\bar{x}), (абсолютное) стандартное отклонение ($s(x)$) и относительное стандартное отклонение ($s_r(x)$) рассчитывали по следующим формулам [22]:

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad (2)$$

$$s(x) = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n-1}} \quad (3)$$

$$s_r(x) = \frac{s(x)}{\bar{x}} \quad (4)$$

Определение концентрации креатинина в моче методом Яффе. Параллельно с анализом методом ЯМР проводился анализ тех же самых 9 образцов мочи в клинической лаборатории городской больницы № 64 на содержание креатинина с помощью стандартной методики на основе кинетического теста (методом Яффе). Методика, применяемая в клинической лаборатории больницы, разработана фирмой "DiaSys" (DiaSys Diagnostic Systems GmbH & Co. KG, Германия) для определения концентраций креатинина в моче в диапазоне от 0,90 до 66,50 мМ, методика обеспечивает выполнение измерений с погрешностью, не превышающей 6,5%. Концентрацию креатинина в моче определяли по скорости образования пикрин-креатининового комплекса, которая определяется по скорости изменения оптической плотности при облучении раствора светом с длиной волны 492 нм ($l = 1$ см). В качестве реагентов использовали водные растворы гидроокиси натрия с концентрацией 0,16 М (рН примерно 13,0) и пикриновой кислоты с концентрацией 4,0 мМ.

Перед анализом образцов мочи фотометр калибровали по стандартному раствору креатинина с концентрацией 0,177 мМ (фирма "DiaSys"). Для этого к 1000 мкл раствора NaOH добавляли 50 мкл стандартного раствора креатинина и перемешивали. Через 5 мин к полученному раствору добавляли 250 мкл раствора

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ

пикриновой кислоты, перемешивали, инкубировали 1 мин и измеряли оптическую плотность раствора два раза (A_1 и A_2) с временным интервалом 2 мин. Из полученных данных вычитали оптическую плотность холостого раствора (без креатинина). Аналогичным образом измеряли оптические плотности растворов с образцами мочи, образцы мочи перед проведением анализа разбавляли в 50 раз дистиллированной водой. Концентрацию креатинина (мМ) рассчитывали по формуле:

$$c = \frac{\Delta A_{\text{образец}}}{\Delta A_{\text{станд}}} \cdot c_{\text{станд}} - 50$$

$$\Delta A_{\text{образец}} = (A_2 - A_1)_{\text{образец}} - (A_2 - A_1)_{\text{холост}}$$

$$\Delta A_{\text{станд}} = (A_2 - A_1)_{\text{станд}} - (A_2 - A_1)_{\text{холост}}$$

где $c_{\text{станд}}$ – концентрация стандартного раствора креатинина (0,177 мМ).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.

Выбор внутреннего стандарта. В качестве внутреннего стандарта использовали ДСС (натриевая соль 2,2-диметил-2-силапентан-5-сульфоновой кислоты) – достаточно инертное соединение, хорошо растворяющееся в водных средах; кроме того, химические сдвиги его сигналов не зависят от температуры и pH среды (в диапазоне от 2 до 10). В спектре ЯМР ^1H ДСС дает 4 сигнала с соотношением интенсивностей 9:2:2:2 – синглет $\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ -группы при 0,015 м.д. и мультиплеты трех CH_2 -групп при 0,64, 1,77 и 2,92 м.д. По отношению к сигналу ДСС при 0,64 м.д. методом интегрирования определяли интенсивности всех остальных сигналов в спектрах. На основании интегральных интенсивностей по формуле (1) рассчитывали концентрации всех метаболитов.

Подбор оптимальных условий для подавления сигнала воды в спектрах ЯМР ^1H мочи. Основной компонент любой биожидкости – вода, интенсивность сигнала протонов которой на несколько порядков превышает интенсивности сигналов растворенных в ней метаболитов. Вода в спектрах ЯМР ^1H мочи дает широкий сигнал при 4,77 м.д. с шириной ~ около 40 Гц на полувысоте сигнала, и этот сигнал перекрывает довольно большой спектральный диапазон (от 3,7 до 5,5 м.д.), а также искажает базовую линию спектра.

Для подавления сигнала воды применяли специальные импульсные последовательности фирмы “Bruker”: *zgpr* [23], *noesyprld* [24], *noesygppld*. В качестве опорного сигнала в канале стабилизации резонансных условий спектрометра при регистрации спектров на ядре ^1H использовали сигнал ЯМР дейтерия (^2H) от добавленной тяжелой воды D_2O (в количестве 10% от объема взятой для анализа биожидкости).

На рисунке приведены спектры образца мочи человека с подавлением и без подавления сигнала воды. В спектре А самую большую интенсивность имеют сигнал воды (с центром в области 4,7 м.д.) и сигнал мочевины (с центром около 5,6 м.д.). Они закрывают наиболее важную часть спектра в области 3-6 м.д. При регистрации спектра В для подавления сигнала воды использована импульсная последовательность *noesyprld*. Обратим внимание на то, что в спектре вместе с сигналом воды исчез также сигнал подвижных протонов NH_2 -групп мочевины (при 5,6 м.д.), которые очень быстро обмениваются с протонами воды. В этом спектре нужная область открыта, и видно много сигналов.

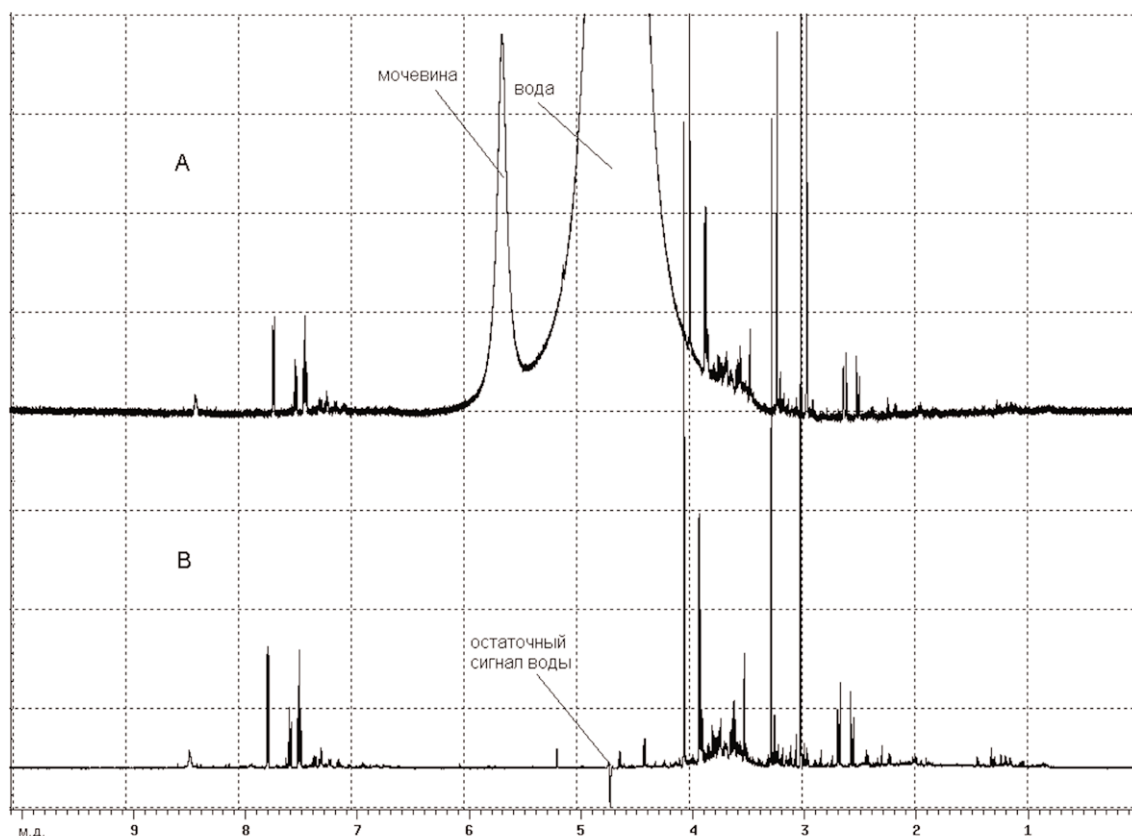


Рисунок.

Спектры ЯМР ^1H мочи человека (спектрометр AVANCE 600 МГц (фирмы “Bruker”)):

А – спектр без подавления сигнала воды (суммированы 32 прохождения спектра);

В – спектр с подавлением сигнала воды с помощью импульсной последовательности *noesypr1d* (суммировано 256 проходов спектра).

Используемые импульсные последовательности включают в себя непрерывное радиочастотное воздействие на частоте сигнала воды, что может вызвать искажение интенсивностей сигналов метаболитов вблизи от сигнала воды. Поэтому возникает необходимость нахождения оптимальных условий для регистрации спектров ЯМР ^1H , при которых бы существенно подавлялся сигнал воды и при этом несильно искажались бы сигналы метаболитов. Этот этап анализа отработывался на растворе креатинина с концентрацией 0,177 мМ. В спектре ЯМР ^1H креатинин дает два синглета при 3,04 м.д. (сигнал CH_3 -группы) и 4,05 м.д. (сигнал CH_2 -группы). Эксперименты показали, что оптимальная мощность подавления для последовательности *zgpr* составляет 62-68 dB, а для *noesygppr1d* - 48-68 dB. Дополнительное воздействие импульсами градиента магнитного поля в последовательности *noesygppr1d* позволяют снизить мощность непрерывного воздействия для подавления сигнала воды (параметр P_{CW}) до 48-55 dB (по сравнению с импульсной последовательностью *zgpr*, где мощность радиочастотного воздействия составляла не менее 62 dB). При большой мощности подавления (P_{CW} 75 dB и более) воздействие начинает затрагивать близко расположенный к подавляемому сигналу воды сигнал креатинина при 4,05 м.д. (интенсивность сигнала при этом занижается), а при малой мощности подавления (P_{CW} 40 dB и менее) вследствие плохого подавления сигнала воды сильно искажается базовая линия под этим сигналом, и интенсивность сигнала креатинина при 4,05 м.д. завышается.

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ

Сравнение данных, полученных при использовании разных импульсных последовательностей для подавления сигнала воды в спектре ЯМР ^1H , проводилось на растворах аминокислот. В спектре ЯМР ^1H глутамин дает три сигнала: мультиплет при 2,14 м.д. (сигнал CH_2 -группы), мультиплет при 2,45 м.д. (сигнал CH_2 -группы) и триплет при 3,78 м.д. (сигнал CH -группы), а тирозин пять сигналов: дублет-дублетов при 3,05 м.д. (сигнал CH -группы), дублет-дублетов при 3,21 м.д. (сигнал CH -группы), дублет-дублетов при 3,95 м.д. (сигнал CH -группы), мультиплет при 6,90 м.д. (сигналы двух CH -группы ароматического кольца) и мультиплет при 7,20 м.д. (сигналы двух CH -группы ароматического кольца). Концентрацию тирозина по сигналу 6,90 м.д. не рассчитывали, так как этот сигнал в спектре перекрывался с широким синглетом NH_2 -группы глутамина. Для каждого из растворов регистрировали по два спектра. Во всех этих экспериментах для получения хорошего соотношения сигнал/шум число накоплений составляло 512. Время накопления ССИ (время выборки) составляло 3,77 с, задержка между импульсами – 5 с. Расчеты проводили с использованием формул (2), (3) и (4). Данные этой серии экспериментов представлены в таблице 1. Из таблицы видно, что импульсные последовательности *noesygpplrd* и *zgpr* дают близкие результаты, в то время, как данные с применением последовательности *noesyprld* несколько занижены по тирозину, и разброс между полученными концентрациями в параллельных измерениях несколько больше, чем в случае *noesygpplrd* и *zgpr*. Поэтому от использования последовательности *noesyprld* отказались, и для регистрации спектров ЯМР ^1H мочи и определения по ним концентраций метаболитов применяли две импульсные последовательности *noesygpplrd* и *zgpr*.

Таблица 1. Определение концентраций (мМ) глутамина и тирозина методом спектроскопии ЯМР ^1H в зависимости от применяемой импульсной последовательности для подавления сигнала воды в спектре.

Компонент	Импульсная последовательность	Введено, мМ	Найдено, мМ	S_r^1
Глутамин ($n=12$, $P=0,95$)	«zgpr»	1,02	1,01±0,03	0,05
	«noesygpplrd»	1,02	1,03±0,02	0,03
	«noesyprld»	1,02	1,02±0,07	0,1
Тирозин ($n=16$, $P=0,95$)	«zgpr»	0,82	0,81±0,03	0,06
	«noesygpplrd»	0,82	0,82±0,03	0,03
	«noesyprld»	0,82	0,77±0,06	0,2

Примечание: 1 Относительное стандартное отклонение.

Идентификация сигналов метаболитов в спектрах мочи. Для отнесения сигналов метаболитов в спектрах ЯМР ^1H мочи использовали литературные данные [25, 26] и дополнительно регистрировали спектры модельных растворов с определённым содержанием интересующего нас вещества при заданном значении pH. Химические сдвиги сигналов некоторых метаболитов (например, аланина, цитрата, креатинина, тирозина) сильно зависят от значения pH раствора, а pH для разных образцов мочи меняются в широком диапазоне (от 5 до 8), поэтому перед анализом образца мы добавляли к биожидкости небольшое количество фосфатного буфера для упрощения отнесения этих сигналов. Главная трудность в решении задачи идентификации сигналов метаболитов в спектрах ЯМР ^1H мочи связана с перекрыванием некоторых сигналов в одномерных спектрах. Ситуация осложняется тем, что на состав мочи сильно влияют разные воздействия на организм: физические нагрузки, стресс, введение лекарственных препаратов и ксенобиотиков (чужеродных для организма химических веществ), режим питания, болезни, возраст субъекта, состав потребляемой пищи [1, 2]. Проблему идентификации при перекрывании сигналов решали с привлечением двумерных ЯМР экспериментов (COSY-90 и COSY-45).

Наиболее информативными в спектрах мочи являются спектральный диапазон от 1,0 до 5,0 м.д., куда попадают сигналы аланина, пирувата, цитрата, ацетата, лактата, глицина, диметиламина, креатина, креатинина, ТМАО и т.д., а также ароматическая область спектра (от 5 до 10 м.д.), где видны сигналы гиппурата и тирозина.

При 1,48 м.д. наблюдается дублет от метильных протонов аланина с характерной константой спин-спинового взаимодействия (КССВ), равной 7,22 Гц. В зависимости от pH данный сигнал иногда смещается до 1,50 м.д. Несмотря на то, что концентрация аланина не превышает 1 мМ, эта аминокислота довольно легко определяется в моче, поскольку в данной области спектра очень редко наблюдаются другие сигналы.

При 2,34 м.д. расположен синглет пирувата, который образуется при окислении молочной кислоты. В спектрах мочи иногда бывают синглеты при 1,92 и 2,23 м.д., относящиеся к ацетату и ацетоацетату соответственно. В этих областях спектра всегда имеются несколько близкорасположенных синглетов, что затрудняет однозначное их отнесение.

Цитрат присутствовал во всех образцах мочи. Его можно определить по характерным дублетам при 2,55 и 2,70 м.д. с константами спин-спинового взаимодействия 16,1 Гц. При 2,73 м.д. наблюдается синглет двух метильных групп диметиламина (ДМА), который может частично перекрываться (при определенных значениях pH) с дублетом цитрата.

Креатинин является одним из основных компонентов мочи и дает два интенсивных синглета при 3,05 и 4,06 м.д. от CH_3 и CH_2 -групп соответственно. Уровень креатинина является показателем функциональной активности почек. Концентрация креатинина в моче повышается при сахарном диабете, инфекционных заболеваниях, а понижается – при мышечной атрофии, параличе, анемии, прогрессирующем поражении почек, лейкемии [21, 27].

Область спектра 3,5–4,0 м.д. содержит несколько сигналов от α - и β -аномеров глюкозы. Глюкоза в моче присутствует в малом количестве, и ее очень редко удается определить в спектрах ЯМР ^1H . α -Глюкозу можно обнаружить по характерному дублету при 5,23 м.д. с КССВ 3,71 Гц, а β -глюкозу по дублету при 4,65 м.д. с КССВ 7,95 Гц.

Одним из метаболитов, дающих сигнал в ароматической части спектра, является гиппурат. Ему принадлежат три мультиплета при 7,55 (два протона ароматического кольца), 7,64 (один протон ароматического кольца) и 7,83 м.д. (два протона ароматического кольца).

Кроме гиппурата по ароматической части спектра можно также определять и тирозин, который даёт два дублета при 6,87 и 7,17 м.д. В отличие от гиппурата, тирозин в образцах находится в меньшем количестве, что иногда затрудняет его определение.

По синглету при 8,46 м.д. определяли формиат, который присутствует в моче в очень низких концентрациях.

Сопоставление данных, полученных методом ЯМР ^1H с данными другого метода. В 9 образцах утренней мочи пациентов с разными степенями тяжести панкреатита параллельно определялись концентрации креатинина двумя методами: методом спектроскопии ЯМР ^1H и кинетическим тестом на основе метода Яффе. Определение концентраций креатинина в образцах мочи по методу Яффе проводился клинической лабораторией городской больницы № 64 согласно стандартной методике. Результаты исследования представлены в таблице 2. Расхождение между концентрациями (D), полученными по методу Яффе и по методу ЯМР, рассчитывали по формуле:

$$D = \frac{\overline{X_{\text{ЯМР}}} - \overline{X_{\text{Яффе}}}}{\overline{X_{\text{Яффе}}}} \quad (5)$$

ЯМР-СПЕКТРОСКОПИЧЕСКОЕ ОПРЕДЕЛЕНИЕ МЕТАБОЛИТОВ В МОЧЕ

где $\bar{X}_{\text{ЯМР}}$ и $\bar{X}_{\text{Яффе}}$ - средние значения концентрации из n параллельных измерений для одного и того же образца мочи, полученные методом спектроскопии ЯМР ^1H и методом Яффе, соответственно (рассчитывали по формуле (2)). При общем диапазоне значений концентраций креатинина от 9,3 до 36,2 мМ расхождения составляли около 7%.

Таблица 2. Концентрации креатинина в образцах мочи, полученные стандартной клинической методикой (метод Яффе) и спектроскопией ЯМР ^1H .

№ образца мочи	Концентрация креатинина (мМ)		Расхождение между данными $D = \frac{\bar{X}_{\text{ЯМР}} - \bar{X}_{\text{Яффе}}}{\bar{X}_{\text{Яффе}}}$
	Метод Яффе ($n=4, P=0,95$)	Спектроскопия ЯМР ^1H ($n=4, P=0,95$)	
8	27,6±0,4	31±2	0,12
9	18,2±0,7	17,1±0,4	-0,06
10	15,1±0,6	16±2	0,06
11	16,2±0,6	17,1±0,6	0,05
13	39,5±0,5	36,2±0,4	-0,08
14	8,7±0,3	9,3±0,3	0,07
17	31,4±0,4	32,9±0,2	0,05
18	23,8±0,9	25,8±0,4	0,09
19	15,8±0,6	16,2±0,3	0,03

Для сравнения двух серий анализов, выполненных независимо друг от друга, применили “парный t-критерий”: вычисленная тестовая статистика (0,93) получилась меньше, чем критическое значение t ($P = 0,95, f = 8$) = 2,31 [22, с. 125-126]. Таким образом, различия между данными, полученными двумя методами (по методу Яффе и методом спектроскопии ЯМР ^1H) можно признать незначимыми.

Определение концентраций метаболитов мочи методом спектроскопии ЯМР ^1H . В спектрах ЯМР ^1H 16 образцов мочи пациентов с разной степенью тяжести панкреатита удалось однозначно идентифицировать и количественно определить 8 метаболитов: аланин, цитрат, глицин, формиат, гиппурат, тирозин, диметиламин, креатинин. Для анализа образцов использовались импульсные последовательности *noesygppr1d*, и *zgpr*. Во всех экспериментах для получения хорошего соотношения сигнал/шум число накоплений составляло 256 (время регистрации спектра составляло около 30 мин.). Время выборки ССИ (*aq*) – 3,77 с, задержка между импульсами – 4 с. Полученные результаты сравнили с литературными данными для здоровых лиц (без патологий). Для удобства сравнения данных полученных методом спектроскопии ЯМР ^1H значения концентраций метаболитов пересчитали в другую единицу измерения (ммоль/моль креатинина). В моче здоровых лиц концентрация креатинина составляет 8 – 27 мМ [28]. Из таблицы 3 видно, что имеется тенденция по уменьшению концентраций глицина и цитрата в моче пациентов больных панкреатитом по сравнению с группой здоровых лиц.

Таблица 3. Сравнение концентраций метаболитов в моче пациентов, больных разными степенями тяжести панкреатита, и здоровых лиц (n – количество проанализированных образцов).

Метаболит	Концентрации			
	мг/мл/л	мг/мл/моль креатинина		
	Пациенты с заболеванием панкреатит ^а ($n = 16$)	Пациенты с заболеванием панкреатит ^а ($n = 16$)	Здоровые лица ^а ($n = 13$) [25]	Здоровые лица ^б ($n = 20$) [26]
Аланин	0,10 – 0,75	6 – 44	0 – 45	$36,4 \pm 1,5$
Цитрат	0,29 – 5,48	18 – 322	102 – 611	$213,6 \pm 8,8$
Глицин	0,24 – 2,75	27 – 108	48 – 233	Нет данных
Формиат	0,06 – 0,73	2 – 42	Нет данных	Нет данных
ДМА	0,25 – 1,72	20 – 101	Нет данных	$25,2 \pm 1,2$
Креатинин	5,0 – 36,2	*	*	*
Тирозин	0,13 – 1,78	6 – 101	Нет данных	Нет данных
Гиппурат	0,10 – 5,17	20 – 327	20 – 770	$341,0 \pm 20,2$

Примечание: а) Диапазон концентраций (range) для данной группы лиц из n образцов.

б) Концентрации для данной группы лиц приведены в виде: средней \pm ошибки средней.

* Содержание метаболитов в моче определяли относительно содержания креатинина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Оптимизированы условия для регистрации спектров ЯМР ^1H мочи. Применение импульсных последовательностей *zgpr* и *poesygppr1d*, используемых для подавления сигнала воды, позволяет получить правильные и хорошо воспроизводимые результаты при определении концентраций метаболитов мочи. В спектрах ЯМР ^1H мочи идентифицированы 8 количественно определяемых метаболитов: аланин, цитрат, глицин, формиат, гиппурат, тирозин, диметиламин, креатинин. Показано, что спектроскопия ЯМР ^1H позволяет одновременно определять несколько метаболитов, различающихся по своим концентрациям в 10^1 - 10^3 раз, и не требует длительной и трудоемкой процедуры пробоподготовки. Исследование показало возможность применения спектроскопии ЯМР ^1H для исследования состава мочи с целью последующего выявления патологий в организме.

Выражаем признательность Э. Абдуллаеву – за помощь при подготовке образцов, Ю.А. Пирогову – за внимание к этой работе и поддержку, О.Ю. Савельеву – за помощь при проведении экспериментов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Nicholson J.K., Wilson I.D.* (1989) *Progress in NMR Spectroscopy*, **21**, 449-501.
2. *Robertson D.G., Lindon J.C., Nicholson J.K., Holmes E.* (2005) *Metabonomics in Toxicity Assessment*, CRC Press, Boca Raton (USA).
3. *Колоколова Т.Н., Савельев О.Ю., Сергеев Н.М.* (2008) *ЖАХ*, **63**(2) (в печати).
4. *Foxall P.J.D., Mellotte G.J., Bending M.R., Lindon J.C., Nicholson J.K.* (1993) *Kidney Int.*, **43**, 234-245.
5. *Le Moyec L., Pruna A., Eugene M., Bedrossian J., Idatte J.M., Huneau J.F., Tome D.* (1993) *Nephron*, **65**, 433-439.
6. *Foxall J.D., Spraul M., Farrant R.D., Lindon J.C., Neild G.H., Nicholson J.K.* (1993) *J. Pharmacol. Biomed. Anal.*, **11**, 267-276.
7. *Bell J.D., Lee J.A., Lee H.A., Sadler P.J., Wilkie D.R., Woodham R.H.* (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1096**, 101-107.
8. *Iles R.A., Chalmers R.A.* (1988) *Clin. Sci.*, **74**, 1-10.
9. *Davies S.E.C., Chalmers R.A., Randall E.W., Iles R.A.* (1988) *Clin. Chim. Acta*, **178**, 241-249.
10. *Davies S.E.C., Woolf D.A., Chalmers R.A., Rafter J.E.M., Iles R.A.* (1992) *J. Nutr. Biochem.*, **3**, 523-530.
11. *Bell J.D., Brown C.C.J., Sadler P.J.* (1989) *NMR Biomed.*, **2**, 246-256.
12. *Iles R.A., Hind A.J., Chalmers R.A.* (1985) *Clin. Chem.*, **31**, 1795-1801.
13. *Foxall P.J.D., Bending M.R., Gartland K.P.R., Nicholson J.K.* (1989) *Human Toxicol.*, **9**, 491-496.
14. *Vermeersch G., Marko J., Cartigny B., Leclerc F., Roussel P., Hermitte M.L.* (1988) *Clin. Chem.*, **34**, 1003-1004.
15. *Malhotra D., Shapiro J.I., Chan L.* (1991) *J. Am. Soc. Nephrol.*, **2**, 1046-1050.
16. *Nicholson J.K., Wilson I.D.* (1987) *Prog. Drug Res.*, **31**, 427-479.
17. *Wilson I.D., Fromson J., Ismail I.M., Nicholson J.K.* (1987) *J. Pharmacol. Biomed. Anal.*, **59** (2), 157-163.
18. *Beckwith-Hall B.M., Nicholson J.K., Nicholls A.W., Foxall P.J.D., Lindon J.C., Connor S.C., Abdi M., Connelly J., Holmes E.* (1998) *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 260-272.
19. *Шпрауль М., Айхофф У.* (2003) *Известия Академии наук. Серия химическая*, **11**, 2391-2400.
20. *Любина А.Я., Ильичева Л.П., Катасонова Т.В., Петросова С.А.* (1984) *Клинические лабораторные исследования, Медицина, М.*
21. *Меньшиков В.В., Делекторская Л.Н., Золотницкая Р.П.* (1987) *Лабораторные методы исследования в клинике. Справочник, Медицина, М.*
22. *Дерффель К.* (1994) *Статистика в аналитической химии (пер. с нем.), Мир, М.*
23. *Braun S., Kalinowski H.-O., Berger S.* (1998) *150 and more basic NMR experiments: a practical course*, Wiley-VCH, Weinheim.
24. *Nicholson J.K., Foxal P.J.D.* (1995) *Anal. Chem.*, **67**, 793-811.
25. *Bales J.R., Higham D.P., Howe I., Nicholson J.K., Sadler P.J.* (1984) *Clin.Chem.*, **30**, 426-432.
26. *Messana M., Forni F., Ferrari F., Rossi C., Giardina B., Zuppi C.* (1998) *Clin. Chem.*, **44**, 1529-1534.
27. *Покровский А.А.* (1969) *Биохимические методы исследования в клинике. Справочник, Медицина, М.*
28. *Хейль В., Коберштейн Р., Цавта Б.* (2001) *Референтные пределы у взрослых и детей. Преаналитические предосторожности. Лабпресс, М.*

Поступила: 11. 09. 2007.

**QUANTITATIVE DETERMINATION OF METABOLITES IN HUMAN URINE
BY NMR ^1H SPECTROSCOPY**

T.N. Kolokolova¹, N.M. Sergeev¹, A.Yu. Korol'kov²

²¹Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119992 Russia;
e-mail: tatkol2003@mail.ru, sergeyev@nmr.chem.msu.ru

²Russian University of People Friendship, Moscow, Russia

Conditions for registration of urinary NMR ^1H spectra have been optimized in order to achieve maximal accuracy of quantitative analysis. Urinary samples from patients with acute pancreatitis have been investigated. Employment of NMR ^1H spectroscopy is perspective for the development of new laboratory diagnostic methods.

Key words: metabolites, urine, NMR ^1H spectroscopy, acute pancreatitis.