

УДК 577.121

©Коллектив авторов

ЯМР-ИССЛЕДОВАНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЕЙ ЧЕЛОВЕКА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ПАТОЛОГИЙ

П.М. Бескаравайный^{1}, М.В. Молчанов¹, А.В. Сусликов², С.И. Паскевич¹,
В.П. Кутышенко¹, С.И. Воробьев³*

¹Институт теоретической и экспериментальной биофизики Российской академии наук (ИТЭБ РАН), 142290, Московская обл., Пущино, Институтская ул., 3;

тел.: (4967)73-92-26; факс: (4967)33-05-53, эл. почта: beskaravainy@gmail.com

²Федеральная Больница Пущинского научного центра РАН (БПНЦ РАН), Пущино

³Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М. Сеченова, Москва

В работе представлены ЯМР-спектры препаратов пяти различных биологических жидкостей человека. Определены и классифицированы сигналы метаболитов, характерные для спектров крови, мочи, слезы, слюны и пота. Была предпринята попытка выделить биомаркеры некоторых сердечнососудистых заболеваний в биожидкостях пациентов. Абсолютных биомаркеров для функциональных заболеваний, таких как ишемическая болезнь сердца (ИБС), даже в случае её острой формы – инфаркта миокарда, не выявлено. Сформулирована гипотеза, объясняющая причину этого. Представлены результаты сравнительного анализа образцов крови и мочи человека и некоторых лабораторных животных. Определены и проанализированы сигналы метаболитов патогенной микрофлоры и их динамика в моче при некоторых заболеваниях мочеполовой системы. Выявлены характерные биомаркеры.

Ключевые слова: биологические жидкости, ЯМР, биомаркеры.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы наметился большой интерес к исследованию биологических жидкостей методами ЯМР- и масс-спектропии, как экспериментальной основе метабомики, изучающей метаболические профили животных и человека в процессе их жизнедеятельности в норме и при различных патологиях, а также при воздействии лекарственных и иных препаратов на отдельный орган, целостный организм и на экосистему [1, 2]. ЯМР-анализ позволяет с большой точностью и в короткое время идентифицировать полный качественный и количественный состав исследуемых образцов и в настоящее время широко применяется в научных исследованиях различных биологических объектов. К настоящему времени получено достаточное количества материала для того, чтобы использовать накопленные знания для диагностики и контроля лечения различных заболеваний. Одной из приоритетных задач

является выявление характерных биомаркеров для различных патологий. Её решение осложняется тем, что даже у условно здоровых людей практически все компоненты в составе любой из биологических жидкостей могут значительно меняться в зависимости от диеты, режима и времени дня и ещё от множества других факторов [3]. Из медицинской практики хорошо известно, что при биохимическом анализе крови, например, нижняя и верхняя границы “нормы” для некоторых компонент отличаются в десятки раз.

В этой работе описаны результаты, полученные в процессе исследования биологических жидкостей при некоторых патологиях.

МЕТОДИКА

Для забора слезы были изготовлены специальные пипетки с обратным капилляром, позволяющие собирать жидкость в объёме, достаточном для ЯМР-исследования.

* - адресат для переписки

Все описанные здесь эксперименты, проводились со слезными жидкостями добровольцев, а также, на образцах представленных МНТК “Микрохирургия глаза” (клиника Фёдорова). Объём слёзной жидкости в наших экспериментах составлял 0,2–0,3 мл и этого было достаточно, чтобы добавив 0,3 мл D₂O, приготовить образец, позволявший в течение 10 мин получить ЯМР спектр с хорошим отношением сигнал/шум.

Образцы крови получены из кардиологического отделения Пущинской больницы. Образцы крови животных получены из лабораторий дбн В.Ф. Кичигиной и кбн Н.М. Захаровой (ИТЭБ РАН), в которых проводятся острые опыты на крысах Wistar [4] и сусликах [5], соответственно. 1 мл крови предварительно центрифугировали (микроцентрифуга “Centrifuge CM50”) при 16000 g, в течение 10 мин. Отбирали 0,5 мл плазмы и добавляли 0,1 мл тяжёлой воды, после чего такой образец был готов для ЯМР-анализа. Образцы мочи и слюны смешивались с тяжёлой водой в тех же объёмах, что и плазма крови без предварительной подготовки.

Сбор и приготовление образцов пота осуществляли с помощью оригинального набора инструментов, разработанных в нашей лаборатории [6]. Образец пота смывали со стеклянного валика в специальной ванночке с 0,68 мл тяжёлой воды. В ЯМР-ампулу отбирали 0,56 мл получившегося смыва. Все ЯМР-исследования проводили сразу после получения образцов. Все образцы биологических жидкостей отбирали для исследования с информированного согласия пациентов.

¹H-спектры регистрировали на ЯМР-спектрометре AVANCE 600 III (“Bruker”, США) с рабочей частотой 600 МГц: при температуре 298К, ширине спектра 24 мд и 90-градусном импульсе 11 мкс. В работе использованы стандартные импульсные последовательности из библиотеки спектрометра с насыщением воды перед 90-ным импульсом: ZGPR – для обзорного спектра, CPMG1D – для фильтрации сигналов по T₂ с τ=80 мс, что обеспечивало удаление из спектров белковых сигналов. Как правило, для достижения хорошего соотношения сигнал/шум хватало 128 повторений, которые накапливались в 32К ячейках памяти управляющего компьютера.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рисунке 1 представлены ЯМР-спектры биологических жидкостей человека: пота (А), мочи (В), слюны (С), слезы (D), плазмы крови (Е). Все они имеют явно

выраженные характерные особенности, благодаря присущим им наборам метаболитов.

Для ЯМР-спектра плазмы крови характерным является наличие мощных сигналов белков и липидов, и глюкозы, присутствующей в крови в большой концентрации. Проведя ряд экспериментов, мы выяснили, что для изучения метаболитного состава крови лучше всего подходит спектр CPMG, который позволяет получить максимальное разрешение сигналов низкомолекулярных метаболитов при значительном содержании высокомолекулярных соединений в образце. На рисунке 2 приведены для сравнения спектры плазмы крови человека (А, В), крысы (С) и суслика (D, E).

Сигналы основного пула метиленовых групп липидов в составе липопротеинов при ~1,3 мд и их метильных групп при ~0,87 мд имеют выраженные правую и левую составляющие. Правая, смещенная в сторону более высоких полей, характеризует гидрофобные компоненты. Увеличение интенсивности сигнала правой компоненты свидетельствует об увеличении вязкости, следовательно реология крови ухудшается. Левая составляющая складывается из сигналов гидрофильных групп.

В спектрах образцов плазмы крови инфарктных больных гидрофобная составляющая обычно увеличена (рис. 2А). Лечение таких пациентов методами, выработанными кардиологами, приводит к уменьшению доли этих гидрофобных компонент, и увеличению амплитуды левой составляющей, сигнализируя о нормализации реологии (рис. 2В).

Интересно, что в ЯМР-спектре плазмы крови суслика в состоянии гибернации наблюдается увеличение гидрофильной компоненты сигнала липопротеинов, то есть ток крови у спящего более свободный, чем у активного (рис. 2D,E).

На рисунке 3А показан спектр CPMG плазмы крови одного из пациентов только что поступившего в реанимацию с острым инфарктом, состав липопротеинов которой резко отличается от ожидаемого.

Для сравнения на рисунке 3В показан точно такой же спектр добровольца из контрольной группы, молодого, активного, энергичного. Мы не видим заметной разницы между этими двумя спектрами, и отличить по спектру больного и здорового человека не удается. Более того, третий спектр (рис. 3С) также принадлежит молодому, здоровому, энергичному человеку, но в нем отсутствуют интенсивные левые компоненты. На рисунке 3D показан спектр CPMG плазмы крови ещё одного человека перенесшего инфаркт, находившегося на излечении в кардиологическом отделении,

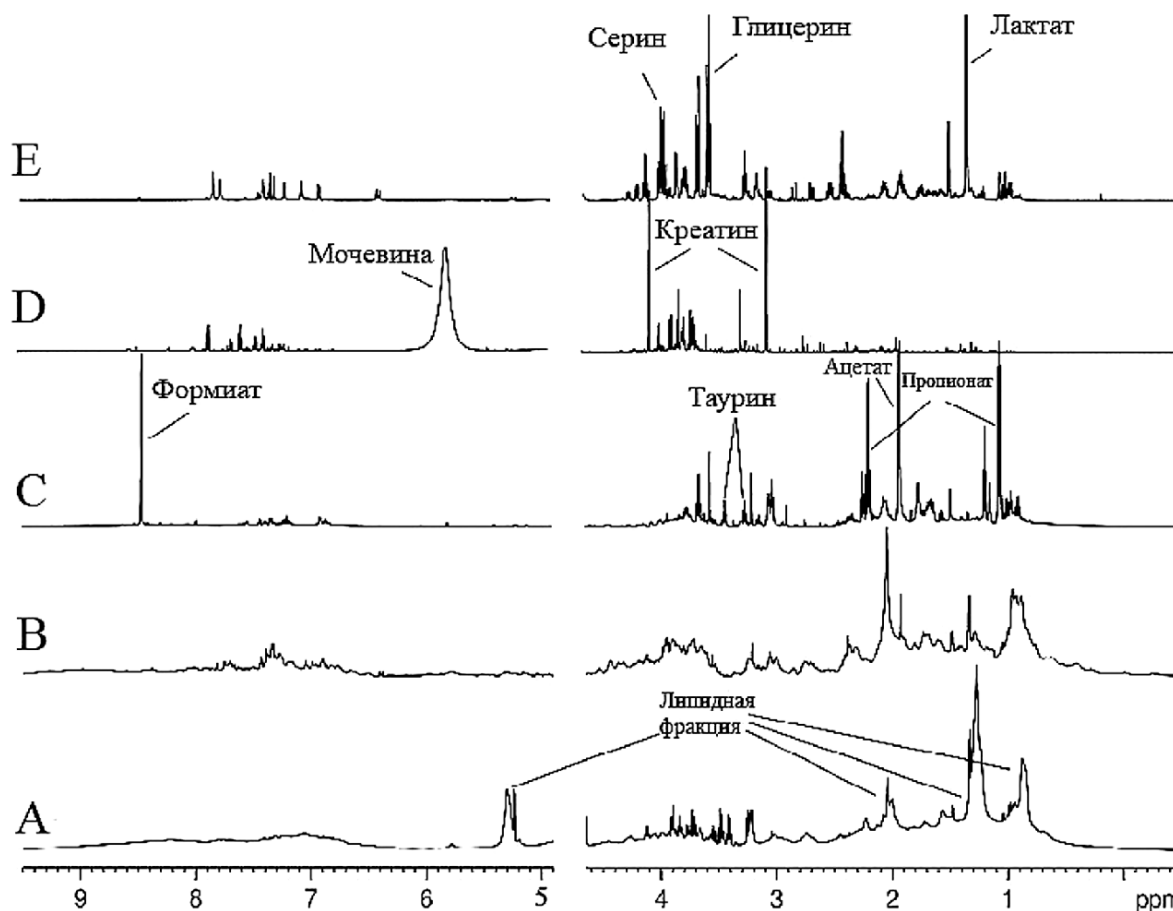


Рисунок 1. Спектры ^1H -ЯМР различных биологических жидкостей человека: плазма крови (А), слеза (В), слюна (С), моча (D), пот (Е).

но уже готовящегося к выписке. Видно, что левые компоненты липидных сигналов заметно интенсивнее правых. Спектры CPMG для пациентов, склонных к тромбозам, принимающих специальные препараты-антикоагулянты, и для людей, принимающих статины, в качестве противохолестериновых препаратов, имеют интенсивные левые компоненты, как и на рисунках 3В и 3D. Данный пример показывает, что этот биомаркер, может служить как сигнал рекомендательного характера для дальнейшего, более детального исследования пациентов. Заметное увеличение гидрофобной составляющей липопротеинов плазмы (рис. 3С), легко выявляемое методом ЯМР-спектроскопии сигнализирует о повышенной вязкости крови и возможном функциональном нарушении сердечной деятельности.

ЯМР-спектр слезы характеризуется большим количеством сигналов различных белков, в том числе и гликопротеинов, что подтверждается наличием интенсивного, широкого сигнала в области поглощения

протонов сахаров при 4-3,5 мд (рис. 1В). Выделить сигналы низкомолекулярных соединений на их фоне весьма затруднительно. Мы установили, что набор и концентрации низкомолекулярных соединений очень консервативны от донора к донору и даже спектры слезы детей и взрослых идентичны. Поэтому найти в составе слезы биомаркер, который можно было бы отнести к какой-то патологии, пока, на наш взгляд, не представляется возможным. Однако у больных диабетом в спектре проявляются сигналы глюкозы, которой нет у здоровых людей, как это было выяснено с помощью образцов предоставленных нам из клиники Федорова. Известно, что среди органов, страдающих от диабета, глаза наиболее уязвимы [7].

Спектр слюны характеризуется наличием большого количества широких сигналов белков и муцинов (рис. 1С). Колебания в интенсивностях сигналов метаболитов очень сильно зависят от времени, прошедшего между приёмом пищи и взятием образца. Например, по содержанию глюкозы достаточно точно можно определить

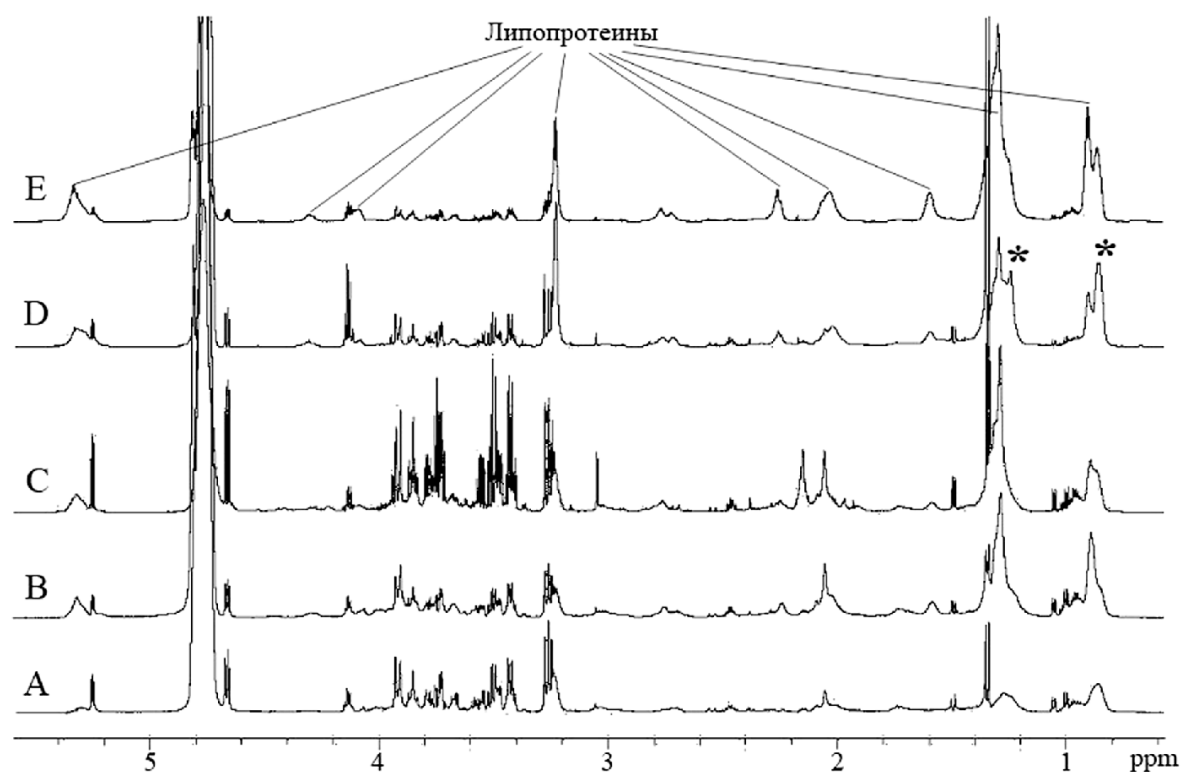


Рисунок 2. ^1H -CPMG-спектры плазмы крови: поступившего в реанимацию больного с инфарктом миокарда (А), больного после успешного лечения инфаркта миокарда (В), крысы (С), активного суслика (D), спящего суслика (Е). Звёздочкой отмечены правые компоненты сигналов метиленовых и метильных групп липидов в составе липопротеинов.

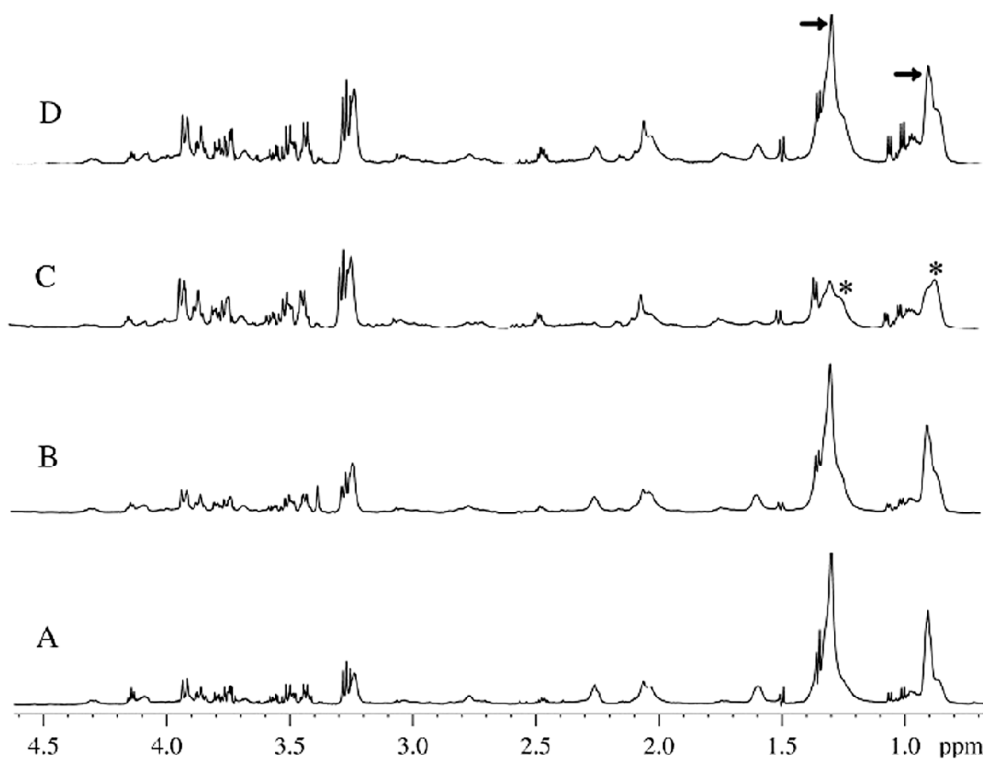


Рисунок 3. Спектры CPMG плазмы крови: больного с острым инфарктом миокарда - (А), условно здоровых людей - (В, С), больного перед выпиской из кардиологического отделения после лечения инфаркта миокарда. Звёздочками отмечены правые компоненты сигналов липидов в составе липопротеинов, обладающих большей гидрофобностью. Стрелками обозначены левые компоненты сигналов.

время приёма пищи, а по содержанию этанола, который очень долго сохраняется в слюне, можно определять степень опьянения человека. Этанол нарушает метаболизм аминокислот и жирных кислот, что приводит к повышению в тканях и плазме крови концентрации пропионовой кислоты, которая обнаруживается в моче и слюне [8]. Состав слюны и появление каких-то новых биомаркеров, как мы полагаем, может отражать изменения, связанные с патологиями, собственно, слюнных желез. Разницы в составе слюны при изучаемых нами патологиях мы не обнаружили.

Моча человека наиболее хорошо изучена, так как уже несколько веков врачи исследуют её для установления или уточнения диагноза самых разных заболеваний. ЯМР-спектр мочи отличается характерными интенсивными синглетами креатинина (4,05 мд и 3,04 мд) и сигналами гиппурата (7,8 мд – дублет, 7,6 мд – триплет, и 7,55 мд – триплет, 3,97 мд – дублет) (см. рис. 1D, 4C).

Большая часть креатинина образуется в мышцах и нервной ткани после распада креатинфосфата. Данный метаболит является важным показателем деятельности почек.

Гиппурат (гиппуровая кислота) – продукт нейтрализации бензойной кислоты, который образуется при её конъюгации с глицином. Синтез гиппуровой кислоты протекает у человека и большинства животных преимущественно в печени. Скорость этой реакции отражает функциональное состояние печени [9]. Еще одной отличительной чертой спектра мочи здорового человека является достаточно интенсивный, характерный сигнал цитрата – двойной дублет, с центрами при 2,72 и 2,56 мд. Цитрат в моче выполняет, в основном защитную функцию, препятствуя образованию и росту нерастворимых кристаллов оксалата кальция и формированию камней [10]. У здоровых людей отсутствуют в спектре сигналы ацетата и лактата, присутствующие в других биологических жидкостях.

Среди множества сигналов в ЯМР-спектре мочи от различных метаболитов не удалось обнаружить абсолютного биомаркера, связанного с сосудистыми заболеваниями, которые мы исследовали. Однако в спектрах мочи больных диабетом можно наблюдать интенсивные сигналы глюкозы (рис. 4C), что является абсолютным биомаркером в этом случае.

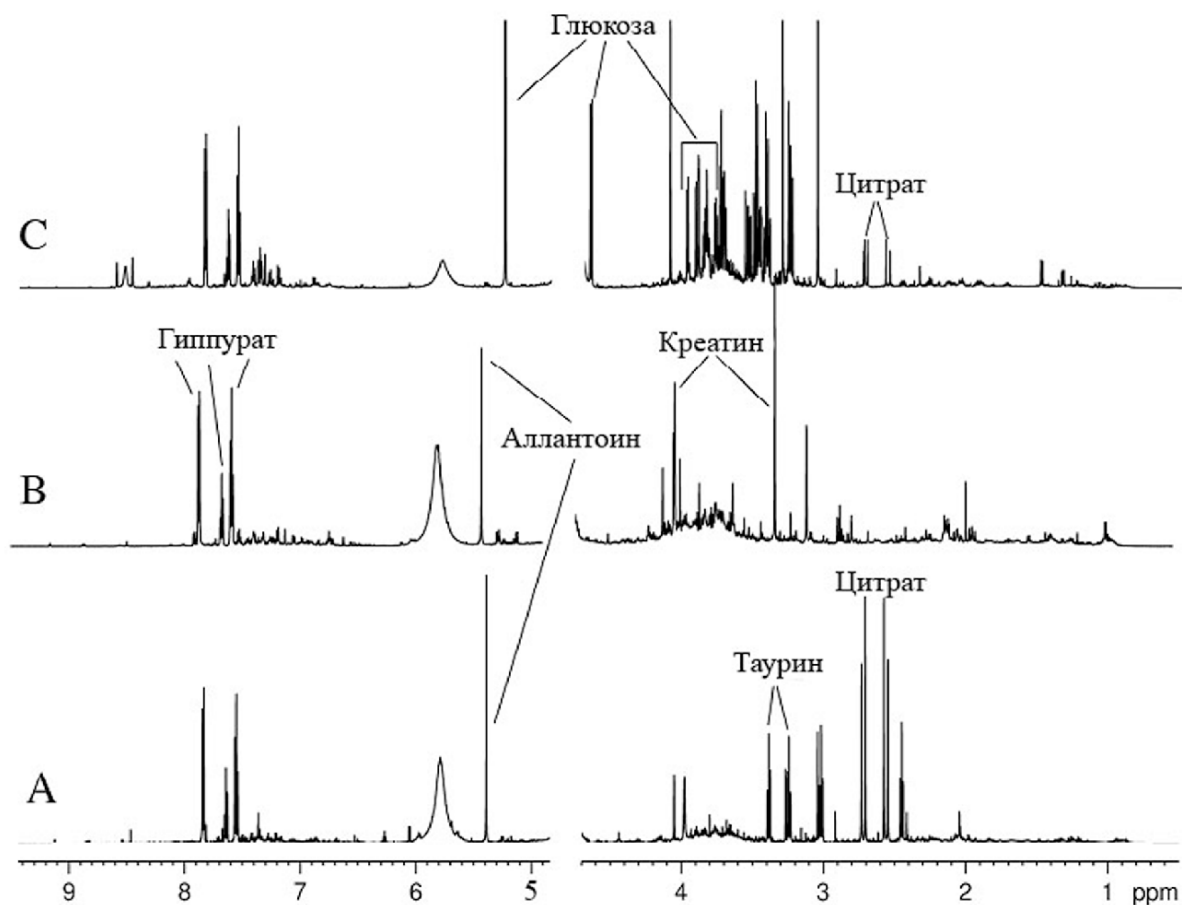


Рисунок 4. Спектры ¹H-ЯМР мочи крысы - (А); сулика - (В) и человека, больного диабетом - (С).

Интересные результаты дали наблюдения за изменением метаболитного состава образцов мочи при длительной экспозиции образцов. На рисунке 5 показаны изменения в ЯМР-спектрах мочи пациента, страдающего приступами мигрени. В образцах, взятых во время приступа, уровень цитрата начинает падать с шестнадцатого часа и через сутки становится нулевым. Всё это время, синхронно растёт уровень ацетата и муравьиной кислоты.

Повторно образцы для анализа были взяты через сутки после приступа. Время начала падения уровня цитрата увеличилось более чем на десять часов. Через пять дней был проведен третий анализ, который показал, что уровень цитрата остается неизменным и по прошествии трёх суток, после приготовления образца. Аналогичные изменения в спектрах мы наблюдали у пациенток с острой формой цистита и пиелонефрита. Экспозиция образцов сопровождалась уменьшением сигнала цитрата и появлением ацетата, муравьиной кислоты, лактата, а также увеличением сигнала треонина. Исчезновение цитрата мы связываем с активностью патогенной или условно-патогенной микрофлоры, в частности – цитробактера, который утилизирует цитрат до угольной кислоты, что детектируется по спектрам ^{13}C при ~ 163 мд. Появление ацетата и муравьиной кислоты также характерно для деятельности микроорганизмов.

На рисунке 1Е представлен спектр пота. Его характерной особенностью является наличие интенсивного сигнала глицерина и лактата. Также присутствует мочевины, ацетат,

аммиак, почти полный набор аминокислот, пируват и довольно редкие соединения для биологических жидкостей, такие как кадаверин, 5-оксо-Д-пролин, сахароза, этанол. Пот, несмотря на свою доступность и информативность мало используется для диагностики различных заболеваний, за исключением разве что кожных. Нами разработана новая методика и инструментарий для забора пота, позволяющие отбирать образцы с самых разных участков тела, причиняя минимум неудобств донору [6].

На рисунке 6 представлены ^1H ЯМР-спектры образцов пота людей с разными патологиями. Вот некоторые наблюдения, связанные с изменением интенсивности сигнала глицерина. Наиболее высокая его концентрация наблюдается в поту субъектов, состояние которых близко к норме (рис. 6D). Наименее выражен сигнал глицерина в спектре пота пациентов с болезнью Альцгеймера (БА) (рис. 6C). У пациентов с БА наблюдается повышенное содержание треонина, сигнал метила которого вносит вклад в метильный резонанс лактата при 1,34 мд, поэтому хорошо различается только в 2D-COSY спектрах. Треонин участвует в поддержании баланса сахара в крови, увеличение количества треонина стимулирует глюконеогенез, синтез коллагена и эластина; треонин также участвует в обмене жиров в комбинации с аспаратом и метионином, препятствуя тем самым отложению жиров в печени [11]. Увеличение концентрации треонина наблюдается в сыворотке крови при различных заболеваниях, в частности, у больных с хроническим нарушением мозгового

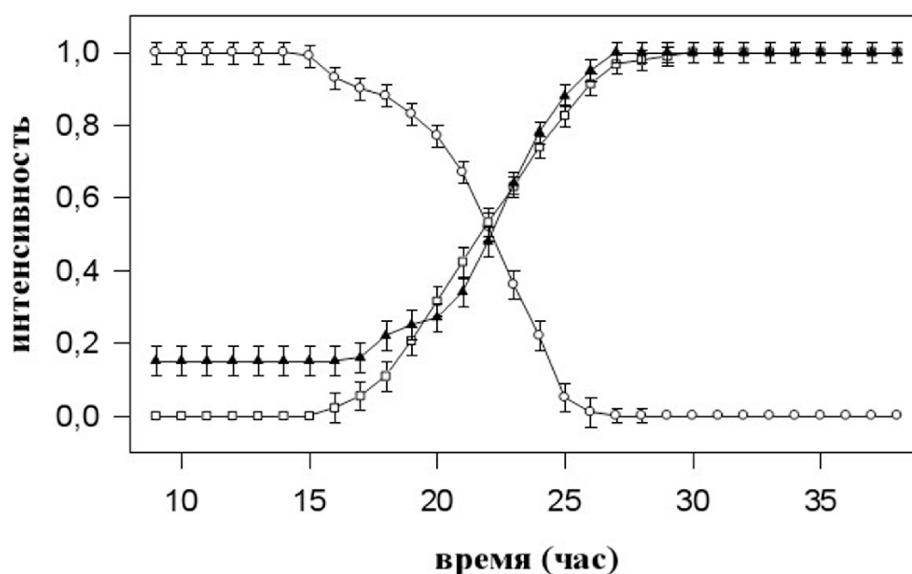


Рисунок 5. Уменьшение интегральной интенсивности сигналов цитрата (кружки) и увеличение интегральных интенсивностей сигналов ацетата (квадраты) и муравьиной кислоты (треугольники) со временем от момента взятия пробы.

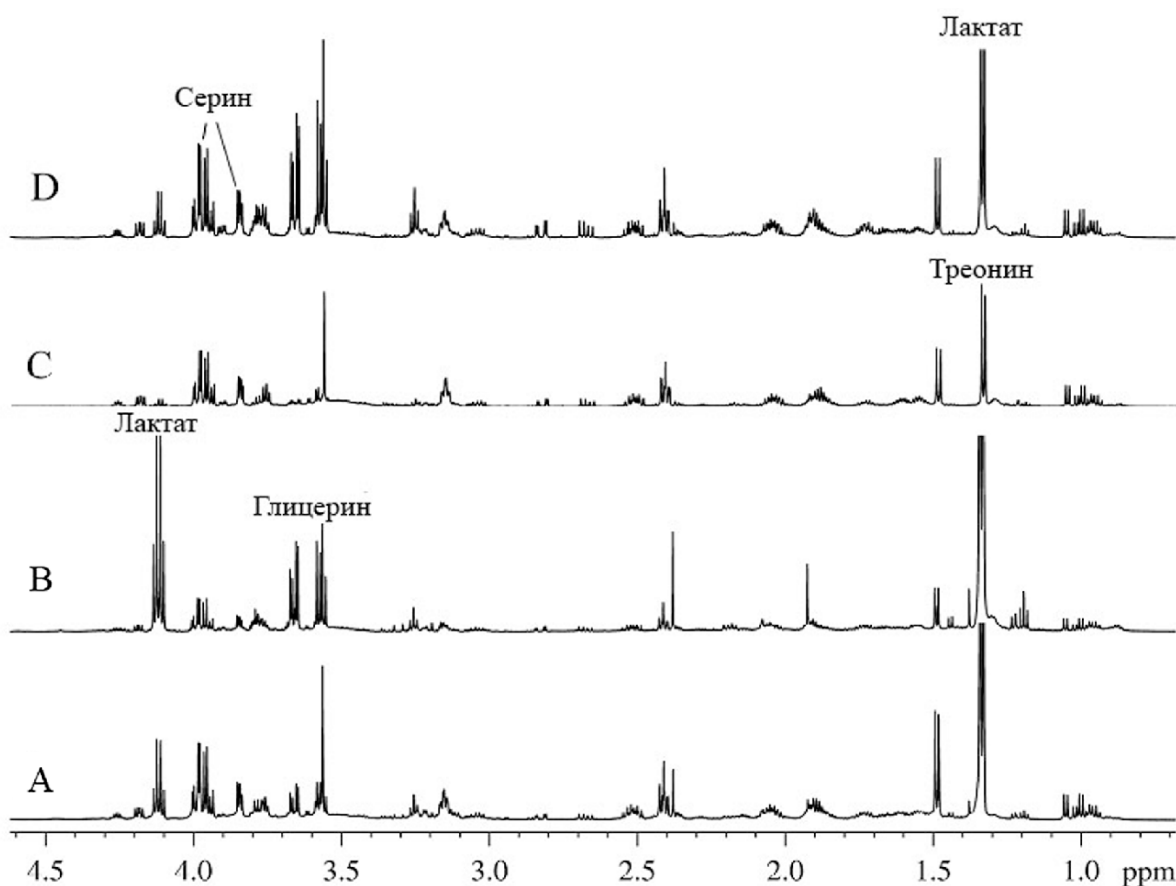


Рисунок 6. ^1H -спектры пота: инфарктного больного (ИБ) на третий день после перевода из реанимации в кардиологическое отделение (А), у больного ИБ, готовящегося к выписке (В), у больного болезнью Альцгеймера (БА) (С) и условно здорового человека (D). Все образцы пота взяты с верхней части спины (ближе к шее, между лопаток).

кровообращения [12]. Треонин стимулирует иммунитет, так как способствует продукции антител [13]. Наличие повышенного содержания треонина в поте и, особенно, в моче сигнализирует о функциональных расстройствах и необходимо рекомендовать пациенту обратить внимание на возможные патологические изменения в организме.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ

Метод ЯМР-спектроскопии позволяет быстро определить качественный и количественный состав содержащихся в исследуемых образцах низкомолекулярных органических веществ, что делает ЯМР ещё одним удобным и информативным способом исследования метаболитного состава физиологических жидкостей человека. Анализ наших данных, а также данных лидирующей в этой области группы Николсона [14-17] показывает, что абсолютного биомаркера, надёжно

указывающего только на сердечно-сосудистую патологию пока не удалось обнаружить, может быть, это окажется принципиально невозможным в свете гипотезы, которую мы излагаем ниже.

Статистическая обработка данных в серии контроль-патология по большой выборке отделяет контроль от патологии, но это не означает, что такое разделение может произойти в серии патология 1 – патология 2. Такие данные никто не представлял и, на наш взгляд, такой результат ожидаем по следующим причинам. Внутренняя среда организма консервативна по своему химическому составу и физическим свойствам. Гомеостаз обеспечивается эффективными регуляторными механизмами, сложившимися и отлаженными миллионами лет эволюции. Однако, как и для многих понятий в биологии гомеостаз имеет весьма широкие границы понятия “норма”. Благодаря коммуникационной функции крови, могут происходить изменения их состава под влиянием

других частей организма, что, например, отражается в колебаниях концентраций низкомолекулярных компонент мочи от диеты или режима дня [3]. Подобные колебания отмечены и для других биологических жидкостей [18].

Сам колебательный характер биохимических компонент косвенно указывает на наличие биохимического гомеостаза. Даже при серьёзных патологиях организм пытается поддерживать гомеостаз, так что появление новых низкомолекулярных компонент или заметное изменение прежних, к сожалению, проявляются уже на поздних стадиях болезни, когда организм не в состоянии поддерживать относительную неизменность своей внутренней среды.

Поэтому идея ранней диагностики методом ЯМР по низкомолекулярным эндогенным компонентам биологических жидкостей скорее всего несостоятельна. Хотя статистический анализ по большой выборке, позволяет отличить норму от патологии, поставить диагноз конкретному пациенту только по данным ЯМР-анализа, по нашему мнению, нельзя.

С другой стороны, если изолировать биологическую жидкость, (например, мочу) от гомеостатической системы организма (взять образец) и анализировать его в течение достаточно большого времени, регулярно регистрируя ЯМР-спектры, то существует достаточно высокая вероятность обнаружения исчезновения или появления сигналов, характеризующих причины некоторых патологий, связанных, чаще всего, с микробным метаболизмом. Следует отметить, что в последнее время повышенное внимание уделяется именно исследованию метаболизма микробиоты человека и животных [19, 20]. Таким образом, для инфекционных болезней, существует возможность решения поставленной нами задачи – обнаружение биомаркера, появляющегося или исчезающего при определённых патологиях. В нашем случае это ацетат и цитрат, соответственно.

Авторы выражают благодарность к.б.н. Поповой И. и к.б.н. Захаровой Н.М. за представленные образцы биологических жидкостей. Данная работа поддержана грантом РФФИ № 10- 0200996.

ЛИТЕРАТУРА

1. Nicholson J.K., Lindon J.C. (2008) *Nature*, **455**, 1084-1056.
2. Holmes E., Wilson I.D., Nicholson J.K. (2008) *Cell*, **134**, 714-717.
3. Кутышенко В.П., Степанов А.А., Сусликов А.В., Чайлахян Л.М. (2006) *ДАН*, **410**(4), 556-559.
4. Popova I.Y., Sinelnikova V.V., Kitchigina V.F. (2008) *Neurosci. Lett.*, **442**, 228-233.
5. Nakipova O.V., Zakharova N.M., Andreeva L.A., Chumaeva N.N., Averin A.S., Kosarskii L.S., Anufriev A.I., Lewinski D.V., Kockskamper J., Pieske B. (2007) *J. Cryobiology*, **55**(3), 173-181.
6. Kutysheiko V.P., Molchanov M., Beskaravayny P., Uversky V.N., Timchenko M.A. (2011) *PLoS one*, **6**(12), e28824.
7. Балашевич Л.И. (2008) *Мед. академ. ж.*, **1**, 189-197.
8. Calabrese V., Rizza V. (1999) *Alcohol*, **19**(2), 169-176.
9. Куценко С.А. (2004) *Основы Токсикологии*, Фолиант, М.
10. Laube N., Jansen B., Hesse A. (2002) *Urol Res.*, **30**(5), 336-341.
11. Diaz S.O., Barros A.S., Goodfellow B.J., Duarte I.F., Carreira I.M., Galhano E., Pita C., Almeida Mdo C., Gil A.M. (2013) *J. Proteome Res.*, **12**(2), 969-979.
12. Бейн Б.Н., Ежова А.А. (2007) *Вятский мед. вестник*, **2**(3), 5-7.
13. Воложанин Д.А., Сосюкин А.Е., Калинина Н.М., Губанов А.И. (2005) *Medline.ru*, **6**(161), 530-540.
14. Nicholson J.K., Lindon J.C., Holmes E. (1999) *Xenobiotica*, **29**(11), 1181-1189.
15. Claus S.P., Tsang T.M., Wang Y., Cloarec O., Skordi E., Martin F.-P., Rezzi S., Ross A., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J.K. (2008) *Mol. Syst. Biol.*, **4**, 219.
16. Martin F.P.J., Dumas M.E., Wang Y.L., Legido-Quigley C., Yap I.K.S., Tang H.R., Zirah S., Murphy G.M., Cloarec O., Lindon J.C., Sprenger N., Fay L.B., Kochhar S., van Bladeren P., Holmes E., Nicholson J.K. (2007) *Mol. Syst. Biol.*, **3**, 112.
17. Martin F.P.J., Wang Y., Yap I.K.S., Sprenger N., Lindon J.C., Rezzi S., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J.K. (2009) *J. Proteome Res.*, **8**(7), 3464-3474.
18. Beckonert O., Keun H.C., Ebbels T.M., Bundy J., Holmes E., Lindon J.C., Nicholson J.K. (2007) *Nat. Protoc.*, **2**(11), 2692-2703.
19. Claus S.P., Tsang T.M., Wang Yu., Cloarec O., Skord E., Martin F.-P.J., Rezzi S., Ross A., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J.K. (2008) *Mol. Syst. Biol.*, **4**(219), 1-14.
20. Martin F.-P.J., Wang Y., Yap I.K.S., Sprenger N., Lindon J.C., Rezz S., Kochhar S., Holmes E., Nicholson J.K. (2009) *J. Proteome Res.*, **8**, 3464-3474.

Поступила: 21. 03. 2013.

NMR STUDY OF HUMAN BIOLOGICAL FLUIDS FOR DETECTION OF PATHOLOGIES

P.M. Beskaravainy¹, M.V. Molchanov¹, A.V. Suslikov², S.I. Paskevich¹, V.P. Kutysenko¹, S.I. Vorob'ev³

¹Institute of Theoretical and Experimental Biophysics RAS,
3 Institutskaya str., Moscow region, Pushchino, 142290 Russia;
tel.: (4967)73-92-26; fax: (4967)33-05-53; e-mail: beskaravainy@gmail.com

²Federal Hospital Pushchino Research Center RAS, Moscow region, Pushchino, Russia

³Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow, Russia

The paper deals with the NMR spectra obtained using preparations of five different human biological body fluids. Characteristic metabolite signals of blood, urine, tears, saliva, and sweat spectra have been determined and classified. The biological body fluid samples were used for search and identification of biomarkers of cardiovascular disease. Absolute functional biomarkers for diseases such as coronary heart disease (CHD) have not been recognized even in the case acute myocardial infarction. A hypothesis explaining reasons of lack of such markers has been formulated. The results of comparative analysis of blood and urine samples from humans and some laboratory animals are given. Identify and analyze signals of metabolites of pathogenic microflora and their dynamics in the urine from patients with urogenital diseases have been determined and analyzed and characteristic biomarkers have been recognized.

Key words: biological fluids, NMR, biomarkers.