

DOI: <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2022.12.2>

УДК: 535.343.4, 616-008.84

**ПРИМЕНЕНИЕ МЕТОДА ТЕРАГЕРЦОВОЙ ГАЗОВОЙ
СПЕКТРОСКОПИИ ВЫСОКОГО РАЗРЕШЕНИЯ ДЛЯ
ИССЛЕДОВАНИЯ СОСТАВА ПРОДУКТОВ ТЕРМИЧЕСКОГО
РАЗЛОЖЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКОЙ ЖИДКОСТИ (УРИНЫ) КРЫС
С ДИСБАКТЕРИОЗОМ**

В.Л. Вакс^{1,2}, Е.Г. Домрачева^{1,2}, М.Б. Черняева^{1,2}, В.А. Анфертьев^{1,2}, Е.С. Жукова³,
Р.Н. Храмов⁴, А.Б. Гапеев⁵, Т.Г. Щербатюк³

¹ ИФМ РАН, филиал ФИЦ ИПФ РАН, 603950, Нижний Новгород, ГСП-105

² Нижегородский госуниверситет им. Н. И. Лобачевского

603022, г. Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23

³ ФБУН "ННИИГП" Роспотребнадзора, 603005, г. Нижний Новгород, ул. Семашко, 20

⁴ Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН

142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

⁵ Институт биофизики клетки РАН - обособленное подразделение ФГБУН

«Федеральный исследовательский центр «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290, г. Пущино, ул. Институтская, д. 3

Статья поступила в редакцию 8 декабря 2022 г.

Аннотация. В современной медицине развивается диагностический подход на основе выявления метаболического профиля заболевания. При этом выявляется набор метаболитов – конечных или промежуточных продуктов обмена веществ в живом организме (человека или подопытных животных), специфичных для данного заболевания или патологического состояния. Перспективными анализируемыми образцами для выявления характерных метаболитов являются биологические жидкости, поскольку они наиболее быстро реагируют на изменение состояния организма, и специфические вещества могут содержаться в них в больших концентрациях, чем в газообразных выделениях организма. В работе исследован состав продуктов термического разложения линейки образцов

биологических жидкостей урины крыс с искусственно вызванным дисбактериозом. Перспективным подходом для исследования многокомпонентных газовых смесей различного происхождения, в том числе биологического, является молекулярная спектроскопия поглощения, в частности нестационарная спектроскопия терагерцового (ТГц) частотного диапазона. При детектировании излучения, прошедшего через газообразный образец, в спектре регистрируются линии поглощения, являющиеся однозначной характеристикой конкретных веществ. По наличию зарегистрированных линий поглощения можно говорить о присутствии данных веществ в исследуемой многокомпонентной газовой смеси, а, следовательно, выявить потенциальные маркеры патологий, заболеваний и маркеры, характеризующие эффекты различного воздействия на живой организм, включая медикаментозное. В работе выявлена совокупность метаболитов, появляющихся при термическом разложении образцов урины крыс (здоровых особей, с искусственно вызванным дисбактериозом, с различными схемами воздействия и лечения), проведено сравнение состава газообразных продуктов термического разложения урины для разных состояний лабораторных животных. Представленный подход является перспективным для разработки метода неинвазивного исследования, позволяющего выявить маркеры, отражающие нарушение метаболизма при дисбактериозе, а также оценить воздействие на организм в процессе проводимой терапии.

Ключевые слова: терагерцовая нестационарная газовая спектроскопия высокого разрешения, продукты термического разложения, метаболиты, дисбактериоз.

Финансирование: Российский научный фонд – грант №21-72-30020.

Автор для переписки: Черняева Мария Борисовна, masha@ipmras.ru

Введение

В современных биологических и медицинских исследованиях наблюдается развитие диагностического подхода на основе выявления метаболического профиля заболевания. В исследованиях выявляется набор метаболитов – конечных или промежуточных продуктов обмена веществ в живом организме (человека или подопытных животных), специфичных для данного заболевания или патологического состояния. Метаболиты могут иметь эндогенное происхождение (естественно производимые самим организмом) или экзогенное (поступать в организм с пищей, лекарствами, токсинами или производиться из них – вещества, поступившие извне, метаболизируются). Перспективными анализируемыми образцами для выявления характерных метаболитов являются биологические жидкости (кровь, урина, слюна и др.), поскольку они наиболее быстро реагируют на изменение состояния организма, и специфические вещества могут содержаться в них в больших концентрациях, чем в газообразных выделениях организма [1].

Кроме исследований метаболома человека, большая часть исследований проводится на лабораторных животных (крысах, мышках и др.), поскольку реакции млекопитающих на стрессоры экзо- и эндогенной природы могут быть схожими. Например, в литературе [2] представлены результаты исследований мочи крыс при физических тренировках и в процессе старения с применением метода гидрофильной хроматографии с масс-спектрометрией (HILICMS/MS). Было проанализировано 320 образцов мочи в 7 различных моментах времени отбора проб, чтобы изучить долгосрочные эффекты тренировок. В исследуемых образцах мочи обнаружен 71 метаболит, в основном, это соединения, имеющие молекулы большого размера: аминокислоты, сахара и т.п. Среди всех выделенных веществ (71 соединение) авторами исследования были выявлены 10 соединений, заметно менявших свое содержание при физических нагрузках и при старении (арабиноза, метиламин, мио-инозитол, котинин, гамма-аминомасляная кислота, лейцин и др.). Было обнаружено, что влияние на метаболом зависит от продолжительности периода физической нагрузки, при

этом острая физическая нагрузка также дает значительные изменения в содержании веществ. Метаболические изменения, обусловленные старением, были одинаково выражены у малоподвижных и тренированных крыс, как в анализируемых образцах мочи, так и крови.

Наиболее распространенными методами исследований образцов биологических сред человеческого организма являются газовая или жидкостная хроматография, а также масс-спектрометрия, часто совмещенная с газохроматографическим разделением. В метаболической базе данных больше всего результатов получено именно с использованием этих методов. Также используются электрохимические сенсоры, нацеленные на конкретные вещества, методы хемилюминесценции и др. Спектроскопические методы разных диапазонов также применяются для выявления метаболитов [1,3].

Исследование изменений метаболического профиля может способствовать развитию диагностических методов таких синдромов, сопутствующих целому ряду заболеваний человека, как дисбактериоз. Сбалансированная кишечная микробиота выполняет множество функций: принимает активное участие в пищеварении, выработке витаминов, защите от внешних факторов, а также играет важную роль в функционировании иммунной системы хозяина. Исходя из этого, сдвиги в целых микробных сообществах в сторону провоспалительного состояния, называемого дисбактериозом, приводят к широкому спектру заболеваний и процессов, охватывающих почти все системы органов. Среди таких болезней – ожирение, диабет, астма, воспалительные заболевания кишечника, болезнь Паркинсона и многие другие. При этом доказано, что наибольшее воздействие на здоровье и поведение индивида, ассоциирующееся со здоровьем, оказывает весь микробный ансамбль кишечника, а не отдельные его виды [4]. Именно по этим причинам возник пристальный интерес к тому, как развивается микробиом человека, что может его нарушить и какие факторы влияют на его стабильность.

Целью работы являлось выявление метаболитов в продуктах термического разложения биологической жидкости (урины) крыс при дисбактериозе и на фоне

его коррекции с использованием метода нестационарной ТГц спектроскопии на эффекте быстрого прохождения частоты.

1. Методы и подходы

Перспективным подходом для исследования многокомпонентных газовых смесей различного происхождения, в том числе биологического, является молекулярная спектроскопия поглощения, в частности нестационарная спектроскопия терагерцового (ТГц) частотного диапазона. В ТГц частотном диапазоне (100 ГГц-10 ТГц) лежат линии вращательного спектра, а также низкочастотные колебательные спектры молекул. При детектировании излучения, прошедшего через газообразный образец, в спектре регистрируются линии поглощения, являющиеся однозначной характеристикой конкретных веществ. По наличию этих линий поглощения можно говорить о присутствии данных веществ в исследуемой многокомпонентной газовой смеси, а, следовательно, выявить потенциальные маркеры патологий, заболеваний и маркеры, характеризующие эффекты различного воздействия на живой организм, включая медикаментозное.

Спектрометры на нестационарных эффектах могут быть реализованы в следующих режимах: с фазовой манипуляцией воздействующего на газ излучения и с быстрым свипированием по частоте [5]. Режим быстрого свипирования осуществляется при реализации быстрого по сравнению с временем релаксации прохождения частоты через линию поглощения. Разработанный и реализованный в ИФМ РАН спектрометр с быстрым свипированием [6] позволяет проходить весь рабочий диапазон в 60 ТГц за время около 30 с. Это позволяет зарегистрировать все линии поглощения веществ, которые находятся в исследуемой ячейке, лежащие в данном диапазоне и имеющие при содержании веществ в смеси интенсивность достаточную, чтобы зарегистрировать их над уровнем шумов.

Метод ТГц нестационарной газовой спектроскопии высокого разрешения применялся для исследования изменений состава метаболитов урины при

физических нагрузках, дисбактериозе, его коррекции с использованием БАД или воздействием электромагнитного излучения на организм лабораторной крысы.

Аутбредные белые крысы-самцы в возрасте 4 месяцев были разделены на 5 групп:

1) интактные – крысы, которые не подвергались каким-либо экспериментальным воздействиям,

2) Контрольная группа – здоровые крысы, подвергавшиеся физическим нагрузкам,

3) Опыт 1 – животные, подвергающиеся интенсивным физическим нагрузкам на фоне нарушения микрофлоры кишечника (дисбактериоза),

4) Опыт 2 – животные, подвергавшиеся интенсивным физическим нагрузкам на фоне нарушения микрофлоры кишечника (дисбактериоза) с добавлением в рацион БАД на основе фукоидана,

5) Опыт 3 – животные, подвергавшиеся интенсивным физическим нагрузкам на фоне нарушений микрофлоры кишечника (дисбактериоза) при корригирующем воздействии электромагнитного излучения (ЭМИ) КВЧ-диапазона.

Животные содержались в стандартных условиях вивария, при свободном доступе к водопроводной питьевой воде и полнорационному комбикорму для лабораторных животных при температуре $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ и влажности 65% с естественным режимом освещения (июнь-июль). Условия содержания животных соответствовали СП 3.3686-21 (ветеринарное заключение №52-005858 от 21.06.2021). Все манипуляции проводили согласно Директиве 2010/63/EU Европейского парламента и совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях.

Для имитации двигательной активности и оценки изменения физической работоспособности у животных использовался стандартный метод «плавания с грузом» [7]. Животные подвергались вынужденному плаванию с утяжелением на 1-е, 6-е, 11-е и 16-е сутки эксперимента с 10:00 до 12:00 часов по мск. Для

моделирования состояния дисбактериоза кишечника был использован гентамицин.

Процесс пробоподготовки заключался в следующем. Образец урины объемом 1-2 мл размораживали, наливали в колбу, затем проводилось обезвоживание образца, поскольку имеющаяся в образце в больших количествах вода, несмотря на отсутствие линий поглощения в рабочем диапазоне спектрометра, мешает проведению спектроскопических измерений с целью выявления веществ, находящихся в образце в следовых концентрациях. Для обезвоживания жидкого образца использовалась вакуумная сушка, большая часть воды удалялась, в колбе с образцом образовывалась тонкая пленка. Летучие вещества из образовавшегося остатка сначала без нагрева, а потом и с нагревом, напускались в измерительную ячейку, которая предварительно откачивалась до давления 10^{-3} мбар. Рабочее давление в ячейке составляло $5 \cdot 10^{-2} - 1 \cdot 10^{-1}$ мбар. Перед напуском смеси продуктов термораспада в ячейку прописывался весь диапазон спектрометра без напуска, запись которого использовалась для выявления линий поглощения как фоновая.

В режиме быстрого свипирования по частоте форма зарегистрированной линии представляет собой биения между спадающим сигналом от линии поглощения газа и прошедшим линейно частотномодулированным сигналом от источника излучения. Поэтому форма линии не позволяет выделить коэффициент поглощения в явном виде. Судить об относительной интенсивности линии можно по амплитуде зарегистрированного сигнала.

Кроме того, была разработана методика качественной оценки изменения концентрации конкретного соединения от образца к образцу на основе подсчета количества зарегистрированных линий поглощения в одном и том же диапазоне спектрометра при одних и тех же условиях измерений. При больших концентрациях вещества в смеси регистрируются более слабые линии поглощения при условии, что в этом диапазоне они есть.

Идентификация линий поглощения проводилась с использованием спектроскопических баз данных свободного доступа в сети Интернет [8,9].

2. Результаты эксперимента

Образцы, полученные 30.06.2021, были взяты в 1-й день эксперимента до моделирования дисбактериоза и проведения каких-либо воздействий. Образцы характеризуют исходное состояние животных, отобранных в экспериментальное исследование, до манипуляций.

В данной работе приведены данные, полученные при исследовании образцов урины крыс, взятых в 1-й и 8-й дни эксперимента.

У здоровой крысы (интактной) в неизменных условиях существенных изменений не происходит. Пример сравнения состава смеси газообразных продуктов термического разложения проб мочи проб самцов № 27 из интактной группы на первые и восьмые сутки эксперимента представлен на рисунке 1.

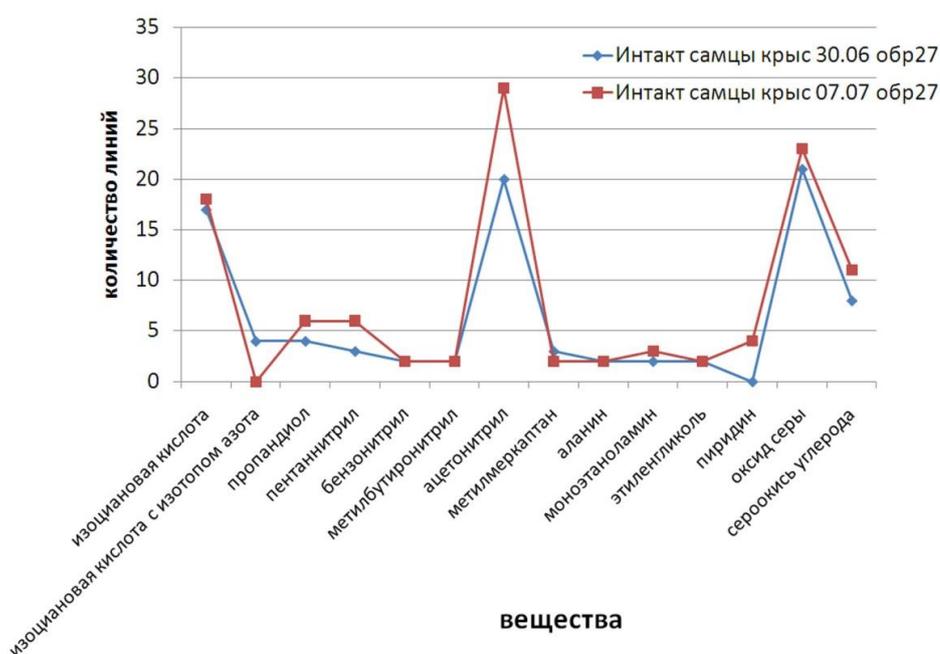


Рис. 1. Состав смеси газообразных продуктов термического разложения проб мочи проб самцов № 27 из интактной группы на первые и восьмые сутки эксперимента

Качественно состав к восьмому дню не изменился за исключением незначительного возрастания содержания ацетонитрила. Остальные расхождения по количеству линий не превышают 2-4 линий. Изотополог дейтерированной изоциановой кислоты не был обнаружен в пробе мочи, взятой

на восьмой день опыта, но появилось некоторое количество пиридина относительно первого дня.

Для крыс с физическими нагрузками прослеживается повышение содержания серосодержащих соединений (это видно по соединению оксид серы) относительно крыс без физических нагрузок. Пример повышения содержания (увеличение амплитуды записанного сигнала) серосодержащих соединений для крыс, подвергавшихся физическим нагрузкам приведен на рис.2. Квантовые числа энергетических уровней, между которыми осуществляется переход, приведены в формате: вращательное квантовое число J , описывающее квантование полного момента количества движения, и квантовые числа проекций моментов количества движения молекулы на ось симметрии молекулы для предельного вытянутого (K_{-1}) и предельного сплюсненного (K_1) волчков [10].

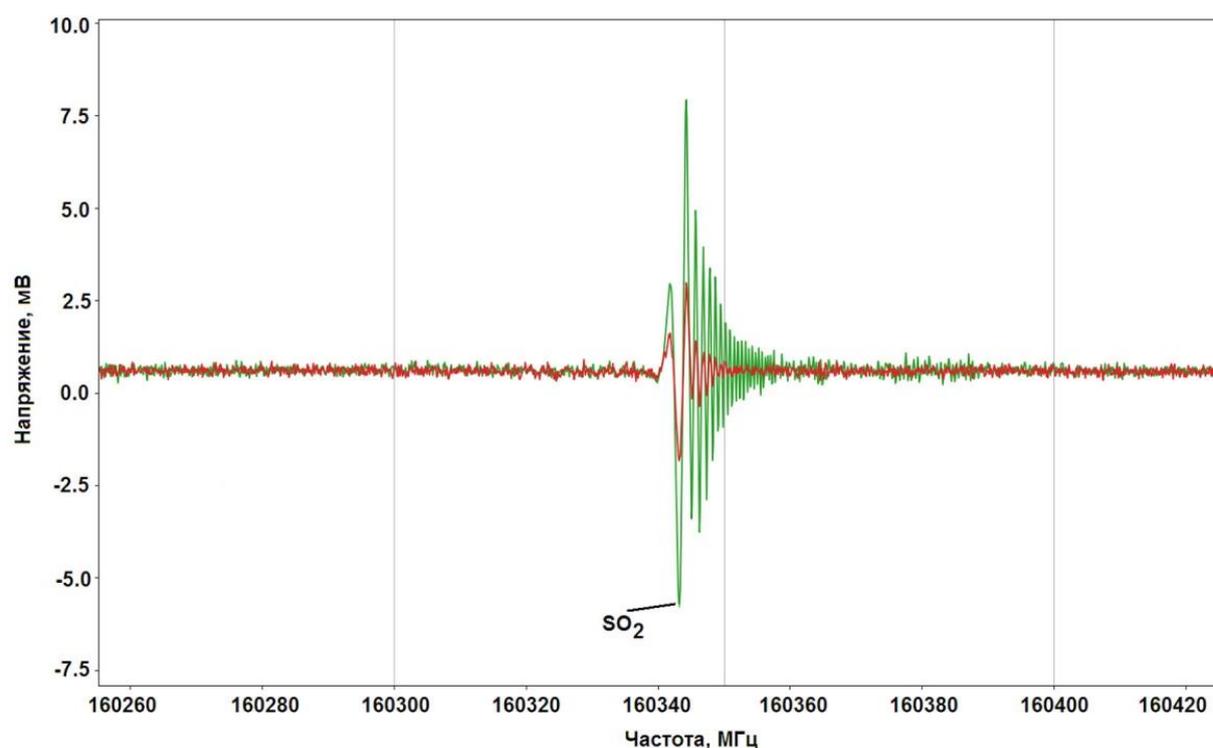


Рис. 2. Запись линии поглощения SO_2 на частоте 160343, 2 МГц (частота из каталога 160342,99, квантовые числа перехода 18 2 16←18 1 17) [8] из образцов мочи интактных крыс (красный) и крыс с физической нагрузкой (зеленый) в первый день эксперимента

Таблица 1. Вещества, идентифицированные в продуктах термического разложения образцов урины крыс на 8 день эксперимента

Вещества	Количество линий				
	Интактные 07.07 образец 27	Контроль 07.07 образец 33	Опыт 1 07.07 образец 38	Опыт 2 07.07 образец 29	Опыт 3 07.07 образец 34
HNCO	18	17	17	17	17
CH ₃ CHO	2	0	1	0	17
C ₂ H ₅ CN	1	0	10	1	0
C ₂ H ₃ CN	0	5	7	2	9
CH ₃ CN	29	38	57	40	37
CH ₃ SH	2	3	9	7	15
SO ₂	23	47	46	44	56
OCS	11	6	10	10	8

Вещества, идентифицированные в продуктах термического разложения образцов урины крыс на 8 день эксперимента представлены в таблице 1. Есть вещества, присутствующие в образце урины в любом состоянии организма. Это, например, аммиак, изоциановая кислота. По некоторым другим веществам явно прослеживается изменение количества веществ в смеси в зависимости от состояния грызуна, физических нагрузок и других воздействий.

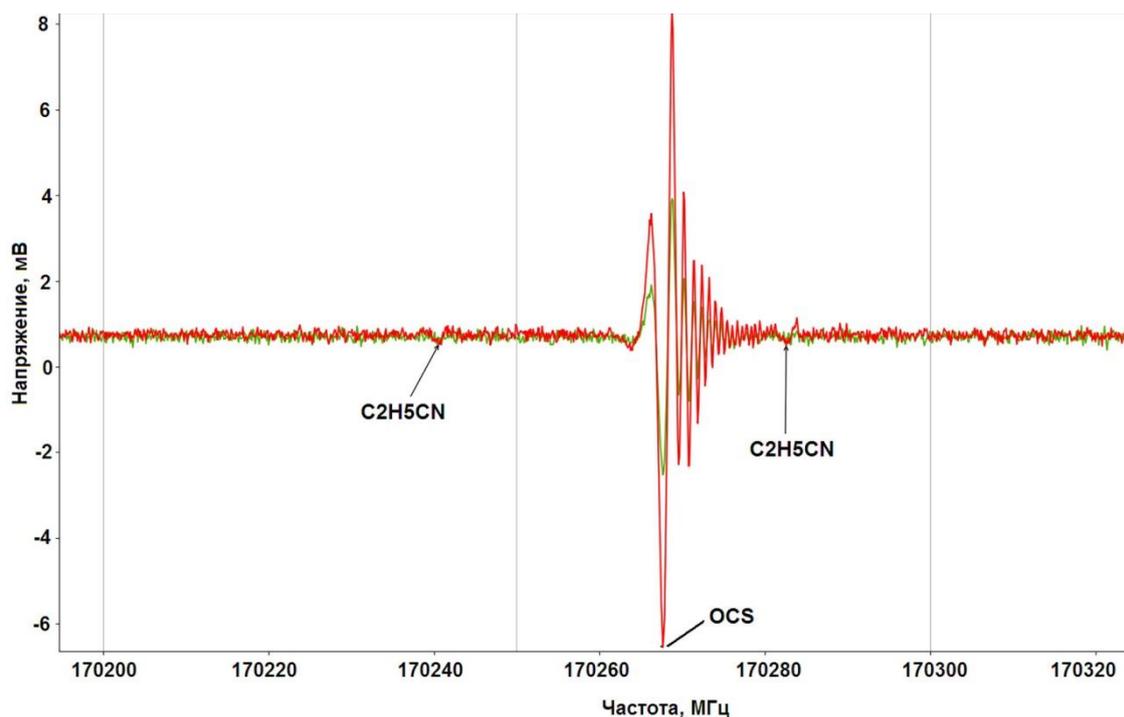


Рис.3. Участок спектра, полученный при исследованиях образцов урины крыс с физической нагрузкой (зеленый) и крыс с физической нагрузкой на фоне дисбактериоза (красный) на восьмой день эксперимента, содержащий линию поглощения OCS на частоте 170267, 5 МГц (170267,494 МГц квантовые числа перехода $14 \leftarrow 13$) [8] (для обоих образцов) и две линии пропионитрила (C_2H_5CN) на частотах 170240 МГц (частота из каталога 170240.32 МГц для двух переходов с квантовыми числами $19\ 7\ 13 \leftarrow 18\ 7\ 12$, $19\ 7\ 12 \leftarrow 18\ 7\ 11$ и частота 170240.697 МГц для переходов с квантовыми числами $19\ 10\ 9 \leftarrow 18\ 10\ 8$ и $19\ 10\ 10 \leftarrow 18\ 10\ 9$ [8]) и 170282 МГц (частота из каталога 170282.5250 МГц с для переходов с квантовыми числами $19\ 6\ 14 \leftarrow 18\ 6\ 13$ и $19\ 6\ 13 \leftarrow 18\ 6\ 12$ [8]) для образца с дисбактериозом

Пример записи участка спектра, полученный при исследованиях образцов мочи крыс с физической нагрузкой (зеленый) крыс с физической нагрузкой на фоне дисбактериоза (красный) на восьмой день эксперимента приведен на рис.3. Для крысы с дисбактериозом без дополнительных воздействий (красный график), кроме физических нагрузок, повышено содержание пропионитрила (C_2H_5CN). Кроме того, содержание серооксида углерода (OCS) возрастает при физических нагрузках на фоне дисбактериоза относительно контрольной группы, также испытывающей физические нагрузки.

Из таблицы 1 видно, что для всех крыс с дисбактериозом возрастает содержание метилмеркаптана (CH_3SH). Для крысы с дисбактериозом при

воздействии на нее электромагнитным излучением возросло содержание ацетальдегида (CH_3CHO).

Заключение

Приведены результаты применения метода терагерцовой газовой спектроскопии высокого разрешения на эффекте быстрого прохождения частоты для исследования состава продуктов термического разложения образцов биологических жидкостей (урины) живых организмов (крыс с искусственно вызванным дисбактериозом).

Выявлены совокупности метаболитов, появляющихся при термическом разложении образцов, обнаружено различие в составе продуктов терморазложения, происходящее при физических нагрузках, при наличии дисбактериоза, а также при введении пищевых добавок, улучшающих состояние крысы при дисбактериозе, и при воздействии электромагнитным излучением на живой организм. Различия в составе продуктов термического разложения урины могут указывать на изменение состояния организма при дисбактериозе и проводимых воздействиях.

Показана перспективность применения метода ТГц спектроскопии высокого разрешения в качестве «электронного носа» для разработки метода неинвазивного исследования, позволяющего выявить маркеры, отражающие нарушение метаболизма при дисбактериозе, а также оценить воздействие на организм крыс в процессе проводимой терапии.

Финансирование: Работы по исследованию биологических жидкостей выполнены при поддержке гранта Российского научного фонда №21-72-30020.

Литература

1. Amann A., de Lasy Castello B., Miekish W., Schubert J., et al. The human volatilome: volatile organic compounds (VOCs) in exhaled breath, skin emanations, urine, feces and saliva. *J. Breath Res.* 2014. V.8. P.034001. <https://doi.org/10.1088/1752-7155/8/3/034001>
2. Deda O., Gika H.G., et al. Impact of Exercise and Aging on Rat Urine and Blood Metabolome. An LC-MS Based Metabolomics Longitudinal Study. *Metabolites.* 2017. V.7. №1. P.10(1-15). <https://doi.org/10.3390/metabo7010010>
3. Вакс В.Л., Домрачева Е.Г., Собакинская Е.А., Черняева М.Б. Анализ выдыхаемого воздуха: физические методы, приборы и медицинская диагностика. *Успехи физических наук.* 2014. Т.184. №7. С.739-758. <https://doi.org/10.3367/UFNe.0184.201407d.0739>
4. Norris V., Molina F., Gewirtz A.T. Hypothesis: Bacteria control host appetites *J. Bacteriol.* 2013. V.195. №3. P.411-416. <https://doi.org/10.1128/JB.01384-12>
5. Вакс В.Л., Анфертьев В.А., Балакирев В.Ю., Басов С.А., Домрачева Е.Г., Иллюк А.В., Куприянов П.В., Приползин С.И., Черняева М.Б. Спектроскопия высокого разрешения терагерцевого частотного диапазона для аналитических приложений. *Успехи физических наук.* 2020. Т.190. С.765-776. <https://doi.org/10.3367/UFNr.2019.07.038613>
6. Черняева М.Б., Вакс В.Л., Анфертьев В.А., Домрачева Е.Г., Приползин С.И., Баранов А.Н., Тессье Р., Айзенштадт А.А., Гаврилова К.А. О продвижении метода нестационарной газовой спектроскопии, реализованного путем быстрого свипирования частоты, вверх по ТГц диапазону. *Изв.ВУЗов. Радиофизика.* (в печати).
7. Биомедицинское (доклиническое) изучение лекарственных средств, влияющих на физическую работоспособность. *Методические рекомендации. ФМБА России. МР.21.43-2017.* Москва. 2017. 134 с.

8. Pickett H.M., et al. Submillimeter, millimeter, and microwave spectral line catalog. *Journal of Quantitative Spectroscopy and Radiative Transfer*. 1998. V.60. №5. P.883-890.
9. Endres C.P., Schlemmer S., Schilke P., Stutzki J., Müller H.S.P. The Cologne Database for Molecular Spectroscopy, CDMS, in the Virtual Atomic and Molecular Data Centre, VAMDC. *J. Mol. Spectrosc.* 2016. V.327. P.95-104. <https://doi.org/10.1016/j.jms.2016.03.005>
10. Таунс Ч., Шавлов А. *Радиоспектроскопия*. Москва, Издательство иностранной литературы. 1959. 757 с.

Для цитирования:

Вакс В.Л., Домрачева Е.Г., Черняева М.Б., Анфертьев В.А., Жукова Е.С., Храмов Р.Н., Гапеев А.Б., Щербатюк Т.Г. Применение метода терагерцовой газовой спектроскопии высокого разрешения для исследования состава продуктов термического разложения биологической жидкости (урины) крыс с дисбактериозом. *Журнал радиоэлектроники [электронный журнал]*. 2022. №12. <https://doi.org/10.30898/1684-1719.2022.12.2>