

Методы обнаружения кристаллов в суставах: *status praesens*. Часть II

М.А. Кабалык, А.И. Дубиков, Т.Ю. Петрикеева

ГОУ ВПО
«Владивостокский
государственный
медицинский
университет
Росздрава»,
Владивосток

Vladivostok State
Medical University,
Russian Agency for
Health Care, Vladivostok

Контакты: Максим
Александрович
Кабалык
maxi_maxim@mail.ru

Contact: Максим
Александрович
Кабалык
maxi_maxim@mail.ru

Поступила 24.06.11

Спектроскопические методы

В основе спектроскопии лежит определение размеров и форм атомов и молекул отдельных веществ на основе их физических и оптических свойств. В ходе спектроскопии исследователь получает некоторый спектр, частота которого соответствует частоте колебаний и вращения молекул конкретного вещества. Широкое применение получила инфракрасная (ИК) спектроскопия или модифицированная Фурье ИК-спектроскопия, в основе которой лежит более сложный молекулярный анализ. Его сложность состоит в том, что спектр включает в себя колебательные и вращательные движения ядер, электронные переходы. Первые два лежат в ИК-области и представляют особый интерес в данной методике. Следует отметить, что технически ИК-спектроскопия — это достаточно простая, не требующая реагентов, автоматизированная методика, позволяющая быстро подвергать анализу различные биологические жидкости [1]. Кроме того, это относительно недорогой и экологически безопасный метод. G. Nosafci и соавт. в 2007 г. предложили использовать ИК-спектроскопию как универсальный клинический анализатор для различных видов лабораторных исследований, усовершенствованный использованием более чем 400 калибровочных образцов, не требующий реактивов, абсолютно точный и воспроизводимый [2]. Представляет интерес исследование, в ходе которого у пациентов с ревматоидным артритом, спондилоартритами и остеоартрозом изучали с помощью ИК-спектроскопии сыровотку крови и синовиальную жидкость. Результаты позволили дифференцировать эти заболевания с точностью 96,5% вследствие различий состава биологических жидкостей, что характеризует высокую специфичность метода [3]. Большое количество работ опубликовано R.A. Shaw и соавт. [4–6], которые изучали сухие мазки синовиальной жидкости с целью диагностики различных видов артритов. Авторы разработали универсальную автоматизированную систему диагностики ревматоидного артрита, остеоартроза и спондилоартритов, используя калибровочные синовиальные жидкости, полученные от пациентов с достоверными диагнозами. Метод показал совпадение результатов анализа с клиническим диагнозом в 105 случаях из 109 [5]. Исследование ИК-спектра кристаллических об-

разцов ВСП позволило выявить основные фрагменты минералов: (ОН-), (СО-) и (РО-) группы [7]. Можно предположить, что ИК-анализ образцов синовиальной жидкости весьма полезен для дифференциальной диагностики различных видов артритов. Однако следует отметить, что такой подход требует тщательной статистической проверки в связи с различными вариантами норм в популяции, а также наличием смешанных заболеваний, специфическую картину спектров которых позволят установить дальнейшие исследования в этой области [8].

В последние десятилетия особый интерес вызывает микроспектроскопия Raman — чрезвычайно мощный инструмент исследования молекулярного состава различных веществ [9]. Метод использует конфокальные микроспектрометры. При этом в экспериментах используется высокое пространственное разрешение — до 0,5–1 мкм. Линии спектров, получаемых при этом, настолько тонкие, что даже малые сдвиги частоты четко фиксируются в спектре. Это позволяет идентифицировать разнообразные химические соединения. Стоит отметить, что это также не требующий реагентов, неинвазивный, компактный способ анализа, имеющий ряд преимуществ перед ИК-спектроскопией [10]. Во-первых, не требуется предварительного высушивания образцов, поскольку жидкости не вызывают помех. Это дает возможность одновременного анализа жидкостной и твердой фаз. Во-вторых, не разрушаются образцы тканей. В-третьих, метод имеет высокое разрешение — вплоть до нескольких микрометров [11, 12]. Убедительно показано, что каждая морфологическая структура тканей обладает уникальным микроспектром [11]. Основываясь на этом, G. Penel и соавт. [12] провели оригинальный эксперимент, в ходе которого в костную ткань австралийских кроликов имплантировали портативные микроспектроскопические датчики. Записывая спектры в течение 8 мес наблюдения, они впервые проследили процессы роста и регенерации *in vivo*. K.A. Esmonde-White и соавт. [13] предложили микроспектроскопию Raman как метод оценки повреждения суставов при остеоартрозе, при этом авторы отмечают возможность оценки не только кристаллических структур, но и изменения в структурах белков синовиальной жидкости. Одним из недостатков комбинационной мик-

роспектроскопии является возникновение фоновой флюоресценции, которая в ряде случаев не позволяет считывать спектры. Вместе с тем метод дает возможность дифференцировать кристаллы дигидрата пирофосфата кальция (ДПФК), моноурата натрия (МУН), основного фосфата кальция (ОФК).

Спектроскопические методы исследования представляют особый интерес для многих областей знаний. Актуальность спектроскопии для изучения микрокристаллических артритов (МА) обусловлена рядом преимуществ, главные из которых — многофункциональность, простота в эксплуатации, высокая точность, экологическая безопасность, скорость получения результатов, относительно низкая стоимость оборудования, при этом не требуется специального наукоемкого процесса подготовки образца для исследования. Недостатками спектроскопических методов являются недостаточная изученность спектров синовиальной жидкости для разных возрастных, расовых и этнических групп в норме и при патологии, необходимость специального обучения специалистов, возникновение помех и сложности в получении результатов в загрязненных образцах. Очевидно, что дальнейшее совершенствование и развитие спектроскопической техники позволит преодолеть ряд проблем других методов и станет новым надежным инструментом диагностики МА [13].

Рентгеноструктурный анализ

Рентгеноструктурный анализ представляет собой метод изучения атомно-молекулярного строения веществ, главным образом кристаллов, в основе которого лежит феномен дифракции, возникающий при взаимодействии рентгеновского излучения с исследуемым образцом. Результат — уникальная для конкретного кристаллического материала картина. Рентгеноструктурный анализ является не разрушающим исследуемый субстрат методом и широко используется для определения состава природных минералов в геологии [14]. Исследование 12 образцов синовиальной жидкости с помощью электронной микроскопии и рентгенофазного анализа позволило выявить кристаллы ДПФК и ОФК в 11 случаях. Полученные результаты были подтверждены дисперсионным рентгенологическим анализом, при этом в оставшемся образце были обнаружены кристаллы ОФК [15]. К преимуществам метода можно отнести возможность анализа моно- и поликристаллических образцов, отсутствие необходимости в реактивах и дополнительном оборудовании. Опираясь на эти преимущества, Y.Z. Liu и соавт., исследовавшие роль кристаллов ДПФК и ОФК при остеоартрозе в суставном хряще с помощью рентгеновской дифракции, обнаружили две дополнительные формы ДПФК микрокристаллов: моно- и триклиническую [16]. Рентгенологический анализ не позволяет исследовать жидкие и гидратированные образцы, требует соблюдения строгих норм безопасности для окружающей среды и обслуживающего персонала. Недостатком метода, помимо этого, является отсутствие возможности анализа структурных фаз белков, однако эта задача решается совместным использованием рентгеноструктурных и биохимических исследований. Возможно, решить эту проблему поможет капиллярный электрофорез. Это относительно новый метод аналитической химии, являющийся по своим характеристикам автоматизированным, высокоскоростным, высокоэффективным и способным заменить или сопровождать ряд трудоемких аналитических процедур, та-

ких, например, как анализ в геле [14]. Капиллярный электрофорез был использован для анализа структуры гликопротеинов и гликозаминогликанов в синовиальной жидкости [17]. С помощью этого метода изучены характерные изменения синовиальной жидкости при остеоартрозе и ревматоидном артрите [18]. Однако метод нуждается в дальнейшем изучении его пользы для анализа синовиальной жидкости в различных клинических ситуациях. Дальнейшие исследования позволят расширить возможности и понять специфичность и воспроизводимость результатов, полученных методом капиллярного электрофореза, по сравнению с другими аналитическими методами.

Люминесценция

Впервые люминесценция была описана в XVIII в., она представляет собой нетепловое свечение вещества, возникающее после поглощения им энергии возбуждения. Некоторые вещества становятся самосветящимися, пока подвергаются освещению посторонним источником света. Это свойство получило название флюоресценции. Флюоресцировать способны как сами молекулы, входящие в состав вещества, так и специально введенные флюорохромы — красители с выраженным феноменом флюоресценции, которые, накапливаясь в конгруэнтных тканях, вызывают специфическое свечение. В последние годы методом стали активно пользоваться в аналитических целях [19]. Тем не менее собственная флюоресценция биомолекул вызывает сложности, которые заключаются в формировании фонового свечения при использовании видимой части светового спектра (350–700 нм), что затрудняет анализ. В попытках усовершенствовать этот метод была предложена ближняя ИК-флюоресценция, с помощью которой удалось избежать возникновения фонового свечения за счет использования длины волны 700–900 нм и достичь высокой чувствительности и разрешающей способности метода.

Бисфосфонаты, являясь аналогами эндогенных фосфатов, имеют высокое сродство к костной ткани за счет их связывания с гидроксиапатитом [20]. Это свойство легло в основу предложений некоторых авторов использовать бисфосфонаты для изучения процессов биоминерализации. A. Zaheer и соавт. [19] считают, что люминесцентный памидронат (памидронат-IRDye78, или Pam78), который быстро и высокоспецифично связывается с гидроксиапатитом в условиях *in vivo* и *in vitro* с пиком поглощения 771 нм и максимумом энергии возбуждения 806 нм, представляется оптимальным для использования в этих целях. По мнению авторов, методика может быть полезна для изучения развития скелета, деятельности остеобластов, формирования метастазов и атеросклероза коронарных артерий [19]. В литературе мы не нашли сообщений об использовании этой методики для обнаружения кристаллов в синовиальной жидкости и тканях сустава. Вместе с тем, учитывая успех ее применения в исследовании процессов биоминерализации в других тканях, можно предположить высокую ценность ближней ИК-флюоресценции в диагностике МА.

Заключение

Завершая обзор, надо отметить, что, безусловно, наиболее изученными и распространенными в диагностике МА являются методы визуализации. Так, поляризационная микроскопия с использованием компенсатора предлагается в качестве стандарта исследования синовиальной

жидкости на предмет содержания кристаллов. Вместе с тем, по изложенным выше причинам, метод не вполне отвечает современным требованиям к качеству и воспроизводимости, предъявляемым к диагностическим методам, несмотря на дешевизну и простоту. Достаточно детально изучены методы окраски гистологических образцов и синовиальной жидкости для идентификации кристаллических структур. Однако малый опыт применения и высокие требования к соблюдению условий анализа не позволяют считать это метод рутинным в диагностике МА.

Высокотехнологичные методы микроскопии, такие как микроскопия Raman, сканирующая электронная микроскопия, трансмиссионная микроскопия, представляют огромный потенциал для решения диагностических задач в данной области. Несмотря на высокую стоимость оборудования, электронная микроскопия обеспечивает точность, скорость получения результатов в сочетании с большой разрешающей способностью.

Особый интерес представляют методы рентгеноструктурного анализа, которые достаточно изучены, широко применяются в геологии для изучения природных кристал-

лов и пород. Учитывая большой опыт применения, высокую разрешающую способность и относительно простую технику выполнения анализа, можно отнести данный метод к перспективным. Однако требуются разработка методик оценки гистологических образцов, унификация и стандартизация технологии как диагностического метода.

На наш взгляд, весьма перспективными являются спектроскопические методы. Особенно подкупают относительно низкая стоимость, универсальность, возможности применения в разных видах лабораторной диагностики, высокое качество и безопасность. Это определяет высокую конкурентоспособность спектроскопических методов и инновационность с точки зрения диагностической и экономической составляющих технологии.

Авторы не возражают против применения поляризационной микроскопии в качестве стандартного рутинного метода диагностики МА, поскольку хорошо понимают, что и эта простая методика доступна далеко не всем специализированным центрам по разным причинам. Вместе с тем без анализа настоящего нет движения к будущему, и направления должны быть определены уже сегодня.

ЛИТЕРАТУРА

1. Wang J., Sowa M., Mantsch H.H. et al. Spectroscopy in biology. *Trends Anal Chem* 1996;5:286–96.
2. Hosafci G., Klein O., Oremek G. et al. Clinical chemistry without reagents? An infrared spectroscopic technique for determination of clinically relevant constituents of body fluids. *Anal Bioanal Chem* 2007;387:1815–22.
3. Eysel H.H., Jackson M., Nikulin A. et al. A novel diagnostic test for arthritis: multivariate analysis of infrared spectra of synovial fluid. *Biospectroscopy* 1997;3:161–7.
4. Shaw R.A., Eysel H.H., Liu K.Z. et al. Infrared spectroscopic analysis of biomedical specimens using glass substrates. *Anal Biochem* 1998;259:181–6.
5. Shaw R.A., Kotowich S., Eysel H.H. et al. Arthritis diagnosis based upon the near-infrared spectrum of synovial fluid. *Rheumatol Int* 1995;5:159–65.
6. Shaw R.A., Mantsch H.H. IR Spectroscopy. In: *Encyclopedia of Analytical Chemistry*. Meyers R.A., ed. Vol. 1. Chichester: John Wiley & Sons Ltd, 2000;83–102.
7. Shah J.S. Application of physical methods in the investigations of crystal-related arthropathies. *Ann Rheum Dis* 1983;42:68–72.
8. Yavorsky A., Hernandez-Santana A., McCarthy G. et al. Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis – analytical approaches and challenges. *Analyst* 2008;133(3):302–18.
9. Smith E., Dent G., eds. *Modern Raman spectroscopy: a practical approach*. Chichester: Wiley, 2005;209–10.
10. Carden A., Morris M.D. Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *J Biomed Opt* 2000;5:259–68.
11. Buschman H.P., Deinum G., Motz J.T. et al. Raman microscopy of human coronary atherosclerosis: biochemical assessment of cellular and extracellular morphologic structures in situ. *Cardiovasc Pathol* 2001;10:69–82.
12. Penel G., Delfosse C., Descamps M. et al. Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone* 2005;36:893–901.
13. Esmonde-White K.A., Mandair G.S., Raaij F. et al. Raman spectroscopy of synovial fluid as a tool for diagnosing osteoarthritis. *J Biomed Opt* 2009;3:034013.
14. Calafiori A.R., Di Marco G., Martino G. et al. Preparation and characterization of calcium phosphate biomaterials. *J Mater Sci: Mater Med* 2007;18:2331–8.
15. Swan A., Chapman B., Heap P. et al. Submicroscopic crystals in osteoarthritic synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 1994;53:467–70.
16. Liu Y.Z., Jackson A.P., Cosgrove S.D. Contribution of calcium-containing crystals to cartilage degradation and synovial inflammation in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2009;17(10):1333–40.
17. Korneluk-Sadzyaska A., Mierzejewska-Iwanowska B., Zwierz K. et al. Haptoglobin glycoforms in a case of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *Med Sci Monit* 1999;5:1191–6.
18. Duffy J.M., Grimshaw J., Kane A. et al. ¹H-nuclear magnetic resonance studies of human synovial fluid in arthritic disease states as an aid to confirming metabolic activity in the synovial cavity. *Anal Proc* 1994;31:257–9.
19. Zaheer A., Lenkinski R.E., Mahmood A. et al. In vivo near-infrared fluorescence imaging of osteoblastic activity. *Nat Biotechnol* 2001;19:1148–54.
20. Manolagas S.C. Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21:115–37.

Ответы на вопросы к лекции В.Г. Барсковой «Диагностика подагры»

(с. 66):

1 – В,

2 – А,

3 – В,

4 – В,

5 – В,

6 – В