



ЛАЗЕРНО-ИНДУЦИРОВАННАЯ ФЛЮОРЕСЦЕНЦИЯ КАК МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ОСТЕОПОРОЗА ПРИ ПЕРЕЛОМАХ ГРУДНЫХ И ПОЯСНИЧНЫХ ПОЗВОНКОВ

Н.Г. Фомичев¹, П.П. Петренко¹, О.В. Фаламеева¹, А.Н. Малов², Н.А. Маслов², А.М. Оришич², А.Т. Титов³, П.М. Ларионов⁴

¹ Новосибирский НИИ травматологии и ортопедии

² Институт теоретической и прикладной механики СО РАН, Новосибирск

³ Объединенный институт геологии, геофизики и минералогии им. акад. А.А. Трофимука, Новосибирск

⁴ Новосибирский НИИ патологии кровообращения им. акад. Е.Н. Мешалкина

Цель исследования — изучение спектральных характеристик лазерно-индуцированной флюоресценции (ЛИФ) веществ, входящих в состав кости, и разработка на ее основе нового метода диагностики остеопороза. Проведено обследование 69 больных с переломами грудного и поясничного отделов позвоночника. Для диагностики переломов позвоночника использовали клинические методы, стандартную рентгенографию в двух проекциях, КТ и МРТ. Критерием остеопений являлся индекс Saville. Минеральную плотность костной ткани оценивали методом двухэнергетической рентгеновской денситометрии. Гистологическому и гистоморфометрическому исследованию подверглись 46 фрагментов тел и остистых отростков поясничных позвонков, взятых во время операции, а также 96 фрагментов костной ткани тел и остистых отростков позвонков, гребней подвздошной кости и девятого ребра, полученных при аутопсии погибших от травм и имевших при жизни соматические заболевания, не оказывающие влияния на метаболизм костной ткани. Для исследований спектров флюоресценции использовали многоканальную систему регистрации спектров. В качестве источника облучения использовался газоразрядный KrF эксимерный лазер с длиной волны $\lambda = 248$ нм и энергией в импульсе 5–10 мДж. Спектральные характеристики интенсивности флюоресценции биологических веществ, входящих в состав костной ткани, показали, что наиболее выраженная флюоресценция порошка гидроксилатапата наблюдается в полосе 380–450 нм. Метод ЛИФ позволяет различать не только структурно-функциональные слои костей, но и дифференцировать степень минерализации костной ткани. Одно из достоинств метода — возможность проводить экспресс-диагностику, что особенно актуально для травматологии.

Ключевые слова: остеопороз, денситометрия, лазерно-индуцированная флюоресценция.

LASER-INDUCED FLUORESCENCE FOR OSTEO-POROSIS DIAGNOSIS IN THORACIC AND LUMBAR VERTEBRAL FRACTURES

N.G. Fomichev, P.P. Petrenko, O.V. Falameeva, A.N. Malov, N.A. Maslov, A.M. Orishich, A.T. Titov, P.M. Larionov

Objective — to investigate spectral characteristics of laser-induced fluorescence (LIF) of bone substances, and to develop a new technique of osteoporosis diagnosis. Sixty-nine patients surgically treated for thoracic and lumbar spine fractures were examined. Clinical examinations, plain radiography in two projections, CT and MRI were used for spine fracture diagnosis. Saville index was a criterion for osteopenia. Bone mineral density was assessed by dual-energy X-ray densitometry. Histological and histomorphometric analyses were applied to 46 fragments of vertebral bodies and spinous processes taken intraoperatively, and 96 autopsy fragments of vertebral bone, spinous processes, iliac crest, and the ninth rib taken from patients died of trauma who had no metabolic bone diseases in their previous history. Fluorescence spectra were analyzed with multichannel system of spectrum registration. Gas-discharge KrF excimer laser with a wave length of $\lambda = 248$ nm and impulse energy of 5–10 mJ was used as a source of radiation. Spectral characteristics of fluorescence intensity of biological substances forming a bone tissue have shown that the most expressed fluorescence of hydroxyapatite is observed in the band of 380–450 nm. The LIF technique permits not only to differentiate the structural-functional layers of bone, but also to determine a bone tissue mineralization degree. The possibility to perform express diagnosis is one of the advantages of the technique. It is especially topical for traumatology.

Key words: osteoporosis, densitometry, laser-induced fluorescence.

Введение

В настоящее время в России, как и в других странах мира, прослеживается явная тенденция к увеличению заболеваемости населения остеопорозом и к прогрессирующему старению популяции [5]. Остеопороз имеет характер «безмолвной эпидемии» и часто протекает бессимптомно, диагностируется только после возникновения переломов, которые являются самым грозным его осложнением [4]. Во многих случаях переломы становятся причиной более костных деформаций, ограничения объема движений, влекут за собой необходимость в постоянном медицинском уходе, а также порождают ряд психологических и других проблем, значительно снижающих качество жизни, ведущих к инвалидности и нередко – к смерти.

До недавнего времени стандартная рентгенография оставалась единственным методом диагностики заболевания, но в силу низкой чувствительности и значительной дозы облучения она не позволяла обследовать широкие группы населения и диагностировать патологию на доклинической стадии. Современные методы диагностики остеопороза основаны на количественном исследовании минеральной плотности костной ткани (МПКТ) – остеоденситометрии, которая может быть проведена с помощью методик монофотонной или дифотонной абсорбциометрии, моноэнергетической или двухэнергетической рентгеновской абсорбциометрии, количественной компьютерной томографии или радиографической абсорбциометрии. Согласно литературным данным, все эти технологии, а также методы, основанные на биохимических исследованиях мочи и крови, гистологической оценки костной ткани, значительно различаются по точности и воспроизводимости измерений, по значимости для клинической и научной практики, а также по общей доступности.

Несмотря на многочисленность имеющихся на вооружении у практи-

ческого здравоохранения методов обследования больных с остеопорозом, нельзя сказать, что проблема диагностики решена целиком и полностью. Используемые в настоящее время методики не всегда позволяют уверенно диагностировать выраженность остеопороза, что затрудняет выбор тактики и метода лечения. Одним из высокоинформативных и современных видов диагностики, используемых в медико-биологических исследованиях, является лазерно-индуцированная флюоресценция (ЛИФ) [1]. В медицинской практике ее применение эффективно для диагностики важнейших физиологических процессов, широкого ряда заболеваний, движения лекарств. Спектроскопическая оценка лазерно-индуцированной аутофлюоресценции широко используется как малоинвазивный метод в экспериментальной онкологии [12], для диагностики аденокарциномы толстого кишечника [9], рака легких [7], плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта [10]. Следующим шагом исследователей стали эксперименты по применению ЛИФ для контроля терапии неоплазмы *in vivo* [13]. К.У. Han et al. [8] разработали метод капиллярного электрофореза с последующим применением ЛИФ для определения вазопрессина в биологических жидкостях. Разработана комбинация метода микродиализа и капиллярного электрофореза ЛИФ, что дает возможность легко мониторировать различные показатели межтканевой жидкости: глюкозы, аминокислот, лекарственных препаратов [11].

Исследования кардиохирургов выявили, что по изменению спектра ЛИФ удается отличить нормальную аорту от пораженной атеросклерозом [6]. Измерения ЛИФ сердечной мышцы показали, что поражение ее кальцинозом приводит к существенной перестройке спектрального состава люминесценции и открывает перспективу применения ЛИФ для диагностики степени поражения кальцинозом при проведении кардиохирургических операций на открытом сердце [2, 3]. При этом следует отметить, что при нарастающей широте использования ЛИФ применение метода в травматологической практике до сих пор не рассматривалось.

Целью данной работы явилось изучение спектральных характеристик ЛИФ – веществ, входящих в состав кости, и разработка на ее основе нового метода диагностики остеопороза.

Материалы и методы

В 2003 г. проведено обследование 69 больных с переломами грудного и поясничного отделов позвоночника в возрасте от 19 до 73 лет (средний возраст – $43,5 \pm 3,1$), получавших оперативное лечение в клинике неосложненной травмы позвоночника Новосибирского НИИТО; среди обследуемых мужчин – 37 (53,6%), женщин – 32 (46,4%) (табл.).

На следующие сутки после травмы в клинику поступило 39 (56,5%) пострадавших, в первые сутки после травмы – 27 (39,1%), после трех суток и более – 3 (4,4%). У большинства больных – 59 (85,7%) – преобладали

Таблица

Распределение больных по полу и возрасту

Возраст, лет	Мужчины, абс. (%)	Женщины, абс. (%)	Итого, абс.
19–29	6 (16,2)	2 (6,2)	8
30–39	8 (21,6)	4 (12,4)	12
40–49	8 (21,6)	8 (24,8)	16
50–59	7 (19,0)	14 (44,2)	21
60 и старше	8 (21,6)	4 (12,4)	12
Всего больных	37 (53,6)	32 (46,4)	69

травмы Th₁₁–L₂ сегментов. Определены причины травм: 28 (40,6 %) больных получили переломы позвоночника от незначительного травматического воздействия (падение с высоты собственного роста, подъем тяжести до 10 кг), остальные 41 (59,4 %) – при автодорожной аварии.

Для диагностики переломов позвоночника использовали клинические методы, стандартную рентгенографию в двух проекциях (переднезадней и боковой), КТ и МРТ. Критерием остеопений являлся индекс Saville. Минеральную плотность костной ткани оценивали методом двухэнергетической рентгеновской денситометрии (DEXA) на приборе «Lunar Expert-XL» стандартным набором программ. Гистологическому и гистоморфометрическому исследованию подверглись 46 фрагментов поясничных позвонков, взятых во время операции, а также 96 фрагментов костной ткани тел и остистых отростков позвонков, гребней подвздошной кости и девятого ребра, полученные в Новосибирском областном бюро судебно-медицинской экспертизы при аутопсии погибших от травм и имевших при жизни соматические заболевания, не оказывающие влияния на метаболизм костной ткани. Гистологические срезы окрашивали гематоксилином и эозином по Ван-Гизону. Определение гистоморфометрических параметров проводили с помощью пакета программ «Motic Images Plus 2.0 ML», «Микромед». Оценивали объем губчатой кости, ширину трабекул, ширину кортикальной пластинки.

Для исследований спектров флюоресценции использовали многоканальную систему регистрации спектров (рис. 1). В качестве источника облучения использовался газоразрядный КгF эксимерный лазер с длиной волны $\lambda = 248$ нм и энергией в импульсе 5–10 мДж. Излучение лазера через диафрагму 2 с помощью линзы 3 и полупрозрачного зеркала 4 подавалось на предметный столик из слабофлюоресцирующего материала, на котором помещались исследуемые

ткани. Выбором размера диафрагмы 2 и месторасположением линзы 3 определяли размер исследуемой области, около 10 мм. С помощью зеркала 5 и линзы 7 изображение ткани проецировалось на спектрограф 8, где регистрировалось спектрометром с голографической дифракционной решеткой, обеспечивающим измерение спектров в интервале 300–600 нм, использован электронно-оптический преобразователь 9 и CCD-камера 10, изображение обрабатывалось на компьютере 11.

Результаты

Сравнительный анализ денситометрического и гистоморфометрического исследований. На основании денситометрического исследования методом двухэнергетической рентгеновской абсорциометрии все больные с переломами позвоночника были разделены на три группы: I – 29 пациентов с нормальной МПКТ; II – 19 с остеопенией; III – 27 с остеопорозом разной степени выраженности. На основании рентгенологического исследования из 27 пациентов третьей группы диагноз «остеопороз»

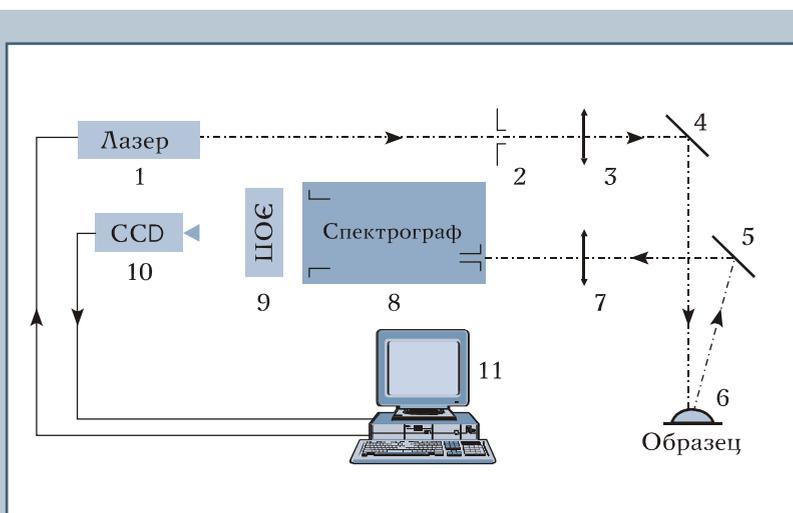


Рис. 1

Принципиальная схема многоканальной системы регистрации спектров:

- 1 – газоразрядный КгF эксимерный лазер с длиной волны $\lambda = 248$ нм и энергией в импульсе 5–10 мДж;
- 2 – диафрагма;
- 3 – линза;
- 4 – зеркало;
- 5 – зеркало;
- 6 – образец (в данном случае фрагмент костной ткани) на предметном столике из слабофлюоресцирующего материала;
- 7 – линза;
- 8 – спектрограф;
- 9 – электронно-оптический преобразователь;
- 10 – CCD-камера (Chads Carl Devais);
- 11 – компьютер

роз» был поставлен семи (26 %); во второй группе остеопения не была заподозрена ни у одного больного.

При гистологическом исследовании препаратов пациентов второй и третьей групп (по сравнению с первой группой) выявлены хаотично расположенные костные балки неравномерной толщины, окруженные тонким ободком остеоида. Остеоциты и линии склеивания расположены неравномерно, в некоторых балках остеоциты отсутствуют. Вокруг некоторых костных балок расположены единичные остеобласты с дистрофическими изменениями ядер. В некоторых балках – множественные микропереломы без признаков регенерации, в межбалочном пространстве – жировой мозг разрыхлен, с очагами фибротизации.

На основании гистоморфометрического исследования костных фрагментов из поясничных позвонков и остистых отростков у пациентов второй и третьей групп (по сравнению с первой) было выявлено снижение объема губчатой кости ($p < 0,01$), уменьшение диаметра трабекул ($p < 0,001$) и кортикальной пластинки ($p < 0,05$). Сравнение показателей объема губчатой кости с показателями минеральной плотности костной ткани, определяемого методом DEXA, выявило наличие высокой степени их корреляции ($r = 0,96$).

Несмотря на то что метод двух-

энергетической рентгеновской денситометрии является своеобразным «золотым стандартом» при диагностике остеопороза, в процессе анализа результатов DEXA и гистоморфометрии произошло уточнение состава основных групп пациентов: один пациент из группы с нормальными значениями минеральной плотности костной ткани дополнил группу пациентов с остеопенией, три пациента из группы остеопении дополнили группу остеопороза. Такая ложноотрицательная диагностика выраженности остеопенических состояний в первом случае была обусловлена наличием атеросклероза аорты и кальцификацией передней продольной связки в поясничном отделе позвоночника, а в остальных случаях – наличием на спондилограммах остеофитов.

Таким образом, сочетание гистоморфометрии костной ткани и денситометрии позволило сформировать диагностический стандарт, использованный в данной работе.

Исследование основных характеристик биологических веществ, входящих в состав костной ткани в норме методом ЛИФ. Зрелая костная ткань состоит на 60–70 % из неорганических минеральных солей, остальная часть – это органический матрикс и вода. Органический матрикс состоит преимущественно из коллагена (примерно 95 %) и из неколлагеновых протеинов,

включая протеогликаны. Главной неорганической составляющей костной ткани живого организма позвоночных являются минералы гидроксилатапата $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

Флюоресценция биологических тканей обеспечивается тремя классами веществ. Первый класс – спектр, в котором отмечается преимущественно люминесценция белка в виде составляющих его аминокислот; второй класс – спектры, у которых полоса с максимумом вблизи 330 нм, однако кроме ЛИФ белка присутствуют и другие полосы флюоресценции в области 370–400 нм, что обусловлено наличием коллагена и эластина; третий класс веществ имеет четыре полосы флюоресценции, отражающих присутствие минерала гидроксилатапата. Известно, что флюоресценция биологических веществ и спектры ЛИФ-веществ имеют сложный состав: наличие ультрафиолетовой компоненты в диапазоне 270–300 нм (кость, хрящ, мышечная фасция), появление второго максимума в области 370–420 нм (кость, хрящ), существенный подъем плато в диапазоне 400–550 нм (мышечная ткань, аорта, мышечная фасция).

Таким образом, различные биологические вещества могут иметь отличающиеся спектры ЛИФ, по которым можно осуществлять их идентификацию.

С целью освобождения от органической составляющей и определения

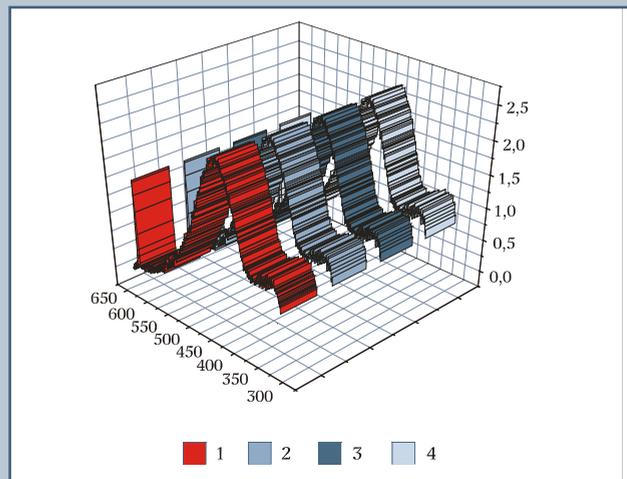


Рис. 2

Интенсивность флюоресценции порошка гидроксилатапата костной ткани разных отделов скелета в относительных единицах ($M \pm m$):

- 1 – гребень подвздошной кости;
- 2 – остистый отросток позвонка;
- 3 – тело поясничного позвонка;
- 4 – ребро

спектров флюоресценции гидроксилапатита нормальной костной ткани в муфельной печи при температуре 700 град. был произведен отжиг фрагментов костей, взятых из гребней подвздошных костей, ребер, остистых отростков и тел позвонков. Выяснено, что наиболее выраженная флюоресценция гидроксилапатита наблюдается в полосе 380–450 нм. Достоверных различий показателей интенсивности свечения порошка гидроксилапатита в образцах здоровой кости в зависимости от локализации выявлено не было (рис. 2).

Раздельное исследование биоптата с кортикальной и губчатой сторон выявило, что степень флюоресценции гидроксилапатита губчатой ткани в полосе 380–450 нм ниже того же показателя кортикальной кости ($p < 0,05$), что подтверждает гипотезу о том, что интенсивность флюоресценции зависит от степени минерализации костной ткани (рис. 3).

Исследование возможностей флюоресценции гидроксилапатита костной ткани в диагностике остеопении и остеопороза методом ЛИФ. При исследовании флюоресценции гидроксилапатита костной ткани из фрагментов гребней подвздошных костей, остистых отростков, тел поясничных позвонков и ребер выявлено, что имеются достоверные различия между первой, второй и третьей группами ($p < 0,05$) (рис. 4).

В двух образцах костной ткани остистых отростков позвонков пациентов из первой группы спектры ЛИФ в полосах 380–450 нм были значительно ниже по сравнению со средними спектрами флюоресценции фрагментов костной ткани пациентов той же группы и напоминали по спектральному составу характеристики костной ткани пациентов третьей группы. При анализе расхождений было выявлено, что фрагменты костной ткани остистых отростков не были в должной мере очищены от связок, по-видимому, спектральный состав отражал присутствие над- и межостистых связок и незначительной части губчатой костной ткани.

После очистки образцов костной ткани от связочного аппарата исследование с помощью ЛИФ было выполнено повторно. В результате спектры ЛИФ двух сомнительных образцов в диагностической полосе гидроксилапатита значительно увеличились и не выходили за рамки разброса спектральных ха-

рактеристик в первой группе, хотя были незначительно меньше среднего показателя данной группы (рис. 5).

При сравнении спектрального состава и результатов гистоморфометрии образцов из каждой исследуемой группы достоверных различий в зависимости от локализации обнаружено

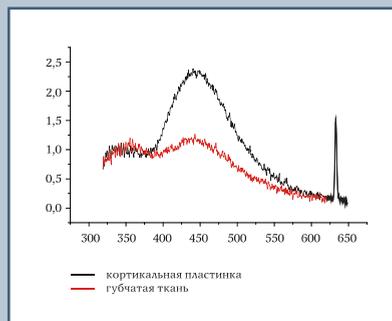


Рис. 3
Интенсивность флюоресценции кортикальной и губчатой кости в относительных единицах

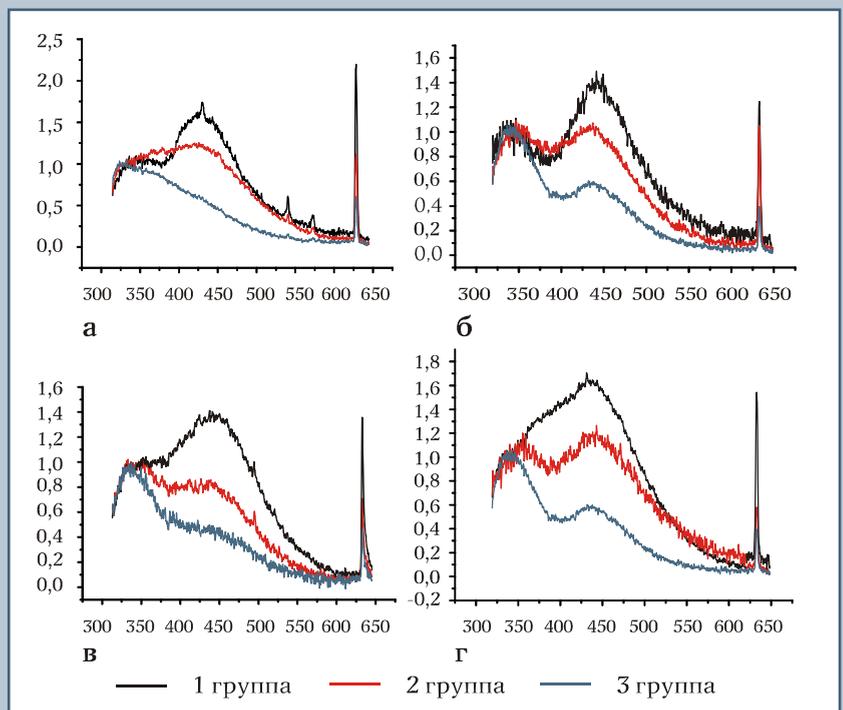


Рис. 4
Интенсивность ЛИФ губчатой костной ткани в относительных единицах:
а — гребней подвздошных костей;
б — остистых отростков;
в — тел поясничных позвонков;
г — ребер

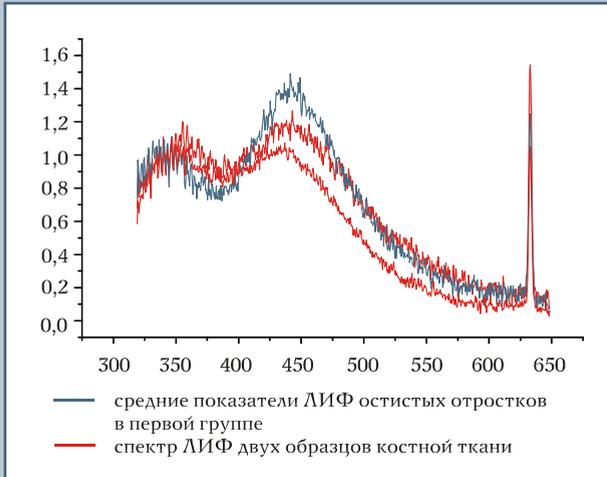


Рис. 5

Повторное исследование ЛИФ двух образцов костной ткани из остистых отростков поясничных позвонков пациентов первой группы (интенсивность флюоресценции выражена в относительных единицах)

не было. Также была установлена высокая корреляционная связь этих показателей с результатами DEXA ($r = 0,89$).

Заключение

Проблема оптимизации диагностики остеопороза до настоящего времени остается весьма актуальной. Современная медицина располагает на сегодняшний день целым спектром морфологических, биохимических, гистоморфологических и инструментальных методов диагностики остеопороза, различающихся точностью, сложностью проведения, доступностью, себестоимостью.

Согласно современным представлениям, главной целью диагностических мероприятий при остеопорозе является принятие решения о необходимости назначения превентивной терапии переломов или уточнения ее характера. Диагностические мероприятия считаются нецелесообразными, если их результаты не повлияют на выбор терапии или исход болезни. Исходное неудовлетворительное состояние

костной ткани у больных с переломами позвоночника влияет на метод остеосинтеза (выбор металлоконструкции, использование костного цемента), объем резекции костной ткани, наличие и длительность послеоперационной иммобилизации.

К сожалению, при недостаточной информативности о наличии остеопороза в области оперативного вмешательства могут развиваться такие осложнения, как прогрессирование кифотической деформации позвоночника в послеоперационном периоде, нестабильность металлоконструкции с последующим отсутствием должной фиксации и возможным развитием ложного сустава, нестабильность эндопротеза при эндопротезировании. Поэтому быстрая и своевременная, особенно интраоперационная, диагностика фрагментов костной ткани может способствовать профилактике этих осложнений.

Одним из современных, высокоинформативных методов диагностики остеопороза может стать оценка ЛИФ. Изученные в процессе исследования спектральные характеристики

интенсивности флюоресценции биологических веществ, входящих в состав костной ткани, показали, что наиболее выраженная флюоресценция порошка гидроксилапатита — основной минеральной составляющей кости — наблюдается в полосе 380–450 нм. Метод ЛИФ позволяет различать не только структурно-функциональные слои костей, но и дифференцировать степень минерализации костной ткани. Выявленная высокая степень корреляции показателей гистоморфометрии и денситометрии со спектрами ЛИФ гидроксилапатита костной ткани позволяет использовать этот метод для диагностики остеопороза и остеопенических состояний. Одно из достоинств данного метода — скорость, то есть возможность проводить экспресс-диагностику. Это особенно актуально для травматологии, так как важным фактором, влияющим на успех оперативного лечения, является адекватная оценка состояния костной ткани во время операции.

Литература

- 1 **Бурштейн Э.И.** Люминесценция белка. Природа и применение // Итоги науки и техники. Сер. Молекулярная биология. Т. 3. М., 1973. С. 126.
- 2 **Ларионов П.М., Малов А.Н., Оришнич А.М. и др.** Лазерно-индуцированная флюоресценция сердечных тканей при поражении кальцинозом // Журнал прикладной спектроскопии. 1997. Т. 64. С. 539–544.
- 3 **Ларионов П.М., Малов А.Н., Маслов Н.А. и др.** Применение метода ЛИФ для исследования влияния УФ-излучения на биологические ткани // Оптика атмосферы и океана. 2000. № 3. Т. 13. С. 18–24.
- 4 **Михайлов Е.Е., Беневоленская Л.И., Мылов Н.М.** Распространенность переломов позвоночника в популяционной выборке лиц старше 50 лет // Вестн. травматол. и ортопед. им. Н.Н. Приорова. 1997. № 3. С. 20–26.
- 5 **Родионова С.С., М.А. Макаров, А.Ф. Колондаев** Значение минеральной плотности и показателей качества костной ткани в обеспечении ее прочности при остеопорозе // Вестн. травматол. и ортопед. 2001. № 2. С. 76–80.
- 6 **Cutruzzola F.W., Stetz M.L., O'Brien K.M. et al.** Change in laser-induced arterial fluorescence during ablation of atherosclerotic plaque // Lasers Surg. Med. 1989. Vol. 9. P. 109–116.
- 7 **Hage R., Galhanone P.R., Zangaro R.A. et al.** Using the laser-induced fluorescence spectroscopy in the differentiation between normal and neoplastic human breast tissue // Lasers Med. Sci. 2003. Vol. 18. P. 171–176.
- 8 **Han K.Y., Ban E., Yoo Y.S.** Analysis of vasopressin using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detector based on competitive immunoassay // J. Chromatogr. 2003. Vol. 26. P. 215–220.
- 9 **Huang Z., Zheng W., Xie S. et al.** Laser-induced autofluorescence microscopy of normal and tumor human colonic tissue // Int. J. Oncol. 2004. Vol. 24. P. 59–63.
- 10 **Majumder S.K., Ghosh N., Kataria S. et al.** Nonlinear pattern recognition for laser-induced fluorescence diagnosis of cancer // Lasers Surg. Med. 2003. Vol. 33. P. 48–56.
- 11 **Paez X., Mazzei-Davila C.A., Hernandez L.** Subcutaneous microdialysis: a simple technique for monitoring the extracellular biochemical environment. Combination with capillary electrophoresis and laser-induced fluorescence detection // Invest. Clin. 2003. Vol. 44. P. 227–239.
- 12 **Richards-Kortum R., Sevick-Muraca E.** Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis // Ann. Rev. Phys. Chem. 1996. Vol. 47. P. 555–606.
- 13 **Wack S., Hajri A., Heisel F. et al.** Feasibility, sensitivity, and reliability of laser-induced fluorescence imaging of green fluorescent protein-expressing tumors *in vivo* // Mol. Ther. 2003. Vol. 7. P. 765–773.

Адрес для переписки:

Петренко Павел Павлович
630091, г. Новосибирск, ул. Фрунзе, 17,
НИИТО,
PPetrenko@niito.ru