

ЭКСПРЕСС-АНАЛИЗ ХРЯЩЕВЫХ ТКАНЕЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МНОГОМЕРНОГО АНАЛИЗА ИК-СПЕКТРОВ

DOI: 10.17691/stm2022.14.6.03

УДК 611.018.3+616–073.584

Поступила 15.06.2022 г.

© **Н.Ю. Игнатьева**, д.х.н., доцент кафедры физической химии¹;
О.Л. Захаркина, научный сотрудник Института фотонных технологий²;
А.П. Свиридов, д.ф.-м.н., ведущий научный сотрудник Института фотонных технологий²

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Ленинские горы, 1, Москва, 119991;²Федеральный научный исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, Ленинский проспект, 59, Москва, 119333

Цель исследования — разработка метода диагностики хрящевой ткани разных видов с количественным определением основных компонентов на основе многомерного анализа ИК-спектров и верификация данных с помощью классического химического анализа.

Материалы и методы. В качестве образцов исследованы хрящи носовой перегородки, коленного сустава, ребра и пульпозного ядра межпозвоночного диска, а также трипсинизированные и дефектные образцы хрящей. Получены ИК-спектры образцов хрящей, а также калибровочных смесей коллагена и хондроитина сульфата. Для получения ИК-спектров использовали режим нарушенного полного внутреннего отражения, а для их обработки — программное обеспечение TQ Analyst и калибровочный метод регрессии на главные компоненты. На основе калибровочной зависимости определяли коэффициент $K_{\text{сп}}$ как отношение массовых долей коллагена и хондроитина сульфата. Его значение сравнивали со значением $K_{\text{хим}}$, равным отношению массовых долей коллагена и хондроитина сульфата, полученных с помощью классического химического анализа этих веществ.

Результаты. ИК-спектры хрящевых тканей являются суперпозицией ИК-спектров коллагена и хондроитина сульфата и качественно отражают их состав. Изменение соотношения между относительными интенсивностями характеристических полос соединений в ИК-спектре очевидно лишь при значительном изменении содержания этих соединений в хрящах. Такое изменение происходит после трипсинизации, когда $K_{\text{сп}}$ возрастает от $0,88 \pm 0,05$ ($K_{\text{хим}} \sim 0,8$) до 4,55. Использование калибровочной модели с полным анализом ИК-спектра хрящей дало возможность определять разницу в соотношении основных компонентов в матриксе разных образцов при отсутствии очевидных изменений в ИК-спектрах. Так, было показано статистически значимое уменьшение содержания хондроитина сульфата в деградированном суставном хряще ($K_{\text{сп}} = 4,4 \pm 1,8$; $K_{\text{хим}} \sim 5,5$) по сравнению с интактными образцами ($K_{\text{сп}} = 2,8 \pm 1,1$; $K_{\text{хим}} \sim 2,6$).

Заключение. ИК-спектрометрический экспресс-анализ хрящевых тканей с применением метода регрессии на главные компоненты позволяет корректно определить соотношение основных компонентов матрикса хряща — коллагена и гликозаминогликанов. Предложенная методика включает одно измерение, не нуждается в длительной и трудоемкой пробоподготовке, не требует длительных, многостадийных и трудоемких химических манипуляций для определения каждого из компонентов, позволяет определить особенности и изменения состава для большого набора образцов хрящевой ткани разных типов. В перспективе такой подход может быть использован для неинвазивной диагностики хрящевой ткани.

Ключевые слова: хрящевая ткань; коллаген; гликозаминогликаны; ИК-спектроскопия с нарушенным полным внутренним отражением; метод регрессии на главные компоненты.

Как цитировать: Ignatieva N.Yu., Zakharkina O.L., Sviridov A.P. Express analysis of cartilage tissue using multivariate analysis of IR spectra. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2022; 14(6): 25, <https://doi.org/10.17691/stm2022.14.6.03>

English

Express Analysis of Cartilage Tissue Using Multivariate Analysis of IR Spectra

N.Yu. Ignatieva, DSc, Associate Professor, Department of Physical Chemistry¹;O.L. Zakharkina, Researcher, Institute of Photonic Technologies²;A.P. Sviridov, DSc, Leading Researcher, Institute of Photonic Technologies²

Для контактов: Игнатьева Наталия Юрьевна, e-mail: nyu@kge.msu.ru

¹Lomonosov Moscow State University, 1 Leninskie Gory, Moscow, 119991, Russia;

²Federal Scientific Research Centre "Crystallography and Photonics" of the Russian Academy of Sciences, 59 Leninsky Prospect, Moscow, 119333, Russia

The aim of the study was to develop a diagnostic method for the quantitative determination of the main components of cartilage tissue of various types based on multivariate IR spectral analysis and verification of data using classical chemical analysis.

Materials and Methods. Cartilages of the nasal septum, knee joint, rib, and nucleus pulposus of the intervertebral disc, as well as trypsinized and defective cartilage samples, were examined as samples. The IR spectra of the cartilage samples, as well as calibration mixtures of collagen and chondroitin sulfate, were obtained. The IR spectra were collected using the attenuated total reflectance techniques, and their processing was performed using the TQ Analyst software and the principal component regression calibration technique. Based on calibration dependence, the K_{sp} coefficient was determined as the ratio of the mass fractions of collagen and chondroitin sulfate. Its value was compared with the value of K_{chem} , equal to the ratio of the mass fractions of collagen and chondroitin sulfate, obtained using the classical chemical analysis of these substances.

Results. The IR spectra of cartilage tissues are a superposition of the IR spectra of collagen and chondroitin sulfate and qualitatively reflect their composition. A change in the ratio between the relative intensities of the characteristic bands of compounds in the IR spectrum is obvious only with a significant change in the content of these compounds in cartilage. This change occurs after trypsinization, when K_{sp} increases from 0.88 ± 0.05 ($K_{chem} \sim 0.8$) to 4.55. The use of a calibration model with a complete analysis of the cartilage IR spectrum made it possible to determine the difference in the ratio of the main components in the matrix of different samples in the absence of obvious changes in the IR spectra. Thus, a statistically significant decrease in the content of chondroitin sulfate in degraded articular cartilage ($K_{sp} = 4.4 \pm 1.8$; $K_{chem} \sim 5.5$) was shown compared with intact samples ($K_{sp} = 2.8 \pm 1.1$; $K_{chem} \sim 2.6$).

Conclusion. IR spectrometric express analysis of cartilage tissue employing the principal component regression method allows a correct determination of the ratio of the main components in the cartilage matrix, those of collagen and glycosaminoglycans. The proposed technique includes one measurement, does not require prolonged and laborious sample preparation, does not require long, multi-stage and laborious chemical manipulations to determine each of the components, and makes it possible to determine the features and changes in the composition for a large set of samples of cartilage tissue of different types. In future, this approach can be used for non-invasive diagnostics of cartilage tissue.

Key words: cartilage tissue; collagen; glycosaminoglycans; IR spectroscopy with attenuated total reflection; principal component regression method.

Введение

Главными компонентами матрикса хрящевых тканей являются коллаген (структурообразующий белок) и сульфатированные полисахариды гликозаминогликаны (ГАГ), образующие сложные комплексы с белком (протеогликаны и их агрегаты) [1, 2]. Содержание этих компонентов и их соотношение являются одним из важнейших показателей функциональной способности хрящей и хрящевых материалов [1, 2]. Оценка данных показателей проводится при исследовании патологических изменений [3–11] и зональной структуры [12] хрящей, а также при создании их заместителей (скаффолдов) [13]. Для установления надежных корреляций между составом и характеристиками конкретного типа хрящевого материала требуется значительное количество исследуемых образцов.

Классический химический анализ биологических тканей обычно требует многостадийной пробоподготовки, включающей в себя получение растворимых форм (первый этап) и анализ растворов на каждый из компонентов (второй этап). При этом перевод ткани в растворимую форму не может происходить по одной методике и для коллагена, и для ГАГ, а анализ каждого компонента требует специального аналитического оборудования и высокой квалификации персонала.

Исключения многостадийной пробоподготовки и анализа, а следовательно, и использования дорого-

стоящих расходных реагентов можно достичь, измеряя набор физических величин целостной структуры. В этом случае проблемой останется установление связи между полученным набором физических величин и химической характеристикой. К таким методам относится ИК-спектроскопия. Теоретическая база использования ИК-спектроскопии для анализа, интерпретации и математической обработки ИК-спектров биологических жидкостей и тканей представлена в работе [14]. В работе [15] на примере анализа данных о крови подробно описан оригинальный подход к статистической обработке отношений высот пиков полос поглощения, позволяющий сделать вывод о патологических изменениях в биологической системе.

Возможность использования ИК-спектров хрящевой ткани для оценки содержания в ней основных компонентов обсуждалась еще более 20 лет назад [16]. В ранних работах на качественном уровне показано, что после трипсинизации хряща (и удаления значительной части ГАГ из матрикса) ИК-спектр поглощения в области $700\text{--}1700\text{ см}^{-1}$ заметно изменяется [16, 17]. Были выделены характерные полосы, относящиеся к отдельным компонентам, и по соотношению интенсивностей пиков этих полос проведены оценки содержания основных компонентов [13, 18, 19]. К сожалению, такой подход не приводит к установлению строгих количественных соотношений между компонентами [12], хотя позволяет качественно картировать содержание ГАГ в хряще [18, 19].

Ситуация изменилась с применением в ИК-спектроскопии формальных методов многомерного анализа больших сложно организованных массивов экспериментальных данных (ИК-спектров многокомпонентных систем). Так, исследователи, создавая собственные алгоритмы обработки с помощью многомерного анализа ИК-спектров хрящевых материалов, получили неплохое согласие в количествах ГАГ, определенных спектральным и химическим методами анализа, в хряще сустава [11], носовой перегородке [12], хрящевых скаффолдах [13], а также провели оценку степени деградации суставного хряща [6]. Появление в программном обеспечении серийных приборов специализированных пакетов программ для многомерного анализа данных существенно облегчает количественное определение двух основных компонентов в матриксе хрящевой ткани. Тем не менее для доказательства достоверности и точности метода анализа ИК-спектральных данных необходимо проводить сравнение конечного результата с данными, полученными традиционными методами.

Особый интерес представляет спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения (НПВО). Она позволяет выполнять экспрессные измерения спектров хрящей с помощью призмического наконечника, который лишь соприкасается с образцом, что существенно упрощает пробоподготовку. Однако в измерениях спектра участвует лишь приповерхностный слой образца, куда проникает эванесцентное световое поле при полном внутреннем отражении. Понятно, что ИК-спектр приповерхностного слоя образца может отличаться от ИК-спектра, усредненного по объему. Вопрос об адекватности определения состава хрящей методом ИК-спектроскопии НПВО до сих пор остается открытым.

Цель исследования — разработка метода диагностики хрящевой ткани разных видов с количественным определением основных компонентов на основе многомерного анализа ИК-спектров и верификация данных с помощью классического химического анализа.

Материалы и методы

Материалы

Носовые перегородки и реберные хрящи свиньи, а также коленный сустав коровы и фрагменты позвоночника кролика и барана были получены с фермы и подвергались предварительной обработке не позднее 12 ч после изъятия.

Образцы отмывали в растворе NaCl и выделяли предназначенные для исследования фрагменты. Для спектрального и последующего биохимического анализа из хрящевых тканей вырезали пластины толщиной 0,5–0,8 мм и площадью примерно 0,5×0,5 см². Такие пластины были выделены из средней части поперечных срезов носовой перегородки и реберного хряща. Для суставного хряща образцы отбирали отдельно из визуально гладких областей и из шеро-

ховатых областей с выраженной волокнистостью. Пульпозные ядра извлекали из межпозвоноковых дисков. После выделения препараты высушивали в термостате при 37°C в воздушной атмосфере в течение 18 ч и получали их ИК-спектры. После этого каждый препарат делили на равные части, в одной половине образца определяли содержание ГАГ, в другой половине — содержание коллагена.

Одним из компонентов калибровочной смеси был хондроитин-4-сульфат (ХС) (С6737; Merck, США) — один из самых распространенных ГАГ хрящевой ткани. В качестве второго компонента использовали коллаген I типа (С3867; Sigma-Aldrich, США). Калибровочный раствор с массовым соотношением коллагена и ХС от 0,11 до 49,0 помещали на предметное стекло и высушивали в термостате при 37°C от 18 до 24 ч. В результате на предметном стекле образовывалась пленка, которую использовали как стандарт для получения ИК-спектра.

Первая трипсинизация. Препараты хрящевой ткани массой 1,5–2,0 мг помещали в раствор, содержащий трипсин с концентрацией 1 мг/мл и азид натрия с концентрацией 0,2 мг/мл, выдерживали в термостате при 37°C в течение 24 ч. Часть материала образца переходила в супернатант (С1), часть оказывалась нерастворенной (О1). В отдельном эксперименте с хрящом носовой перегородки супернатант декантировали, высушивали в стеклянной чашке Петри и измеряли ИК-спектр полученной пленки. Нерастворенный материал промывали, высушивали и измеряли его ИК-спектр. В остальных случаях вся система подвергалась програве и повторной трипсинизации.

Вторая трипсинизация. Оставшиеся после первой трипсинизации супернатант и нерастворившийся остаток прогревали на водяной бане при 85°C в течение 15–20 мин, затем добавляли трипсин до конечной концентрации 2 мг/мл и оставляли в термостате при 37°C еще на 24 ч. Полученную коллоидную смесь центрифугировали, супернатант (С2) декантировали. В отдельном эксперименте центрифугат (О2) и супернатант С2 высушивали и получали их ИК-спектры. Во всех остальных случаях С2 от второй трипсинизации анализировали на содержание ГАГ с помощью спектрофотометрической реакции.

Методы

Определение содержания гликозаминогликанов. Количество ГАГ определяли в супернатанте после второй трипсинизации высушенных образцов. Анализ основан на реакции комплексообразования анионных ГАГ с красителем диметилметиленовым синим (ДММС), которая сопровождается метахромазией. Анализ проводили по методу Фарндэйла [20] с небольшими изменениями, позволяющими существенно уменьшить стандартное отклонение для калибровочной зависимости. Изменения заключались в замене соляной кислоты

на уксусную при приготовлении раствора ДММС, в исключении добавления NaCl в этот раствор и в дополнительной обработке раствора красителя в ультразвуковой бане. В качестве калибровочного стандарта использовали растворы ХС (С6737) с концентрацией 1–5 мкг/мл. Оценку содержания комплекса ХС–ДММС проводили методом дифференциальной спектрофотометрии на длине волны 589 нм с использованием спектрофотометра UV-1800 (Shimadzu Co., Япония) и раствора ДММС как раствора сравнения. Для каждого супернатанта измерения проводились 3–5 раз.

Отношение массовых долей коллагена и ХС в образцах хряща обозначали как $K_{хим}$.

Определение содержания коллагена. Кислотный гидролизат высушенных образцов хрящей массой 2–5 мг готовили в смеси соляной и трифторуксусной кислот в запаянных стеклянных ампулах при температуре 166°C. Аминокислотный анализ проводили на анализаторе Hitachi-835 (Hitachi, Япония) в стандартном режиме анализа белковых гидролизатов. Для каждого гидролизата измерения выполняли 3 раза. Содержание коллагена оценивали в предположении, что гидроксипролин составляет 13,5% (массовых) в аминокислотном пуле коллагена.

Получение и обработка ИК-спектров. Спектры образцов регистрировали с помощью инфракрасного Фурье-спектрометра Nicolet iS10 (Thermo Fisher Scientific, США) методом НПВО с использованием специальной приставки с алмазной призмой. ИК-спектры получали в режиме отражения в диапазоне 400–4000 $см^{-1}$ с разрешением 0,5 $см^{-1}$ и усреднением по 32 сканам, преобразовывали в единицы $\log(1/R)$ с помощью алгоритма программы OMNIC. Величина $\log(1/R)$ аналогична поглощению, поскольку R — отношение интенсивностей инфракрасной энергии, отраженной от образца и от алмазной призмы без образца.

ИК-спектры в диапазоне 750–1800 $см^{-1}$ обрабатывали с помощью программного обеспечения (Thermo Fisher Scientific, США).

Статистическая обработка данных. Экспериментальные данные химического анализа и спектрального анализа нескольких однотипных образцов обрабатывали с использованием пакета программ OriginPro 2015 (OriginLab Corporation, США). Данные представлены в виде $M \pm SD$, где M — среднее значение, а SD — стандартное отклонение. Разницу между средними величинами $K_{сп}$ для образцов суставного хряща, взятых из визуально гладких областей и из шероховатых областей с выраженной волокнистостью, оценивали по двухвыборочному t -критерию Стьюдента. Уровень значимости *a priori* задали как $p=0,05$.

Экспериментальные данные спектрального анализа с использованием калибровочного метода регрессии на главные компоненты обрабатывали с помощью программы TQ Analyst, которая обеспечивала

среднеквадратичные ошибки калибровки, прогнозирования [21] и коэффициенты корреляции.

Результаты

Чистые компоненты и калибровочные смеси. ИК-спектры чистых компонентов (коллагена и ХС) представлены на рис. 1. Там же представлен ИК-спектр полученной из смеси пленки, состоящей из 70% коллагена и 30% ХС (по массам) с отношением $K_{хим}=2,33$.

Для ИК-спектра коллагена наиболее характерными являются следующие полосы:

- интенсивные с максимумами ~ 1628 и ~ 1530 $см^{-1}$ и менее интенсивная с максимумом ~ 1236 $см^{-1}$, связанные с колебаниями в пептидной группе (полосы Амид I и Амид II);

- с максимумами ~ 1447 и ~ 1394 $см^{-1}$, связанные с деформационными колебаниями групп CH_2 и CH_3 ;

- знаковая для коллагена полоса с максимумом ~ 1338 $см^{-1}$, предположительно связанная с деформационным колебанием группы CH_2 в остатке пролина в полипептидной цепи.

В ИК-спектре ХС проявляются такие полосы:

- широкая, в области 1650–1500 $см^{-1}$, связанная с колебаниями в N-ацетильной группе (близкой по химической структуре к пептидной группе) и валентными колебаниями C=O в группе COO⁻;

- с центрами ~ 1410 и ~ 1375 $см^{-1}$, связанные с деформационными колебаниями групп CH_2 и CH_3 или COO⁻;

- интенсивные с центрами ~ 1223 и ~ 1025 $см^{-1}$, связанные с валентными симметричными и антисимметричными колебаниями в группе SO₃⁻ и, возможно, со скелетными колебаниями C-O-C (~ 1025 $см^{-1}$);

- с центром ~ 1125 $см^{-1}$, ассоциированная с пиранозным кольцом;

- с центрами ~ 924 и ~ 855 $см^{-1}$, ассоциированные со скелетными колебаниями групп C-O-C и C-O-S.

На рис. 2 представлена калибровочная зависимость для содержания коллагена в смеси коллаген–ХС, построенная по методу регрессии на главные компоненты. Калибровочный и проверочный наборы (пленки с известным составом) состояли из 20 и 5 объектов соответственно. Среднеквадратичные ошибки калибровки и прогнозирования составляют около 1,9 и 2,3%, а коэффициенты корреляции близки к единице как для моделирования ($R_c^2=0,997$), так и для прогнозирования ($R_t^2=0,9978$). Калибровочная и проверочные линии практически сливаются. На основе калибровочной зависимости определяли $K_{сп}$ как отношение массовых долей коллагена и ХС.

Хрящ носовой перегородки и его модификация трипсином. В табл. 1 показаны содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ в образце хрящевой ткани носовой перегородки. ИК-спектр исходной ткани представлен на рис. 3 (кривая 2).

После первичной трипсинизации образца с

Рис. 1. ИК-спектры коллагена (кривая 3) и хондроитин-4-сульфата (кривая 1) и их смеси с отношением $K=2,33$ (кривая 2)

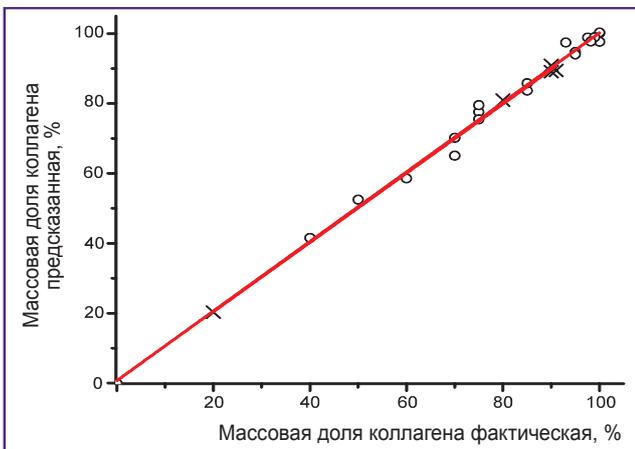
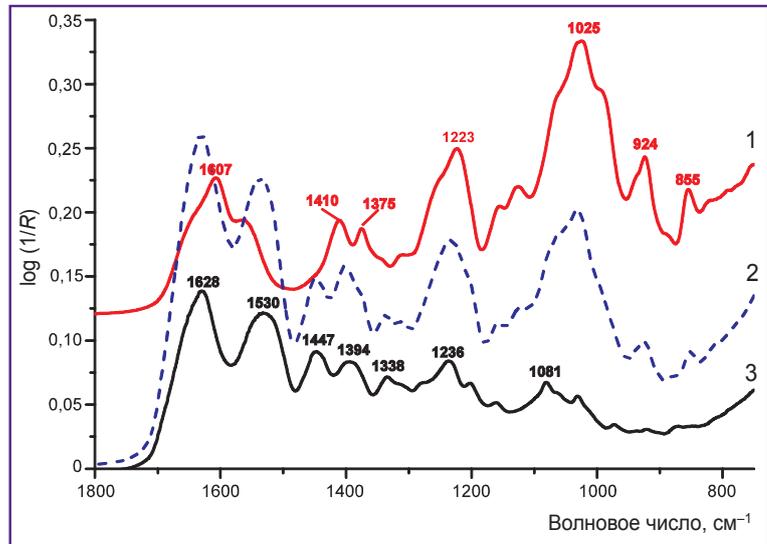


Рис. 2. Калибровка и проверка смеси коллагена и хондроитин-4-сульфата:

○ — калибровочный набор; × — проверочный набор с известным составом

$K_{сп}=0,91$ по данным спектрального анализа произошло резкое увеличение доли коллагена в нерастворимом остатке O1 ($K_{сп}=4,55$) и уменьшение этой величины в пленке супернатанта С1 ($K_{сп}=0,32$). Тем не менее после первой трипсинизации заметная часть от исходного количества ХС осталась в нерастворимом остатке O1. После трипсинизации, денатурации и повторной трипсинизации образца с $K_{сп}=0,89$ подавляющая часть ХС оказалась в растворе супернатанта С2 ($K_{сп}=0,25$), в то время как в нерастворимом остатке O2 оказался преимущественно коллаген ($K_{сп}=13,5$). ИК-спектры центрифугата O2 (рис. 3, кривая 1) и пленки С2 (рис. 3, кривая 3) заметно отличаются и приближаются к ИК-спектрам коллагена и ХС соответственно.

В табл. 1 приведено также значение $K_{сп}$, усредненное для 11 образцов хрящей носовой перегородки.

Реберный хрящ. Заметим, что ИК-спектры пре-

Таблица 1

Содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для хряща носовой перегородки (ХНП)

Образец	Коллаген*	Гликозаминогликан*	$K_{хим}$	$K_{сп}$
ХНП (для одного образца)	$36,0 \pm 0,7$	$46,0 \pm 3,0$	0,78	0,81
ХНП (n=11)	—	—	—	$0,88 \pm 0,05$

* процент от сухой массы.

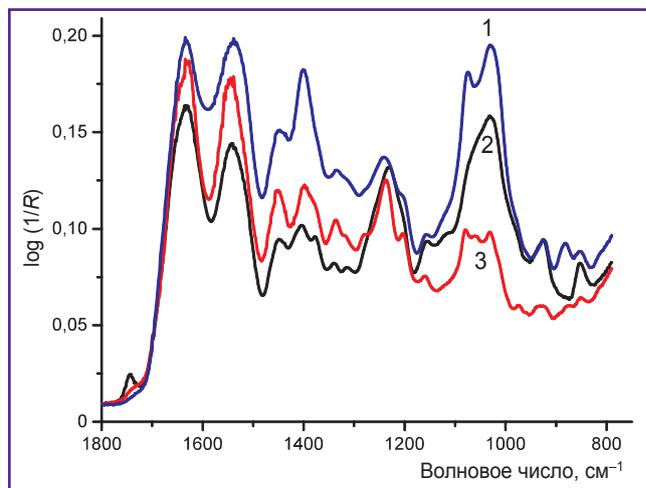


Рис. 3. ИК-спектры исходного хряща носовой перегородки (кривая 2), центрифугированного нерастворимого осадка (O2, кривая 1) и супернатанта (C2, кривая 3) после двойной обработки трипсином и прогрева исходного образца

паратов гиалиновых хрящей (суставных и реберных) принципиально не отличались от таковых для хрящей носовой перегородки. В табл. 2 представлено содержание основных компонентов, а также значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для двух образцов реберного хряща.

Таблица 2

Содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для реберного хряща (РХ)

Образец	Коллаген*	Гликозаминогликан*	$K_{хим}$	$K_{сп}$
РХ1	29,0±0,5	21,9±2,2	1,32	1,59
РХ2	31,0±0,5	18,3±2,1	1,69	1,88

* процент от сухой массы.

Таблица 3

Содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для препаратов суставного хряща, полученных с гладкой (СХГ) и шероховатой волокнистой (СХФ) поверхностей

Образец	Коллаген*	Гликозаминогликан*	$K_{хим}$	$K_{сп}$
СХГ-1	60,5±0,7	25,4±2,1	2,38	2,21
СХГ-2	58,2±0,5	18,1±1,9	3,21	3,05
СХГ (n=12)	—	—	—	2,8±1,1**
СХФ-1	65,1±0,6	12,5±2,5	5,2	5,35
СХФ-2	75,0±0,7	13,9±3,2	5,4	5,7
СХФ (n=8)	—	—	—	4,4±1,8**

* процент от сухой массы; ** средние значения СХГ и СХФ статистически значимо различались.

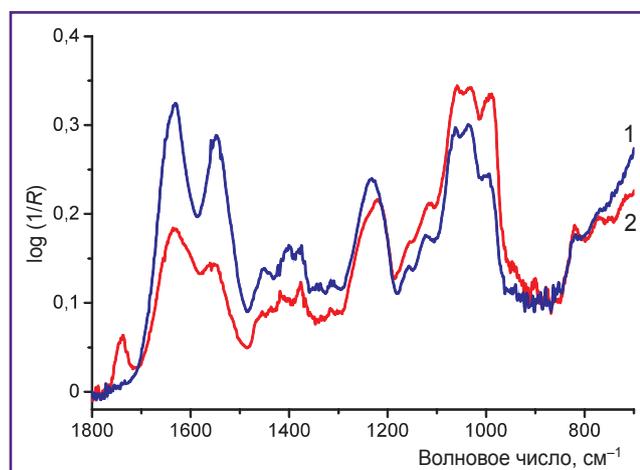


Рис. 4. ИК-спектры пульпозного ядра межпозвонкового диска барана (1) и кролика (2)

Суставной хрящ. Образцы суставного хряща отбирались как с гладкой поверхности, так и с шероховатой волокнистой поверхности сустава. В табл. 3 показано содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для образцов суставного хряща с разной фактурой (по два образца каждой фактуры). Там же приведено значение $K_{сп}$, усредненное для 12 образцов с гладкой поверхности и 8 образцов — с шероховатой волокнистой поверхности сустава.

Пульпозное ядро межпозвонкового диска. На рис. 4 показан ИК-спектр препаратов пульпозного ядра межпозвонкового диска кролика и барана.

Таблица 4

Содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для пульпозного ядра кролика (ПЯ_{кр}) и барана (ПЯ_б)

Образец	Коллаген*	Гликозаминогликан*	$K_{хим}$	$K_{сп}$
ПЯ _{кр} 1	4,9±0,1	28,5±1,5	0,17	0,16
ПЯ _{кр} 2	5,8±0,2	31,3±1,7	0,19	0,22
ПЯ _б 1	18,1±0,3	13,5±2,1	1,34	1,15
ПЯ _б 2	17,2±0,2	12,2±1,8	1,41	1,21

* процент от сухой массы.

В табл. 4 представлено содержание основных компонентов и значения $K_{хим}$ и $K_{сп}$ для разных образцов пульпозного ядра кролика и барана.

Обсуждение

Основные полосы поглощения в ИК-спектрах коллагена и ГАГ связаны с характерными колебаниями специфических групп в белках [12, 18, 22, 23] и сульфатированных аминсахарах [18, 24, 25]. ИК-спектры пленок (рис. 1, кривая 3) и хрящевых тканей (см. рис. 3, 4) являются суперпозицией ИК-спектров коллагена и ГАГ, что качественно отражает их состав. Так, с увеличением содержания ГАГ увеличивается относительная интенсивность полос в области 980–1100 $см^{-1}$, связанных с колебаниями в пиранозном кольце и группе SO_3^- , и уменьшается интенсивность полос Амид I и Амид II пептидных групп.

Изменения соотношений между характеристическими полосами соединений в ИК-спектре очевидны при значительном изменении содержания этих соединений в хрящах. Например, при сравнении приведенных на рис. 4 ИК-спектров пульпозного ядра кролика ($K_{сп} \sim 0,2$) и пульпозного ядра барана ($K_{сп} \sim 1,2$) отчетливо заметно усиление поглощения, связанное с колебаниями характерных групп ГАГ в первом случае. Проявление этого эффекта наблюдается и при трипсинизации, которая приводит к разрушению стержневых и связующих белков протеогликанов и их агрегатов и обеспечивает таким образом выход ГАГ в супернатант [26]. В ИК-спектрах твердого остатка полосы поглощения ГАГ гораздо менее выражены, чем в спектрах супернатанта (см. рис. 2).

Более точную количественную характеристику состава ткани можно получить, лишь используя калибровочные модели, причем желательно с полным анализом ИК-спектра, а не одного отношения интенсивностей полос [11, 12]. Здесь уместно отметить, что количественный анализ указывает на необходимость повторной трипсинизации после прогрева образцов для перевода подавляющей части ГАГ в супернатант. Лишь после такой обработки ГАГ оказываются полностью доступны для химического анализа.

Определенный двумя методами химический состав хрящей соответствует литературным данным [4–7, 27–29]. Это справедливо как для гиалиновых хрящей, где $K_{\text{хим}}$ меняется от ~1 в носовой перегородке скота [27] до ~3–5 в суставном хряще [30], так и для пульпозного ядра (не относящегося к гиалиновому типу). В последнем случае доля ГАГ может превышать долю коллагена в несколько раз в зависимости от типа животного, и полученные нами значение $K_{\text{хим}}$ и близкое значение $K_{\text{сп}}$ для пульпозного ядра межпозвоночного диска кролика и барана прекрасно согласуются с данными других авторов ([28] и [29] соответственно). Заметим, что и для одного типа хрящевой ткани существуют некоторые вариации величины отношения коллаген/ГАГ. Это иллюстрируется разбросом значений $K_{\text{сп}}$ для нескольких образцов от одного объекта (хрящ сустава, см. табл. 2) или нескольких объектов (носовые перегородки, см. табл. 1). Вариации могут быть связаны как с зональным изменением химического состава в целостной системе, так и с индивидуальными характеристиками биологического объекта [4–7, 27–30].

Данные спектрального ИК-анализа отражают специфику дегенерации суставного хряща [4–7, 18]. Важным показателем этой дегенерации служит уменьшение содержания ГАГ. Мы подтвердили, что значение $K_{\text{сп}}$ значительно больше в образцах хряща с шероховатой поверхностью и выраженной волокнистостью по сравнению с внешне гладкими образцами (см. табл. 2). Заметим, что это выполняется как для образцов, в которых был дополнительно определен показатель $K_{\text{хим}}$, так и для усредненных значений $K_{\text{сп}}$.

Важным результатом является совпадение величин $K_{\text{хим}}$ и $K_{\text{сп}}$ для препаратов всех типов хрящей, причем соотношения массовых долей коллагена находятся в широком диапазоне значений. Такое совпадение этих значений, одно из которых ($K_{\text{сп}}$) получено на целом образце, а другое — как количество окрашенного комплекса ГАГ с ДММС в трипсинате, требует некоторых пояснений. Предположим, что минимальной является ошибка в оценке содержания коллагена, определенного наиболее точным из используемых аналитических методов. В то же время константы связывания ГАГ и красителя ДММС в комплекс для разных ГАГ отличаются и калибровочные кривые для них не совпадают [31], а используемая исследователями калибровочная зависимость получается для конкретного стандарта. Таким образом, нельзя быть уверенным в точном определении суммарного содержания всех ГАГ по измерению поглощения в супернатанте хрящевой ткани после добавления красителя, поскольку в хрящевой ткани присутствуют различные ГАГ, причем в разных соотношениях [32].

Существуют и другие факторы, обуславливающие неточность метода определения ГАГ с помощью ДММС [33], однако до сих пор считается, что он наиболее адекватно позволяет оценить «абсолютное» содержание ГАГ. Что касается ИК-спектров разных ГАГ, то в них нет принципиальных отличий, так как у них

одинаковые химические структуры, определяющие характерные полосы в ИК-спектре. Спорным моментом спектрального определения величины K является отличие по составу калибровочных смесей и препаратов ткани. Однако сходство их ИК-спектров позволяет предположить, что остальные (отличные от белков и ГАГ) компоненты незначительно влияют на вид ИК-спектра хрящевых тканей. Еще раз подчеркнем, что мы оцениваем не абсолютное количество коллагена и ГАГ, а только их отношение, которое совпадает со значением коэффициента, определенного на основе химического анализа.

Экспериментальное определение отношения коллаген/ГАГ на основе ИК-спектра ($K_{\text{сп}}$), полученного с помощью НПВО, не требует многостадийной пробоподготовки, дорогостоящего, длительного анализа, который должен проводить исполнитель высокой квалификации. Кроме того, химическое определение коллагена и ГАГ не может быть сделано в одном образце, а анализируемые образцы могут быть неидентичными. Зная спектральное отношение в образце, можно выбрать и провести более удобный для исследователя анализ одного из компонентов. Количество второго компонента легко рассчитывается. Определение величины $K_{\text{хим}}$ часто является первым в исследованиях изменений хрящевой ткани, и количество образцов может достигать нескольких десятков. В этом случае экспресс-характеристика вариативности химического состава оказывается крайне важной.

Заключение

Инфракрасный спектрометрический анализ в режиме нарушенного полного внутреннего отражения с применением метода регрессии на главные компоненты дает возможность корректно определить соотношение основных компонентов матрикса хряща — коллагена и гликозаминогликанов — и провести предварительную неинвазивную диагностику хрящевой ткани. Предложенная методика является экспрессной и позволяет определить особенности и изменения состава для большого набора образцов хрящевой ткани нескольких типов. Дополнительным преимуществом служит крайне простая пробоподготовка, которая не требует многостадийных и трудоемких химических манипуляций и расхода реагентов.

Финансирование исследования. Исследование проведено в рамках выполнения работ по Государственному заданию Федерального научно-исследовательского центра «Кристаллография и фотоника» РАН и по Государственному заданию №АААА-А21-121011990019-4.

Конфликт интересов отсутствует.

Литература/References

1. Silver F.H., Kato Y.P., Ohno M., Wasserman A.J. Analysis of mammalian connective tissue: relationship between

- hierarchical structures and mechanical properties. *J Long Term Eff Med Implants* 1992; 2(2–3): 165–198.
2. Muir H. The chondrocyte, architect of cartilage. Biomechanics, structure, function and molecular biology of cartilage matrix macromolecules. *Bioassays* 1995; 17(12): 1039–1048, <https://doi.org/10.1002/bies.950171208>.
 3. Rotter N., Tobias G., Lebl M., Roy A.K., Hansen M.C., Vacanti C.A., Bonassar L.J. Age-related changes in the composition and mechanical properties of human nasal cartilage. *Arch Biochem Biophys* 2002; 403(1): 132–140, [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00263-1](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00263-1).
 4. Homicz M.R., McGowan K.B., Lottman L.M., Beh G., Sah R.L., Watson D. A compositional analysis of human nasal septal cartilage. *Arch Facial Plast Surg* 2003; 5(1): 53–58, <https://doi.org/10.1001/archfaci.5.1.53>.
 5. Karchner J.P., Yousefi F., Bitman S.R., Darvish K., Pleshko N. Non-destructive spectroscopic assessment of high and low weight bearing articular cartilage correlates with mechanical properties. *Cartilage* 2019; 10(4): 480–490, <https://doi.org/10.1177/1947603518764269>.
 6. Li G., Thomson M., Dicarlo E., Yang X., Nestor B., Bostrom M.P.G., Camacho N.P. A chemometric analysis for evaluation of early-stage cartilage degradation by infrared fiber-optic probe spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2005; 59(12): 1527–1533, <https://doi.org/10.1366/000370205775142593>.
 7. Mrosek E.H., Lahm A., Ergelet C., Uhl M., Kurz H., Eissner B., Schagemann J.C. Subchondral bone trauma causes cartilage matrix degeneration: an immunohistochemical analysis in a canine model. *Osteoarthritis Cartilage* 2006; 14(2): 171–178, <https://doi.org/10.1016/j.joca.2005.08.004>.
 8. West P.A., Bostrom M.P.G., Torzilli P.A., Camacho N.P. Fourier transform infrared spectral analysis of degenerative cartilage: an infrared fiber optic probe and imaging study. *Appl Spectrosc* 2004; 58(4): 376–381, <https://doi.org/10.1366/000370204773580194>.
 9. Franz T., Hasler E.M., Hagg R., Weiler C., Jakob R.P., Mainil-Varlet P. In situ compressive stiffness, biochemical composition, and structural integrity of articular cartilage of the human knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 2001; 9(6): 582–592, <https://doi.org/10.1053/joca.2001.0418>.
 10. Lavery S., O'Kouneff S., Ionescu M., Reiner A., Pidoux I., Webber C., Rossier Y., Billingham R.C., Poole A.R. Excessive degradation of type II collagen in articular cartilage in equine osteochondrosis. *J Orthop Res* 2002; 20(6): 1282–1289, [https://doi.org/10.1016/S0736-0266\(02\)00053-0](https://doi.org/10.1016/S0736-0266(02)00053-0).
 11. Yin J., Xia Y. Proteoglycan concentrations in healthy and diseased articular cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 2014; 133: 825–830, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.05.092>.
 12. Yin J., Xia Y. Macromolecular concentrations in bovine nasal cartilage by Fourier transform infrared imaging and principal component regression. *Appl Spectrosc* 2010; 64(11): 1199–1208, <https://doi.org/10.1366/000370210793335124>.
 13. Baykal D., Irrechukwu O., Lin P.C., Fritton K., Spencer R.G., Pleshko N. Nondestructive assessment of engineered cartilage constructs using near-infrared spectroscopy. *Appl Spectrosc* 2010; 64(10): 1160–1166, <https://doi.org/10.1366/000370210792973604>.
 14. Gordetsov A.S. Infrared spectroscopy of biological fluids and tissues. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2010; 1: 84.
 15. Kogan L.P., Kislitsyn D.I., Krasnikova O.V., Medyanik I.A., Gordetsov A.S. Diagnosis of a disease using the values of statistical functionals calculated from infrared spectroscopic parameters of blood. *Sovremennye tehnologii v medicine* 2017; 9(4): 25–35, <https://doi.org/10.17691/stm2017.9.4.03>.
 16. Querido W., Kandel S., Pleshko N. Applications of vibrational spectroscopy for analysis of connective tissues. *Molecules* 2021; 26(4): 922, <https://doi.org/10.3390/molecules26040922>.
 17. Potter K., Kidder L.H., Levin I.W., Lewis E.N., Spencer R.G. Imaging of collagen and proteoglycan in cartilage sections using Fourier transform infrared spectral imaging. *Arthritis Rheum* 2001; 44(4): 846–855, [https://doi.org/10.1002/1529-0131\(200104\)44:4<846::aid-anr141>3.0.co;2-e](https://doi.org/10.1002/1529-0131(200104)44:4<846::aid-anr141>3.0.co;2-e).
 18. Camacho N.P., West P., Torzilli P.A., Mendelsohn R. FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers* 2001; 62(1): 1–8, [https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<1::aid-bip10>3.0.co;2-o](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<1::aid-bip10>3.0.co;2-o).
 19. Ramakrishnan N., Xia Y., Bidthanapally A. Polarized IR microscopic imaging of articular cartilage. *Phys Med Biol* 2007; 52(15): 4601–4614, <https://doi.org/10.1088/0031-9155/52/15/016>.
 20. Farndale R.W., Buttle D.J., Barrett A.J. Improved quantitation and discrimination of sulphated glycosaminoglycans by use of dimethylmethylene blue. *Biochim Biophys Acta* 1986; 883(2): 173–177, [https://doi.org/10.1016/0304-4165\(86\)90306-5](https://doi.org/10.1016/0304-4165(86)90306-5).
 21. Родионова О.Е. Интервальный метод обработки результатов многоканальных экспериментов. Дис. ... докт. физ.-мат. наук. М; 2008.
Rodionova O.E. *Interval'nyy metod obrabotki rezul'tatov mnogokanal'nykh eksperimentov*. Dis. ... dokt. fiz.-mat. nauk [Interval method for processing the results of multichannel experiments. DSc Thesis]. Moscow; 2008.
 22. Edwards H.G.M., Farwell D.W., Holder J.M., Lawson E.E. Fourier-transform Raman spectroscopy of ivory: II. Spectroscopic analysis and assignments. *J Mol Struct* 1997; 435(1): 49–58, [https://doi.org/10.1016/s0022-2860\(97\)00122-1](https://doi.org/10.1016/s0022-2860(97)00122-1).
 23. Manoharan R., Wang Y., Feld M.S. Histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc* 1996; 52(2): 215–249, [https://doi.org/10.1016/0584-8539\(95\)01573-6](https://doi.org/10.1016/0584-8539(95)01573-6).
 24. Cael J.J., Isaac D.H., Blackwell J., Koenig J.L., Atkins E.D.T., Sheehan J.K. Polarized infrared spectra of crystalline glycosaminoglycans. *Carbohydr Res* 1976; 50(2): 169–179, [https://doi.org/10.1016/s0008-6215\(00\)83848-3](https://doi.org/10.1016/s0008-6215(00)83848-3).
 25. Servaty R., Schiller J., Binder H., Arnold K. Hydration of polymeric components of cartilage — an infrared spectroscopic study on hyaluronic acid and chondroitin sulfate. *Int J Biol Macromol* 2001; 28(2): 121–127, [https://doi.org/10.1016/s0141-8130\(00\)00161-6](https://doi.org/10.1016/s0141-8130(00)00161-6).
 26. Bank R.A., Krikken M., Beekman B., Stoop R., Maroudas A., Lafeber F.P., te Koppele J.M. A simplified measurement of degraded collagen in tissues: application in healthy, fibrillated and osteoarthritic cartilage. *Matrix Biol* 1997; 16(5): 233–243, [https://doi.org/10.1016/s0945-053x\(97\)90012-3](https://doi.org/10.1016/s0945-053x(97)90012-3).
 27. Peters T.J., Smillie I.S. Studies on chemical composition of menisci from the human knee-joint. *Proc R Soc Med* 1971; 64(3): 261–262, <https://doi.org/10.1177/003591577106400310>.
 28. Ghosh P., Taylor T.K.F., Horsburgh B.A. The composition and protein metabolism in the immature rabbit

intervertebral disc. *Cell Tissue Res* 1975; 163(2): 223–238, <https://doi.org/10.1007/bf00221729>.

29. Mizuno H., Roy A.K., Vacanti C.A., Kojima K., Ueda M., Bonassar L.J. Tissue-engineered composites of annulus fibrosus and nucleus pulposus for intervertebral disc replacement. *Spine (Phila Pa 1976)* 2004; 29(12): 1290–1298, <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000128264.46510.27>.

30. Fermor H.L., McLure S.W.D., Taylor S.D., Russell S.L., Williams S., Fisher J., Ingham E. Biological, biochemical and biomechanical characterisation of articular cartilage from the porcine, bovine and ovine hip and knee. *Biomed Mater Eng* 2015; 25(4): 381–395, <https://doi.org/10.3233/bme-151533>.

31. Goldberg R.L., Kolibas L.M. An improved method for determining proteoglycans synthesized by chondrocytes in culture. *Connect Tissue Res* 1990; 24(3–4): 265–275, <https://doi.org/10.3109/03008209009152154>.

32. Buckwalter J.A., Roughley P.J., Rosenberg L.C. Age-related changes in cartilage proteoglycans: quantitative electron microscopic studies. *Microsc Res Tech* 1994; 28(5): 398–408, <https://doi.org/10.1002/jemt.1070280506>.

33. Warren S. *A critical analysis of the 1,9-dimethylmethylene blue assay for sulfated glycosaminoglycans in synovial fluid*. MSc Thesis. Guelph, Ontario: University of Guelph; 2000.