

## ОПРЕДЕЛЕНИЕ ВОЗМОЖНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА РАМАНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ НЕСОСТОЯТЕЛЬНОСТИ КРЕСТООБРАЗНЫХ СВЯЗОК КОЛЕННОГО СУСТАВА

Лычагин А. В. ORCID ID 0000-0002-2202-8149,  
Калинский Е. Б. ORCID ID 0000-0002-8103-5613,  
Азаркин К. М. ORCID ID 0009-0005-4882-3553,  
Гаркави А. В. ORCID ID 0000-0003-4996-1657,  
Гончарук Ю. Р. ORCID ID 0000-0002-0015-0266

*Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова, кафедра травматологии, ортопедии и хирургии катастроф, г. Москва, Российская Федерация, e-mail: wilopt@mail.ru*

Травмы крестообразных связок коленного сустава являются одними из самых распространенных травм в мире. Недостаточность крестообразных связок приводит к формированию нестабильности в коленном суставе и развитию гонартроза. Диагностика частичных разрывов, сопровождающихся микроструктурными изменениями, не столь проста. Помочь решить задачу объективного и количественного определения состояния тканей может Рамановская спектроскопия. Цель. Исследовать возможность использования метода Рамановской спектроскопии для оценки состояния крестообразных связок коленного сустава. Объектом исследования являлись экспланты крестообразных связок, полученные в ходе операций первичного тотального эндопротезирования коленных суставов (n=30). В предоперационном периоде всем пациентам выполняли магнитно-резонансную томографию с оценкой состояния крестообразных связок по шкале остеоартрита передней крестообразной связки. Состоятельность связок оценивали до забора, используя классификацию американской ассоциации хирургов-ортопедов. После эксцизии проводили исследование эксплантов при помощи Рамановской спектроскопии в диапазоне 2600–3800 см<sup>-1</sup>. При нормировании на пик 1270 см<sup>-1</sup> выявлено статистически значимое различие между I и II степенью повреждения связки (p < 0,001) при исследовании отношения 1240/1270 см<sup>-1</sup>. Статистически значимое различие между II и III степенью (p < 0,01) определено только при исследовании отношений 850/1270 см<sup>-1</sup> и 1002/1270 см<sup>-1</sup>. При нормировании на пик 1450 см<sup>-1</sup> можно отметить статистически значимые различия между I и II степенью повреждения связки на полосах Рамановского рассеяния 1240, 1270, 1650 см<sup>-1</sup> (p < 0,001). Статистически значимы также различия между I и III степенью на всех полосах Рамановского рассеяния (p < 0,001). Метод Рамановской спектроскопии позволяет эффективно дифференцировать состоятельную связку от патологически измененной. Тем не менее дифференциация между II и III степенями повреждения оказалась возможной лишь при исследовании отношений 850/1270 см<sup>-1</sup> и 1002/1270 см<sup>-1</sup>.

Ключевые слова: травматология, ортопедия, передняя крестообразная связка, задняя крестообразная связка, Рамановская спектроскопия, биофотоника.

## DETERMINING THE FEASIBILITY OF USING RAMAN SPECTROSCOPY TO DETECT INSUFFICIENCY OF THE KNEE JOINT CRUCIATE LIGAMENTS

Lychagin A. V. ORCID ID 0000-0002-2202-8149,  
Kalinsky E. B. ORCID ID 0000-0002-8103-5613,  
Azarkin K. M. ORCID ID 0009-0005-4882-3553,  
Garkavi A. V. ORCID ID 0000-0003-4996-1657,  
Goncharuk Yu. R. ORCID ID 0000-0002-0015-0266

*Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education Sechenov First Moscow State Medical University. Department of Traumatology, Orthopedics and Disaster Surgery, Moscow, Russian Federation, e-mail: wilopt@mail.ru*

Injuries of the cruciate ligaments of the knee joint are among the most common injuries worldwide. Insufficiency of the cruciate ligaments leads to the development of knee joint instability and gonarthrosis. The diagnosis of partial tears accompanied by microstructural changes is not straightforward. Raman spectroscopy may help address the problem of objective and quantitative assessment of tissue condition. Objective. To investigate the feasibility of using Raman spectroscopy to assess the condition of the cruciate ligaments of the knee

joint. The study objects were cruciate ligament explants obtained during primary total knee arthroplasty procedures (n = 30). In the preoperative period, all patients underwent magnetic resonance imaging with evaluation of cruciate ligament condition using the anterior cruciate ligament osteoarthritis scale. Ligament integrity was assessed prior to harvesting according to the classification of the American Association of Orthopaedic Surgeons. After excision, the explants were examined using Raman spectroscopy in the range of 500–2000  $\text{cm}^{-1}$ . When normalized to the 1270  $\text{cm}^{-1}$  peak, a statistically significant difference between grade I and grade II ligament damage ( $p < 0.001$ ) was identified for the 1240/1270  $\text{cm}^{-1}$  ratio. A statistically significant difference between grades II and III ( $p < 0.01$ ) was detected only for the 850/1270  $\text{cm}^{-1}$  and 1002/1270  $\text{cm}^{-1}$  ratios. When normalized to the 1450  $\text{cm}^{-1}$  peak, statistically significant differences between grades I and II ligament damage were observed at the Raman scattering bands of 1240, 1270, and 1650  $\text{cm}^{-1}$  ( $p < 0.001$ ). Statistically significant differences between grades I and III were also noted across all Raman scattering bands ( $p < 0.001$ ). Raman spectroscopy enables effective differentiation between intact ligaments and pathologically altered ones. However, differentiation between grades II and III damage was possible only when analyzing the 850/1270  $\text{cm}^{-1}$  and 1002/1270  $\text{cm}^{-1}$  ratios.

Keywords: traumatology, orthopedics, anterior cruciate ligament, posterior cruciate ligament, Raman spectroscopy, biophotonics.

## Введение

Травмы крестообразных связок представляют собой одну из наиболее распространенных категорий спортивных травм во всем мире. В Соединенных Штатах ежегодно около 250 000 человек получают разрывы передней крестообразной связки (ПКС), причем почти в 50% этих случаев требуется реконструктивное хирургическое вмешательство [1; 2]. Хотя травмы задней крестообразной связки (ЗКС) встречаются реже, структурные повреждения ЗКС выявляются у 38% пациентов с травмами колена, и такие травмы связаны со значительными долгосрочными неблагоприятными последствиями для функции коленного сустава [3; 4]. Актуальных данных по эпидемиологии повреждений крестообразных связок в Российской Федерации нет [5].

Внутренний потенциал заживления крестообразных связок ограничен из-за недостаточной васкуляризации. После травмы микроструктурные изменения, включая клеточные изменения и дезорганизацию внеклеточного матрикса, приводят к изменению механических свойств ткани связки [6]. Функциональная недостаточность крестообразных связок приводит к нестабильности коленного сустава и способствует развитию гонартроза. В клинической практике пациенты могут испытывать хроническую боль, изменение походки, гипотрофию мышц и прогрессирующее функциональное нарушение, что в конечном итоге приводит к значительному снижению физической активности и качества жизни. Эти патологические последствия можно предотвратить своевременным хирургическим вмешательством, которое обычно включает пластику или реинсерцию связки. Однако результаты хирургического лечения сильно зависят от времени вмешательства: на поздних стадиях необратимые изменения сустава существенно ограничивают эффективность операции. Следовательно, ранняя и точная диагностика повреждений крестообразных связок имеет критически важное значение, особенно у лиц, занимающихся интенсивной физической активностью.

В случаях полного разрыва крестообразных связок клинические проявления, как правило, выражены и легко подтверждаются с помощью неинвазивных методов визуализации, таких как магнитно-резонансная томография (МРТ) и ультразвуковое исследование, а также во время диагностического этапа артроскопического вмешательства [7]. Однако частичные субсиновиальные разрывы, связанные с незначительными микроструктурными изменениями, представляют собой серьезную диагностическую проблему. В таких случаях явные клинические признаки нестабильности коленного сустава могут отсутствовать, а традиционные методы визуализации, включая МРТ, демонстрируют ограниченную чувствительность для обнаружения этих повреждений [8].

Методы оптической спектроскопии, успешно применяемые в различных медицинских дисциплинах, включая общую хирургию, эндокринологию, урологию, онкологию, неврологию и нейрохиргию, предоставляют возможность объективной и количественной оценки состояния тканей [9-11].

Спектроскопия представляет собой анализ взаимодействия между материей и электромагнитным излучением. Анализ спектра поглощения или излучения позволяет определить компонентный состав, структурную организацию и некоторые физические характеристики исследуемого образца. Рамановская спектроскопия (РС) впервые была описана К. В. Раманом в 1928 году, который идентифицировал рассеянные фотоны, демонстрирующие сдвиг длины волны относительно падающего света. В РС монохроматический лазерный источник освещает образец, вызывая фотонно-молекулярные взаимодействия, которые могут приводить к потере энергии (стоксово рассеяние) или приобретению энергии (антистоксово рассеяние) рассеянными фотонами [12-14]. Обмен энергией возбуждает определенные молекулярные колебания, генерируя Рамановский спектр, в котором каждая молекула демонстрирует характерный рисунок, соответствующий ее составным функциональным группам [15]. Этот метод позволяет идентифицировать и характеризовать молекулярный состав и структуру материалов. РС чувствительна к изменениям в конформации и составе клеток, тканей, дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК), белков и липидов [12].

### **Цель исследования**

Исследовать возможность использования метода Рамановской спектроскопии для оценки состояния крестообразных связок коленного сустава.

### **Материалы и методы исследования**

Для отбора пациентов к участию в исследовании проводили скрининг среди совершеннолетних пациентов, имевших показания к тотальному эндопротезированию коленного сустава. Всем пациентам в предоперационном периоде была выполнена МРТ, на

основании которой диагностированы повреждения хотя бы одной крестообразной связки коленного сустава, соответствующее 1-2 типам по шкале остеоартрита передней крестообразной связки (ACLOAS). Пациентов с полным разрывом, а также с отсутствием патологии крестообразных связок, по данным МРТ, не включали в исследование.

В ходе операции проводили анализ состояния крестообразных связок, оценивая их по классификации американской ассоциации хирургов-ортопедов (AAOS) до их эксцизии. При выполнении операции тотального эндопротезирования коленного сустава осуществляли забор эксплантов ПКС и ЗКС, которые впоследствии подвергали спектроскопическому исследованию. Образцы крестообразных связок изымали единым блоком совместно с костными точками прикрепления для сохранения структурной целостности и обеспечения оптической оценки областей прикрепления. После каждого оперативного вмешательства экспланты тщательно осматривались на предмет ятрогенных повреждений, полученных во время забора, чтобы исключить потенциальные артефакты измерения. Образцы, имеющие такие повреждения, исключались из дальнейшего анализа. Несмотря на то, что в исследование включали только тех пациентов, у которых при предоперационном МРТ-исследовании выявляли повреждения только 1 и 2 типов по классификации ACLOAS, все же в некоторых случаях интраоперационно, используя классификацию AAOS, выявляли повреждения и III степени, то есть полный разрыв. В общей сложности в окончательный анализ были включены 30 эксплантов передней и задней крестообразных связок, полученных от 24 пациентов.



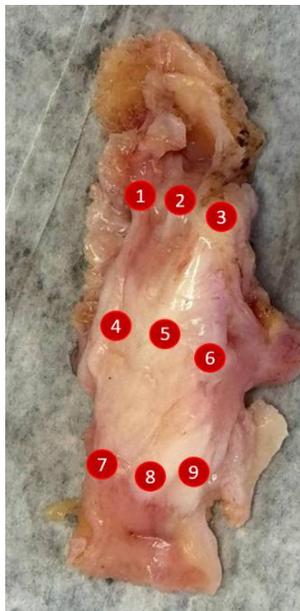
*Рис. 1. Экспланты ПКС: слева - 1-я степень повреждения (AAOS),  
справа - 3-я степень повреждения (AAOS).*

*Примечание: составлено авторами в ходе исследования*

Извлеченные экспланты связок тщательно промывали в стерильном контейнере физиологическим раствором хлорида натрия (NaCl – 0,9%) для удаления остаточных следов

крови и синовиальной жидкости, которые могли бы помешать получению спектров. Для предотвращения дегидратации биологических образцов в контейнер добавляли 150 мл фосфатно-буферного раствора (PBS).

Для анализа методом Рамановской спектроскопии на каждом экспланте выделили девять репрезентативных точек (рис. 2).



*Рис. 2. Точки получения спектров на примере экспланта ПКС. Примечание: составлено авторами в ходе исследования*

Каждое измерение повторяли два-три раза, в результате чего получили набор данных, включающий 270 исследованных участков крестообразных связок.

Основные полосы Рамановского рассеяния для молекул, содержащихся в связках, известны и описаны в литературе [16].

Основные полосы Рамановского рассеяния для молекул, содержащихся в связках

Пик (см <sup>-1</sup> )	Молекулярное колебание	Молекулярный компонент	Ткань сустава
850-880	C-C	Коллаген	Хрящ, синовиальная жидкость, сухожилие, связка, мениск
1001-1004	Ароматическое	Белки	Хрящ, синовиальная жидкость, сухожилие, связка, мениск
1240	C-N	Дефектный коллаген	Хрящ, синовиальная жидкость, сухожилие, связка, мениск, субхондральная кость, кость
1270		Функциональный коллаген	
1441-1460	CH <sub>2</sub>	Липиды и белки	Хрящ, сухожилие, связка, мениск, субхондральная кость, кость
1630-1690	C=O	Коллаген и другие белки	Хрящ, сухожилие, связка, мениск, субхондральная кость, кость

Примечание: составлено авторами на основе источника [16].

Использовали источник света с длиной волны 690 нм при комнатной температуре ( $25 \pm 2$  °C). Оптическая система использовала ряд линз и зеркал для направления падающего луча в одно из двух оптических волокон, в то время как рассеянный сигнал от образца собирался через второе волокно и передавался через коллиматор и полосовой фильтр на входную щель монохроматора. Спектры Рамановского рассеяния регистрировали в диапазоне  $2600\text{--}3800$   $\text{см}^{-1}$  с помощью монохроматора M266 (решетка 600 штрихов/мм, SOL Instruments Ltd., Минск, Беларусь), оснащенного камерой с зарядовой связью (ПЗС-детектор) с обратной засветкой в ближнем ИК-диапазоне, глубоко обедненным слоем и термоэлектрическим охлаждением (iDus 416, Andor Technology, Белфаст, Северная Ирландия, Великобритания). Монохроматор и ПЗС-детектор работали под управлением программного обеспечения Solar Lab, разработанного компанией SOL Instruments Ltd (Минск, Беларусь). Спектры регистрировали при интенсивности лазерного излучения на поверхности ткани около 500 мВт, время измерения каждого спектра составляло 3 секунды. Ширина входной щели монохроматора составляла 100 мкм.



*Рис. 1. Общий вид установки для Рамановской спектроскопии.*

*Примечание: составлено авторами в ходе исследования*

Статистические сравнения между степенями повреждения крестообразных связок оценивали при помощи непараметрического U-критерия Манна - Уитни. Всего таким образом было проанализировано более 300 спектров Рамановской спектроскопии. Для корректировки исходных р-значений, полученных с помощью каждого отдельного U-критерия Манна - Уитни, применяли поправку Бонферрони. Для заключения о статистической значимости скорректированное р-значение должно было быть меньше установленного уровня, равного 0,05.

### **Результаты исследования и их обсуждение**

По результатам измерений был построен график средних спектров Рамановского рассеяния в зависимости от Рамановского сдвига (рис. 4).

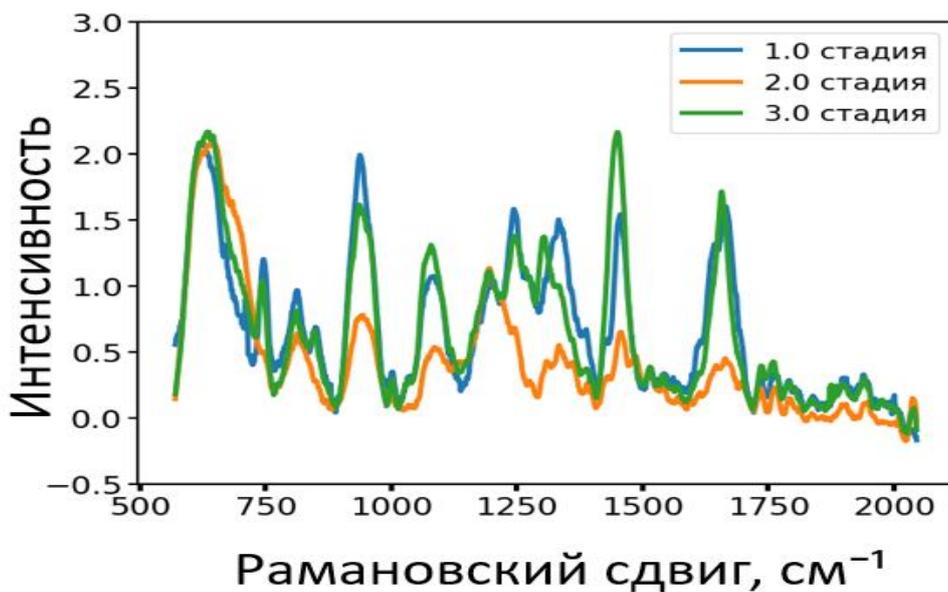


Рис. 4. Вариабельность интенсивности спектров Рамановского рассеяния в зависимости от степени повреждения связки по ААОС.

Примечание: составлено авторами в ходе исследования

В Рамановской спектроскопии для нивелирования аппаратных факторов и различного времени накопления принято использовать отношения интенсивностей пиков. Нормирование проводили на самые интенсивные полосы: 1270 см<sup>-1</sup> (маркер функционального коллагена) и 1450 см<sup>-1</sup> (маркер белков/липидов), на которые были построены диаграммы (рис. 5, 6).

При нормировании на пик 1270 см<sup>-1</sup> обращает на себя внимание отношение дефектного коллагена к функциональному (диаграмма 1240/1270 см<sup>-1</sup>), где выявлено статистически значимое различие между I и II степенью повреждения связки по ААОС ( $p < 0,001$ ). Это подтверждает, что степень дегенерации коррелирует с увеличением доли дефектного коллагена. Статистически значимое различие между II и III степенью ( $p < 0,01$ ) определено только при исследовании отношений 850/1270 см<sup>-1</sup> и 1002/1270 см<sup>-1</sup> (рис. 5).

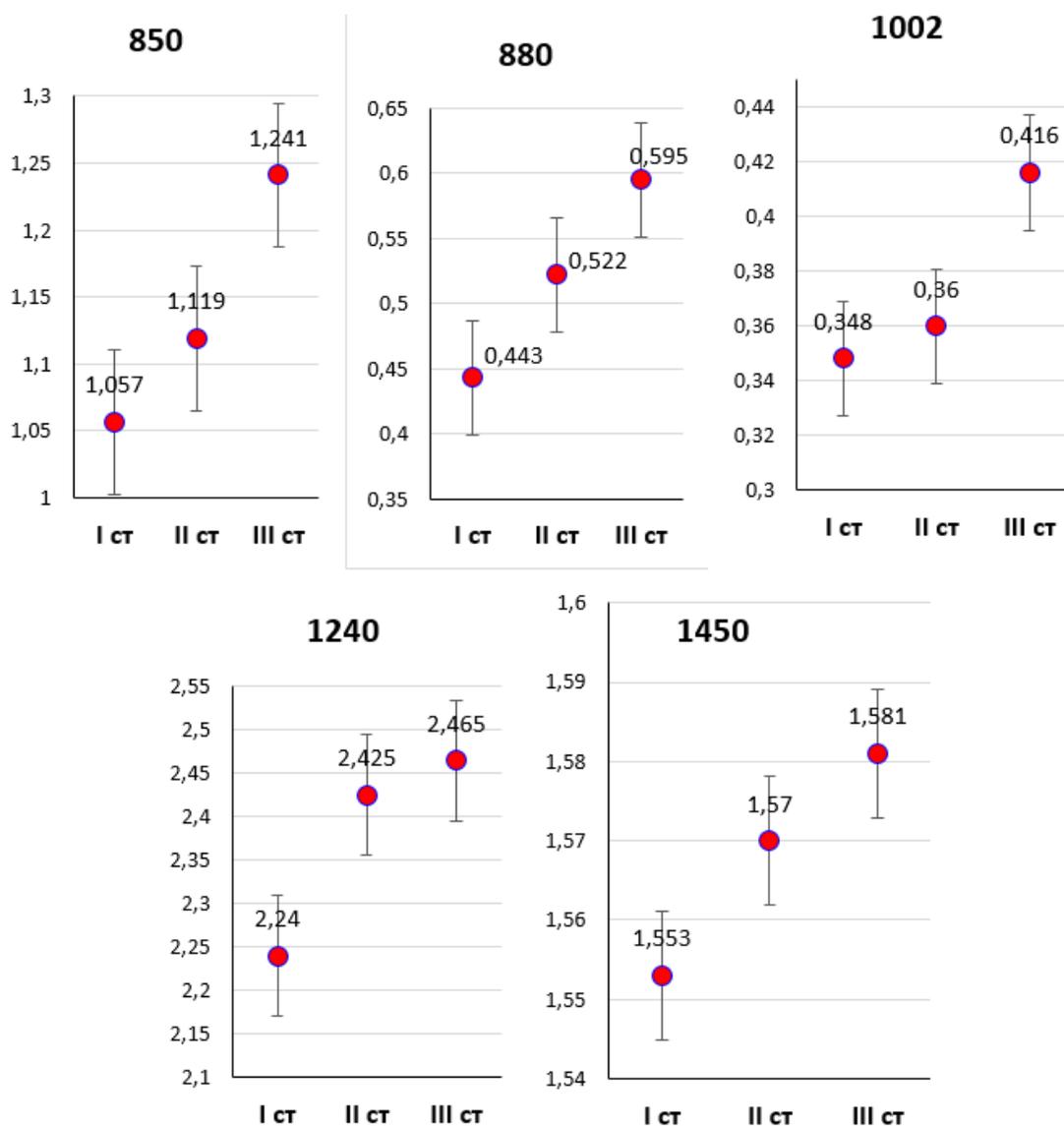


Рис. 5. Диаграммы размаха с оценкой статистической значимости различий между степенями тяжести повреждений связок по AAOS по данным РС (нормирование на пик 1270 см<sup>-1</sup>). Примечание: составлено авторами в ходе исследования

При нормировании на пик 1450 см<sup>-1</sup> можно отметить статистически значимые различия между I и II степенью повреждения связки по AAOS на полосах Рамановского рассеяния 1240, 1270, 1650 см<sup>-1</sup> ( $p < 0,001$ ). Статистически значимы также различия между I и III степенью на всех полосах Рамановского рассеяния ( $p < 0,001$ ). Однако различия между II и III степенью по AAOS при данном методе анализа были статистически незначимыми ( $p > 0,05$ ) (рис. 6).

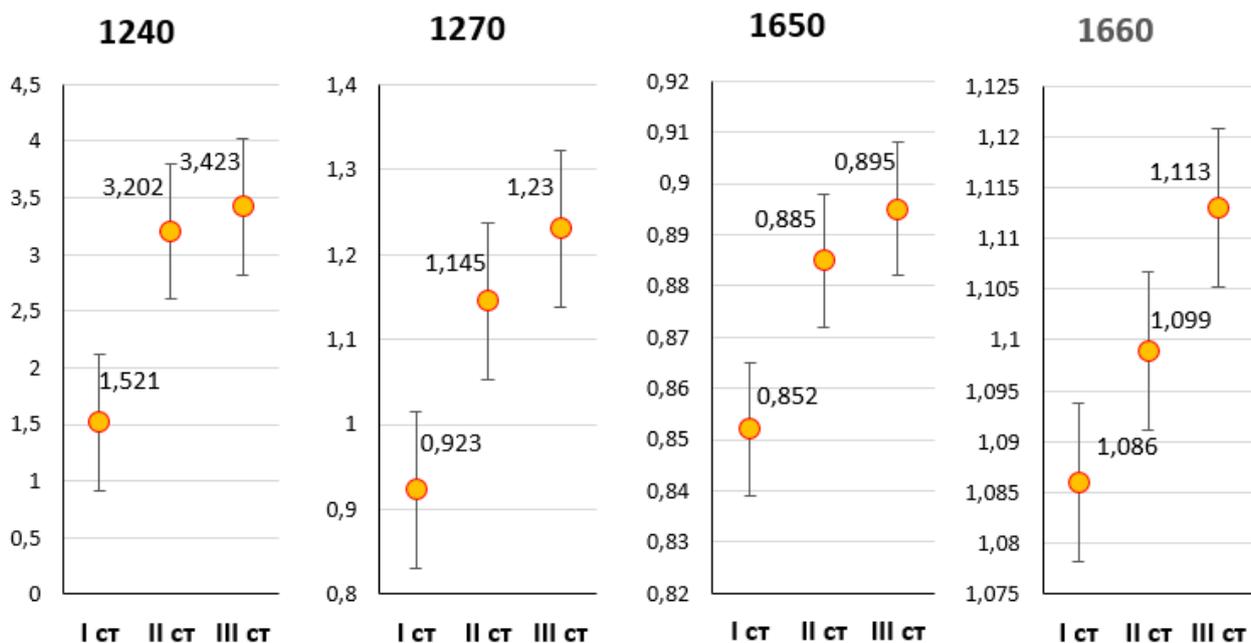


Рис.6. Диаграммы размаха с оценкой статистической значимости различий между степенями тяжести повреждений связок по AAOS по данным РС (нормирование на пик 1450 см<sup>-1</sup>). Примечание: составлено авторами в ходе исследования

### Заключение

Таким образом, метод Рамановской спектроскопии позволяет эффективно дифференцировать состоятельную связку (неповрежденную или поврежденную незначительно – I степень по AAOS) от патологически измененной (II и III степени) за счет оценки отношения дефектного и функционального коллагена. В то же время разграничение между II и III степенями повреждения оказалось более сложной диагностической задачей и стало возможным лишь при анализе отношений 850/1270 см<sup>-1</sup> и 1002/1270 см<sup>-1</sup>. С клинической точки зрения полученные результаты указывают на потенциальную значимость Рамановской спектроскопии как объективного инструмента оценки состояния крестообразных связок. В перспективе интеграция данного метода в клиническую практику может повысить объективность диагностики.

### Список литературы

1. Beaulieu M. L., Ashton-Miller J. A., Wojtys E. M. Loading mechanisms of the anterior cruciate ligament // Sports biomechanics. 2023. № 22 (1). P. 1-29. DOI: 10.1080/14763141.2021.1916578.
2. Dewig D. R., Boltz A. J., Moffit R. E., Rao N., Collins C. L., Chandran A. Epidemiology of anterior cruciate ligament tears in national collegiate athletic association athletes: 2014/2015–

2018/2019 // *Medicine and Science in Sports and Exercise*. 2024. № 56 (1). P. 29-36. DOI: 10.1249/MSS.0000000000003281.

3. Owesen C., Sandven-Thrane S., Lind M., Forssblad M., Granan L. P., Årøen A. Epidemiology of surgically treated posterior cruciate ligament injuries in Scandinavia // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2017. № 25 (8). P. 2384-2391. DOI: 10.1007/s00167-015-3786-2.

4. Sanders T. L., Pareek A., Barrett I. J., Kremers H. M., Bryan A. J., Stuart M. J., Levy B. A., Krych A. J. Incidence and long-term follow-up of isolated posterior cruciate ligament tears // *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*. 2017. № 25(10). P. 3017-3023. DOI: 10.1007/s00167-016-4052-y.

5. Бальжинимаев Д. Б. Хирургическое лечение пациентов с повреждением передней крестообразной связки (экспериментально-клиническое исследование): дис. канд. мед. наук. Иркутск, 2023. 119 с. URL: [https://niito.ru/wp-content/uploads/2023/04/balzhinimaev\\_dissertacziya\\_17.04.2023-1.pdf](https://niito.ru/wp-content/uploads/2023/04/balzhinimaev_dissertacziya_17.04.2023-1.pdf)

6. Pitsillides A., Stasinopoulos D., Giannakou K. Healing potential of the anterior cruciate ligament in terms of fiber continuity after a complete rupture: a systematic review // *Journal of Bodywork and Movement Therapies*. 2021. № 28. P. 246-254. DOI: 10.1016/j.jbmt.2021.06.003.

7. Della Villa F., Buckthorpe M., Grassi A., Nabiuzzi A., Tosarelli F., Zaffagnini S., Della Villa S. Systematic video analysis of ACL injuries in professional male football (soccer): injury mechanisms, situational patterns and biomechanics study on 134 consecutive cases // *British journal of sports medicine*. 2020. № 54 (23). P. 1423-1432. DOI: 10.1136/bjsports-2019-101247.

8. Al Mohammad B., Gharaibeh M. A. Magnetic resonance imaging of anterior cruciate ligament injury // *Orthopedic Research and Reviews*. 2024. P. 233-242. DOI: 10.2147/ORR.S450336.

9. Райков Б. Д., Азаркин К. М., Лычагин А. В., Гончарук Ю. Р., Липина М. М., Гаркави А. В., Вязанкин И. А., Погосян Д. А., Калинин Е. Б., Калинин Б. М., Кудрачев Т. Р., Мурдалов Э. Э., Дрогин А. Р., Белов Н. О., Ровнягина Н. Р., Будылин Г. С. Новый способ определения диагностических параметров суставного хряща: от теории к практике (клинический пример) // *Кафедра травматологии и ортопедии*. 2023. № 1 (51). С. 73-81. DOI: 10.17238/2226-2016-2023-1-73-81. EDN: PLPLYP.

10. Abramczyk H., Brozek-Pluska B. Raman imaging in biochemical and biomedical applications // *Diagnosis and treatment of breast cancer. Chemical reviews*. 2013. № 113 (8). P. 5766-5781. DOI: 10.1021/cr300147r.

11. Qi Y., Chen E. X., Hu D., Yang Y., Wu Z., Zheng M., Sadi M. A., Jiang Y., Zhang K., Chen Z., Chen Y. P. Applications of Raman spectroscopy in clinical medicine // *Food Frontiers*. 2024. № 5 (2). P. 392-419. DOI: 10.1002/fft2.335.

12. Cui S., Zhang S., Yue S. Raman spectroscopy and imaging for cancer diagnosis // *Journal of healthcare engineering*. 2018. № 2018 (1). 8619342. DOI: 10.1155/2018/8619342.
13. Lyng F. M., Traynor D., Nguyen T. N. Q., Meade A. D., Rakib F., Al-Saady R., Goormaghtigh E., Al-Saad K., Ali M. H. Discrimination of breast cancer from benign tumours using Raman spectroscopy // *PLoS One*. 2019. № 14 (2). P. e0212376. DOI: 10.1371/journal.pone.0212376.
14. Balan V., Mihai C. T., Cojocaru F. D., Uritu C. M., Dodi G., Botezat D., Gardikiotis I. Vibrational spectroscopy fingerprinting in medicine: from molecular to clinical practice // *Materials*. 2019. № 12(18). P. 2884. DOI: 10.3390/ma12182884.
15. Sato H., Ishigaki M., Taketani A., Andriana B. B. Raman spectroscopy and its use for live cell and tissue analysis // *Biomedical Spectroscopy and Imaging*. 2018. № 7 (3-4). P. 97-104. DOI: 10.3233/BSI-180184.
16. Casal-Beiroa P., González P., Blanco F. J., Magalhães J. Molecular analysis of the destruction of articular joint tissues by Raman spectroscopy // *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2020. № 20 (8). P. 789-802. DOI: 10.1080/14737159.2020.1782747.

**Конфликт интересов:** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Conflict of interest:** The authors declare that there is no conflict of interest.