

КРИСТАЛЛОГРАФИЯ В БИОЛОГИИ И МЕДИЦИНЕ

УДК 535.341.08, 543.42, 543.44

ВОЗМОЖНОСТИ ФИЗИЧЕСКИХ МЕТОДОВ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ФАЗОВОГО СОСТАВА ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ

© 2019 г. Ю. С. Кривоносов^{1,*}, В. Е. Асадчиков¹, А. В. Бузмаков¹, А. Г. Иванова¹, В. В. Артемов¹,
А. А. Русаков¹, В. В. Пантюшов³, Р. Г. Сайфутдинов⁴, Н. В. Минаев², С. А. Минаева²,
М. А. Сячина², В. К. Попов²

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Россия

² Институт фотонных технологий ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН, Москва, Троицк, Россия

³ Городская клиническая больница № 1 им. Н.И. Пирогова, Москва, Россия

⁴ Кафедра госпитальной и поликлинической терапии Казанской государственной медицинской академии,
Казань, Россия

*E-mail: Yuri.S.Krivososov@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.05.2019 г.

После доработки 13.06.2019 г.

Принята к публикации 17.06.2019 г.

Методами рентгеновской микротомографии, рентгеновского фазового анализа, спектроскопии комбинационного рассеяния и элементного анализа проведены исследования желчных камней с зональным морфологическим строением. Конкременты изучали *in vitro* в просушенном состоянии, в их составе обнаружены фазы холестерина, билирубина, карбоната кальция, а также хлоридов натрия и калия. Работа выполнена в рамках развития томографических методов, которые в перспективе могут быть использованы для “прижизненной” диагностики холестеринового холелитиаза. Продемонстрирована возможность определения фазового состава гетерогенных желчных камней на основе анализа распределений линейного коэффициента поглощения, полученных по данным рентгеновской моноэнергетической микротомографии. Результаты томографических исследований согласуются с данными традиционных прямых методов определения фазового и элементного состава изучаемых объектов.

DOI: 10.1134/S0023476119060110

ВВЕДЕНИЕ

Желчнокаменная болезнь (ЖКБ) — полиэтиологическое заболевание, вызванное нарушением биохимического обмена холестерина и билирубина, сопровождающееся образованием конкрементов желчного пузыря. В настоящий момент ЖКБ является самым распространенным заболеванием желудочно-кишечного тракта в мире [1, 2]. По данным современных исследований происходит неуклонный рост заболевания среди различных групп населения на фоне экологических факторов, образа жизни и питания. В связи с этим во всем мире сохраняется интерес к дальнейшему изучению этиологии, патогенеза, лечению и профилактике патологических заболеваний, связанных с органоминеральными агрегатами организма. В настоящий момент установлена прямая связь ЖКБ с возрастом и полом пациентов, факторами питания и ожирения, наследственностью, сывороточными факторами, дискинезией желчного пузыря и желчевыводящих

путей, нарушениями водного и солевого балансов в организме [1, 3–9].

Хотя проблемы диагностики и лечения ЖКБ успешно решаются в современной медицине, нарастающее распространение заболевания на сегодняшний день подчеркивает объективную необходимость изучения возможностей “прижизненной” диагностики фазового и химического состава камней желчного пузыря с целью повышения эффективности использования органосохраняющих методик лечения ЖКБ. Несмотря на многочисленные попытки диагностики состава желчных камней инструментальными методами, в том числе с помощью рентгеновской компьютерной томографии [10, 11], в настоящее время не существует методики *in vivo* определения фазового состава желчных камней. Как следствие, доля пациентов, к которым на практике применяются литолитические методы лечения ЖКБ, по известным авторам данным не превышает 30% [12]. При этом исследования состава желчных камней в европейской популяции показывают, что доля кам-

ней, в которых холестерин является основным компонентом, составляет более 90% от общего количества [13]. К данной многочисленной группе пациентов, вероятно, может быть применена литолитическая терапия для лечения ЖКБ.

В настоящей работе представлены результаты исследований, направленных на создание методики определения фазового состава желчных камней (*in vitro*) по измерениям на рентгеновском микротомографе с пространственным разрешением на уровне 10–20 мкм и монохроматическим зондирующим излучением с энергией 17.5 кэВ. Также использованы методы рентгеновского фазового анализа (РФА), спектроскопии комбинационного рассеяния (КР) и электронной микроскопии для получения информации о физико-химических параметрах желчных камней. Ранее было продемонстрировано количественное совпадение экспериментально измеренных линейных коэффициентов поглощения холестериновых конкрементов с расчетом на основе табличных данных, показана возможность детально визуализировать исследуемый конкремент, а также сделать предположения о фазовом составе его гомогенных областей [14]. В настоящей работе сделана попытка определения фазового состава гетерогенных желчных камней на основе анализа распределений линейного коэффициента поглощения, полученных методом моноэнергетической рентгеновской микротомографии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для исследований использованы несколько конкрементов желчного пузыря, полученных при хирургическом лечении ЖКБ. Все конкременты просушены перед началом исследований.

Моноэнергетическая рентгеновская микротомография. Томографические измерения желчных камней проводили на лабораторном рентгеновском микротомографе, разработанном в ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН. Источником излучения являлась стандартная рентгеновская трубка с характеристической линией MoK_α (энергия 17.5 кэВ), выделяемой кристаллом-монохроматором. Излучение регистрировалось CCD-детектором XIMEA xiRay11 с размером пикселя $9 \times 9 \text{ мкм}^2$ и полем зрения $36 \times 24 \text{ мм}^2$. Использовалась схема сканирования в параллельном пучке, в которой рентгеновский источник и детектор оставались неподвижны в процессе эксперимента, а образец вращался на гониометрическом устройстве. В каждом эксперименте снимали 400 проекций с шагом 0.5° , обработку томографических данных проводили алгебраическим методом реконструкции. Использование монохроматического зондирующего пучка поз-

волило получить истинные значения линейного коэффициента поглощения при реконструкции.

Рентгенофазовый анализ. Для исследования методом РФА фрагменты желчных камней растирали в порошки и наносили на стеклянную кювету. Измерения рентгенограмм проводили на дифрактометре Rigaku MiniFlex 600 (CuK_α -излучение, 40 кВ, 15 мА, Ni-K_β -фильтр). Угловой диапазон сканирования $2\theta = 3^\circ\text{--}90^\circ$ с шагом 0.02° , скорость сканирования 2 град/мин. Размер пучка, падающего на образец, задавали горизонтальной (размер 10 мм) и вертикальной (угловой размер 1.25°) щелями. Рентгенофазовый анализ выполняли в программе PDXL (Rigaku Corporation, Япония) с использованием базы данных порошковых дифрактограмм ICDD PDF-2 (2017).

Спектроскопия комбинационного рассеяния. Спектры КР регистрировали на дисперсионном спектрометре КР Nicolet Almega XR при возбуждении ND:YAG-лазером ($\lambda = 532 \text{ нм}$). Для реализации режима высокого пространственного разрешения (микро-КР) использовали объектив с увеличением $100\times$ и областью регистрации спектра диаметром менее 1 мкм. Для анализа спектров применяли программное обеспечение “Omnici”.

Электронная микроскопия. Измерения рентгеновских энергодисперсионных спектров желчных камней выполнены на растровом электронном микроскопе (РЭМ) FEI Quanta 200 3D с приставкой для анализа EDAX Genesys.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

На рис. 1 представлены микрофотографии исследованных конкрементов. Конкремент GS-26 (рис. 1а) представляет собой агрегат с четко выраженной центральной частью, в которой хаотически расположены рыхлые кристаллические образования желто-коричневого цвета, и плотной оболочкой, по структуре напоминающей послойные концентрические отложения. Конкремент GS-28 (рис. 1б) имеет редко встречающееся морфологическое строение, похожее на *геликтиты* арагонита (минеральные агрегаты с ветвящимися цилиндрическими или коническими отростками дендритов) или на *кораллиты* (агрегаты из не срастающихся отдельных ветвей дендритов и их кустов, между которыми имеется зазор).

По проведенным исследованиям с помощью РФА установлено, что в конкременте GS-26 присутствуют фазы холестерина в двух модификациях (одноводный $\text{C}_{27}\text{H}_{48}\text{O}_2$ и безводный $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$), а также карбоната кальция CaCO_3 в модификациях арагонита (80%) и ватерита (20%). При этом сделана попытка по отдельности исследовать оболочку и центральную часть конкремента GS-26. В результате показано, что карбонат кальция сосредоточен преимущественно в оболочке GS-26,

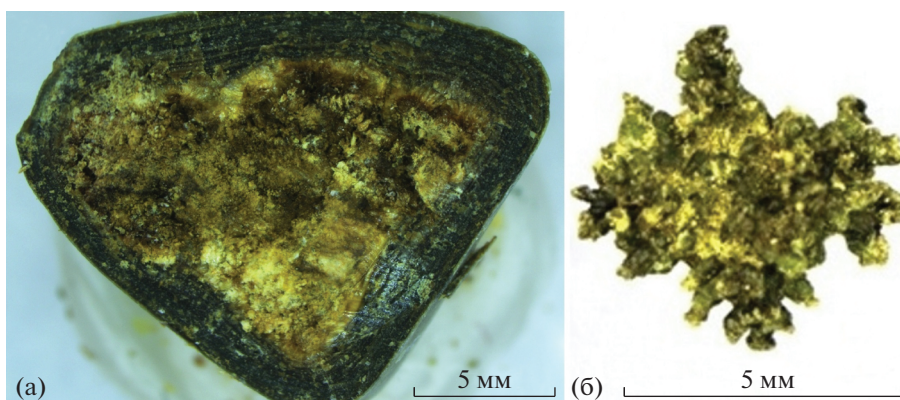


Рис. 1. Микроскопические фотографии желчных камней: а – конкремент GS-26 (в разрезе); б – конкремент GS-28 (оптический микроскоп Nikon SMZ1270).

а холестерин присутствует и в оболочке, и в центральной части. Наличие карбоната кальция в центральной части GS-26 остается под сомнением ввиду слабоинтенсивных рефлексов на дифрактограмме, наличие которых может быть следствием подмеса материала оболочки при механической резке конкремента в процессе проведения исследований. Для конкремента GS-28 все рефлексы на дифрактограмме (рис. 2) в диапазоне 20° – 90° идентифицируются как смесь двух полиморфных модификаций CaCO_3 – арагонита и ватерита – с небольшой примесью $(\text{Na}, \text{K})\text{Cl}$. По результатам полуколичественного фазового анализа неорганической фракции конкремента GS-28 методом Ритвельда процентные доли арагонита и ватерита составили 84% и 16% соответственно. В малоугловой области спектра дифрактограммы конкремента GS-28 ($2\theta = 3^\circ$ – 15° , рис. 2) проявляется широкий максимум диффузного рассеяния, при этом на его фоне наблюдаются слабоинтенсивные рефлексы, которые однозначно не идентифицируются. Можно предположить, что холестерин, если и присутствует в составе камня, то не образует кристаллическую фазу.

Проведен качественный элементный анализ трех участков конкремента GS-28 методом РЭМ. Энергодисперсионные спектры представлены на рис. 3. На поверхности отростков-дендритов (точка 1 рис. 3), а также в областях между дендритами (точка 3 рис. 3) обнаружены элементы, входящие в состав карбоната кальция (Ca, C, O). Центральная часть конкремента GS-28 (точка 2 рис. 3) отличается высоким содержанием углерода C, значительно меньшим количеством Ca, а также присутствием O, Na, Mg, S, Cl, K в малых количествах. Данный элементный состав центральной части конкремента GS-28 не позволяет предполагать наличие какой-то одной фазы, здесь могут присутствовать холестерин, билирубин и карбонат кальция. При этом данные эле-

ментного состава подтверждают наличие кристаллов $(\text{Na}, \text{K})\text{Cl}$.

Методом спектроскопии КР у конкрементов GS-26 и GS-28 отдельно исследованы оболочка и центральная часть (ядро). Получение спектров КР от рассматриваемых образцов затруднялось тем, что вследствие неоднородности их структуры и химического состава, а также наличия в них различных неидентифицированных примесей, присутствовал значительный сигнал флуоресценции. Поэтому постоянно требовалось проведение корректировки положения базовой линии спектров. Кроме того, под воздействием лазерного излучения образцы в некоторых случаях подвергались локальному (в пределах зоны лазерного облучения) термическому разрушению. В силу последнего обстоятельства не от всех кристалли-

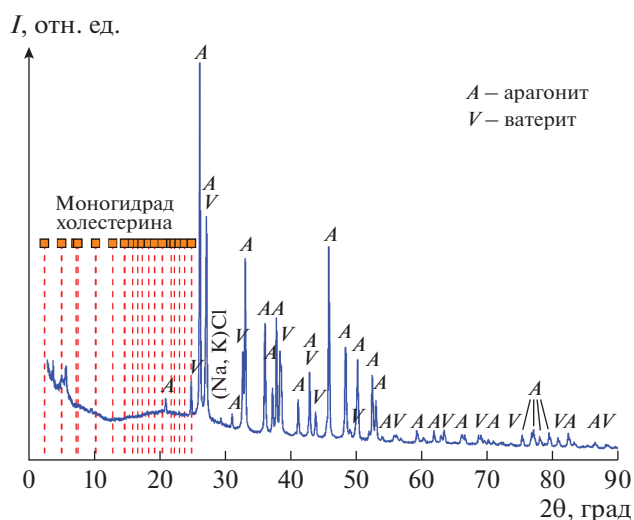


Рис. 2. Рентгеновская дифрактограмма желчного камня GS-28. Буквенные обозначения и пунктирные линии показывают положения основных рефлексов идентифицированных фаз.

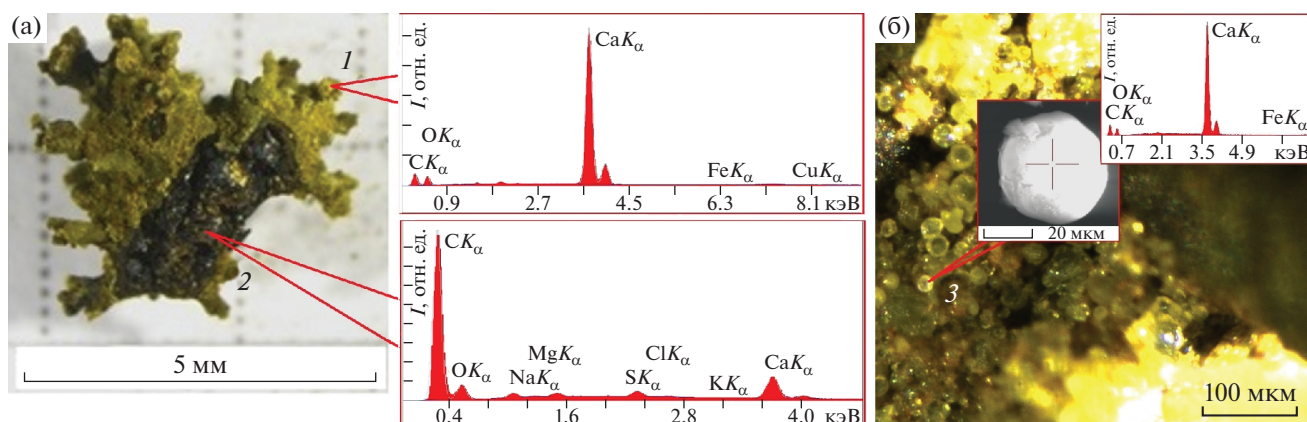


Рис. 3. Микроскопические фотографии желчного камня GS-28: а – в разрезе; б – фотография увеличенных областей между дендритными отростками. На выносных изображениях представлены рентгеновские энергодисперсионные спектры, снятые в точках 1, 2, 3 на растровом электронном микроскопе, и результаты качественного элементного анализа.

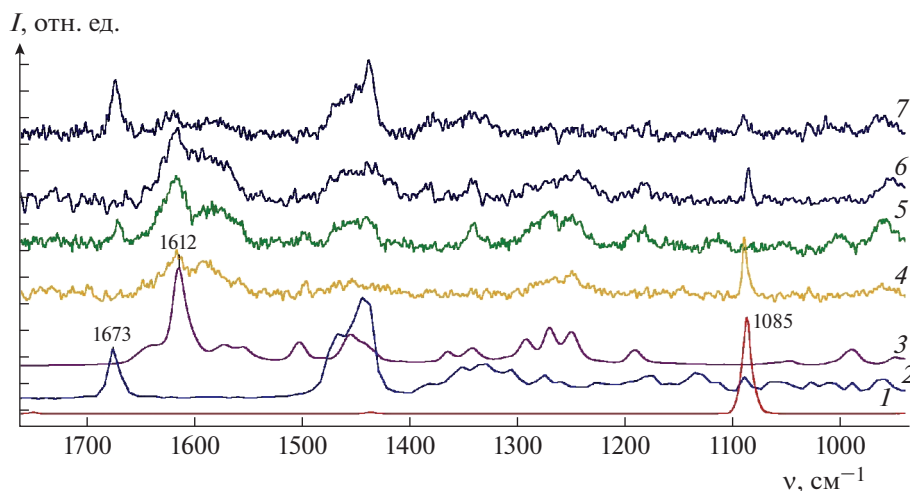


Рис. 4. Спектры КР карбоната кальция (1), холестерина (2), билирубина (3), внешней оболочки образца GS-28 (4), внутренней части (ядра) образца GS-26 (5), внешней оболочки образца GS-26 (6, 7).

ческих образований в исследуемых образцах удалось получить воспроизводимые спектры КР. Для определения основного химического состава камней использовали известные спектры КР билирубина, холестерина и карбоната кальция, взятые из базы данных спектрометра Nicolet Almega XR.

На рис. 4 показаны характерные спектры КР, полученные от исследуемых образцов. Для карбоната кальция характерна полоса с максимумом около 1085 см^{-1} , она присутствует также в спектрах оболочек обоих конкрементов (рис. 4, спектры 1, 4, 6, 7). Для холестерина характерна полоса с максимумом в районе 1673 см^{-1} . Она присутствует в спектрах КР как внутренней части, так и оболочки образца GS-26 (рис. 4, спектры 2, 5, 7). Для билирубина характерна полоса с максимумом в районе 1612 см^{-1} , она присутствует в спектрах внутренней части и оболочки образца GS-26, а также оболочки образца GS-28 (рис. 4, спектры 3–6). Внутренняя часть образца GS-28 состоит в основном из темного вещества, которое заметно повреждается при воздействии лазерного излучения. Его спектр КР слабо интенсивный, но в нем отчетливо наблюдается характерная для билирубина полоса 1612 см^{-1} . При этом в основной массе образца присутствуют многочисленные вкрапления светлых кристаллов, спектр КР которых также соответствует билирубину.

Таким образом, по результатам РФА, спектроскопии КР и элементного анализа достоверно установлено наличие в оболочке конкремента GS-26 фаз карбоната кальция и холестерина (по данным РФА и КР), а также билирубина (по дан-

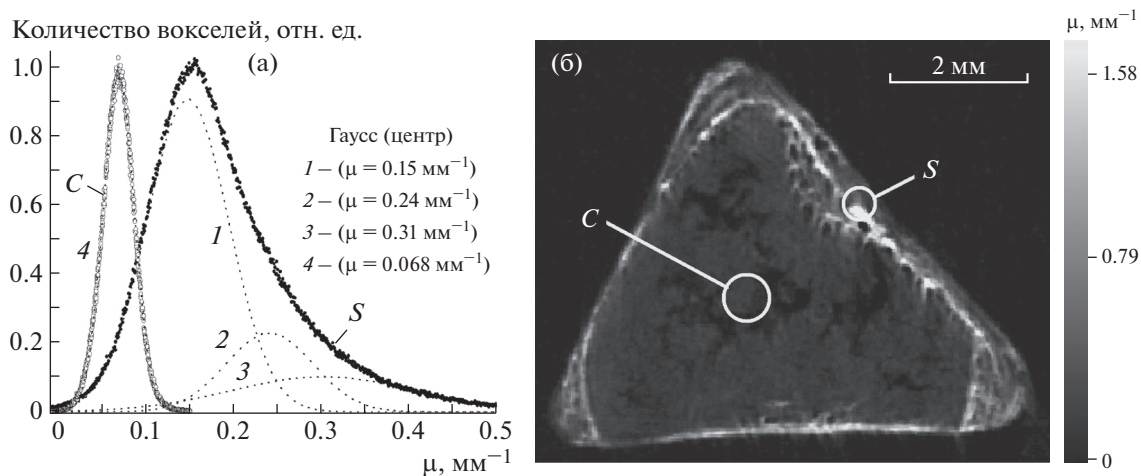


Рис. 5. Гистограммы распределения линейного коэффициента поглощения μ для желчного камня GS-26 (а). Кривая S — распределение μ в оболочке конкремента, 1, 2, 3 — аппроксимация S гауссовыми функциями. Кривая C — распределение μ в центральной части конкремента, 4 — аппроксимация C функцией Гаусса. Сечение томографической реконструкции конкремента GS-26 (б).

ным КР); во внутренней части GS-26 присутствуют холестерин (по данным РФА и КР) и билирубин (по данным КР). Во внешней оболочке GS-28 и его дендритных отростках присутствует карбонат кальция (по данным РФА и КР) и билирубин (по данным КР), во внутренней части GS-28 — билирубин (по данным КР). Методом РФА не удалось достоверно установить присутствие какой-либо фазы во внутренней части образца GS-28, при этом есть предположения о наличии в нем аморфного холестерина. Отметим, что билирубин, обнаруженный в составе камней методом КР, присутствует в объеме конкрементов лишь редкими кристаллическими образованиями и, видимо, поэтому не проявляется на дифрактограммах РФА. Данные элементного анализа конкремента GS-28 согласуются с результатами, полученными методами РФА и КР.

На рис. 5 и 6 представлены результаты обработки микротомографических измерений конкрементов GS-26, GS-28. На томографических сечениях обоих конкрементов (рис. 5б и 6б) можно наблюдать схожее зональное строение, а именно рыхлую трещиноватую центральную часть и плотную сплошную оболочку. Поскольку исследуемые образцы оказались гетерогенными, каждую зону конкрементов анализировали отдельно, для чего по томографическим данным строили гистограммы распределения линейного коэффициента поглощения μ для каждого исследуемого участка. Отметим, что в случае, когда томографические данные получены от однородного образца, гистограмма распределения линейного коэффициента поглощения всегда одновершинная и подчиняется нормальному закону. По этой причине полученные мультимодальные распределе-

ния аппроксимировали суммой гауссовых функций, каждая из которых соответствует своей фазе в составе образца или области характерной плотности в пределах одной фазы и характеризуется средним значением линейного коэффициента поглощения $\bar{\mu}$ для соответствующей кривой аппроксимации. Гистограммы, построенные для центральных частей и оболочек конкрементов GS-26, GS-28, а также для дендритных отростков конкремента GS-28 представлены на рис. 5а, 6а, 6в. Там же даны кривые аппроксимации и полученные средние значения линейного коэффициента поглощения.

Для центральной части конкремента GS-26 наблюдается одномодальное распределение линейного коэффициента поглощения (рис. 5, кривая C) со средним значением $\bar{\mu} = 0.068 \text{ мм}^{-1}$. Данное значение линейного коэффициента поглощения согласуется с экспериментальными результатами, представленными в [14], где для холестериновых конкрементов были установлены усредненные значения линейного коэффициента поглощения в пределах $0.05\text{--}0.07 \text{ мм}^{-1}$. Расчет на основе табличных данных для чистого холестерина $\text{C}_{27}\text{H}_{46}\text{O}$ дает значение $\mu = 0.061 \text{ мм}^{-1}$ (для энергии 17.5 кэВ). Таким образом, результаты микротомографических исследований показывают наличие только холестериновой фазы в центральной части конкремента GS-26, что подтверждается данными измерений РФА и КР. Наличие билирубина в центральной части GS-26, продемонстрированное по измерениям КР, никак не проявляется в распределении коэффициента поглощения, вероятно, потому, что объемная доля фазы билирубина слишком мала. Гистограмма распределения коэффициентов поглощения для

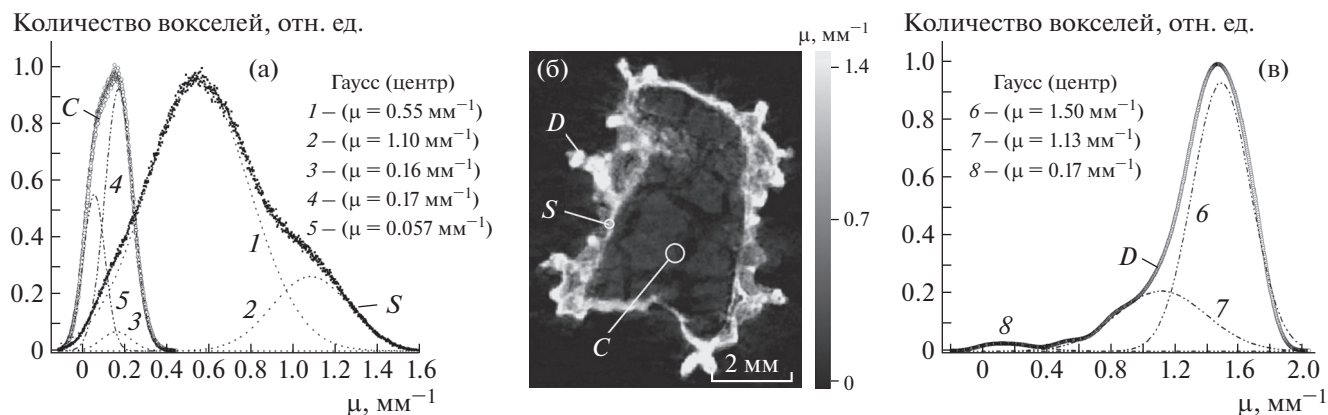


Рис. 6. Гистограммы распределения линейного коэффициента поглощения μ для желчного камня GS-28 (а, в). Кривая S – распределение μ в оболочке конкремента, 1, 2, 3 – аппроксимация S гауссовыми функциями. Кривая C – распределение μ в центральной части конкремента, 4, 5 – аппроксимация C гауссовыми функциями. Кривая D – распределение μ в дендритных отростках конкремента, 6, 7, 8 – аппроксимация D гауссовыми функциями. Сечение томографической реконструкции конкремента GS-28 (б).

оболочки конкремента GS-26 (рис. 5, кривая S) несимметрична и аппроксимируется суммой трех гауссовых функций (рис. 5, кривые 1, 2, 3) со средними значениями $\bar{\mu} = 0.15, 0.24, 0.31 \text{ мм}^{-1}$, вероятно, характеризующими фазу карбоната кальция. Это подтверждается данными [14], где для карбоната кальция в желчных камнях установлены значения μ в диапазоне $0.15\text{--}0.37 \text{ мм}^{-1}$. Отметим, что расчет линейного коэффициента поглощения на основе табличных данных для карбоната кальция дает значение $\mu = 2.4 \text{ мм}^{-1}$. Это различие может быть следствием того, что массовая плотность карбоната кальция в желчных камнях меньше табличной. Наличие холестериновой фазы в оболочке конкремента GS-26 по томографическим данным не установлено.

Для центральной части конкремента GS-28 получено двумодальное распределение коэффициента поглощения (рис. 6, кривая C), аппроксимированное кривыми 4 и 5 (рис. 6) со средними значениями $\bar{\mu} = 0.17$ и 0.057 мм^{-1} . Из анализа кривых 4 и 5 (рис. 6) можно установить объемную долю каждой фазы, которая составила 69% для карбоната кальция и 31% для холестерина. Полученные значения линейных коэффициентов поглощения могут свидетельствовать о наличии фаз холестерина и карбоната кальция в центральной части конкремента GS-28. Данное предположение не противоречит результатам элементного анализа (рис. 3а, точка 2), однако достоверно не подтверждается измерениями РФА и КР. Гистограммы распределений коэффициента поглощения для оболочки конкремента GS-28 и его дендритных отростков представлены кривыми S и D на рис. 6а и 6в соответственно. Оба распределения мультимодальны и аппроксимируются гауссовыми функциями со средними значениями $\bar{\mu} =$

$0.16, 0.55, 1.1 \text{ мм}^{-1}$ для оболочки конкремента GS-28 и $\bar{\mu} = 0.17, 1.13, 1.5 \text{ мм}^{-1}$ для его дендритных отростков. Данные значения линейного коэффициента поглощения характеризуют карбонат кальция, поскольку других фаз в оболочке GS-28 и его дендритных отростках по данным РФА и КР не обнаружено.

Таким образом, по результатам исследований фазы карбоната кальция в конкрементах GS-26 и GS-28 при аппроксимации гистограмм распределения линейного коэффициента поглощения гауссовыми функциями установлены максимумы распределений в широком диапазоне значений μ от 0.15 до 1.5 мм^{-1} . Разброс значений линейного коэффициента поглощения говорит о том, что фаза карбоната кальция не однородна в объеме конкрементов и сильно различается по плотности на разных участках. При этом при аппроксимации каждого распределения (рис. 5а, 6а, 6в) повторяется гауссова функция с максимумом линейного коэффициента поглощения $0.15\text{--}0.17 \text{ мм}^{-1}$. Данное значение линейного коэффициента поглощения также согласуется с результатами [14] и, по мнению авторов, может использоваться для определения фазы карбоната кальция в составе желчных камней с помощью рентгеновской моноэнергетической (с энергией 17.5 кэВ) микротомографии.

ВЫВОДЫ

Проведены исследования конкрементов желчного пузыря методами рентгеновской микротомографии, рентгеновского фазового анализа, спектроскопии комбинационного рассеяния и электронной микроскопии. Установлено, что конкременты гетерогенны с зональным морфо-

логическим строением. Определен фазовый состав конкрементов, обнаружены фазы холестерина, карбоната кальция и билирубина. Показана возможность определения фазового состава желчных камней на основе анализа распределений линейного коэффициента поглощения рентгеновского излучения, при этом методом рентгеновской микротомографии можно изучать как кристаллические, так и аморфные фазы.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН в части “проведения экспериментов”, Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-26028) в части “реконструкции изображений и анализа микротомографических экспериментов”. Эксперименты по РФА и электронной микроскопии проведены с использованием оборудования ЦКП ФНИЦ “Кристаллография и фотоника” РАН.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Novacek G.* // *Wien. Med. Wochenschr.* 2006. V. 156. P. 527.
2. *Sun H., Tang H., Jiang S. et al.* // *World J. Gastroenterol.* 2009. V. 15. P. 1886.
3. *Everhart J.E., Khare M., Hill M. et al.* // *Gastroenterology.* 1999. V. 117. P. 632.
4. *Völzke H., Baumeister S.E., Alte D. et al.* // *Digestion.* 2005. V. 71. P. 97.
5. *Qin J., Han T.Q., Fei J. et al.* // *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 2005. V. 85. P. 1966.
6. *Abu-Eshy S.A., Mahfouz A.A., Badr A. et al.* // *East. Mediterr. Health J.* 2007. V. 13. P. 794.
7. *Stuart G.S., Tang J.H., Heartwell S.F. et al.* // *Contraception.* 2007. V. 76. P. 357.
8. *Cirillo D.J., Wallace R.B., Rodabough R.J. et al.* // *J. Am. Med. Assoc.* 2005. V. 293. P. 330.
9. *Zimmer V., Lammert F.* // *Curr. Opin. Gastroenterol.* 2011. V. 27. P. 231.
10. *Baron R.L., Rohrmann C.A., Lee S.P. et al.* // *Am. J. Roentgenol.* 1988. V. 151. P. 1123.
11. *Суворова Е.И., Пантюшев В.В., Волошин А.Э.* // *Кристаллография.* 2017. Т. 62. № 6. С. 853.
12. *Ильченко А.А.* Желчнокаменная болезнь. М.: Анахарсис, 2004. 200 с.
13. *Schafmayer C., Hartleb J., Tepel J. et al.* // *BMC Gastroenterology.* 2006. V. 6. P. 36.
14. *Асадчиков В.Е., Бузмаков А.В., Волошин А.Э. и др.* // *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология.* 2018. № 7(155). С. 118.