

УДК 620.187

## ЭЛЕКТРОННО-МИКРОСКОПИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ КРИСТАЛЛОМОРФОЛОГИЧЕСКИХ КАРТИН В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ

© 2020 г. А. И. Иванова<sup>а</sup>, \*, Л. А. Курбатова<sup>б</sup>

<sup>а</sup>Тверской государственный университет, Тверь, 170100 Россия

<sup>б</sup>Тверской государственный медицинский университет, Тверь, 170100 Россия

\*e-mail: alex.ivanova33@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.02.2019 г.

После доработки 18.03.2019 г.

Принята к публикации 18.03.2019 г.

Представлены результаты микроморфологических исследований кристаллизации органических компонентов операционной желчи. В качестве кристаллообразующего вещества был использован спиртовой раствор нингидрина. Кристалломорфологический анализ полученных картин исследован методом растровой электронной микроскопии.

**Ключевые слова:** растровая электронная микроскопия, кристаллизация, дендриты, сферолиты, кристаллические агрегаты.

**DOI:** 10.31857/S1028096020010057

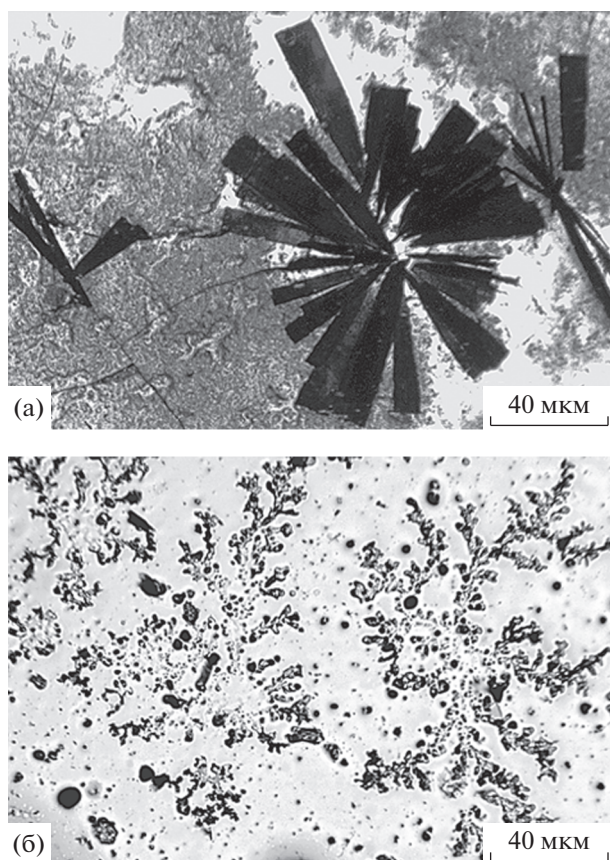
### ВВЕДЕНИЕ

Современные методы исследований в микробиологии и медицине представлены, как правило, оптической микроскопией (ультрафиолетовой, инфракрасной, люминесцентной, фазово-контрастной) и просвечивающей электронной микроскопией, изучающей тонкие срезы образцов различной химической природы. Растровая электронная микроскопия (РЭМ) нашла применение в исследованиях поверхности биопленок, тканей, морфологии и структуры микроорганизмов [1–3]. В последние годы появилось значительное количество публикаций, посвященных кристалломорфологическому методу исследования биологических жидкостей живых организмов. Как известно, такие жидкости являются многокомпонентными растворами, их физические и химические характеристики претерпевают изменения при патологических процессах. Кристаллографические методы исследования биологических субстратов организма человека представляют собой в настоящее время динамичную отрасль медицинских знаний, способную дать значительную информацию как для теоретических наук (физиологии, морфологии, микробиологии и других), так и для клинических дисциплин [4–7]. Учеными Тверского государственного университета разработана серия методов

кристалломорфологической диагностики ряда заболеваний. Сущность методов состоит в введении в одну из биологических жидкостей организма диагностического вещества — нингидрина (трикетогидринденгидрата), активно реагирующего на малейшие изменения в биологических жидкостях, а также образующего сложные формы кристаллов: вискеры, дендриты, сферолиты. Исходя из кристаллографических характеристик, получаемых гранных форм и аморфных образований удалось создать систему, позволяющую дополнять и ставить диагнозы заболеваний [8–10].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

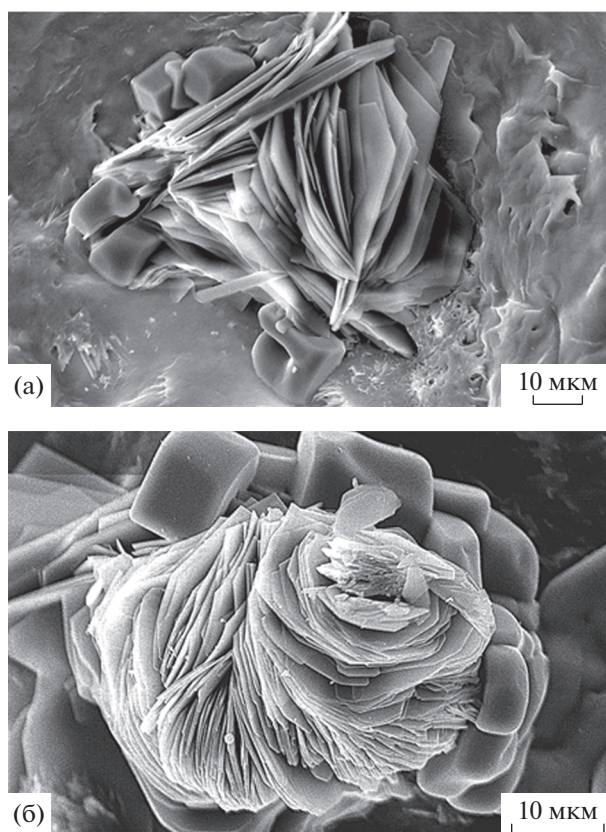
В настоящей работе проведен электронно-микроскопический анализ кристалломорфологических картин основных органических компонентов операционной желчи с добавлением диагностического вещества нингидрина. Микроморфологические исследования желчи проводили с использованием растрового электронного микроскопа JEOL 6610 LV с системой рентгеновского энергодисперсионного микроанализа Oxford INCA Energy 350. РЭМ обладает рядом преимуществ по сравнению с традиционной световой микроскопией: большая глубина фокуса при высоком разрешении, быстрое формирование изображения, широкий диапазон увеличений, возможность



**Рис. 1.** Оптическое изображение: а – кристаллических сферолитов; б – дендритов.

рентгеноспектрального (элементного) анализа. Использование новых методик, таких как лантаноидное контрастирование, позволяет расширить возможности РЭМ в микробиологии и медицине.

Объектом исследования были образцы операционной желчи, к которым добавляли спиртовой раствор нингидрина (кристаллообразующее вещество), смесь готовили в чашках Петри при температуре 18–20°C. Картины кристаллизации исследовали с помощью биологического микроскопа Levenhuk 720В и электронного микроскопа JEOL 6610 LV в режиме регистрации вторичных электронов. На рис. 1а представлены изображения кристаллических сферолитов с лучами разного размера (желчь с повышенным количеством желчного пигмента – билирубина), на рис. 1б – сложные кристаллические формы – дендриты (желчь пациента, перенесшего гепатит А), полученные методом светлопольной оптической микроскопии. Строение камней, образующихся в желчи, значительно зависит от их состава. Чисто холестериновые камни имеют круглую или овальную форму, их диаметр от 4–5 до 12–15 мм,



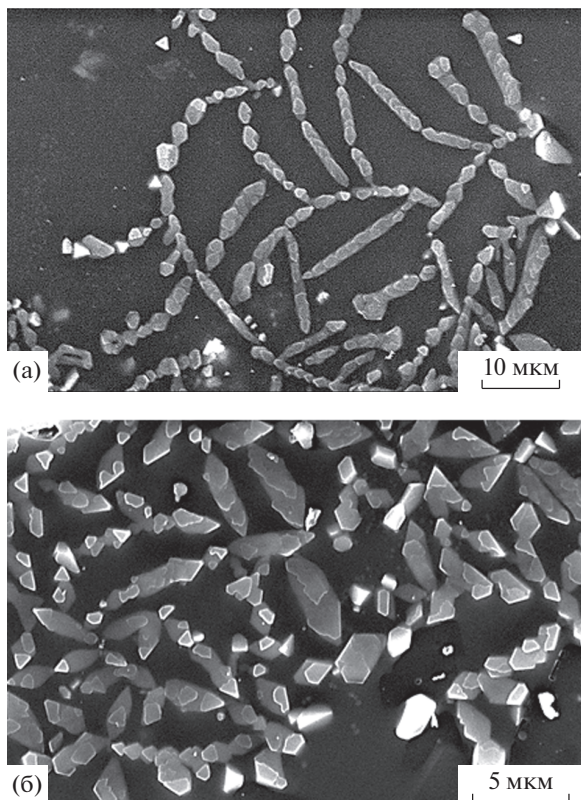
**Рис. 2.** РЭМ-изображения пластинчатых кристаллов холестерина в окружении монокристаллов хлористого натрия, полученные при разном увеличении.

локализуются почти всегда в желчном пузыре. Кристаллы холестерина часто обнаруживаются в желчи здоровых людей, но большое количество таких образований указывает на высокий риск образования желчных камней.

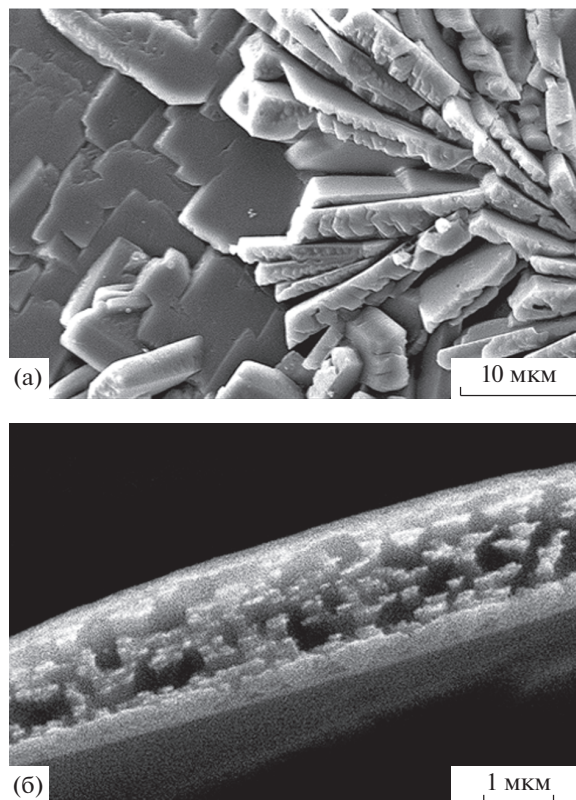
Кристалломорфологическая картина исследуемой жидкости пациента, не страдающего желчнокаменной болезнью, представлена многочисленными кубическими кристаллами хлористого натрия размером от 1 до 15 мкм (анализ желчи показал повышенное содержание NaCl) и тонкими ромбическими кристаллами моногидрата холестерина в значительном количестве, что с медицинской точки зрения указывает на потерю коллоидальной стабильности желчи. На рис. 2 представлены тонкие пластинчатые кристаллы моногидрата холестерина в окружении кубических кристаллов хлористого натрия. Кристаллы моногидрата холестерина на начальной стадии кристаллизации имеют форму тонких ромбов размером 1–5 мкм, затем образуются агрегаты пластинчатых кристаллов (рис. 3).

Преимущественно холестериновые камни имеют слоистую структуру или состоят из пигменти-





**Рис. 3.** РЭМ-изображения скоплений ромбовидных холестериновых кристаллов, образующих сложный узор, полученные при разном увеличении.

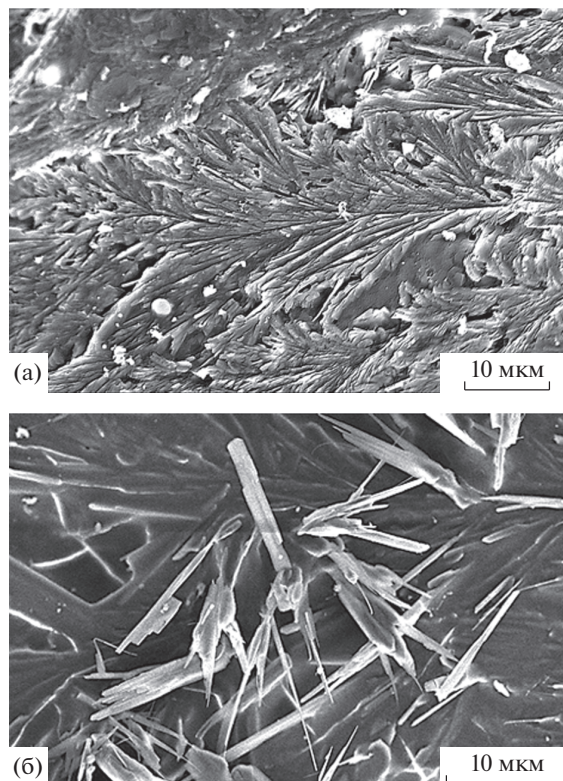


**Рис. 4.** РЭМ-изображение: а – слоистой структуры холестериновых кристаллов; б – зубцевого среза холестериновой пластины.

рованной центральной части, окруженной тонким слоем холестерина. Методом РЭМ хорошо выявляется структура холестериновых камней (рис. 4). На срезе видны нерегулярные зубцеватые структуры. Часто слоистость связана с наложением кальцинатов, что присуще как холестериновым, так и известковым и пигментным камням. Структура мелких пигментных желчных камней визуализируется как однородная и гомогенная в оптическом микроскопе, слоистое строение этих камней часто можно выявить только с помощью электронной микроскопии.

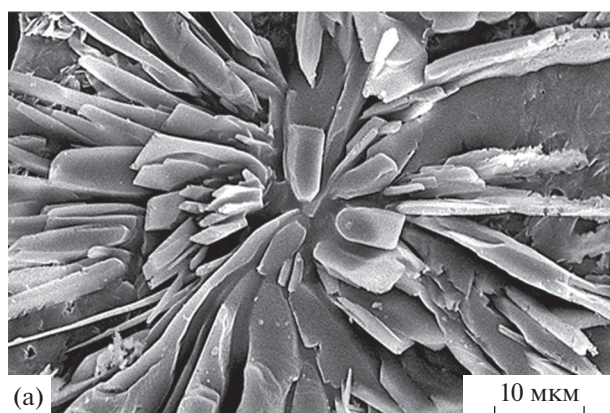
Практически все образцы желчи с различными патологиями (воспалительные процессы, содержание камней всех видов) склонны к образованию кристаллических скелетных форм – дендритов. На рис. 5а представлены папоротникообразные дендриты солей желчи, которая содержит, как правило, сложные холестерино-пигментно-известковые камни. Тонкие игольчатые кристаллы жирных кислот, иногда сгруппированные в пучки, также свидетельствуют о воспалительных процессах в желчном пузыре (рис. 5б).

На рис. 6 изображены при разных увеличениях сферолитоподобные формы кристаллов карбона-

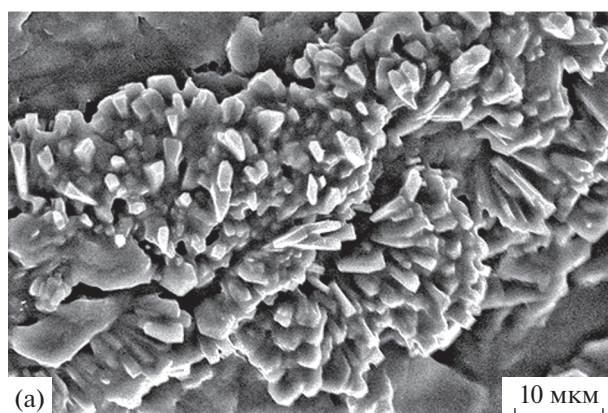


**Рис. 5.** РЭМ-изображение: а – папоротникообразных дендритов солей желчи; б – игольчатых кристаллов жирных кислот.

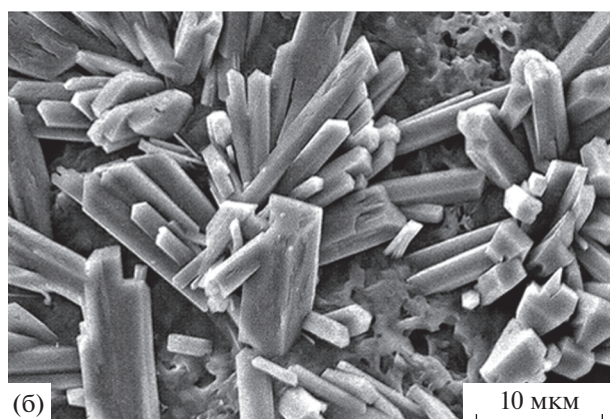




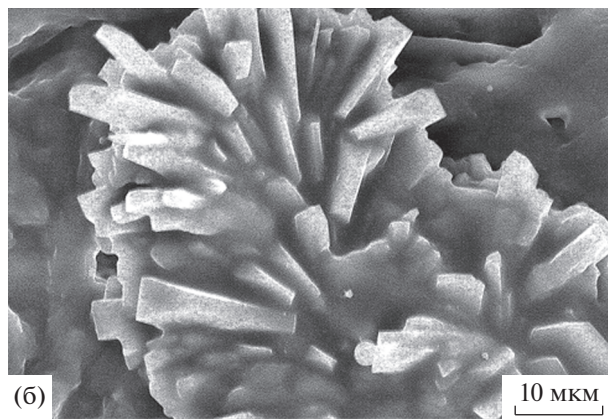
(a)



(a)



(б)



(б)

**Рис. 6.** РЭМ-изображения сферолитоподобных форм кристаллов карбоната кальция, образованных в желчи, полученные при разном увеличении.

**Рис. 7.** РЭМ-изображения кристаллических агрегатов желчи, полученные при разном увеличении.

та кальция, который может находиться в желчи в различных полиморфных модификациях: арагонита, ватерита и кальцита, что способствует образованию известковых камней. Данные биохимического анализа желчи (содержание холестерина, билирубина, кальциатов) хорошо дополняются результатами энергодисперсионного анализа, установлены примеси в исследуемой желчи, в одной из проб отмечается повышенное содержание кальция, магния, кремния, калия, железа и алюминия, обусловленное наличием сложных холестерин-пигментно-известковых камней.

Кристалломорфологическая картина желчи со сложными и пигментными камнями часто представлена кристаллическими агрегатами, примеси известковых солей здесь незначительны (рис. 7). Методом энергодисперсионного анализа исследован состав кристаллов желчи, содержащей известковые, холестериновые, пигментные и сложные комбинированные камни. Установлено, что желчь, кристаллизующаяся в форме сферолитов и кристаллических агрегатов, характеризуется повышенным содержанием кальция. Желчь,

склонная к образованию холестериновых кристаллических пластин, содержит меньшее количество кальция.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В последние десятилетия активно развивается междисциплинарная интеграция, сближение научной и практической медицины, естественных наук физико-математического цикла и современных научно-технических методов исследования. Использование оптической и электронной микроскопии при изучении основных особенностей патогенного кристаллообразования в биологических жидкостях человека (слюне, ликворе, плазме, моче, желчи, слезной жидкости) дает хорошие результаты и может служить методом экспресс-анализа в ряде случаев. Электронно-микроскопическое исследование картин кристаллизованной желчи информативно. Оно позволяет выявлять тонкую структуру разнообразных кристаллических форм, предоставляет дополнительные сведения об особенностях кристаллизации в биологических жидкостях, что может быть полезно

для понимания природы патологических процессов в живом организме.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Миронов А.А., Комисарчик Я.Ю., Миронов В.А.* Методы электронной микроскопии в биологии и медицине. СПб.: Наука, 1994. 400 с.
2. *Андошкин А.И., Сапожников С.П., Карпунина А.В.* // Вестн. ЧГУ. 2013. № 3. С. 355.
3. *Франк В.Д., Глики А.Э., Котельникова Е.Н. и др.* // Записки Рос. минералог. общ-ва. 2008. № 5. С. 88.
4. *Курбатова Л.А., Петрова М.Б., Павлова Н.В., Шестакова В.Г.* // Естествознание и гуманизм. 2006. № 3. С. 47.
5. *Каликитейн Д.Б., Мороз Л.А., Квитко Н.Н. и др.* // Клиническая медицина. 1990. № 4. С. 28.
6. *Максимов С.А.* // Бюл. сибирской медицины. 2007. № 14. С. 80.
7. Патент 2197728 (РФ). Способ диагностики обострения хронического холецистита / НГМА, СФТИ. *Потехина Ю.П., Страхов А.В., Потехин П.П. и др.* // 2003.
8. *Смирнов Ю.М., Курбатова Л.А.* // Вестн. ТвГУ. Сер. Физика. 2009. № 3. С. 35.
9. Патент 2542498 (РФ). Кристалломорфологический способ диагностики опухолевых заболеваний почек. / ТГУ. *Никулина М.И., Курбатова Л.А., Смирнов Ю.М.* // 2015.
10. Патент 2623077 (РФ). Кристалломорфологический способ диагностики и профилактики опухолевых заболеваний / ТГУ. *Никулина М.И., Смирнов Ю.М.* // 2017.

## Electron Microscopic Analysis of Crystallomorphological Pictures in Biological Liquids

A. I. Ivanova<sup>1,\*</sup>, L. A. Kurbatova<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Tver State University, Tver, 170100 Russia

<sup>2</sup>Tver State Medical University, Tver, 170100 Russia

\*e-mail alex.ivanova33@yandex.ru

The results of micromorphological studies of the crystallization of organic components of the surgical bile are presented. As a crystal-forming substance, an alcohol solution of ninhydrin is used. The crystal morphological analysis of the obtained patterns is investigated by the method of scanning electron microscopy.

**Keywords:** scanning electron microscopy, crystallization, dendrites, spherulites, crystal aggregates.