

Применение электронной микроскопии для исследования разрушения желчных камней с помощью камнелизатов

Г.Г. Устинов¹, В.В. Поляков^{2,3}

¹ Алтайский государственный медицинский университет (Барнаул, Россия)

² Алтайский государственный университет (Барнаул, Россия)

³ Институт физики прочности и материаловедения СО РАН (Томск, Россия)

Electron Microscopy Research of Gallstone Destruction with a Solvent

G.G. Ustinov¹, V.V. Polyakov^{2,3}

¹ Altai State Medical University (Barnaul, Russia)

² Altai State University (Barnaul, Russia)

³ Institute of Strength Physics and Materials Science of the Siberian Branch of the RAS (Tomsk, Russia)

Исследуются структурные механизмы разрушения желчных камней под воздействием различных растворителей. В качестве метода, используемого для анализа изменений микроструктуры желчного камня при внешнем воздействии, используется электронная сканирующая микроскопия. Разработана методика такого исследования, заключающаяся в подготовке шлифов и последующего анализа влияния растворителя на структурные области шлифа. Эти области существенно различаются по фазовому и элементному составу как для камней разных видов, так и для различных участков камня в силу неоднородности строения и различных условий возникновения и роста.

В качестве растворителей желчных камней применялись следующие вещества: хлороформ, диэтиловый эфир, эвкалиптовое масло, метилтетрбутиловый эфир и этиловый спирт. Изучено влияние этих растворителей на наиболее распространенные группы желчных камней, а именно на холестериновые и смешанные камни, в структуре которых присутствуют как кристаллические, так и аморфные области.

Показано, что механизм разрушения различен для разных структурных элементов желчных камней. Используемые растворители характеризуются существенными различиями в механизмах воздействия на камень. Так, диэтиловый эфир растворяет в основном кристаллический холестерин; эвкалиптовое масло и этиловый спирт растворяют прежде всего аморфную компоненту желчного камня.

Полученные результаты могут быть применены при разработке новых эффективных методов безоперационного разрушения желчных камней. Они также могут быть использованы при прогнозировании результатов воздействия растворителем на конкретные желчные камни.

This paper deals with structural mechanisms of gallstone destruction influenced by different solvents. Changes in microstructure of gallstones under external influence are investigated with scanning electron microscopy. The proposed technique includes preparation of thin sections and further analysis of solvent effects on several structural areas of the section. These areas differ substantially in phase and elemental composition for different types of gallstones and different sections of gallstones due to structural heterogeneity and different conditions of gallstones formation and growth.

The following substances are used as solvents for gallstones: chloroform, diethyl ether, eucalyptus oil, methyltetra-butyl ether, and ethanol. The effect of these solvents on the most common types of gallstones, i.e. cholesterol and mixed type gallstones with crystalline and amorphous areas in their structures, is investigated.

It is shown that the destruction mechanism is different for different structural elements of gallstones. The solvents used in this study have differences in the mechanisms of dissolution. Namely, diethyl ether generally dissolves crystalline cholesterol while eucalyptus oil and ethanol dissolve an amorphous component of gallstones.

Obtained results can be utilized for further development of new and prospective non-surgical methods of gallstone destruction. They can also be used to predict the results of specific solvent effects on particular gallstones.

Ключевые слова: желчные камни, электронная сканирующая микроскопия, химический состав, разрушение.

DOI 10.14258/izvasu(2016)1-13

Введение. Для создания эффективного метода безоперационного разрушения желчных камней необходимо выявление механизмов их разрушения под воздействием растворителя (камнелизата) [1, 2]. Эффективным методом, позволяющим изучить закономерности и особенности такого разрушения на микро- и мезоуровнях, является электронная микроскопия [3, 4]. В данной работе с ее помощью проводится исследование механизмов разрушения желчных камней под влиянием различных растворителей.

Желчные камни имеют сложное строение и состоят из различных структурных элементов. Строение камней при их возникновении и росте определяется метаболическими и биохимическими процессами [5, 6]. Обычно в структуре камня выделяют оболочку, среднюю часть камня и его ядро, которые содержат различные по форме кристаллы холестерина. Для камней с наиболее распространенным химическим составом — холестериновых и смешанных — во внешней оболочке располагается аморфно-слоистый холестерин, промежуточная часть представлена пластинчатыми и призматическими формами холестерина, в ядре и прилежащих к нему участках находятся игольчатые кристаллы холестерина. Различия в степени кристалличности смежных слоев указывает на процесс перекристаллизации отлагающегося холестерина в период формирования одного сложного слоя или сближения слоев [7, 8]. Установлено также, что в различных видах камней между кристаллами и слоями в желчном камне может быть связующее аморфное пигментное вещество, при этом в чисто холестериновых камнях аморфное вещество располагается только между слоями и отсутствует между кристаллами, а в смешанных и холестериновых желчных камнях, содержащих более 70% холестерина, аморфное вещество находится как между кристаллами холестерина, так и между слоями [9, 10]. В камнях обнаруживается незначительное количество белка [11–12]. Наряду с основными составными частями желчных камней — углерода, кислорода, водорода — в них обнаруживаются и микроэлементы: медь, железо, цинк, кремний, свинец, титан, никель и др. [13–16]. Принципиальное значение имеет то обстоятельство, что отделы камня — ядро, промежуточная часть, оболочка — имеют свои особенности по фазовому и элементному составу. Все эти факторы, наряду с конкретным методом воздействия на камни [16], определяют протекание процесса растворения камня.

Key words: gallstones, scanning electron microscopy, chemical composition, destruction.

Экспериментальный метод. Для исследования структуры желчных камней применялись различные методы, из них наиболее распространенным является рентгеноструктурный анализ [17]. В то же время этот метод неприменим для идентификации аморфных веществ, содержание которых в пигментных желчных камнях может быть весьма значительным. Для исследования структуры и состава органоминеральных агрегатов достаточно успешно использовались и другие физические методы (инфракрасная спектроскопия, лазерная масс-спектрометрия, ядерный магнитный резонанс, атомно-силовая микроскопия) [18–21], однако их применение в задаче разрушения желчных камней представляется весьма затруднительным. Эти обстоятельства обуславливают выбор электронной микроскопии в качестве основного метода для изучения растворения желчных камней.

В данной работе для электронно-микроскопического исследования была использована коррозионная методика, основанная на нанесении конкретного растворителя на шлиф камня. Шлифы желчных камней получали по методике, сущность которой состоит в том, что сегмент желчного камня помещали в эпоксидную смолу, после затвердевания его шлифовали и полировали. Типичный вид шлифов желчных камней приведен на рисунке 1. Со шлифов изготавливали угольно-платиновые реплики, которые исследовали на электронном сканирующем микроскопе TESLA BS300 под увеличением от 500 до 2000 крат [22]. В качестве растворителей применялись хлороформ, диэтиловый эфир, эвкалиптовое масло, метилтетрабутиловый эфир и 96° этиловый спирт [23, 24]. Время воздействия составляло 30 минут. Для корректного сопоставления результатов растворения желчные камни были разбиты на группы по химическому составу, внутри группы они были подобраны одинаковыми по структуре, массе и размеру (под размером при этом понималось среднее значение наибольшего и наименьшего диаметров камня).

Особенности разрушения желчных камней.

Воздействие хлороформа. В результате исследования было установлено, что под действием хлороформа на шлифе холестеринового желчного камня диаметром до 10 мм растворялись как кристаллы холестерина, так и аморфное вещество. При этом на поверхности шлифа образовывались глыбки, которые затем подвергались дальнейшему растворению. Кристаллы солей кальция не растворялись, а фрагментировались (рис. 2). На шлифах конкрементов диаметром

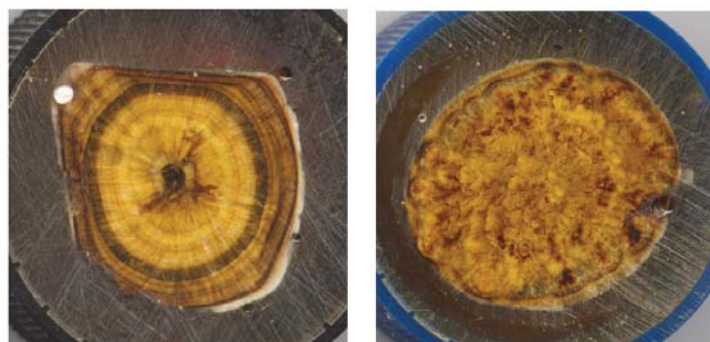


Рис. 1. Вид шлифов желчных камней

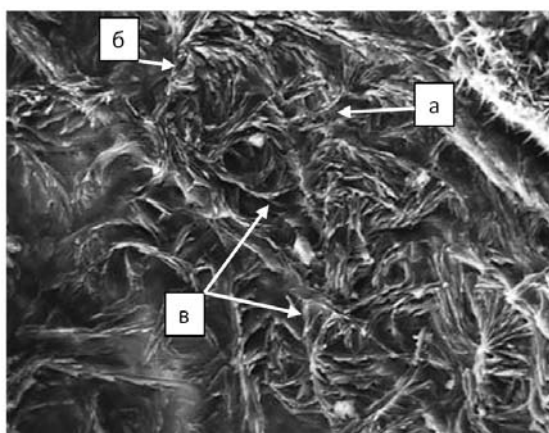


Рис. 2. Электронная микрофотография шлифа холестеринного камня после воздействия хлороформом; $\times 500$: а — аморфное вещество, б — кристаллы холестерина, в — кристаллы солей кальция

свыше 15 мм участки растворения были отмечены только в оболочке и частично — в ядре камня.

Воздействие диэтилового эфира. Действие диэтилового эфира на шлиф холестеринного камня было направлено на растворение кристаллической части

камня. Значительно быстрее растворялись аморфный холестерин и пластинчатые кристаллы холестерина, которые в большом количестве содержались в мелких конкрементах и оболочке камня. Следует отметить, что полностью оболочка камня растворялась медленно вследствие большего слоя аморфного вещества, которое, по всей вероятности, в целом камне затрудняет проникновение эфира к кристаллам холестерина. В ядре и промежуточной части камня более организованные кристаллы холестерина растворялись более медленно. Под действием эфира призматические кристаллы становились истонченными, края их в одних наблюдениях сглаживались, в других — заострялись и приобретали вид шипов (рис. 3).

Воздействие эвкалиптового масла. Под воздействием эвкалиптового масла шло растворение аморфной части камня. Растворение его в оболочке и промежуточных частях было равномерным. Ядро из-за пористости своего строения растворялось интенсивнее, чем оболочка. В кристаллах холестерина отмечены только начальные этапы растворения, при этом пластинчатые и призматические кристаллы приобретали неправильную форму. Аморфное вещество между кристаллами исчезало, поверхность приобретала как бы эрозированный вид (рис. 4).

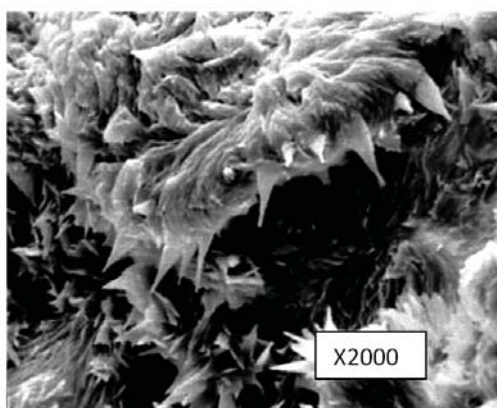
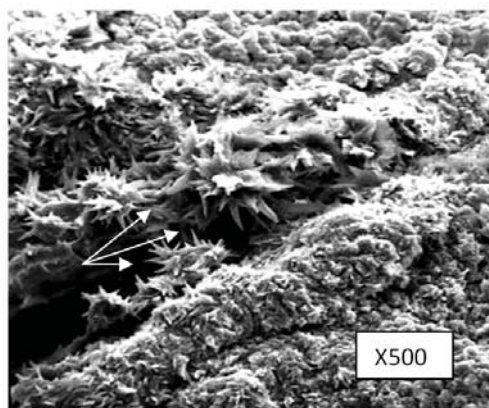


Рис. 3. Электронная микрофотография шлифа холестеринного камня после воздействия диэтиловым эфиром. Стрелками отмечены игольчатые кристаллы холестерина

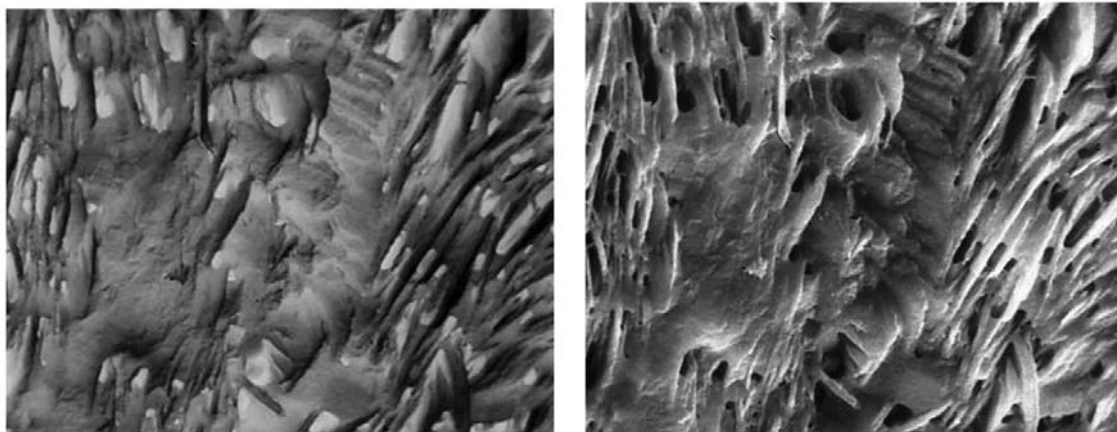


Рис. 4. Электронная микрофотография шлифа холестеринного камня после воздействия эвкалиптовым маслом; x500

Воздействие метилтертбутилового эфира. Метилтертбутиловый эфир на разломе камня растворял аморфное цементирующее вещество (рис. 5). Кристаллы холестерина не изменяли своей формы и на разломе выглядели ориентированно сложенными, на отдельных участках лежали свободно. При исследовании этого же шлифа через 90 минут установлено, что растворению подвергаются и кристаллы холестерина. Это означало, что первоначально растворялось аморфное вещество, связывающее кристаллы холестерина, после чего связь между кристаллами становилась непрочной, они распадались и, уже находясь в свободном состоянии, подвергались дальнейшему растворению.

Воздействие этилового спирта. Слабым лизирующим действием на разлом камня обладал этиловый спирт. Под действием спирта ядро и промежуточная часть камня становились рыхлыми. Более отчетливо проявлялись кристаллы холестерина, контуры их ста-

новились неровными, сглаженными, поверхность камня напоминала лист папоротника (рис. 6).

Заключение. Мы установили, что камнелизат по-разному влияет на различные структурные элементы желчного камня. Вид конкретного растворителя также оказывает весьма значительное влияние на доминирующий механизм растворения, а именно, диэтиловый эфир растворяет преимущественно кристаллы холестерина. Влияние эвкалиптового масла и этилового спирта направлено в основном на аморфное вещество камня. Хлороформ и метилтетрбутиловый эфир являются соединениями, лизирующими как аморфное, так и кристаллическое вещество камней.

Полученные данные могут быть использованы для оптимального подбора камнелизатов, наиболее эффективно разрушающих желчные камни. Эти сведения могут быть также применены для прогнозирования результатов такого воздействия на конкретные камни.

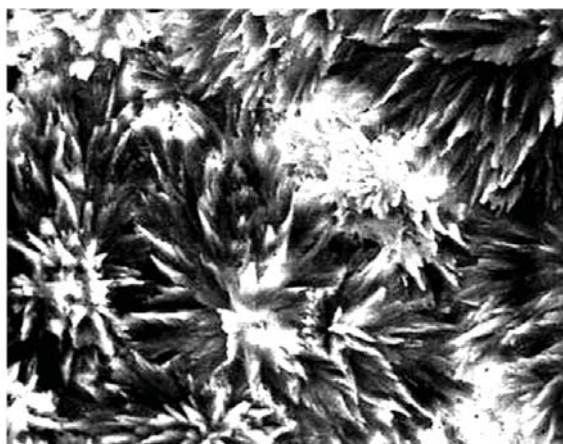


Рис. 5. Электронная микрофотография шлифа холестеринного камня после воздействия метилтертбутиловым эфиром; x500

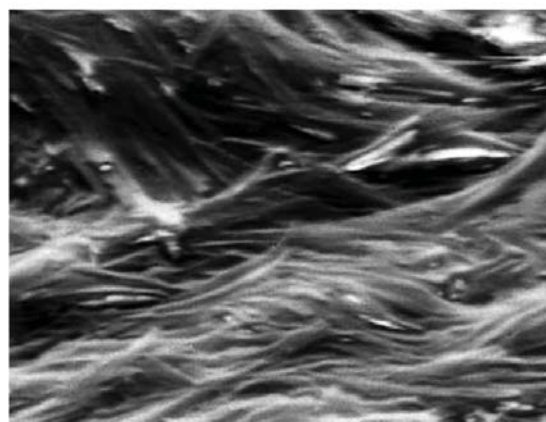


Рис. 6. Электронная микрофотография шлифа холестеринного камня после воздействия этиловым спиртом; x500

Библиографический список

1. Поляков В.В., Устинов Г.Г., Титаренко Н.А. Исследование прочностных свойств желчных камней // Медицинская физика. — 2001. — № 11.
2. Устинов Г.Г., Поляков В.В. Структура и физико-механические свойства желчных камней : монография. — Барнаул, 2014.
3. Криштал М. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ. — М., 2009.
4. Глезер А.М. Сканирующая электронная микроскопия и рентгеноспектральный микроанализ. — М., 2010.
5. Dyck P., Hoda F.; Osmer E.S.; Green R.M. Microarray analysis of hepatic gene expression in gallstone-susceptible and gallstone-resistant mice // Mammalian Genome. — 2003. — V. 14, № 9.
6. He J. Nishida S., Xu M., Makishima M., Xie W. Prevents Cholesterol Gallstone Disease by Regulating Biosynthesis and Transport of Bile Salts // Gastroenterology. — 2011. — V. 140. № 7.
7. Kodaka T., Sano T., Nakagawa K., Kakino J., Mori R. Structural and analytical comparison of gallbladder stones collected from a single patient: studies of five cases // Microscopy Services Laboratory. — 2004. — V. 37. — № 2.
8. Поляков В.В., Петрухно Е.В., Устинов Г.Г. Применение многомерного анализа данных к исследованию физико-механических характеристик биоминеральных образований // Биомедицинская радиоэлектроника. — 2011. — № 12.
9. Qiao T., Ma R.H., Luo X.B., Luo Z.L., Zheng P.M., Yang L.Q. A microstructural study of gallbladder stones using scanning electron microscopy // Microscopy_Research_and_Technique. — 2013. — V. 76. — № 5.
10. Поляков В.В., Неймарк А.И., Устинов Г.Г., Петрухно Е.В. Исследование элементного состава различных видов биоминеральных образований в организме человека // Известия Алтайского гос. ун-та. — 2010. — № 1.
11. Liu G., Xing D., Yang H.M., Wu J. Study of the insoluble remainder of human gallstones by scanning electron microscope and Fourier transform infrared spectrum Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi. — 2002. — V. 22, № 4.
12. Sossé Djessou P., Aké Mondé A., Tiahou G., Koffi G., Cissé Camara M., et al. Gallstone biochemical characteristics using Fourier transform infrared spectroscopy method // Ann Biol Clin Paris. — 2010. — V. 68, № 1.
13. Elsiddig K.E. Mohamed Mahmoud Hafiz, Aamir Abdullahi Hamza, Mohammed H.F. Shalayel, Saadeldin Ahmed Idris Minerals composition of different types of gallstones in Sudanese population // American Journal of Analytical Chemistry. — 2014. — № 1 (1).
14. Kamal Elzaki Elsiddig, Mohamed Mahmoud Hafiz, Aamir Abdullahi Hamza, Mohammed H.F., Shalayel Saadeldin Ahmed Idris. Minerals composition of different types of gallstones in Sudanese population // American Journal of Analytical Chemistry. — 2014. — V. 1, № 1.
15. Suo T., Peng P., Feng M., Liu H., Ai Z., Tong S., Yang X., Qin X. Fixed-point and stratified analysis of the fine structure and composition of five gallstones with Fourier transform infrared (FT-IR) specular reflection spectroscopy // Microsc Res Tech. — 2012. — V. 75, № 3.
16. Устинов Г.Г., Поляков В.В., Рудер Д.Д., Шарак А.В. Использование ультразвука как катализатора при контактном растворении желчных камней // Известия Алтайского гос. ун-та. — 1998. — № 1.
17. Alatise O.I., Eusebius I. Obiajunwa, Oladejo O. Lawal, Abdurashheed R.K. Adesunkanmi. Particle-Induced X-ray Emission (PIXE) Analysis of Minor and Trace Elements in Gallstones of Nigerian Patients // Biological Trace Element Research. — 2010. — V. 134, № 1.
18. Ryan E.S., Amanuel Z.Z., Jennifer A.S. An in situ Atomic Force Microscopy Study of Uric Acid Crystal Growth // Phys. Chem. B. — 2005. — V. 109.
19. Raman R.G., Selvaraju R., Thirupathi G., Valliappan R. Epidemiological Study of Gallstone in Cuddalore District // Int. J. Pharm Tech Res. — 2010. — V. 2, № 2.
20. Yoo E.H., Oh H.J., Lee S.Y. Gallstone analysis using Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR) // Clin Chem Lab Med. — 2008. — V. 46, № 3.
21. Singh V.K., Singh V.R., Awadhesh K., Thakur S.N., Rai P.K., Singh J.P. Quantitative analysis of gallstones using laser-induced breakdown spectroscopy // Applied Optics. — 2008. — V. 47, № 31.
22. Поляков В.В., Устинов Г.Г., Петрухно Е.В. Исследование элементного состава и структуры желчных камней с помощью растровой электронной микроскопии // Медицинская физика. — 2010. — № 4.
23. Allen M.J., Borody T.J., Bugliosi T.F. et al. Rapid dissolution of gallstones by methyl- tert-butyl ether // The New England Journal of Medicine. — 1985. — V. 312.
24. Griffith S.L., Burney B.T., Fry F.J., Franklin T.D. Experimental gallstone dissolution with methyl-tert-butyl ether (MTBE) and transcutaneous ultrasound energy // Investigative Radiology. — 1990. — V. 25.