

## МИКРОЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ И УЛЬТРАСТРУКТУРА ЖЕЛЧНЫХ КАМНЕЙ РАЗНОГО ТИПА

Асланов А.М.<sup>1</sup>, Яловега Г.Э.<sup>2</sup>, Колмакова Т.С.<sup>1</sup>, Бржезинская М.М.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Ростовский государственный медицинский университет, <sup>1</sup>Кафедра медицинской биологии и генетики Россия, 344022, г. Ростов-на-Дону, пер. Нахичеванский 29, e-mail: aslanov.a@bk.ru

<sup>2</sup>Южный федеральный университет, физический факультет, Россия, 344090, г. Ростов-на-Дону, ул. Зорге, 5

<sup>3</sup>Берлинский Центр материалов и энергии имени Гельмгольца, Берлин, Германия

В статье проведен анализ особенностей ультраструктурного строения и микроэлементного состава желчных камней в зависимости от их типа. Были исследованы 40 образцов камней, полученных после холецистэктомии у больных желчнокаменной болезнью: 17 (42,5%) камней - гомогенные холестериновые, 17 (42,5%) - смешанные и 6 (15%) - пигментного (билирубинового) типа. Микроэлементный состав камней был исследован методом рентгенофлуоресцентного анализа, ультраструктурное строение - методом сканирующей электронной микроскопии. В элементный состав желчных камней всех типов входят микроэлементы Mn, Fe, Ni, Cu, Zn. В качестве вариативных элементов выступают Bi, Br, As, Cr, что может быть следствием проводимого лечения пациентов или среды обитания. Содержание микроэлементов в ядре и поверхностных слоях желчных камней зависит от типа камня.

Ключевые слова: желчные камни; микроэлементный состав; ультраструктурное строение; сканирующая электронная спектроскопия, рентгенофлуоресцентный анализ.

## MICROELEMENT STRUCTURE AND ULTRASTRUCTURE GALLSTONES DIFFERENT TYPE

Aslanov A.M.<sup>1</sup>, Yalovega G.E.<sup>2</sup>, Kolmakova T.S.<sup>1</sup>, Brzhezinskaya M.M.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Rostov state medical university Chair of medical biology and genetics, 29 Nakhichevan st., Rostov-on-Don, 344022, Russia, e-mail: aslanov.a@bk.ru

<sup>2</sup>Southern Federal University, Department of physics, 5 Zorge st., Rostov-on-Don, 344090, Russia

<sup>3</sup>Helmholtz-Zentrum Berlin für Materialien und Energie, Berlin 12489, Germany

The article analyzes the ultrastructural features of the structure and microelement composition of gallstones, depending on their type. Were examined 40 samples of stones obtained after cholecystectomy in patients with cholelithiasis: 17 (42,5%) stones - homogeneous cholesterol, 17 (42,5%) - mixed and 6 (15%) - the pigment (bilirubin) type. Trace element composition of the stones was studied by X-ray fluorescence spectroscopy, ultrastructural structure - by scanning electron microscopy. In the elemental composition of all types of gallstones micronutrients include Mn, Fe, Ni, Cu, Zn. As an act of variant elements Bi, Br, As, Cr, that can be a consequence of the treatment of patients or the environment. The content of trace elements in the core and surface layers gallstones depends on the type of stone.

Keywords: gall stones; microelement composition; ultrastructure morphology; scanning electron microscopy, X-Ray fluorescence.

В последние годы в клинической диагностике, благодаря работам российских ученых Шатохиной С.Н. и Шабалина В.Н., создано новое направление - морфология биологических жидкостей и зоолитов, основанное на структуропостроении сложных многокомпонентных систем, способных к саморегуляции [4; 6]. Морфологическая картина биологических жидкостей и зоолитов, например желчи и желчных камней, мочи и нефролитов, характеризует молекулярный уровень организации процессов, а следовательно, может нести диагностическую информацию, с помощью которой можно установить связь между особенностями патологического процесса и морфологическими изменениями в клетках того или иного органа, а также дальнейшее клиническое течение заболевания [5]. Исследователями

установлено, что при фазовом переходе биологической жидкости из неупорядоченного жидкого состояния в твердое (например, кристаллизация жидкости при высыхании) образуется определенный статический порядок, который доступен для наблюдения [2; 3]. Образование структур твердой фазы биологических жидкостей обусловлено волновыми концентрационными взаимодействиями в системе «вода - минеральные вещества - органические соединения» [3]. Например, установлен феномен патологической кристаллизации солей в белковой среде мочи больных уролитиазом, лежащий в основе процесса камнеобразования в мочевыводящих путях [6]. Это было доказано на основе длительных клинических наблюдений, рентгеноспектрального микроанализа, позволяющего определить вид камнеобразующих солей.

Исследования в этом направлении изучения желчи и желчных камней малочисленны [1]. Изучение минерального состава желчных камней ориентировано, главным образом, на кальций и фосфор - основу камней биогенного происхождения [1]. Между тем микроэлементный состав желчных камней (в частности железа, цинка, меди, марганца и т.д.) наиболее подробно изучен в связи с экологическими особенностями места проживания больных. Роль этих микроэлементов в камнеобразовании и формировании тяжести течения желчнокаменной болезни не изучена, что представляет интерес в плане перспективы к поиску альтернативного подхода лечения ЖКБ. В связи с этим исследования разнообразия микроэлементного состава желчных камней в зависимости от их морфологической характеристики актуальны и интересны.

Целью данной работы является анализ особенностей ультраструктурного строения и микроэлементного состава желчных камней в зависимости от их морфологических характеристик.

#### **Материалы и методы исследования**

В работе были исследованы 40 образцов камней (10 у лиц мужского пола и 30 женского), полученные при холецистэктомии пациентов с хроническим калькулезным холециститом, проведенной в хирургическом отделении РостГМУ в 2013-2014 гг. Возраст больных был старше 50 лет и в среднем составил  $60,2 \pm 2,4$  года. По морфологическим характеристикам, 30 (37,5%) камней относились к гомогенным холестериновым, 40 (50%) – к смешанным и 10 (12,5%) – к камням пигментного или билирубинового типа. Все камни были сгруппированы по морфологическим характеристикам в 8 групп (табл. 1).

Морфология поверхности и внутренних зон камней исследована методом сканирующей электронной микроскопии на микроскопе LEO 1560 Института нанометровой оптики и технологии (Берлинский центр материалов и энергии имени Гельмгольца). Микроэлементный статус образцов был определен методом рентгенофлуоресцентного анализа. Спектры рентгеновской флуоресценции были зарегистрированы на линии КМС-2,

источника синхротронного излучения Bessy (II) (Берлин, Германия). Для определения элементного состава образцов были зарегистрированы обзорные спектры с экспозицией в 10 сек. Измерения проведены в диапазоне энергии ионизации от 1 до 12 кэВ, что соответствует диапазону определяемых элементов от Na до Br. С использованием программного кода Winshell (Max) была проведена идентификация K $\alpha$ -характеристических линий исследуемых образцов.

### Результаты

Результаты исследования показали различия в качественном и количественном микроэлементном составе изучаемых камней. На рисунке 1 представлены обзорные спектры на примере образцов камней, входящих в группы № 1, 6 и 8, полученные методом рентгенофлуоресцентного анализа.

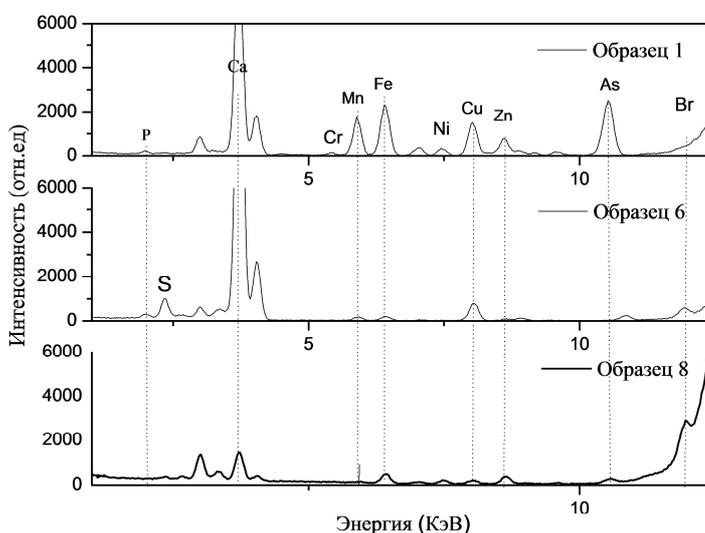


Рис. 1. Обзорные рентгенофлуоресцентные спектры для образцов групп № 1, 6 и 8

На основе проведенных исследований было установлено, что гомогенные холестериновые камни имели приблизительно одинаковый элементный состав, представленный следующими химическими элементами: Ca, Fe, Zn, Cu, Br. Отличительной чертой такого типа камней является полное отсутствие или низкое содержание в их составе фосфора, являющегося составной частью фосфолипидов (лецитина). В связи с этим можно предположить, что при образовании камней имеет место смещение функционального равновесия лецитина и жирных кислот, препятствующих кристаллизации камней. Также с этим фактом связан и цвет холестериновых камней – они имели желтый или белый цвет.

Таблица 1

Микроэлементный состав желчных камней различного типа

№	Элементный состав	Типы камней	Особенности внешнего
---	-------------------	-------------	----------------------

группы			вида
1	P, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, As	Смешанные (n=7)	Крупные, круглые, матовые
2	S, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn, Br	Холестериновые (n=5)	Гомогенные, крупные
3	P, S, Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Br	Смешанные (n=2)	Коричнево-пигментные камни
4	K, Ca, Fe, Cu, Zn	Холестериновые (n=5)	Гомогенные холестериновые камни
5	P, S, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br	Смешанные (n=4)	Ядро - пигментное черное, к периферии коричневые матовые непрозрачные слои
6	P, S, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Bi, Br	Пигментные (n=6)	Черные пигментные крупные, непрозрачные камни
7	P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br	Смешанные (n=4)	Черные пигментные камни
8	Ca, Fe, Zn, As, Br	Холестериновые (n=7)	Гомогенные холестериновые камни

Как известно, лецитин, наряду с желчными кислотами, участвует в образовании мицеллы, препятствуя кристаллизации холестерина. Следовательно, есть основание полагать, что одной из причин образования гомогенных холестериновых камней является нарушение фосфолипидного состава желчи, что, возможно, и является вероятной причиной выпадения холестерина в осадок с образованием ядра желчного камня.

Железо, как активный центр гемоглобина, входит в состав эндогенных пигментов, что объясняет его присутствие в составе холестериновых камней (камни 2,8). Элементы Zn, Cu и Br, определялись лишь на поверхности холестериновых камней, тогда как центральная их часть состоит из чистого холестерина.

Микроэлементный состав смешанных камней более разнообразный. В него входили микроэлементы: P, S, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Br. Отличительной особенностью этих камней по сравнению с холестериновыми является большое содержание в составе фосфора (P), придающего им более темный цвет. За счет высокого содержания билирубина, часто находящегося в виде небольшого ядра в центре изучаемых конкрементов, камни имеют коричневый цвет. Центральное расположение билирубина в камнях данного типа, а также присутствие микроэлементов желчных пигментов указывает на ведущую роль нарушения пигментного обмена в желчи у таких пациентов. Кроме того, в составе всех изучаемых камней установлено присутствие серы (S), марганца (Mn) и железа (Fe) – микроэлементов желчных пигментов, а у одного из больных обнаружено наличие As. Причина накопления в камне мышьяка, как и других микроэлементов (Zn, Cu, Br), может быть обусловлена

кумулятивными свойствами желчи и желчных камней по накоплению веществ, содержащихся в окружающей среде даже в незначительных количествах.

В состав билирубинового (пигментного) типа камней входили P, Ca, Mn, Fe, Cu, Zn, Bi, Br. Отличительным микроэлементом был висмут. Зачатки билирубиновых камней образуются во внутрипеченочных желчных ходах в виде белковой основы, желчных пигментов и незначительной примеси известковых солей, что объясняет присутствие в составе камня элементов Mn, Ca, Fe. Наличие в составе Cu, Zn, Bi, Br может быть связано с нарушением обмена металлсодержащих белков в гепатоцитах. Следует отметить, что во всех образцах этого типа камней присутствует железо, которое, по нашему мнению, имеет гематогенное происхождение.

При анализе изображений камней, полученных сканирующей электронной микроскопией, учитывали морфологию поверхности и композиционный контраст областей затемнения.

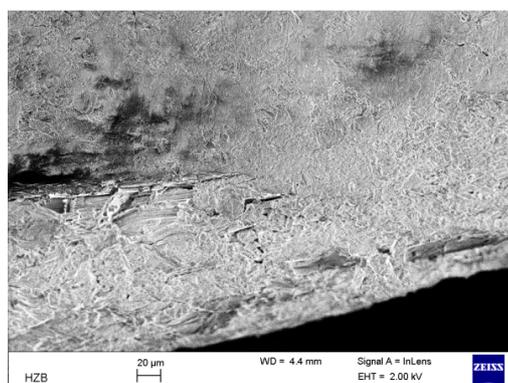
Гомогенные холестериновые камни, образцы групп № 2 и № 4 имели схожее строение: структура этих камней была слоистой; на срезе видны многочисленные нерегулярные зубцеватые структуры, местами напоминающие розетки кристаллов.

На снимке в ядре камня наблюдались многочисленные затемненные области, что свидетельствовало о скоплении в этих областях элементов с малым атомным номером и об отсутствии металлов (рис. 2а). Поскольку более тяжелые химические элементы, регистрируемые детектором обратных рассеянных электронов, выглядят на СЭМ-микрофотографиях в более светлом сером тоне, то можно заключить, что в отличие от внутренней области содержание металлов в поверхностных слоях увеличивается (рис. 2б).

Смешанные камни групп № 3 и № 5 имели сходное строение: структура этих камней слоистая, рыхлая; на срезе слой имеет трещины разного диаметра, в рассматриваемой области наблюдаются ребристые слоистые образования (рис. 3а). На снимке затемненные области присутствуют только в местах образования щелей.



*a*



*б*

Рис. 2. Микрофотографии внутренней части и поверхностных слоев холестериновых камней, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа: 2а – внутренняя область камня № 4, 2б – поверхность камня № 2. Длина масштабной линейки указана в мкм.

В целом внутренняя часть камня характеризуется светлыми областями, что свидетельствует о присутствии в ней атомов металлов повсеместно, в том числе и в поверхностных слоях (рис. 3б).

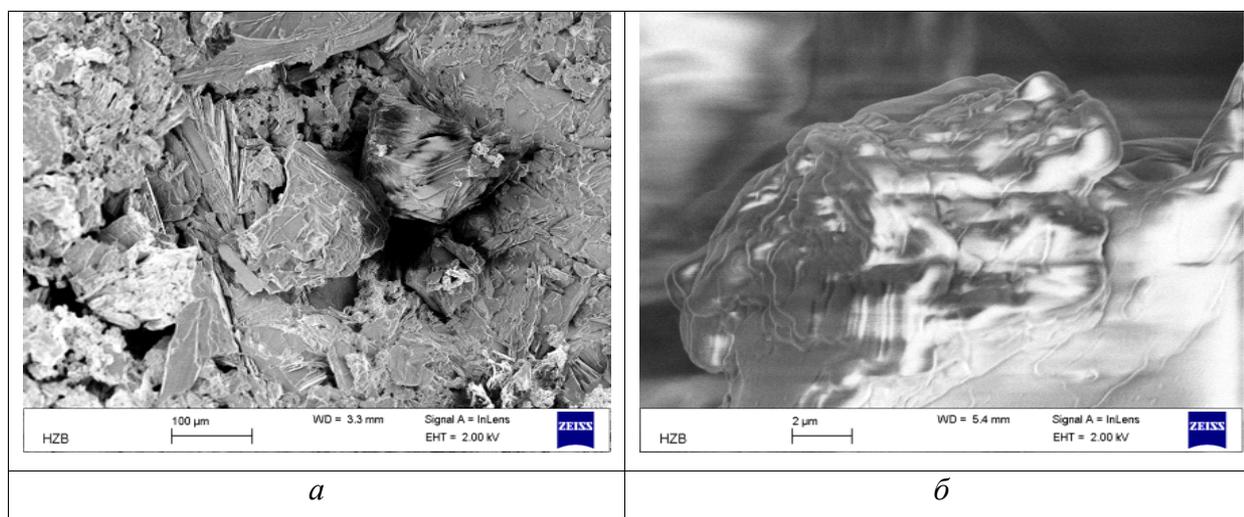


Рис. 3. Микрофотографии внутренней части и поверхностных слоев смешанных камней, полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа: 3а - внутренняя часть камня №5, 3б - внутренняя часть камня № 3. Длина масштабной линейки указана в мкм.

Камни групп № 1, 7 и 8 имеют структуру, не похожую ни на одну из вышеперечисленных. Структура смешанных камней группы №7 слоистая, на срезе слой имеет трещины разного диаметра, в рассматриваемой области наблюдаются ребристые слоистые образования. Однако, в отличие от смешанных камней № 3 и № 5, на СЭМ-изображениях практически весь рассматриваемый участок представляет собой темную область, имеются щели разного диаметра. Следовательно, несмотря на смешанный тип камней, внутренняя его часть в основном содержит элементы с малыми атомными номерами, концентрация в ней металлов с большим атомным номером низка. Изображение поверхности камня также затемнено.

Следовательно, в поверхностных слоях атомы металлов также присутствуют в малом количестве.

Структура камней группы № 8 слоистая. Однако, в отличие от всех остальных камней, выделяются отдельные слоистые блоки, по форме напоминающие геометрические фигуры: прямоугольники и квадраты разной величины.

Структура смешанных камней образцов № 1 волокнистая. Во внутренней структуре имеются трещины. В целом внутренняя часть показывает очаговое распределение как темных, так и светлых областей, что указывает на неравномерность распределения металлов

и подтверждается электронной микроскопией. Тем самым результаты свидетельствуют о том, что смешанные камни могут существенно различаться по месту расположения металлов и плотности ядра. Это даёт основание предполагать участие микроэлементов в формообразовании камней смешанного типа.

Пигментные (билирубиновые) камни группы № 6 имеют схожее с холестериновыми камнями групп № 2 и № 4 строение: структура слоистая; на срезе слой имеет многочисленные зубцеватые структуры, напоминающие розетки минеральных кристаллов. На СЭМ-микрофотографиях видна темная область, соответствующая скоплению элементов с малым атомным номером. Во внутренней части камня наряду с темными областями присутствуют и светлые локусы, что объясняется присутствием во внутренней части камня металлов с атомным номером выше атомного номера компонентов билирубина (С, О, Н, N). Содержание металлов на поверхности камня выше, чем во внутренней части, о чем свидетельствуют светлые области. Обращает на себя внимание тот факт, что металлы практически во всех образцах концентрируются преимущественно на поверхности камней. Следовательно, можно полагать, что холестериновые и белковые компоненты принимают участие в формировании зачатка и ядра желчных камней, обеспечивая тем самым их рост.

### **Выводы**

Таким образом, результаты проведённого исследования позволяют нам сделать следующие выводы.

1. Микроэлементы наряду с органическими веществами желчи (холестерином, билирубином, муцином) принимают участие в образовании желчных камней. При этом, встраиваясь в кристаллическую структуру камней, микроэлементы откладываются либо в ядре, либо в поверхностных слоях или равномерно распределяются по всем слоям в зависимости от типа желчного камня.
2. Содержание металлов микроэлементов в ядре или поверхностных слоях желчных камней зависит от типа камня. В холестериновых камнях атомы металлов находятся в поверхностных слоях, в смешанных и пигментных камнях - как в ядре, так и в поверхностной оболочке.
3. В элементный состав желчных камней всех типов входят микроэлементы Mn, Fe, Ni, Cu, Zn. В качестве вариативных элементов выступают Bi, Br, As, Cr, что может быть следствием проводимого лечения пациентов или среды обитания.

Накапливание металлических элементов, возможно, является точкой перехода хронического течения холецистита в острое. Мы полагаем, что соприкосновение металлических элементов камней со стенкой желчного пузыря может служить триггерным

механизмом свободно-радикального повреждения клеток желчного пузыря и развития воспаления.

*Авторы выражают благодарность Берлинскому центру материалов и энергии имени Гельмгольца за предоставление пучкового времени для проведения экспериментальных измерений на BESSY II.*

### Список литературы

1. Голованова О.А., Пальчик Н.А., Березина Н.Ю., Юдина Л.Н. Сравнительная характеристика минерального и микроэлементного состава желчных камней, удаленных у пациентов в Новосибирской и Омской областях // Химия в интересах устойчивого развития. – 2006. - С. 14-18, 125-131.
2. Жданов Р.И., Скальный А.В., Ибрагимова М.Я., Скальная М.Г., Березкина Е.С., Сабирова Л.Я. Взаимосвязь дисбаланса макро- и микроэлементов и здоровье населения (обзор литературы) // Казанский медицинский журнал. – 2011. - 4: 606-9. - С. 25.
3. Пальчик Т.А., Мороз Т.Н., Леонова И.В., Мирошниченко Л.В. Минералообразование в организме человека // Биокостные взаимодействия: жизнь и камень : материалы II Международного симпозиума. - СПб., 2004. - 186-9. - С. 56.
4. Шабалин В.Н., Шатохина С.Н. Морфология биологических жидкостей человека. - М. : Хризостом, 2001. - С. 304.
5. Шатохина С.Н. Значение биоминерализации в норме и патологии // Медицинская кафедра. – 2006. – № 1. - С. 14-9.
6. Шатохина С.Н., Дасаева Л.А., Шатохина И.С., Шабалин В.Н., Шилов Е.М. Патогенетические особенности морфологической картины фаций мочи больных хроническим пиелонефритом //Лечащий врач. – 2014. - № 1. – С. 43-45.

### Рецензенты:

Овсянников В.Г., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической физиологии ГБОУ ВПО «Ростовский государственный медицинский университет» Минздрава России, г. Ростов-на-Дону;

Чистяков В.А., д.б.н., заведующий лабораторией экспериментального мутагенеза НИИ биологии ФГАОУ ВПО «Южный федеральный университет», г. Ростов-на-Дону.