

# ПОЛЯРИЗАЦИОННАЯ МИКРОСКОПИЯ В ДИАГНОСТИКЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТОВ

Колтовой Н.А., к.ф.-м.н.,  
Москва, Лабметод. koltovoi@mail.ru

Поляризационная микроскопия – эффективный метод исследования структуры и свойств цитологических и гистологических препаратов. Известно, что многие биологические объекты являются анизотропными. Поэтому поляризационные методы позволяют оперативно и просто обнаружить оптически неоднородные объекты и диагностировать заболевание.

Поляризационный метод применяется в диагностике биологических объектов очень давно. Одним из первых его применил в биологии немецкий исследователь В.Шмидт в 1924 году [1]. Большой вклад в применение поляризационной микроскопии в гистологии внесли Ю.Целлариус и Л.Кактурский. Поляризационная микроскопия позволяет изучать свойства гистологических структур, обладающих способностью двойного лучепреломления [2]. При желании для реализации метода любой оптический микроскоп можно превратить в поляризационный микроскоп. Для этого оптический микроскоп снабжают дополнительно двумя поляризационными фильтрами. Первый фильтр помещают непосредственно между осветителем и объектом (поляризатор). Он преобразует обычный свет в линейно-поляризованный. Второй поляризационный фильтр помещают между объективом и глазом исследователя (анализатор). Он служит для анализа поляризованного света, прошедшего через объект исследования.

Большинство биологических структур обладает свойством положительного двойного лучепреломления, и их показатель преломления вдоль выделенного направления больше показателя преломления в поперечном направлении. Встречаются также объекты с отрицательным двойным лучепреломлением: у них показатель преломления вдоль выделенного направления меньше, чем в поперечном направлении. С помощью поляризационного метода можно наблюдать и диагностировать любые цитологические и гистологические препараты: как окрашенные, так и неокрашенные, как фиксированные, так и нефиксированные (нативные). Практически в каждом биологическом препарате имеются светящиеся объекты [3]. Перед поляризационным анализом желательно удалить парафин из срезов, потому что остатки парафина обладают собственным двойным лучепреломлением.

Первую группу объектов, распознаваемых с помощью поляризационной микроскопии, составляют круглые объекты, капли, липоиды, которые в скрещенных поляроидах выглядят как Мальтийский крест. Появление данных объектов связано с нарушением липидного обмена, с болезнями почек. Ориентировочный диаметр этих капель – 2,4 микрометра.

Эффектом анизотропии обладают холестерин и его эфиры, фосфатиды, цереброзиды, миелины. Но нейтральные жиры и жирные кислоты свойством двойного лучепреломления не обладают. Можно выделить два типа объектов: вещества, анизотропия которых исчезает при нагревании и вновь появляется при охлаждении (холестерин и его эфиры), и вещества, анизотропия которых при нагревании не исчезает (цереброзиды, фосфатиды, миелины). Для эфиров холестерина наблюдается эффект: если после быстрого охлаждения провести быстрый нагрев, то свойство анизотропности резко пропадает, так как разрушается жидкокристаллическая фаза.

Липопротеины (липопротеиды) – это комплексы, состоящие из белков и липидов. Форма липопротеинов сферическая, их размеры лежат в диапазоне 4–1200 нм. Оболочка сферы состоит из мономолекулярного слоя фосфолипидов с включенными в его состав молекулами холестерина и белков. Внешняя сторона оболочки – гидрофильная, а внутренняя сторона – гидрофобная. Внутри оболочки содержатся молекулы эфиров холестерина, триглицерида и небольшое количество свободного холестерина.

Хиломикроны (chylomicron) – это самые большие липопротеины. Хиломикроны образуются в энтероцитах после переваривания и всасывания жиров из тонкой кишки. Энтероциты – адсорбирующие клетки эпителия желудочно-кишечного тракта, в частности толстого и тонкого кишечника. Затем хиломикроны попадают в лимфатические

сосуды и через грудной лимфатический проток поступают в кровь. Из-за большого размера, хиломикроны вызывают сильное рассеивание света. В результате этого после приема пищи плазма крови всегда выглядит опалесцирующей или даже мутной, в зависимости от количества потребляемой с пищей жиров. Концентрация хиломикрон в плазме крови обычно достигает максимума через 3–6 часов после приема пищи, а затем в течение часа постепенно снижается. Хиломикроны и липопротеины локализованы в плазме крови.

Липосомы (liposomes) – частицы, которые образованы одним или несколькими концентрическими замкнутыми липидными бислоями. Свойством двойного лучепреломления обладают многослойные липосомы LMV.

### ОСНОВНЫЕ ОБЛАСТИ В ДИАГНОСТИКЕ

Многие заболевания, как известно [4], диагностируются по анализу осадка мочи. Среди них – липоидурия (липурия). При этом заболевании в моче иногда можно наблюдать липидные капли, которые в скрещенных поляроидах наблюдаются в виде так называемого Мальтийского креста. Липоидурия сопровождается выделением с мочой анизотропных, двоякопреломляющих жировых структур (anisotropic fat crystals). (Липурия – выделение холестерина с мочой) Капельки в поляризованном свете выглядят в виде темного креста со светящимися сегментами – Мальтийскими крестами. Их присутствие обусловлено появлением эфиров холестерина, находящегося в жидкокристаллической фазе. Если в каплях нет эфиров холестерина, – то они не светятся. Их образование связывают с жировой дегенерацией клеток эпителия почечных канальцев. Липоидурия весьма характерна для нефротического синдрома независимо от его генеза. Эти структуры появляются при жировой дистрофии.

Другое заболевание – цилиндрурия. В почечных канальцах образуются жировые цилиндры и овальные жировые тельца (oval fat bodies, fat globules) из жироперерожденного почечного эпителия. Они состоят из капель жира (липоидов) различного размера. В отличие от нейтральных жиров липоиды обладают двойным лучепреломлением. В скрещенных поляроидах появляется изображение в виде Мальтийского креста. При наблюдении без поляризаторов при малом увеличении цилиндры будут темными из-за сильного преломления света каплями жира. Жировые цилиндры обнаруживаются в осадке мочи больных липоидным нефрозом, липоидно-амилоидным нефрозом, диабетической нефропатией, гломерулонефритом и пиелонефритом с нефротическим компонентом.

Липидоз – нарушение внутриклеточного липидного обмена в организме – тоже диагностируется поляриметрическими методами. Только здесь в качестве объекта анализа рассматриваются капли жира в различных тканях, которые в поляризационном микроскопе светятся в виде Мальтийского креста. Однако область наблюдения этих объектов ограничена, так как одно и то же вещество

в зависимости от его физического состояния (жидкое, кристаллическое) то дает, то не дает двойного лучепреломления. Типично двойное лучепреломление с изображением Мальтийского креста имеют сферокристаллы (сферолиты, которые образуются в присутствии эфиров холестерина). С помощью поляризационного микроскопа можно дифференцировать изотропные и анизотропные липиды. Анизотропные липиды дают характерное двойное лучепреломление. Отличительная особенность – при нагревании свойство двойного лучепреломления пропадает, а при охлаждении – появляется снова. Любой жир, находящийся в тканях, растворяется в растворителях, которые используются при окраске образцов ткани для микроскопического исследования. Поэтому исследование лучше производить в замороженных срезах, в которых жир остается в цитоплазме.

При таком заболевании, как атеросклероз (atherosclerosis), объектом исследования становятся стенки сосудов. Холестерин при микроскопическом исследовании в поляризованном свете дает характерную картину Мальтийского креста. При артритах объект исследования – синовиальная жидкость (sinovial fluid). Артрит – это заболевание, связанное с поражением суставов. В синовиальной жидкости наблюдаются сферолиты липидов, которые в скрещенных поляроидах дают ту же характерную картину. При остром бактериальном простатите исследуют поляризационное изображение

секрета предстательной железы, а при желчекаменной болезни – секрета желчи.

Отличительной особенностью поляризационного свечения липидных капель является тот факт, что при вращении предметного стекла яркость свечения объекта и ориентация Мальтийского креста остается постоянной. При свечении других кристаллов и волокон проявляются другие особенности: попеременное изменение яркости изображения за период полного поворота объекта вокруг оси наблюдения. Для исследования рекомендуется использовать замороженные срезы из нефиксированного или фиксированного в формалине материала. Нельзя применять фиксирующие растворы, содержащие растворители липидов. Срезы заключают в глицерин.

Другую группу объектов составляют различные кристаллы. При подагре (gout) в синовиальной жидкости наблюдаются кристаллы моноурата натрия, которые имеют игольчатую форму и обладают отрицательным двойным лучепреломлением. При подагре в синовиальной жидкости с помощью поляризационной микроскопии можно наблюдать свечение игольчатых кристаллов мочевой кислоты. При псевдоподагре в синовиальной жидкости наблюдаются кристаллы пирофосфата кальция дегидрата, которые имеют ромбовидную или прямоугольную форму в виде коротких прямых пучков и обладают положительным двойным лучепреломлением. Существует мнение, что кристаллы пирофосфата кальция не образуются в синовиальной жидкости, а попадают из суставного хряща в полость сустава, где и вызывают воспалительную реакцию.

Мочекаменная болезнь связана с образованием кристаллов различных веществ (уролитов – поликристаллических образований, состоящих из минералов) в естественных полостях органов мочевой системы. Поляризационными методами возможно наблюдение особых типов кристаллов. Так, оксалат кальция встречается в моче больных сахарным диабетом. Кристаллы дегидрата мочевой кислоты, обладающие двойным лучепреломлением, наблюдаются при камнеобразовании, при обширных поражениях легких, отравлении свинцом, у больных острым ревматизмом, при нарушении кровообращения. Иногда в моче можно обнаружить кристаллы крахмала, которые в скрещенных поляроидах дают изображение Мальтийского креста.

При силикозе (silicosis) в поляризованном свете гистологического препарата легкого наблюдается свечение кристаллов двуокиси кремния ( $\text{SiO}_2$ ). При асбестозе (asbestosis) можно определить размеры волокон асбеста, они обладают свойством двойного лучепреломления. Канцерогенность асбеста зависит не от вида асбеста, а от длины волокон. Волокна размером менее 3 микрон обладают выраженным канцерогенным эффектом. Риск возникновения рака легкого у больных асбестозом увеличивается примерно в 10 раз. Доказано, что асбест потенцирует действие других канцерогенов. Волокна размерами более 5 микрон не обладают канцерогенными свойствами. Профессиональное

заболевание – талькоз (talcosis), болезнь легких, вызванная вдыханием пыли талька, также диагностируется поляризационными методами.

Новым и интенсивно развивающимся направлением поляризационной микроскопии стало изучение состава и структуры биожидкостей: сыворотки или плазмы крови, мочи, синовиальной жидкости, лимфы, слеза и т.д. На предметное стекло наносят каплю исследуемой биожидкости и сверху на нее накладывают покровное стекло. Исследуемая капля оказывается между предметным и покровным стеклами. За счет испарения воды через боковую поверхность капля высыхивается, и образуются кристаллы. Эти кристаллы исследуются с помощью поляризационного микроскопа. Количество кристаллов, их форма и размеры позволяют производить раннюю диагностику различных заболеваний. Преимущество поляризационного метода состоит в том, что при обычном методе наблюдения в проходящем свете кристаллов не видно.

Третья группа объектов – различные волокна. В 1927 году П.Диври открыл с помощью поляризационной микроскопии амилоидную природу ряда патологических структур мозга стариков. При выявлении амилоида в стенках сосудов диагностируют так называемое заболевание белковой стромально-сосудистой дистрофией. Коллагеновые волокна в различных тканях обладают ярким свечением в скрещенных поляроидах. Собственная анизотропия коллагена при использовании топооптических красителей или импрегнации препаратов металлами – золотом, медью, серебром – усиливается и сопровождается появлением дихроизма.

Очень важным вопросом для судебной-медицинской экспертизы при скоропостижной кончине человека является диагностика причины его смерти на наличие инфаркта миокарда [5–7]. Эту диагностику можно оперативно провести с помощью поляризационной микроскопии. Миофибриллы в поляризованном свете обнаруживают характерную поперечную исчерченность, связанную с чередованием анизотропных (А) и изотропных (I) дисков. А-диски обладают ярко выраженным положительным двойным лучепреломлением и кажутся светлыми в поляризованном свете (при обычном свете они темные), тогда как I-диски почти полностью лишены способности к двойному лучепреломлению и в поляризованном свете выглядят темными (при обычном свете – светлые). Имеются данные о том, что при диагностике инфаркта миокарда при скоропостижной смерти без применения поляризационного метода наблюдаются частые случаи неправильных диагнозов.

Даже нервные ткани, а не то что волосы, способны поведать о многих секретах своих обладателей. Поляризационные методы используются при диагностике заболеваний кожи. Различные компоненты кожи по-разному взаимодействуют с поляризованным светом. Созданы приборы, в которых кожа освещается поляризованным светом.

Наблюдение и регистрация также осуществляются через поляризатор. При таком методе наблюдения более контрастно выражены различные новообразования и повреждения на коже.

### ПОЛЯРИЗАЦИОННЫЙ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЙ ИММУНОАНАЛИЗ

В основе поляризационного флуоресцентного иммуноанализа (ПФИА) лежит свойство увеличения поляризации при флуоресценции небольших флуоресцентно меченых гаптен (меток) при связывании со специфичным антителом. Если образец содержит непомяченное определяемое вещество, метка связывается с антителом конкурентно, и поляризационный сигнал уменьшается. ПФИА не требует фракционирования образцов. В настоящее время разработано большое количество методик ПФИА для малых гаптен, таких как лекарственные препараты, гормоны, антибиотики, токсины, детергенты, пестициды и т.д. Изучаемые клетки возбуждают светом, поляризованным в вертикальной плоскости. Регистрируется флуоресценция через поляризатор, ориентированный в горизонтальной плоскости.

В дополнение к стандартной методике поляризационной микроскопии предлагается новая, более информативная, методика. Обычно для поляризационной микроскопии используются поляризационные фильтры с линейной поляризацией. В новой методике предлагается диагностика препаратов с использованием поляризационных фильтров

с циркулярной поляризацией. Оказалось, что изображения, полученные с помощью циркулярных фильтров, несут, по сравнению со стандартной методикой, гораздо больше информации и позволяют выявлять более тонкую структуру тканей и клеток.

### ЛИТЕРАТУРА

1. **Шмидт В.** Ткани животных организмов в поляризованном свете. – F. Cohen, Bonn, 1924.
2. **Кактурский Л.В.** Поляризационная микроскопия. Микроскопическая техника. – М.: Медицина, 1996.
3. **Шабалин В.Н., Шатохина С.Н.** Морфология биологических жидкостей человека. – М.: Хризостом, 2001.
4. **Шаповальянц С.Г., Цкаев А.Ю., Иванова Т.В.** Поляризационная микроскопия желчи в диагностике микрохоледохолитиаза. – Хирургия, №5, 1999, с. 15.
5. **Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Непомнящих Л.М.** Патологоанатомическая диагностика преднекротических изменений и инфаркта миокарда методом поляризационной микроскопии. Методические рекомендации. – М.: Минздрав СССР, 1979.
6. **Габинский Я.Л., Яковлев Ю.Р., Яковлева С.Б.** Текстуальный атлас: инфаркт миокарда и информационно-аналитические возможности поляризационной микроскопии. – Екатеринбург: Изд. Екатеринбургский инфарктный центр, 1994.
7. **Гринберг Л.М.** Поляризационная микроскопия в патологоанатомической практике. – Екатеринбург, 1995.



### ФИНВАЛ – 20 ЛЕТ НА ВОЛНЕ ИННОВАЦИЙ!

В 1991 году страна с головой окунулась в рыночные отношения. Тогда в ряды первопроходцев российской постперестроечной экономики влились сотрудники Московского завода им. Лихачева. Группа молодых, энергичных предпринимателей, начинавших с поставок отечественного и импортного инструмента, за 20 лет выросла в Группу Компаний ФИНВАЛ. Ныне в ее арсенале широкая линейка современного высокотехнологичного оборудования для обработки металла, оснастки, запасных частей, рабочего инструмента.

ФИНВАЛ поставяет металлообрабатывающее и термическое оборудование из Германии, Южной Кореи, Японии, Франции, Тайваня и других стран. В его портфеле продукция с такими брендами,

как HANWHA, HWACHEON, MORI SEIKI, LITZ, FARINA, MAX SEE, SCHMETZ. Как правило, поставка оборудования заказчикам – это начало постоянного сотрудничества, потому что специалисты Сервисного Центра ФИНВАЛа обучают персонал клиентов, выполняют диагностические и ремонтные работы любой сложности, поставляют запчасти. Сервисные работы обеспечивают поставляемое оборудование во всех регионах России.

Благодаря сотрудничеству с Группой Компаний ФИНВАЛ сотни фирм за время технического переоснащения своих предприятий повысили производительность, сократили издержки, увеличили рентабельность производства. Изменения, которые инициирует ФИНВАЛ в процессе

технического аудита, затрагивают всю производственную цепочку. Сотрудники фирмы помогают заказчикам выйти на качественно новый технологический уровень, освоить выпуск новой продукции. Основные принципы, которым следует ФИНВАЛ, выстраивая отношения с клиентами и партнерами, – это компетентность, наличие ресурсов, исполнение обязательств.

Свое 20-летие ФИНВАЛ встречает большими планами дальнейшего развития – ведь Россия продолжает держать курс на модернизацию промышленных предприятий. И ФИНВАЛ поможет своим заказчикам обновить станочный парк их предприятий, для этого у компании имеются эффективные инженерные решения.

Шевцова О., [www.finval.ru](http://www.finval.ru)