

Структура и морфология нанокристаллических кальцификатов щитовидной железы

С.Н. Данильченко¹, А.С. Станиславов¹, В.Н. Кузнецов¹, А.В. Коченко¹, Т.Г. Калиниченко¹,
А.В. Резник², В.В. Стариков³, Р.А. Москаленко², А.Н. Романюк²

¹ *Институт прикладной физики НАН Украины, ул. Петропавловская, 58, 40000 Сумы, Украина*

² *Сумский государственный университет, ул. Римского-Корсакова, 2, 40007 Сумы, Украина*

³ *Национальный технический университет «Харьковский политехнический институт», ул. Фрунзе, 21, 61002 Харьков, Украина*

(Получено 12.02.2016; в отредактированной форме – 02.03.2016; опубликована online 15.03.2016)

В работе приведены результаты исследований морфологии, структуры, элементного и фазового состава кальцинированных фрагментов патологических образований щитовидной железы. Методами рентгеновской дифракции и инфракрасной спектроскопии установлено, что все исследованные патологические кальцификаты представляет собой дефектный карбонатзамещенный апатит кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Показано, что применение просвечивающей электронной микроскопии в комбинации с микродифракцией электронов позволяет выявить некоторые структурные и морфологические особенности кристаллов апатита щитовидной железы, не обнаруживаемые другими методами. Благодаря этому, при условии применения тонкого препарирования на стадии анатомических исследований и подготовки пробы, может быть реализован локальный морфологический и структурный анализ минеральных составляющих депозита как при одном и том же клиническом случае, так и при их широком разнообразии.

Ключевые слова: Кальцификация, Щитовидная железа, Структура, Фазовый состав, Апатит.

DOI: [10.21272/jnep.8\(1\).01031](https://doi.org/10.21272/jnep.8(1).01031)

PACS numbers: 87.15. ± v

1. ВСТУПЛЕНИЕ

Отложение патологических кальцийсодержащих минералов (эктопическая кальцификация) может происходить практически в любом месте тела человека [1-3]. Кристаллы патологических депозитов, как правило, имеют наномасштабные размеры или даже рентгеноаморфны [2], что усложняет исследования их структуры.

Кальцификаты, образующиеся в щитовидной железе (ЩЖ) чаще ассоциируются с не онкологическими изменениями этого органа, хотя есть свидетельства и противоположного свойства [3-5]. Доступная на сегодня информация о микроструктуре, элементном и фазовом составе таких минеральных депозитов очень ограничена. Тем более не изученными остаются специфические кристаллохимические характеристики отложений ЩЖ в связи с тем или иным видом патологии. Проведение такого рода исследований должно способствовать более глубокому пониманию процессов патологической кальцификации ЩЖ и выработке в конечном итоге новой стратегии профилактики и лечения данного вида патологии.

Следует отметить, что в доступной литературе нет четкой и однозначной классификации минеральных отложений ЩЖ в связи с определенными клиническими патологиями. Тем не менее, некоторыми авторами отмечается, что наиболее часто кальцификация наблюдается при папиллярном раке ЩЖ. При этом, патологические биоминералы могут быть отнесены к псаммомным тельцам, стромальным кальцификатам и/или эктопическому костеобразованию [6]. По-видимому, эту классификацию нельзя считать окончательной и единственно возможной, тем более, что во многих работах приводятся и другие виды патологий ЩЖ, сопровождающиеся отложениями кальцификатов [например 7 и 8].

Отдельного внимания заслуживают вопросы локализации минеральных отложений ЩЖ. Многими авторами подчеркивается устойчивая связь между особенностями патологии с одной стороны, и локализацией и морфологией сопутствующих кальцификатов с другой. Однако, определение структурных характеристик депозита миллиметрового или микронного масштаба представляет серьезную проблему. В таких случаях возникает необходимость применения локальных методов исследования структуры и состава с микронной пространственной разрешающей способностью, доступных при использовании специальных установок, связанных с синхротронными источниками излучения [9]. Вместе с тем, при надлежащем препарировании исследуемого материала, весомые результаты могут быть достигнуты и с применением традиционной электронной микроскопии и дифракции электронов. Кроме возможности локализации области исследований, электронная дифракция в комбинации с электронной микроскопией, имеет еще несколько важных преимуществ по сравнению с рентгеновской дифракцией. Картина электронной дифракции (электронограмма) может быть сопоставлена с микроскопическим изображением, т.е. морфологическими характеристиками кристаллических частичек, на которых происходит дифракция. В том случае если кристаллические частички сопоставимы с размером электронного зонда, можно получить электронограмму от отдельных монокристаллов и определить их кристаллографическую ориентировку [10].

Цель настоящей работы состояла в определении кристаллической фазы, структурных характеристик и морфологических особенностей минеральной составляющей депозитов ЩЖ. Сопутствующей задачей исследований было выявление специфических отличий кальцификатов, относящихся к разным видам патологий.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В настоящей работе был исследован 61 образец патологических минеральных отложений ЩЖ (по тексту *Thyroid 1* и т.д.) на предмет их элементного и структурно-фазового состава, а также морфологических особенностей как депозита в целом (макро уровень – увеличение до 500), так и отдельных кристаллических частичек (микро и нано уровень). Предварительно по всем представленным клиническим случаям были проведены анатомические, гистоморфологические и гистохимические исследования [11]. По результатам этих работ исследуемые образцы были классифицированы согласно патологии ЩЖ, на фоне которой они возникли: кальцификаты злокачественных новообразований (папиллярный, фолликулярный и медуллярный раки ЩЖ-14, случаев), доброкачественных образований (аденомы ЩЖ-30 случаев), фолликулярная аденома (11 случаев), зоб и патологическая биоминерализация, которая встречается при тиреоидитах (6 случаев). При обнаружении каких-либо специфических структурных или концентрационных особенностей кальцификата, клиническая история и этиология каждого образца могла быть легко установлена.

Минеральную составляющую отделяли от мягких тканей депозита путем термической обработки в электропечи (на воздухе) при 200 °С на протяжении часа. При этом происходило разрушение органической части депозита и удаление свободной воды при сохранении неизменной структуры минерала. После такого низкотемпературного отжига в большинстве случаев твердые частички минерала можно было легко отделить механически от золы органических тканей.

Исследования методом растровой электронной микроскопии (РЭМ) были выполнены на приборе РЭММА-102 (SELMi, Украина). Прибор позволяет визуализировать исследуемую поверхность образца в широком диапазоне увеличений с разрешением порядка 10 нм и получать данные об элементном составе из анализа характеристических энергодисперсионных рентгеновских спектров (EDX спектров), возбуждаемых электронным зондом. Обработка спектрометрической информации проводилась с помощью штатного программного обеспечения системы микроанализа.

Рентгендифракционные исследования структуры материалов были выполнены на дифрактометре ДРОН-4-07 («Буревестник», Россия) с использованием излучения $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 0,154$ нм) при условиях фокусировки по Брэггу-Брентано (θ - 2θ) (2θ – брэгговский угол). Образцы снимали в режиме непрерывной регистрации (скорость 2 °/мин) в диапазоне углов 2θ от 10° до 70°. Предварительная обработка экспериментальных результатов была проведена в программном пакете DIFWIN-1 (ТОО «Эталон-ПТИЦ»), идентификация фазового состава – при помощи картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Инфракрасные (ИК) спектры были получены на Фурье-спектрометре Spectrum-One (Perkin Elmer, USA, 2003). Перед исследованиями образцы в виде порошка были смешаны с порошком KBr (3 мг образца на 300 мг KBr) и спрессованы в таблетки. Измере-

ния и анализ спектров выполнялись с использованием штатного программного обеспечения прибора.

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) с электронной дифракцией (ЭД) была выполнена на приборе ПЭМ-125К (SELMi, Украина), который позволяет изучать морфологию и фазовый состав кристаллических частичек кальцификата. При подготовке проб отожженные минерализованные ткани в форме порошка помещали в дистиллированную воду и обрабатывали ультразвуком с помощью установки УЗДН-А (SELMi, Украина). Ультразвуковой излучатель находился в сосуде с дистиллированной водой и образцами в течение десяти минут. Удельная мощность составляла приблизительно 15-20 Вт/см² при рабочей частоте излучателя 22 кГц. Несколько капель полученной суспензии наносили на направленный вертикально вверх ультразвуковой излучатель УЗДН-А и распыляли 2-3 секунды, варьируя мощность установки. Распыленный аэрозоль улавливали на тонкую углеродную пленку (10-20 нм), расположенную на медной сеточке держателя образцов. Микрофотографии и картины ЭД были получены при ускоряющем напряжении $U_{\text{уск}} = 90$ кВ.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Согласно данным РЭМ, минерализованный материал депозитов представлял собой разноразмерные частички произвольной формы с признаками хрупкого излома по краям. В ряде случаев наблюдались крупные частицы, представляющие собой подобие слешка (или отпечатка) с поверхности мягких тканей железа и повторяющие их форму (рис. 1а, 1б, *Thyroid 13* и *Thyroid 14*). Из приведенных снимков видно, что минерал образовывал твердую оболочку (корку) или скорлупу с гладкой или складчатой поверхностью, на поверхности железа и толщина такой «скорлупы» в некоторых случаях имела характерный размер (5-10 мкм). Представляет несомненный интерес определение преимущественной кристаллографической ориентировки минерала относительно поверхности железа. В некоторых случаях при больших увеличениях изломов наблюдалась пористость (губчатость, «ноздреватая» структура) минеральных отложений (рис. 1в, *Thyroid 16*).

В EDX спектрах помимо основных линий Са и Р зачастую присутствуют слабые линии S, К, Сl и некоторых других элементов. Соотношение интенсивностей линий Са и Р близко к характерному для апатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, хотя разброс значений достаточно большой и зависит от выбора точки накопления сигнала.

Рентгеновские дифрактограммы кальцификатов (рис. 2а) характеризуются размытыми и перекрывающимися линиями. Фазовый состав образцов в большинстве случаев представлен исключительно апатитом с разной степенью кристалличности. В некоторых случаях (рис. 2а) обнаруживаются слабые признаки второй фазы – β -ТКМФ (трикальциймагнийфосфат). На многих дифрактограммах в районе $2\theta \sim 21$ - 22° видно гало (рис. 2б), характерное для материала кюветы, которое может быть вызвано малым количеством образца, покрывающим лишь цен-

тральную часть кюветы. Для большинства образцов оценка размеров кристаллитов по Шерреру [12, 13] в направлении нормали к плоскости (0 0 2) дает разброс значений от 14 до 30 нанометров.

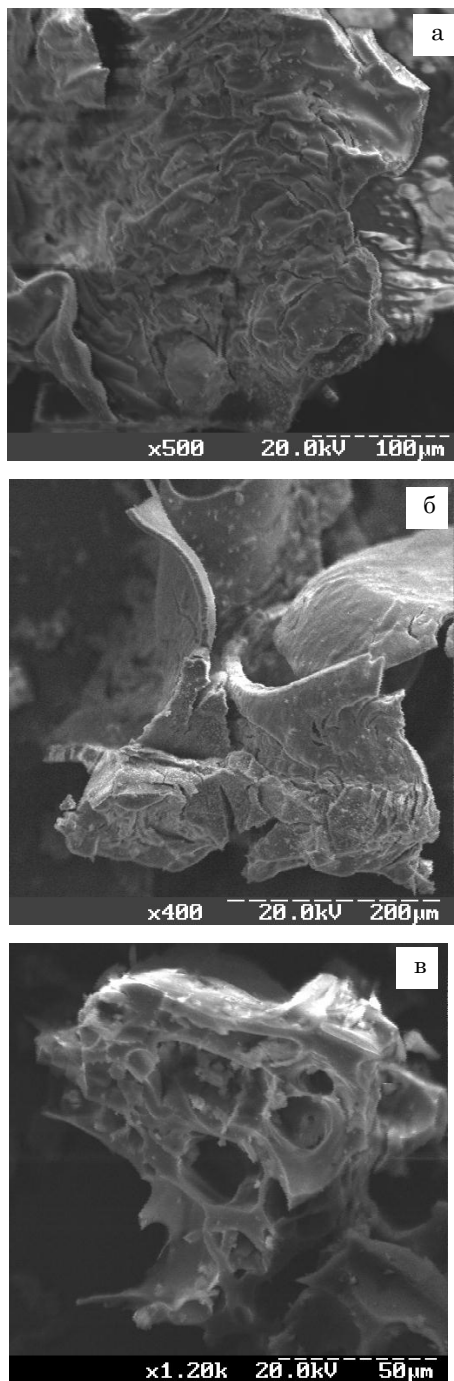


Рис. 1 – Морфологические особенности минеральных частиц депозитов ЩЖ по данным РЭМ

Данные ИК спектроскопии хорошо согласуются с приведенными выше результатами структурного анализа и подтверждают апатитную природу кальцификатов. Кроме того, ИК спектры (рис. 3) демонстрируют полосы поглощения, соответствующие карбонатным замещениям в структуре апатита. Обнаруженный карбонатный апатит имеет преимущественно признаки В-типа, т.е. частичного замещения

фосфат-ионов карбонат-ионами (пики поглощения в районе $870-875\text{ см}^{-1}$ и $1410-1420\text{ см}^{-1}$) [14].

Данные ПЭМ и ЭД, в сравнении с результатами описанных выше методов, отличаются большим разнообразием и допускают некоторые вариации трактовок. Тем не менее, ЭД уверенно подтверждает наличие апатита во всех исследованных депозитах ЩЖ. Согласно ПЭМ кристаллы апатита могут быть примерно монодисперсными или чаще полидисперсными;

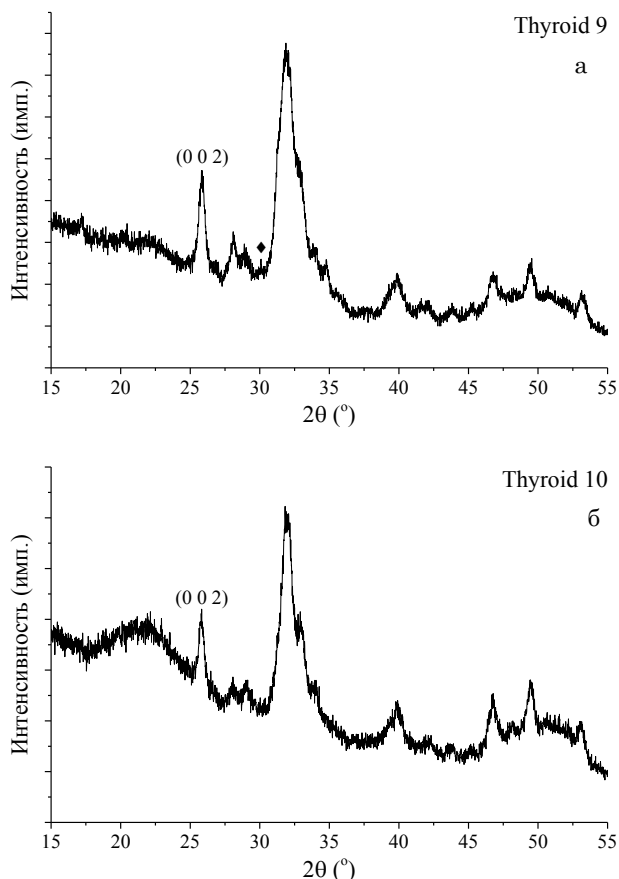


Рис. 2 – Типичные дифрактограммы минерала депозитов ЩЖ (символом ♦ обозначен основной пик β -ТКМФ, индексами hkl (0 0 2) отмечена линия апатита, из уширения которой оценивались размеры кристаллитов)

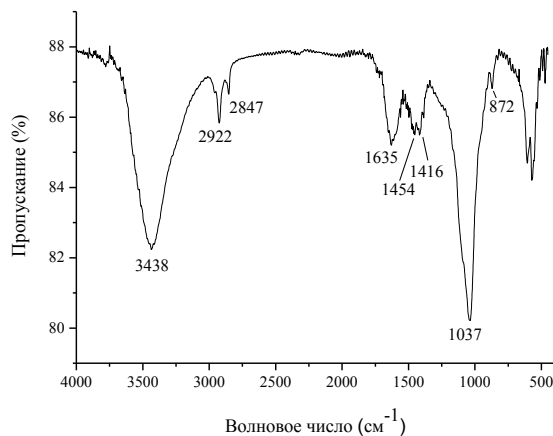


Рис. 3 – Типичный ИК спектр патологического минерала ЩЖ

картины ЭД большей частью поликристаллические, хотя есть особенности свойственные картинам дифракции от отдельных монокристаллов. В ряде случаев очевидна выраженная ориентировка кристаллических частичек относительно подложки держателя образцов.

Микрофотография на рис. 4а демонстрирует высокую степень полидисперсности кристаллов. Соответствующая картина микродифракции (рис. 4б) также характерна для материала разной дисперсности, когда мелкие кристаллы дают размытое кольцо (гало), а относительно крупные – отдельные отражения, свойственные для ЭД на монокристаллах. Гало на электронограмме имеет разрывы, что свидетельствует о некоторой ориентированности (текстурированности) отражающих кристаллитов. Одиночным рефлексам (0 0 2) соседствуют мелкие размытые отражения на кольцах того же радиуса. Это указывает на близкую кристаллографическую ориентацию, попавших в отражающее положение, относительно крупных кристаллов и мелких частичек, находящихся на их поверхности или в ближайшем окружении.

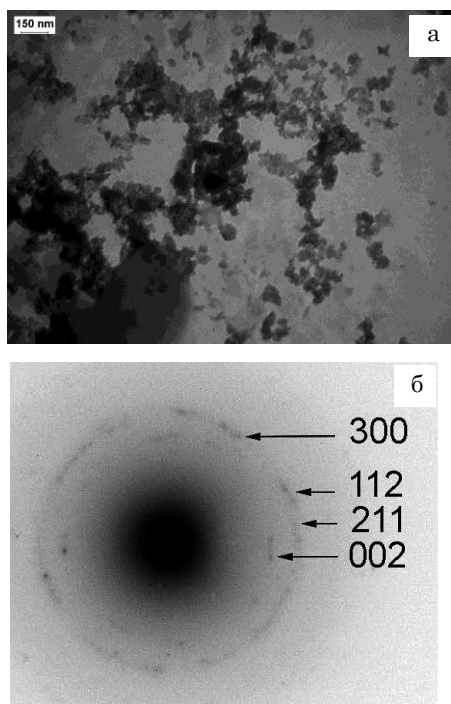


Рис. 4 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов (а) и картина ЭД (б) образца кальцификата (*Thyroid 8/34B*) (здесь и далее цифрами на электронограмме отмечены индексы hkl , соответствующие апатиту)

В другом случае (рис. 5) на электронно-микроскопическом изображении видны большие кристаллы (до сотен нанометров) в окружении сравнительно маленьких кристаллических частичек. Последние дают на электронограмме размытое кольцо слившихся линий с индексами Миллера (2 1 1), (1 1 2) и (3 0 0), соответствующих близким межплоскостным расстояниям (0,281-0,272 нм). Сильные точечные рефлексы с индексами (0 0 2) и (0 0 4) образованы монокристалльной частичкой апатита с базисными плоскостями перпендикулярными наблюдаемой поверхности.

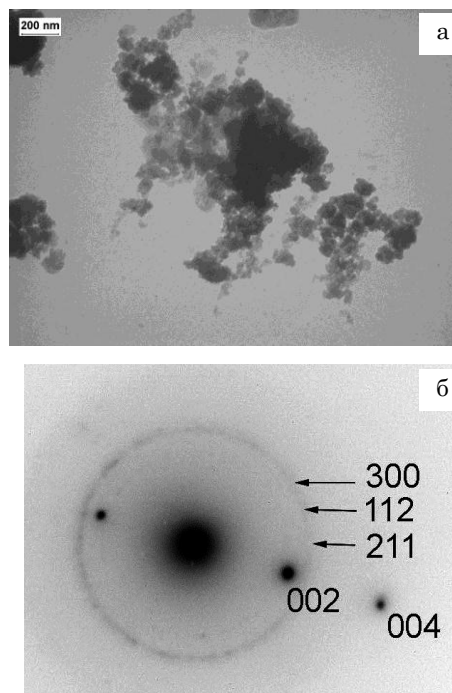
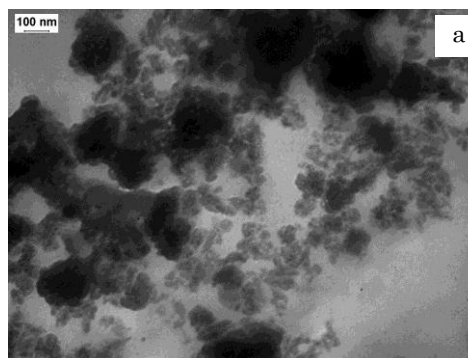


Рис. 5 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов (а) и картина ЭД (б) образца кальцификата (*Thyroid 10*)

Для случая, представленного на рис. 6 также характерны полидисперсные кристаллы апатита. Крупные частицы дают точечные рефлексы (рис. 6б), а мелкие – размытые и сливающиеся кольца от нескольких близких по межплоскостным расстояниям рефлексов. Отсутствие сильных точечных рефлексов с индексами (0 0 2) объясняется тем, что в отражающее положение не попали крупные частички апатита с базисными плоскостями перпендикулярными плоскости изображения. Учитывая предыдущий случай (рис. 5), можно утверждать, что относительно большие кристаллы апатита могут ориентироваться/располагаться базисными плоскостями (типа (0 0 1)), как параллельно, так и перпендикулярно к плоскости наблюдаемой поверхности.

На рис. 7 представлен случай мелкодисперсных частичек апатита. Есть признаки преимущественной ориентировки: на электронно-микроскопическом изображении (рис. 7б) видны цепочки кристаллов, на электронограмме – чередующиеся разрывы и утолщения дифракционных колец.



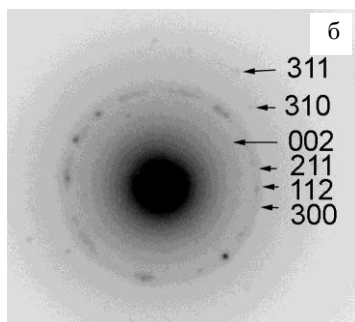


Рис. 6 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов (а) и картина ЭД (б) образца кальцификата (Thyroid 13)

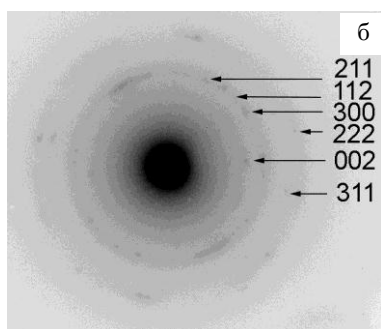
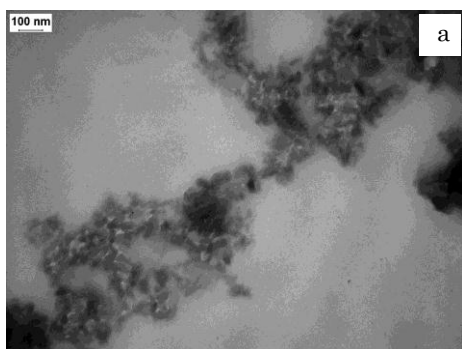


Рис. 7 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов (а) и картина ЭД (б) образца кальцификата (Thyroid 24)

Представленные данные демонстрируют широкое разнообразие размеров, формы и ориентации кристаллов кальцификатов ЩЖ, хотя подтверждают их фазовую принадлежность к апатитам кальция. Поскольку исследования методами ПЭМ и ЭД не требуют большого количества материала пробы (в сравнении с рентгеновской дифракцией), то представляется возможным проведение исследований выявляющих структурные и морфологические особенности кальцификата в связи с его местом локализации в патологическом образовании или ЩЖ в целом.

4. ВЫВОДЫ

Согласно данным комплексных исследований (рентгеновская и электронная дифракция, ИК спектроскопия) патологические кальцификаты ЩЖ представляют собой нанокристаллический дефектный апатит кальция со значительной долей карбонатных замещений в решетке (в позиции фосфатных ионов). Видимых признаков других кристаллических фаз не выявлено. Размер кристаллитов апатита, определяемый из ширины пиков рентгеновской дифракции (0 0 2), лежит в широких пределах, но для большинства образцов составляет 14-30 нанометров. Устойчивых зависимостей между данными рентгеновской дифракции и ИК спектроскопии с одной стороны и видом патологии (местом локализации депозита) по данным анатомических исследований – с другой, не обнаружено.

Исследования морфологических особенностей депозитов методом РЭМ при небольших увеличениях (до 500) показало, что минерал может образовывать твердую оболочку (корку) или скорлупу с гладкой или складчатой поверхностью, на поверхности железы и толщина такой «скорлупы» в целом имеет характерный размер (5-10 мкм).

По данным ПЭМ, кристаллические частички кальцификатов, как правило, полидисперсны (разноразмерны) и разброс их размеров может быть довольно большим. Однако, почти каждый образец имеет свои специфические особенности, касающиеся морфологии и размеров кристаллов, а так же образованной ими картины ЭД. Исходя из этого, при условии тонкого препарирования исходного материала с механическим выделением локализованных микрокальцификатов, представляется возможным исследование зависимости данных ПЭМ и ЭД от места локализации депозита или вида клинической патологии. Как предполагается, это должно быть предметом дальнейших исследований. Результаты этой работы будут способствовать развитию инструментальных подходов физики твердого тела и современного материаловедения к исследованию объектов биологической минералогии, определяющих здоровье и качество жизни человека.

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы выражают благодарность заведующему кафедрой прикладной физики СумГУ Проценко Ивану Ефимовичу за помощь в организации электронно-микроскопических исследований и ценные замечания в ходе дискуссии по результатам дифракционного анализа.

Structure and Morphology of Nanocrystalline Calcifications in Thyroid

S.N. Danilchenko¹, A.S. Stanislavov¹, V.N. Kuznetsov¹, A.V. Kochenko¹, T.G. Kalinichenko¹,
A.V. Rieznik², V.V. Starikov³, R.A. Moskalenko², A.M. Romaniuk²

¹ Institute for Applied Physics, NAS of Ukraine, 58, Petropavlovskaya St., 40000 Sumy, Ukraine

² Sumy State University, 2, Rymskogo-Korsakova St., 40007 Sumy, Ukraine

³ National Technical University «Kharkiv Politechnic Institute», 21, Frunze St., 61002 Kharkiv, Ukraine

The paper presents the results of study on morphology, structure, elemental and phase composition of the calcified fragments from pathological formations of the thyroid gland. The X-ray diffraction and infrared spectroscopy revealed that all investigated pathological calcifications are represented by a defective carbonate substituted calcium apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. The use of transmission electron microscopy in combination with electron microdiffraction is shown to reveal some structural and morphological features of crystals of thyroid apatite, which are not detectable by other methods. Therefore, the local morphological and structural analysis of a mineral component of the deposits can be implemented both in one clinical case, and in wide variety of cases, if a delicate preparation at anatomical studies and sample preparation procedure will be applied.

Keywords: Calcification, Thyroid gland, Structure, Phase composition, Apatite.

Структура та морфологія нанокристалічних кальцифікатів щитоподібної залози

С.М. Данильченко¹, О.С. Станіславов¹, В.М. Кузнецов¹, О.В. Коченко¹, Т.Г. Калініченко¹,
А.В. Резнік², В.В. Стари́ков³, Р.А. Москаленко², А.М. Романюк²

¹ Інститут прикладної фізики НАН України, вул. Петропавлівська, 58, 40000 Суми, Україна

² Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007 Суми, Україна

³ Національний технічний університет «Харківський політехнічний інститут», вул. Фрунзе, 21, 61002 Харків, Україна

У роботі наведені результати досліджень морфології, структури, елементного та фазового складу кальцінованих фрагментів патологічних утворень щитоподібної залози. Методами рентгенівської дифракції та інфрачервоної спектроскопії встановлено, що всі досліджені патологічні кальцифікати являють собою дефектний карбонатзаміщений апатит кальцію $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Показано, що застосування просвічуючої електронної мікроскопії у комбінації з мікродифракцією електронів дозволяє виявити деякі структурні та морфологічні особливості кристалів апатиту щитоподібної залози, які не виявляються іншими методами. Завдяки цьому, та при умові застосування тонкого препарування на стадії анатомічних досліджень і підготовки проби, може бути реалізованим локальний морфологічний і структурний аналіз мінеральних часток депозиту, як при одному і тому ж клінічному випадку, так і при їх широкому різновиді.

Ключові слова: Кальцифікація, Щитоподібна залоза, Структура, Фазовий склад, Апатит.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРЫ

1. T. Kirsch, *Curr. Opinion Orthopedics* **18**, 425 (2007).
2. L. Stork, P. Müller R. Dronskowski, J.R. Ortlepp, *Z. Kristallogr.* **220**, 201 (2005).
3. M.L. Khoo, S.L. Asa, I.J. Witterick, J.L. Freeman, *Head Neck* **24**, 651 (2002).
4. J.V. Johannessen, M. Sobrinho-Simoes, *Lab. Invest.* **43**, 287 (1980).
5. J.L. Hunt, L. Barnes, *Am. J. Pathology.* **128**, 90 (2003).
6. Y. Bai, G. Zhou, M. Nakamura T. Ozaki, I. Mori, E. Taniguchi, A. Miyauchi, Y. Ito, K. Kakudo, *Modern Pathology* **22**, 887 (2009).
7. J. Lee, S.Y. Lee, S.H. Cha, B.S. Cho, M.H. Kang, O.J. Lee, *Thyroid* **23**, 1106 (2013).
8. B.K. Kim, Y.S. Choi, H.J. Kwon, J.S. Lee, J.J. Heo, Y.J. Han, Y.-H. Park, J.H. Kim, *Endocr. J.* **60**, 155 (2013).
9. H. Jin, K. Ham, J.Y. Chan, L.G. Butler, R.L. Kurtz, S. Thiam, J.W. Robinson, R.A. Agbaria, I.M. Warner, R.E. Tracy, *Phys. Med. Biol.* **47**, 4345 (2002).
10. E.I. Suvorova, P.A. Buffat, *J. Microscopy* **196**, 46 (1999).
11. R.A. Moskalenko, A.V. Rieznik, A.V. Gapchenko, H.G. Prokopyeva, A.S. Malceva, *World of Biology and Medicine* **3**, 324 (2015).
12. H.P. Klug, L.E. Alexander, *X-Ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials* (New York: Wiley: 1974).
13. S.N. Danilchenko, A.V. Koropov, I.Yu. Protsenko, B. Sulkiio-Cleff, L.F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.* **41**, 268 (2006).
14. T.I. Ivanova, O.V. Frank-Kamenetskaya, A.B. Kol'tsov, V.L. Ugolkov, *J. Solid State Chem.* **160**, 340 (2001).