Диагностика по капле крови. Кристаллизация биожидкостей.
Книга 2. Закрытая капля (краевая дегидратация).

Авторы:
Краевой Сергей Александрович
Колтовой Николай Алексеевич

Москва
2013

Аннотация.

Рассматривается перспективный метод диагностики заболеваний на основе кристаллизации капли сыворотки крови. Метод является простым, не требует дорогостоящего оборудования, оперативным, дешевым, безреагентным. Метод позволяет оценить общее состояние организма, нарушение работы отдельных подсистем организма, проводить мониторинг состояния организма, проводить скрининговые обследования, выявлять заболевания на ранней стадии. Метод позволяет выявлять раковые заболевания на ранней стадии. На основе обследования большого число пациентов удалось выделить набор диагностических признаков для диагностики различных заболеваний. Путем проведения большого количества экспериментов удалось выявить и описать динамику процессов, происходящих в высыхающей капле сыворотки крови. Понимание происходящих процессов позволило выявлять структурные и функциональные нарушения состояния крови. Книга предназначена для врачей, которые хотят использовать новые эффективные методы диагностики, и для специалистов, которые занимаются нанотехнологиями для разработки процессов самосборки.

Во второй (из четырех) книг рассматривается кристаллизация капли сыворотки крови методом закрытой капли (краевая дегидратация).

Глава 1. Процессы, происходящие при дегидратации методом закрытой капли.
1.1 Методика проведения кристаллизации.
1.1.1 Методика приготовление препарата методом закрытой капли.
1.1.2 Зависимость кристаллизации от объема капли.
1.1.3 Кристаллизация при повышенной температуре .
1.1.4 Разведение сыворотки.
1.1.5 Материал подложки.
1.2 Динамика процесса кристаллизации.
1.2.1 Возникновение интерференционных полос.
1.2.2 Последовательность кристаллизации.
1.2.3 Динамика образования структур по дням.
1.3 Течения.
1.4 Образование центральной области воздуха.
1.5 Образование краевых воздушных пузырей.
1.6 Структура границы воздух-сыворотка.
1.6.1 Образование осадка липидов в виде капель.
1.6.2 Формирование усов.
1.6.3 Формирование дендритов липидов.
1.7 Образование островов.
1.8 Структура границы остров - сыворотка.
1.9 Структура кристаллограммы.
1.10 Внешняя граница.
1.10.1 Структура внешней границы.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.10.2 Темные острова.
1.11 Трещины.
1.11.1 Трещины
1.11.2 Псевдотрещины.
1.11.3 Параллельные трещины.

Глава 2. Структуры в закрытой капле.
2.1 Сферолиты.
2.1.1 Большие яркие сферолиты (холестерин).
2.1.2 Ветвистые сферолиты (триглицериды).
2.1.3 Малые двойные сферолиты.
2.1.4 Малые оолитоподобные сферолиты (соли кальция).
2.2 Дендриты.
2.2.1 Дендриты соли (хлорид натрия).
2.2.1.1 Скелетные дендриты соли.
2.2.1.2 Прямоугольные дендриты соли.
2.2.1.3 Смешанные дендриты соли.
2.2.2 Дендриты разные.
2.3 Перья, полоски.
2.4 Иглы (моноурат натрия).
2.5 Капли .
2.6 Волокна.
2.7 Напряжения в высохшей капле .
2.8 Кристаллизация на поверхности.
2.9 Разные объекты.
2.10 Кристаллизация тестовых растворов.
2.11 Выделение объектов с помощью различных оптических методов.
2.12 Особенности процесса кристаллизации.
2.13 Структуры и процессы закрытой капли, аналогичные структурам открытой капли.

Глава 1. Процессы, происходящие при дегидратации методом закрытой капли.

1.1 Методика проведения кристаллизации.

1.1.1 Методика приготовление препарата методом закрытой капли.

Сыворотка крови объемом 10-20 мкл наносится на предметное стекло и накрывается покровным стеклом. Высушивание производится в эксикаторе с влагопоглотителем, помещенным в суховоздушный шкаф при температуре +37 градусов в течение 5-6 часов (Савина Л.В.).

Сыворотка крови объемом 20 мкл наносится на предметное стекло и накрывается покровным стеклом размера 10х10мм. Предварительно предметное стекло обрабатывается 0,02% раствором лецитина для обеспечения более высокого смачивания. Высушивание производится при температуре +37 градусов в течение 24 часов (Габинский Я.Л.).

При опускании покровного стекла на каплю стекло раздавливает каплю, капля растекается и предметное стекло опускается. Обычно для приготовления препаратов используется покровное стекло, которое имеет размера 24х24 мм и толщиной 0,1 мм.

Для достижения максимальной информативности кристаллограммы необходимо подобрать оптимальные условия для кристаллизации. Условия являются оптимальными, если при кристаллизации одной и той же сыворотки выявляется максимальное количество структурных элементов. Можно увеличивать время кристаллизации понижая температуру и увеличивая влажность. Можно уменьшать время кристаллизации повышая температуру и уменьшая влажность. Чем медленнее кристаллизация, тем более оптимальные условия для

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

формирования кристаллов. При быстром испарении воды (при высокой температуре) сыворотка быстро загустевает и не успевает происходить кристаллизация.

Кроме оптимальной методики кристаллизации большое значение имеет правильный выбор момента регистрации. Ошибочным является мнение, что чем больше времени прошло, тем лучше сформировались кристаллы. На самом деле кроме процессов роста кристаллов имеет место процесс разрушения кристаллов. Наиболее оптимальным является наблюдение кристаллов, когда сыворотка имеет структуру геля. Кристаллы в геле самые четкие. Например, при затвердевании сыворотки происходит разрушение кристаллов соли.

1.1.2 Зависимость кристаллизации от объема капли.

Покровные стекла, которыми накрывается капля сыворотки для кристаллизации, бывают различного размера: квадратные стеклянные размером 18х18 мм, 24х24 мм, круглые пластиковые диаметром 15 и 22 мм. Каплю так же можно накрывать предметным стеклом. Масса покровного стекла размером 24х24 мм равна 0,2 грамма. Масса предметного стекла размером 25х75 мм равна 4,75 грамма.

Накроем каплю объемом 2,5 мкл предметным стеклом. Получается капля между двумя предметными стеклами. Капля получается без фиксированных границ, капля не доходит до границ стекол и не фиксируется на них. Капля начинает постепенно сжиматься из-за испарения воды. На месте контакта капли со стеклом образуются усы.

Интересен следующий эксперимент. Каплю объемом 20 мкл накрывают покровным стеклом, а рядом капают вторую каплю объемом 20 мкл так, чтобы она касалась покровного стекла. В этом случае вторая капля затягивается под покровное стекло. При большом объеме капли воды вытесняется, при малом объеме капли вода затягивается. Какой объем капля является равновесным?

Таблица. 2-1. Теоретическая толщина слоя капли в зависимости от объема капли (покровное стекло 24х24 мм, площадь 576 мм2).

Объем, мкл	5	10	15	20	25	30	35	50	100	200	300
Высота пленки, мм	0,009	0,017	0,026	0,035	0,043	0,052	0,061	0,086	0,174	0,347	0,521
Высота высохшей пленки, мм	0,02	0,04	0,04	0,04	0,04	0,045	0,05	0,06			

Из общих соображений следует, что чем больший объем сыворотки кристаллизуется на фиксированной площади, тем больше кристаллов образуется. Увеличение объема сыворотки с пропорциональным увеличением площади кристаллизации приводит только к увеличению площади кристаллограммы, при той же насыщенности кристаллограммы различными структурами. Если раскапывать не 20 мкл под покровным стеклом 24х24мм, а 60 мкл под двумя предметными стеклами 25х76 мм, то информативность препарата возрастает в три раза. Проявляется в три раза больше структур.

Чем тоньше пленка, тем быстрее происходит испарение воды и быстрее происходит кристаллизация. И более четко проявляются различные структуры. Чем тоньше пленка, тем сильнее проявляется структура усов, так как в тонкой пленке более легкие условия для образования усов. Однако при изменении объема капли от 10 до 30 мкл толщина пленки практически не изменяется. Толщина пленки уменьшается при объеме капли меньше 15 мкл. При объеме капли 15 мкл образуется мало усов. При объеме капли 10 мкл образуется

среднее количество усов. При объеме капли 10 мкл образуется много усов. Толщину пленки можно изменить, положив на покровное стекло некоторый груз.

При опускании покровного стекла на каплю - капля раздавливается покровным стеклом.

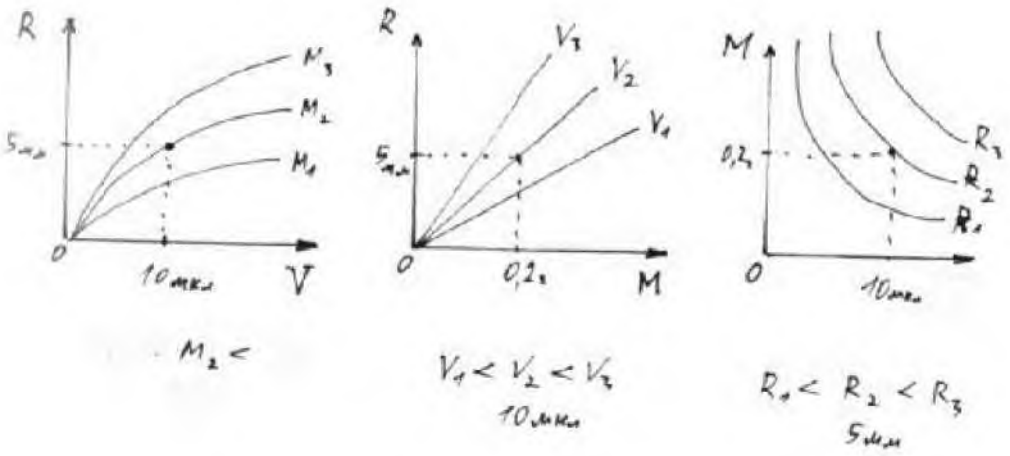
PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

При использовании покровного стекла размером 24х24 мм возможны различные варианта в зависимости от объема капли.

1- Очень малый объем капли. Если объем капли меньше 3 мкл, то капля при растекании занимает только центральную часть покровного стекла и не касается внешних границ (капля без фиксированных границ). Если сверху надавить на покровное стекло, то радиус капли под стеклом увеличивается. Капля не раздавливается совсем, толщину капли нельзя уменьшить до нуля, так как этому противодействует расклинивающее давление капли. При высыхании капли в центре остается небольшой круг затвердевшей сыворотки.

2- Малый объем капли - от 3 до 15 мкл. Вначале капля занимает всю поверхность под покровным стеклом. После высыхания капля занимает только центральную часть под покровным стеклом в виде круга радиуса R. Радиус круга R пропорционален объему капли V. Высота покровного стекал над предметным стеклом H (толщина пленки сыворотки) определяется весом покровного стекла M и расталкивающей силой капли. Стягивающая сила (капиллярный эффект) зависит от величины поверхностного натяжения (радиуса закругления мениска капли под покровным стеклом). V=пR2*H, H=c*M, где c - некоторая константа. Давление Лапласа - это стягивающее давление, возникающее под искривленной поверхностью.

P1=c/r = 2c/H, где c- коэффициент поверхностного натяжения, r-радиус кривизны r=H/2. Давление является стягивающим, так как вода смачивает стекло и мениск направлен внутрь капли. Давление покровного стекла P2=M/пЯ2. В результате получаем:



P1+P2= P3, где P3 - расклинивающее давление (Дерягин).

При дегидратации сыворотка переходит в гелеобразное состояние и быстро стягивается в центральной части покровного стекла в виде серпа. При этом покровное стекло поднимается. Кристаллы в этом случае не образуются. Для капель малого объема можно провести кристаллизацию, если на покровное стекло сверху положить груз фиксированной величины. В этом случае толщина капли станет стандартной (в зависимости от величины груза), независимо от исходного объема капли.

3- Допустимый объем капли - от 15 до 32 мкл. Капля растекается и занимает все

V

Ч *= И, 4**

Рис. 2-1. Взаимосвязь параметров R-радиус капли, V - объем капли, M - масса покровного стекла.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

пространство под покровным стеклом. Белка, который содержится в капле, хватает для формирования внешнего запирающего слоя белка. Происходит обычный процесс дегидратации. Когда объем капли равен 15 мкл, мениск с краю капли вогнутый, и высота
покровного стекла - 0,03 мм. Когда объем капли равен 32 мкл, мениск с краю капли выпуклый, и высота покровного стекла - 0,06 мм.

4- Большой объем капли - более 32 мкл. При объеме капли 200 мкл часть капли выдавливается из-под стекла. При объеме капли более 400 мкл большая часть капли выдавливается из-под стекла. В этом случае избыточная сыворотка вытесняется из под покровного стекла на предметное стекло. Вытесненная сыворотка быстро испаряется и в дальнейшем происходит обычный процесс дегидратации.

Таблица 2-2. Допустимый объем капли в зависимости от размера покровного стекла.

Размер покровного стекла	Площадь стекла, мм2	Минимальный объем	Высота, мм	Максимальный объем	Высота, мм
18x18 мм	270	8 мкл	0,03	15 мкл	0,06
24x24 мм	576	15 мкл	0,03	32 мкл	0,06
24x75 мм	1800	45 мкл	0,03	100 мкл	0,06
Предметное стекло 25x75 мм	1875				

1.1.3 Кристаллизация при повышенной температуре.

Кристаллизацию можно проводить при повышенной или при пониженной температуре. Для этого удобно использовать термостолик на основе элемента Пельтье. Температуру поверхности термостолика можно регулировать. На процесс кристаллизации существенным образом влияет соотношение двух скоростей - скорость выделения растворенного воздуха из сыворотки и скорость загустевания сыворотки. При повышении температуры увеличивается скорость выделения воздуха и увеличивается скорость загустевания. Чем меньше температура кристаллизации, тем более медленно происходят процессы, и тем большее количество различных структур образуется.

Максимальное количество структур образуется при температуре сушки 20 градусов. Время сушки покровного стекла площадью 25x25 мм составляет 15 дней.

При сушке при температуре 37 градусов все процессы ускоряются в два раза, но количество образуемых структур сокращается на 30%.

При температуре 80 градусов вода испаряется через боковую поверхность в течение четырех часов. В связи с быстрым испарением кристаллизации не происходит. Если объем капли 3 мкл, то уже через пять минут начинают выпадать липиды на границе сыворотки с воздушным пузырьком.

Вывод: кристаллизацию необходимо проводить при комнатной температуре. При повышении температуры информативность кристаллограммы уменьшается.

1.1.4 Разведение сыворотки.

При раскапывании одного и того же объема сыворотки в сыворотке, разведенной водой, количество воды увеличивается, а количество белка уменьшается. В результирующей кристаллограмме возрастает площадь зоны воздуха, и уменьшается площадь высохшей сыворотки. При разведении 1:8 (одна часть сыворотки на восемь частей воды) площадь высохшей сыворотки очень мала, и составляет всего 0,5% (3мм2 от общей площади 625мм2). Площадь высохшей сыворотки пропорциональна количеству белка в сыворотке.

Таблица. 2-3. Зависимость площади высохшей сыворотки от степени разведения.

Разведение сыворотки	100%	50%	25%	12%	6%
Площадь высохшей сыворотки, мм2	300	150	75	37	18
Площадь высохшей сыворотки, %	50%	25%	12%	6%	3%

Структура кристаллограммы при разведении упрощается. Так как уменьшается

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

количество липидов, то граница пузырьков воздуха с сывороткой становится боле тонкой и четкой. Формируется мало дендритов липидов. При разведении сыворотка 12% нарушается структура кристаллограммы, не образуется краевая зона белка. Кристаллограмма представляет собой несколько небольших островов в центральной части покровного стекла.

Площадь сыворотки после высыхания пропорциональна количеству белка в сыворотке. Таким образом получаем, что если раскапывать один и тот же объем сыворотки с постоянным коэффициентом разведения, то площадь прямо пропорциональна с некоторым коэффициентом количеству общего белка в сыворотке крови. Коэффициент пропорциональности определяется на основе раскапывания тестовых растворов, содержание белка в которых было заранее определено другими методами. Оптимальное разведение для количественного определения белка составляет 12% сыворотки.

Вывод: разведение сыворотки нецелесообразно, уменьшается информативность кристаллограммы.

1.1.5 Материал подложки.

Большое значение имеет взаимодействие поверхности материала с молекулами белка для образования различных структур на поверхности подложки. Оказывается, если предметное стекло, на которое наносится сыворотка, предварительно обработать раствором лецитина, то количество образуемых структур увеличится в два раза по сравнению с обезжиренным предметным стеклом.

Для получения стандартных условий кристаллизации и наиболее эффективного текстурообразования предметное и покровное стекло предварительно обрабатывалось по методике, предложенной D.M. Small (1977), для создания на поверхности стекол гидрофобной лецитиновой пленки.

Вывод: для увеличения информативности кристаллограммы необходимо обрабатывать предметное стекло раствором лецитина.

Если вместо покровного стекла накрывать каплю сыворотки пластинкой из пластика, то сцепленные сыворотки с пластиком будет более слабое. Пластик легко отскакивает в лютой момент. Все структуры остаются на предметном стекле.

1.2 Динамика процесса кристаллизации.

В исходной капле сыворотки крови содержится 90% воды. Значит, при дегидратации должно испариться 9/10 объема жидкости, и покровное стекло после дегидратации должно опуститься до 1/10 от исходной высоты. Если начальная толщина слоя составляет 0,1 мм, то после дегидратации толщина слоя должна быть 0,01 мм. Однако все обстоит гораздо сложнее. По краям покровного стекла остается свободная поверхность капли, через которую происходит испарение воды. Испарение воды происходит медленно, так как полоска свободной поверхности по бокам очень узкая, и мениск поверхности капли вогнутый. Так как испарение происходит с боков, то в краевой области образуется повышенная концентрация белка и пониженная концентрация воды по сравнению с центральной областью капли. В связи с этим из области повышенной концентрации воды (центральная область) начинается диффузия воды в область пониженной концентрации воды (краевая область). Образуется поток молекул воды из центральной области в краевую область. Вода из центральной области не может испариться вверх через покровное стекло, поэтому она диффундирует к краю, и там испаряется.

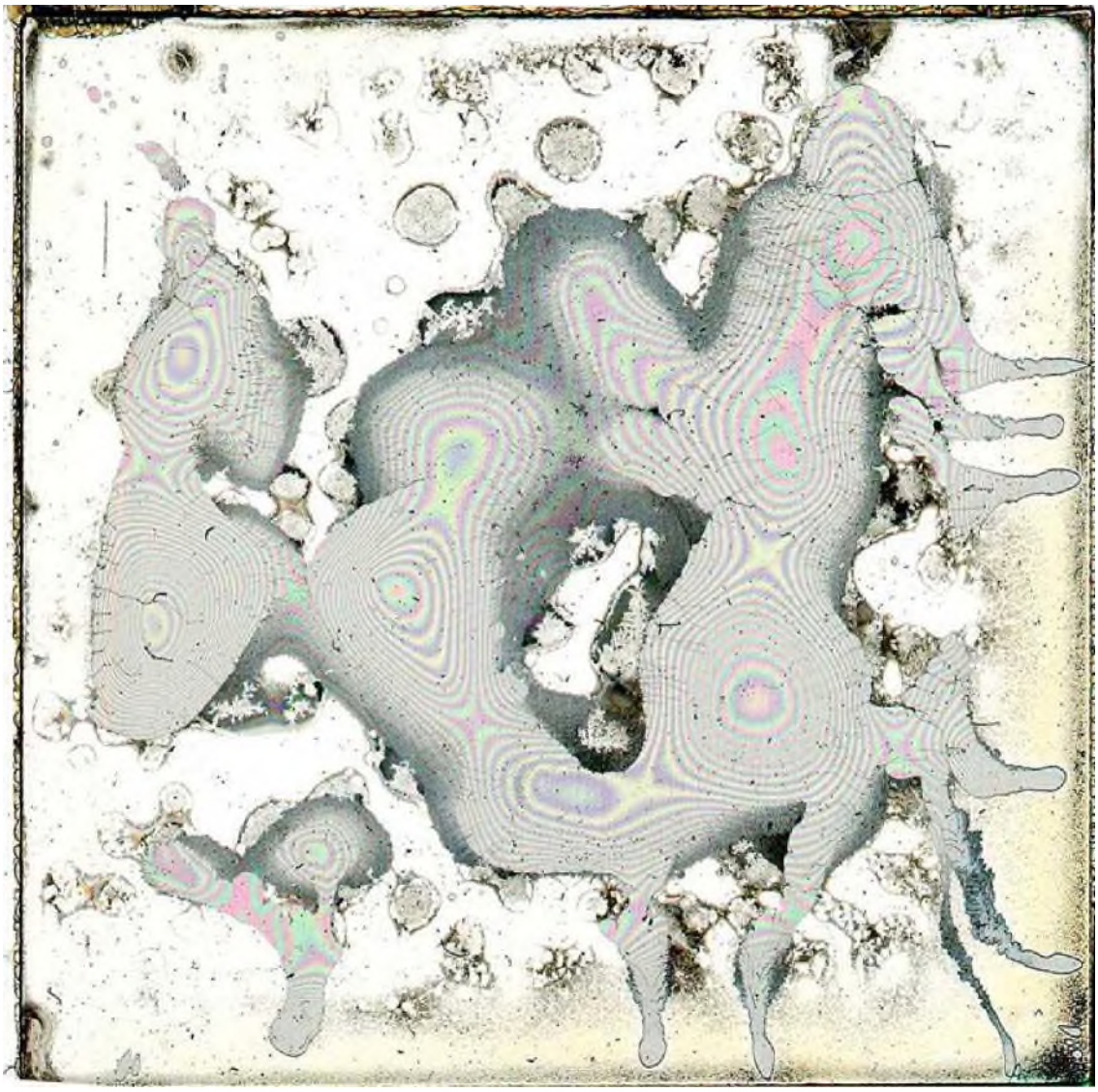
Происходит затвердение краевой области, и образуется кольцо из белка в виде затвердевшего геля. Необходимо отметить, что структура затвердевшего белка по краю является довольно рыхлой, с большими ячейками. Поэтому молекулы воды без труда покидают каплю через застывшее кольцо, а молекулы воздуха без труда поникают внутрь капли.

Затвердевшие белки в краевой области имеют структуру, аналогичную структуре белков в краевой области, получаемую методом открытой капли. Центральная часть капли в этот момент еще имеет жидкое состояние. В дальнейшем центральная часть капли остается в гелеобразном состоянии практически все время. Не в жидком, а именно в гелеобразном состоянии. Это выясняется путем удаления верхнего покровного стекла через несколько

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

месяцев после начала дегидратации. Твердое внешнее кольцо не позволяет опускаться покровному стеклу при испарении воды. Но так как вода все равно продолжает испаряться и объем геля продолжает уменьшаться, то опускается только центральная часть покровного стекла. В результате опускания центральной части покровного стекла в центральной части капли создается разряжение, область с пониженным давлением. Этот прогиб хорошо виден в микроскоп с помощью фазового метода контраста в виде цветных полос вдоль границы геля. Прогиб покровного стекла так же можно наблюдать глазом при боковом освещении в виде цветных интерференционных полос. Причиной возникновения интерференционных полос так же может быть наличие тонкой пленки сыворотки (липидов), находящихся на поверхности стекла в области воздушного пузырька.

Иногда опускание настолько сильное, что покровное стекло трескается.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 2-2. Общий вид препарата сыворотки крови, приготовленный методом закрытая капля. Видны интерференционные кольца, появившиеся в результате прогиба покровного стекла. Видна центральная область воздуха, краевые пузырьки и острова. Поле зрения 27 мм.

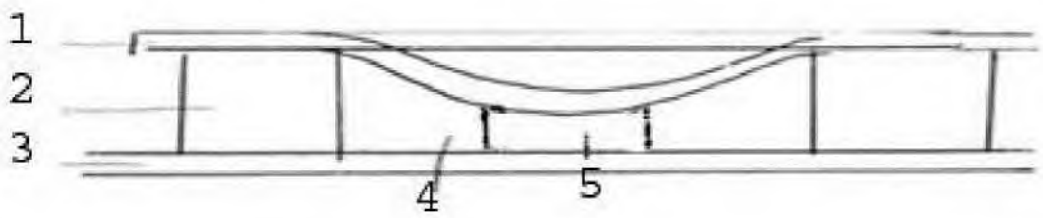


Рис. 2-3. Схема вдавливания покровного стекла при кристаллизации. 1-покровное стекло, 2-затвердевший белок, 3- предметное стекло, 4-гель, 5-воздух.

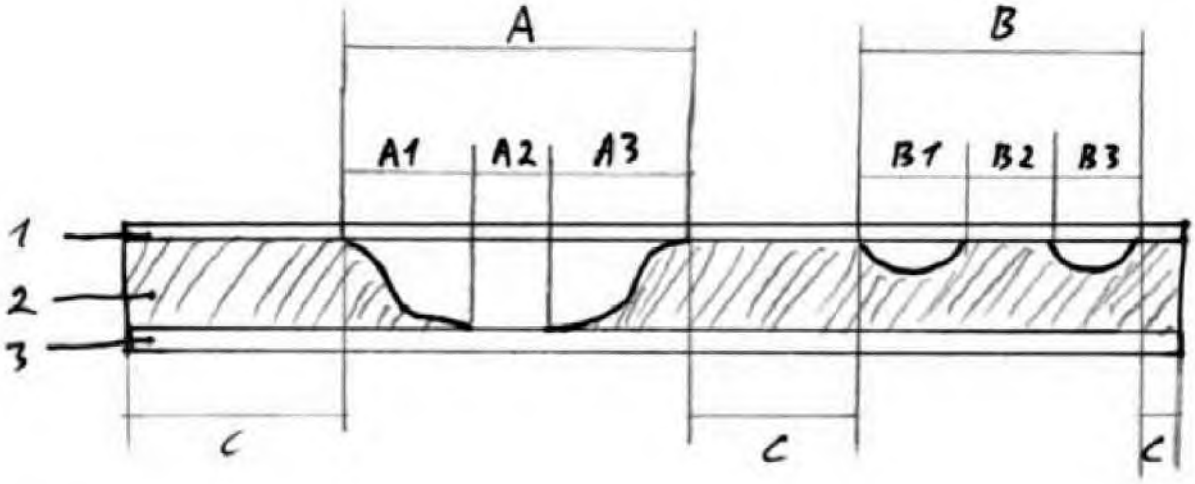


Рис. 2-4. Структура зон после процесса кристаллизации.

1- покровное стекло,
2- затвердевшая сыворотка,
3- предметное стекло,
A-Зона центрального пузырька воздуха,
A1 и A3 -зона липидов (блестит при боковом освещении, цветные интерференционные полосы)
A2 - зона воздушного пузырька (блестит при боковом освещении)
B - зона острова,
B1 и B3 - зона липидов (блестит при боковом освещении, цветные интерференционные полосы)
B2 - центральная зона острова, дендрит
C - зона затвердевшей сыворотки.

При зеркальном освещении (отраженный свет, освещение и наблюдение под углом 45 градусов к вертикальной оси) четко выделяется зона липидов и воздуха.

1- Там где нет контакта сыворотки с покровным стеклом, происходит зеркальное отражение и эта область блестит (зона воздуха).

2- Там где нет контакта сыворотки со стеклом но имеются неоднородности в виде осадка липидов, происходит рассеяние света. Эта область выглядит светлой.

3- Там где имеется контакт покровного стекла с сывороткой (зона белка) луч света проходит без отражения, и данная область выглядит темной.

Таблица 2-4. Различные варианты наблюдения и освещения.

		Наблюдение	Глаз	Сканер	Микроскоп	Микроскоп
		Освещение	зеркальное	Проходящий свет	Проходящий свет	Темное поле
1	Зеркальное отражение	Область воздуха	Блестящая	серая	Серая	Черная

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2	Рассеяние	Граница, липиды	Белая	Темная	Коричневая	Белая
3	Прохождение	Область сыворотки	Темная	Белая	Серая	Черная

1.2.1 Возникновение интерференционных полос.

Можно наблюдать два вида интерференционных полос в зависимости от метода регистрации и причины образования полос.

1- Интерференционные полосы, вызванные прогибом покровного стекла. Существуют два типа прогиба.

-Общий прогиб покровного стекла, вызванный формированием затвердевшей сыворотки по краю покровного стекла. При этом формируются интерференционные полосы параллельные краю покровного стекла. Эти полосы слабо видны на фоне затвердевшей сыворотки.

-Прогиб над пузырьками воздуха. Интерференционные полосы идут параллельно границе пузырька. Эти полосы четко видны на фоне воздушного пузырька.

Интерференционные полосы можно наблюдать следующими способами:

а- полосы видны невооруженным взглядом в режиме зеркального освещения. В этом режиме блестит поверхность предметного стекла, и на покровном стекле блестит зона воздушных пузырьков, так как свет отражается от поверхности стекла. Зона затвердевшей сыворотки выглядит серой, так как лучи света не отражаются, а проходят насквозь. В этом случае полосы видны только в зоне воздушных пузырьков.

б- полосы видны при наблюдении в микроскоп в проходящем свете при малом увеличении (4х),

в- полосы видны при сканировании препарата на планшетном сканере в режиме на просвет. Разумеется, что при сканировании необходимо размещать препарат покровным стеклом на стекло сканера. Тогда будут видны интерференционные полосы покровного стекла. Иначе будут видны интерференционные полосы предметного стекла.

При сканировании стекла с высохшей каплей сканером наблюдается две системы интерференционных полос:

-одна интерференционная полоса соответствует прогибу стекла на величину равную длине волны света. Число интерференционных полос на прогибе - от 1 до 40, значит величина прогиба - от 0,5 мкм до 20 мкм. Толщина самого покровного стекла равна 100 мкм.

-первая система полос формируется покровным стеклом, и отражает прогиб покровного стекла в зоне воздушных пузырьков,

-вторая система полос формируется предметным стеклом. Это параллельные полосы, отражающие положение стекла относительно стекла сканера. Особо четко двойная система полос видна при высыхании капли между двумя предметными стеклами.

-интерференционные полосы возникают в области воздушных пузырьков и вызваны уменьшением расстояния между предметным и покровным стеклом.

-в области контакта затвердевшей сыворотки со стеклами интерференционных колец нет. - наблюдаются при параллельном освещении снизу, например, при вводе изображения кристаллограммы с помощью сканера в режиме работы на просвет.

-интерференционные кольца наблюдаются в обоих режимах сканирования - когда покровное стекло находится сверху, и когда покровное стекло находится снизу.

-если каплю накрывать не покровным стеклом, с пластинкой из пластика, то интерференционные кольца получаются более частыми, так как пластик более гибкий, чем стекло.

-Капнем маленькую каплю, которая под покровным стеклом не касается границ (1мкл). Тогда интерференционные кольца говорят о том, что происходит уменьшения давления внутри капли из-за вогнутого мениска. Это вызывает прогиб стекла над каплей.

-Если сыворотка находится между двумя предметными стеклами, то интерференционные кольца отражают в основном общий прогиб стекол в центральной части. Прогиб над областями воздуха

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

очень маленький из-за большой толщины предметных стекол.

2- Интерференционные полосы, вызванные наличием пленки липидов. Интерференционные полосы вызваны наличием пленки липидов переменной толщины. Интерференционные полосы возникают в области границы между воздушными пузырьками и затвердевшей сывороткой. Наблюдаются при зеркальном освещении (освещение и наблюдение под углов 45 градусов к вертикали). Интерференционные полосы видны с двух сторон - со стороны покровного и предметного стекла. Значит, пленка липидов находится и на покровном и на предметном стекле.

Таблица. 2-5. Выявление различных областей при различных методах освещения.

Зона	Зеркально е	Проходящее	Темнопольное	Поляризационное	Фазовый
Сыворотка	Темная	светлая	темная	темная	однородная
Воздух чистый	Блестит	Светло серый	темный	темный	однороден
Воздух эфиры	Блестит	Светло серые	серый	Яркие точки	Плохо видны
Липиды	Блестит, Интерф. полосы	Темно серые	серые	светятся	Четко видны
Дендрит соли	темный	светлый	темный	темный	Четко виден

Если после кристаллизации удалить верхнее покровное стекло, то на нем практически не остается следов. Все основные компоненты оседают на нижнем предметном стекле. После удаления покровного стекла интерференционные полосы пропадают.

Если проводить кристаллизацию между двумя предметными стеклами, то процессы кристаллизации существенно изменяются. Так как верхнее предметное стекло практически не прогибается, то нет засасывания внешнего воздуха. Так как предметное стекло тяжелее покровного, то оно сильнее расплющит каплю, и толщина слоя сыворотки уменьшится. ,то тоже сказывается на процессах кристаллизации. В результате отсутствует структура капли, нет центральной воздушной области. Воздушная область формируется не в центре, а в виде бублика вдоль края предметного стекла.

Прогиб покровного стекла может быть вызван следующими причинами:
1- уменьшение объема сыворотки за счет испарения воды (при фиксированной высоте по краям за счет высохшего белкового валика.
2- уменьшение объема сыворотки за счет сжатия белка при испарении воды. Покровное и предметное стекло стягиваются сжимающимся белком (который прикреплен к стеклам).
3- уменьшение объема сыворотки за счет стягивания (сжатия) белка к зафиксированному краю покровного стекла. В результате этого образуется разреженный воздушный пузырь в центре покровного стекла (область пониженного давления). В связи с этим максимальный прогиб покровного стекла наблюдается в области воздушного пузыря.

1.2.2 Последовательность кристаллизации.

Для кристаллизации некоторого вещества из раствора (геля) необходимо выполнение двух условий:
-достаточно высокая концентрация данного вещества,
-достаточно высокая подвижность молекул данного вещества в растворе.

Можно предположить, что в начальный момент все компоненты в сыворотке распределены более или менее равномерно и сыворотка однородна. Через некоторое время сыворотка загустевает с краев и остается жидкой в середине. Таким образом, кристаллизация происходит в основном в центральной части, где более сильная диффузия.

1- Пузырьки. Наиболее подвижными в сыворотке оказываются молекулы растворенных газов. Они имеют небольшой размер и довольно высокую концентрацию. Таким образом, в

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

первую очередь происходит «кристаллизация» растворенных газов - образование пузырьков воздуха. Пузырьки воздуха размером 0,01 мм образуются уже через час после начала процесса. Пузырьки очень быстро растут. За 10 минут пузырьки увеличиваются в размере в два раза. Пузырьки растут до определенного размера, порядка 0,1 мм.

Испаряется вода, уменьшается объем сыворотки. Начинается засасывание внешнего воздуха. Причиной является поверхностное натяжение, которое: -удерживает внешний край воды, и не дает ему сжаться, -удерживает покровное стекло и не дает ему опуститься.

В дальнейшем происходит затвердевание внешнего края сыворотки, и вместо поверхностного натяжения эти две функции выполняет затвердевший белок.

На второй день образуется несколько пузырьков среднего размера, растут краевые пузырьки.
На третий день образуется несколько крупных пузырьков с гладкими границами.
На четвертый день сливаются крупные пузырьки, формируется центральная область воздуха.
На пятый день происходит формирование усов и начинает формироваться граница липидов.

2- Светящееся кольцо. По краям покровного стекла начинает происходить загустевание сыворотки. Через один день (иногда уже через один час) недалеко от края покровного стекла образуется два кольца. Ближе к краю образуется кольцо из мелких агрегатов. Ближе к центру образуется кольцо из мелких капель. Кольцо из мелких капель ярко светится при темнопольном режиме и боковом освещении. Это кольцо аналогично светящемуся кольцу, которое возникает при движении фронта фазового перехода в открытой капле. На второй день светиться стала вся центральная область. Светящееся кольцо расширилось, сместилось к центру и заняло всю центральную область. Во всей центральной области выпал осадок в виде капелек. Светящееся кольцо является фронтом (областью) загустевания сыворотки.

Структура светящегося кольца при движении от центра к краю покровного стекла. В центре покровного стекла перед кольцом заметно движение различных микроорганизмов в еще жидкой сыворотке. На внутреннем краю светящегося кольца становятся видны большие круглые агрегаты в виде капель практически одинакового диаметра - 3 мкм. При движении к центру светящегося кольца резко увеличивается количество капель. Некоторые капли выглядят слившимися. В центре кольца капли занимают практически половину всей видимой площади. При дальнейшем продвижении к краю кольца видно, что количество капель уменьшается, видно, что все поле зрения заполнено разрушенными каплями. Затем кольцо пропадает. Это уже загустевшая сыворотка, и в этой области никакого движения уже не наблюдается.

3- Дендриты соли. Затем начинается кристаллизация соли в виде дендритов. Центры кристаллизации расположены равномерно по всей области капли. Кристаллизация

начинается там, где имеются некоторые неоднородности. Соль в растворе находится в виде ионов Na+ и Cl-. Ионы окружены гидратной оболочкой, но они все равно намного меньше молекул белков и липидов. Происходит образование дендритов соли. Если на кристаллограмме дендрит соли окружен пузырьком воздуха, или граница пузырька воздуха прогибается - значит дендрит соли образовался раньше того момента, когда до него дошла граница пузырька воздуха. Если дендрит соли упирается в ровную границу пузырька воздуха, и в этом направлении он слабо развит - значит граница пузырька воздуха застыла до того момента, когда рос дендрит соли.

4- Иглы. Затем начинается кристаллизация уратов, солей мочевой кислоты. Мочевая кислота присутствует в сыворотке в виде солей. Происходит образование игольчатых кристаллов.

Все дальнейшие события разворачиваются на границе вокруг пузырьков воздуха и дендритов соли.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

5- При образовании центральной области воздуха на границе раздела воздух- сыворотка происходит концентрация липидов, которые являются поверхностно-активными веществами. На границе воздушного пузырька собираются все липиды, которые находились в сыворотке в том объеме, который теперь занимает воздушный пузырек. Концентрация липидов происходит так же на границе раздела между дендритом соли и сывороткой. Липиды как бы раздвигаются при росте дендрита соли. «Кристаллизация» липидов начинается в некоторый определенный момент фазового перехода. Липиды начинают оседать на дне воздушного пузырька при росте воздушного пузырька. Затем расширение воздушного пузырька прекращается, и липиды начинают формировать дендритную структуру от границы. Липиды выделяются из сыворотки в виде растущих дендритов с тонкими или толстыми веточками. Толстые ветки касаются и нижнего стекла и верхнего стекла. Границы толстых веток четко видны. Тонкие ветки расположены на нижнем стекле и не касаются верхнего стекла. Границы тонких веток видны при фазовом методу наблюдения. Над тонкими ветками находится воздух.

При образовании дендритов молекулы липидов теряют гидратную оболочку и объединяются. Объем липидов уменьшается. Так как в этот момент сыворотка уже обладает высокой вязкостью (гель), то образовавшееся место заполняется воздухом из воздушного пузырька. Таким образом вокруг островов и пузырьков воздуха образуется полоса липидов с воздушной прослойкой. При зеркальном освещении эта полоса блестит. Зона воздушных пузырьков так же блестит. Но в полосе липидов наблюдаются яркие интерференционные полосы, вызванные наличие липидной пленки. В зоне пузырьков интерференционные полосы очень слабые.

Рост дендритов липидов начинается так же вокруг дендритов соли и образуются так называемые острова.

6- Затем начинается кристаллизация крупных молекул холестерина в виде больших сферолитов. Имеется две основных локализации крупных сферолитов:
-на границе островов, где имеется высокая концентрация липидов и холестерина, -в свободной сыворотке, где более легкая диффузия.

1.2.3 Динамика образования структур по дням.

Кристаллизация проводится при комнатной температуре 25 градусов.

1 день - начинается образование маленьких пузырьков.

2 день - образуется несколько пузырьков среднего размера, растут краевые пузырьки, образуется несколько крупных пузырьков с гладкими границами. Затвердевает краевая область по границе покровного стекла.

3 день - сливаются крупные пузырьки, формируется центральная область воздуха, выпадение эфиров холестерина на границе воздух-сыворотка, формирование усов,

4 день - начинают расти дендриты липидов, образуются иглы и перистые кристаллы,

7 день - растут дендриты липидов, образуются малые сферолиты.

8 день - образуются дендриты соли,

10 день - растут дендриты липидов, образуются большие сферолиты, формируются крупные дендриты соли, начинается формирование островов.

14 день - начинают образовываться острова,

18 день - растут дендриты липидов, разрушились дендриты соли.

20 день - завершается рост дендритов липидов, островов, образуются напряжения в затвердевшем геле за счет роста кристаллов.

Время формирования различных структур в днях (когда начинается формирование и когда заканчивается формирование структуры):
-Воздушный пузырек - начало 0, конец 5, -Краевые пузырьки - начало 1, конец 2,
-Дендриты соли - начало 2, максимум 3, разрушение 14, -Иглы - начало 2, конец 6,
-Перья - начало 3, конец 7, -Дендриты липидов - начало 2, конец 12,

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-Напряжения в высохшей капле - начало 2, конец 14, -Сферолиты - начало 14, конец 20.

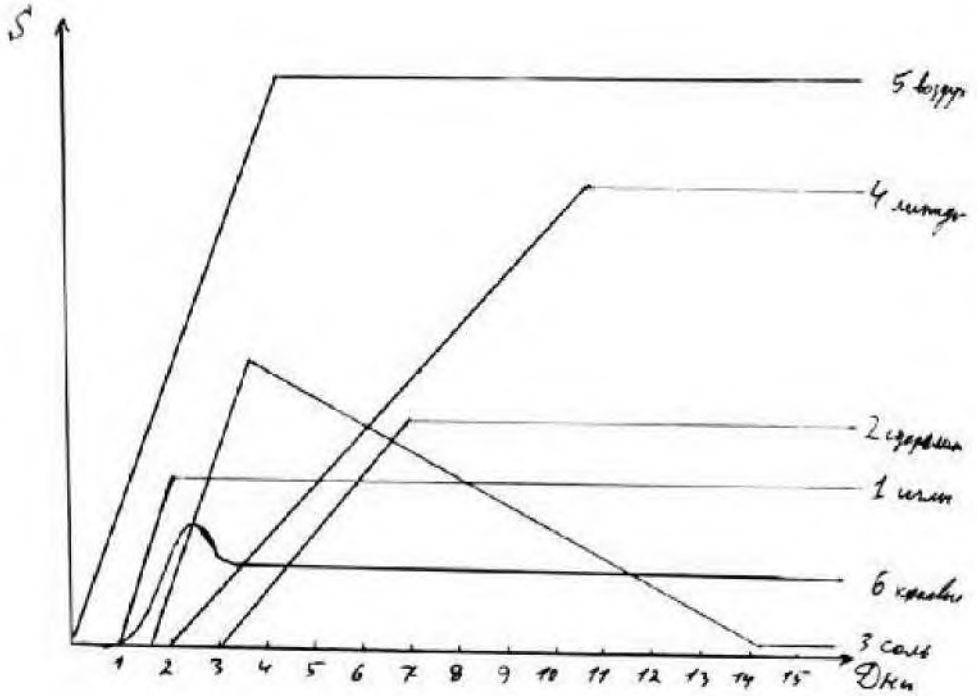


Рис. 2-5. Зависимость размеров (площади) различных структур от времени (дни).
1-иглы,
2-сферолиты,
3-дендриты соли,
4-дендриты липидов,
5-воздушный пузырек,
6-краевые пузырьки.

Рост кристаллов начинается только после достижения необходимой концентрации раствора, на второй день.

Кроме значения суммарной площади данного типа кристаллов (игл, дендритов, сферолитов) большое диагностическое значение имеет распределение различных типов кристаллов по размерам. Например, при быстрой кристаллизации образуется много мелких сферолитов. При медленной кристаллизации образуется мало, но большие сферолиты. Общая площадь при этом одинакова, и соответствует исходной концентрации вещества в растворе. Предполагается, что все имеющееся в растворе вещество кристаллизовалось.

Например, для диагностики важно количество мелких, средних и крупных сферолитов.

Необходимо отметить, что динамика процессов различна в различных частях капли . С краю капли сыворотка быстро затвердевает, и процессы останавливаются. Чем ближе к центру капли - тем дольше осуществляется динамика процессов.

Важно, что структура кристаллов со временем не только может улучшаться, но может и ухудшаться. Оптимальные условия кристаллизации - в геле. Сыворотка проходит три состояния - жидкое, гелеобразное и твердое. Наилучшие условия для оценки структуры кристаллов - гелеобразное состояние. При затвердевании сыворотки происходит разрушение многих структур. Таким образом, получаем, что оптимальные условия оценки структуры кристаллов - от 9 до 12 дня после начала кристаллизации. Однако для разных препаратов данный интервал может изменяться.

1.3 Течения.

Если в сыворотку добавить мелкие частицы, то становятся видны течения под покровным стеклом. Течения не являются стационарными. Течения возникают из-за различных граничных

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

условий по краям покровного стекла. Возникает перетекание жидкости из одного края стекла к другому. Крупные частицы оседают на дно, а мелкие частицы, которые находятся во взвешенном состоянии, двигаются по течению. Интересно, что направление движения пузырьков воздуха не всегда совпадает с направлением движения остальных частиц.

Кроме переменных течений существует основное тороидальное течение - от центра к краю по дну и от края к центру по верхней части пленки сыворотки. Это течение особенно хорошо видно если в сыворотку добавить трейсеры - эритроциты. Течением эритроциты выносятся в краевую зону покровного стекла. Этим течением в краевую зону выносятся все частицы и крупные молекулы. В результате в краевой зоне повышается концентрация белков, молекулы которых имеют большие размеры. Это же течение выносит в центральную область пузырьки воздуха, так как пузырьки воздуха находятся в верхнем слое сыворотки.

Через один день после начала процесса сыворотка загустевает настолько, что течения прекращаются.

1.4 Образование центральной области воздуха.

При испарении воды после затвердения кромки уменьшение объема геля за счет сжатия геля с боков и за счет опускания покровного стекла уже невозможно. Тогда уменьшение объема геля в результате испарения воды осуществляется за счет образования в центре воздушного пузырька из растворенного воздуха и сжатия геля от центра к краю. Воздух поступает из двух источников - растворенные газы в сыворотке и воздух снаружи. При испарении воды концентрация растворенных газов увеличивается, так же как увеличивается концентрация всех остальных растворенных веществ. Так как растворимость газов при постоянной температуре не изменяется, то начинается выделение газов. В норме к сыворотке крови имеются два основных газа - углекислый газ (CO_2) и кислород (O_2). Газы

находятся в нескольких состояниях - растворенном, слабо связанном и сильно связанном состоянии. Молекулы газов могут входить в структуру ячеек воды в виде клатратов.

Количество растворенных газов. Абсорбционный коэффициент - количество газа, растворенное в 1 см3 жидкости при нормальных условиях. Абсорбционные коэффициенты для плазмы крови: кислород - 0,023, азот - 0,012, углекислота - 0.541. Содержание двуокиси углерода - 5% в растворенном виде, 80% - в связанном виде (в виде бикарбонат ионов HCO_3). Парциальное давление в норме 40 мм ртутного столба. Парциальное давление кислорода - 80 мм ртутного столба.

Газы начинают выделяться равномерно по всему объему на микроскопических центрах газообразования (частицы, кристаллики) у которых имеется свободная поверхность, и образуются маленькие пузырьки. Основными центрами газообразования являются микропузырьки (нанопузырьки) газов, которые присутствуют в исходной сыворотке крови.

Интересен следующий эффект. Иногда в сыворотке содержатся твердые включения - агрегаты, кристаллы. В процессе испарения воды покровное стекло опускается. В некоторый момент, когда размер включения станет равным расстоянию между стеклами, включение начинает играть роль распорки. В этом месте образуется как бы купол, возвышение. В этом месте начинает собираться воздух. Включение становится центром большого воздушного пузыря. Возможна реализация следующей методики для стандартизации вида получаемых структур. В центр капли, перед накрыванием покровным стеклом, помещается стандартная микросфера диаметром 0,2 мм. Данная микросфера будет центром формирования центральной воздушной области, и структуры сформировавшихся капель будут похожими - в центре будет большая воздушная область, и все структуры вокруг нее.

Некоторые пузырьки образуются при накрывании капли покровным стеклом.

Нанопузырьки. Нанопузырьки образуются в результате температурных флуктуаций плотности из растворенных в сыворотке газов - кислорода и углекислого газа. Пузырьки имеют размер от 20 до 200 нм. Пузырьки являются термодинамически метастабильными в результате адсорбции ионов на их поверхности. Граница воды и газовой фазы пузырьков заряжена

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

отрицательно. Пузырьки снаружи окружены облаком противоионов. Снаружи на пузырек действует внешнее давление и поверхностное натяжение. Изнутри на пузырек действует кулоновское отталкивание адсорбированных ионов и движение молекул газа.

Пузырьки размером 0,01 мм образуются уже через 1 час после начала процесса. Пузырьки быстро перемещаются к центру. Маленькие пузырьки двигаются быстрее. Большие пузырьки двигаются медленнее.

Так как выделение газов внутрь уже существующего пузырька более эффективно, чем образование нового пузырька, то пузырьки начинают увеличиваться в размерах. Если два пузырька образовались рядом, то между ними возникает сила притяжения, вызванная силами поверхностного натяжения. В результате этого близкие пузырьки слипаются. Пузырьки слипаются, но не сливаются. Между пузырьками остается тонкая перегородка из поверхностно-активных веществ - липидов. Затем начинается движение пузырьков к центру.

Существует несколько способов объяснения движения воздушных пузырьков к центру.

1- градиент плотности. Движение к центру объясняется движением по градиенту плотности. С краев сыворотка более твердая и более плотная из за повышенной концентрации белка. В центральной части капли сыворотка более жидкая и менее плотная. Поэтому пузырьки воздуха начинают двигаться к центру.

2- пониженное давление. В центре существует область пониженного давления, которая так же способствует движению пузырьков к центру.

3- течения. В высыхающей сыворотке существует глобальное течение, направленное снизу от центра к краю, и сверху - от края к центру. Так как пузырьки воздуха находятся в верхнем слое, то их течением уносит к центру.

На самом деле действуют все причины. Пузырьки двигаются с разной скоростью. Если диаметр пузырька меньше расстояния между стеклами, то он двигается по течению со

скоростью среды. Для больших пузырьков скорость движения определяется двумя силами - сила тяги к центру, и противодействующая ей сила трения. Сила трения складывается из силы сцепления пузырька с поверхностями стекол и силы сопротивления вязкой среды. Иногда наблюдается эффект броска. Пузырек стоял на месте, а потом резко сместился к центру на большое расстояние. Это означает, что его сдерживала некоторая сила сцепления. Так как пузырек растет, то сила тяги постепенно возрастала. Когда сила тяги превысила силу сцепления, произошел бросок пузырька - резкое смещение к центру.

При движении пузырьков на их поверхности скапливаются липиды, которые являются поверхностно-активными веществами. Поверхностно-активные вещества всегда концентрируются на границе раздела между жидкостью и воздухом. В центральной части покровного стекла пузырьки собираются в одну кучу. При слипании между собой пузырьки не сразу лопаются, а некоторое время остаются разделенными друг от друга тонкими пленками, как в пене. При этом толщина разделяющей пленки становится везде одинаковой. Разделяющая пленка состоит из двух слоев ПАВ, между которыми находится прослойка воды. Чем больше концентрация ПАВ (липидов), тем толще и устойчивее разделяющие пленки. В чистой воде перегородки лопаются сразу при касании пузырьков. Остатки этих перегородок иногда сохраняются до конца процесса высыхания. При этом сохраняются до конца те перегородки, которые оказываются зафиксированными некоторыми неоднородностями, находящимися в сыворотке: пылинками, кристаллами. Эти перегородки светятся в поляризованном свете, так как они образованы белками и липидами. Так как среда очень вязкая, то движение пузырьков к центру очень медленное. Некоторые пузырьки, которые образовались позднее, не успевают добраться до центральной области, и при загустении сыворотки останавливаются на некотором удалении от центра. В результате в центральной части покровного стекла образуется центральная область, свободная от сыворотки, и заполненная газом - один большой газовый пузырь. Так как образование и движение внутренних пузырьков происходит на раннем этапе, когда сыворотка еще жидкая, то все пузырьки успевают дойти до центра и слиться вместе. Величина области воздуха (площадь) пропорциональна количеству газов, растворенных в сыворотке крови. Если бы не было фиксации краевой области, то не происходило бы образование газового пузыря в центре покровного стекла. Центральный воздушный пузырь не

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

имеет идеальной круглой формы. Неоднородность края вызвана неоднородностью концентраций и состава высыхающей капли и неоднородностью поверхности предметного стекла. Там, где концентрация белка меньше и состояние геля более жидкое - граница пузырька продвигается к краю быстрее. Фронт роста пузырька так же огибает более плотные области, в которых сцепление с поверхностью стекла боле сильное, и в которых началась кристаллизация. Необходимо отметить, что рост центрального пузырька происходит за счет газов, поступающих за счет диффузии через внешнюю границу пузырька.

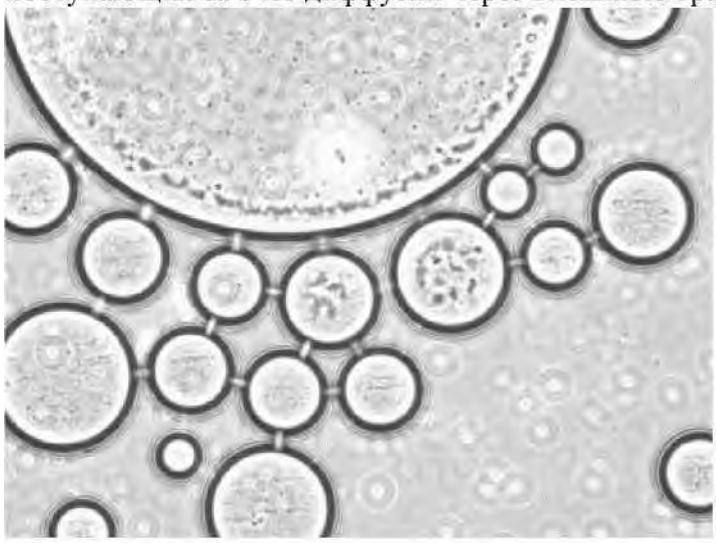


Рис. 2-6. Начальный этап скопления воздушных пузырьков в центральной области. Фазовый контраст. Поле зрения 1,5 мм.

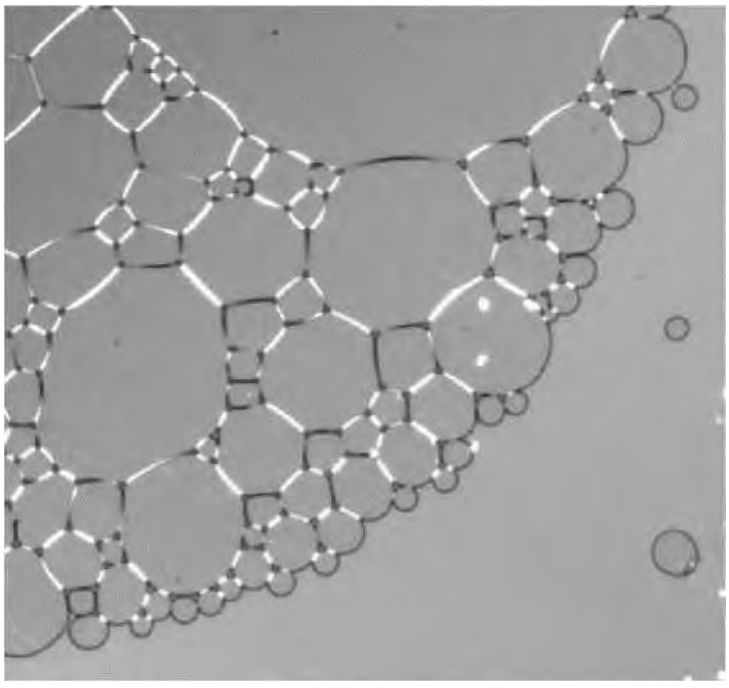


Рис. 2-7. Слипание пузырьков на более позднем этапе. Поляризованный свет. Поле зрения 5 мм.

1.5 Образование краевых воздушных пузырей.

Второй тип воздушных пузырей - краевые пузырьки. Краевые пузырьки образуется с краю покровного стекла. Краевые пузырьки имеют вид расширяющихся полос, направленных от края к центру покровного стекла. Эти пузыри образуются из-за пониженного в центре давления за счет втягивания воздуха снаружи внутрь высыхающей капли. В структуре загустевшего с края геля на короткое время образуется микроканал, по которому порция внешнего воздух поступает под покровное стекло. Иногда можно видеть, как первый пузырек

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

продвинулся, и через некоторое время через то же место просочился второй пузырек. И так несколько раз. Этот процесс зависит от перепада давлений и вязкости геля. Дальнейшее увеличение объема краевых пузырьков происходит только за счет выделения в них воздуха, содержащегося в сыворотке. Краевые пузырьки бывают двух типов

- соединенные с центральной воздушной областью, и изолированные, не успевшие соединиться. Форма пузырьков зависит от соотношения двух скоростей - скорость роста краевого пузырька и скорость движения фронта затвердевания от края к центру. Скорость роста краевого пузырька определяется концентрацией растворенных газов. Чем больше газов
- тем быстрее растет пузырек.

-Если скорость затвердевания большая, то пузырьки сужаются к центру и сливаются. -Если скорость затвердевания средняя, то пузырьки растут постоянной ширины.

-Если скорость затвердевания низкая, то краевые пузырьки расширяются при приближении к центру и успевают соединиться с центральной областью воздуха.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

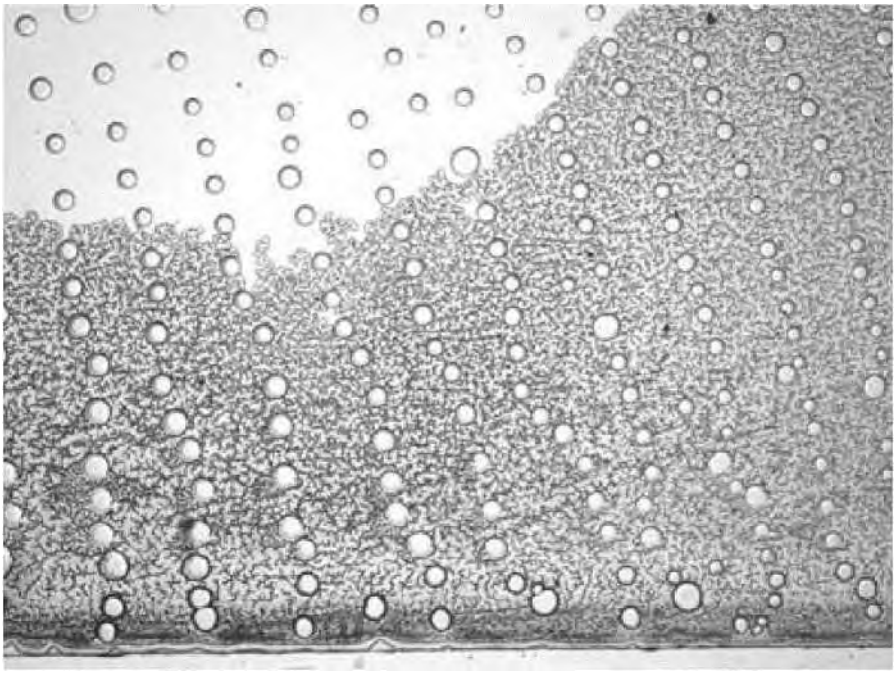


Рис. 2-8. Движение краевых пузырьков внешнего воздуха к центру через гель. Видно многократное проникновение внешнего воздуха. Светлое поле. Поле зрения 7 мм.

Граница краевого пузырька, расположенная ближе к краю, быстро затвердела , и на ней ничего не происходит. Эта граница выглядит в проходящем свете в виде четкой линии. На границе, которая двигается к центру, происходит концентрация липидов. При продвижении границы в сторону центра липиды осаждаются на поверхности нижнего стекла. Поэтому краевые пузырьки в той части, которая ближе к центру, становятся серыми из-за маленьких капелек на поверхности стекла. Капельки не все одинаковые, и бывают двух видов:

-липиды - капельки, которые в поляризованном свете - темные,

-эфиры холестерина - капельки, которые в поляризованном свете дают изображение мальтийского креста.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

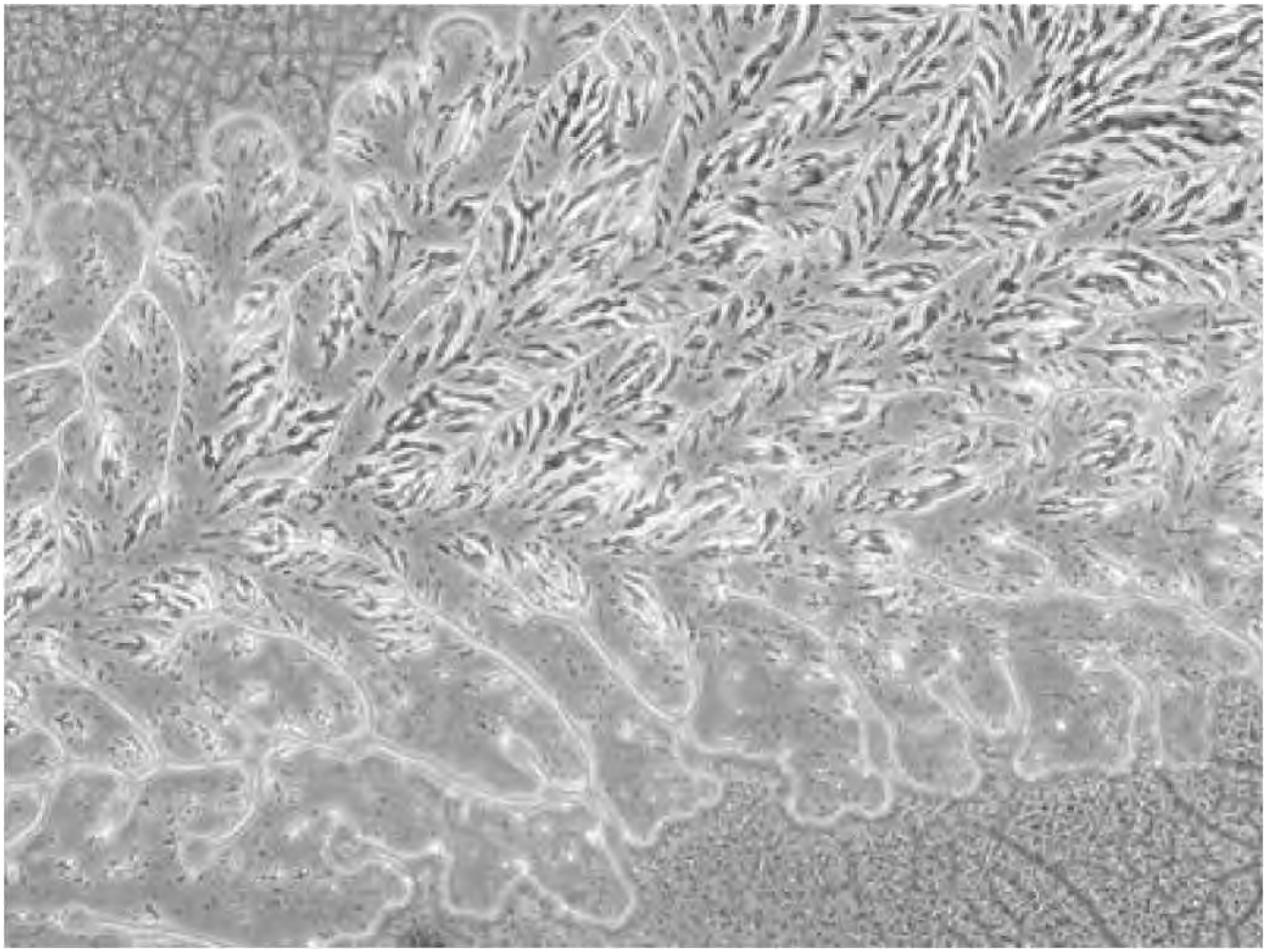


Рис. 2-9. Движение фронта воздуха и образование ветвей в краевом пузырьке. Фазовый контраст. Поле зрения 1,2 мм

При дегидратации чистого альбумина краевые пузырьки получаются ровными без липидного осадка. В сыворотке крови граница краевого пузырька, которая ближе к краю - четкая и гладкая. Граница, которая ближе к центру капли, получается неровной, и состоящей из отдельных выпячиваний. При расширении пузырька воздух прорывается в области с наименьшим сопротивлением. Структура границы соответствует неоднородности в застывающем геле. При наличии мелких включений происходит образование ветвей.

Фазовый переход. При расширении краевого пузырька к центру существуют два момента времени, когда происходит изменение процесса роста краевого пузырька.

1- начинается осаждение капель липидов на нижней поверхности пузырька. Капли липидов хорошо видны в режиме темнопольного освещения.

2- увеличивается вязкость сыворотки. Граница пузырька становится извилистой и изрезанной. До этого момента граница пузырька была ровной. Начинается образование ветвей.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

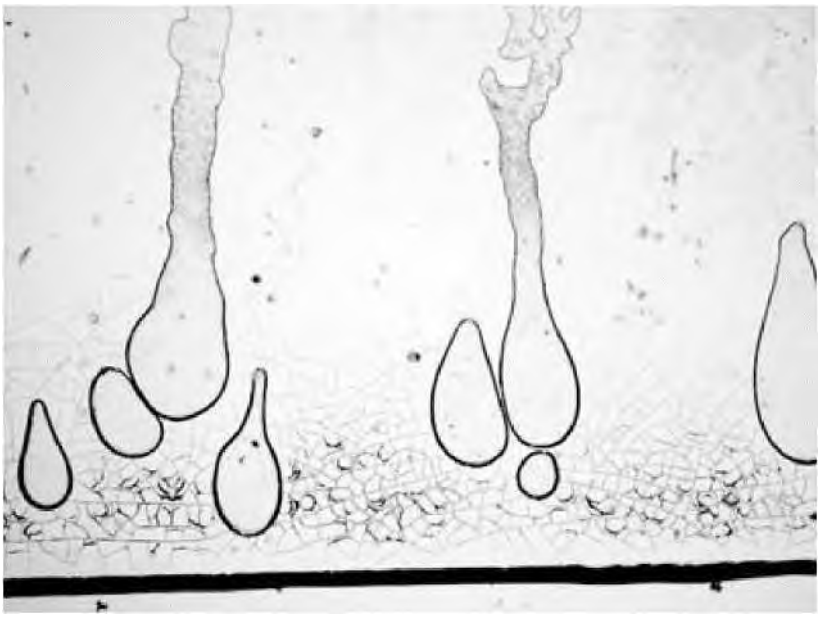


Рис. 2-10. Движение краевых пузырьков от края к центру. В длинных пузырьках виден момент начала осаждения липидов и момент начала загустения сыворотки. Поле зрения 4 мм.

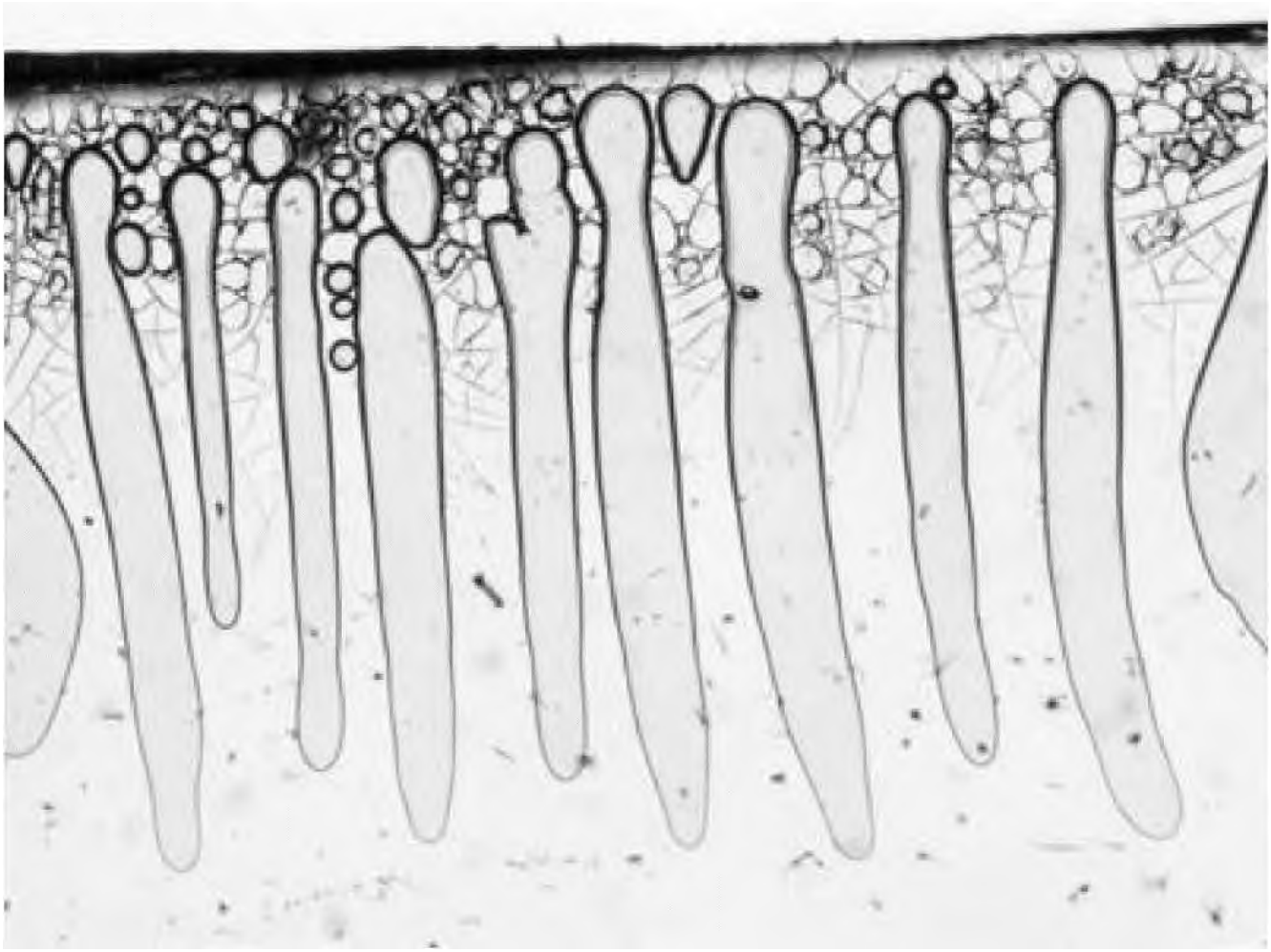


Рис. 2-11. Краевые пузырьки с ровной границей в растворе чистого альбумина. Поле зрения 7 мм.

При наблюдении роста краевых пузырьков иногда бывают случаи, когда краевой пузырек не увеличивается, а уменьшается в размерах. Сжимается часть краевого пузырька, которая расположена ближе к центру. Следы максимального расширения пузырька и текущего (сжатого) состояния пузырька хорошо видны при большом увеличении при фазовом методе освещения. Поверхность стекла, на которой был пузырек и отступил является гладкой и однородной. Поверхность, где пузырька не было, покрыта мелкими точками.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.6 Структура границы воздух-сыворотка.

1.6.1 Образование осадка липидов в виде капель.

Граница раздела воздух - сыворотка является границей раздела воздух - раствор вода+альбумин+липиды. Определяющую роль в формировании границы оказывают липиды. Граница раздела воздух-сыворотка границей раздела между жидкой и газообразной фазой. Поэтому на этой поверхности происходит концентрация ПАВ - поверхностно-активных веществ, которыми являются липиды, эфиры холестерина. Молекулы липидов располагаются на поверхности раздела сыворотка-воздух монослоем, гидрофобными хвостами направленными в воздух, а гидрофильными частями - в сыворотку. По мере увеличения размера пузырька, его граница продвигается от центра к краю. При движении границы на нижней поверхности (предметное стекло) происходит осаждение липидов в виде тонкого слоя и капель.

Необходимо отметить, что концентрирование липидов на границе области воздуха происходит за счет переноса липидов на поверхности маленьких пузырьков, которые собираются в центре. Пузырьки проходят сквозь всю сыворотку и собирают на своей поверхности липиды. В центральной части воздушного пузырька осадок липидов не образуется, так как на начальном этапе скорость движения фронта пузырька большая, а концентрация липидов на границе - маленькая. Затем в какой то момент времени начинает образовываться осадок в виде слабо заметных полос, которые тянутся за движением фронта. Полосы являются осадком, образовавшимся на нижнем стекле. Затем наступает второй момент времени, когда происходит сильное выпадение липидов на дне в виде капель. Можно предположить, что у липидов существует две критические концентрации, два фазовых перехода.

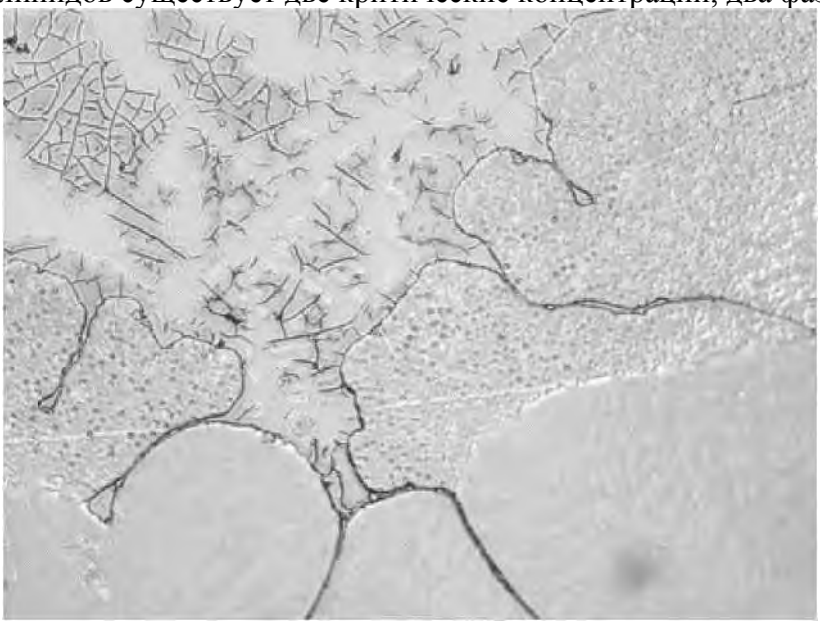


Рис. 2-12. Граница воздух - сыворотка. Нет дендритов липидов. Видна четкая граница начала осаждения липидов. Поле зрения 0,5 мм.

Два типа капель липидов.

При образовании осадка липидов можно выявить два типа капель:

-Капли светлые с размытыми границами. Скорее всего, это триглицериды.

-Капли более темного света с четкой границей. Так как граница четкая - значит, эти капли представляют собой шарики (сферы). Это эфиры холестерина в жидкокристаллической фазе. Эфиры холестерина можно наблюдать в виде жидкокристаллических капель, которые при наблюдении в скрещенных поляроидах начинают светиться в виде креста (мальтийский крест) на темном фоне. Эти капли обладают оптической активностью, которая исчезает при нагревании и вновь появляется при охлаждении. Если препарат нагреть до температуры порядка 50 градусов, то изображение яркого креста пропадает, и фон становится светлым. Это означает, что капля эфиров холестерина перешла в другое фазовое состояние, а среда стала оптически неактивной. Значит, эфиры холестерина являются термотропными жидкими кристаллами. При остывании препарата до комнатной температуры восстанавливается исходное состояние капли в виде ярких капель эфиров холестерина с мальтийским крестом.

Иногда, когда липидов осаждается очень много, происходит образование крупных агрегатов

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

липидов, которые имеют структуру похожую на кристаллическую.

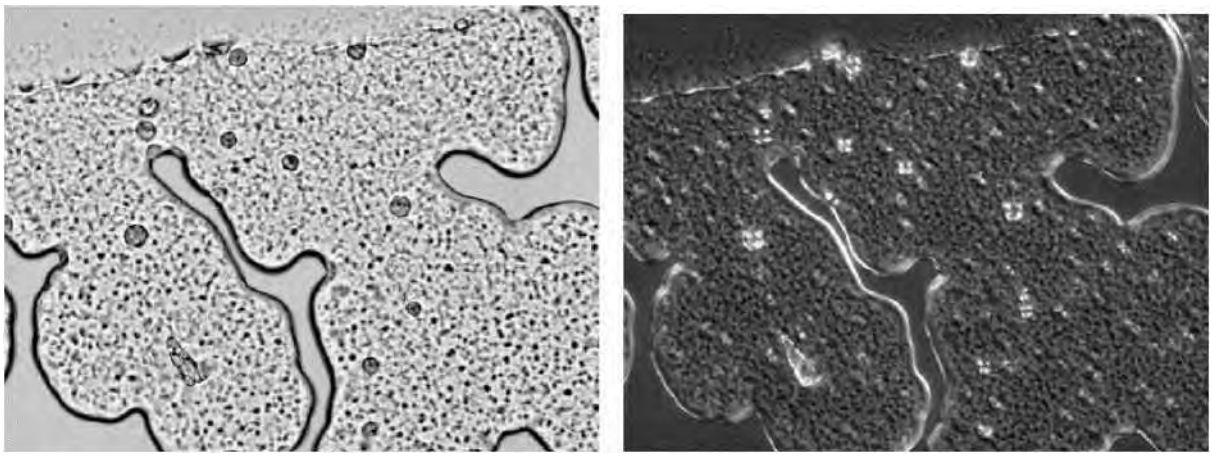


Рис. 2-13. Капли липидов и жидкокристаллические капли эфиров холестерина. Светлое поле и поляризованный свет. Поле зрения 0,2 мм.

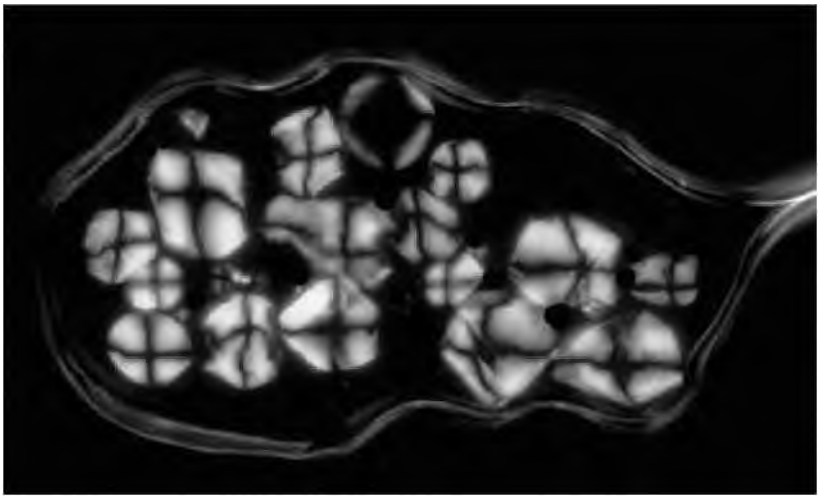


Рис. 2-14. Жидкокристаллические капли эфиров холестерина. Видна структура капель. Виден «Мальтийский крест». Поляризованный свет. Поле зрения 0,2 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

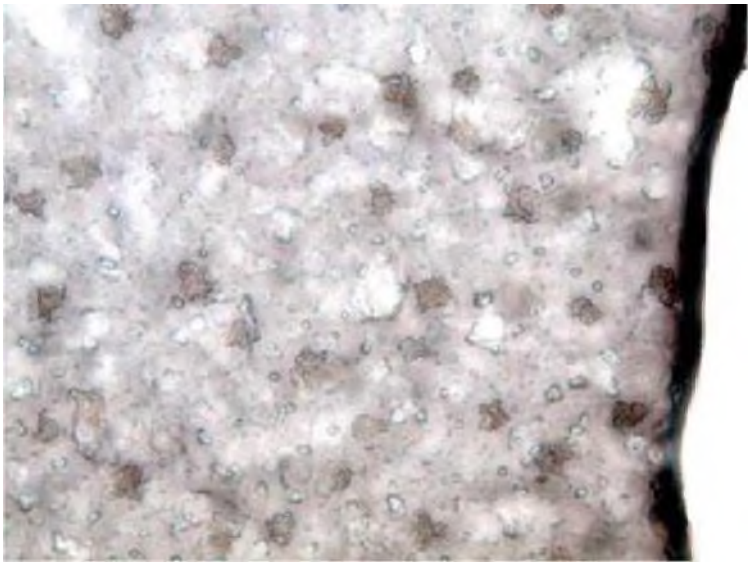


Рис. 2-15. Агрегаты среди капель липидов. Светлое поле. Поле зрения 0,3 мм.

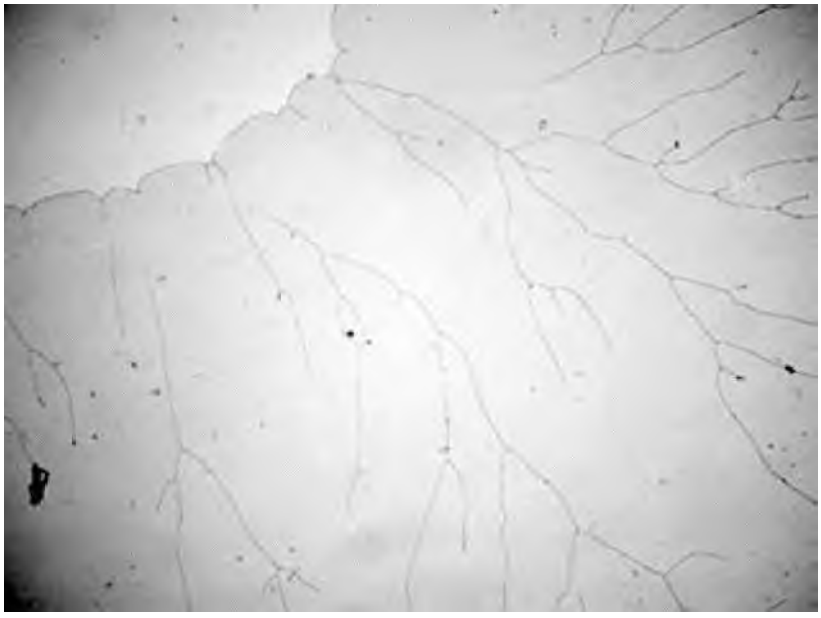
Структура границы воздух-альбумин определяется следующими тремя моментами времени:

1- момент начала осаждения липидов,
2- момент прекращения роста воздушного пузырька,
3- момент затвердевания альбумина.

Так как структура сыворотки неоднородна, то на разных участках границы затвердевание происходит в различные моменты времени. Поэтому структура границы на разных участках различна. Существуют различные варианты структуры границы воздух- альбумин.

Различные варианты границы в зависимости от скорости затвердевания.

1- Ровная граница. Изолированные усы завершаются четкой ровной границей, за которой находится однородный альбумин. Такая граница образуется, если затвердевание произошло после прекращения роста пузырька. Такую границу имеет воздух в растворе чистого альбумина.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 2-16. Ровная граница воздух - альбумин в растворе чистого альбумина. Видны одиночные усы. Светлое поле. Поле зрения 7 мм.

2- Граница в виде языков. Такая граница получается, если затвердевание начинается рано, когда пузырек еще растет. Воздушная область продолжает расширяться, но теперь граница

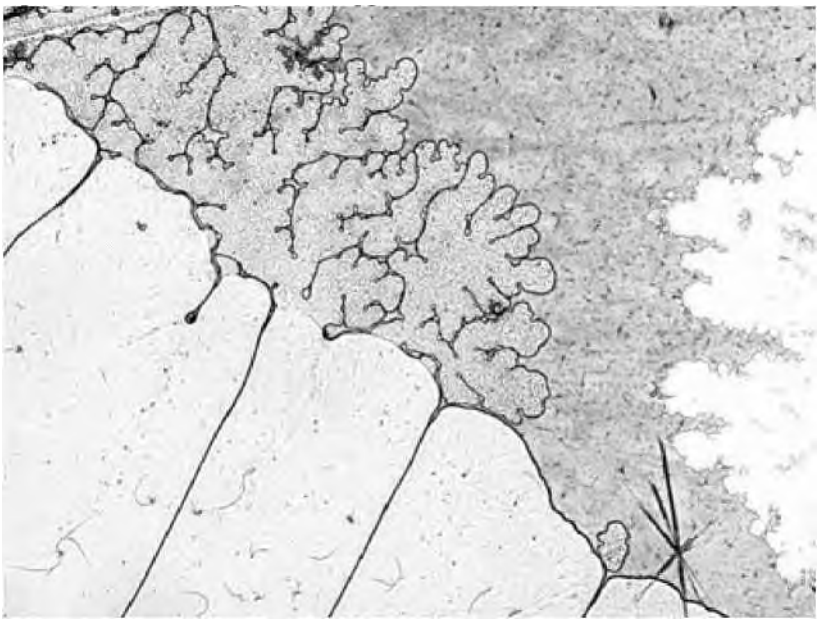


Рис. 2-17. Граница воздух - сыворотка в виде языков. Поле зрения 1,5 мм.

1.6.2 Формирование усов.

Динамика формирования границы в зависимости от концентрации липидов на границе.

Таблица 2-6. Этапы формирования границы воздух - сыворотка.

Этап	Компонент 1-воздух	Компонент 2-липиды
1	Сплошное поле	Нет компонента
2		Одиночные усы
3	Г устые толстые усы	Г устые тонкие усы
4	Средние усы	Средние усы
5	Г устые тонкие усы	Г устые толстые усы
6	Одиночные усы	
7	Нет компонента	Сплошное поле

В зависимости от количества липидов на границе раздела, процесс формирования границы может завершиться на любом этапе. Не обязательно проходят все 7 этапов.

1- этап. Однородная область. В самом начале формирования области воздуха на границе очень малая концентрация липидов. Одиночных усов нет. Образуется сплошное однородное поле без ветвей и без осадка.

2- этап. Одиночные усы. По мере роста центральной воздушной области на ее границе скапливается все больше и больше липидов. В некоторый момент на пути двигающегося фронта попадается некоторая неоднородность, образуется перемычка между верхним и нижним стеклом, и образуются так ветвь (называемая миелиновая бороздка). Зарождение линии аналогично зарождению кристалла, неоднородность выступает как центр зарождения усы. По мере отступления границы ветвь продолжает удлиняться. Образуется все больше таких усов. Некоторые усы сливаются. Усы могут только сливаться, разветвляться усы не могут. Поэтому возникает структура линий в виде дендрита. Иногда усы обрываются. Усы часто обрываются при дегидратации чистого альбумина, так как нет поверхностно-активных веществ.

Причина образования одиночных усов - поверхностное натяжение. Это определяет форму и

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

строение одиночных усов. Одиночные усы являются слабо изогнутыми, тонкими, однородными, состоят из двух боковых поверхностей, разделенных тонкой прослойкой жидкости. Структура усов не совсем однородна. Можно выделить несколько типа участков усы:

1- утолщения, толстый участок переменной толщины - сгусток липидов. Такой участок является начальным образование усы, расположен в тройной точке - точке слияния двух усов, и периодически встречается в усы. В поляризованном свете не светится.

2- тонкий участок постоянной толщины. В поляризованном свете ярко светится.

3- очень тонкий участок постоянной толщины. В поляризованном свете светится слабо.

4- разрыв усы. Иногда у усов имеется разрыв. Однако при большом увеличении видно, что разрыв представляет собой утоньшение усов. В результате утоньшения прекращается контакт усы с поверхностью верхнего покровного стекла. Однако сама ветвь не обрывается. Видно, что ветвь продолжается в виде волокна. Затем волокно увеличивается в диаметре, вновь появляется контакт, и вновь появляется четкая граница.

Так как усы имеют четкую границу, значит, что усы прикреплены и к предметному и к покровному стеклу, занимают весь промежуток между стеклами. Этот факт можно подтвердить экспериментально. Если отделить покровное стекло от предметного стекла, то усы распадаются на две части, прикрепленные к верхнему и нижнему стеклу соответственно.

Некоторые усы через пять дней начинают разрушаться.

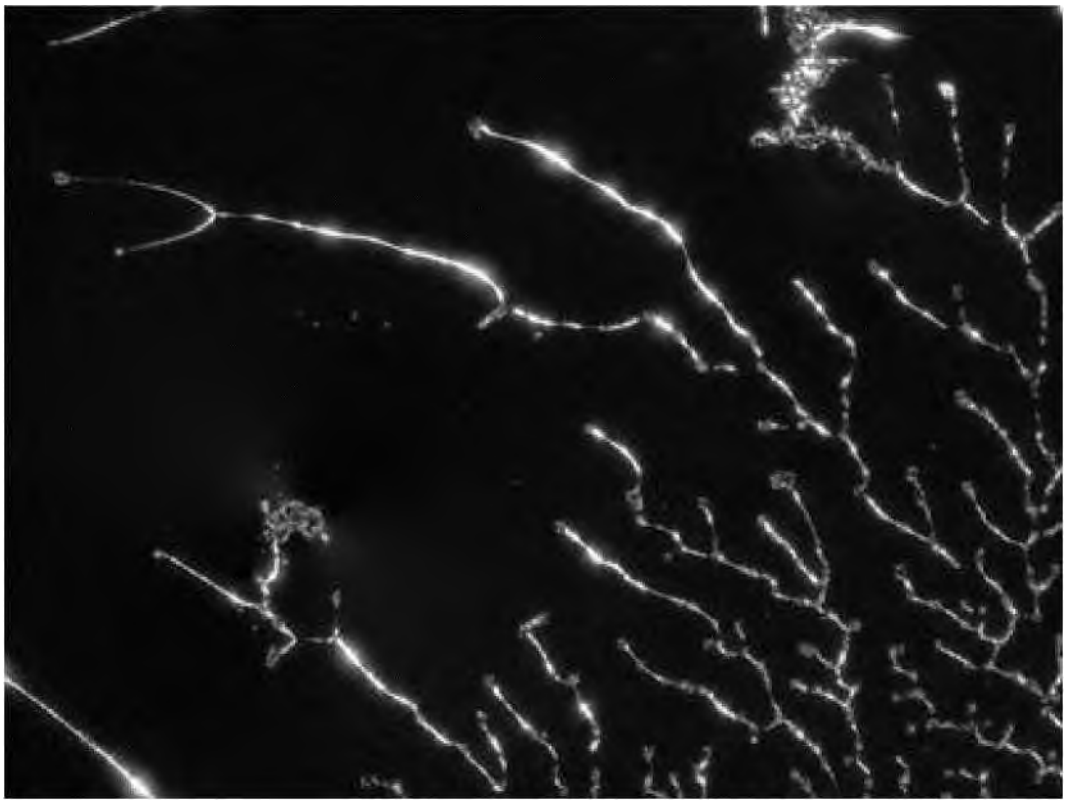


Рис. 2-18. Одиночные усы (миелиновые бороздки), переходящие в плотную сеть усов. Поляризованный свет. Поле зрения 0,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

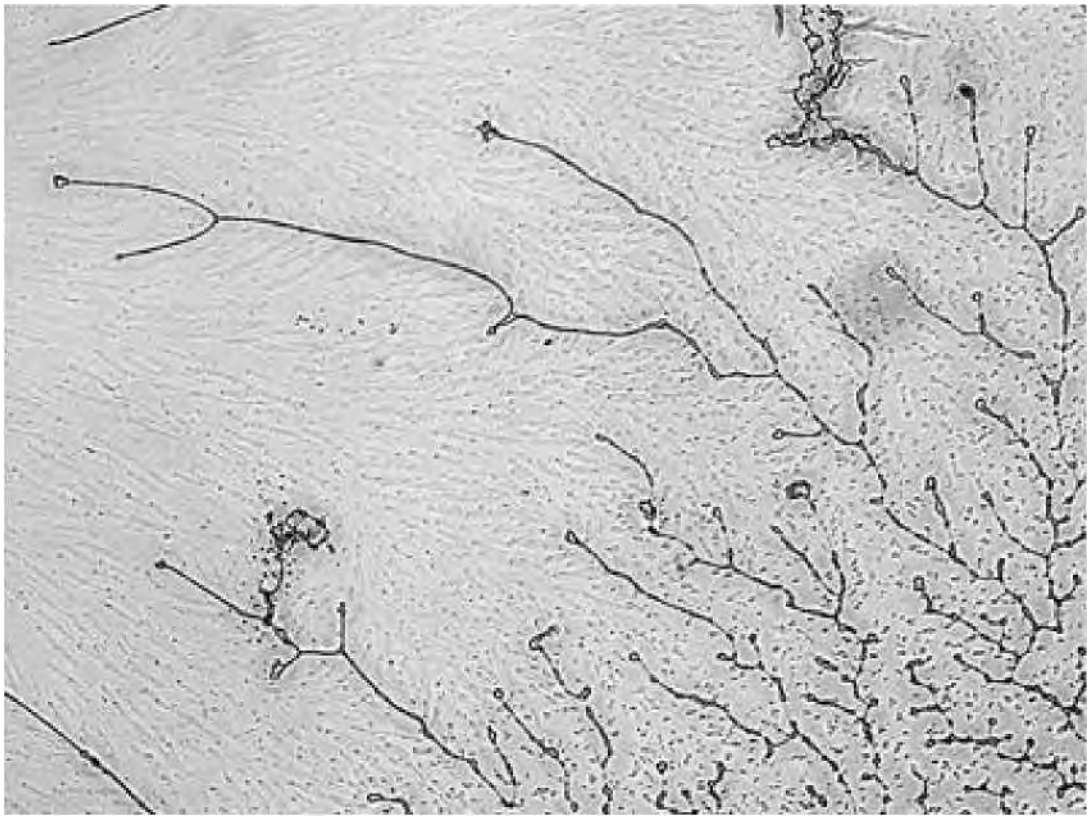


Рис. 2-19. Одиночные усы (миелиновые бороздки), переходящие в плотную сеть усов. Светлое поля. Поле зрения 0,5 мм.

3- этап. Густая сеть усов. Если концентрация липидов на границе достаточно высокая, то в некоторый момент времени происходит фазовый переход. Липиды начинают осаждаться в виде крупных капель. Эти капли служат начальной точкой для появления новых усов (раньше усы зарождались только на инородных включениях). Возникает сплошное поле усов в виде дендритов, заполняющих все пространство. Между ветками дендритов осаждается много липидов в виде ярких точек. Сыворотка при этом уже достаточно густая, и рост воздушного пузырька происходит в виде языков. В этом случае причина образования усов не в том, что они тянутся за фронтом, а в том , что они формируются из осаждающихся липидов. Усы дендритов являются изогнутыми, толстыми, неоднородными. В ветвях дендритов много крупных образований в виде узлов.

Почему образуются дендриты липидов? Причиной образования дендритов липидов является дендритный рост пузырька воздуха. При росте пузырька в вязкой неоднородной среде с густым наполнителем (липидами) рост происходит не ровным фронтом, а языками. Для образования дендрита необходимо выполнение двух условий: возможность веткам разветвиться и невозможность веткам сливаться. При росте язык может только разветвиться на две языка, если на пути роста появляется неоднородность, которая мешает росту. Два языка не могут слиться, так как при росте языка на его границе возникает сильно уплотненный слой среды. Если сближаются два языка, между ними создается очень плотный барьер, и языкам легче расти в направлении меньшего сопротивления - параллельно барьеру. Таким образом, получается, что автоматически возникает дендритная структура. На самом деле при детальном анализе структуры дендритов иногда можно наблюдать обрыв усы. Это означает, что соединились два боковых языка. При этом видно, что в этом месте было очень мало липидов, и перегородка была очень тонкая.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

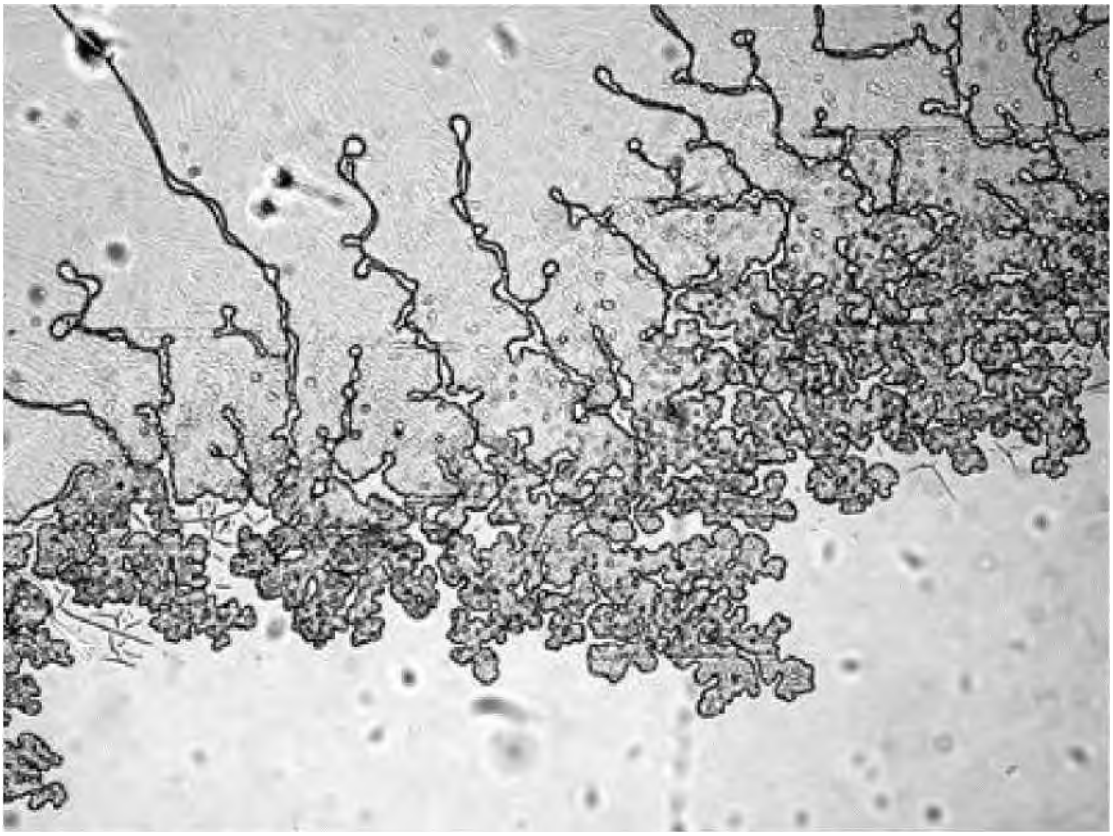


Рис. 2-20. Строение границы воздух - сыворотка. Видны 2, 3, 4, 5, 6 и 7 этапы формирования границы воздух - сыворотка. Светлое поле. Поле зрения 1 мм.

4- этап. Средние усы. Постепенно, по мере увеличения концентрации липидов, увеличивается толщина усов липидов и уменьшается ширина языков воздуха. В некоторый момент времени толщина усов липидов станет такой же, как и ширина языков воздуха.

5- этап. Толстые усы. При дальнейшем увеличении концентрации липидов толщина веток липидов становится больше ширины языков воздуха. В этом случае уже можно рассматривать языки воздуха как дендрит в среде липидов.

6- этап. Липидов уже настолько много, что можно наблюдать лишь отдельные языки воздуха в среде сыворотки.

7- этап. Языков воздуха больше нет, и образуется одна сплошная среда сыворотки.

1.6.3 Формирование дендритов липидов.

После того, как сформировалась граница воздух-сыворотка, начинает формироваться внешняя область границы. В этой области находится раствор вода+альбумин+липиды. В зависимости от соотношения этих компонент внешняя граница имеет различный вид.

1- Если концентрация альбумина и липидов низкая, за границей формируется однотонная область без особенностей.

2- Если концентрация альбумина высокая, за границей формируется область альбумина светло-желтого цвета, которая растрескивается. Образуются тонкие трещины. В некоторых случаях образуется сеть из трещин и псевдотрещин.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

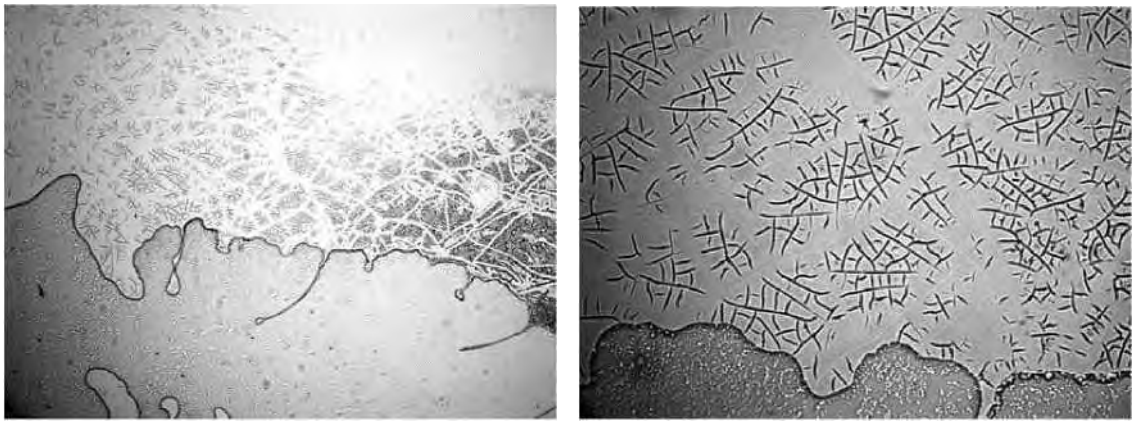


Рис. 2-21. Фрагментация внешней граничной области воздух - сыворотка с помощью псевдотрещин. Светлое поле. Поле зрения 1,5 мм и 0,3 мм.

3- Если концентрация липидов высокая, то происходит выделение фазы липидов из раствора вода+альбумин+липиды. Липиды отделяются в виде толстых коротких волокон, которые воспринимаются как толстые трещины.

1.7 Образование островов.

Острова представляют собой круглые образования размером от 1 до 5 мм. Острова расположены в области белка. Острова являются основным структурным компонентом при высыхании сыворотки. В проходящем свете острова видны слабо. Острова имеют четкую структуру, выявляемую методом темного поля. Можно выделить следующие элементы в структуре островов: центральный дендрит, сферолиты внутри острова, граница острова.

Можно четко различить следующие структурные компоненты островов:
1- Центральная область (однородная область или дендрит соли).
2- Сферолиты холестерина на границе области и между ветвями.
3- Дендриты липидов на границе острова.
4- Внешняя граница в виде растрескавшейся светло желтой области альбумина.

Вначале формируется центральная область - дендрит соли. Затем формируются сферолиты. Сферолиты начинают расти когда дендрит уже достаточно большой и близок к завершению роста. Некоторое время сферолиты и дендриты продолжают расти вместе. Затем на границе формируются дендриты липидов. Затем происходит формирование внешней границы альбумина, затвердевание и растрескивание.

1- Центральная область острова. Центральная область острова бывает нескольких типов
1- Дендритный остров. В центре острова находится крупный дендрит соли с ярко выраженной дендритной структурой. При формировании острова вначале формируется центральный дендрит из кристаллов соли. Центральный дендрит имеет различный вид: шестиугольные линии, четырехугольные линии, ветвистые линии, пластинчатый дендрит. Вид дендрита определяется соотношением компонент (соль и белок) в момент кристаллизации и вязкостью альбумина в момент кристаллизации. По мере увеличения вязкости возникают следующие формы дендритов: пластинчатый дендрит, прямоугольный дендрит, ветвистый дендрит.
2- Альбуминовый остров. Остров представляет собой затвердевший альбумин, покрытый трещинами и антитрещинами. Внешне остров похож на остров с дендритом, только нет прямых ветвей дендрита, а есть изогнутые псевдотрещины. Обычно такие острова имеют простую структуру, и вокруг них отсутствует дендриты липидов.
3- Пустой остров. В центре острова находится однотонная светлая область без ярко выраженной дендритной структуры. Остров выделяется из окружающего белка четкой границей с растрескивавшимся альбумином снаружи острова. В темном поле вдоль внешней границы видна тонкая полоска светящихся точек - зародышей сферолитов.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2-Сферолиты холестерина.

После того, как сформировался дендрит, начинают расти сферолиты. Сферолиты имеются в островах практически всегда. Только иногда это только маленькие светящиеся точки на границе острова (зародыши сферолитов), иногда это большие веерные сферолиты на границе или неправильные сферолиты между ветвями дендрита соли. Так как сферолиты растут в уже формированной структуре, то они имеют неправильную форму. Между ветвями дендрита растут фрагментарные дендриты. На краю дендрита, между дендритом и граничной областью растут дендриты в виде веера. Кроме крупных дендритов внутри острова часто образуется много мелких сферолитов - зародышей сферолитов. Внутри островов так же образуются яркие цветные сферолиты.

В зависимости от локализации можно выделить два типа островов: -изолированные острова - это изолированные области с четкой границей, -граничные острова - это острова, примыкающие к границе раздела воздух - сыворотка или к границе покровного стекла.

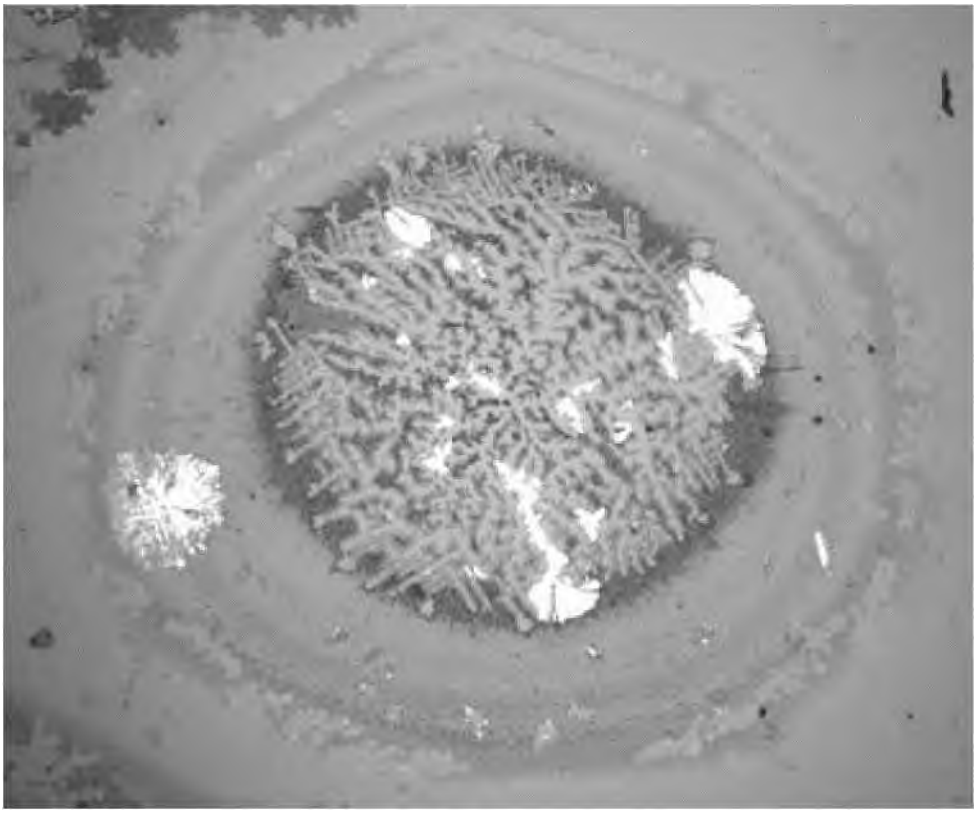


Рис. 2-22. Остров со сферолитами. Вокруг острова видна полоса темного осадка и широкая граничная полоса. В этой полосе видны интерференционные кольца. Поляризованный свет. Поле зрения 3 мм.

Облака - это область ярких точек, светящихся в режиме темного поля, и не имеющие никакой структуры.

1.8 Структура границы остров-сыворотка.

Рост дендрита осуществляется за счет диффузии соли в сыворотке. Рост осуществляется по окружности вокруг дендрита. Рост дендрита соли продолжается до тех пор, пока гель вокруг не затвердеет настолько, что прекратится диффузия и, следовательно, рост дендрита. Затем начинается образование фрагментарных сферолитов холестерина внутри дендрита и веерных сферолитов холестерина на границе дендрита. Затем начинается окончательное затвердевания альбумина вокруг дендрита.

В зависимости от концентрации различных компонент вокруг дендрита граница может иметь различный вид (вокруг одного дендрита разные участки границы могут иметь различный вид):

1-тонкая линия без видимых особенностей, если малая концентрация альбумина.

2- Полоса дендритов липидов .

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Дендриты липидов образуются на границе островов, на границе дендритов соли. Дендриты липидов при малом увеличении видны в виде темной полосы вокруг островов. Темная полоса представляет собой систему из двух вложенных друг в друга дендритных структур - дендриты липидов и дендриты среды (альбумина). Между дендритом соли и альбумином находится концентрированная сыворотка (концентрированный раствор альбумина и липидов в воде). При дегидратации эта область распадается на две фазы - липиды и альбумин. Точнее, из раствора выделяется (выкристаллизовывается) фаза липидов. Лиды выделяются в виде дендритов. Получается граничный слой, имеющий вид серых дендритов. Структура дендрита - сильноразветвленная. Ветви липидного дендрита не являются однородными, они содержат много включений в виде ярко светящихся точек и центральных протяженных образований. Ветка дендрита представляет собой некоторую полоску, в которой имеются отдельные включения (бугры) и обычно имеется центральный высокий хребет (толстое волокно).

Между ветвями дендрита область однородна (раствор альбумина в воде) и не содержит ярких точек.

Полоса дендритов не является однородной. Рядом с дендритом липидов мало, и дендрит имеет тонкие ветви. Дальше от дендрита концентрация альбумина растет, и ветви дендрита становятся толстыми. Еще дальше концентрация липидов уменьшается, и ветви дендрита опять становятся тонкими.

Динамика роста дендрита. Анализируя структуру дендрита можно предположить, что рост дендрита начинается в некоторой точке, а затем распространяется во все стороны. Рост идет по всем направления ровным фронтом, пока не встретится препятствие (другой дендрит соли) или не спадет концентрация липидов.

Рост дендрита состоит в том, что ветки увеличиваются в длину за счет присоединения новых молекул липидов. Ветки могут разветвляться, если встречается неоднородность, и ветка нарастает в двух боковых направлениях. Две ветки не могут слиться, так как ветки окружены обедненным липидом раствором. В соответствии с правилами роста, при таких условиях возникает структура дендрита.

Формирование дендритной структуры липидов на границе островов аналогично, но немного отличается от формирования дендритов липидов на границе раздела воздух-сыворотка.

-На границе раздела воздух-сыворотка можно рассматривать двухкомпонентное взаимодействие - воздух и раствор вода+альбумин+липиды. Формирование дендритов осуществлялось за счет динамики проникновения воздуха в раствор.

-На границе раздела дендрита соли и сыворотки происходит отделение липидов из раствора вода+альбумин+липиды. Формирование дендритов происходит за счет выделения фазы липидов.

На внешней границе дендрита образуется концентрированный раствор вода+альбумин+липиды. Этот концентрированный раствор находится в виде полосы в области вокруг дендрита. С внутренней стороны полоса ограничена дендритом соли, а с внешней стороны полоса ограничена сывороткой (в основном альбумин с малым содержанием липидов). Почему липиды собираются вокруг дендрита соли? Возможно из-за диффузных потоков.

Процесс формирования дендритов липидов. В растворах двух несмешивающихся низкомолекулярных жидкостей выделение одной из фаз обычно происходит в виде сфер, шариков. Для раствора двух несмешивающихся высокомолекулярных соединений (альбумин и липиды) разделение фаз происходит принципиально другим образом. Происходит образование надмолекулярных структур. Основной тип надмолекулярных структур для вытянутых макромолекул - микрофибриллы и фибриллы - вытянутые образования в виде волокон. В

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

поляризованном свете волокна светятся. Это подтверждает, что они имеют ориентированную структуру.

Существует несколько моделей для объяснения формирования дендритной структуры липидов, в зависимости от того, с какой точки зрения рассматривать сыворотку:

1- гель: модель геля - синерезис,
2- гель: модель разрушения структуры геля,
3- жидкий кристалл: модель жидкокристаллических структур,
4- полимер: модель структуры кристаллизации высокомолекулярных соединений (полимеров),
5- раствор полимеров: модель коацервации,
6- раствор: модель структуры расслоения несмешивающихся жидкостей,
7- раствор белков: модель высаливания.

Эти модели не противоречат и не исключают друг друга, а являются взаимодополняющими.

1- модель геля - синерезис.

Синерезис - уменьшение объема геля, сопровождающееся отделением жидкости. Синерезис происходит в результате уплотнения пространственной структуры сетки, образованной молекулами белков. При определенной концентрации белков наступает сближение молекул белка настолько близко, что начинают играть роль более сильные взаимодействия, и молекулы сближаются еще сильнее, белок сжимается.

Аналогичный процесс происходит при сворачивании крови, но в этом случае в образовании сгустка основную роль играют молекулы фибрина.

2- модель разрушения структуры геля.

Когда гель содержит вытянутые высокомолекулярные соединения (ВМС), то при испарении воды повышается концентрация ВМС и начинается образование надмолекулярных структур ВМС. Молекулы ВМС формируют в геле трехмерную структуру связей. Трехмерная структура имеет вид вытянутых волокон, фибрилл. При дальнейшем загустении геля происходит его сжатие. Фибриллы уплотняются. Так как молекулы являются жесткими, то уплотнение вдоль волокон - слабое, а уплотнение поперек волокон - сильное. При уплотнении волокон происходит разрыв структуры геля. Группа волокон сжимается и отделяется от остальных волокон. Между группами волокон образуется разрыв. Так как напряжения - слабые, а гель - вязкий, то образования трещины не происходит. Происходит

только разуплотнение структуры геля. Эта область заполняется молекулами воды, соли, и отдельными молекулами белков. Эта область выглядит однородной, прозрачной и не содержит включение и неоднородностей. Именно такими областями разделены дендриты липидов в граничной области. Это области с разрушенной структурой геля.

3- Модель жидкокристаллических структур.

Липиды при некоторых условиях обладают свойствами жидких кристаллов, и при кристаллизации образуют различные структуры.

4- Модель структуры кристаллизации высокомолекулярных соединений (полимеров).

Высокомолекулярные соединения, (которыми являются альбумин и липиды), при кристаллизации могут образовывать так называемые «полосатые структуры». Полосатые структуры имеет вид двух вложенных систем дендритов. Последовательность формирования полосатых структур следующая. Вначале глобулярные белки распутываются в длинные нити. Затем отдельные молекулы соединяются в пачки. Затем из пачек формируются фибриллы. Затем

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

из фибрилл формируются волокна или дендриты.

При формировании надмолекулярных структур полимеров происходит процесс самоорганизации. Например, рассмотрим раствор, состоящий из среды (растворителя) и плавающих в ней макромолекул в виде длинных цилиндров. При малой концентрации макромолекул они ориентированы произвольно случайным образом. При некоторой концентрации макромолекул, когда растворителя мало и свободный поворот макромолекул затруднен, начинает происходить переориентирования макромолекул. Энергетически более выгодным оказывается параллельная ориентация макромолекул. Молекулы начинают выстраиваться в одном направлении. Возникает структура жидкого кристалла. Происходит процесс самоорганизации.

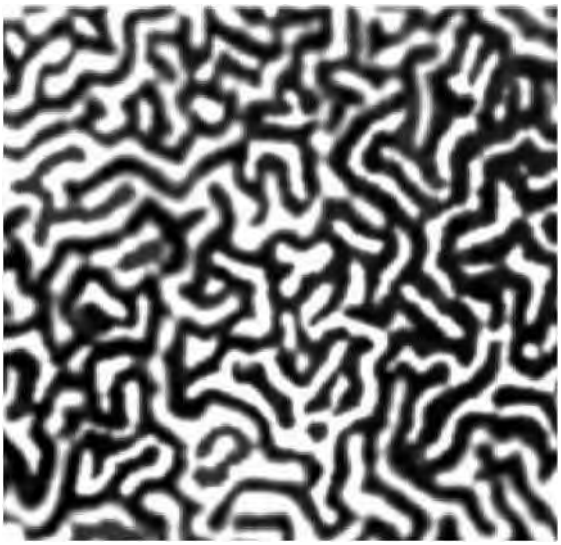


Рис. 2-23. «Полосатые структуры» возникающие в полимерах.

5- Модель коацервации растворов полимеров.

При испарении воды происходит разрушение гидратных оболочек молекул полимера. Происходит сближение и соединение молекул с образованием агрегатов. В общем случае происходит расслоение раствора на две несмешивающиеся фазы. Первая фаза представляет собой концентрированный раствор полимера, а вторая фаза представляет собой разбавленный раствор полимера. Белки и липиды представляет собой полимеры. При испарении воды происходит расслоение раствора белка на две фазы.

6- Модель структуры расслоения несмешивающихся жидкостей.

Можно предположить, что вначале произошло формирование градиента концентрации липид-альбумин, а затем началось расслоение, разделение на две фазы. На самом деле имеется трехкомпонентный раствор: вода+альбумин+липиды. Однако расслоение происходит между двумя нерастворимыми фазами: липиды и раствор альбумина в воде.

Можно предположить, что эта жидкость является липидной компонентой, и имеет жидкокристаллическое строение. Этим можно объяснить формирование дендритной структуры. Аналогичная структура формируется при дегидратации методом закрытой капли раствора альбумина и лецитина в воде, и на границе центральной области воздуха и белковой области. Толщина ветвей дендритов может зависеть от силы поверхностного натяжения, а степень разветвленности - от чистоты поверхности.

Дендритная структура разделения фаз является частным случаем разделения двух фаз несмешиваемых полимеров. Морфология (строение) смеси определяется соотношением компонент. Если компоненты А гораздо больше, чем компоненты Б, то структура смеси представляет собой мелкие шарики компонента Б в компоненте А. Обычно для случая двух несмешиваемых жидкостей А и Б переходная граница имеет следующее строение: жидкость А / капли жидкости Б в жидкости А / капли жидкости А в жидкости Б / жидкость Б.

По мере увеличения концентрации компонента Б шарики переходят в волокна, а затем волокна переходят в слои. Когда концентрации двух компонент равны, смесь распадается на слои чередующихся компонент. Один из вариантов - полное разделение двух компонент,

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

разделение на две области, разделенные границей.

На самом деле в трехмерном варианте возможны три случая:

0-мерный - капли (сферы),

1- мерный - чередующиеся волокна,

2- мерный - чередующиеся слои.

В нашем случае имеются две несмешивающиеся жидкости между двумя параллельными плоскостями - двумерный, а не трехмерный вариант. В двумерном варианте возможны следующие варианты строения смеси:

0-мерный - окружности (капли, диски),

1- мерный - чередующиеся полосы. В этом случае формируются так называемые параллельные линии.

1,5-мерный вариант - вложенные дендриты. Это вариант является единственным, реализуемым в нормальных условиях в случае неоднородных компонент.

В соответствии с механизмом разделения фаз (последовательное формирование с движущимся фронтом) реализуется дендритный вариант разделения смеси. При этом вся выделившаяся фаза представляет собой один связанный дендрит, в который со всех сторон вклиниваются дендриты второй фазы. Можно предположить, что дендрит фазы растет из одной точки, постепенно расширяясь во все стороны.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

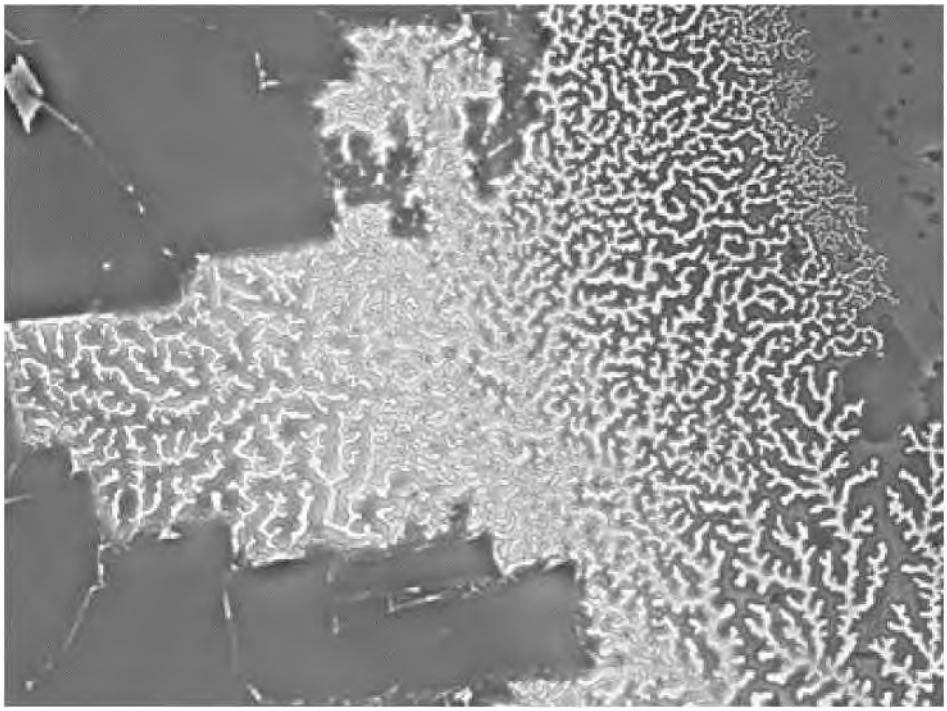


Рис. 2-24. Строение темной границы острова. Вложенная система дендритов. Слева-плоские кристаллы соли, справа - альбумин. Поле зрения 0,7 мм.

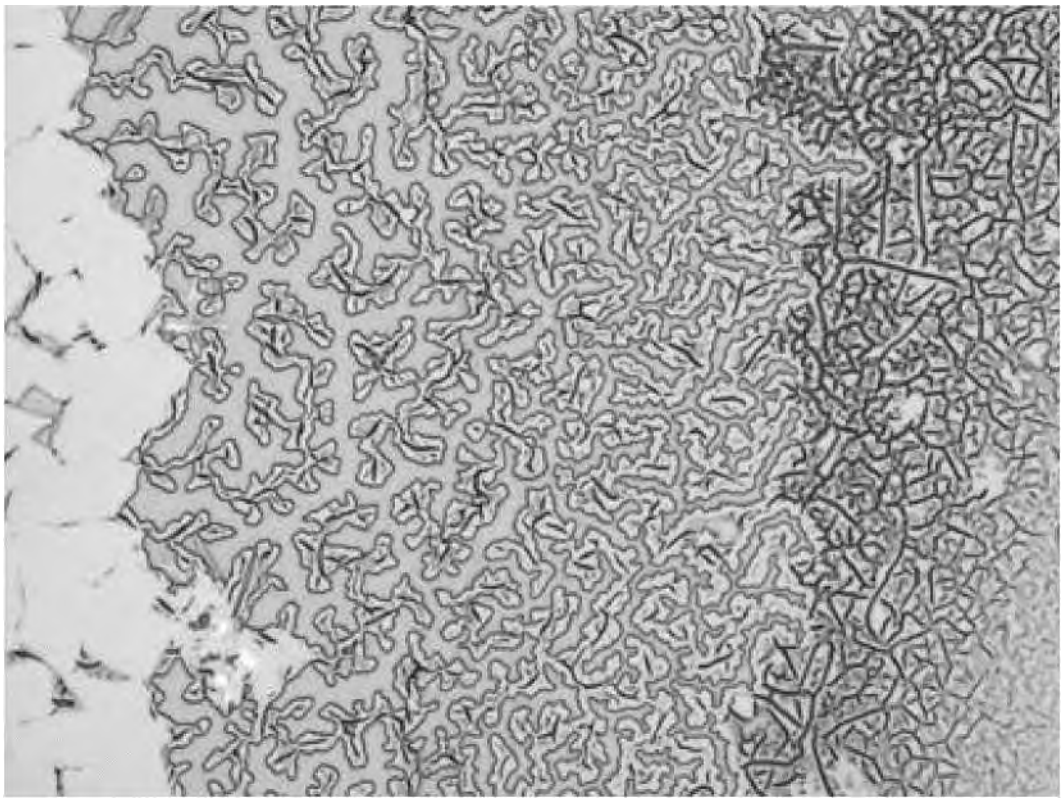


Рис. 2-25. Неоднородная структура липидных дендритов. Поле зрения 0,3 мм.

7- раствор белков: модель высаливания.

Альбумины и глобулины обладают различной растворимостью. Альбумины хорошо растворяются в воде, в слабом и насыщенном растворе соли. Глобулины в воде не растворимы, но растворяются в слабом растворе соли. В насыщенном растворе соли глобулины так же не растворяются. При изменении свойств раствора в первую очередь высаливаются (выделяются в виде отдельной фазы) глобулины. Глобулины, имеющие крупные и тяжелые молекулы и небольшую водную оболочку, выпадают в осадок при неполном насыщении раствора солями. Альбумины, как более мелкие молекулы, окруженные большой водной оболочкой, - при полном

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

насыщении. При испарении воды происходит повышение концентрации соли, и происходит высаливание глобулинов, выделение глобулинов в отдельную фазу.

3- Внешняя граница острова. Светло желтая полоса.

На завершающем этапе формирования острова происходит затвердевание альбумина вокруг острова. При этом происходит растрескивание альбумина. Так как имеется растрескивание, то это означает, что альбумин находится в твердой фазе.

Иногда область трещин разделена червеобразными длинными белами линиями (псевдотрещинами) на ячейки. В пределах ячеек происходит растрескивание белка. Таким образом, области растрескивания имеют вид отдельных ячеек. Можно выделить два типа трещин. Обычные тонкие длинные трещины и короткие толстые трещины. С удалением от границы дендрита концентрация альбумина уменьшается, и растрескивание так же уменьшается.

4- Внешняя граница острова. Светло серая полоса.

С внешней стороны острова образуется широкая светло-серая полоса. В этой полосе имеется много мелких агрегатов. В режиме томного поля эта полоса светится, и состоит из множества мелких светящихся точек. Возможно, это капли осадка липидов, когда липидов мало, и не хватает для образования дендритов.

Именно в этой широкой полосе видны интерференционные кольца, возникающие вокруг островов. Значит, именно в этом месте осуществляется прогиб покровного стекла над островом. За счет перекристаллизации вещества объем сыворотки в области острова уменьшается. В результате возникают интерференционные кольца.

5- Внешня граница острова - синяя и темно коричневая полоса.

Иногда с внешней стороны острова образуется цветная полоса. Вначале идет полоса синего цвета, а за ней идет полоса темно-коричневого цвета. Эпи полосы являются продолжением дендритов липидов, но почему то приобретают яркую окраску.

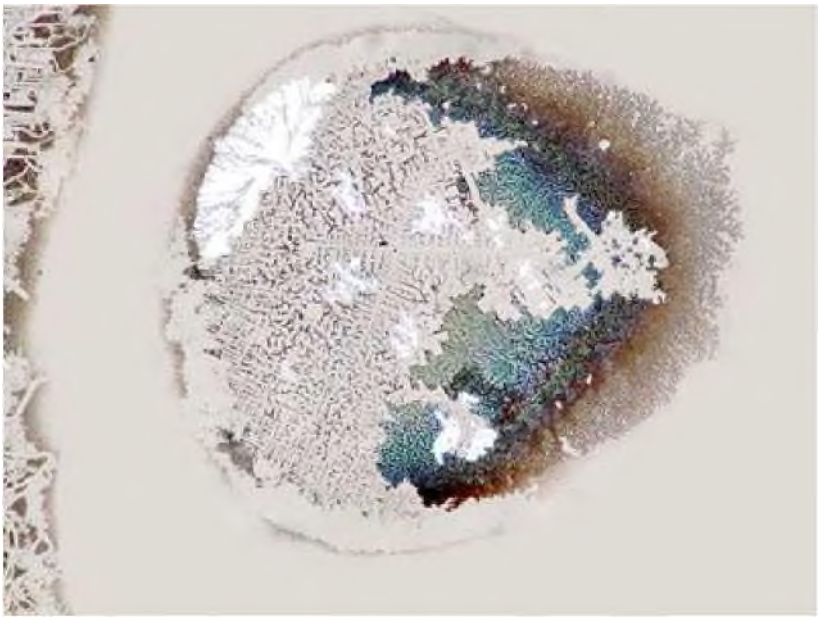


Рис. 2-26. Цветные полосы вокруг острова. Светлое поле. Поле зрения 3,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.9 Структура кристаллограммы.

При формировании структуры кристаллограммы каждая из основных компонент сыворотки крови проявляется особым образом.

1- Вода - вода практически вся испаряется.
2- Белки (альбумин) являются матрицей, в которой происходят все процессы.
3- Соль (хлорид натрия) - дендрит в центральной части островов.
4- Газы - занимают центральную область кристаллограммы в виде области воздуха.
5- Липиды:
   -апобелки - внешняя граница островов,
   -фосфолипиды - дендриты на границе островов,
   -холестерин - сферолиты внутри островов,
   -эфиры холестерина - капли на границе области воздуха,
   -триглицериды - ветвистые дендриты внутри островов.

В структуре сформировавшейся кристаллограммы можно выделить следующие основные области:

1- область белка (альбумин) - это основной структурный элемент кристаллограммы,
2- область воздуха - находится внутри области белка,
3- область дендритов соли - находится внутри области белка,
4- границы области белка (область липидов):
   -границы сыворотка-область воздуха,
   -граница сыворотка-дендрит соли
   -внешняя граница сыворотки.

На общий вид кристаллограммы оказывают влияние два основных фактора: -неоднородность состава сыворотки,
-неоднородность поверхности стекла, на котором происходит кристаллизация.

Область воздуха.

Область воздуха заполнена воздухом, не содержит кристаллов, и состоит из двух частей: -область воздуха центральная, она расположена в центральной части покровного стекла и представляет собой большую округлую область.
-область воздуха краевая, они состоит из отдельных вытянутых от края к центру воздушных пузырей. В той части, которая ближе к центру покровного стекла, обычно в виде капель концентрируются липиды.

Обычно воздух составляет от 0 до 30% общей площади. Можно предположить, что суммарная площадь области воздуха равна (S1+S2) и пропорциональна количеству газов, растворенных в сыворотке крови, и газов, поступивших снаружи. Объем воздуха можно определить путем умножения площади области воздуха на высоту покровного стекла над предметным стеклом в высушенной капле. Область воздуха состоит из двух компонент: -большая центральная область воздуха.
-небольшие краевые области воздуха.

Важным диагностическим параметром является процент площади, заполненной воздухом. S0=S1+S2, где
50 - площадь покровного стекла, под которым происходит кристаллизация. S0=25ммх25мм=625 мм2.
51 - площадь области воздуха,
52 - площадь сыворотки.

Площадь воздуха S1 состоит из площади центральной области воздуха S11 и площади краевых пузырьков S12, S1=S11+S12.

Площадь воздуха S1 так же состоит из двух компонент - Sa - площадь чистого воздуха,

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

и Sb - площадь воздуха с липидами. S1=Sa+Sb.

Площадь сыворотки состоит из трех компонент:

521- площадь чистой сыворотки, которая в режиме темного поля имеет темный цвет,

522- площадь отложений липидов, которая в режиме темного поля имеет светлый цвет,

523- площадь островов, которые являются темными, но окружены светлым кольцом.

Площадь островов S23 состоит из площади кристаллов соли S231 и площади граничных липидов S232.

Таким образом, получаем, что S0=(S11+S12)+(S21+S22+S231+S232).

Так же общую площадь можно представить как сумму следующих компонент: -площадь чистого воздуха,
-площадь воздуха с каплями эфиров холестерина,
-площадь воздуха с усами,
-площадь граничных липидов, -площадь кристаллов соли, -площадь сферолитов,
-площадь игольчатых кристаллов,
-площадь параллельных линий, -площадь чистой сыворотки.

В области воздуха кроме ветвей имеется еще два типа объектов, которые кристаллизовались из паров, находящихся в зоне воздуха.
Точки. Точки хорошо видны в режиме темного поля как ярко светящиеся точки. Точки локализованы на верхней поверхности стекла (нижней поверхности верхнего стекла). Кристаллы. Кристаллы имеют вытянутую форму с рваными краями. Кристаллы образуются на нижней и на верхней поверхностях стекол.

Область границы воздух-альбумин.

Область границы расположена между областью воздуха и областью белка. Граница состоит из миелиновых ветвей, капель эфиров холестерина, и областей липидов.

Область белка.

Область белка состоит из чистой области белка вокруг области воздуха. В области белка расположены острова и облака. Область белка состоит из двух фаз.

Чистая область белка - это прозрачная область светло-желтого, не имеющая видимых структурных элементов. Однако при наблюдении в режиме флуоресценции можно обнаружить, что в центральной части этой области находится область, которая светится слабым светом. Можно предположить, что это чистый белок. При приближении к области островов и воздуха свечение пропадает. Аналогичное свечение имеется по краю покровного стекла при образовании круглых трещин. Это имеет место при повышенной концентрации белка на краю.

Везде по краю области белка имеется прозрачная полоса светло-голубого цвета - вокруг краевой зоны белка, вокруг области воздуха, вокруг островов. Эта полоса является прозрачной, и именно в этой полосе разворачиваются все события - растрескивание и образование различных структур. От основной области белка прозрачная полоса отделена слабо заметной тонкой линией.

Таблица 2-7. Сравнение двух типов области белка.

	Признак	Область 1	Область 2
1	Состояние	твердое	гель
2	цвет	голубой	желтый
3	локализация	краевая область	центральная область
4	В темнопольном освещении	ярко светится, много мелких точек	Не светится
5	Трещины	Тонкие длинные трещины, Толстые короткие трещины	Псевдотрещины, тонкие короткие трещины
6	капли		На дне много мелких круглых образований

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Таблица 2-8. Сравнительные характеристики различных областей.

№	Область	Светлое поле	Темное поле	Поляризация
1	Воздух	Светлая	Темная	Нет
2	Г раницы	Темные линии	Светлые линии	Нет
3	Белок	Светлая	темная	Яркие, серые, ветвистые
4	Липиды	Коричневая	Ярко светлая	Частичные
5	Холестерин	Светлая	темная	Цветные

Условно можно выделить следующие структуры, если продвигаться от центра к краю покровного стекла:
-центральная область воздуха,
-ветви, миелиновые бороздки, (светятся в режиме темного поля)
-капли эфиров холестерина, (светятся в режиме темного поля)
-(заканчиваются ветви)
-область липидов, воздушные пузырьки с осадком в виде капель липидов, (светится в режиме темного поля)
-полоса чистого альбумина,
-полоса альбумина в твердой фазе с трещинами и мелкими агрегатами, (светится в режиме темного поля)
-полоса альбумина с мелкими светящимися точками липидов, (светится в режиме темного поля)
-полоса альбумина в фазе геля, (в этой области - острова),
-краевая полоса альбумина в твердой фазе с трещинами и ячейками, -край покровного стекла.

В структуре острова можно выделить следующие компоненты, если продвигаться от середины острова к краю:
-дендрит соли,
-сферолит холестерина,
-дендрит фосфолипидов, -растрескавшийся альбумин, -однородное поле альбумина без трещин.

Если через один месяц после начала кристаллизации отделить верхнее покровное стекло, то можно наблюдать, что на покровном стекле отпечатались только краевые структуры, расположенные по краю покровного стела. В центральной части покровного стекла практически никаких структур не отпечатывается.

1.10 Внешняя граница.

Внешней границей сыворотки является граница покровного стекла. Если объем сыворотки 20 мкл, то внешняя граница тонкая, окрашена в слабо-желтый цвет и покрыта сетью мелких трещин. Эта область представляет собой затвердевший белок. Растрескивание происходит из-за сжатия сыворотки при затвердевании. Последовательность событий при образовании трещин состоит в следующем:
1-Из сыворотки в краевой зоне через край испаряется вода.
2- Испарение воды вызывает повышение концентрации белков в краевой зоне.
3- При превышении концентрации белков некоторого критического значения начинается загустение и затвердевание сыворотки.
4- При затвердевании сыворотки происходит уменьшение объема.
5- При уменьшении объема в затвердевшей сыворотке возникают напряжения.
6- При превышении напряжения некоторого критического значения начинается растрескивание сыворотки.

1.10.1 Структура внешней границы.

1-Темная полоса толстого слоя альбумина. Темная полоса растрескавшегося альбумина. Если объем капли более 50 мкл, то в граничной области концентрируется большое количество белка. Белок затвердевает и образует структуры аналогичные методу открытой капли.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Формируются трещины, ячейки и кольцевое растрескивание внутри ячеек. Если зазор между стеклами сделать большим, то толстый слой белка формируется по всех границе сыворотки. Если зазор маленький, но большой объем сыворотки, то толстый слой формируется в углах покровного стекла. В углах, при достаточном количестве сыворотки, образуется полоса толстого слоя затвердевшего альбумина, которая от остальной области отделяется четкой границей.

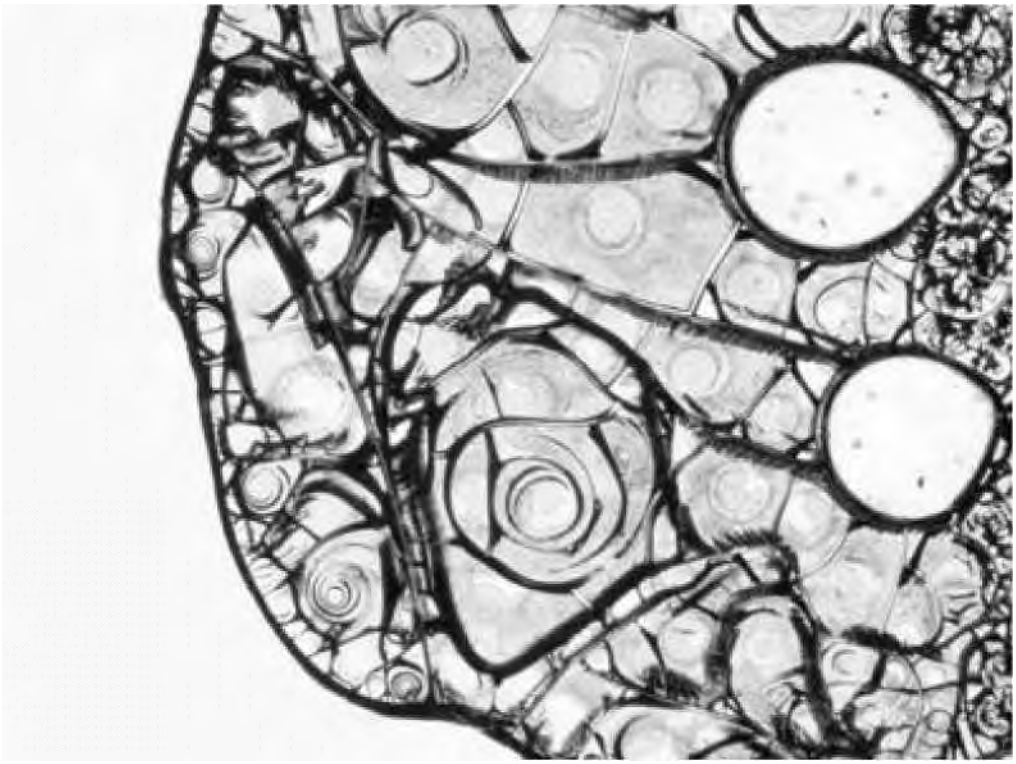


Рис. 2-27. Закрытая капля с большим зазором между стеклами. Светлое поле. Поле зрения 3,5 мм.

В полосе толстого слоя альбумина формируются ячейки. При дегидратации чистого альбумина в ячейках образуются кольцевые трещины. В ячейках происходит следующее: -формируются ядра, -образуется светло-коричневый осадок, -образуются интерференционные кольца в ячейках, -образуются дуговые трещины. Дуговые трещины не вертикальные, а наклонные, и выглядят в виде широких наклонных полос. Дуговые трещины имеют вид дуги (конуса), расширяющегося к низу.

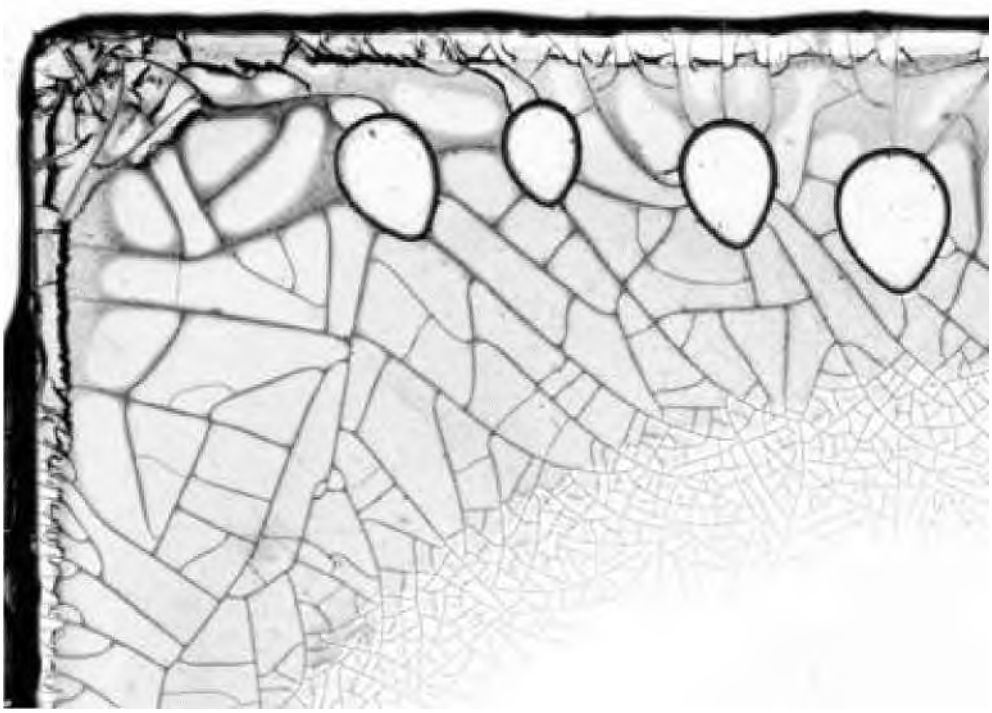


Рис. 2-28. Ячейки в краевой зоне. Поле зрения 3,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2-Полоса растрескавшегося альбумина с крупными ячейками. В этой полосе концентрация белков уже не очень высокая, поэтому полоса выглядит прозрачной и в ней образуются прямолинейные (слабо изогнутые) тонкие трещины, которые разбивают всю полосу на четырехугольные области.

3- Полоса растрескавшегося альбумина с мелкими ячейками.

4- Полоса альбумина с псевдотрещинами.

При достаточной концентрации вытянутых белковых молекул происходит растрескивание путем возникновения псевдотрещин. Вся область разбивается псевдотрещинами на части, в которых затем происходит растрескивание с помощью обычных трещин.

5- Полоса альбумина с одиночными трещинами. Эти трещины находятся дальше от зоны растрескивания альбумина. Как правило, трещина содержит некоторую неоднородность, которая послужила причиной возникновения трещины. Короткие трещины бывают в виде двух или трех лучей, отходящих от неоднородности.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

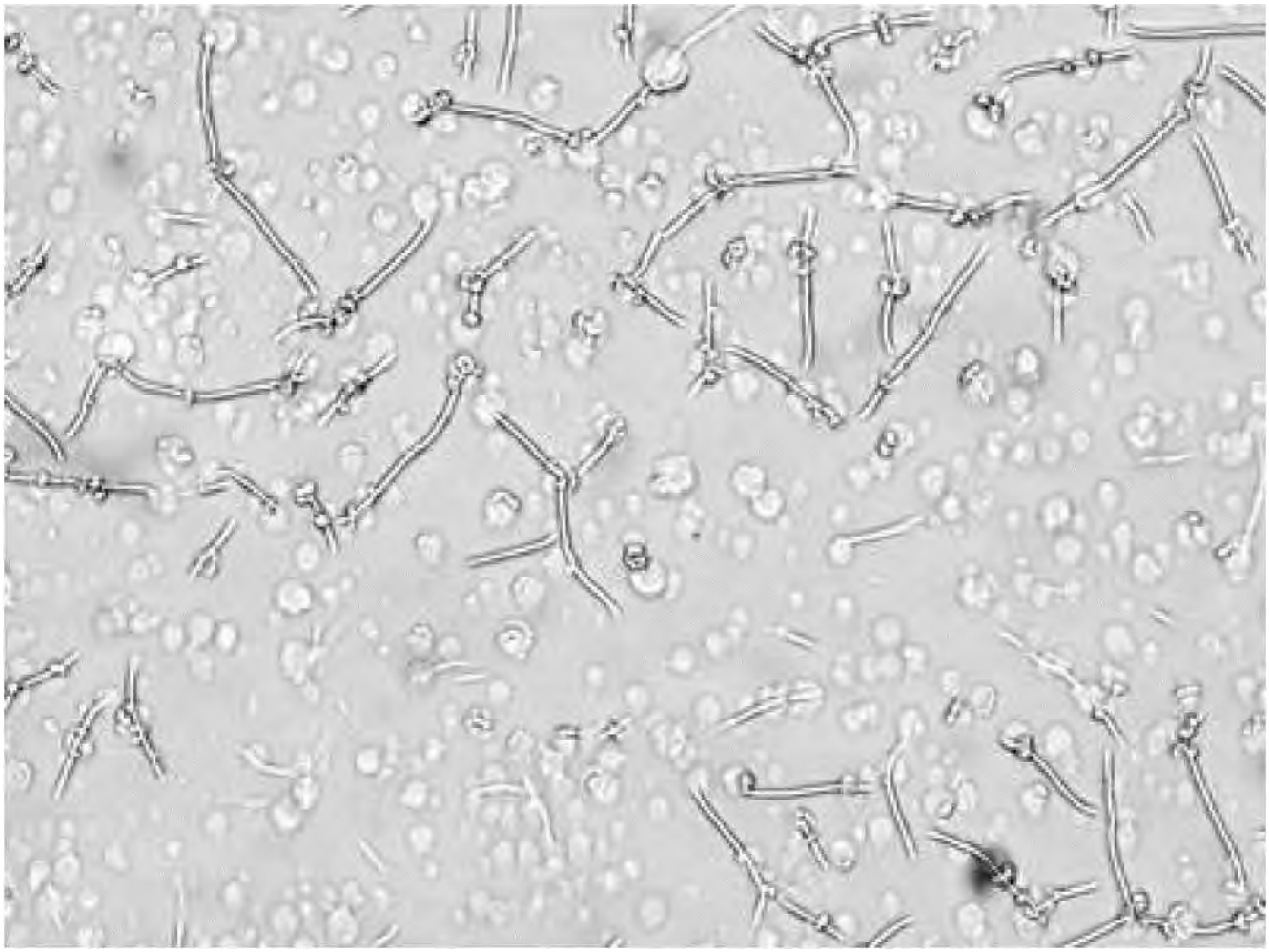


Рис. 2-29. Тонкие короткие трещины. Поле зрения 0,2 мм.

6- Полоса альбумина без трещин.

Около края имеется полоса, которая ярко светится в режиме темного поля. Светятся мелкие точки, которые являются мелкими каплями липидов.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

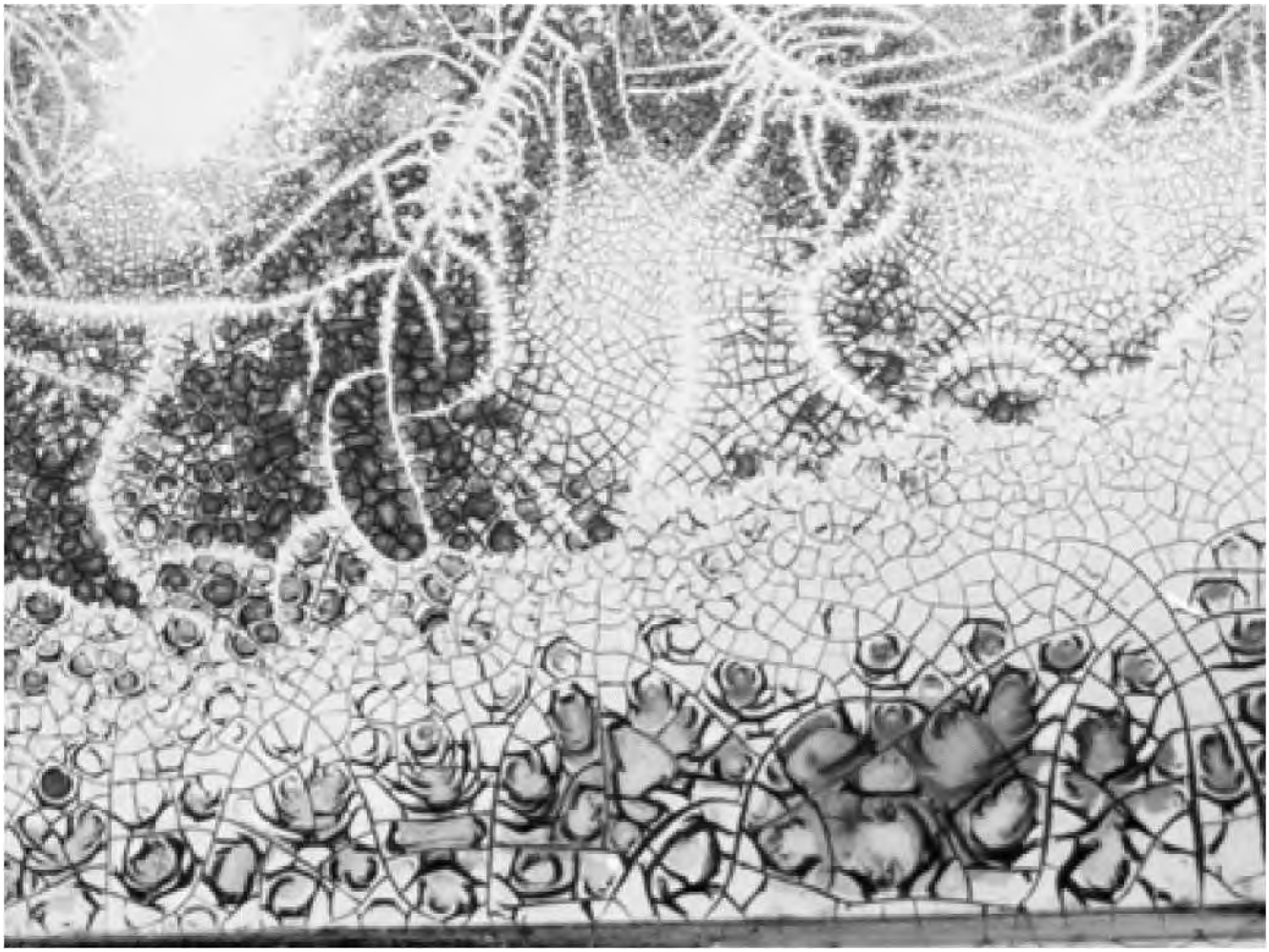


Рис. 2-30. Различные слои в граничной области. Светлое поле. Поле зрения 7 мм.

Обычно, вдоль границы вначале идет тонкая прозрачная полоса затвердевшей сыворотки, а за ней идет полоса с тонкими трещинами. При этом имеются длинные тонкие трещины параллельно границе, и короткие тонкие трещины в разных направлениях. Трещины с самого края направлены перпендикулярно к краю

Кристаллы. Если сыворотка занимает не все пространство под покровным стеклом, то происходит образование кристаллов на чистой поверхности стекла. Иногда образуются кристаллы на верхней поверхности покровного стекла и на нижней поверхности предметного стекла. Эти кристаллы образуются из пара, который испаряется из сыворотки.

1.10.2 Темные острова.

Темные острова образуются в краевой зоне. В зоне светящихся точек хорошо заметны темные области округлой формы и различного размера. У самого края темные острова маленькие, но чем дальше от края, тем больше размер темных островов. В проходящем свете темные острова не видны. В режиме темного поля темные острова видны только потому, что у них по краю светятся точки выпавших липидов. В режиме фазового контраста удается рассмотреть структуру темных островов. Темный остров имеет структуру дендрита.

Иногда по краю темных островов происходит растрескивание альбумина. В режиме фазового контраста иногда можно видеть псевдотрещины в виде лучей, расположенные по краям.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

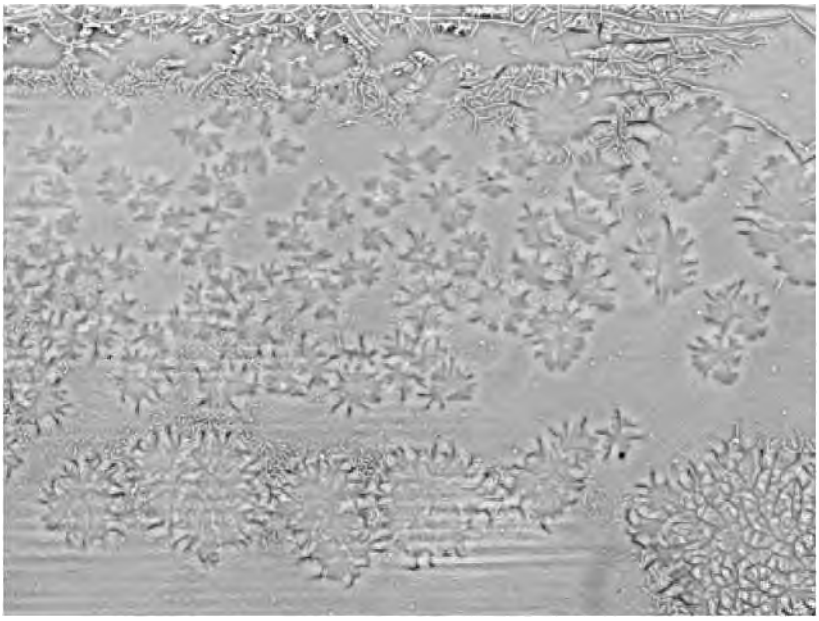


Рис. 2-31. Темный дендрит. Фазовый метод. Поле зрения 1,5 мм.

При приближении к самому краю в зону затвердевшего альбумина темные острова становятся видны как округлые кристаллические агрегаты. По форме, размерам и структуре эти агрегаты аналогичны кристаллам соли, которые образуются на поверхности высыхающей сыворотки методом открытой капли. Подтверждением того, что эти агрегаты являются кристаллами соли служит тот факт, что они образуются при высыхании раствора вода+альбумин+соль.

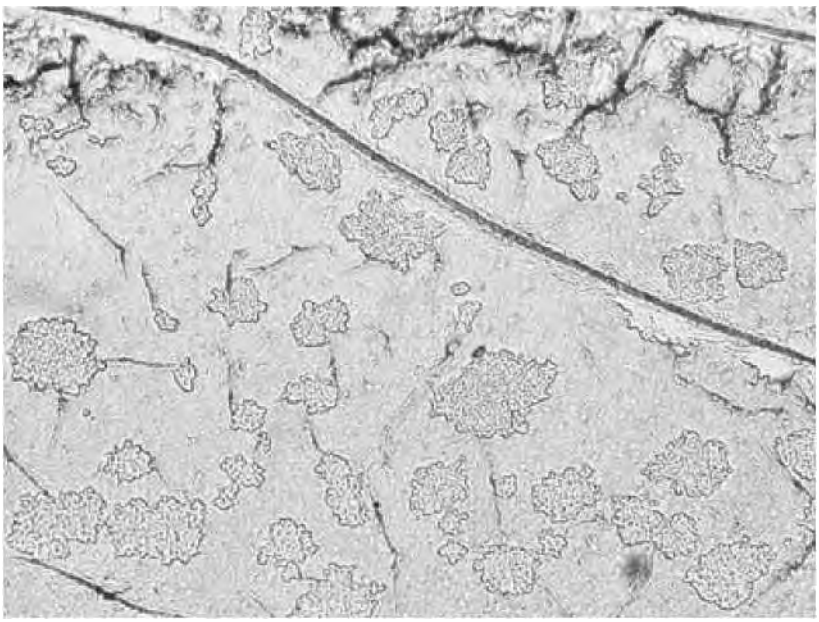


Рис. 2-32. Кристаллы соли в краевой зоне. Светлое поле. Поле зрения 0,2 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

1.11 Трещины.

1.11.1 Трещины.

Трещины расположены в области белка, и бывают различных типов. Как правило, трещины раскалывают белок по всей толщине от верхней до нижней границы. В режиме светлого поля трещины видны в виде темных линий. Видны линии всех ориентаций. В режиме темного поля трещины видны в виде светлых линий. Боковая грань трещины ровная, и хорошо отражает свет. При этом светятся только те линии, которые перпендикулярны направлению освещения. При наблюдении с помощью поляризационного метода трещины видны в виде ярких полос. Это можно объяснить тем, что на границах трещины имеется напряженное состояние.

Область растрескивания альбумина не является однородной. В области растрескивания содержатся замкнутые области без трещин. И наоборот, в области без трещин содержатся замкнутые области с трещинами. На основе этого можно сделать вывод, что область белка состоит из двух фаз (компонент). Одна фаза растрескивается, а другая фаза не растрескивается.

Можно выделить следующие типы трещин:

-Дуговые трещины в ячейках.

-Г ребешковые трещины - наблюдаются в ячейках вдоль трещин, образующих ячейку. -Тонкие длинные трещины появляются по краю покровного стекла при растрескивании белка.

-Тонкие короткие трещины двух и трех лучевые. -Псевдотрещины.

-Толстые трещины в зоне границы воздух-альбумин. На самом деле это не трещины, а образования в виде толстых волокон из липидов.

1.11.2 Псевдотрещины.

Трещины - это раскалывание альбумина, находящегося в твердой фазе.

Псевдотрещины бывают двух типов - тип 1 и тип 2.

Псевдотрещины типа 1 - это раскалывание альбумина, находящегося в фазе геля. Особенность псевдотрещин в том, что это не полный разрыв геля, а только разрыв структуры геля с заполнением области разрыва некоторым веществом (жидкостью). В специальной литературе по разрушению полимеров такие трещины называются трещинами «серебра».

Возникает основной вопрос: в каком случае образуются трещины, а в каком случае образуются псевдотрещины? Ответ простой: псевдотрещины образуются при растрескивании геля с большой концентрацией высокомолекулярных соединений (полимеров) и при наличии в геле жидкой фазы. Дело в том, что при образовании псевдотрещины разрушается основная структура геля и снимается напряжение. Происходит раскрытие псевдотрещины, как и у обычной трещины. Особенность состоит в том, что не происходит заполнение псевдотрещины воздухом. Если в геле высокая концентрация длинных молекул, то они как канатами соединяют противоположные стороны псевдотрещины. Между канатами пространство заполняется жидким растворителем, в нашем случае водой. Так как длинные молекулы в псевдотрещине ориентированы строго перпендикулярно к поверхности трещины, то возникает оптическая неоднородность, и в поляризованном свете псевдотрещина ярко светится. В проходящем свете псевдотрещина видна как светлая полоса - полоса оптической неоднородности.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

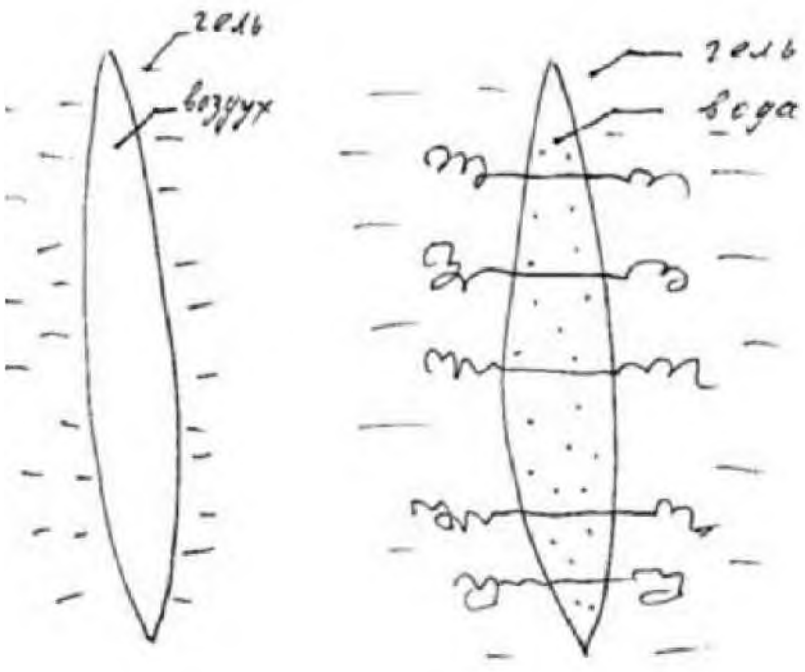


Рис. 2-33. Строение трещины (1) и псевдотрещины (2).

Псевдотрещины представляют собой тонкие длинные линии, прямые или изогнутые. При большом увеличении псевдотрещины видны в виде ярких белых линий. Свойства псевдотрещин:
-псевдотрещины - тонкие линии постоянной ширины, светлые в проходящем свете и темные при фазовом методе,
(трещины - тонкие линии постоянной ширины, темные в проходящем свете и светлые при фазовом методе),
- псевдотрещины образуются при дегидратации чистого раствора альбумина,
- псевдотрещины образуются на ранней стадии дегидратации,
-псевдотрещины пронизывают все пространство белка,
-псевдотрещины обычно прямые, но иногда загибаются,
-существуют области сгущения, из которых выходят псевдотрещины в разные стороны, - существуют псевдотрещины первого уровня, в области сгущения от псевдотрещин первого уровня перпендикулярно ей отходят параллельно несколько псевдотрещин второго уровня, - псевдотрещины могут исходить в виде лучей в разные стороны от некоторой неоднородности,
-псевдотрещина завершается в чистом пространстве, или упирается в другую псевдотрещину,
-если в области псевдотрещин много альбумина, то он разделяется псевдотрещинами на ячейки, и растрескивается в каждой ячейке отдельно,
-имеются области растрескавшегося альбумина без псевдотрещин,
-трещины не пересекают псевдотрещины, а только упираются в них. Это происходит потому, что псевдотрещины снимают напряжение, и трещины через них не развиваются.

Полимеризация альбумина может быть различной в зависимости от вязкости альбумина на момент полимеризации. При малой вязкости альбумина (ближе к центру капли) псевдотрещины прямолинейные, правильные, сохраняют структуру. В краевой области псевдотрещины изогнутые, так как вязкость альбумина высокая. По степени изогнутости волокон можно судить о вязкости альбумина в этом месте.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

В краевой зоне капли , у границы покровного стекла , идет наиболее сильное испарение воды и затвердевание. В этой области образуется сеть трещин и псевдотрещин. Можно наблюдать случаи, когда псевдотрещина переходит в обычную трещину (светлая линия становится темной). Это имеет место, если трещина начала развиваться в твердой фазе, а затем перешла в область с высокой концентрацией высокомолекулярных соединений и стала псевдотрещиной. Анализ совместной структуры трещин и псевдотрещин показывает, что они развивались одновременно, и их развитием управлял один закон - снятие напряжения в геле.

Рис. 2-34. Трещины - темные. Светлое поле. Поле зрения 0,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

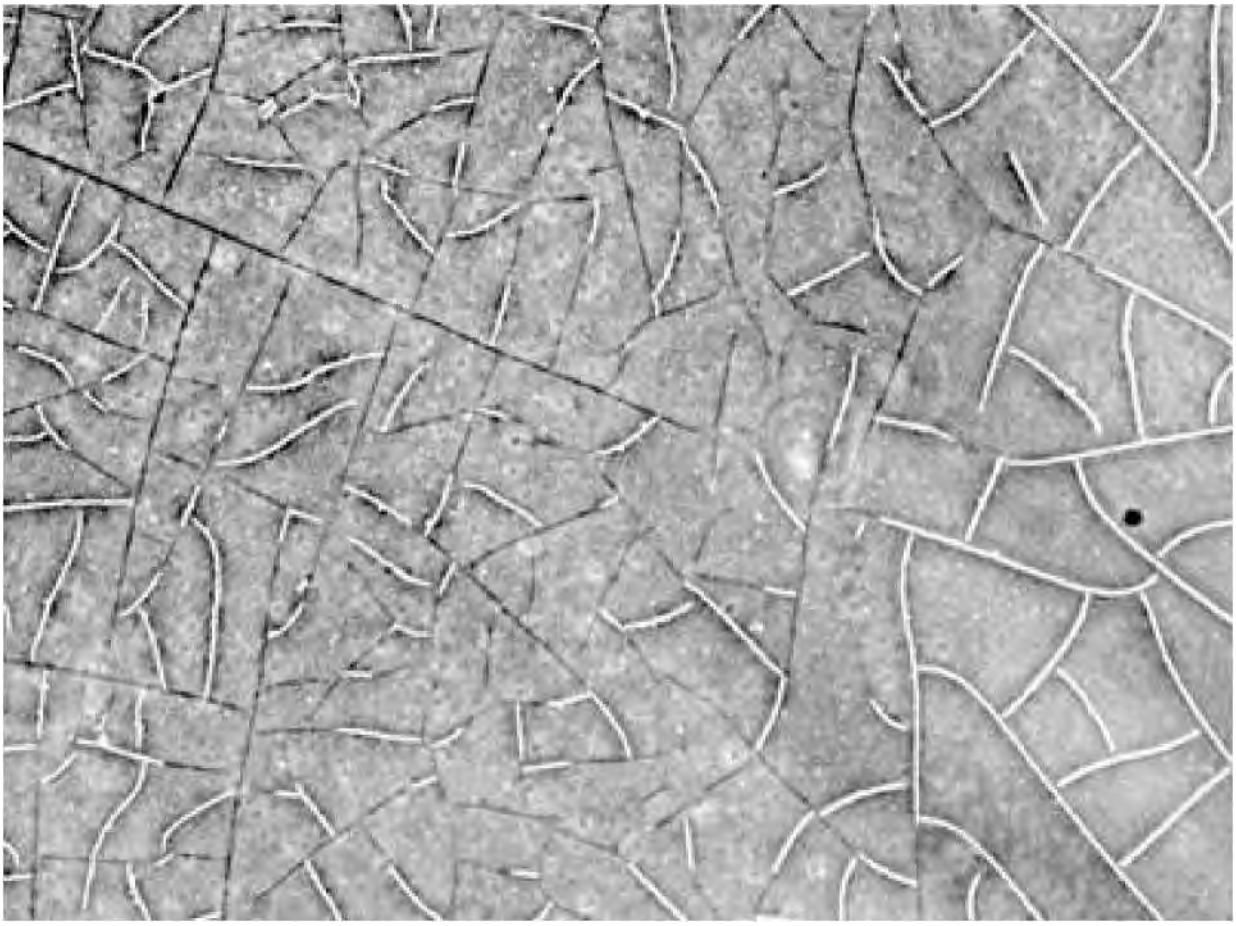


Рис. 2-35. Трещины - светлые и псевдотрещины типа 1 - темные. Фазовый контраст. Поле зрения 0,5 мм. В местах образования твердой корки на поверхности капли трещины на поверхность не выходят и образуются псевдотрещины.

В краевой зоне находится альбумин, и при затвердевании он должен был покрыться равномерной сетью трещин. Однако наблюдаются длинные извилистые линии (псевдотрещины), которые разбивают альбумин на отдельные области, в которых и происходит растрескивание.

Таблица 2-9. Сравнение методов освещения для трещин и псевдотрещин.

	Метод освещения	Трещины	Псевдотрещины Тип 1	Псевдотрещины Тип 2	Фон
1	Светлое поле	темные +	светлые	светлый	светлый
2	Поляризованный свет	темные	светлые +	темный	темный
3	Фазовый контраст	светлые +	темные +	серый	серый
4	Темное поле	светлые +	темные	темный	темный

Таким образом, получается, что трещины выявляются с помощью освещения методом светлого поля, методом темного поля и фазовым методом. Псевдотрещины выявляются с помощью освещения методом фазового контраста и поляризационным методом. Только с помощью фазового мет ода освещения одновременно видны и трещины и псевдотрещины.

В режиме светлого поля псевдотрещины проявляются по-разному.

-При слабом увеличении (2х, 4х) псевдотрещины не видны, и сливаются с фоном.

-При среднем увеличении (10х, 20х, 40х) псевдотрещины видны в виде светлых линий на сером фоне.

-При сильном увеличении (60х) псевдотрещины видны в виде темных линий на сером фоне.

Псевдотрещины образуются так же при высыхании раствора чистого альбумина. Это говорит о том, что в растворе чистого альбумина кроме глобулярной формы молекул присутствуют молекулы с нарушенной третичной и четвертичной структурой - распутанные глобулы, молекулы альбумина в виде нитей. Повышение концентрации распутанных глобул повышает вероятность

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

образования псевдотрещин. Количество псевдотрещин пропорционально количеству распутанных глобул альбумина.

Одна из причин образование псевдотрещин - наличие затвердевшей корочки на поверхности высыхающей капли. В этом случае трещина зарождается во внутренней части капли, расширяется, но не выходит на поверхность. При этом не происходит заполнение трещины воздухом, и трещина заполняется растворенной водой. Поверхность капли над трещиной остается ровной.

Псевдотрещины тип 2.

Псевдотрещины тип 2 отличаются от псевдотрещин тип 1 тем, что фактически отсутствует раскрытие трещины. Псевдотрещины тип 1 образуются одновременно с обычными трещинами. Псевдотрещины тип 2 образуются на более ранней стадии, когда сыворотка еще недостаточно твердая чтобы образовались трещины, но уже достаточно густая, и имеется довольно жесткая трехмерная структура. Суть образования псевдотрещины тип 2 состоит в том, что в некоторый момент времени сыворотка загустевает настолько, что в ней возникает напряжение. Под действием напряжения в некоторой области происходит раздвижение (а не разрыв) структуры сыворотки. Наличие высокой концентрации высокомолекулярных соединений препятствует разрыву. В результате раздвижения снимается напряжение. В связи со структурой псевдотрещины тип 2 у нее нет четкой границы. Поэтому псевдотрещины тип 2 не выявляются никакими специальными методами освещения. Они всегда выглядят так же как и фон. Однако увидеть все таки псевдотрещины тип 2 можно - на основе анализа текстуры изображения поля трещин. Псевдотрещины всегда расположены в тех областях, где имеются обычные трещины. Псевдотрещины тип 2 видны в виде извилистых линий, разбивающих поле трещин на фрагменты.

Таким образом, получаем, что растрескивание сыворотки происходит в два этапа. На первом этапе, когда сыворотка еще не затвердела, происходит образование псевдотрещин тип 2. Эти псевдотрещины разбивают сыворотку на отдельные области.

Затем сыворотка затвердевает, и происходит второй этап растрескивания. Растрескивание происходит в пределах областей, образованных псевдотрещинами типа 2. При этом одновременно образуются трещины в тех местах, где высокомолекулярных компонент мало, и псевдотрещины тип 2 в тех местах, где высокомолекулярных компонент много.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

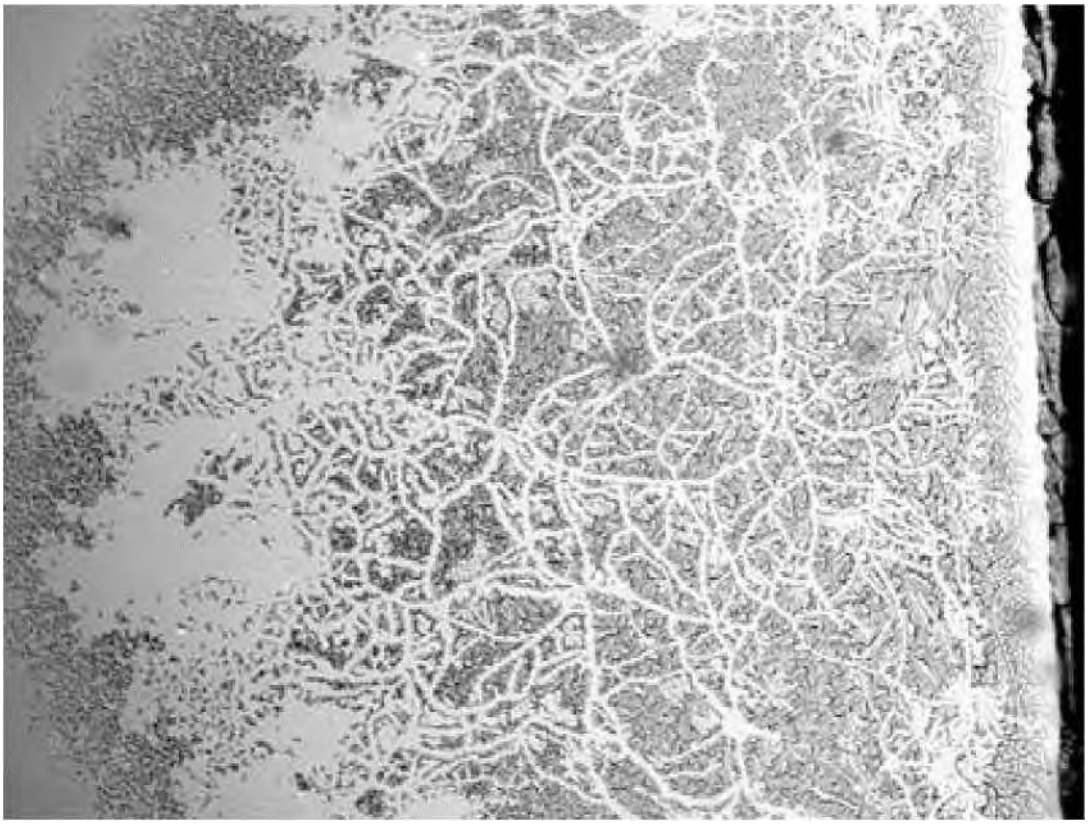


Рис. 2-36. Псевдотрещины типа 2 в виде изогнутых линий. Поле зрения 1,5 мм.

Особенно трудно отличить псевдотрещины тип 2 в структуре островов, в которых имеются дендриты соли с тонкими ветвями. Толщина псевдотрещин тип 2 и дендритов практически совпадает, и те и другие выглядят светлыми линиями. Отличить можно следующим образом. Дендрит соли имеет центр, от которого отходят прямолинейные линии - это дендрит. Дальше линии загибаются - это уже псевдотрещины тип 2. Так же как и дендрит псевдотрещины образуются на раннем этапе, и концы ветвей дендритов служат зародышами для развития псевдотрещин тип 2. И псевдотрещины тип 2 растут как продолжение ветвей дендрита. Но так как направление роста псевдотрещин определяется не кристаллической структурой, а напряжениями в среде, то псевдотрещины загибаются.

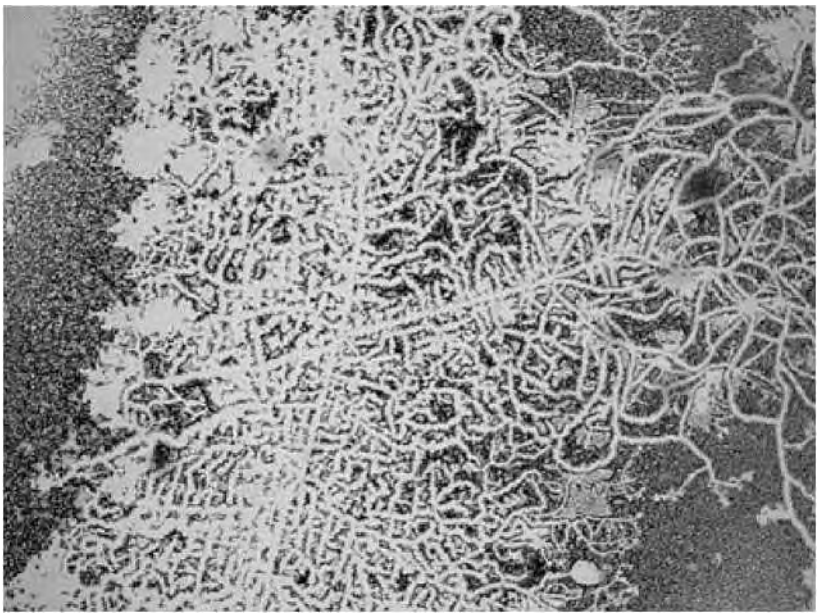


Рис. 2-37. Прямые ветви дендрита соли переходят в загнутые псевдотрещины тип 2. Поле зрения 1,5 мм.

Причиной возникновения трещин и псевдотрещин является возникновение напряжений в

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

затвердевшей сыворотке. Место возникновения трещин определяется двумя параметрами:
-места повышенного напряжения (включения, кристаллы, неоднородности), -места пониженной прочности. Микропузырьки воздуха, которые находятся в сыворотке, существенно уменьшают прочность.

Трещины и псевдотрещины представляют собой различные виды разрушения геля . Трещина - это полный разрыв геля, псевдотрещины - это разрыв структуры без образования трещины. Имеется еще один тип разрушения геля - образование областей. Если гель достаточно вязкий, а сжатие структуры геля достаточно сильное, происходит разрыв структуры геля и расхождения границ разрыва структуры на большие расстояния. В геле образуется большая область, в которой мало надмолекулярных образований, очень слабая или совсем нет трехмерной структуры геля. Эта область в основном заполнена водой, солью, и отдельными макромолекулами. Эта область при различных методах освещения никак не выявляется и является прозрачной и однородной. Область можно выявить только на основе того, что проявляется на границе геля вокруг нее. Вокруг нее имеется область альбумина, которая иногда растрескивается. Вокруг нее часто выпадают липиды в виде точек, которые ярко светятся в режиме темного поля. Такие области образуются в области границы, на границе островов, в зоне образования дендритов липидов. Если это большая область в зоне белка, то эта область является так называемым простым островом. Если в области разрыва достаточно соли, то в этой области начинает расти дендрит соли.

В зависимости от соотношения вязкости геля сыворотки, силы напряжений, концентрации белков, липидов и соли, происходят разные сценарии разрушения геля и образования островов. Области разрыва геля являются начальными фазами при образовании островов.

1. Вначале формируется разрыв - простой остров. В нем может вырасти дендрит соли - темный остров. Вокруг острова может произойти выделение липидов - обычный остров.

Разрыв -> простой остров -> темный остров -> обычный остров.

2. Если структура геля достаточно прочная, и область разрыва образоваться не может, то образование островов происходит по другому сценарию.

Область высокой концентрации альбумина и липидов -> образование псевдотрещин -> образование трещин между псевдотрещинами -> образование острова.

3. Если имеется высокая концентрация соли, то образование островов происходит по третьему сценарию.

Образование крупного дендрита соли-> выделение липидов по границе-> образование острова.

1.11.3 Параллельные трещины.

Параллельные трещины обычно возникают в краевой области. Параллельные трещины возникают в том случае, если имеется выделенная ориентация волокон в геле, содержащем высокомолекулярные соединения. Остается только выяснить вопрос - почему в некоторых областях происходит ориентирование молекул вдоль некоторого направления. Параллельные трещины образуются при растрескивается в виде параллельных трещин, если имеется выделенная ориентация молекул полимера. Известно, что при увеличении концентрации раствора молекул, которые имеют вытянутую форму, происходит самосборка, самоупорядочивание молекул, и молекулы выстраиваются ориентированными в некотором направлении.

Параллельные трещины называют маркерами пролиферации. Можно выделить следующие особенности этого маркера:
-параллельные трещины чаще всего образуются в краевой области, -параллельные трещины являются наклонными трещинами, -параллельные трещины появляются на раннем этапе формирования структур, -параллельные трещины представляют собой ряд параллельных линий (от 10 до 40 линий), -расстояние между линиями практически одинаковое - 0,02 мм (20 мкм),

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-особо ярко трещины светятся в режиме темного поля и в поляризованном свете, -иногда одна линия расходится на две параллельные трещины, -иногда трещина прерывается, и продолжается в виде псевдотрещины, -иногда сверху параллельной трещины образуются кристаллы соли.

Параллельные трещины могут быть образованы фибрином и лецитином.

Параллельные трещины образуются, если в сыворотку добавить фибрин. Фибрин - это фибриллярный белок, молекулы которого имеют не глобулярную структуру (спутанный шар), а фибриллярную структуру (длинные нити).

Лецитин (один из основных компонентов фосфолипидов) при растворении в воде образует слои. Слои представляют собой устойчивую жидкокристаллическую структуру. При растрескивании параллельные слои могут служить причиной образования параллельных трещин.

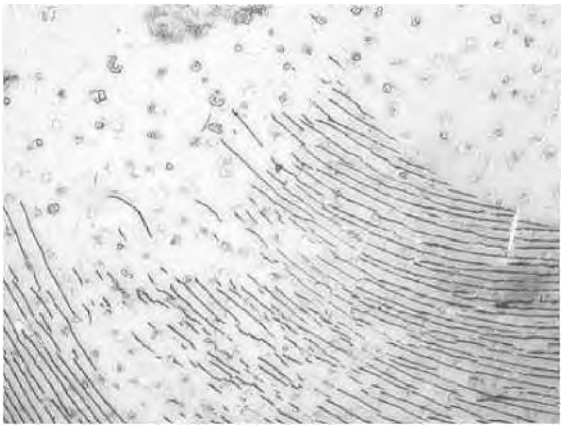


Рис. 2-38. Параллельные трещины. Поле зрения 4 мм.

Для количественной оценки наличия параллельных линий можно использовать площадь, занимаемую параллельными трещинами.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Глава 2. Структуры в закрытой капле.

При дегидратации сыворотки крови методом закрытой капли происходит кристаллизация различных компонент, содержащихся в сыворотке. Принципиальное отличие метода закрытой капли от метода открытой капли состоит в том, что в методе закрытой капли испарение воды происходит очень медленно. Это создает оптимальные условия для роста кристаллов. Одной из основных особенностей кристаллизации является сокристаллизация. Сыворотка крови имеет сложный состав, и при дегидратации происходит совместная кристаллизация и осаждение (сокристаллизация и соосаждение) одновременно различных компонент. Если условия кристаллизации компонент сильно различаются, то возможна кристаллизация чистых веществ, таких как хлорид натрия, моноурат натрия. Если различные компоненты кристаллизуются при одинаковых условиях, то возможна совместная кристаллизация нескольких веществ в одном кристалле, например, холестерин и триглицериды.

При загустении сыворотки начинается разрушение структуры компонент сыворотки, надмолекулярных агрегатов. Липопротеины распадаются на компоненты - холестерин, эфиры холестерина, триглицериды, фосфолипиды. Затем начинается процесс кристаллизации отдельных компонент, содержащихся в загустевшей сыворотке крови. Компоненты липопротеинов (холестерин, эфиры холестерина, триглицериды и фосфолипиды) кристаллизуются в области их первоначальной локализации - вблизи границы раздела сыворотки и пузырька воздуха. Так как кристаллизация происходит из гелеобразного состояния, то она протекает медленно за счет диффузии компонент.

Имеется три зоны повышенной концентрации альбумина:
1- на краю покровного стекла (там происходит испарение воды),
2- на границе воздух-альбумин (когда внутренняя область воздуха увеличивается, альбумин раздвигается в стороны),
3- на границе островов (при кристаллизации соли образуется большой дендрит, который при росте раздвигает альбумин).

Имеется три области образования кристаллов:
1- на поверхности предметного стекла (в нижнем слое сыворотки), в этой области расположены все основные кристаллы,
2- на поверхности покровного стекла (в верхнем слое сыворотки), в этой области расположено небольшое число мелких кристаллов.
3- в центральной части сыворотки на некоторых центрах кристаллизации.

Принципиальное значение имеет локализация структурных элементов (кристаллов). Можно выделить два основных типа локализации:
1- локализация по всему полю - означает, что кристаллы равномерно распределены по всему полю. Например, игловидные кристаллы моноурата натрия, оолитоподобные сферолиты солей кальция.
2- локализация в области островов - означает, что данный компонент является составной частью липопротеинов. Например, белок липопротеид, холестерин, триглицериды, фосфолипиды.

При кристаллизации можно выделить ряд характерных объектов:
А- Кристаллические образования:
1-Сферолиты
-Сферолит большой - холестерин (Савина)
-серые
-яркие

-цветные

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-Сферолит веерный (оксалаты, соли щавелевой кислоты)
-Сферолит мелкий двойной
-Сферолит мелкий оолитоподобный (соли кальция)
2-Ветви (триглицериды, Савина)
3- Дендриты (белки - глобулины)
- прямоугольные дендриты (иммуноглобулины, Савина)
- пластины - (гамма глобулины, Савина), (холестерин, Шатохина) -темные дендриты,
-тонкие дендриты,
-тонкие дендриты в области воздуха
4- Иглы (моноурат натрия)
-одиночные
-пучки (снопы, звезды)
-перья (цветные)
5- Капли (эфиры холестерина).
6- Волокна
7- Коричневые агрегаты (билирубин)

В- Структурные образования.
8- Воздушные области.
9- Ветви.
10- Трещины (параллельные трещины (маркер пролиферативных процессов), прямые трещины, кольцевые трещины)
11- Напряжения (точечные, облака)

аблица 2-10. Структурные элементы высохшей капли.

№	Структурный элемент	Остров	Везде	Поля риз	Вещество	Савина	Шатохина-морфотипы	Каноненко
1.1	Сферолит	+	+	+	Холестерин	Радиальнолучистый сферолит, крестообразный, -холестерин, гиперхолестеринемия	Сферолит, -ядро в центре- маркер онкологии	СФк - сферолит крупный, - Белок
1.2	Сферолит веерный	+		+	Оксалаты	Веерный, перистый сферолит -оксалаты (соли щавелевой кислоты), -гипероксалемия	Веерный сферолит	СФД - сфородендрит
1.3	Сферолит мелкий		+	+				СФм-сферолит мелкий

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

	двойно й							
1.4	Сферол ит мелкий оолито подобн ый		+	+	Соли кальция	-соли кальция, -гиперокальциемия		
1.5	Мелкоз ернист ые агрегат ы				Глицин	-глицин, -гиперглицинемия		
2.1	Ветви	+	+	+	Триглицери ды	Разветвленные дендриты, Спутанно-волокнистый агрегат, - триглицериды		Ко-Коралловые кристаллы
2.2	Нити	+	+	-				
3.1	Дендри ты	+	-	-		Иммуноглобулины	Дендритный морфотип	
3.2	Пласти ны	+			гаммаглобу лины	Пластинчатые агрегаты, - гаммаглобулины	Пластинчатый морфотип, - холестерин	
4.1	Иглы одиноч ные		+	+	Моноурат натрия			ИК-игольчатые кристаллы, - моногидрат холестерина
4.2	Иглы сноп		+	+	Моноурат натрия	Моноурат натрия, - гиперурикемия	Игольчатый морфотип	ИК-игольчатые кристаллы с центром роста
4.3	Иглы перья	-	+	+		-гиперурикемия		
5	Капли		+	+	Эфиры холестерина			КД-конфокальн ые домены
6	Волокн а				мукополиса хариды	мукополисахариды		
7	Коричн евые агрегат ы		+		Альбумин и липиды			
8	Воздуш ные полост и		+		Газы кислород и CO2			
9	Ветви	-	+	+	липиды	Нитевидные кристаллы	Миелиновые (маслянистые)	ЖКЛ - жидкокриста
						-альбумин	бороздки	ллические линии

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

10	Паралл ельные трещин ы		+	+	Альбумин и фибрин		Маркер пролифератив ных процессов	
11	Напряж ения	-	+	+				

2.1- Сферолиты.

Сферолиты обычно образуются при кристаллизации веществ в вязкой среде, когда слабая диффузия и невозможен рост правильных кристаллов.

Возможны различные типы сферолитов:

-слоистый, когда сферолит растет слой за слоем, при различных условиях, на срезе видны чередующиеся слои,

-игольчатый, когда сферолит состоит из игольчатых кристаллов, растущих из центра кристаллизации,

-ветвистый, когда сферолит состоит из веточек (дендритов), растущих из центра кристаллизации,

-пластинчатый, когда сферолит состоит из пластинок, растущих из центра кристаллизации.

Рост кристаллов осуществляется путем присоединения к уже существующему кристаллу некоторых компонент. В качестве компонент могут быть отдельные атомы, отдельные молекулы, агрегаты молекул, мелке кристаллы, пластинки (блочная кристаллизация). При кристаллизации высокомолекулярных соединений происходит присоединение к кристаллу как отдельных молекул, так и целых молекулярных агрегатов (фибриллы, пачки, ленты, пластины-ламели). При образовании сферолитов из высокомолекулярных соединений сферолит состоит из лучей (фибрилл) в кристаллическом состоянии и из аморфного состояния того же вещества (липида) или растворителя (вода и альбумин) которые заполняют пространство между лучами.

Существует еще один способ образования сферолитов - путем расщепления растущего кристалла. Тогда можно предположить следующую последовательность образования сферолита: кристалл в виде длинной пластинки, перистый кристалл, сферолит. Способ роста сферолита путем расщепления является универсальным, и применим для веществ с любой кристаллической решеткой. Как бы ни начинал расти сферолит, какой бы формы не был зародыш, при росте и расщеплении любого кристалла получается сферолит. Суть роста кристаллов с расщеплением состоит в том, что на поверхности кристалла оседают примеси, или какое-то другое вещество, блокирующее нормальный рост. При этом получается рост как бы лучами, иголками.

На самом деле описанные два метода блочный и расщепление при росте сферолитов являются не исключающими, а дополняющими друг друга. При реальном росте происходит и расщепление, и блочный рост.

Полимеры обычно образуют два типа сферолитов: кольцевые и фибриллярные. Кольцевые сферолиты имеют структуру чередующихся светлых и темных колец. Чередующаяся структура вызвана закручиванием лент, образующих лучи сферолита. Таким образом разность хода лучей непрерывно возрастает вдоль радиуса.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

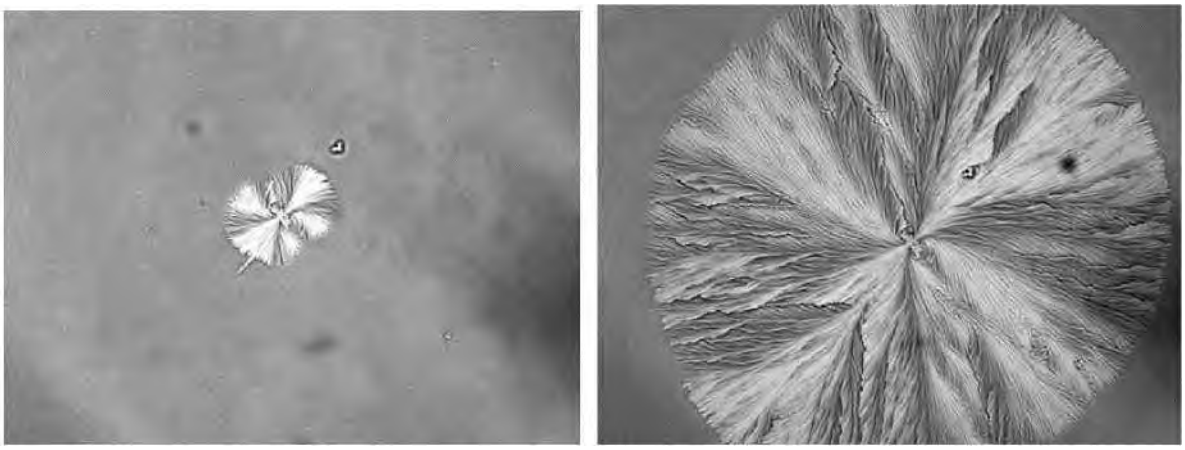


Рис. 2-39. Сферолит в начальной стадии и через три дня. Поляризованный свет. Поле зрения 0,5 мм.

В соответствии с размером можно выделить два основных класса сферолитов - большие и малые. Большие сферолиты имеют размер порядка 100 мкм. Малые сферолиты имеют размер порядка 10 мкм.

Большие сферолиты можно условно разделить на три класса: серые, яркие и цветные. Эти типы сферолитов отличаются по степени оптической анизотропии. Серые сферолиты имеют самую слабую оптическую анизотропию, а цветные сферолиты имею самую сильную анизотропию. Разумеется, что это деление условно, и существуют промежуточные типы сферолитов, с промежуточным значением анизотропии. Степень анизотропии определяется процентным содержанием оптически анизотропного компонента, которым могут быть липиды.

Степень оптической анизотропии проявляется двумя способами. Первый способ - яркость свечения при скрещенных поляроидах. Чем выше степень анизотропии - тем сильнее свечение. Второй способ - характер свечения при параллельных поляроидах. При параллельных поляроидах серые сферолиты не видны, они не вносят изменений в свет. Яркие сферолиты дают слабое изображение темного креста. Цветные сферолиты в параллельных поляроидах дают темное изображение креста.

2.1.1. Большие яркие сферолиты (холестерин)

Яркие сферолиты.

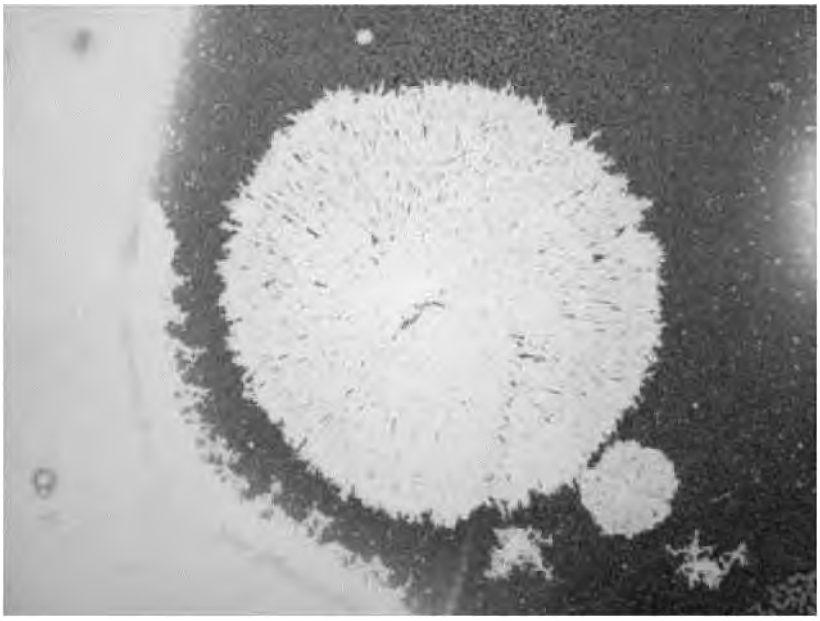
Яркие сферолиты правильной круглой формы локализованы в область белка, где им никто не мешает расти. Сферолиты растут в течении 4 дней, затем рост останавливается. Некоторые сферолиты растут в течении 8 дней. Сферолиты расположены в середине между предметным и покровным стеклом. Если отделить покровное стекло от предметного стекла, то часть сферолитов останется на предметном стекле, часть сферолитов останется на покровном стекле. Некоторые сферолиты распадутся на две части, одна часть сферолита останется на предметном стекле, а вторая часть сферолита - на покровном стекле. В зависимости от расположения, сферолиты имеют различную форму.

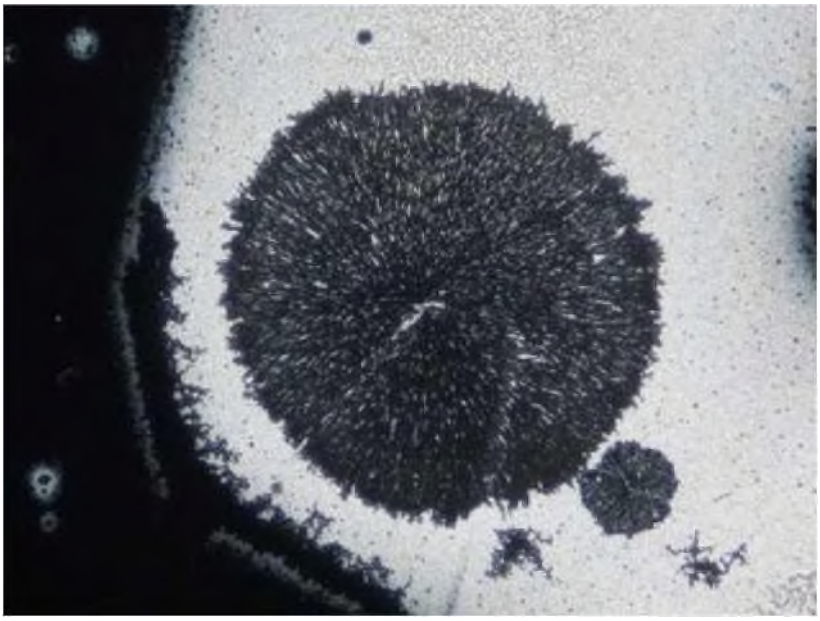
-в свободной белковой области сферолиты имеют правильную круглую форму. -на границе островов сферолиты имеют вид секторов полукруглой формы, в виде веера. -между ветвями дендритов соли вырастают незавершенные ветвистые сферолиты неправильной формы.

-на границе островов можно наблюдать сферолиты неправильной формы с отдельными яркими листьями по краям.

-на границе островов в поляризованном свете можно наблюдать много ярких точек, которые являются не выросшими зародышами сферолитов.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com





PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

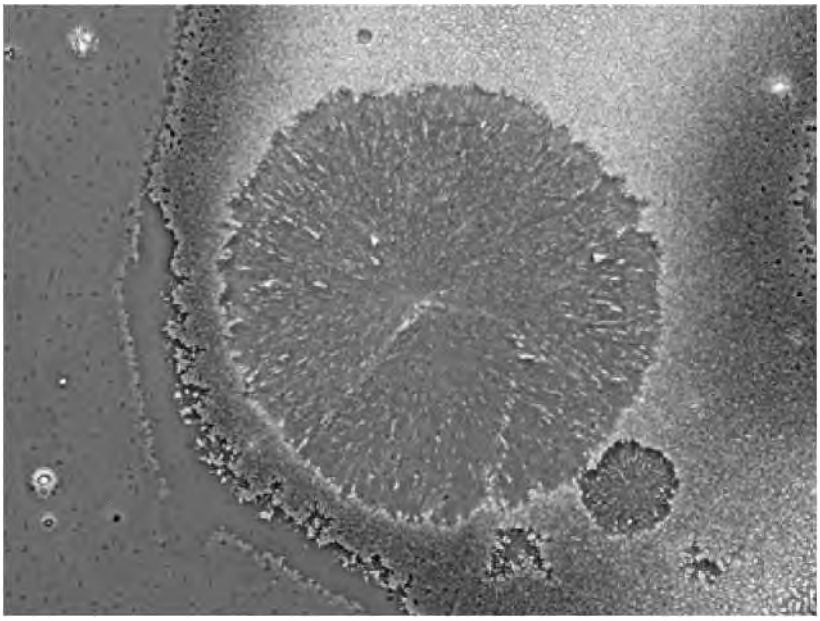


Рис. 2-40. Яркий сферолит при различных режимах освещения. 1-светлое поле, 2- поляризационный свет, 3- Темнопольное освещение, 4- фазовый метод. Поле зрения 1,5 мм.

В сферолитах можно выделить следующие структурные компоненты.

1- зародыш сферолита. Практически всегда в центре сферолита имеется некоторая неоднородность (большая или маленькая) которая послужила центром для начала кристаллизации сферолита.

2- основа сферолита - гладкие радиальные образования. В поляризованном свете дают изображение мальтийского креста. Сферолит обычно имеет однородную поверхность. Иногда на поверхности сферолита можно наблюдать черные точки.

3- более тонкие ветвистые образования. Иногда они образуются на более поздних этапах кристаллизации в виде второго ветвистого слоя. Светятся в поляризованном свете.

4- ветви - тонкие веточки постоянной толщины. Светятся в поляризованном свете. Это триглицериды. Образуются при совместной кристаллизации с холестерином. Можно наблюдать переходные этапы: сферолит без веточек, сферолит с малым количеством веточек, сферолит с большим количеством веточек, одни веточки без сферолита.

4-листья - яркие толстые образования на периферии сферолита. В поляризованном свете имеют яркую разноцветную окраску.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

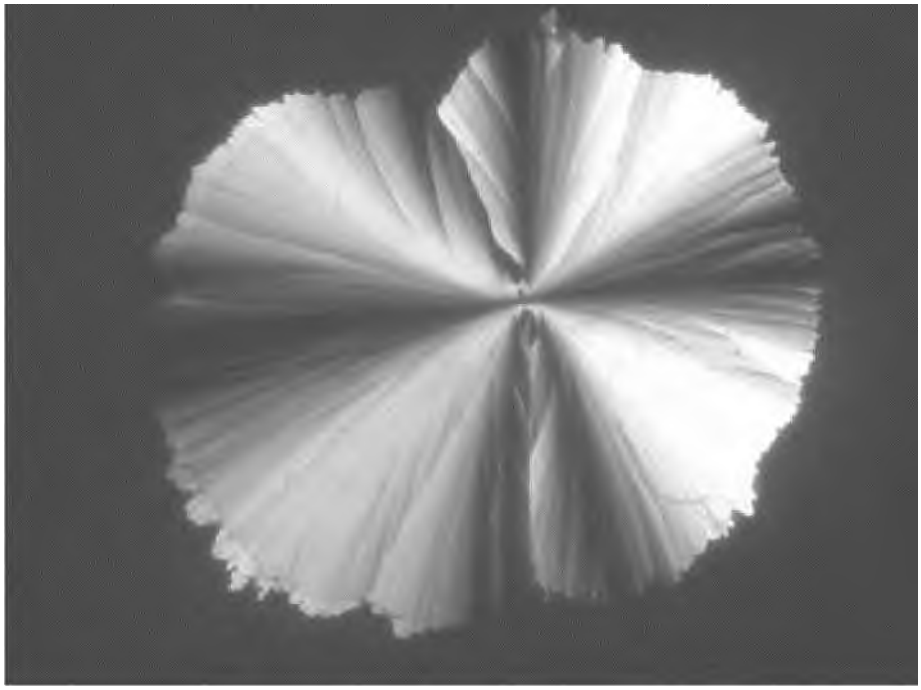


Рис. 2-41. Яркий правильный сферолит. Поляризационное освещение. Поле зрения 1 мм.

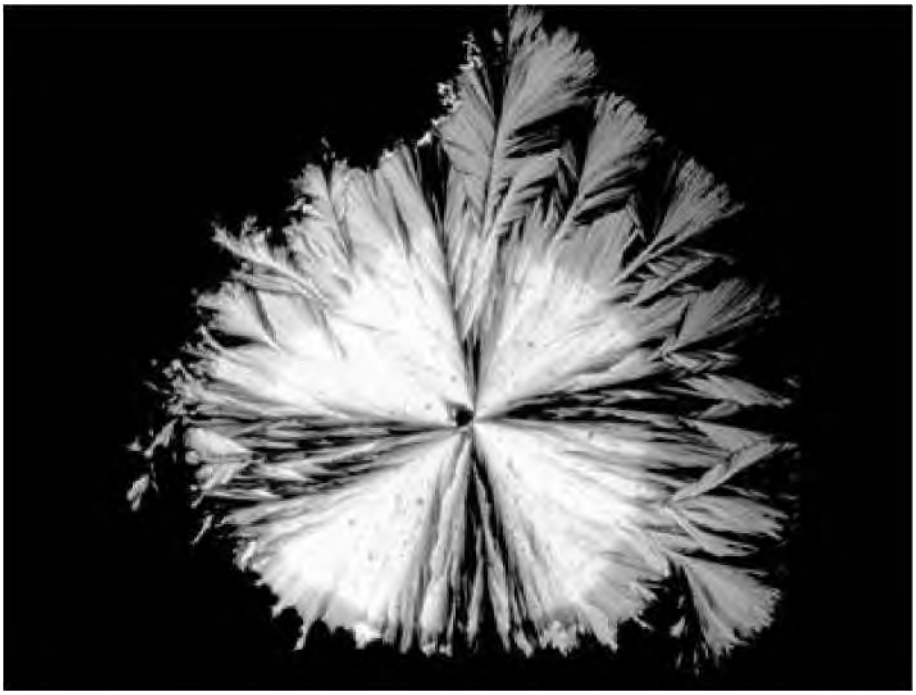


Рис. 2-42. Яркий двойной сферолит с точечными дефектами. Поле зрения 1,5 мм.

Иногда можно наблюдать двойной сферолит. Центральная область сферолита гладкая и однородная, а краевая область сферолита состоит из тоненьких веточек. Это означает, что в процессе кристаллизации изменились условия, например, понизилась концентрация кристаллизуемого компонента.

Количественная оценка степени наличия сферолитов .

Для количественной оценки степени наличия сферолитов можно использовать следующие параметры:

-общее количество сферолитов,

-суммарная площадь сферолитов,

-распределение сферолитов в зависимости от площади.

Сферолиты неправильной формы.

В зависимости от расположения форма сферолитов может быть правильной круглой, или

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

неправильной. Правильную форму круга имею сферолиты, образовавшиеся в свободном пространстве вдали от границ. Сферолиты, образованные в области островов, имею неправильную форму. Принять правильную форму им мешают ранее выпавшие дендритные кристаллы. Если сферолит имеет неправильную форму, значит, его росту мешали какие-то компоненты. Неправильные сферолиты бывают разных типов:

-сферолиты неправильной формы (сектор, веер), возникают при росте в ограниченном пространстве. Пространство ограничено ранее образовавшимися кристаллами.

-сферолит с включениями,

-сферолит с дефектами (темные точки), -двойной сферолит, правильный сферолит, но снаружи в виде кольца имеется другой тип роста сферолита,

-сложный сферолит, состоит из двух компонент, гладкий и веточки, образуется в результате совместной кристаллизации двух компонент.

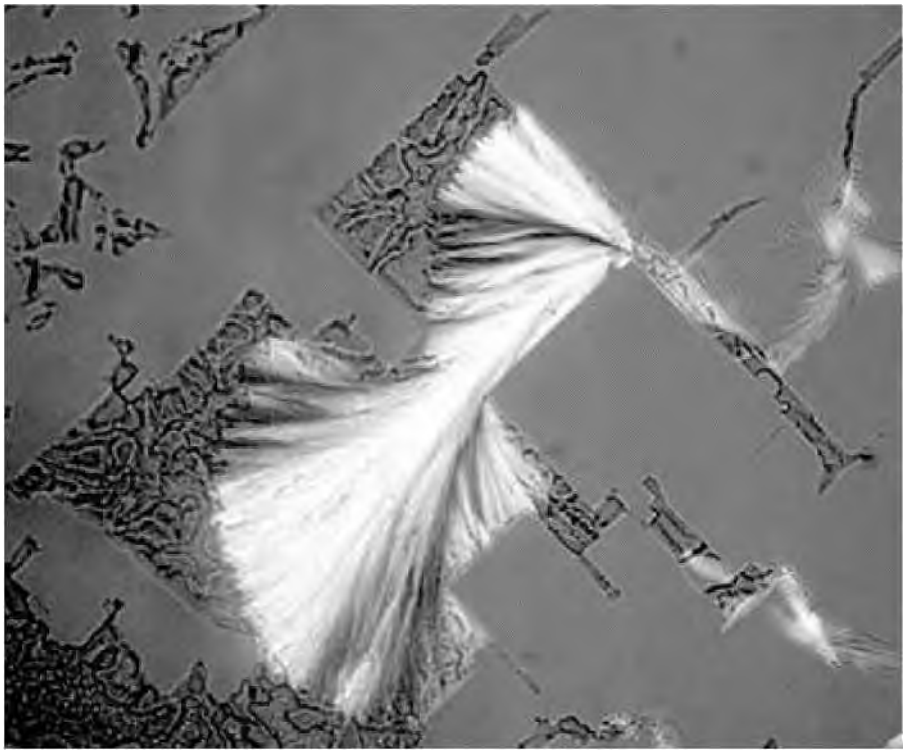


Рис. 2-43. Неправильный сферолит. Область роста ограничена плоскими кристаллами соли. Поле зрения 0,3 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

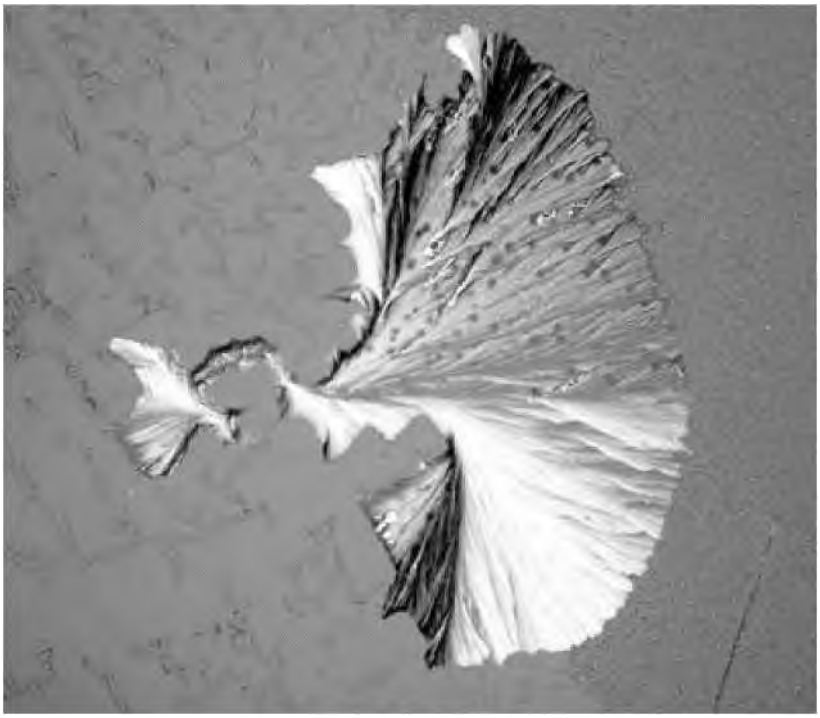


Рис. 2-44. Веерный сферолит на границе острова. Поляризованный свет. Поле зрения 0,7 мм.

Сферолит с листьями.

Сферолиты с листьями образуются на границе островов . Листья представляют собой ярко светящиеся фрагменты. Состав основного сферолита и листьев одинаков. Основной сферолит сформировался в свободной области. Листья сформировались в области растрескавшегося альбумина, граничащего с островом, либо в зоне липидов, граничащих с островом. Исходно это была одна область высокой концентрации холестерина, которая при кристаллизации оказалась разбитой на две части.

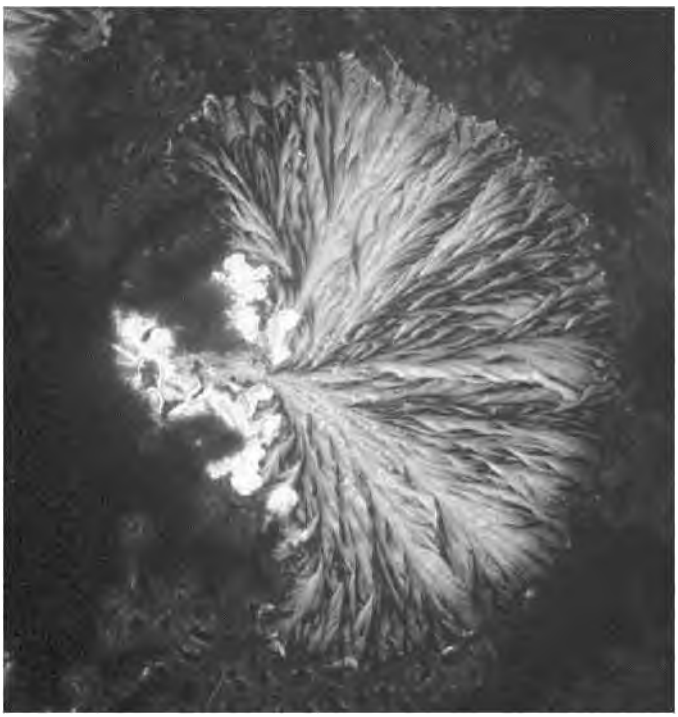


Рис. 2-45. Сферолита с листьями. Поляризованный свет. Поле зрения 0,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

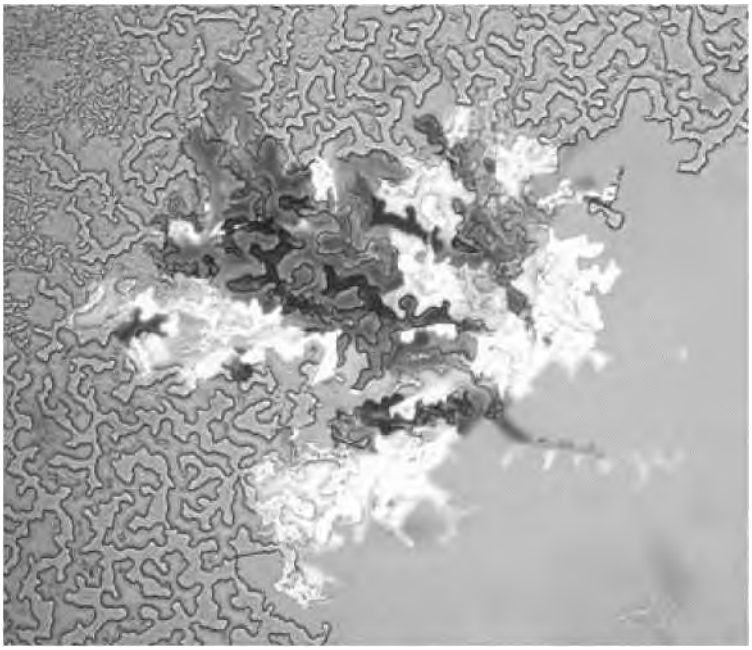


Рис. 2-46. Сферолит с листьями. Поляризованный свет. Поле зрения 0,15 мм.

Цветные сферолиты.

Цветные сферолиты являются очень красивыми. В скрещенных поляроидах они имею яркую цветную окраску. Часто не весь сферолит имеет яркую окраску, а отдельные его компоненты - листья. Цветной сферолит имеет структуру ветвей с расходящимися в разные стороны листьями.

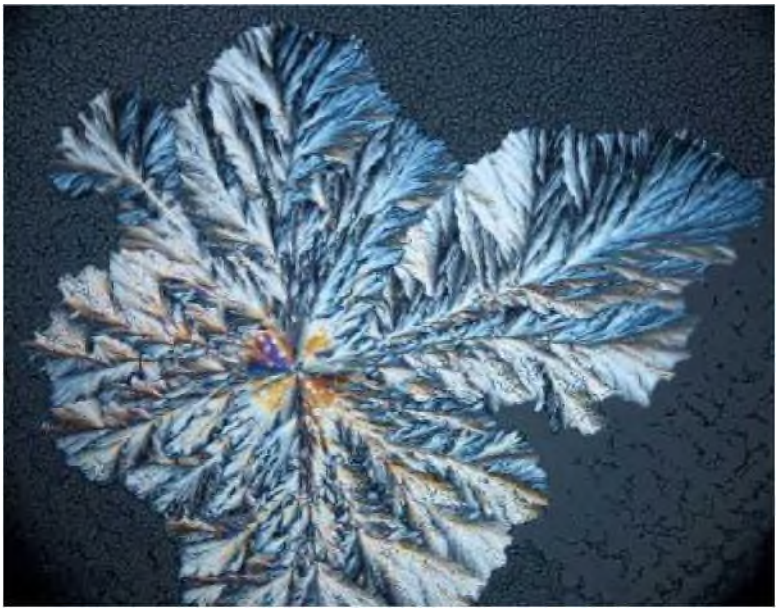


Рис. 2-47. Большой цветной сферолит. Поляризационный свет. Поле зрения 0,5 мм.

Серые сферолиты.

Можно выделить отдельный тип сферолитов - серые сферолиты. Если яркие сферолиты в скрещенных поляроидах ярко светятся, то серые сферолиты светятся очень слабо. По строению они аналогичны обычным сферолитам. Так как свечение определяется липидами, то можно предположить, что в серых сферолитах мало липидов. Расположены темные сферолиты обычно далеко от краевой области.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

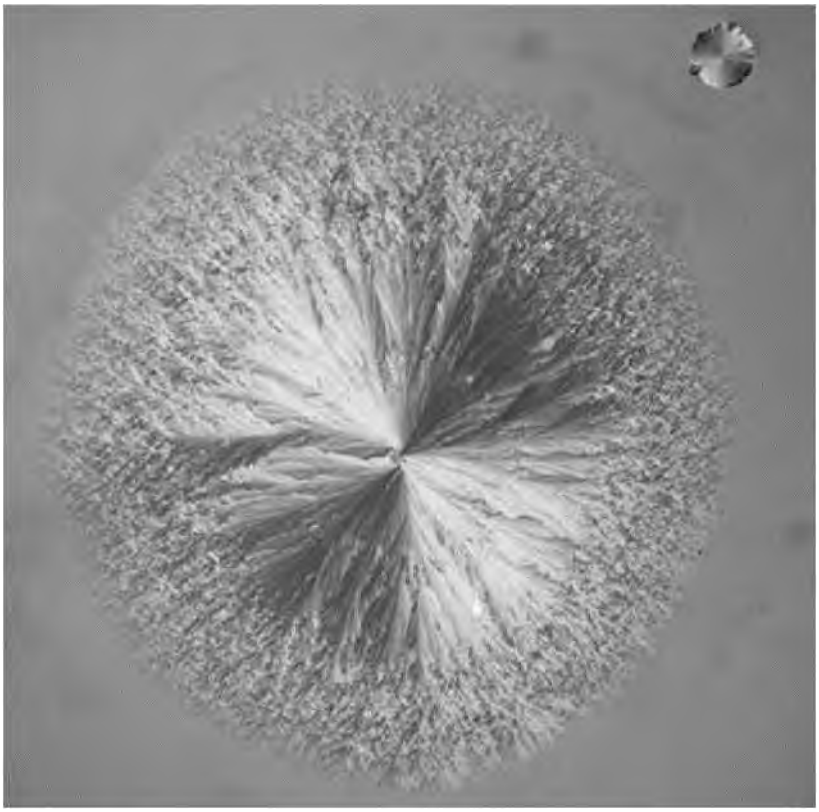


Рис. 2-48. Большой серый сферолит. Поляризационное освещение. Поле зрения 0,5 мм.

Сферолиты со вставками.

Особый интерес для диагностики имеют большие сферолиты со вставками малых сферолитов. Вставки бывают центральные и боковые. Центральная вставка - это когда малый сферолит находится в центре большого сферолита. Боковая вставка - это когда малый сферолит находится не по центру большого сферолита. Имеется два типа центральных вставок - яркая вставка в темный сферолит, и яркая вставка в яркий сферолит. Самый важный случай - это яркая центральная вставка в яркий сферолит. Предполагается, что эта комбинация может служить маркером ракового заболевания.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

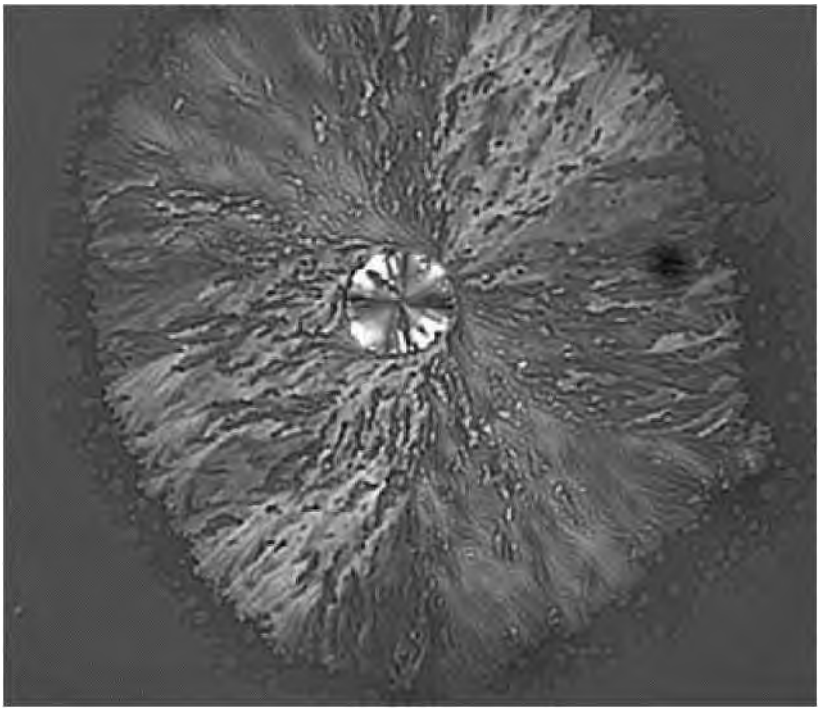


Рис. 2-49. Большой сферолит со вставкой малого сферолита. Поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

2.1.2. Ветвистые сферолиты (триглицериды)

Кристаллические образования в виде тонких веток постоянной ширины с узелковыми образованиями. Образуются при кристаллизации триглицеридов. Кристаллизуются либо самостоятельно, либо совместно с холестерином, и в этом случае образуют ветки в структуре сферолита.

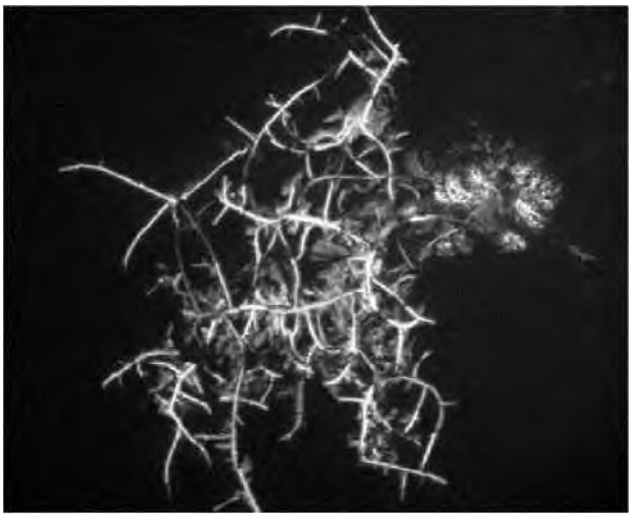


Рис. 2-50. Ветвистый сферолит (триглицериды). Поляризованный свет. Поле зрения 0,2 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

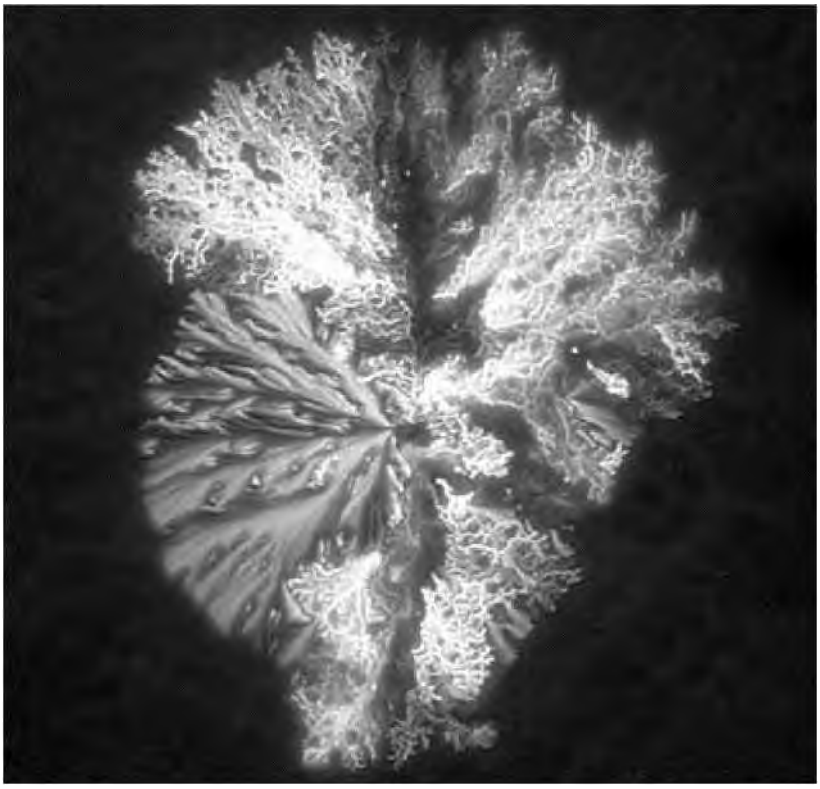


Рис. 2-51. Сложный сферолит, гладкая (холестерин) и ветвистая (триглицериды) компоненты. Образовался в результате совместной кристаллизации двух компонент. Поляризованный свет. Поле зрения 0,6 мм.

2.1.3 - Малые двойные сферолиты.

Наряду с большими сферолитами при большом увеличении можно обнаружить малые сферолиты. Как правило, они не имеют тонкой структуры, и как бы состоят из четырех лепестков. Вокруг лепестков часто имеется кольцо с мелкоточечной структурой. Малые сферолиты растут всего 4 дня, потом их рост останавливается. Малый двойной сферолит имеет размер порядка 10 мкм и их можно наблюдать при увеличении 600х. Они состоят из круглого центра, окруженного кольцом в виде бахромы.

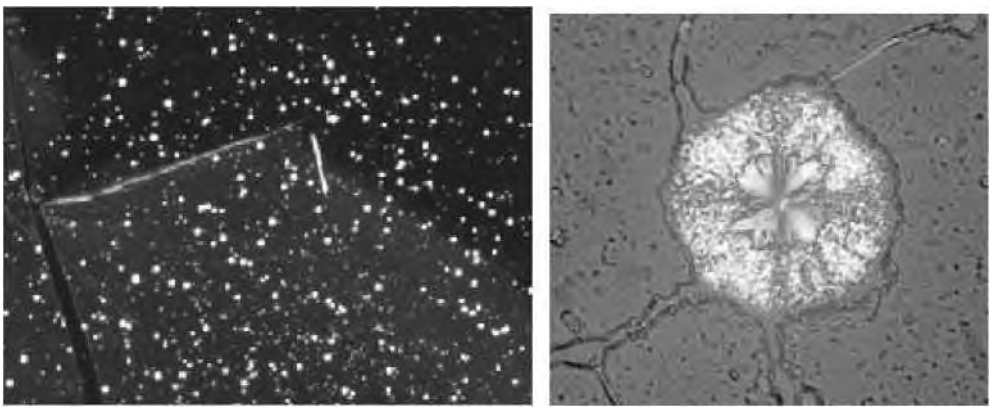


Рис. 2-52. Малые сферолиты. Поляризованный свет. Поле зрения 0,7 и 0,2 мм.

2.1.4 - Малые оолитоподобные сферолиты (соли кальция).

Малые оолитоподобные сферолиты образованы солями кальция. Он имеют размер порядка 10 мкм, и их можно наблюдать при увеличении 600х. Обычно оолитоподобные сферолиты состоят из четырех гладких лепестков.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

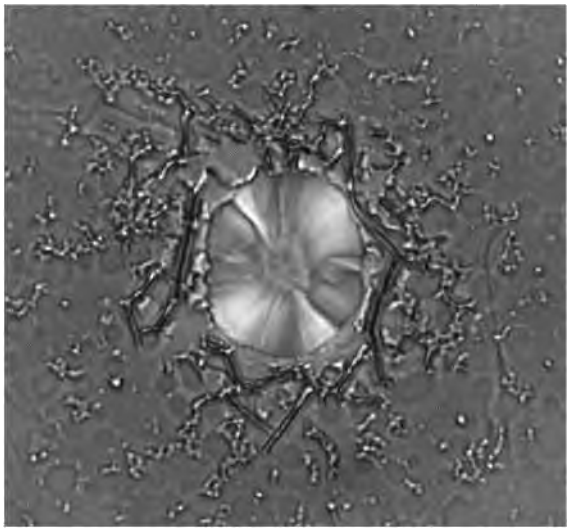


Рис. 2-53. Малый оолитоподобный сферолит. Поляризованный свет. Поле зрения 0,2 мм.

Принципы образования сферолитов.

Обычно сферолиты образуются при кристаллизации высокомолекулярных соединений (полимеров) из расплава. В нашем случае рост сферолитов происходит в областях с повышенной концентрацией вещества, а это в некотором смысле аналогично концентрации из расплава. При образовании сферолита существенно, что в области кристаллизации происходит перестройка, самоорганизация, самосборка молекул вещества. Существенно, что обычно сферолит состоит из двух составляющих - радиальных лепестков (ламелей) кристаллизовавшегося вещества, и аморфного, не закристаллизованного вещества между ними. Ламели представляют собой плоские пластинки, в которых молекулы ориентированы перпендикулярно плоскости пластинки.

Предполагается, что сферолит состоит из множества отдельных кристаллитов, которые анизотропны, и асимметричны по форме.

При кристаллизации модельных растворов чистых веществ сферолиты образуются для фибрина.

2.2 Дендриты.

2.2.1 Дендриты соли (хлорид натрия).

2.2.1.1 Скелетные дендриты соли.

Дендриты соли образуются в областях с повышенной концентрацией соли. Обычно дендриты соли образуются рядом с границей воздушного пузырька, так как за счет движения границы у границы создается повышенная концентрация всех компонент. Так как ионы соли Na+ и Cl- являются очень маленькими по сравнению с молекулами белка, то их подвижность горазбо более высокая. В связи с этим дендриты соли образуются самыми первыми на раннем этапе кристаллизации (на 2 и3 день).

Дендриты соли представляют собой скелетные кристаллы соли. При этом термин скелетный кристалл более соответствует реальной структуре кристалла, чем термин дендритный. У дендритных кристаллов нет выделенных направлений роста, определяемых кристаллической ориентацией. Скелетные кристаллы соли имеют четыре фиксированных направлений, вдоль которых осуществляется рост. У скелетного кристалла соли всегда существует центр, в котором начался рост кристалла. Если среда однородна, то кристалл растет равномерно по всем направлениям. Если среда неоднородна, то кристалл растет несимметрично. Неоднородность среды бывает двух типов: неоднородность концентрации соли и неоднородность вязкости среды. При неоднородности концентрации структура дендрита одинаковая, но в направлении более высокой концентрации соли растут более длинные ветки. При неоднородности вязкости среды становится неоднородность структуры дендрита. В более вязкой среде растет много маленьких веток, в менее вязкой среде растет мало больших веток (пластины).

Для образования больших дендритов имеются определенные условия. Дело в том, что атомы(ионы) Na и Cl имеют маленькие размеры. Поэтому они хорошо диффундируют в сетчатой структуре геля. Отметим, что для высокомолекулярных соединений (белков) коэффициент диффузии в геле очень маленький, а для соли - большой.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Скелетные кристаллы образуются при кристаллизации в вязкой среде, когда отсутствует конвекционное перемешивание и слабая диффузия. Существуют две основных причины преимущественного роста вершин - концентрационная и примесная.

Концентрационная причина. В этом случае рост вершин является более быстрым в связи с тем, что вершину окружает большее количество кристаллизуемого вещества, чем грань. И присоединение кристаллизующегося веществе к вершине более вероятно, чем к грани. Из-за малой степени диффузии параллельно растущей грани создается слой с очень малым количеством кристаллизуемого вещества. Из-за этого рост грани останавливается.

Примесная причина. В среде вокруг растущего кристалла всегда присутствуют примеси, которые при росте кристалла накапливаются на гранях и блокируют дальнейший рост грани. В этом случае дальнейшее кристаллообразование возможно только через вершины граней. У вершин больше вероятность присоединения кристаллизуемого вещества и вершина как бы прорывает накопившийся слой примесей.

Интересно происходит сам процесс роста дендрита. Процесс роста дендрита - квазипериодический. Вначале растут вершина и грани. Затем рост граней тормозится и растет вершина в виде иглы. Когда игла прорывает обедненный слой - опять начинается рост вперед и в стороны. И так далее. Это объясняет образование зубцов на боковой поверхности лучей дендрита. Так же просто объясняется тот факт, что обычно боковые ветви соединяются с основное веткой с помощью тонкой ножки. Вначале один из боковых выступов основной ветви прорывается через блокирующий слой с помощью роста иглы, а затем начинается нормальный рост ветки. Величина тонкой ножки, соединяющая боковую ветвь с основной, пропорциональна толщине блокирующего слоя.

Рис. 2-54. Боковые ветви дендрита на тонкой ножке. Поле зрения 0,5 мм.

При дегидратации раствора соли в альбумине образуются дендриты, состоящие из лучей постоянной ширины, расположенных различным образом:

-дендрит в виде четырех лучевой звезды,
- дендрит в виде шести лучевой звезды,
- дендрит в виде пластин,
- дендрит в виде изогнутых ветвей.

Дендрит в виде четырех лучевой звезды - это стандартная форма скелетного кристалла, если исходная форма кристалла куб (квадрат). Растут вершины.

Дендрит в виде шести лучевой звезды - это тоже скелетный кристалл, но в этом случае начальная ориентация кубического зародыша такова, что он повернут, и горизонтальная плоскость проходит через шесть вершин куба. Поэтому рост осуществляется в направлении шести вершин куба.

Дендрит в виде пластин - это исходно скелетный кристалл в виде четырех лучевой звезды, но вязкость среды была низкой, диффузия была высокой, и смогли расти боковые грани.

Дендрит в виде изогнутых ветвей - вязкость среды очень высокая, и это вызывало загибание лучей.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

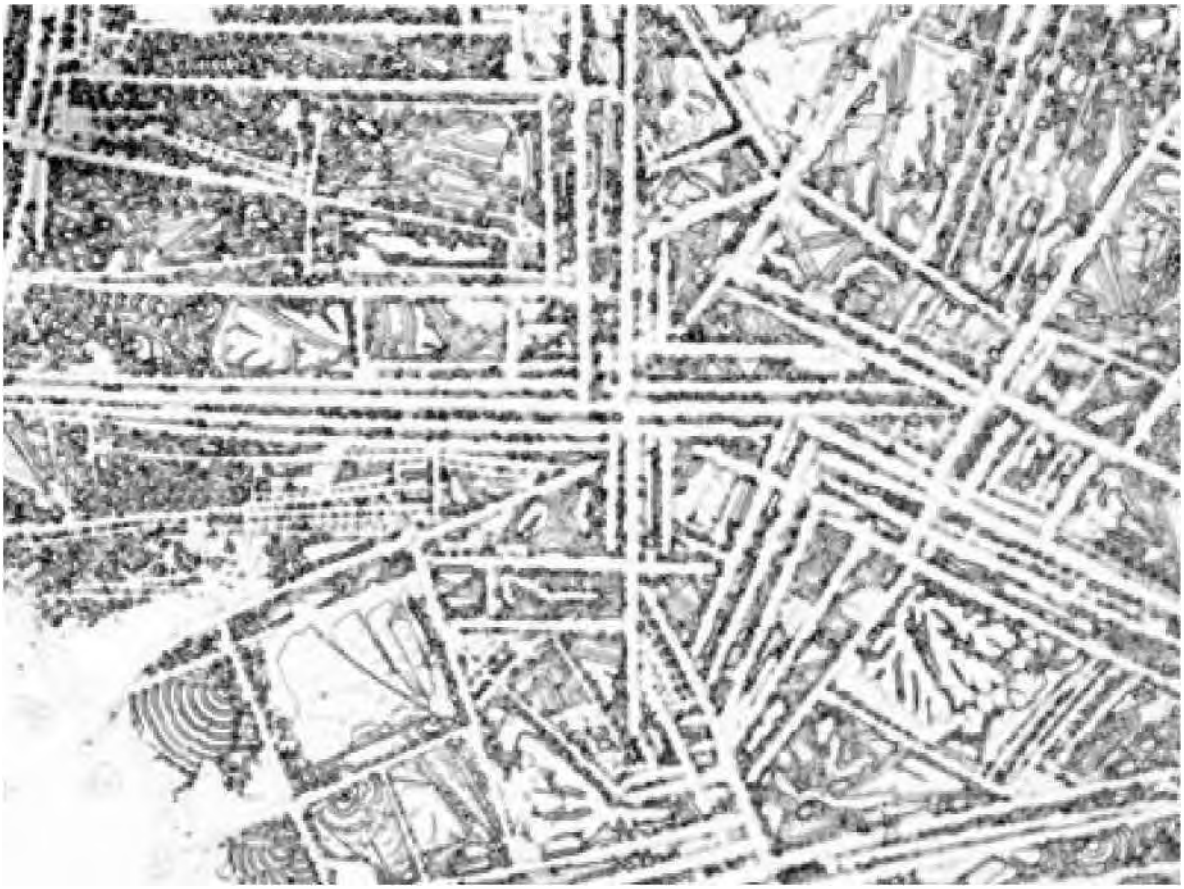


Рис. 2-55. Дендрит соли в виде четырех лучевой звезды. Поле зрения 1,3 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

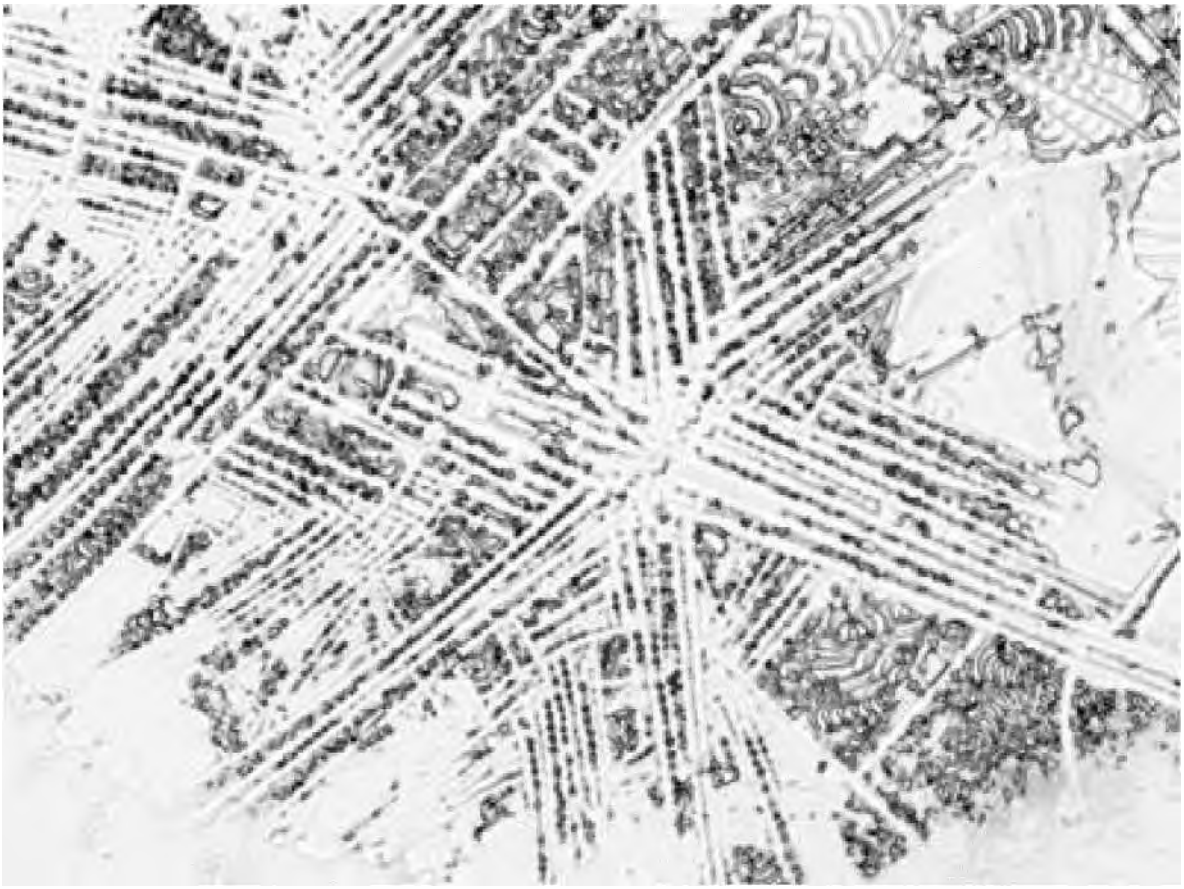


Рис. 2-56. Дендрит соли в виде шести лучевой звезды. Поле зрения 1,3 мм.

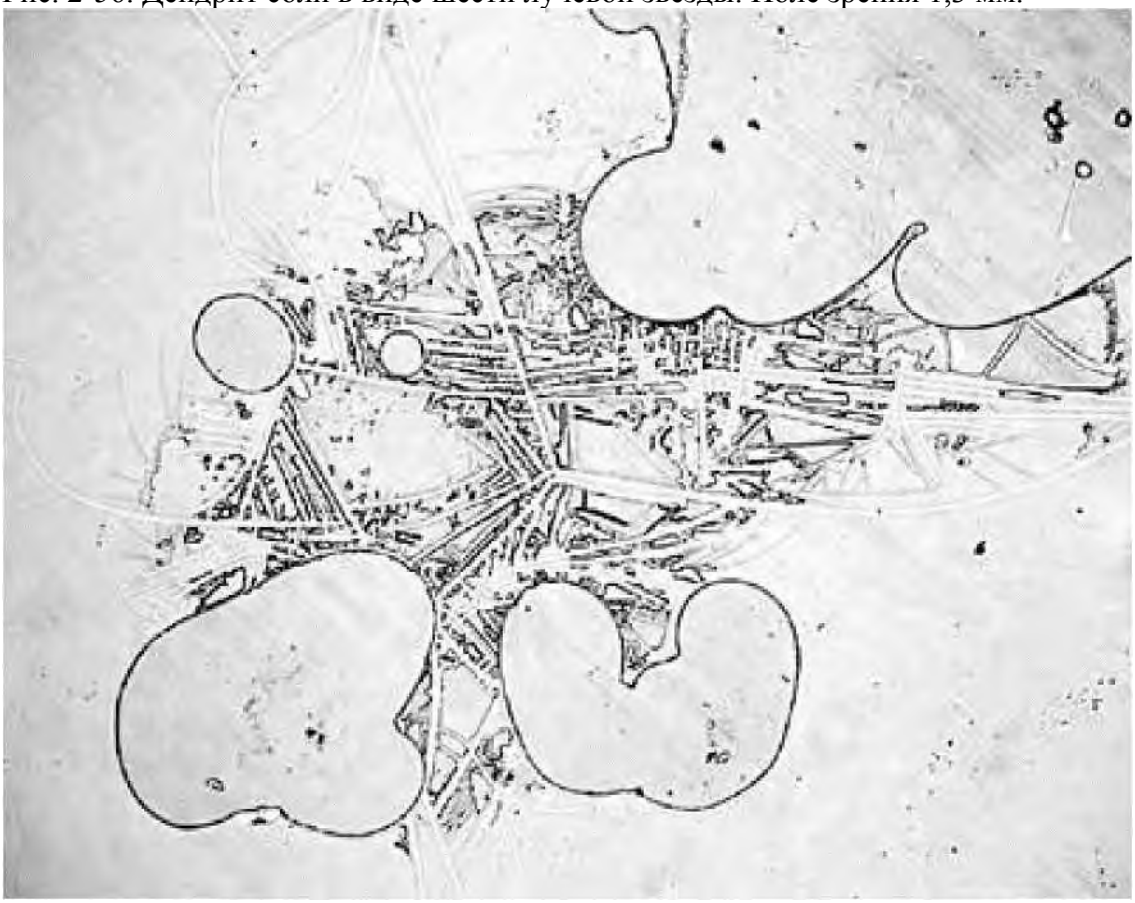


Рис. 2-57. Дендрит соли в виде прямых линий, которые переходят в псевдотрещины. Поле зрения 1,3 мм.

2.2.1.2 Прямоугольные дендриты соли.

При высокой концентрация соли и сильной диффузии (малой концентрации белка) возникают

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

прямоугольные дендриты. Они представляют собой четырехугольные пластины - одиночные или группа сросшихся пластин. Прямоугольный дендрит всегда имеет центр, в котором начался рост дендрита. У прямоугольных дендритов принципиально другой метод образования по сравнению со скелетными дендритами.

-Скелетные дендриты соли - это скелетные кристаллы соли. Они растут в направлении диагоналей кристаллической решетки.

-Прямоугольные дендриты соли - это истинные кристаллы соли, и они растут в направлении граней. Все грани у прямоугольных дендритов соли параллельны.

В центральной части больших пластин можно наблюдать неоднородность, которая вызвана двумя причинами:

-неоднородность строения и роста пластины.

-неоднородность рельефа поверхности, на которой образовалась пластина.

Однако можно подобрать условия для выращивания больших однородных пластин соли, если это необходимо. Большие пластины образуются, как правило, в свободной области вдали от границы область воздуха - сыворотка, там, где малая вязкость, и высокая диффузия. Вблизи границы большие пластины не образуются.

Рис. 2-58. Прямоугольный дендрит соли. Светлое поле. Поле зрения 3 мм.

2.2.1.3. Смешанные дендриты соли.

Смешанный дендрит состоит из двух компонент - прямоугольной и скелетной.

Смешанные дендриты обычно образуются вблизи границы, в области с градиентом вязкости сыворотки. Дендрит как бы состоит из двух частей. В области которая ближе к границе и является более густой растет скелетный дендрит (много маленьких веточек). В области которая расположена ближе к центру капля и является более жидкой растет прямоугольный дендрит (веток мало и они большие).

Обычно в смешанном дендрите первым образуется прямоугольный дендрит в области с высокой концентрацией соли и низкой концентрацией альбумина. По мере роста происходит повышение вязкости альбумина, и дендрит соли начинает расти как скелетный кристалл, в виде ветвей. Таким образом вырастают смешанные дендриты: центр - прямоугольный дендрит, а краевые ветки - скелетный дендрит.

Таким образом по форме кристалла можно определить состояние сыворотки (жидкая или гель) и направление градиента плотности сыворотки. Чем ближе дендрит к границе капли, тем он более несимметричен.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

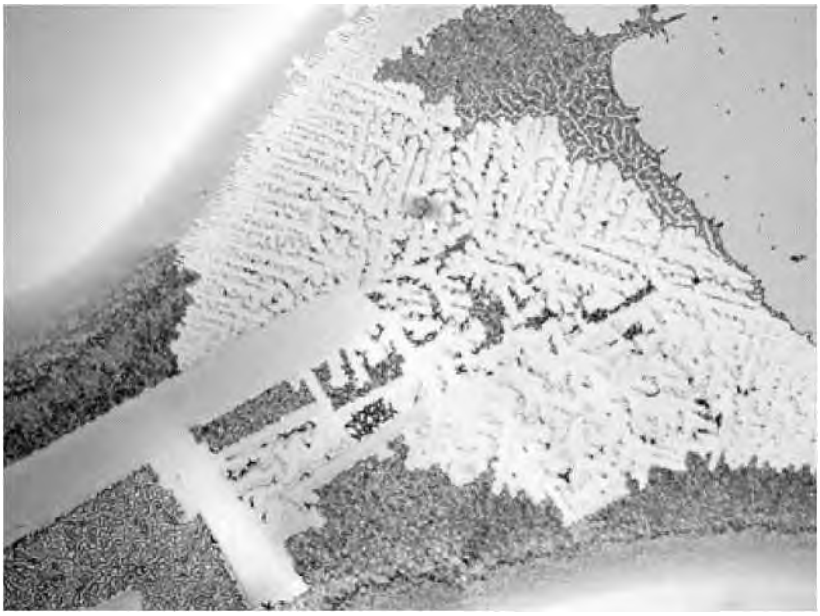


Рис. 2-59. Прямоугольный дендрит соли, переходящий в скелетный дендрит соли. Светлое поле. Поле зрения 1,5 мм.

2.2.2 Дендриты разные.

2.2.2.1 Дендрит темный.

Дендрит темный образуется в краевой зоне. В поляризованном свете не светится. Темный дендрит состоит из двух компонент: черные узкие трещины в виде дендрита, и темно серое вещество, расположенное по краям трещин.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

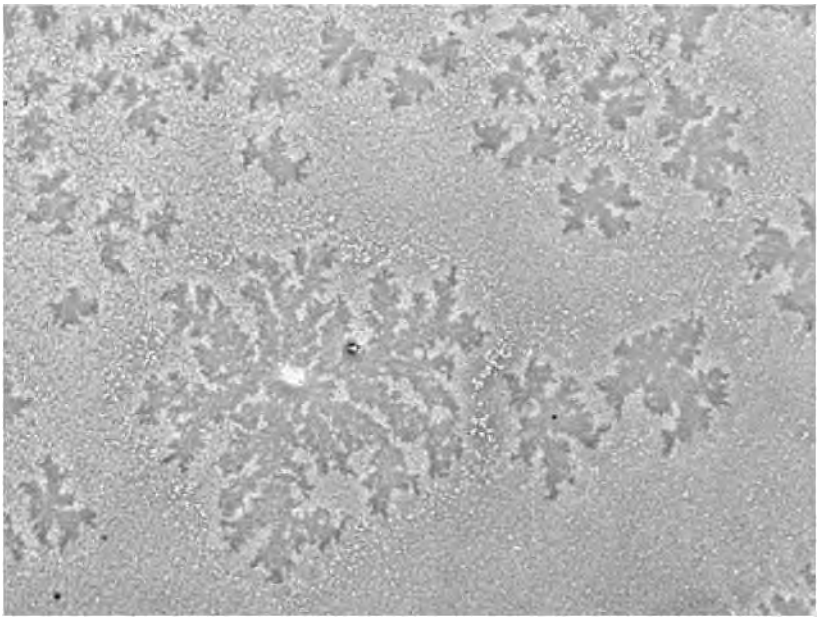


Рис. 2-60. Дендрит темный. Фазовый метод. Поле зрения 1.5 мм.

2.2.2.2 Дендрит светлый.

Дендрит светлый образуется в свободном белковом пространстве. В поляризованном свете не светится. Иногда в режиме фазового контраста можно видеть другой необычный дендрит - светлый дендрит. Светлый дендрит в поляризованном свете не светится.

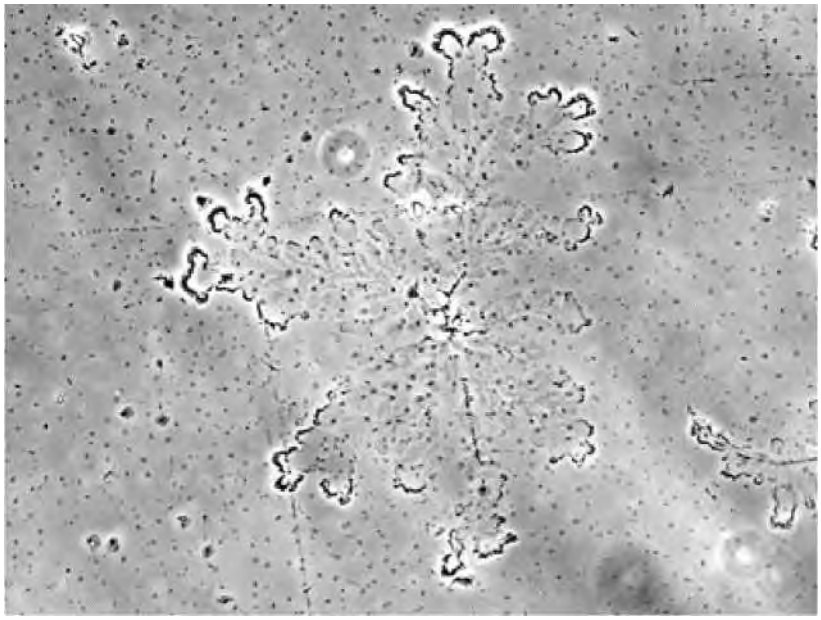


Рис. 2-61. Дендрит светлый. Фазовый контраст. Поле зрения 0,5 мм.

2.2.2.3 Дендрит ветвистый.

Дендрит ветвистый образуется в свободном белковом пространстве. Ветвистый дендрит светится в поляризованном свете.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

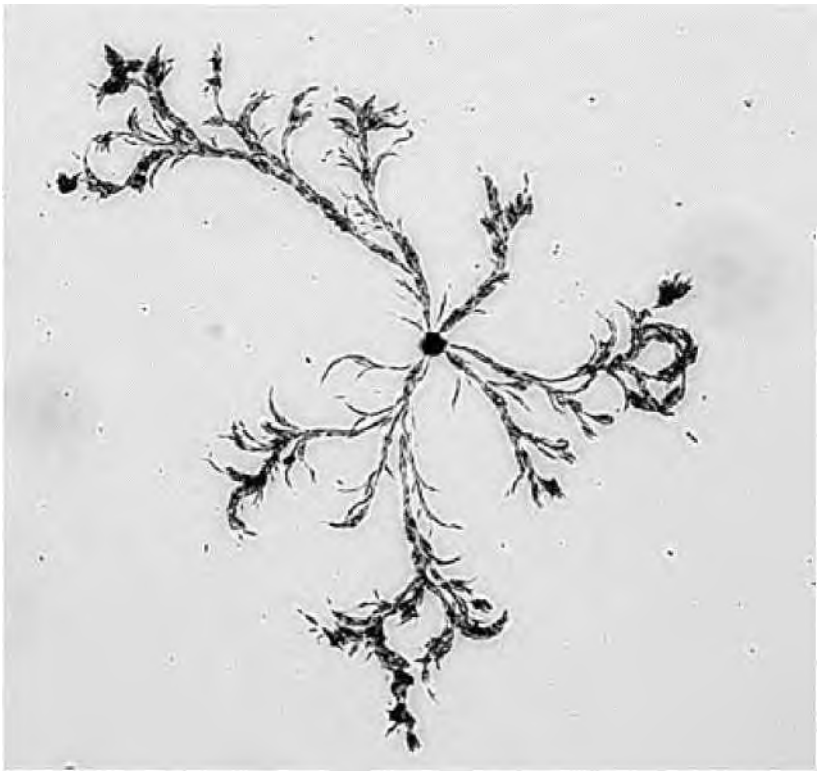


Рис. 2-62. Дендрит ветвистый. Светлое поле. Поле зрения 0,7 мм.

2.2.2.4 Дендрит тонкий.

Дендрит тонкий образуется внутри островов рядом с дендритом соли. Иногда можно видеть необычный дендрит - тонкий прямолинейный дендрит.

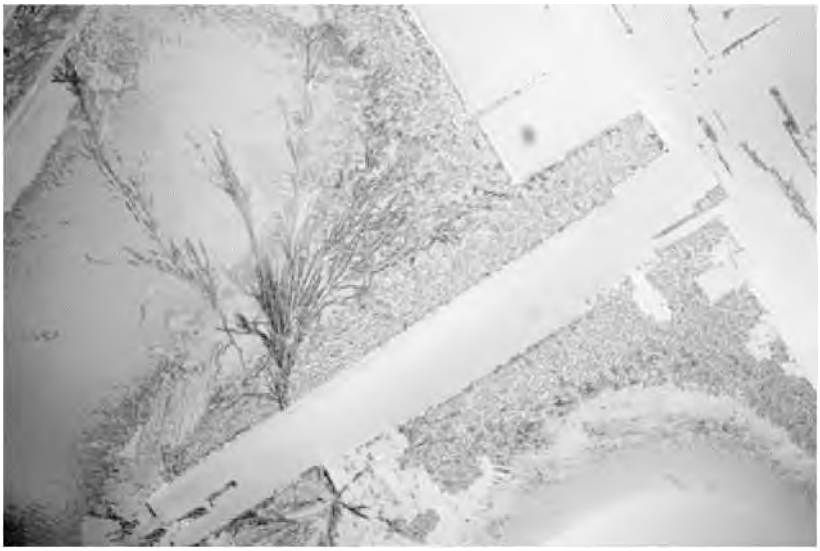


Рис. 2-63. Дендрит тонкий рядом с прямоугольным дендритом соли. Светлое поле. Поле зрения 1,2 мм.

2.2.2.5 Дендрит сферолитовый.

Иногда при росте сферолита изменяются условия, и сферолит начинает расти в виде дендрита. Дендрит сферолитовый образуется в свободном белковом пространстве Дендрит сферолитовый светится в поляризованном свете.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

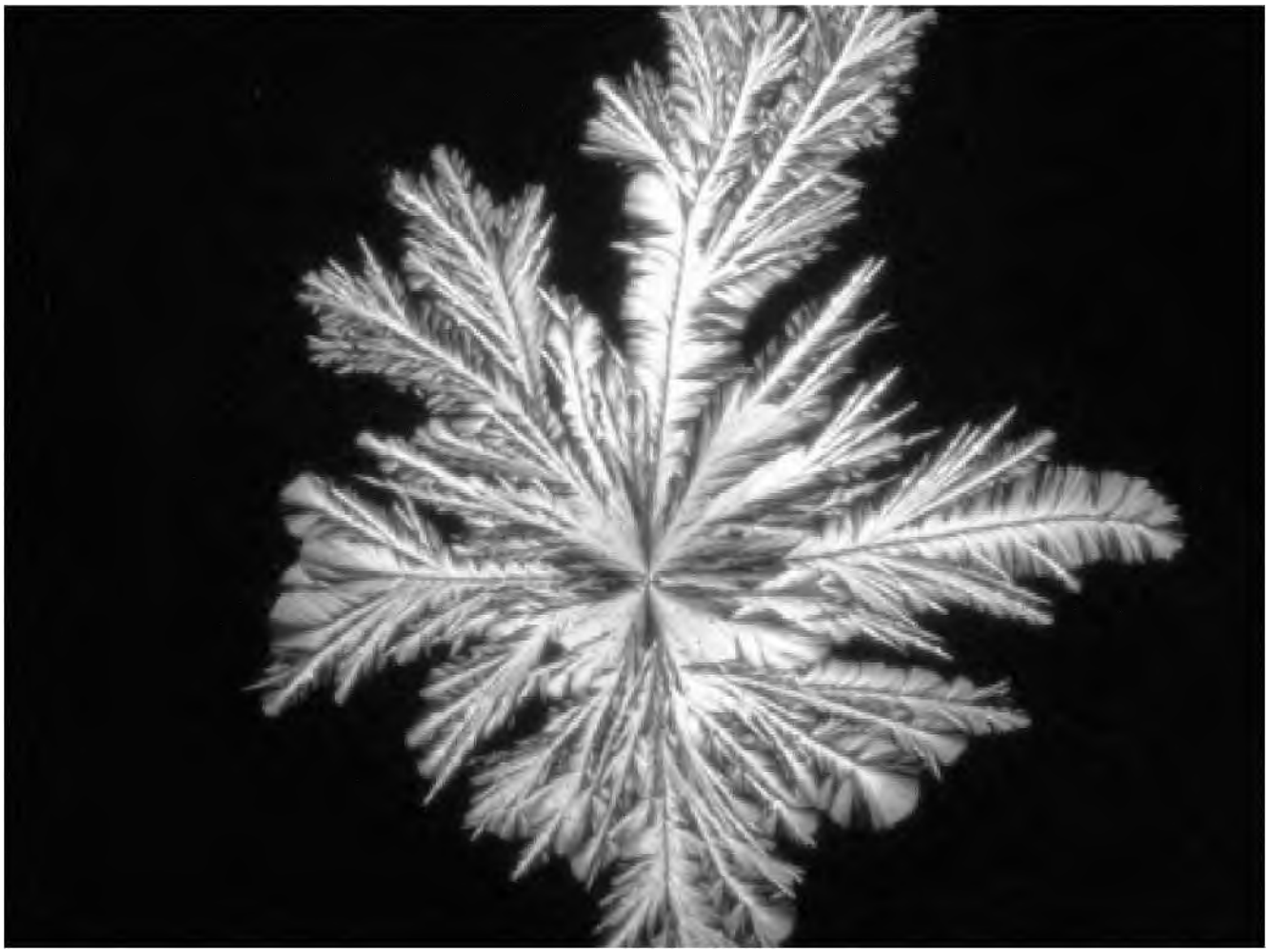


Рис. 2-64. Дендрит сферолитовый. Поляризованный свет. Поле зрения 0,5 мм.

Иногда из сферолита вырастает большой дендрит.

Рис. 2-65. Дендрит сферолитовый. Светлое поле. Поле зрения 3,5 мм.

2.2.2.6 Дендрит рваный.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Дендрит рваный образуется в зоне воздуха между ветвями липидов. Дендрит рваный светится в поляризованном свете. Скорее всего, дендрит рваный образован липидами.

2.3 Перья, полоски.

В поляризованном свете встречаются кристаллы, которые при малом увеличении (4х) видны как иглы. При большом увеличении видно, что это не иглы, а полоски. Некоторые полоски начинают расщепляться по краям.

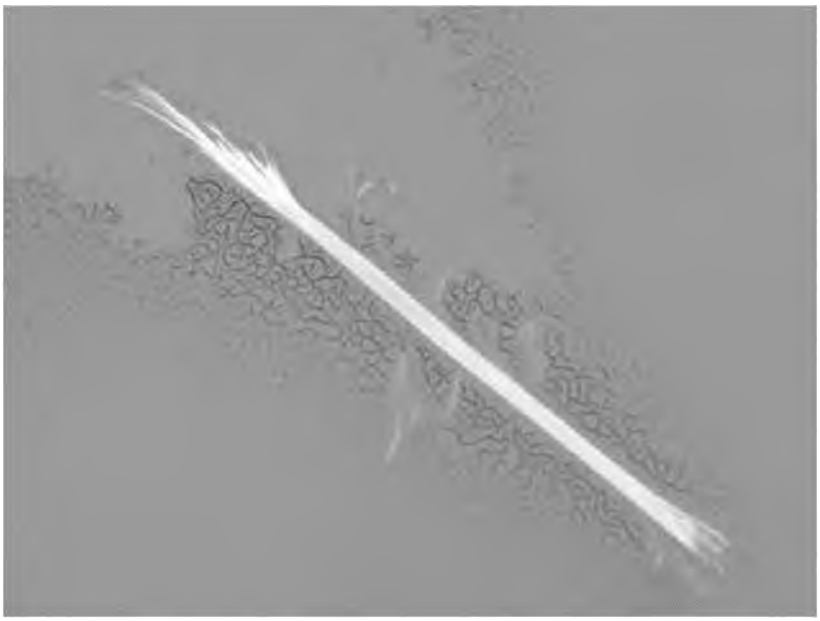


Рис. 2-66. Расщепляющаяся полоска. Поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

При дальнейшем расщеплении образуются расщепленные кристаллы в виде перьев. Границы перьев имеют размытые края, и нельзя сфокусировать сразу весь кристалл. Это говорит о том, что кристалл имеет не плоскую, а пространственную структуру.

Рис. 2-67. Перья. Поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

2.4 Иглы (моноурат натрия).

В литературе часто пишут, что иглообразную форму имеют кристаллы мочевой кислоты. Так

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

как в крови слабощелочная среда, pH=7,3, то мочевая кислота не может быть в крови в виде кислоты. В крови мочевая кислота содержится в виде соли натрия (моноурата натрия). Кристаллы в виде игл имеют следующие особенности: Кристаллы в виде игл растут в течении 1-4 дня. Затем рост прекращается. Кристаллы в виде игл бывают двух типов- одиночные иглы, или пучки игл.
Кристаллов урата натрия игольчатой формы обладают отрицательным двойным лучепреломлением (окрашиваются в желтый цвет при расположении параллельно оси красного луча) в поляризационном микроскопе.
Кристаллы урата натрия имеют вид длинных игл или пучков прутьев длиной 1 -20 мкм, хорошо видны на черном фоне как "белые искры" вследствие двулучепреломления. Замечено, что если много кристаллов в виде игл, то нет сферолитов.

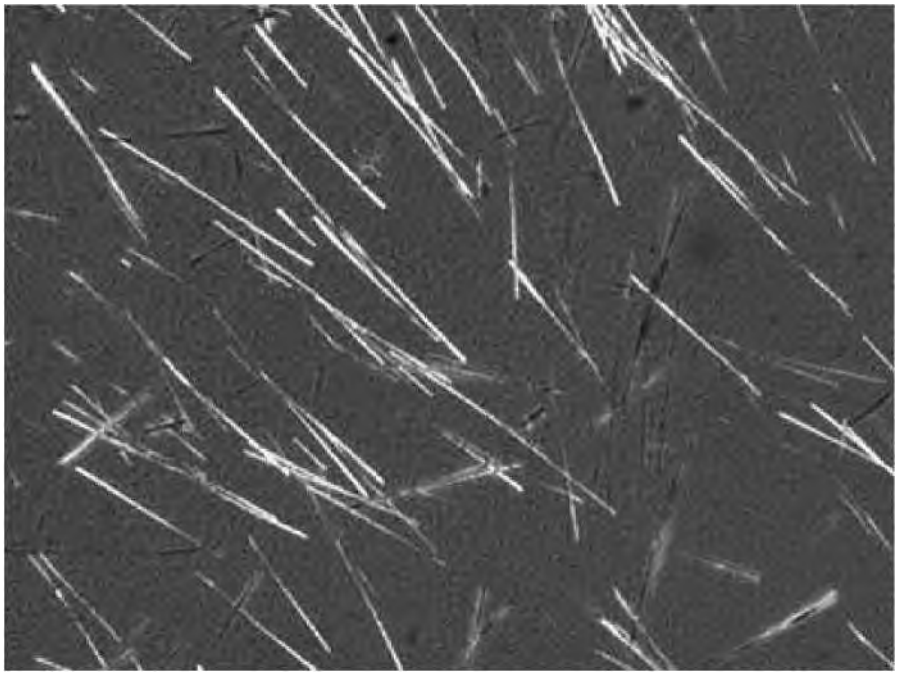


Рис. 2-68. Иглы. Поляризованный свет. Поле зрения 1,5 мм.

Можно выделить следующие типы иглоподобных кристаллов: 1-одиночные иглы, 2-пучки игл, растущих из единого центра,

-при очень малых концентрациях моноурата натрия иглы не образуются,
-при малых концентрациях моноурата натрия образуются изолированные иглы,
-при высоких концентрациях моноурата натрия образуются пучки игл,
-при очень высоких концентрациях моноурата натрия происходит расщепление игл, и образуются перья.
Можно предположить, что в виде игл кристаллизуются ураты, находящиеся в свободном состоянии.

Количественная оценка степени наличия игольчатых кристаллов.
Для оценки количества кристаллов в виде игл возможно применение следующих параметров:
-общее число игольчатых кристаллов,

-суммарная площадь (длина) игольчатых кристаллов,
-распределение количества игольчатых кристаллов в зависимости от длины,
-площадь одиночных игольчатых кристаллов и площадь сноповидных игольчатых кристаллов.

Таблица 2-11. Свойства мочевой кислоты (Uric acid).

Название	Мочевая кислота/ 2,6,8-триоксипурин
Английское название	Uric Acid
Формула	C5H4N4O3
Молеулярный вес	168,11
Содержание г/л	58-76 мг/л

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Содержание ммоль/л	0,14-0,42 ммоль/л
Содержание муж ммоль/л	0,24-0,50 ммоль/л
Содержание жен ммоль/л	0,16-0,40 ммоль/л
Патология ммоль/л	>0,62 ммоль/л

Мочевая кислота существует в двух формах: кетонной форме и енольной форме. Наиболее устойчива кетонная (оксо-) форма.

Таблица 2-12. Норма мочевой кислоты (мкмоль/л) в зависимости от пола и возраста:

возраст	0-14 лет	15-90 лет
Мужчины	120-320	210-420
Женщины	120-320	150-350

Для мужчин - 5,8-7,6 мг/100 мл, для женщин - 4,8-7,1 мг/100 мл.

Мочевая кислота является конечным продуктом обмена пуриновых оснований, источником которых служат эндогенные и пищевые нуклеотиды. Мочевая кислота выводит избыток азота из организма человека. Мочевая кислота синтезируется в печени. Так как в крови слабощелочная среда, pH=7,3, то мочевая кислота не может быть в крови в виде кислоты. В крови мочевая кислота содержится в виде соли натрия (моноурата натрия). Ураты - соли мочевой кислоты.

-Мочевокислый натр (моноурат натрия)- $2C_5H_3N_4O_3Na + H_2O$.

-Мочевокислый калий (урат калия) -Мочевокислый аммоний $C_5H_3N_4O_3(NH_4)$

Ураты состоят, главным образом, из мочекислого натрия, затем из мочекислых солей калия, кальция и магнезии. Из всех уратов только мочекислый аммоний может выпадать и в щелочной моче. Растворимость солей мочевой кислоты (количество единиц воды, необходимых для растворения единицы соли): Мочевая кислота - 15000, Урат магния - 3750, Урат натрия -1175, Урат калия - 790, Урат кальция -603.

В физиологических условиях 25% уратов плазмы крови связано с белком, а остальные находятся в виде свободного моноурата натрия.

Мочевая кислота плохо растворима, предел растворимости ее солей соответствует нормальной концентрации в крови — до 0,41 ммоль/л.

Ураты - хорошо растворимые натриевая и калиевая соли мочевой кислоты. Высокая растворимость уратов в плазме объясняется наличием связывающих белков и, возможно, некоторых растворяющих низкомолекулярных соединений. Растворимость уратов значительно зависит от кислотности. В щелочной среде происходит растворение уратов, а в кислой - кристаллизация.

Кристаллы мочевой кислоты - бесцветные кристаллы, разлагаются ниже температуры плавления, плохо растворимы в воде. Кристаллы мочевой кислоты выглядят как иглы при обычной световой микроскопии. Блестящие, похожие на иглы, кристаллы мочевой кислоты

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

лучше всего видны в поляризационный микроскоп. При высокой концентрации кристаллические иглы образуют звезды - несколько игл, исходящих из одной точки.

Концентрация мочевой кислоты в крови обусловлена равновесием процессов синтеза мочевой кислоты и ее выведения почками. При нарушении деятельности почек, происходит нарушение обмена мочевой кислоты. Как следствие — накопление в крови солей натрия, уровень мочевой кислоты растет, вызывая разнообразные повреждения органов и тканей.

Повышенное содержание мочевой кислоты в крови -гиперурикемия - является характерным лабораторным признаком подагры, но наблюдается и при ряде других заболеваний. Гиперурикемией сопровождаются лейкозы, B12-дефицитная анемия (малокровие, связанное с дефицитом витамина B12), иногда некоторые острые инфекции (пневмония, брюшной тиф, рожистое воспаление, туберкулез). У здоровых людей уровень мочевой кислоты несколько повышается при высоком содержании пуринов в пище (красное мясо, печень, почки, мозги, язык), и снижается при низкопуриновой диете (молоко, сыр, яйца).

Показания к назначению анализа на мочевую кислоту: подагра, мочекаменная болезнь, оценка функции почек при почечной патологии, лимфопролиферативные заболевания, ИБС (ишемическая болезнь сердца).

Гиперурикемия у больных подагрой имеет волнообразный характер. Периоды нормального содержания мочевой кислоты сменяются ее повышением в 3-4 раза по сравнению с нормой.

В следствии повышенной концентрации мочевой кислоты возможно развитие подагры и мочекаменной болезни.

Содержание мочевой кислоты в организме взрослого человека составляет 1000 мг, за сутки он вырабатывает 750 мг и соответственно столько же, по порядку величины, должен вывести. Удаление мочевой кислоты и служит узким местом. Примерно треть её выводится через кишечник, а оставшаяся часть не может быть растворена в тех полутора литрах воды, которые за сутки выводятся из человека в виде мочи: растворимость кислоты всего 70 мг/л. Её надо преобразовать в урат натрия, чья растворимость на порядок выше. Однако мочевая кислота - слабая, при pH = 5,8 она диссоциирует лишь наполовину. Повышение кислотности мочи и приводит к образованию в мочевыводящей системе уратных конкреций („песочка“). Вот так и получается, что в почке до 90% мочевой кислоты извлекается из первичной мочи и возвращается обратно в кровь. В крови же устанавливается стационарная концентрация кислоты, близкая к критической (у мужчин до 70, а у женщин до 60 мг/л). Нарушение баланса приводит к накоплению кислоты в организме, причём счёт идёт уже на десятки грамм. Отклонение в эту сторону встречается у трети человечества.

Мочевая кислота и ее соли ураты плохо растворимые в воде молекулы, которые при повышении концентрации быстро кристаллизуются и агрегируют, следствием чего могут развиться такие состояния как подагра, нефролитиаз или нефропатия. При подагре кислота начинает кристаллизоваться в виде урата натрия, концентрация которого при гиперурикимии на порядок больше, чем обычно.

2.5 Капли.

Капли бывают четырех видов (четыре различных вещества осаждаются в виде капель). Капли осаждаются на нижнем стекле и имеют очертания в виде круга.

Капли 1 - капли в области воздуха у границы. Размер капель - 10 мкм, цвет - светлый, граница - размытая. Это капли триглицеридов. Триглицериды могут существовать в виде жидких изотропных капель. При охлаждении препарата на замораживающем микротоме или непосредственно на предметном столике микроскопа происходит их кристаллизация. При этом часто появляются отрицательно изотропные игольчатые кристаллы.

Капли 2 - капли в области воздуха. Размер капель - 10 мкм, цвет - светлый, граница - четкая. Это капли эфиров холестерина. В поляризованном свете они дают изображение креста.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Капли 3. В зоне белка можно наблюдать другой тип капель. При большом увеличении на однородной светлой области белка можно видеть серые круглые пятна одинакового размера (около

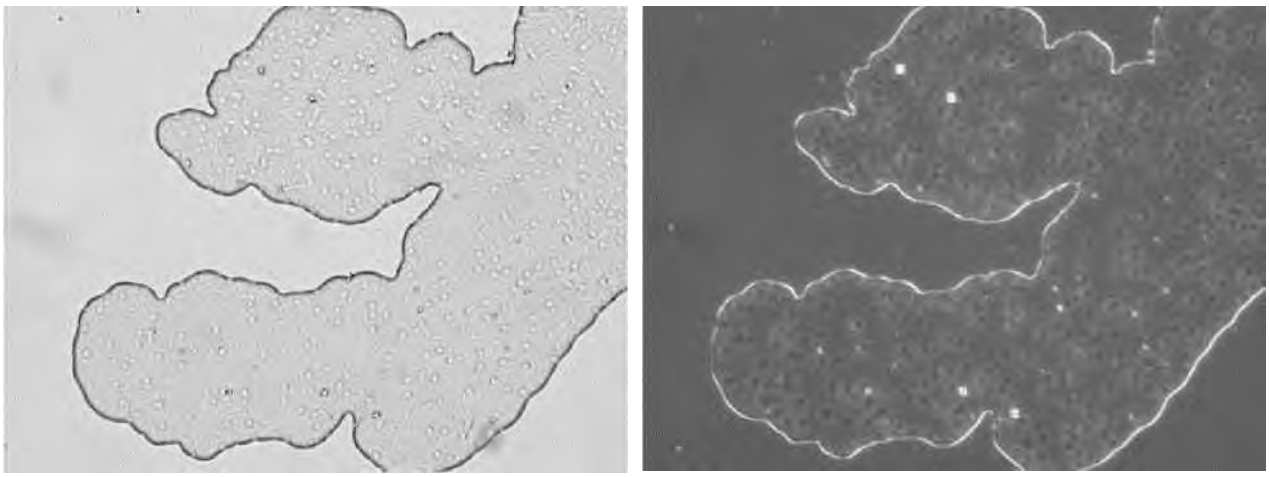


Рис. 2-69. Капли липидов и эфиров холестерина (светятся). Светлое поле и поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

10мкм) с размытыми границами. Пятна распределены равномерно по всей области белка. При смещении фокусировки (при опускании столика вниз) эти области становятся яркими пятнами на более темном фоне. Это говорит о том, что эти области имеют форму линзы, т.е. это капли какого-то вещества, показатель преломления которого выше, чем у окружающей среды. Эти капли иногда проявляются на сферолитах в виде темных включений на поверхности сферолита. По всей области белка капли распределены равномерно. При приближении к краю капли пропадают.

Капли 4 (точки). В зоне белка так же видно много мелких капель с резкой границей с диаметром около 1 мкм. Эти капли ярко светятся в проходящем свете. Эти капли являются каплями липидов. При большом увеличении можно проследить, как эти капли на границе с островами переходят в слой липидов.

ЛЖ&11

ЛНь

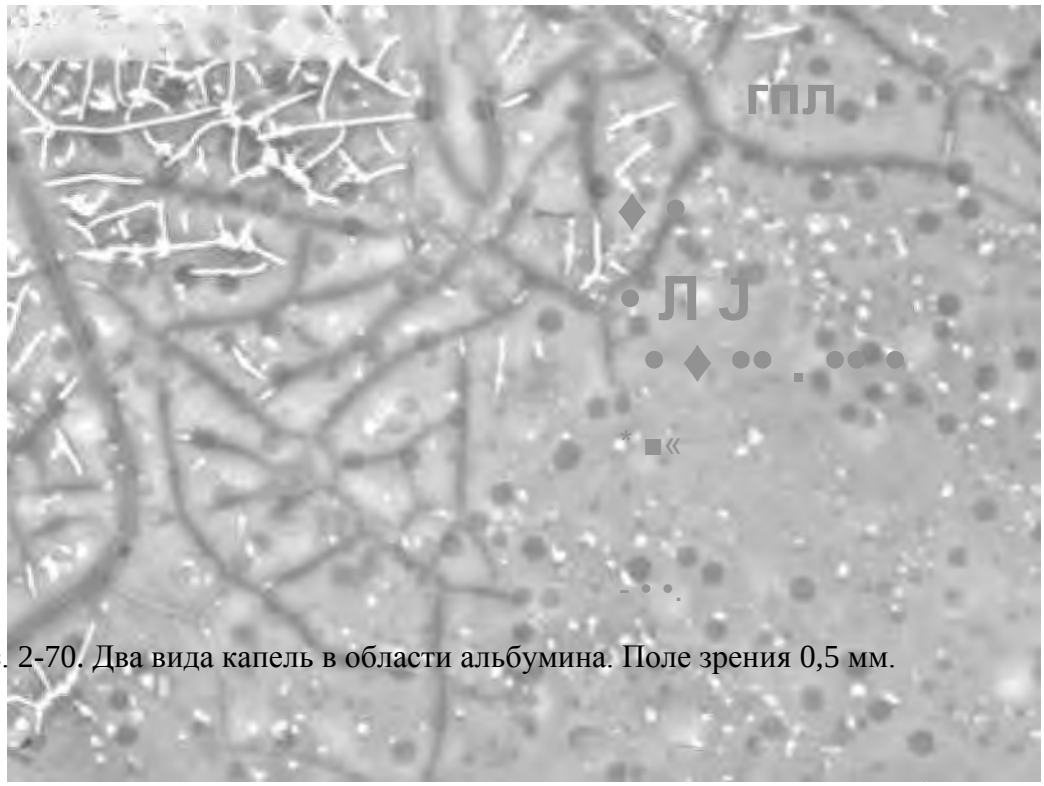


Рис. 2-70. Два вида капель в области альбумина. Поле зрения 0,5 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Таблица. 2-13. Сравнительные характеристики различных типов капель.

Признак	Капли 1	Капли 2	Капли 3	Капли 4 точки	Капли 5 точки
Вещество	Триглицериды	Эфиры холестерина	?	липиды	
Локализация	Область воздуха	Область воздуха	Область альбумина	Область альбумина	Область воздуха
Размер	10 мкм	10 мкм	10 мкм	1 мкм	1 мкм
Граница	размытая	четкая	размытая	четкая	четкая
Методы освещения:					
Светлое поле	светлые	светлые	темные	светлые	Серые +
Поляризованный свет	темные	Яркий крест	темные	темные	темные
Темное поле			темные	Темные	Светлые +
Фазовый метод			Темные +	Светлые +	Темные +

2.6 Волокна.

Толстые волокна.

Иногда в высохшей капли видны толстые волокна. Особенности наблюдаемых волокон:

-Волокна видны сразу после раскапывания капли.

-Волокна хорошо видны в поляризованном свете.

-Волокна имеют постоянную ширину, приблизительно 0,02 мм.

-Волокна имею различную длину.

-На поверхности волокна иногда имеются чешуйки. Возможно это поверхностный рост волокна.

-Волокна имеют не круглую, а плоскую форму, в виде ленты. Соотношение ширины к толщине составляет примерно 10:1.

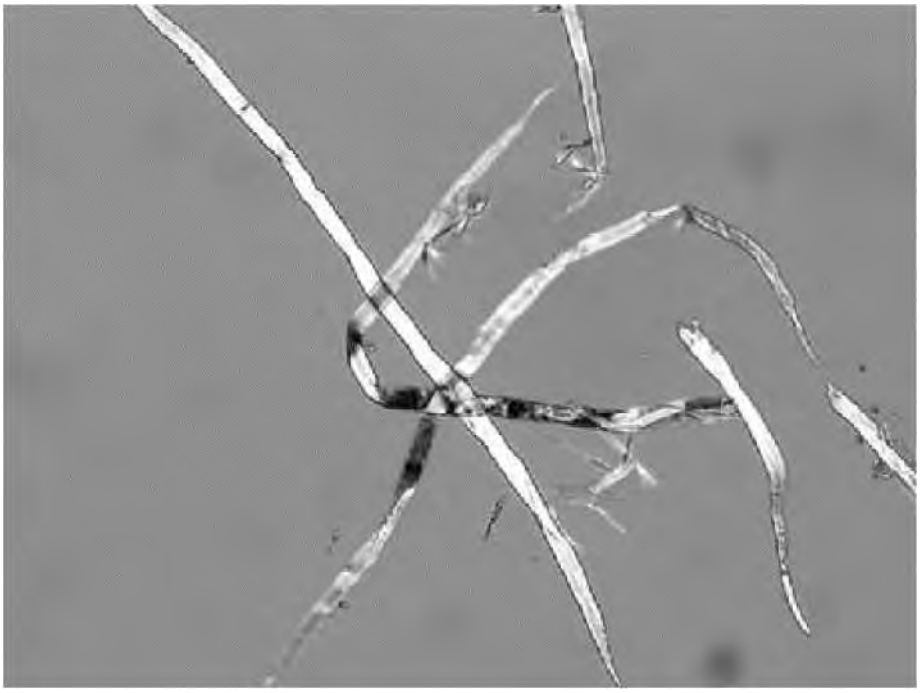


Рис. 2-71. Толстые волокна.

Тонкие волокна фибрина.

При длительном хранении в сыворотке образуется сгусток из волокон. В основном полимеризуются остатки фибрина, который имеется в сыворотке. Волокно фибрина это - полимер из мономеров фибрина. Длина мономера фибрина - 46 нм. Диаметр волокон фибрина в фибриновом сгустке крови имеет нормальное распределение от 4 до 50 нм. Средний диаметр фибриновых волокон - 17 нм. По другим данным диаметр волокна фибрина составляет 400 нм, и волокно состоит из 5000 молекул фибрина. Волокна фибрина не светятся в поляризованном свете.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

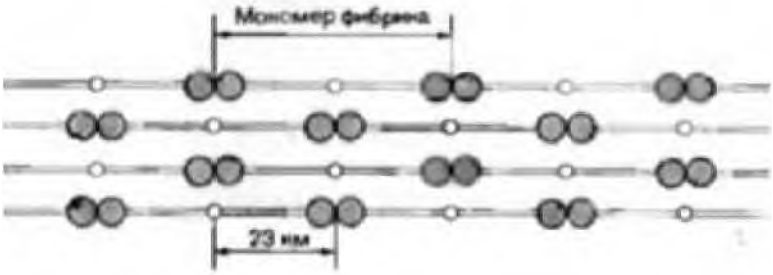


Рис. 2-72. Структура волокна фибрина.

Различные волокна.

Одна из причина появления волокон - это артефакты из воздуха. В воздухе постоянно имеются волокна от одежды. Волокна так же остаются на поверхности стекла, если протирать стекла тряпочкой. Различные типы волокон имеют различное строение. -Бумажные волокна под микроскопом имеют вид широких, лентообразных, скрученных полых волокон.

-Льняные волокна имеют вид прямой трубки с узким пустым каналом, толстыми стенками. Окрашиваются раствором йода или серной кислотой в синий цвет.

-Шелковые волокна, круглые, блестящие, без внутренней полости. Окрашиваются раствором сахара и серной кислотой в красный цвет.

-Шерстяные волокна имеют под микроскопом вид толстых круглых трубочек, как бы покрытых чешуйками. При добавлении 25% раствора едкого калия волокна окрашиваются в красный цвет.

-Хлопчатобумажное волокно - трубочки с тонкими стенками с внутренним каналом.

Диаметры различных волокон: -фибрин - 0,004-0,05 мкм -хлопковое волокно - 2-60 мкм -волос человека - 70-100 мкм

2.7 Напряжения в высохшей капле.

При высыхании капли в ней возникают напряжения. Часть напряжений снимается за счет образования трещин, а часть остается. Напряженное состояние прозрачного твердого тела можно наблюдать с помощью поляризационного метода. В скрещенных поляроидах все поле наблюдения становится темным, а в местах напряжения наблюдаются светлые области, свечение. Интенсивность свечения пропорциональна величине напряжения.

Напряжения в закрытой капле проявляются в виде мальтийского креста. Возникают центры напряжения (центр образования кристаллов) вокруг которого наблюдается яркий крест. Напряжения вызывают ориентацию молекул. Следовательно, возникает оптическая анизотропия (наведенное двойное лучепреломление).

Фотоупругость, фотоэластический эффект, пьезооптический эффект - это возникновение оптической анизотропии в первоначально изотропных телах под действием механических напряжений. Фотоупругость является следствием зависимости диэлектрической проницаемости вещества от деформации и проявляется в виде двойного лучепреломления и дихроизма, возникающих под действием механических нагрузок. При одноосном растяжении или сжатии изотропное тело приобретает свойства оптически одноосного кристалла с оптической осью, параллельной оси растяжения или сжатия. Фотоупругость обусловлена деформацией электронных оболочек атомов и молекул и ориентацией оптически анизотропных молекул либо их частей, а в полимерах - раскручиванием и ориентацией полимерных цепей

При возникновении точечной деформации, вызванной ростом кристалла, напряжения имеют радиальную структуру. В этом случае ориентация молекул так же имеет радиальную структуру. В скрещенных поляроидах радиальная структура анизотропии дает изображение светящегося креста (мальтийский крест).

Особенности проявления напряжений.

-Напряжения возникают на поздней стадии кристаллизации, ориентировочно через 2 дня после начала,

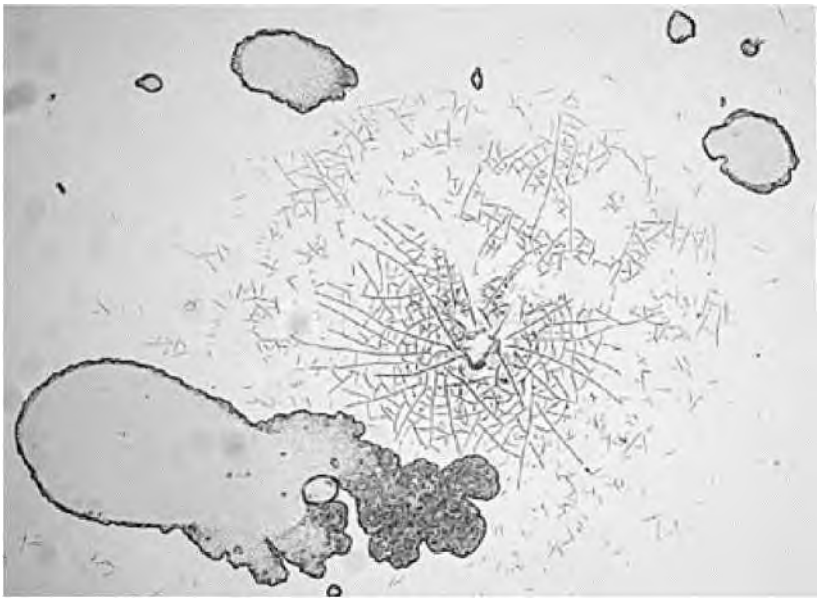
PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-В скрещенных поляроидах видны в виде мальтийского креста, темные лучи которого параллельны направлениям поляроидов,
-Часто расположены в центре группы из мелких светящихся точек (липидов),
-Часто вокруг большого центра напряжений имеется сеть трещин,
-Часто в центре имеется прозрачное кристаллическое образование, -Располагаются центры напряжений в основном в центральной, а не граничной области, -Обычно центры напряжений одиночные и располагаются далеко друг от друга, -Встречаются центры напряжения в центральной воздушной области, например, одиночный кристалл, соединенный с основной областью перетяжкой. Наличие креста в этом случае говорит о том, что напряжение возникает в покровном стекле, и светится покровное стекло. Можно предположить, что в стекле возникает растяжение, так как кристалл растет, увеличивается в объеме, но стекло держится окружающим застывшим альбумином. Подтверждением того, что напряжения возникают в стекле, служит и то факт, что при растрескивании альбумина в области напряжения вид креста не меняется, на нем не появляется ярких трещин как при растрескивании открытой капли,
-точечные (малые) напряжения,
-напряжения, вызванные ростом кристалла,
-светлые поля в виде областей, -напряжения обычно возникают при охлаждении вещества из расплава.

2.7.1 Напряжения вокруг растущего кристалла.

В области белка иногда происходит кристаллизация различных компонент. При росте кристалла происходит затвердевание альбумина в его окрестности, и происходит растрескивание затвердевшего альбумина. Можно предположить, что кристалл продолжает расти после того, как альбумин затвердел. Это вызывает возникновение напряжений в затвердевшем альбумине. Центром напряжений является растущий кристалл.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com



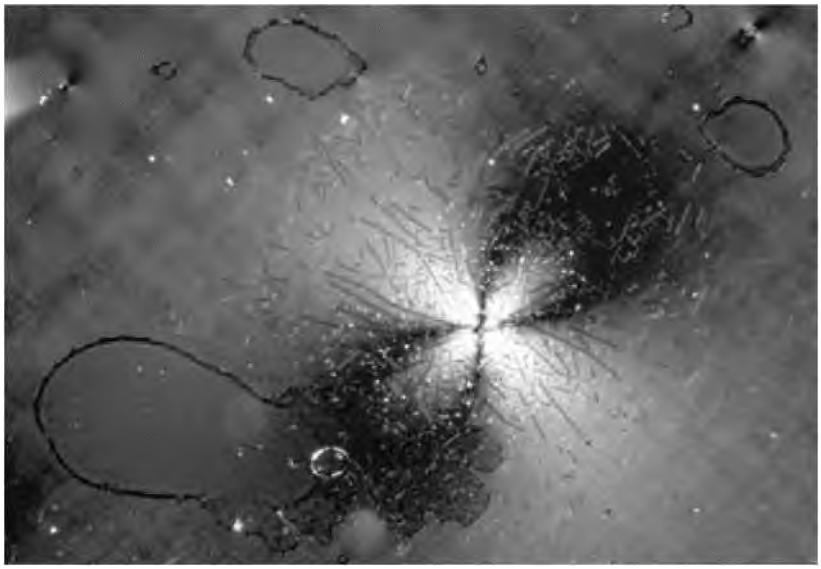
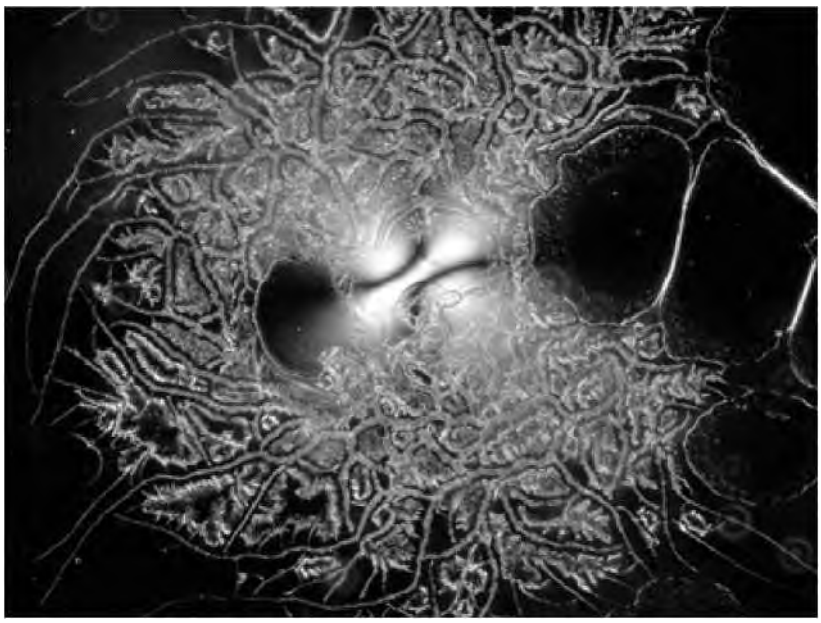


Рис. 2-73. Возникновение напряжений вокруг растущего кристалла. Проходящий и поляризованный свет. Поле зрения 1,5 мм.

При большом увеличении видна структура мальтийского креста. В центре креста видна характерная фигуры в виде восьмерки.



PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 2-74. Напряжения вокруг кристалла. Структура центра «Мальтийского» креста в виде восьмерки. Поляризованный свет. Поле зрения 1,5 мм.

2.7.2 Возникновение напряжений вокруг имеющихся включений.

Иногда в сыворотке уже содержатся твердые включения (агрегаты, кристаллы). При накрывании сыворотки покровным стеклом они не проявляются, так как их размер меньше толщины слоя сыворотки между предметным и покровным стеклом. При испарении воды и сжатии сыворотки покровное стекло начинает опускаться, толщина пленки между стеклами уменьшается. В некоторый момент толщина пленки сравнивается с размером включения. Включение касается верхнего и нижнего стекла. При дальнейшем опускании покровного стекла включение начинает играть роль распорки. В этом месте расстояние между стеклами не уменьшается. В связи с этим возникает два эффекта. Во первых - в этом месте происходит образование воздушного пузырька. В центре пузырька находится включение, которое поддерживает покровное стекло как купол (бугор). Во вторых возникает напряжение в покровном стекле и появляется изображение мальтийского креста. Можно провести модельный эксперимент. Если на стекло надавить острым предметом (иглой, острием ножа), то в месте касания предмета со стеклом в стекле возникают напряжения, и в поляризованном свете возникает изображение светящегося креста.

2.7.3 Напряжения вокруг неоднородностей, звездочки.

Звездочки видны в виде множества ярких мелких точек. При большом увеличении звездочки видны в виде маленьких неоднородностей. Неоднородностью может быть небольшой кристаллик, или небольшой агрегат. Звездочки видны в виде маленьких крестиков. Вокруг звезд нет растрескивания. Значит, напряжения возникают в геле. Если бы вокруг кристалликов была жидкость, то напряжений бы не возникло.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 2-75. Напряжения вокруг маленьких кристаллов - звезды. Поляризованный свет. Поле зрения 3,0 м.

2.7.4 Напряжения в виде прямоугольных структур.

Прямоугольные структуры не видны в проходящем свете. В поляризованном свете эти структуры видны в виде светящихся областей. Как правило, эти объекты локализованы в граничной области. Области представляют собой чередующиеся светлые и темные прямоугольники на сером фоне. Образование таких областей связано с деформацией геля. Если в геле имеются ориентированные волокнистые структуры, то деформация геля не будет однородной. Поперек волокон будет происходить сильное сжатие за счет сближения волокон. Так как волокна жесткие, то вдоль волокон деформация будет слабая. Так как напряжения создают неоднородность, то в области темных прямоугольников иногда наблюдается выпадение липидов, которые в поляризованном свете светятся в виде ярких точек.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

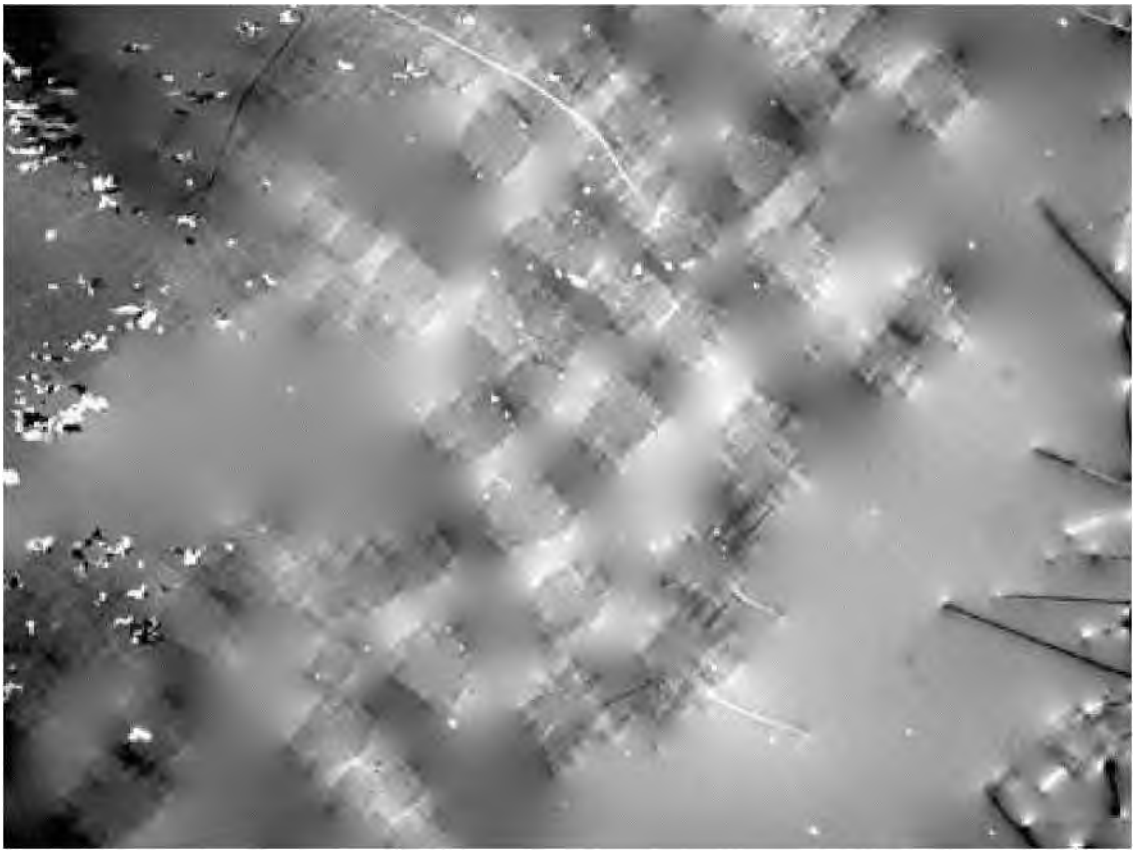


Рис. 2-76. Прямоугольные структуры. Поляризованный свет. Поле зрения 1,2 мм.

2.8 Кристаллизация на поверхности.

При высыхании сыворотки под покровным стеклом наиболее летучие компоненты сыворотки испаряются и кристаллизуются на поверхности покровного стекла. Обычно образуются кристаллы в виде дендритов. Кристаллы на поверхности возникают на второй день после начала кристаллизации и на третий день прекращают расти.

Рис. 2-77. Дендрит поверхностный - артефакт. Светлое поле. Поле зрения 0,7 мм.

Важно предварительно убедиться, что кристаллов не было на используемых стеклах, и что исходные стекла являются чистыми. Иногда на поверхности покровных стекол, если они долго хранились, уже имеются ветвистые кристаллы.

2.9 Разные объекты.

2.9.1 Коричневые агрегаты (билирубин). При наличии в сыворотке большого количества билирубина (желчного пигмента), в краевой области покровного стекла наблюдается большое

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

количество светло-коричневых округлых зерен. Концентрация зерен уменьшается по направлению от края покровного стекла к центру. В норме билирубин (прямой и непрямой) переносится в сыворотке крови альбумином. При испарении воды связи альбумина с билирубином разрываются, и билирубин выпадает в чистом виде.

2.9.2 Агрегаты. Иногда образуются агрегаты - скопление мелких шариков. Агрегаты ярко светятся в поляризованном свете. По форме агрегаты похожи на множество шариков жира. Возможно что основной компонент агрегатов - липиды.

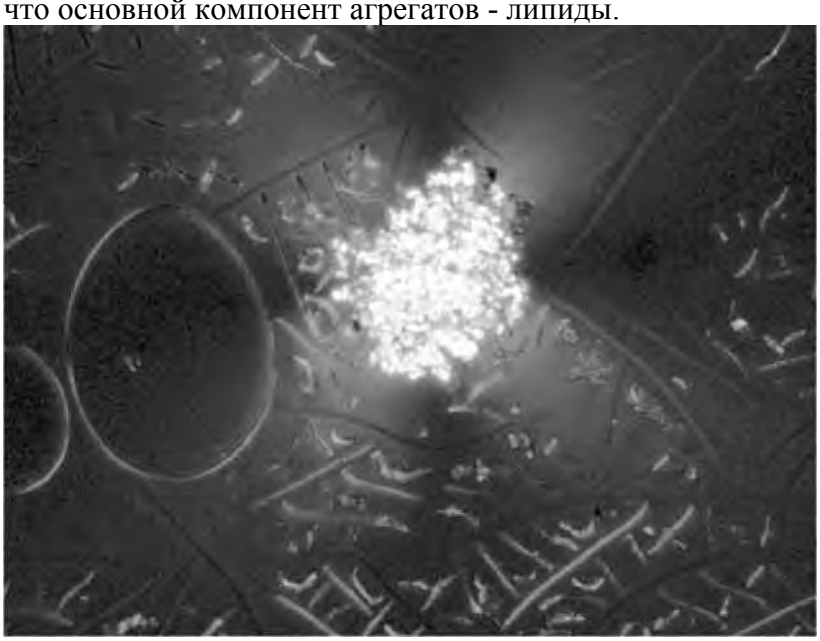


Рис. 2-78. Крупный агрегат. Поляризованный свет. Поле зрения 0,3 мм.

2.10 Кристаллизация тестовых растворов.

Для идентификации кристаллов, образующихся при кристаллизации сыворотки, очень эффективным является метод кристаллизации тестовых растворов. В этом случае заранее известно, какое вещество образует данный тип кристаллов.

Необходимо понимать, что некоторые структуры могут возникнуть из-за недостаточной степени очистки веществ (альбумина). Дело в том, что метод дегидратации очень чувствительный, и малейшее количество примесей влияет на формирование различных структур.

0-Вода.

Вода не кристаллизуется под покровным стеклом, но некоторые процессы можно наблюдать. Через час после начала процесса происходит образование газовых пузырьков, которые быстро растут. Через некоторое время происходит прорыв внешнего воздуха через боковую границу, и быстрый рост центрального пузырька. В капле под покровным стеклом наблюдаются течения, если в воду добавить мелкие частицы.

Вода испаряется вся, независимо от объема капли (от 5 до 500 мкл). Если в воде содержатся примеси, то в центре образуется остров.

1-чистый раствор альбумина.

Прежде всего необходимо отметить, что раствор альбумина для инфузий 10%, который продается в аптеках, не может являться тестовым раствором альбумина. Дело в том, что в растворе для инфузий кроме альбумина содержится хлорид натрия (соль). Состав раствора аналогичен сыворотке. Таким образом, данный раствор является тестовым раствором соли в альбумине.

Для того чтобы понимать процессы, происходящие в сыворотке, необходимо выяснить процессы, происходящие в растворе чистого альбумина. При кристаллизации раствора чистого альбумина структура капли сохраняется. По краям прозрачная область альбумина.

В центре находится область воздуха. Граница воздух-альбумин состоит только из простых ветвей. Отсутствуют липидные пузыри.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

В поляризованном свете практически отсутствуют светящиеся объекты. В граничной области, в области растрескивания альбумина, видно слабое свечение напряженных областей.
В области альбумина имеются острова. Интересна структура остовов. Отсутствует темный осадок на границе островов (нет липидов). В островах имеются дендриты альбумина.

2-раствор альбумина с добавлением соли NaCl.

Рис. 2-79. Раствор альбумина с добавлением соли NaCl. Поле зрения 1,5 мм.

3-раствор альбумина с добавлением креатинина.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

Рис. 2-80. Кристаллы из раствора альбумина с добавлением креатинина. Поле зрения 3,5 мм.

4-раствор альбумина с добавлением глюкозы.

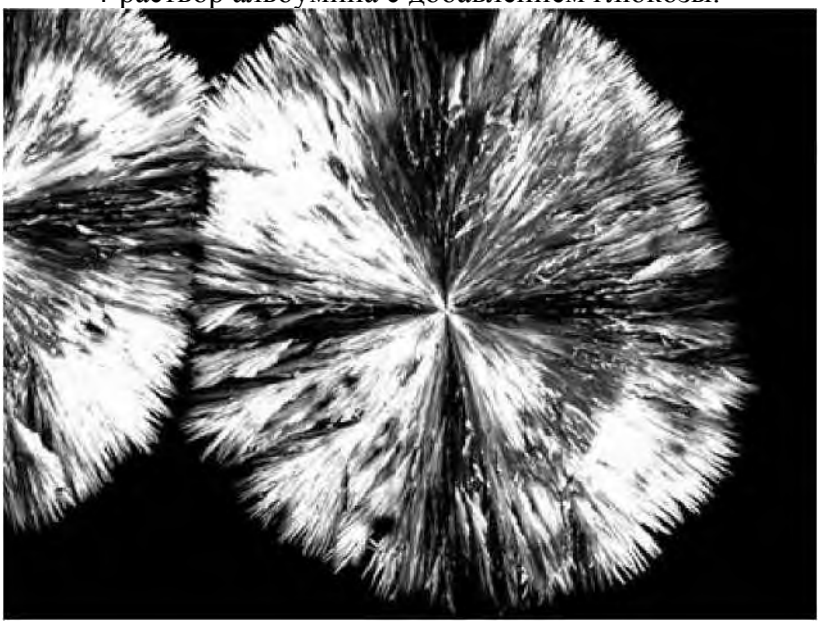


Рис. 2-81. Раствор альбумина с добавлением глюкозы. Поле зрения 0,7 мм.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

2.11 Выделение объектов с помощью различных оптических методов.

Рассмотрим применение различных методов освещения (светлое поле, темное поле, поляризация, фазовый метод) для наблюдения различных объектов (трещины, текстурные элементы, капли, кристаллы).

Таблица 2-14. Проявление различных объектов с помощью различных методов освещения.

	Светлое поле	Темное поле	Поляризация	Фаза
Фон	светлый	темный	темный	серый
Воздух	светлый	темный	темный	серый
Альбумин	светлый	темный	темный	серый
Трещины	темные +	светлые +	темные	светлые +
Псевдотрещины тип1	светлые	темные	темные	серые
Псевдотрещины тип 2	светлые	темные	светлые +	темные +
Параллельные трещины	темные +	светлые +	светлые +	светлые +
Капли 1	серые +	темные	темные	серые
Капли 2	серые +	темные	яркий крест	серые
Капли 3	светлые	темные	темные	серые
Капли 4	светлые	темные	темные	серые
Сферолиты	светлый	темный	светлый +	серый
Дендриты соли	светлый	темный	темный	темный +
Кристаллы оптические	-	-	ярко светятся	
Кристаллы не оптические	-	-	-	

Основные объекты, которые являются однородными и не выявляются - это области воздуха и область чистого белка.

-Кристаллы. Кристаллы расположены в области белка. Кристаллы видны только при поляризационном методе в виде светящихся объектов. Не все кристаллы обладают свойством оптической анизотропии и выявляются с помощью поляризационного метода. Например, дендритные кристаллы холестерина, расположенные в центральной части островов, не светятся.

Поляризационным методом выделяются - липиды, ураты.

2.12 Особенности процесса кристаллизации.

-Кристаллизация в тонкой пленке. Кристаллизация происходит в тонкой пленке толщиной порядка 0,05 мм. В этом случае происходит не трехмерная кристаллизация, как обычно, а двумерная кристаллизация. В случае двумерной кристаллизации действуют совершенно другие законы, отличные от случая трехмерной кристаллизации.

-Кристаллизация в геле. При испарении воды образуется густой гель альбумина, и дальнейшая кристаллизация компонент происходит в вязкой среде, геле. Отличительная особенность кристаллизации в геле - малая скорость диффузии вещества. Если исходная концентрация вещества маленькая, то не происходит кристаллизации. Кристаллизация начинается, если концентрация вещества превышает некоторое пороговое значение. Однако,

это имеет место только в том случае, когда вещество распределено по сыворотке равномерно. На самом деле имеет место неоднородность в распределении концентрации. И кристаллизация

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

может начаться в тех областях, где локальная концентрация выше критической.

-Сокристаллизация (соосаждение)- совместная кристаллизация различных веществ.

-Фазовый переход золь-гель. Потеря гидратной оболочки. Исходное состояние капли - жидкое. Капля представляет собой коллоидный раствор высокомолекулярных молекул белков - золь. При испарении воды происходит переход капли из жидкого состояния в гелеобразное. Из капли испаряется вода, так как это самые легкие молекулы в растворе, и они обладают достаточной энергией, чтобы покинуть раствор. В первую очередь испаряется свободная вода. Расстояние между молекулами белка уменьшается. Вязкость увеличивается. В растворах белков структурирование может происходить за счет гидрофобного взаимодействия между неполярными участками цепей, а гидратированные участки цепей, наоборот защищают белковые молекулы от их полного слипания.

-Денатурация. При дегидратации глобулярные белки, имеющие форму глобулы (шара) могут денатурировать и переходить в расправленную форму. Внешние проявления денатурации сводятся к потере растворимости, повышению вязкости белковых растворов. - Изменение pH сыворотки при дегидратации.

При дегидратации сыворотки крови pH изменяется.

-Фазовый переход гель - ксерогель. При дальнейшем испарении воды начинает испаряться связанная вода из гидратных оболочек молекул белка. Молекулы слипаются. Происходит затвердевание геля, образуется ксерогель - твердое тонкопористое вещество с упорядоченной структурой пор.

-Студни. Одна из разновидностей студней имеет отчетливо выраженное двухфазное состояние. Они возникают в результате распада однофазных растворов полимеров на две фазы, первая из которых, содержащая большое кол-во полимера, образует преим. непрерывный каркас, а вторая фаза с очень низкой концентрацией полимера включена в этот каркас в виде дисперсии. Эти студни часто образуются из растворов белков. При этом фазовый распад связан с изменением активности растворителя вследствие введения "нерастворителя" или резкого изменения температуры.

-Синерезис (syneresis). Синерезис - явление самопроизвольного уменьшения объема геля с выделением наружу дисперсионной среды, содержащейся в петлях геля; синерезису способствуют все факторы, вызывающие коагуляцию, например, увеличение концентрации электролита. При синерезисе из студня, образованного белком, происходит расслоение. При установлении новых условий состояния студня, избыток жидкости отделяется вначале в виде микрокапель в массе студня, а затем в виде непрерывной жидкой фазы. Для высаливания альбумина необходима концентрация NaCl - 5,42 моль/л.

-Высаливание. Высаливание (преципитация) - осаждение высокомолекулярных соединений из растворов при добавлении солей. Высаливание происходит из-за потери макромолекулами гидратной оболочки. При добавлении ионов происходит борьба за молекулы воды между ионами и макромолекулами. Ионы побеждают, отбирают воду у макромолекул. Макромолекулы теряют гидратную оболочку, слипаются и выпадают в осадок.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

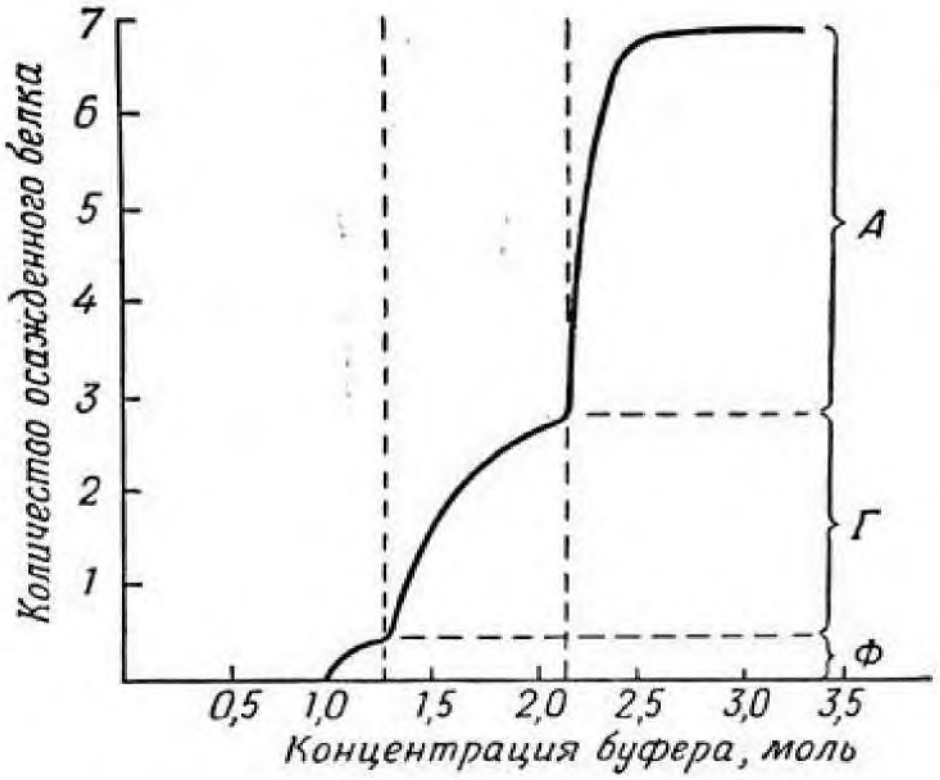


Рис. 2-82. Диаграмма высаливания белков.

При малых концентрациях соли осаждаются фибриноген (Ф -концентрация 1,0 моль), потом глобулины (Г- концентрация 1,3 моль), потом — альбумины (А- концентрация 2,0 моль).

-Коацервация (coacervate). Коацервация - это процесс самопроизвольного объединения водных оболочек нескольких частиц, без слияния самих частиц. Коацерваты образуются в концентрированных растворах белков и нуклеиновых кислот. Коацервация коллоидного раствора (жидкого студня) происходит, когда мицеллы, частично потеряв водную оболочку, сближаются между собой и образуют общую среду коллоидного раствора (студня). В дальнейшем в такой общей оболочке может происходить постепенное обезвоживание, сближение частиц, их слипание и выпадение в осадок. Причем свойства коацерватной капли (мицелл, объединенных одной общей водной оболочкой) таковы, что она имеет большую вязкостью, чем породивший ее коллоидный раствор (студень). Вязкость способствует поглощению и удержанию в этой капле самых различных веществ: красителей, солей, продуктов обмена.

В результате высаливания обычно возникают образования, похожие на коагуляты - волокна, хлопья, творожистые осадки. Однако в некоторых случаях высаливание приводит к образованию капелек второй жидкой фазы — структурированной жидкости, приближающейся по свойствам к студню. Это явление носит название коацервации. Оно характерно для ряда белков. Концентрация ВМС в коацерватных каплях увеличивается, в остальном растворе — уменьшается, по сравнению с исходной концентрацией.

Самопроизвольное разделение гомогенного раствора на две фазы в этом процессе представляется, на первый взгляд, неожиданным, поскольку в нем возникают концентрационные градиенты, а также фазовые границы, обладающие избыточной энергией. Статистическая трактовка, предложенная Онзагером, вскрывает энтропийный характер коацервации. Вытянутые макромолекулы в растворе перекрываются сферами действия, в результате чего уменьшается свобода броуновского движения. Выделение части макромолекул в другую, более концентрированную фазу, значительно увеличивает свободу вращательного движения всех макромолекул, оставшихся в дисперсионной среде (мало изменяя ее для макромолекул коацервата), а следовательно и энтропию системы.

Коацерваты способны адсорбировать различные вещества. Из раствора в них поступают химические соединения, которые преобразуются в результате реакций, проходящих в коацерватных каплях.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

-Коагуляция (coagulation). Коагуляция - объединение частиц дисперсной фазы в агрегаты вследствие сцепления (адгезии) частиц. При высоком содержании частиц дисперсной фазы коагуляция может приводить к отверждению всего объема системы вследствие образования пространственной сетки коагуляционной структуры, происходит структурообразование. Коагуляция - объединение мелких частиц дисперсных систем в более крупные под влиянием сил сцепления с образованием коагуляционных структур. Коагуляция — физико-химический процесс слипания коллоидных частиц. Коагуляция ведёт к выпадению из коллоидного раствора хлопьевидного осадка или к застудневанию. Коагуляция — естественный, самопроизвольный процесс расслаивания коллоидного раствора на твёрдую фазу и дисперсионную среду. Таким образом дисперсная система стремится достигнуть состояния минимальной энергии.

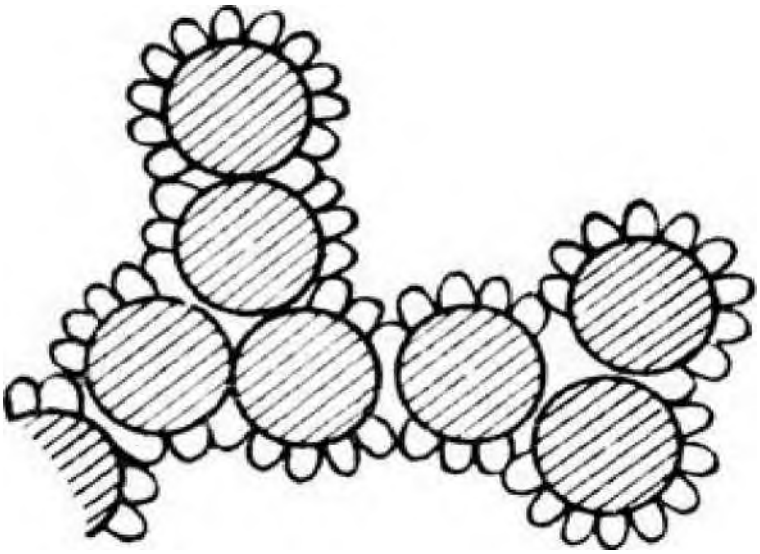


Рис. 2-83. Слипание частиц.

Слияние гидратных оболочек при слипании коллоидных частиц.

Высаливание, синерезис, коацервация и коагуляция представляют собой различные стороны одного и того же процесса - слипание крупных молекул белков при испарении воды и повышении концентрации белков. При испарении воды в среде постоянно повышается количество связей между коллоидными частицами, происходит загустение, образование густого геля (студня).

Этапы дегидратации:

1- Изолированные коллоидные частицы в воде.

2- Испарение несвязанной воды, которая находится между коллоидными частицами. При испарении воды происходит постепенное сближение коллоидных частиц до некоторого минимального расстояния.

3- При дальнейшем испарении воды у некоторых частиц частично нарушаются гидратные оболочки. Некоторые частицы начали слипаться. Начинают образовываться макрочастицы. Происходит коацервация частиц, гидратные оболочки частиц объединяются.

4- Образуются большие группы слипшихся частиц. Если частицы тяжелые, то они выпадают в осадок. Если плотность частиц аналогична плотности воды, то слипшиеся частицы продолжают плавать в воде.

5- Группы частиц слипаются, и образуется отдельная фаза из слипшихся частиц.

6- Объем фазы увеличивается.

7- Все частицы слиплись в одну фазу.

8- Затвердение фазы из-за испарения оставшейся воды.

-Агглютинация - склеивание частиц растворенной фазы.

-Флотация. Флотация - разделение мелких твердых частиц и выделение капель дисперсной фазы из эмульсий. Основана на различном смачиваемости частиц (капель) жидкостью (преимущественно водой) и на их избирательном прилипании к поверхности раздела жидкость - газ. Слипание пузырьков воздуха происходит только с гидрофобными частицами (не смачиваемыми водой) или частицами, имеющими гидрофобные участки

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com

поверхности. Элементарный акт флотации заключается в следующем: при сближении пузырька воздуха с твердой гидрофобной частицей разделяющая их прослойка воды при некотором критической толщине прорывается и происходит слипание пузырька с частицей.

-Перколяция. Перколяция - образование пространственных связей путем объединения единичных связей. Эта модель описывает процесс гелеобразования.

-Образование кристаллогидратов. Кристаллогидраты - кристаллы, включающие молекулы воды. Многие соли, а также кислоты и основания выпадают из водных растворов в виде кристаллогидратов. Кристаллизационная вода обычно может быть удалена нагреванием, при этом разложение кристаллогидратов часто идёт ступенчато.

-Образование коллоидных кристаллов. Происходит кристаллизания коллоидных частиц аналогично кристаллизации атомов. Коллоидная кристаллизация происходим в результате процесса самосборки коллоидных частиц. Бывает объемная коллоидная кристаллизация (3D) и двумерная 92D) кристаллизация в пленках.

-Образование клатратов (clathrate compound). Клатраты - соединения включения, образованы включением молекул вещества («гостя») в полости кристаллической решётки, образованной молекулами другого типа («хозяевами») (решётчатые клатраты). При загустевании белка образуется трехмерная сеть, в ячейках которой располагаются более мелкие молекулы, находящиеся в сыворотке.

-Супрамолекулярная (надмолекулярная) химия (Supramolecular chemistry) — междисциплинарная область науки, включающая химические, физические и биологические аспекты рассмотрения более сложных, чем молекулы, химических систем, связанных в единое целое посредством межмолекулярных (нековалентных) взаимодействий. Объекты супрамолекулярной химии — супрамолекулярные ансамбли, строящиеся самопроизвольно из комплементарных, т. е. имеющих геометрическое и химическое соответствие фрагментов, подобно самопроизвольной сборке сложнейших пространственных структур в живой клетке. Впервые термин «супрамолекулярная химия» был введен в 1978 г. лауреатом Нобелевской премии Жаном-Мари Леном и определен как «химия, описывающая сложные образования, которые являются результатом ассоциации двух (или более) химических частиц, связанных вместе межмолекулярными силами».

Необходимо отметить, что при испарении всей воды не будет достигаться 100% концентрации веществ. Например, исходная концентрация соли NaCl в сыворотке составляла 0,9%. При испарении воды (которой 90%) концентрация повысится в 10 раз и станет равной 9%, но не 100%. Правда это будет уже не раствор соли в воде, а раствор соли в геле альбумина.

Если под покровное стекло капнуть воды, то вода заполняет почти все пространство под покровным стеклом. Остаются не смоченными только два типа областей: пузырьки воздуха (центральный и краевые), и области липидов на границе воздух - сыворотка.

2.13 Структуры и процессы закрытой капли, аналогичные структурам открытой капли.

И в закрытой и в открытой капле некоторые процессы происходят аналогично.
-происходит растрескивание сыворотки,
-образуются трещины и псевдотрещины,
-образуются ячейки в граничной области закрытой капли, аналогичные ячейкам в краевой зоне открытой капли,
-в ячейках выпадает темный осадок,
-соль кристаллизуется в виде дендритов,
-соль кристаллизуется в виде агрегатов в краевой зоне,
-разделение раствора на две фазы (обогащенная и обедненная белком). В открытой капле это структуры морщин, в закрытой капле это структуры на границе воздух-сыворотка.
-и в закрытой и в открытой капле на начальном этапе формируется основное тороидальное течение.
-существует движение фронта фазового перехода жидкость-гель в виде светлого кольца.

PDF created with pdfFactory Pro trial version www. pdffactory. com