

Методы обнаружения кристаллов в суставах: status praesens. Часть I

М.А. Кабалык, А.И. Дубиков, Т.Ю. Петрикеева

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования «Владивостокский государственный медицинский университет Росздрава», Владивосток

Контакты: Максим Александрович Кабалык
maxi_maxim@mail.ru

Contact: Maksim Aleksandrovich Kabalyk
maxi_maxim@mail.ru

Поступила 24.06.2011

История изучения микрокристаллических артропатий (МА) берет свое начало в 80-х годах XIX в., когда развернулась дискуссия о целесообразности использования термина «uric acid diathesis» (мочекислый диатез). Во время дискуссии был выдвинут основополагающий тезис о том, что кристаллы мочевой кислоты являются уникальной причиной развития подагры. Особый интерес медицинской общественности вызвала статья I.В. Уео, опубликованная в 1888 г., в которой автор впервые систематически излагает накопленные факты метаболизма и патологической роли мочевой кислоты [1]. В 1903 г. E.H. Bennet делится результатами аутопсии пожилого мужчины, в суставном хряще которого были обнаружены ромбовидные кристаллы немочекислый природы [2]. Это было первое описание пирофосфатной артропатии.

В настоящее время группа МА включает в себя артриты, ассоциированные не только с мочекислым натрием, пирофосфатом кальция, но и с гидроксиапатитом алюминия, кристаллами основного фосфата кальция. Очевидно, что эта категория патологий суставов будет постоянно расширяться за счет идентификации новых кристаллов-участников, и связано это, прежде всего, с научно-техническим прогрессом в области технологий анализа кристаллических структур. В условиях особой актуальности инновационных подходов к ранней (возможно, доклинической) диагностике особенно важно иметь отчетливое представление о существующих методах и возможности их использования в клинической практике. Последние рекомендации Европейской антиревматической лиги (EULAR) по терминологии и ведению больных с пирофосфатной артропатией [3, 4] предполагают использование в качестве основного диагностического стандарта поляризационной микроскопии синовиальной жидкости. Вместе с тем появился целый ряд точных и информативных методов обнаружения кристаллов в синовиальной жидкости и тканях сустава, превосходящих по своим возможностям поляризационную микроскопию, ультразвуковое исследование и стандартную рентгенографию.

В данной статье сделана попытка критического анализа современных методов идентификации кристаллов в хряще, синовиальной жидкости и периартикулярных тканях.

Методы визуализации.

Световая микроскопия

Поляризационная микроскопия с использованием компенсатора (ПМК), вариант простой световой микроскопии, впервые была применена для обнаружения в синовиальной жидкости кристаллов мочевой кислоты (моноурата натрия – МУН) и дигидрата пирофосфата кальция (ДПФК) в начале 60-х годов прошлого века [4–7]. Она быстро стала «золотым стандартом», рекомендуемым авторами учебников для рутинной диагностики МА [2, 3, 6, 8–10]. Суть метода состоит в обнаружении веществ, обладающих свойством оптической анизотропии (от греч. anisos – неравный и tropos – направление). Пучок света, проходя через кристалл, разделяется на два пучка с взаимно перпендикулярными плоскостями поляризации, свет вдоль которых распространяется в различных направлениях и с разными скоростями. Оптически изотропный объект не виден в поляризационном микроскопе. Видимой будет только структура, которая обладает способностью изменять направление поляризации проходящего через нее света. Такой способностью обладают двулучепреломляющие кристаллы, например ДПФК.

До сегодняшнего дня этот метод является самым популярным в ревматологической практике для анализа синовиальной жидкости на предмет наличия в ней кристаллов. Поляризационная микроскопия с разрешением 1 мкм способна идентифицировать кристаллы МУН, ДПФК и оксалата кальция (ОК), но не основного фосфата кальция (ОФК) ввиду мелких размеров этих частиц, за исключением тех случаев, когда они образуют конгломераты.

Преимущества ПМК заключаются в доступности, относительной простоте выполнения анализа, быстроте получения результата, дешевизне метода. Однако многие авторы считают этот метод недостаточно чувствительным и конкретным, чтобы квалифицировать его как стандарт для постановки диагноза [11–15]. Это связано, во-первых, с тем, что разные кристаллы обладают различной степенью оптической анизотропии. Например, кристаллы МУН имеют сильное лучепреломление и легко идентифицируются, в то время как ДПФК обладают слабым лучепреломляющим эффектом, что затрудняет их определение [16]. Так, J. Ivorra и соавт. показали в своем исследовании, что только пятая часть кри-

сталлов ДПФК проявляет феномен оптической анизотропии и может быть обнаружена методом ПМК [17]. Во-вторых, доступное разрешение микроскопии 1 мкм не позволяет визуализировать мелкие кристаллы МУН и ДПФК, тем более мелкие кристаллы гидроксиапатита, которые часто воспринимаются как детрит, что снижает чувствительность метода [18, 19]. В-третьих, как было показано в слепых исследованиях, даже при остром артрите кристаллы МУН и ДПФК не были замечены опытными исследователями, что иллюстрирует существенную субъективную компоненту ПМК [16, 19].

Большой опыт применения ПМК показывает высокую ценность этого метода с точки зрения экспресс-диагностики МА. Однако оптические свойства кристаллов, низкая разрешающая способность поляризационного микроскопа и недостаточная воспроизводимость заставляют исследователей искать новые, более эффективные методы обнаружения кристаллов в синовиальной жидкости.

Методы окрашивания

Окрашивание образцов синовиальной жидкости различными красителями применяется для более эффективного обнаружения кристаллов и их агрегатов, в том числе тех, которые не видны при поляризационной микроскопии [16]. Одним из таких методов является окрашивание образцов синовиальной жидкости ализариновым красным, который рекомендуется в качестве ценного дополнительного способа идентификации микрокристаллов ДПФК и ОФК с помощью ПМК [20–22]. Ализарин является классическим протравным красителем. Он содержится в виде генциобиозида руберитриновой кислоты в корнях краппа (*Rubia tinctorum*). Суть окрашивания состоит в том, что ализарин вступает в реакцию с некоторыми ионами, в частности Al^{+3} , которые являются постоянными составляющими различных соединений кальция. Это, в сущности, качественная реакция на катионы. Так F. Eggelmeijer и соавт., используя ализариновый красный, обнаружили кальцийсодержащие кристаллы в 65% образцов синовиальной жидкости, полученных от пациентов с синовитом [21, 23]. В дальнейшем электронная микроскопия подтвердила наличие кристаллов гидроксиапатита и ДПФК в 92% образцов с положительной окраской ализариновым красным.

Ценность окрашивания ализариновым красным связана в первую очередь с тем, что на результат не влияют оптические свойства кристаллов [23]. Многочисленные исследования эффективности и воспроизводимости этого метода позволили определить его пороговую чувствительность для кристаллов ДПФК и ОФК: 0,5 и 0,1 мкм/мл⁻¹ соответственно. При этом частота обнаружения кристаллов составила 100% при пирофосфатной артропатии, 54% при остеоартрозе и 39% у пациентов с ревматоидным артритом [20, 24]. K. Shoji утверждает, что окрашивание синовиальной жидкости ализариновым красным превосходит по диагностической ценности рентгеновскую дифракцию, при которой пороговая чувствительность обнаружения кристаллов ДПФК составляет 0,9–1,0 мкм/мл⁻¹ [24]. Им также показана эффективность предварительного центрифугирования суставной жидкости для повышения чувствительности исследования. Вместе с тем существует ряд факторов, которые напрямую или косвенно влияют на качество результата анализа. Во-первых, метод требует сохране-

ния оптимальной рН синовиальной жидкости, в пределах 4,0–6,0 для гидроксиапатита и 4,0–5,5 для ДПФК, что не всегда возможно. Во-вторых, необходимо строгое соблюдение 2% концентрации раствора ализаринового красного, используемого для окрашивания образца [24]. В-третьих, окрашивание ализариновым красным неспецифично для различных соединений кальция, что делает его непригодным для идентификации нескольких разновидностей кристаллов в одном образце [25]. В-четвертых, фагоцитированные кристаллы вызывают ряд трудностей в их идентификации.

Таким образом, проблема стандартизации и унификации метода еще не решена, что не позволяет рекомендовать его использование в рутинной практике обнаружения кристаллов в жидких и твердых средах суставов.

Продемонстрирована эффективность окраски образцов синовиальной жидкости по Граму [26]. Этот метод давно зарекомендовал себя в микробиологии и оказался ценным для обнаружения кристаллов МУН и ДПФК. При этом используются два анилиновых красителя, генциановый или метиловый фиолетовый – с последующей фиксацией раствором йода. До сих пор не расшифрована природа фиксации красителя кристаллами. Судя по всему, это происходит благодаря тем же механизмам, с помощью которых стенки бактерий поглощают краситель. Одними из первых ромбовидные грамположительные кристаллы в синовиальной жидкости описали А.Р. Wheeler и B.S. Graham [26]. Исследуя синовиальную жидкость пациента с острым септическим артритом голеностопного сустава, кроме повышенного содержания глюкозы и лейкоцитов, авторы при окрашивании по методу Грама обнаружили ромбовидные кристаллы, которые при ПМК были идентифицированы как ДПФК. Интересно, что кристаллы обнаруживались даже после 2 лет хранения образца [27].

К сожалению, метод окрашивания образцов синовиальной жидкости по Граму крайне плохо изучен с точки зрения воспроизводимости и специфичности, что не позволяет рекомендовать его как рутинный для идентификации кристаллов [27]. Вероятно, дальнейшие исследования в этой области позволят расширить возможности применения окраски по Граму.

В целях обнаружения кристаллов при ДПФК у гистологов были заимствованы окраска Diff-Quik и более специфический метод окрашивания по von Kossa. Последний был впервые описан в 1901 г. von Kossa, впоследствии модифицирован G. Clark и другими авторами [28]. В основе метода лежит реакция преципитации ионов серебра с фосфатом в кислой среде с последующим фотохимическим распадом. Реакция используется для обнаружения отложенных фосфатов кальция в тканях [29, 30] и характеризует минерализацию костной ткани [31], а также применяется для изучения минералообразования в паренхиме почек [32]. Важное преимущество окрашивания по von Kossa – возможность количественной оценки. Недостатком же метода считается отсутствие возможности качественной оценки микрокристаллических структур, в том числе фосфатов кальция. Дело в том, что наличие смеси двух солей не дает возможности дифференцировать их методом von Kossa. В связи с этим F. Vonewald и соавт. рекомендовали использовать рентгеновскую дифракцию и инфракрасную микроскопию Фурье для определения качественного состава солей фосфата кальция [33].

Окрашивание по Diff-Quik является разновидностью метода Романовского, в основе которого лежит применение смеси красителей (азура, эозина и метиленового синего) [34]. Отличия от окраски по Романовскому сводятся к разной степени интенсивности окислительных реакций. Изначально метод разрабатывался для окрашивания тонких срезов тканей и мазков жидкостей, например крови или вагинального секрета, с целью идентификации бактерий, клеточных элементов и тканей различных видов. Возникла идея использования этого метода для идентификации кристаллов в синовиальной жидкости. Так, показана высокая специфичность окраски Diff-Quik для кристаллов МУН, вместе с тем ДПФК в ряде экспериментов либо не обнаруживался, либо исследователи получали ложноположительные результаты [35]. При этом кристаллы определялись при хранении синовиальной жидкости до 12 мес, что является существенным преимуществом этого метода.

В целом, микроскопия синовиальной жидкости с применением окрашивания является ценным диагностическим методом. Это, в первую очередь, обусловлено относительно низкой стоимостью оборудования и реактивов. Во-вторых, окрашивание дает возможность идентифицировать кристаллы и агрегаты, которые часто не видны при ПМК. В-третьих, есть возможность избежать влияния оптических свойств кристаллов на результат исследования. Вместе с тем нет единого универсального способа окраски, позволяющего обнаружить все возможные типы кристаллов. Тот или иной метод является наиболее специфичным для определенного типа микрокристаллических структур, обнаруживаемых в средах сустава. Другим недостатком является необходимость специальной подготовки лаборантов для работы с синовиальной жидкостью, при этом на качество исследования и результаты напрямую влияет опыт и квалификация специалиста. До настоящего времени не предложен метод окраски, позволяющий с высокой точностью идентифицировать внутриклеточные кристаллы. Ряд методов требуют дополнительных уточняющих исследований, что усложняет процесс диагностики МА.

Микроскопия Raman

Индийский физик Венката Раман в 1930 г. был удостоен Нобелевской премии за работы по рассеянию света и за открытие эффекта, названного в его честь. Методика, получившая название микроскопии вынужденного рамановского рассеяния (ВРР), позволяет проводить количественную оценку частиц, присутствующих в изучаемых образцах ткани. Этот вид многомерной микроскопии позволяет идентифицировать в режиме реального времени одновременно видимую и невидимую составные части изучаемого материала от нескольких нанометров до миллиметров и опробован впервые на наноматериалах [36]. ВРР-микроскопия использует два лазерных луча высокой интенсивности, сканирующих образец. Такой подход позволяет получать 3D-изображение объектов очень быстро, при этом нет необходимости введения дополнительных меток. Оба лазерных луча сходятся на анализируемом образце и могут быть легко подстроены по частоте.

В медицинской исследовательской практике этот метод стал использоваться относительно недавно. Так, С.В. Freudiger и соавт. [55] продемонстрировали пользу метода в изучении распределения омега-полиненасыщенных жирных кислот и насыщенных жиров в живых клетках, при исследовании тканей головного мозга, а также

в мониторинге доставки лекарственных веществ через эпидермис. Изучение синовиальной жидкости больных остеоартрозом и посттравматическим синовитом с оценкой плотности, интегрального распределения, формы и размеров частиц методом ВРР-микроскопии не показало существенных различий при этих состояниях [38]. Тем не менее достоверные различия были получены при сравнении с контрольной группой, что авторы связали с наличием и степенью выраженности дегенеративных изменений в суставах.

ВРР-микроскопия — уникальный по своим качествам и возможностям метод визуализации, обладающий такими преимуществами, как высокая разрешающая способность, возможность получения объемного изображения, изучения молекулярной структуры веществ и количественной оценки образцов тканей. Вместе с тем отсутствие достаточного опыта в применении этого метода для анализа биологических сред и тканей, в том числе синовиальной жидкости, не позволяет судить о специфичности метода в диагностике МА. Необходимо дальнейшее интенсивное изучение возможностей микроскопии Raman в этой области, что позволит расширить знания и опыт применения этого метода в ревматологической практике.

Электронная микроскопия

Много работ посвящено морфологической оценке биоптатов хряща с помощью сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) [39, 40]. Суть этого вида микроанализа заключается в фокусировании пучка электронов на поверхности образца, что приводит к вторичной эмиссии электронов с поверхности изучаемого объекта. Достоинствами метода являются относительная простота подготовки образцов, высокая резкость изображения и большое увеличение. Это делает СЭМ одним из простых и эффективных способов визуализации [19]. СЭМ в сочетании с другими методами часто используется исследователями для обнаружения и описания депозитов кристаллов в хряще и синовиальной жидкости [41–43]. В 1983 г. Т. Cunningham и соавт. [44] разработали ряд методов подготовки образцов синовиальной жидкости и хряща для СЭМ, что еще более упростило и ускорило исследование, на которое ранее уходило до 48 ч. В частности, было предложено использование 100% гидразина для идентификации кристаллов гидроксипатита в синовиальной жидкости. При этом порог чувствительности метода составляет 5 мкг/см¹.

К преимуществам СЭМ можно отнести: высокие разрешающую способность и порог чувствительности, возможность обнаружения мелких кристаллов и их агрегатов, которые не видны при ПМК, быстроту и относительную простоту подготовки образцов для исследования. Вместе с тем методу присущи существенные недостатки: необходимость специального обучения сотрудников лаборатории и высокая стоимость оборудования.

Использование электронной микроскопии совместно с электронно-зондовым исследованием позволило обнаружить различные кристаллы фосфата кальция, которые из-за чрезвычайно малых размеров не были видны при световой микроскопии [45]. В основе этого метода исследования лежит анализ твердых образцов с помощью пучка электронов (зонда), источником которых является электронная пушка с термоэлектронной эмиссией и ускорением в электрическом поле. Используя этот метод, S.Y. Ali классифицировал три типа кристаллов апатита: 1-й тип —

округлые формы, 2-й тип — кубовидные, 3-й тип — игольчатые [46]. Эти результаты позволили автору предположить, что различная морфология кристаллов ассоциируется с различными клиническими паттернами. Вместе с тем при кристаллографическом анализе с использованием электронного зонда не удалось выявить существенных различий молярных соотношений Са:Р в кристаллах фосфата кальция разных морфологических типов [47, 48]. Возможность определить соотношение Са:Р имеет важное значение в определении химической природы кристаллов [49]. Так, было показано, что соотношение Са:Р, равное 1:1, соответствует кристаллам ДПФК, а 1,4:1 — характерно для гидроксиапатита [45, 48].

Таким образом, метод может быть использован для изучения топографии кристаллической структуры твердых тел, локального анализа, уточнения физико-химической характеристики и кристаллографической оценки гидроксиапатит-коллагеновых ассоциаций, а также выявления микрокристаллов, не определяемых методом стандартной электронной микроскопии [50]. К недостаткам электронно-зондового исследования можно отнести чрезвычайно высокую стоимость оборудования, возможность анализа только твердых образцов. Немаловажны высокие требования к обеспечению безопасности окружающей среды и санитарно-эпидемиологического благополучия персонала.

Другой вид микроскопии — трансмиссионная микроскопия, которая реализуется с помощью трансмиссионных (просвечивающих) электронных микроскопов, в которых тонкопленочный объект просвечивается пучком ускоренных электронов с энергией 50–200 кэВ. Электроны, отклоненные атомами объекта на малые углы и прошедшие сквозь него с небольшими энергетическими потерями, попадают в систему магнитных линз, которые формируют на люминесцентном экране (и на фотопленке) светопольное изображение внутренней структуры. Трансмиссионная электронная микроскопия также может быть полезна в диагностике МА. С ее помощью становится доступным изучение соотношения кристалл—клетка и более мелких форм кристаллов, чего не позволяет световая микроскопия. Метод дает возможность визуализировать различные артефакты, например кремнийсодержащие частицы из стекла [51], которые могут вводить в заблуждение исследователя при ПМК. Гидроксиапатит алюминия может быть обнаружен на основании выявления кристаллов размером 75–250 А в диаметре и подтвержден электронно-зондовым анализом, при этом коэффициент Са:Р должен быть равен 1,6:1 [52]. Электронная микроскопия высокого разрешения была использована для описания морфологии отдельных мелких кристаллов [53]. При этом исследователи подчеркивают преимущества метода перед СЭМ

и рентгеновской дифракцией при исследовании мелких частиц и смеси различных кристаллов фосфатов кальция. Кроме того, этим методом было выявлено присутствие кристаллов основного фосфата кальция, ранее не обнаруживаемых при световой микроскопии. Так, Р. Negro и соавт. [54] при анализе 23 образцов синовиальной жидкости с помощью ПМК обнаружили различные виды кристаллов только в 11 образцах, вместе с тем трансмиссионная электронная микроскопия позволила идентифицировать микрокристаллы в оставшихся 12 образцах, что, несомненно, демонстрирует ее преимущества. Другим значительным преимуществом является возможность получения дифракционных картин (электронограмм), позволяющих судить о кристаллической структуре объектов и точно измерять параметры кристаллических решеток. Существенным недостатком метода является необходимость изготовления ультратонких срезов образцов тканей, что повышает и без того высокие стоимость метода и трудозатраты.

Таким образом, электронная микроскопия заняла существенные позиции в исследовательской практике многих областей знаний. Все больший интерес исследователей привлекает этот метод с точки зрения диагностики МА. Это обусловлено, во-первых, высокой точностью по сравнению со световой микроскопией. Во-вторых, методы электронной микроскопии дают возможность не только количественного, но и качественного анализа образцов тканей и синовиальной жидкости. Кроме того, обеспечиваются высокая скорость получения результатов, разрешающая способность в отношении мелких и сверхмелких форм кристаллов, которые невозможно идентифицировать при ПМК. Не менее важной является объективность в идентификации кристаллов за счет математического моделирования и отсутствия влияния мнения эксперта, что является главным недостатком световых методов микроскопии. Электронная микроскопия позволяет анализировать кристаллическую решетку вещества, что является основным способом идентификации его структуры. Несмотря на это высокая стоимость оборудования, расходных материалов и обучения специалистов, строгое и точное соблюдение условий эксперимента, высокие требования к безопасности затрудняют применение этого метода в широкой клинической практике. Вместе с тем электронная микроскопия имеет перспективные направления, которые также могут быть полезны в диагностике МА: сканирующая зондовая микроскопия, атомно-силовая микроскопия, химическая силовая микроскопия [55]. Сегодня нет достаточного количества данных, позволяющих судить о недостатках и достоинствах этих новых и, возможно, чрезвычайно перспективных методов исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Yeol I.B. An address on the therapeutics of the uric acid diathesis. *Br Med J* 1888; 1(1410):16–9.
2. Phelps P., Steele A.D., McCarty D.J. Jr. Compensated polarized light microscopy. Identification of crystals in synovial fluids from gout and pseudogout. *JAMA* 1968;203(7):508–12.
3. Zhang W., Doherty M., Bardin T. et al. European League Against Rheumatism recommendations for calcium pyrophosphate deposition. Part I: terminology and diagnosis. *Ann Rheum Dis* 2011;70:563–70.
4. Zhang W., Doherty M., Pascual E. et al. EULAR recommendations for calcium pyrophosphate deposition. Part II: Management. *Ann Rheum Dis* 2011;70:571–5.
5. McCarty D.J., Kohn N.N., Faures J.S. The significance of calcium phosphate crystals in the synovial fluid of arthritic patients: the «pseudogout syndrome». II. Identification of crystals. *Ann Intern Med* 1962;56:711–37.
6. Насонов Е.Л. Ревматология. Клинические рекомендации. М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008;99–110.
7. Барскова В.Г. Рекомендации Европейской антиревматической лиги по терминологии и диагностике болезни депони-

- рования кристаллов пирофосфата кальция: комментарии эксперта. *Совр ревматол* 2011;2:6–8.
8. Барскова В.Г. Перспективы улучшения диагностики и лечения микрокристаллических артритов (интервью). *Совр ревматол* 2011;1:86–8.
 9. McCarty D.J., Hollander J.L. Identification of urate crystals in gouty synovial fluid. *Ann Intern Med* 1961;54:452–60.
 10. Vernon Roberts B. Synovial fluid and its examination. In: Scott J.T., ed. *Copeman's textbook of the rheumatic diseases*. 6th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1986;251–77.
 11. Hearn P.R., Guillard-Cumming D.F., Russell G.G. Pathogenesis of chondrocalcinosis and pseudogout. Metabolism of inorganic pyrophosphate and production of calcium pyrophosphate dihydrate crystals. *Ann Rheum Dis* 1983;42:107–8.
 12. Schumacher H.R., Sieck M.S., Rothfuss C. et al. Reproducibility of synovial fluid analyses. A study among four laboratories. *Arthr Rheum* 1986;29:770–4.
 13. McGill N.W., York H. Reproducibility of synovial fluid examination for crystals. *Aust NZ J Med* 1991;34:710–3.
 14. Hasselbacher P. Variation in synovial fluid analysis by hospital laboratories. *Arthr Rheum* 1987;30:637–42.
 15. Pascual E., Jovani V. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:371–86.
 16. Yavorsky A., Hernandez-Santana A., McCarthy G. et al. Detection of calcium phosphate crystals in the joint fluid of patients with osteoarthritis – analytical approaches and challenges. *Analyst* 2008;133(3):302–18.
 17. Ivorra J., Rosas J., Pascual E. Most calcium pyrophosphate crystals appear as non-birefringent. *Ann Rheum Dis* 1999;58:582–4.
 18. McCarthy G.M. Crystal deposition diseases: out of sight, out of mind. *Curr Opin Rheumatol* 2005;17:312–3.
 19. Lumbrellas B., Pascual E., Frasquet J. et al. Analysis for crystals in synovial fluid: training of the analysts results in high consistency. *Ann Rheum Dis* 2005;64:612–5.
 20. Paul H., Reginato A.J., Schumacher R. Alizarin red S staining as a screening test to detect calcium compounds in synovial fluid. *Arthr Rheum* 1983;26:191–200.
 21. Eggemeijer F., Dijkmans B.A., Macfarlane J.D. et al. Alizarin red S staining of synovial fluid in inflammatory joint disorders. *Clin Exp Rheumatol* 1991;9:11–6.
 22. Huang J.W., Chen W.J., Liao S.K. et al. Osteoblastic differentiation of rabbit mesenchymal stem cells loaded in A carrier system of Pluronic F127 and Interpore. *Chang Gung Med J* 2006;29:363–72.
 23. Ortiz-Bravo E. The test of the synovial fluid in microcrystalline joint diseases. *Rev Prat* 1994;44:174–7.
 24. Shoji K. Alizarin red S staining of calcium compound crystals in synovial fluid. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1993;67:201–10.
 25. Lazcano O., Li C., Pierre R.V. et al. Clinical utility of the alizarin red S stain on permanent preparations to detect calcium-containing compounds in synovial fluid. *Am J Clin Pathol* 1993;99:90–6.
 26. Wheeler A.P., Graham B.S. Pseudogout presenting with low synovial fluid glucose: identification of crystals by gram stain. *Am J Med Sci* 1985;289(2):68–9.
 27. Petrocelli A., Wong A.L., Swezy L. Identification of pathologic synovial fluid crystals on Gram stains. *J Clin Rheumatol* 1998;4:103–5.
 28. Bills C.E., Eisenberg H., Pallante S.L. Complexes of organic acids with calcium phosphate: the von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* 1997;128(4):194–207.
 29. Kruttsay M. Methods for demonstration of some calcium compounds in histological sections. *Acta Histochem* 1963;15:189–91.
 30. Raustyte G., Caye-Thomasen P., Hermansson A. et al. Calcium deposition and expression of bone modelling markers in the tympanic membrane following acute otitis media. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2006;70:529–39.
 31. Bills C.E., Eisenberg H., Pallante S.L. Complexes of organic acids with calcium phosphate: the Von Kossa stain as a clue to the composition of bone mineral. *Johns Hopkins Med J* 1974;128:194–207.
 32. Asselman M., Verhulst A., de Broe M.E. et al. Calcium oxalate crystal adherence to hyaluronan-, osteopontin-, and CD44-expressing injured/regenerating tubular epithelial cells in rat kidneys. *J Am Soc Nephrol* 2003;14:3155–66.
 33. Bonewald F., Harris S.E., Rosser J. et al. Calcif. von Kossa staining alone is not sufficient to confirm that mineralization in vitro represents bone formation. *Tissue Int* 2003;72(5):537–47.
 34. Henry M.J., Burton L.G., Stanley M.W. et al. Application of a modified Diff-Quik stain to fine needle aspiration smears: rapid staining with improved cytologic detail. *Acta Cytol* 1987;31(6):954–5.
 35. Selvi E., Manganelli S., Catenaccio M. et al. Diff Quik staining method for detection and identification of monosodium urate and calcium pyrophosphate crystals in synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 2001;60:194–8.
 36. Huang Y.X. Effects of prolonged kanamycin administration on cochlear anatomy and auditory brainstem response thresholds in chickens. *Curr Appl Phys* 2005;5:553–6.
 37. Freudiger C.W., Min W., Saar B.G. et al. Label-free biomedical imaging with high sensitivity by stimulated Raman scattering microscopy. *Science* 2008;322(5909):1857–61.
 38. Zha Z.G., Yao C.C., Tu M. et al. Correlation of the size and shape of the solid particles in synovial fluid and knee joint disease. *Curr Appl Phys* 2007;7(S1):112–5.
 39. Gardner D.L., McGovern Salter D., Oates K. SEM microscopy. *Microsc Res Technol* 1997;37:245–70.
 40. Fuerst M., Bertrand J., Lammers L. et al. Calcification of articular cartilage in human osteoarthritis. *Arthr Rheum* 2009;60(9):694–703.
 41. Hayes A., Turner I.G., Powell K.A. et al. Osteoarthritis. *J Mater Sci Mater Med* 1992;3:75–8.
 42. Moradi-Bidhendi N., Turner I.G. Bidirectional regulation of osteoclast function by nitric oxide synthase isoforms. *J Mater Sci Mater Med* 1995;6:51–5.
 43. Doyle D.V., Dieppe P.A., Crocker P.R. et al. Mixed crystal deposition in an osteoarthritic joint. *J Pathol* 1977;123(1):1–4.
 44. Cunningham T., Uebelhart D., Very J.M. et al. Synovial fluid hydroxyapatite crystals: detection thresholds of two methods. *Ann Rheum Dis* 1989;48:829–31.
 45. Li-Yu J., Clayburne G.M., Sieck M.S. et al. Calcium apatite crystals in synovial fluid rice bodies. *Ann Rheum Dis* 2002;61:387–90.
 46. Ali S.Y. Apatite-type crystal deposition in arthritic cartilage. *Scan Electron Microsc* 1985;4:1555–66.
 47. Ali S.Y., Gray J.C., Wisby A. et al. Preparation of thin cryo-sections for electron probe analysis of calcifying cartilage. *J Microsc* 1977;111(1):65–76.
 48. Lee R.S., Kayser M.V., Ali S.Y. Calcium phosphate microcrystal deposition in the human intervertebral disc. *J Anat* 2006;208:13–9.
 49. Pascual E., Jovani V. Synovial fluid analysis. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 2005;19:371–86.
 50. Arsenault A.L., Hunziker E.B. Electron microscopic analysis of mineral deposits in the calcifying epiphyseal growth plate. *Calcif Tissue Int* 1988;42(2):119–26.
 51. Bardin T., Schumacher H.R., Lansaman J. et al. Transmission electron microscopic identification of silicon-containing particles in synovial fluid: potential confusion with calcium pyrophosphate dihydrate and apatite crystals. *Ann Rheum Dis* 1984;43:624–7.
 52. Bonavita J.A., Dalinka M.K., Schumacher H.R. Hydroxyapatite deposition disease. *Radiology* 1980;134:621–5.
 53. Suvorova E.I., Buffat P.A. Electron diffraction and high resolution transmission electron microscopy in the characterization of calcium phosphate precipitation from aqueous solutions under biomineralization conditions. *Eur Cells Mater* 2001;1:27–42.
 54. Nero P., Nogueira I., Vilar R. et al. Synovial fluid crystal identification by electron microscopy. *Acta Reumatol Port* 2006;31:75–81.
 55. Smith D.A., Connell S.D., Robinson C. et al. Analysis biological fluid by spectroscopy. *Anal Chim Acta* 2003;479:39–57.