

Олександр Ковальчук

Мікроскопія жовчі як метод діагностики літогенезу

ДВНЗ "Тернопільський державний медичний університет імені І. Я. Горбачевського"

Представлена методика мікроскопічного дослідження жовчі за методом поляризаційної флуоресценції. Розроблені нові підходи до системного аналізу даних мікроскопії жовчі і показників біохімічного аналізу, зокрема вмісту холестерину і жовчних кислот, з графічним відображенням клініко-лабораторної інформації.

Ключові слова: мікроскопічний аналіз жовчі, поляризаційна флуоресценція, рідкокристалічні властивості, біохімічний аналіз жовчі, холестерино-лейкоцитарні конгломерації.

Мікроскопічний аналіз жовчі як метод лабораторної діагностики в останні роки поповнився перспективними методичними підходами, що стали можливими внаслідок впровадження в біомедичну практику досягнень фундаментальних наук, зокрема фізики рідких кристалів. Анізотропним властивостям біологічних молекул, які, власне, і є виявом належності їх до рідких кристалів, стали підґрунтям розробки методу дослідження жовчі за методом поляризаційної флуоресценції [1]. З огляду на те, що рідкокристалічні властивості притаманні багатьом макромоле-

кулярним структурам організму, зокрема ліпідним мембранам клітин, гормонам, вітамінам, нуклеїновим кислотам, холестерину та ін., з'явилася можливість не тільки їх візуалізувати та визначити активність, але й з нових позицій підійти до розуміння біофізичної ролі цих структур у фізіологічних процесах та патогенезі захворювань [2–4]. Останнє тим більш важливо з врахуванням труднощів мікроскопічного дослідження біоматеріалів від хворих за традиційною методикою з використанням світлового лабораторного мікроскопа, які впливають із неоднорідності оптичних параметрів складових компонентів, наприклад, жовчі (жовчні кислоти, холестерин, лейкоцити та ін.), що вимагає застосування спеціальних лабораторних методів. А такі відомі показники холерекінетичної функції, як вміст жовчних кислот і холестерину в крові, та визначений на основі їх співвідношення інтегральний показник — холато-холестериновий індекс недостатньо повно відображають патологічні зміни гомеокінезу гепатобілярної системи. Виходячи з наведеного, аналіз методичних особливостей поляризаційної флуоресценції жовчі та оцінка клініко-діагностичної інформативності її як лабораторно-діагностичного методу й склали основну мету цієї роботи.

Матеріал і методи. Отриману для аналізу (1-2 мл) нативну жовч аналізують методом поляризаційної флуоресценції відразу або протягом 30 діб, оскільки зберігання при 4 °С не супроводжується змінами її фізико-хімічних властивостей. Мікропрепарат готують на предметному склі, для чого товсту краплю шарують на чисте знежирене предметне скло і відразу досліджують за методикою товстої краплі у поляризованому прохідному світлі. Підсихання на предметному склі не змінює структури компонентів жовчі, але цей методичний прийом не тільки забезпечує якісну фотореєстрацію мікропрепарату, але надає можливість спостерігати за динамікою процесу кристалізації, вплив на нього інших чинників відповідно до завдання дослідження. При дослідженні препарату жовчі після фокусування зображення в окулярі мікроскопа добиваються чіткості і яскравості картини поляризаційної флуоресценції повільним обертанням одного з поляризаційних світлофільтрів і регулюванням світлового потоку. При аналізі полярофлуорограми відмічають загальну кількість мікрооб'єктів, що флуоресціюють, їх похо-

дження. Звертають увагу на наявність конгломерацій і кількість клітин, що входять до їх структури, появу типових для кристалів плоских поверхонь і форм, їх загальну кількість і розміри.

У мікропрепараті відмічають характер лейкоцитарної реакції за кількістю лейкоцитів у полі зору, оцінюючи результат у балах від 1 до 4 включно за такою схемою: поодинокі ($n < 20$) клітини оцінюють в 1 бал, а в межах ($20 < n < 50$) — результат оцінюють у 2 бали. При значній кількості клітин, а саме ($50 < n < 100$), результат позначають 3 балами, а при виявленні деформованих клітин у мікропрепараті понад 100 цей показник оцінюють у 4 бали.

За аналогічним принципом оцінюють літогенний процес у жовчі за ступенем вираженості холестерино-лейкоцитарних конгломерацій (ХЛК): поодинокі кристалики, до складу яких входять до 5 лейкоцитарних ядер, оцінюють в 1 бал, до 10 кристалічних агломерацій з 5 — 10 клітинних ядер — у 2 бали, поширеність дрібних і середніх кристалів до 15 — 30 у полі зору позначають 3 балами, а великі, навіть поодинокі кристали, що складаються з великої кількості клітин, оцінюють у 4 бали. Картину поляризаційної флуоресценції жовчі в мікропрепараті спостерігають в окулярі мікроскопа і при потребі фотодокументують. Застосування цифрової фотокамери надає можливість комп'ютерної обробки отриманої візуальної інформації, формування необхідної бази даних.

З огляду на системний характер патологічних змін в гепатобілярній системі, аналіз останніх доцільно здійснювати з використанням інтегрального підходу до оцінки результатів лабораторного дослідження. Перспективним, на наш погляд, є комбіноване відтворення системності патологічних порушень за допомогою обчислення математичних співвідношень отриманих показників, пов'язаних між собою логікою патогенетичного процесу. Отримані результати мікроскопії і дані біохімічного дослідження жовчі, а саме вміст холестерину, жовчних кислот і холато-холестериновий індекс, заносять до робочої таблиці і будують пелюсткову діаграму. Показники вмісту холестерину і жовчних кислот для зручності (при зіставленні розмірності з іншими показниками) при графічному відображенні зменшують у 10 разів. Послідовність занесення даних у робочу таблицю підпорядковують алгоритму і програмі побудови діаг-

рами таким чином, щоб права частина пелюсткової діаграми відображала компоненти літогенного процесу, а саме кількість кристалів у жовчі і рівень холестерину, а ліва частина графіка – інформацію про кількісний характер запального компонента патологічного процесу, зокрема за показником лейкоцитарної реакції у полі зору мікропрепарату і концентрації жовчних кислот у жовчі.

Результати. За запропонованою методикою проведено дослідження жовчі 76 хворих на хронічний калькульозний холецистит, у яких під час міні-інвазивного оперативного втручання з жовчної протоки брали жовч на дослідження.

На рисунку 1 наведені типові полярофлуорограми жовчі, отримані під час обстеження хворих. Необхідні для проведення системного аналізу жовчі дані наведені у робочій таблиці 1.

Робоча таблиця 1

Дані біохімічного та мікроскопічного дослідження жовчі

№ за/п	Холестерин		Жовчні кислоти		Холато-холестериновий коефіцієнт	Ступінь ХЛК (в балах)	Лейкоцит. реакція (в балах)
	мг %	ммоль/л	мг %	ммоль/л			
		3*		4*	1*	2*	5*
1	572	14,89	2085	54,21	3,64	1	1
2	872	22,67	3150	81,90	3,61	2	2
3	174	4,52	747	19,42	4,29	3	3
4	946	24,59	3000	78,00	3,17	4	4

Примітка. * – помічені порядкові номери показників при побудові пелюсткової діаграми.

За наведеними в робочій таблиці 2 даними побудовані відповідні пелюсткові діаграми, які відображають співвідношення патогенетично значимих ланок при патології гепатобіліарної системи. За характером асиметрії діаграми, зокрема її правої і лівої сторін, роблять висновок про співвідношення у патологічному процесі компонентів запалення і літогенезу, про домінування або переважний характер послідовності зазначених механізмів у формуванні патологічного процесу в цілому.



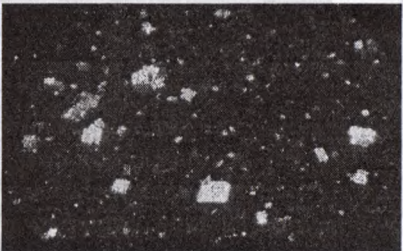
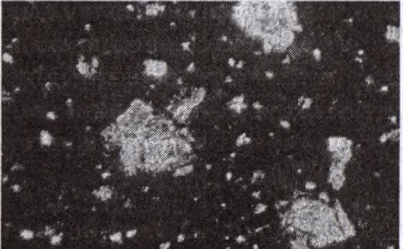
№ за/п	Ступінь ХЛК (в балах)	Лейкоцитарна реакція (в балах)	Поляризаційна флуоресценція жовчі
1	1	1 (+)	
2	2	2 (++)	
3	3	4 (++++)	
4	4	4 (++++)	

Рис. 1. Поляризаційна флуоресценція мікропрепаратів нативної жовчі та їх кількісна оцінка.

Робоча таблиця 2

Вихідні показники (за даними робочої таблиці 1)

1*	2*	3*	4*	5*	пелюсткова діаграма
3,64	1	$14,89 \cdot 10^{-1}$	$54,21 \cdot 10^{-1}$	1	
3,61	2	$22,67 \cdot 10^{-1}$	$81,90 \cdot 10^{-1}$	2	
4,29	3	$4,52 \cdot 10^{-1}$	$19,42 \cdot 10^{-1}$	3	
3,17	4	$24,59 \cdot 10^{-1}$	$78,00 \cdot 10^{-1}$	4	

Таким чином, завдяки впровадженню в клініко-лабораторну практику високоточної методики мікроскопії, що базується на реалізації принципу подвійного заломлення світлових променів при проходженні їх через анізотропні молекули біосубстрату, інформативність діагностичного дослідження жовчі суттєво підвищилася. У мазку нативної жовчі при цьому виявляються окремі клітини, головним чином лейкоцити, характеризуючи рівень вираженості локальних запальних компонентів патологічного процесу, а також кристалів, що стали наслідком взаємодії лейкоцитів та інших клітин з холестерином і жовчними кислотами. Це тим більш важливо для діагностичного дослідження, що рідкокристалічна природа компонентів, що висвічують у полі зору поляризаційного мікроскопа, дають можливість з принципово нових позицій оцінювати патогенез хвороби, а також здійснювати технологічний контроль ефективності лікування.

Висновки: 1. Застосування поляризаційної флуоресцентної мікроскопії жовчі забезпечує високоінформативну клініко-лабораторну діагностику захворювань гепатобіліарної системи на клітинно-молекулярному рівні шляхом візуалізації фізико-хімічного процесу формування холестеринно-лейкоцитарних конгломератів як структур з анізотропними — рідкокристалічними властивостями.

2. Математична обробка результату взаємодії клітинних і гуморальних компонентів жовчі, зокрема холестерину і лейкоцитів за даними полярофлуорографічного мікроскопічного аналізу, з наступним обчисленням і графічним відтворенням інтегральних діагностичних індексів об'єктивно відображає системний характер патологічних порушень в печінці і жовчному міхурі.

Література

1. Козловская Л. В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования / Л. В. Козловская, А. Ю. Николаев; под ред. акад. Е. М. Тареева. — М.: Медицина, 1984. — С. 227 — 231.
2. Жевандров Н. Д. Поляризация света / Н. Д. Жевандров. — М.: Наука, 1969. — С. 125 — 140.
3. Шаповальянц С. Г. Поляризационная микроскопия желчи в диагностике микрохоледохолитиаза / Шаповальянц С. Г., Цкаев А. Ю.,

- Иванова Т. В. // Хирургия. Журнал им. Н. И. Пирогова. — 1999. — № 5. — С. 34 — 39.
4. Kitamura N. Serial quantitative image analysis and confocal microscopy of hepatic uptake, intracellular distribution and biliary secretion of a fluorescent bile acid analog in rat hepatocyte doublets / N. Kitamura, Z. Gatmaitan, I. M. Arias // *Hepatology*. — 1990. — Vol. 12(6). — P. 1358 — 1364.

MICROSCOPY OF BILE AS A METHOD OF DIAGNOSTICS

O. Kovalchuk

SHEI "Ternopil State Medical University by I. Ya. Horbachevsky"

Summary. *The methodic of microscopic research of bile is presented by means of polarization fluorescence microscopy. New approaches are developed to the analysis of data of microscopy of the bile and indexes of biochemical analysis of the systems, in particular, to maintenance of cholesterol and biliuous acids, with the graphic representation of the clinical and laboratory information.*

Key words: *microscopic analysis of bile, polarization fluorescence, liquid-crystal properties, biochemical analysis of bile, cholesterol-leucocytic conglomerations.*