

КРИСТАЛООПТИЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ СТРУКТУРИ ЖОВЧІ

Курик М.В., Сіксай Л.Т., Бандурин О.Ю.

Ужгородський національний університет, м.Ужгород; Інститут екології (ІФ НАН України), м.Київ

Ключові слова: жовч, структура кристалізації, кристалооптичний метод

Вступ. Дослідження біофізичних властивостей функцій гепатоцитів, що відбиваються на жовчі може мати діагностичне значення, завдяки біофізичному стані жовчі [1-10, 13]. У процесах якому можна характеризувати ступінь порушення нормальної життєдіяльності організму

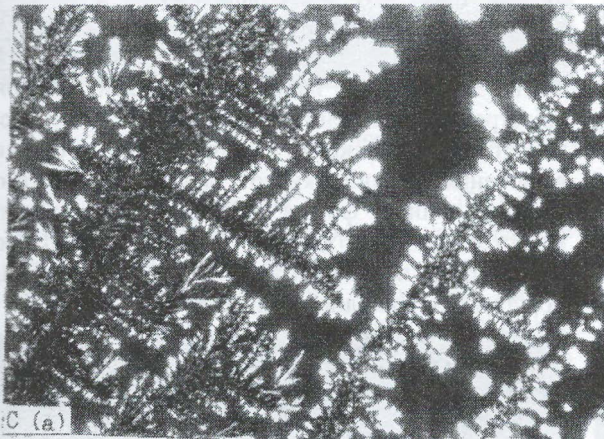
ріднокристалічні стани біологічних середовищ мають визначальне значення. При наявності патології печінки порушення структури веде до змін у міцелярності жовчі, її сольобілізуючих властивостей. Всі ці зміни, певно мають проявлятися у зміні структури жовчі в твердому стані при її кристалізації, що можна спостерігати, застосовуючи кристалооптичний метод [9]. Вивченню особливостей кристалізації печінкової та міхуревої жовчі і присвячено дану роботу.

Матеріали та методи. Для досліджень нами використано такий метод, при якому нативну жовч розташовували між двома скляними пластинками, після чого її інкубувано при температурі 37°C. Внаслідок порушення рівноважного стану жовчі при наявності патологій самовільно відбувається її кристалізація з утворенням моно- та полікристалів. Жовч у твердому (кристалічному) стані досліджували за допомогою поляризаційної мікроскопії. Вимірювання проведені на поляризаційному мікроскопі типу NU-2E (Carl-Zeiss). Спектри поглинання нативної жовчі вимірювались за допомогою двопробного спектрометра 356 (Hitachi). При дослідженні спектрів люмінесценції жовчі використано оптичну схему, описану в [11]. Вимірювання проведені за допомогою фотоелектричної спектральної установки, побудованої на базі монохроматора SPM-2 (Carl-Zeiss). Некристалічну жовч наливали у спеціальні кварцові кювети, товщина досліджуваного шару в яких складала 150 мкм. Всі вимірювання виконані при кімнатній температурі.

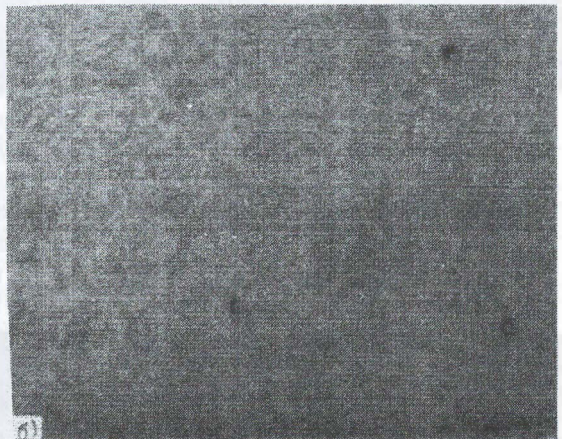
Результати досліджень та їх обговорення. У ході досліджень печінкової жовчі 17 практично

здорових людей контрольної групи виявлено, що жовч є однорідним міцелярним розчином, процес кристалізації якого проходить за дендритним механізмом з впорядкованим розташуванням міцел з утворенням структури твердої фази за типом “папороті”. Процес такої кристалізації обмежений ступенем дифузії міцел і залежить від в’язкості жовчі. Печінкова жовч здорової людини при звичайній мікроскопії являє собою добре виражену, однорідну, насичену, впорядковану фрактальну структуру, яку можна характеризувати як лист “папороті” (рис. 1а). В поляризованому світлі елементи структури “папороті” мають оптичну активність (вони оптично анізотропні), що виявляється у випромінюючій структурі жовчі, що видно з наведеного рисунка. По краях гілок “папороті” та препарату спостерігалась невелика кількість анізотропних включень, що може бути результатом кристалізації жовчних кислот. Тому таку кристалічну структуру печінкової жовчі відносять до першого (I) типу кристалізації жовчі.

Для міхуревої жовчі здорових людей внаслідок зміни концентрації води та електролітів через секретії додатково в жовчному міхурі впорядковане розташування міцел порушується. Структура кристалізації жовчі при звичайній мікроскопії набувала склоподібного вигляду (рис. 1б). У поляризованому світлі міхурова жовч ізотропна, але іноді спостерігалась невелика кількість маленьких, неправильної форми анізотропних включень, більш виражених по периферії препарату. Таку кристалічну структуру міхуревої жовчі також відносять до I типу.



а)



б)

Рис. 1. Кристалооптична структура жовчі (КОСЖ) контрольної групи: а) – С; б) – В. Збільшення x 1200

При наявності процесу запалення в жовчовидільній системі порушується міцелярна рівновага жовчі, що, на нашу думку, приводить до змін у морфології кристалічної структури та її здатності до двопробного заломлення. Кристалізація в такому випадку відбувається з рідинно-кристалічної фази, наявність якої є критерієм патологічного стану [2]. Нами проведені дослідження зміни кристалізації жовчі у 79

хворих, з них: 53 хворих хронічним персистуючим гепатитом та 26 хворих цирозом печінки.

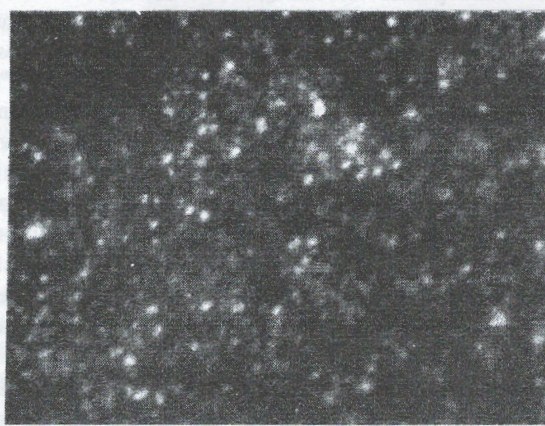
Для хворих хронічним персистуючим гепатитом виявлені зміни у структурі кристалізації печінкової жовчі (рис. 2а). Поряд з анізотропною “папороттю” у 22 хворих спостерігалась інша впорядкована структура у вигляді “листя листяниці” або “пальмового листа”, при якому окрім неоднорідної впорядкованості кристалічної

структури спостерігалось включення – анізотропні кристали сумарних ліпідів (кристалізація відбувалася за II типом печінкової жовчі). У 17 хворих виявлені поодинокі анізотропні кристали моногідрату холестерину або ефірів холестерину. У 5 хворих в печінковій жовчі виявлено кристалічну структуру III типу, характерну для випадків перенасичення жовчі холестерином та порушення колоїдальної рівноваги жовчі. Кристалічна структура печінкової жовчі була

порушена, втрачалась здатність “папороті” до двоприменезаломення. Якщо при звичайній світлооптичній мікроскопії відмічалась впорядкована структура “папороті”, то в поляризованому світлі спостерігалось слабе анізотропне декорування гілок папороті, аж до повного зникнення. Для 9 хворих структура кристалізації печінкової жовчі не відрізнялась від контрольної групи (I тип кристалізації).



а)



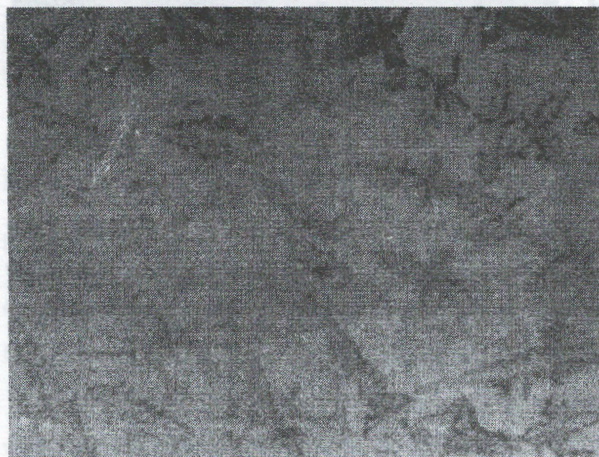
б)

Рис. 2. КОСЖ хворих хронічним персистуючим гепатитом: а) – С; б) – В. Збільшення x 1200

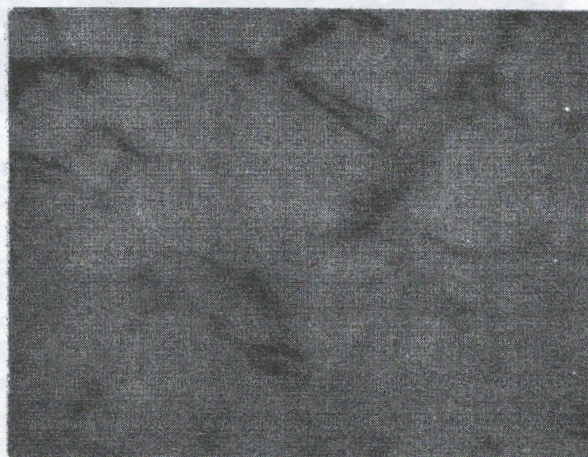
У міхуревій жовчі в 19 випадках характерною особливістю кристалізації була склоподібна структура з наявністю впорядкованих анізотропних включень, в основному, сумарних ліпідів, у вигляді великих чотирикутних кристалів (рис. 2б). У 16 випадках при кристалізації міхуревої жовчі спостерігалась невелика кількість дрібних анізотропних включень по периферії препарату (кристалізація за I типом). Для 14 хворих спостерігалась анізотропні шаруваті сфероліти – складні утворення білково-ліпідного комплексу. В одному випадку спостерігалась дрібні анізотропні включення у вигляді голок – кристали ефірів холестерину, що не спостерігалась у групі практично здорових людей (кристалізація міхуревої жовчі за II типом). У 3 випадках знайдені анізотропні чотири кутові пластинки моногідрату холестерину, більш виражені по периферії препарату (кристалізація жовчі за III

типом).

Для 17 із 26 хворих цирозом печінки в печінковій жовчі спостерігалась значна зміна оптичної активності папороті (рис. 3а). Для обстежених хворих кристалізація печінкової жовчі відбувалася за IV типом. Внаслідок порушення міцелярної рівноваги, структура папороті при звичайній мікроскопії була виражена слабо, дрібна, дуже часто зі спотвореною структурою. В поляризованому світлі папороть була повністю ізотропною (втрачалася структура папороті). На фоні ізотропної папороті знайдені дрібні анізотропні включення у вигляді гілок (ефіри холестерину); яскраві, неправильної форми, включення жовчних кислот; дрібні, прямокутної або ромбічної форми кристали моногідрату холестерину. У 9 хворих спостерігався III тип кристалізації печінкової жовчі, з менш вираженим порушенням колоїдної рівноваги.



а)



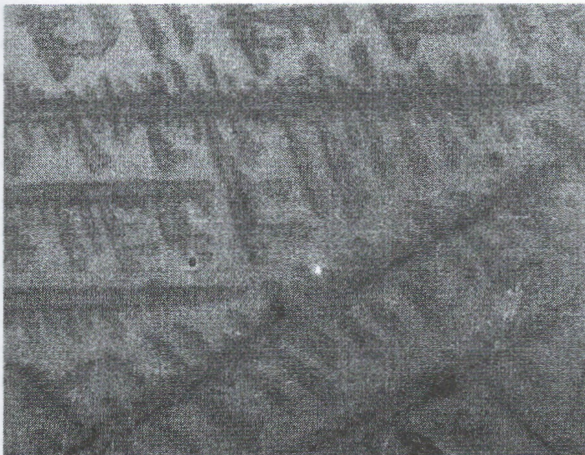
б)

Рис. 3. КОСЖ хворих цирозом печінки: а) – С; б) – В. Збільшення x 1200

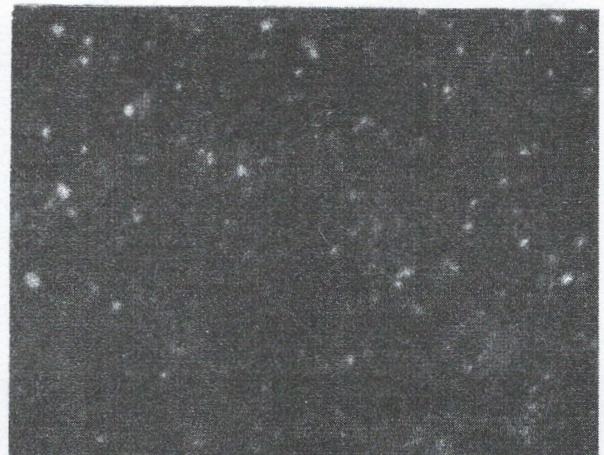
Для хворих цирозом печінки в міхуревій жовчі знайдені (в різній кількості) поодинокі, або у вигляді конгломератів, анізотропні кристали та рідкокристалева фаза, яку вважають провісником виникнення каменів (рис. 36). Особливо багато кристалів моногідрату холестерину спостерігалось на периферії препарату, часто утворюються дивні конгломерати у вигляді "намиста". Така картина кристалізації жовчі спостерігалась у 11 хворих. В 7 випадках хворих цирозом печінки в міхуревій жовчі виявлено наявність великих анізотропних конгломератів, що нагадують за своєю природою холестеринові везикули. Ці конгломерати із рідкокристалічних утворень при випаровуванні розчинника переходили в тверді кристали, зберігаючи при цьому свою форму. Їх виявлено тут невелику кількість – не більше десяти у полі зору. Це анізотропні кристали моногідрату холестерину (III тип кристалізації міхуревій жовчі). Для 5 хворих спостерігалась кристалізація за II типом, в препараті знайдено невелику кількість неупорядкованих анізотропних

чотирикутних кристалів, та дрібних, неправильної форми кристалів жовчних солей. У 3 хворих цирозом печінки була виявлена склоподібна структура з наявністю неупорядкованих анізотропних включень сумарних ліпідів, у вигляді чотирикутних кристалів (IV тип кристалізації міхуревій жовчі).

Для пацієнтів, що отримали невеликі дози іонізуючого випромінювання (14 пацієнтів без патології печінки), кристалооптична структура печінкової жовчі (рис. 4а) являє собою добре розвинуте папороття. Невеликі за розмірами сферолітні, оптично активні включення спостерігаються на краях препаратів. У поляризованому світлі елементи структури папороті мають оптичну активність (перший тип кристалізації печінкової жовчі). На відміну від печінкової, міхурева жовч (рис. 4б) в твердому стані не має структури, практично повністю ізотропна, не містить згаданих включень, що є оптично активними (I тип кристалізації міхуревій жовчі).



а)



б)

Рис.4. КОСЖ хворих хронічним алкоголізмом: а) – С; б) – В. Збільшення x 1200

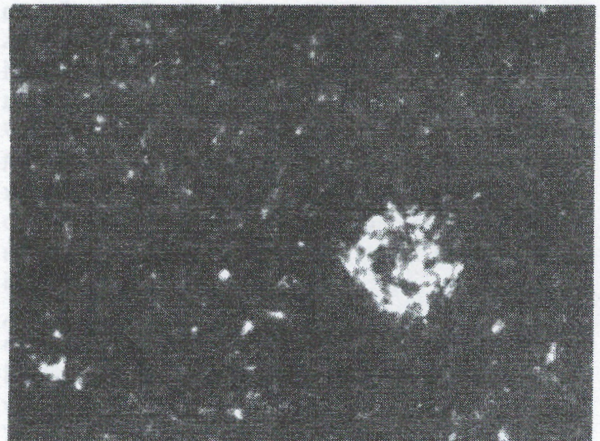
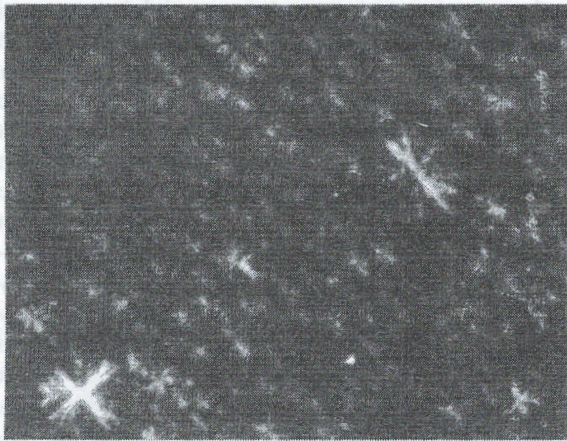
Для хворих на хронічний алкоголізм (27 чол.) в печінковій жовчі знайдено фрактальну структуру (феномен папороті) із незначно спотвореною структурою (рис. 5а). Крім того, у 6 хворих виявлені невеликі зони включень з оптичною активністю – монокристали незначних розмірів (кристалізація печінкової жовчі за II типом), у 3 хворих в печінковій жовчі спостерігалась структура кристалізації, що характерна для насиченої холестерином жовчі. Цей холестерин не утримувався в міцелі і в значній кількості кристалізувався у вигляді мікромонокристалів моногідрату холестерину (III тип кристалізації печінкової жовчі).

При дослідженнях міхуревій жовчі у 13 хворих на фоні склоподібної ізотропної структури виявлені включення, що являють собою окремі анізотропні монокристали (I тип кристалізації). У 6 хворих знайдені у різній кількості поодинокі конгломерати анізотропних кристалів моногідрату холестерину (II тип кристалізації міхуревій жовчі).

Для інших хворих жовч не мала структури, була повністю ізотропна а також не мала включень, які б мали оптичну активність (рис. 5б). Аналіз структури жовчі в твердому стані за допомогою поляризаційної мікроскопії однозначно свідчать про те, що жовч досліджених хворих містить в різних кількостях різноманітні кристалічні (мікромонокристали моногідратів холестерину) та рідкокристалічні включення). Зазвичай, в нормі, печінкова жовч являє собою фрактальну, оптично анізотропну структуру (структура типу папороті). Зменшення вмісту води приводить, мабуть, до переходу міцелярного розчину жовчі в проміжкову рідкокристалічну фазу. Для більшості хворих структура папороті зберігається, однак практично зникає оптична активність препарату. На цьому фоні спостерігається включення іншої фази, яка свідчить про неоднорідність структури жовчі, про порушення її міцелярності. У обстежених хворих також були виявлені суттєві зміни структури твердої фази жовчі: або спостерігалися слабкі

залишці структури типу папороті і на ньому вкраплення іншої фази, або, найчастіше, зникла оптична структура папороті та спостерігалися тільки кристалічні, або рідінокристалічні

вкраплення. Отримані результати свідчать про відхилення структури печінкової жовчі від міцелярності та, мабуть, її літогеності.



а)

б)

Рис.5. КОСЖ пацієнтів, що отримали малі дози іонізуючого випромінювання:
а) – С; б) – В. Збільшення x 1200

Отже, при наявності захворювань печінки та жовчних шляхів, в першу чергу порушується міцелярність жовчі, що відразу проявляється в змінах процесу кристалізації жовчі. В залежності від характеру патології виявлені різні порушення міцелярності та, відповідно, різні картини кристалізації, тобто, пересичення викристалізуються в компоненти у вигляді характерних мікроскопічних вкраплень. У більшості випадків це оптично анізотропні мікрочастинки. Крім пересичення жовчі її компонентами, порушення міцелярності принципово не дає впорядкованої структури в твердій фазі, структура папороті повністю зникає. Тобто, структура твердої фази печінкової відхиляється від впорядкованої, оптично анізотропної структури папороті, до ізотропної, повністю неупорядкованої структури.

Таким чином, дослідження структури кристалізації нативної жовчі є одним із принципів підходів до первинної діагностики при різних захворюваннях гепатобіліарної системи. За ступенем порушення кристалічної жовчі у твердій фазі можна тестувати стан міцелярності жовчі, ступінь її відхилення від норми. Дослідження рідінокристалічності жовчі є одним із важливих сучасних методів первинної діагностики різних патологічних станів. Кристалооптичний метод вивчення біологічних структур досить простий, доступний, достатньо інформативний, перспективний для первинного виявлення патології і в поєднанні з іншими методами його можна розглядати як один із важливих методів в сучасній практичній медицині.

Серед важливих фізичних характеристик жовчі, які дають інформацію про процеси міжмолекулярної взаємодії, нами також досліджені оптичні спектри поглинання та люмінесценції. Головною характеристикою структури жовчі, як було сказано вище, є її міцелярність, яка

визначається особливостями міжмолекулярної взаємодії основних компонент, що входять до складу жовчі. З метою з'ясування можливого визначення таких особливостей взаємодії в жовчі, ми провели дослідження спектрів поглинання та люмінесценції нативної жовчі і жовчі в твердому стані (ліофізованої при спеціальних умовах) у 23 хворих хронічним персистуючим гепатитом до і після стаціонарного лікування, та 17 пацієнтів контрольної групи практично здорових людей. Всі вимірювання спектрів поглинання та люмінесценції виконані при кімнатній температурі. Жовч для досліджень бралася таким чином: при звичайному зондуванні, з внутрішньовенним введенням холецистокініну (ХЦК); при лапаротомічній холецистектомії. Отримані результати вимірювань спектрів поглинання та люмінесценції наведені на рис. 6. В результаті проведених досліджень виявлено, що для спектрів поглинання і люмінесценції жовчі хворих на хронічний гепатит та жовчі пацієнтів контрольної групи характерним є отримання однакової кількості електронних смуг, а основна різниця в спектрах виявлялася лише у співвідношенні їх інтенсивностей.

У спектрах поглинання знайдені суттєві відмінності. Для пацієнтів контрольної групи виявлені дві смуги поглинання при $\lambda_1 = 405,0 \pm 4,7$ нм (оптична густина 1,46) і $\lambda_2 = 270,0 \pm 4,0$ нм (оптична густина 1,7). У спектрах хворих на хронічний гепатит інтенсивність смуг поглинання була майже втричі меншою $\lambda_1 = 410,0 \pm 4,8$ нм (оптична густина 0,46) і $\lambda_2 = 270,0 \pm 5,0$ нм (оптична густина 0,51). Крім того, для цієї групи хворих спостерігалась додаткова смуга поглинання $\lambda_3 = 470,0 \pm 4,1$ нм, щоправда з менш вираженим розділенням. Область спектру поглинання жовчі 380 –

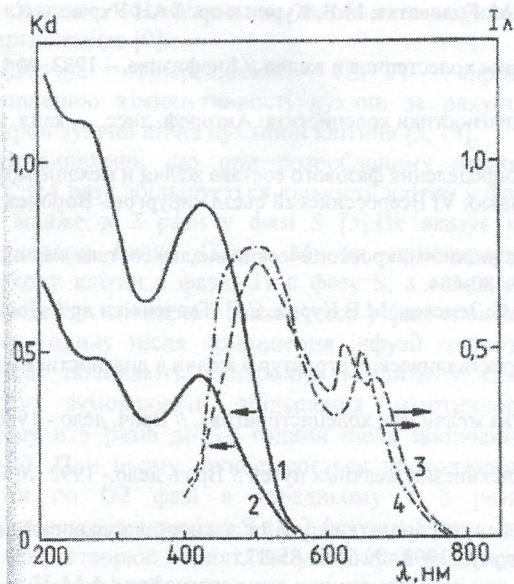


Рис. 6. Спектри поглинання (1,2) та люмінесценції жовчі в нормі (1,3) і для хворих хронічним персистоючим гепатитом (2,4)

500 нм, де зазвичай спостерігаються дві смуги поглинання $410,0 \pm 4,4$ нм і $460,0 \pm 4,8$ нм, наявність яких свідчить про вміст прямого (короткохвильова) та непрямого (довгохвильова) білірубину. Що стосується смуги поглинання в спектральній області $220,0 \pm 4,1$ нм, то її поява пов'язана із поглинанням світла ліпопротеїдними комплексами жовчі, в які входять основні ліпідні компоненти жовчі (холестерин, жовчні кислоти, фосфоліпіди). Мабуть, діагностичне значення має співвідношення інтенсивності поглинання у максимумах смуг в спектрах, тому що зміни суттєво проявляються саме по цьому параметру спектрів поглинання.

Спектри люмінесценції жовчі досліджених хворих та практично здорових людей також мали відмінності. У контрольній групі в спектрах люмінесценції спостерігаються три смуги, що роблять різний внесок в інтенсивність люмінесценції: широка інтенсивна смуга з максимумом при $\lambda = 510,0 \pm 4,9$ нм та дві смуги різної інтенсивності при $\lambda = 625,0 \pm 5,0$ нм та $\lambda = 675,0 \pm 5,0$ нм.

На відміну від цього спектру у хворих на хронічний гепатит у спектрі люмінесценції жовчі замість однієї смуги при $\lambda = 510,0 \pm 4,9$ нм спостерігаються дві смуги: при $\lambda = 460,0 \pm 4,3$ нм і $\lambda = 510,0 \pm 4,7$ нм (рис. 7). Що стосується довгохвильового діапазону спектру люмінесценції, то для хворих на хронічний гепатит спостерігалась одна полоса випромінювання з максимумом поблизу $\lambda = 660,0 \pm 5,0$ нм.

Мабуть, положення цієї смуги та її інтенсивність залежать від ступеня тяжкості

захворювання. В процесі лікування відбувалась зміна її положення та інтенсивності випромінювання. Слід відмітити, що зміщення самої довгохвильової смуги люмінесценції у короткохвильову область спектру (в середньому на 20-30 нм) спостерігалось майже завжди після курсу лікування, іноді незалежно від положення на шкалі довжин хвиль основної смуги люмінесценції. В результаті лікування спектр люмінесценції жовчі змінюється таким чином, що, одночасно з короткохвильовим зміщенням довгохвильової смуги, відбувається зміщення основної смуги люмінесценції в область більших довжин хвиль. Мабуть, такі зміни в спектрах люмінесценції жовчі після проведеного лікування свідчать про зміну структури ліпопротеїдного комплексу, з яким і пов'язані наявні особливості у спектрах.

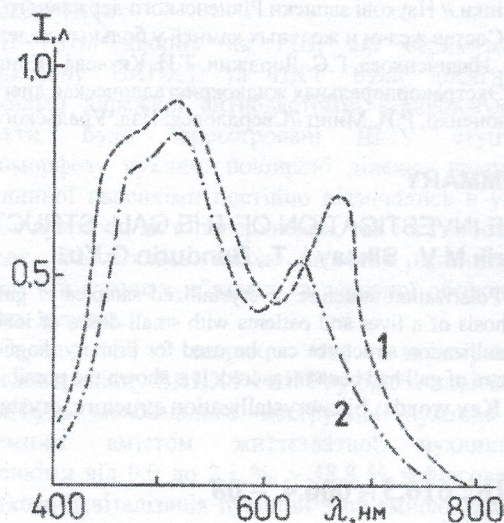


Рис. 7. Спектри люмінесценції жовчі до (1) і після (2) проведеного лікування хворих на хронічний персистоючий гепатит

Висновок. Отримані дані дозволяють зробити висновок, що існує певний зв'язок між патологією печінки і характером порушень у жовчі, що можна спостерігати в оптичних спектрах поглинання та люмінесценції жовчі. Тому, на нашу думку, є перспективним використання знайдених нами особливостей спектральних характеристик жовчі (а саме: зміна співвідношень інтенсивностей у смугах поглинання та випромінювання, зміщення максимумів на шкалі довжин хвиль) для діагностики захворювань печінки на різних стадіях захворювань в зв'язку з високою чутливістю та простотою виконання. Безперечно, аналізи жовчі пацієнтів традиційними методами досліджень мають бути доповнені її спектральними характеристиками.

ЛІТЕРАТУРА

1. Ганиткевич Я.В., Карбач Я.И. Исследования желчи. Биохимические и биофизические методы. -К.: Вища школа 1985.- 256 с.

2. Жидкие кристаллы в морской медицине /А.К. Асмолов, Н.М. Головатая, М.В. Курик и др. // АН Украины К.: Наукова думка 1992.- 96 с.
3. Занецкий Е.В., Кононенко О.В. Особенности кристаллизации холестерина в желчи // Биофизика. – 1983.-№4.- С.701-703.
4. Занецкий Е.В. Поляризационная микроскопия как метод диагностики холецистита: Автореф. дисс. ... канд. мед. наук Свердловск 1986.-23 с.
5. Лисиенко В.И., Занецкий Е.В. Диагностическое значение определения фазового состава желчи и механизмов кристаллизации холестерина у больных желчекаменной болезнью: VI Всероссийский съезд хирургов.- Воронеж.- 1983.- С.297-298.
6. Лисиенко В.И., Занецкий Е.В., Кононенко О.В. // Поляризационно-микроскопический анализ состава желчи при холециститах: 3-й Всес. съезд гастроэнтерологов.- М.-1984.-С.480-484.
7. Оптические свойства желчи и желче-каменной болезни /В.С. Земсков, М.В.Курик, С.И. Ткаченко и др.// Докл. АН УССР.-1990.-С.67-69.
8. Постолов П.М., Быков А.В., Мишина С.Г. Исследование кристаллических структур в желчи в диагностике желче-каменной болезни // Вестник хирургии.-1990.-№10.-С.22.
9. Прима А.В., Курик М.В., Полещук А.П. Некоторые свойства желчи при холецистопатиях. // Врач. дело.- 1986.- №9.-С.59-62.
10. Прима А.В. Значение кристаллографии для диагностики дискинезии желчных путей // Врач. дело.- 1992.-№6.- С.106-109.
11. Сіксай Л.Т., Бандурин О.Ю., Бандурин Ю.А. Фотолюмінесценція сироватки крові та діагностика захворювань печінки.// Наукові записки Рівненського державного педінституту.- 1998.- №6.- С. 85-87.
12. Состав желчи и желчных камней у больных холелитиазом при спектрометрии и дериватографии / А.М. Ногаллер, Р.А. Иванченкова, Г.С. Дорджин, Т.И. Китаева //Клин. медицина.- 1986.-№1.-С.17-24.
13. Экстракорпоральная жидкокристаллическая диагностика холецистита /В.М. Лисиенко, Е.В. Занецкий, О.В. Кононенко, Р.И. Минц //Свердловск: Изд. Уральского унив-та.- 1989.-104 с.

SUMMARY

THE INVESTIGATION OF THE GALL STRUCTURE BY CRYSTALLOPTICAL METHOD

Kurik M.V., Siksay L.T., Bandurin O.Yu.

Polarization structure of crystallized samples of gall of practically healthy people as well as of those ill with hepatitis, cirrhosis of a liver and patients with small doses of ionizing radiation are studied. The founded changes in gall's pictures of crystallization structures can be used for primary diagnostics of a liver pathologies. The absorbance and photoluminescence spectra of gall had been measured. It is shown the possibilities of using this dates as added during traditional liver diagnostic.

Key words: bile, crystallization structure, crystal-optical method