

## ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ КРИСТАЛЛООПТИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЖЕЛЧИ В РАННЕЙ ДИАГНОСТИКЕ ЖЕЛЧНОКАМЕННОЙ БОЛЕЗНИ

*Вахрушев Я.М., Хохлачева Н.А.*

ГОУ ВПО «Ижевская государственная медицинская академия»

*Вахрушев Яков Максимович*

*426011, Ижевск, ул. Удмуртская, д. 271*

*Тел.: 8 (3412) 42 2933, 8 (3412) 45 2006*

*E-mail:stoxel@yandex.ru*

### РЕЗЮМЕ

Целью исследования являлось изучение изменений морфологической картины желчи и возможности использования их в ранней диагностике ЖКБ. Проведено комплексное исследование биохимических и кристаллооптических свойств желчи у 207 пациентов с I стадией ЖКБ при различной давности заболевания. Выявленные кристаллооптические морфотипы имеют селективную морфологию в соответствии со степенью литогенности желчи, что позволяет определять давность заболевания и степень дестабилизации желчи для проведения своевременных адекватных профилактических мероприятий.

**Ключевые слова:** желчнокаменная болезнь; биохимические свойства желчи; кристаллооптические свойства желчи.

### SUMMARY

The aim of our investigation was to study the changes of bile morphology and possibilities of its using in early diagnostic stage of cholelithiasis. We spent the complex investigation of biochemical and crystal-optic qualities of bile in 207 patients with cholelithiasis stage I with different disease duration. The revealed crystal-optic morphotypes have selective morphology due to the bile lithogene level that allows to determine the disease duration and the bile instability to make in-time adequate prophylactic.

**Keywords:** gallstone disease; biochemical qualities of bile; crystal-optic qualities of bile.

**Ж**елчнокаменная болезнь (ЖКБ) развивается бессимптомно, что представляет большую трудность для ранней клинической диагностики и своевременного использования профилактических мероприятий [1–4].

В последние годы все большую роль в диагностике приобретает изучение фазового состава различных биосред организма, основанного на представлении об участии жидких кристаллов в патогенезе ряда заболеваний [5; 6]. По немногочисленным литературным данным, некоторые биологические жидкости, в частности желчь, способны кристаллизоваться при определенных условиях и образовывать узоры. Морфология этих узоров существенно изменяется в зависимости от характера патологического процесса, поэтому делаются попытки использовать их для диагностических целей [5; 6].

Целью исследования являлось изучение изменений морфологической картины желчи

и возможности использования их в ранней диагностике ЖКБ.

### МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В клинических условиях проведено целенаправленное и углубленное обследование 207 пациентов с I стадией ЖКБ (классификация А. А. Ильченко, 2001 [7]), развившейся на фоне гепатобилиарной патологии (функциональные нарушения желчевыводящих путей, хронический некалькулезный холецистит, жировой гепатоз, хронические гепатиты алиментарной этиологии). Возраст пациентов — от 22 до 63 лет, давность появления симптомов билиарной патологии по анамнестическим данным составила от 3 месяцев до 11 лет.

В верификации диагноза использованы результаты ультрасонографического исследования билиарной системы на аппарате S-ДН-500 и компьютерной

томографии на аппарате *Universal max* (США). Всем больным проводилось многофракционное дуоденальное зондирование с последующим макроскопическим, микроскопическим, морфометрическим и биохимическим исследованием желчи.

Для выявления признаков дестабилизации желчи в порциях «В» и «С» определялась суммарная концентрация желчных кислот — ЖК, холестерина — ХС [8] и фосфолипидов — ФЛ [9]. Проведено вычисление холато-холестеринового коэффициента (ХХК) и фосфолипидно-холестеринового коэффициента (ФЛХК), являющихся индексами литогенности желчи. Определение билирубина желчи проводилось модифицированным спектрофотометрическим методом Ендрассика — Грофа. Для исследования уровня кальция в желчи применен метод атомно-эмиссионной спектроскопии индуктивно-связанной плазмой (АЭС-ИСП) с использованием спектрометра *Spectroflame Modula D* (Германия).

Для изучения морфологической картины пузырной желчи использовался метод клиновидной дегидратации. Желчь порции «В» в объеме 3 мкл наносилась в виде капли на поверхность обезжиренного шлифованного кварцевого стекла, высушивалась в эксикаторе с влагопоглотителем, помещенным в суховоздушный шкаф при температуре 35 градусов Цельсия на протяжении 2–2,5 часа. Формирование структур происходило за счет испарения с краев препарата и в первую очередь появлялось в периферийных областях. Просмотр препаратов (кристаллография) производился методом простой поляризации в проходящем свете при помощи микроскопа *Leica DM 2500* (объектив  $\times 3,5$ ) с цифровой камерой *Leica DFC 420* и программного обеспечения *Leica applications*. Основные морфокинетические изменения в препарате начинаются в первые часы и происходят к концу первых суток [5], поэтому препарат исследовали через 3 часа и через 24 часа после его приготовления. При помощи программы *ImageJ* (free ware) определяли особенности микроструктуры желчи, изображения вводили в компьютер, анализировали и обрабатывали их с помощью оригинальной компьютерной программы «Видеогест».

Результаты лабораторно-инструментальных исследований сравнивались с данными контрольной группы, которую составили 70 практически здоровых лиц в возрасте от 20 до 60 лет.

Полученные результаты анализировали с помощью программ статистической обработки *Excel* и *Biostat*. Достоверность данных, представленных в виде средних величин ( $M$ ) с определением их ошибок ( $\pm m$ ), оценивали по критерию Стьюдента при нормальном распределении выборки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

У всех пациентов при ультразвуковом исследовании желчного пузыря обнаружены признаки билиарного сладжа (микролитиаз, замаскообразная

желчь). При макроскопическом исследовании их желчь была густая, неоднородная, при микроскопии в ней найдены кристаллы холестерина, микролиты, что является свидетельством I (начальной, или предкаменной) стадии ЖКБ.

Многочисленные исследования, проводимые на нашей кафедре, свидетельствуют о том, что I стадия ЖКБ сопровождается изменением химического состава желчи. Так, у обследуемых больных в порциях «В» и «С» желчи независимо от давности появления билиарных симптомов отмечены однонаправленные изменения (см. табл.). В обеих порциях желчи содержание ХС было значительно повышено, а содержание ЖК и ФЛ, являющихся стабилизаторами коллоидного состояния желчи, снижено. Важно отметить, что при увеличении давности появления билиарных симптомов нарастают признаки дестабилизации желчи, литогенность ее несколько увеличивается. Примечательно, что при I стадии ЖКБ концентрация билирубина и микроэлемента кальция в порции «В» желчи оказалась ниже, чем в контрольной группе, причем не наблюдалось зависимости от давности появления жалоб со стороны билиарной системы. Уровень билирубина у обследуемых больных составил  $867,87 \pm 3,86$  ммоль/л, при контрольных значениях —  $1003,12 \pm 3,64$  ммоль/л, уровень кальция составил  $0,0023 \pm 0,0002$  и  $0,04 \pm 0,00003$  м% соответственно.

Известно, что процесс формирования желчных камней происходит в три стадии: насыщение, кристаллизация и рост [10]. Наиболее важной является стадия перенасыщения желчи ХС, наступающая тогда, когда весь холестерин не может быть солюбилизирован везикулами. Везикулы, перенасыщенные ХС (фаза перенасыщенного мономера холестерина), образуют мультиламеллярные везикулы, которые являются неустойчивыми образованиями. Такие везикулы агрегируют, образуя жидкие кристаллы (липосомы). После этого происходит нуклеация кристаллов ХС, образуются твердые кристаллы (кристаллы моногидрата ХС), являющиеся центром кристаллизации [11]. Таким образом, нуклеация холестерина и обнаружение его в желчи в кристаллической форме свидетельствуют не только о наличии литогенных свойств желчи, но и о начальных этапах камнеобразования. Исходя из вышеизложенного, осаждение кристаллов моногидрата холестерина является ключевым звеном образования желчных камней [12]. Дальнейший рост кристалла ХС происходит в основном за счет ХС моноламеллярных везикул.

Кристаллография желчи — метод исследования, основанный на способности ряда кристаллообразующих веществ формировать различные структуры. Форма кристалла — это естественная система индикации химического состава биожидкости [13]. У лиц контрольной группы при морфометрическом

исследовании микроструктуры пузырной желчи обнаружено наличие широко разветвленных кристаллов (рис. 1 А), которые анализировались по признаку жидкокристаллических линий (ЖКЛ). Угол наклона ЖКЛ составлял  $98,97 \pm 2,92^\circ$ . Для желчи пациентов с I стадией ЖКБ характерно уменьшение угла наклона ЖКЛ в зависимости от увеличения давности появления билиарных симптомов (рис. 1 Б). Так, при давности до 5 лет у 31 пациента (23,1%) угол наклона ЖКЛ составил  $68,44 \pm 2,31^\circ$  (по отношению к контролю  $p < 0,01$ ), при давности более 5 лет у 16 пациентов (21,0%) —  $46,16 \pm 3,67^\circ$  (по отношению к контролю  $p < 0,01$ ). Разница угла наклона ЖКЛ между обеими группами была достоверна ( $p < 0,01$ ).

Помимо этого в начальной стадии ЖКБ появляются оптически активные включения, реагирующие на поляризованный свет: пластинчатые друзы, разветвленные дендриты с пластинчатыми ветвями, разветвленные платообразные агрегаты, радиально-лучистые сферолиты. Проведенные нами кристаллооптические исследования свидетельствуют о том,

что найденные кристаллооптические морфотипы имеют специфическую морфологию в соответствии со степенью литогенности желчи.

Для ранней стадии (рис. 2) дестабилизации коллоидной структуры желчи (давность появления билиарных симптомов до 5 лет) характерно появление кристаллов, обладающих низкой оптической активностью: наиболее типичны разветвленные платообразные агрегаты, так называемые кристаллы моногидрата холестерина (у 79 пациентов — 58,9%), несколько реже выявлялись разветвленные дендриты с пластинчатыми ветвями (у 58 пациентов — 43,2%).

Нарастание биохимических признаков нестабильности желчи (давность появления билиарных симптомов более 5 лет) приводило к формированию кристаллов, обладающих высокой оптической активностью: радиально-лучистые сферолиты и пластинчатые друзы, так называемые крупные сферолиты встречались примерно с одинаковой частотой

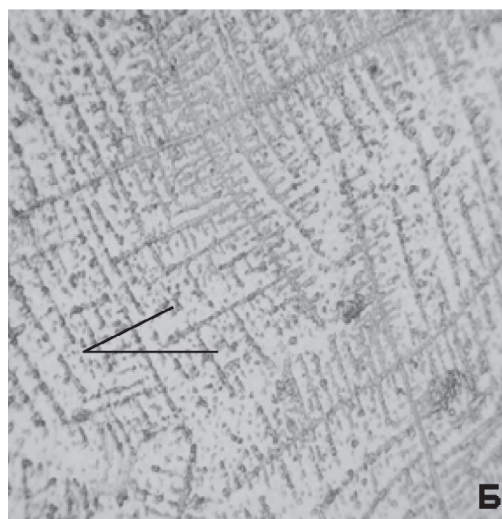
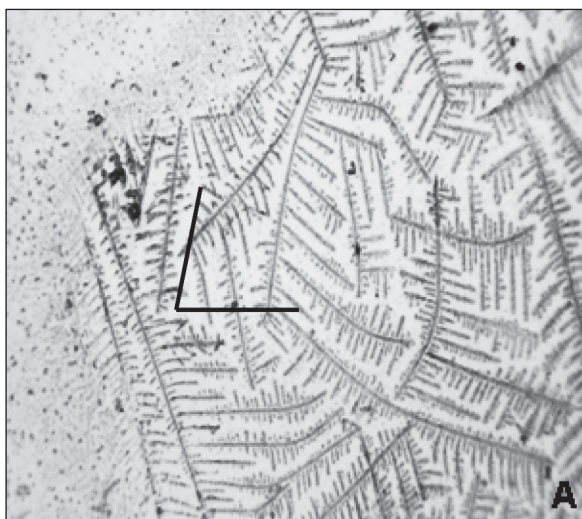


Рис. 1. Кристаллограммы желчи с широко разветвленными ветвящимися кристаллами: А — желчь здоровых лиц; Б — желчь пациентов с ЖКБ

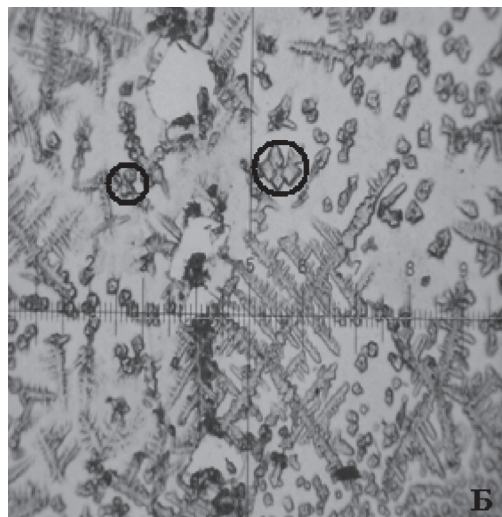


Рис. 2. Кристаллограммы желчи пациентов с I стадией ЖКБ при давности появления билиарных симптомов до 5 лет: А — разветвленные дендриты с пластинчатыми ветвями; Б — разветвленные платообразные агрегаты



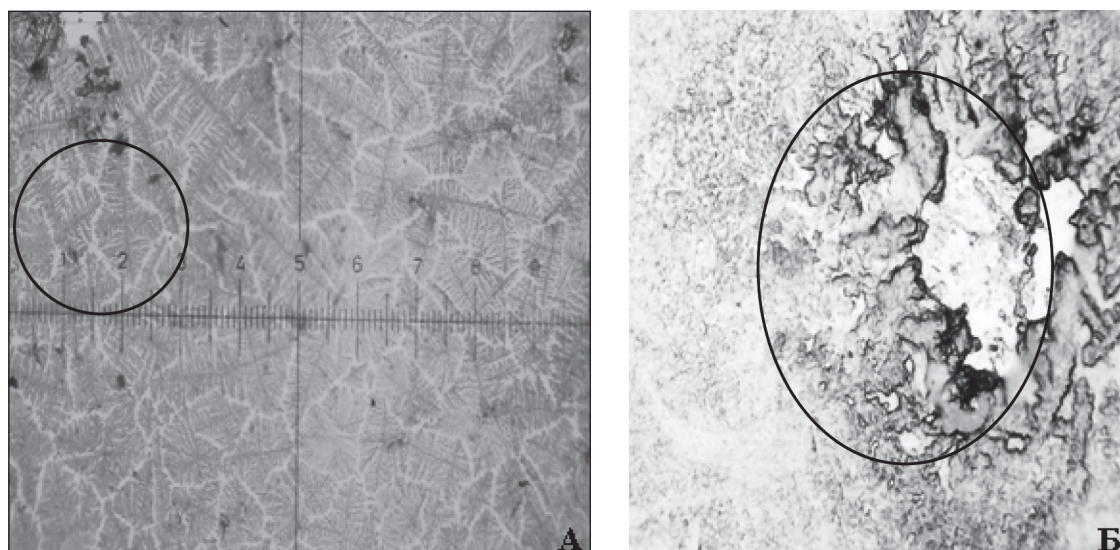


Рис. 3. Кристаллограммы желчи пациентов с I стадией ЖКБ при давности появления билиарных симптомов более 5 лет: А — радиально-лучистые сферолиты; Б — пластинчатые друзы

ПОКАЗАТЕЛИ ХИМИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ЖЕЛЧИ ПАЦИЕНТОВ С ЖКБ I СТАДИИ ПРИ РАЗЛИЧНОЙ ДАВНОСТИ ПОЯВЛЕНИЯ БИЛИАРНЫХ СИМПТОМОВ				
Показатели	Контрольная группа (n = 70)	Пациенты давностью билиарных симптомов до 5 лет (n = 134)	Пациенты давностью появления билиарных симптомов более 5 лет (n = 73)	p <sub>1</sub>
ХС (ммоль/л): порция «В» порция «С»	7,53 ± 2,14 3,45 ± 0,96	19,91 ± 4,64** 10,78 ± 2,18**	23,45 ± 2,31** 12,18 ± 1,34**	< 0,05 > 0,05
ЖК (ммоль/л): порция «В» порция «С»	53,52 ± 5,42 19,14 ± 2,76	49,14 ± 4,86* 17,37 ± 1,40*	45,46 ± 1,23* 15,34 ± 2,11*	< 0,05 < 0,05
ФЛ (ммоль/л): порция «В» порция «С»	3,12 ± 0,04 0,32 ± 0,002	1,14 ± 0,03** 0,19 ± 0,004*	0,95 ± 0,01** 0,14 ± 0,002**	> 0,05 > 0,05
ХХК (ед): порция «В» порция «С»	9,53 ± 1,16 6,37 ± 1,74	2,46 ± 0,62** 1,61 ± 0,46**	1,96 ± 0,45** 1,44 ± 0,23**	> 0,05 > 0,05
ФХК (ед): порция «В» порция «С»	0,41 ± 0,02 0,12 ± 0,001	0,04 ± 0,0002* 0,01 ± 0,0003*	0,02 ± 0,0001** 0,009 ± 0,0003**	> 0,05 > 0,05

Примечание: n — число наблюдений; \* —  $p < 0,05$  по сравнению с контролем; \*\* —  $p < 0,01$  по сравнению с контролем; p<sub>1</sub> — достоверность между группами пациентов с давностью билиарных симптомов до 5 лет и более 5 лет.

(у 29 пациентов — 38,1% и 31 пациента — 40,7% соответственно) (рис. 3).

Выявленные морфологические варианты строго специфичны для групп с короткой и длительной билиарной симптоматикой, об этом может свидетельствовать то, что, по данным нашего исследования, ни в одном проценте случаев не встречалось наличия одинаковых вариантов в обеих группах. Можно полагать, что выделенные оптически активные включения соответствуют промикролитам и микролитам, образующимся в I стадии ЖКБ. Вероятно, разветвленные платообразные агрегаты

и разветвленные дендриты с пластинчатыми ветвями являются переходными формами (промикролитами) и предшествуют образованию микролитов — микрокристаллов в виде радиально-лучистых сферолитов и пластинчатых друз [6]. Анализ особенностей морфологического состава желчи позволил выделить кристаллооптические маркеры в соответствии с давностью появления билиарных симптомов и признаков дестабилизации желчи. При увеличении литогенности желчи возрастает оптическая активность кристаллов. Результаты наших исследований согласуются с литературными

данными, свидетельствующими о том, что литогенная желчь — это желчь, склонная преципитировать холестерин с образованием жидкокристаллических структур с высокой оптической активностью [14].

Таким образом, поляризационная микроскопия, отражающая пространственные надмолекулярные структуры биосекрета [5], выявляет более глубокие изменения в структуре желчи в отличие от биохимического метода, определяющего только количественное содержание основных составляющих желчи.

## ВЫВОДЫ

1. Кристаллооптический способ исследования желчи является высокочувствительным, но в то же

время простым в исполнении методом и может быть широко использован в ранней диагностике ЖКБ.

2. Разветвленные дендриты с пластинчатыми ветвями и разветвленные платообразные агрегаты являются переходными формами и предшествуют образованию микролитов — микрокристаллов в виде пластинчатых друз или радиально-лучистых сферолитов.

3. Выявленная разница в частоте обнаружения ряда морфотипов позволяет определять давность появления симптомов билиарной патологии и степень дестабилизации желчи и обосновывает необходимость мероприятий, направленных на раннюю диагностику первичного холелитиаза для проведения своевременной адекватной профилактической терапии ЖКБ.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Ильченко А. А. Достижения, спорные и нерешенные вопросы билиарной патологии // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2008. — № 5. — С. 4–10.
2. Яковлева Л. М., Иванов Л. Н. Уровень и динамика желчных кислот у экспериментальных животных с холелитиазом // Новое в гастроэнтерологии / Под ред. Ф. И. Комарова, В. Т. Ивашкина. Т. 2. — М., 1996. — С. 58–159.
3. Akatsu T., Kameyama K., Kawachi S. et al. Gallbladder carcinoma with osteoclast-like giant cells // J. Gastroenterol. — 2006. — Vol. 41, № 1. — P. 83–87.
4. Hori T., Wagata T., Takemoto K. et al. Spontaneous necrosis of solid gallbladder adenocarcinoma accompanied with pancreaticobiliary maljunction // World J. Gastroenterol. — 2008. — Vol. 14, № 38. — P. 5933–5937.
5. Груздев М. П. Значение кристаллооптических свойств биосред в диагностике и оценке эффективности лечения заболеваний гепатопанкреатической зоны: Автореф. дис. ... докт. мед. наук. — Челябинск, 2000. — 29 с.
6. Савина Л. В., Кокуева О. В., Голованова Е. С., Кадыгорб Г. В. Кристаллооптические структуры желчи при хроническом бескаменном холецистите // Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2002. — № 5. — С. 59–62.
7. Ильченко А. А. Желчнокаменная болезнь. — М., 2004. — 196 с.
8. Мирошниченко В. П., Громашевская Л. Л., Касаткина М. Г., Козачек Г. А. Определение содержания желчных кислот и холестерина в желчи // Лаб. дело. — 1978. — № 3. — С. 149–153.
9. Attili A. F., Scafato E., Marchioli R. et al. Diet and gallstones in Italy: the cross-sectional MICOL results Hepatology // Hepatology. — 1988. — Vol. 27, № 6. — P. 1492–1498.
10. Иванченкова Р. А. Хронические заболевания желчевыводящих путей. — М.: Атмосфера, 2006. — 415 с.
11. Carey M. C., Cohen D. E. Biliary transport of cholesterol in vesicles, micelles and liquid crystals // Bile Acids and the Liver. — MTP Press, 1987. — P. 287–300.
12. Захарова И. Н., Пыков М. И., Коровина Н. А. и др. Проблемы диагностики дисфункциональных расстройств билиарного тракта у детей // Мед. совет. — 2009. — № 2. — С. 25–31.
13. Потехина Ю. П., Зубеев П. С., Страхов А. В. и др. Кристаллография и вискозиметрия при желчнокаменной болезни // Клин. лабор. диагностика. — 2001. — № 3. — С. 33–35.
14. Мараховский Ю. Х. Профилактика и ранняя диагностика желчнокаменной болезни // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. — 1997. — Т. 7, № 1. — С. 62–72.