

# Методи дослідження

УДК 616.998.1-073.756.5

*О.В. Покришко, М.І. Шкільна, В.В. Дем'яненко*

## ПОРІВНЯЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДІВ ДІАГНОСТИКИ ЛЯМБЛІОЗУ ЗА ДОПОМОГОЮ СВІТЛООПТИЧНОЇ МІКРОСКОПІЇ ТА ПОЛЯРИЗОВАНОЇ ФЛУОРЕСЦЕНЦІЇ

ДВНЗ «Тернопільський державний медичний університет імені І.Я. Горбачевського»

**Резюме.** З огляду на належність макромолекулярних структур одноклітинних паразитів *Lamblia intestinalis* (*Giardia intestinalis*) до оптично активних речовин із властивостями рідких кристалів, у статті на фактичному матеріалі наведені методичні і методологічні переваги діагностичного цитоломінесцентного паразито-

логічного аналізу на засадах принципу поляризованої флуоресценції.

**Ключові слова:** лямбліоз, дуоденальне зондування, люмінесцентна мікроскопія, поляризована флуоресценція, спектральний аналіз.

**Вступ.** Тенденція до поширення лямбліозу серед дітей і дорослих залишається актуальною медико-соціальною проблемою. За даними експертів ВООЗ, щорічно у світі лямбліозом заражаються 200 млн осіб. В Україні реєструють – 30-40 тис. випадків [1]. Не менш значущою проблемою залишається недостатня ефективність протипаразитарної терапії, недосконалість системи її оцінки. Саме це, з очевидністю, вимагає розроблення і впровадження не тільки нових високоточних та інформативних методів лабораторної діагностики лямбліозу, але й методик поглибленого вивчення особливостей біологічного циклу збудника *Lamblia intestinalis* (*Giardia intestinalis*). Перспективними в зазначеному аспекті все частіше виявляються методичні підходи, орієнтовані на дослідження живого, а не фіксованого паразита, зі збереженою можливістю його одноклітинного організму до біологічно детермінованих метаморфних перетворень із вегетативної до цистоподібної форм. Таким вимогам відповідає метод цитоломінесцентного аналізу, зокрема на засадах поляризованої флуоресценції. Фізична сутність поляризованої флуоресценції полягає в здатності ліпідів мембран, нуклеїнових кислот ядер клітин та інших макромолекулярних структур живих клітин як оптично активних речовин з рідкокристалічними властивостями індукувати еліптичну поляризацію світла. Це проявляється залежним від довжини хвилі явищем кругового дихроїзму [2-4]. Виходячи з вищевказаного, поляризована флуоресценція набуває особливого значення в клінічно-лабораторній практиці паразитологічних досліджень [5].

**Мета дослідження.** На фактичному матеріалі довести переваги методу поляризованої флуоресценції порівняно з традиційним мікроскопічним світлооптичним у дослідженні одноклітинних паразитів у пробах жовчі хворих на лямбліоз, за паразитоскопії біоматеріалу від хворого.

**Матеріал і методи.** Під спостереженням перебувало 35 осіб. Вік пацієнтів склав від 16 до

70 років. Чоловіків – 27 (31,1 %), жінок – 60 (68,9 %). Діагностику лямбліозу здійснювали за МКХ-10 згідно з діагностичною програмою “Протокол надання медичної допомоги хворим на лямбліоз”, затвердженого МОЗ України від 03.07.06 за № 434, яким і передбачено діагностичне дуоденальне зондування.

Дослідження жовчі проводили як за допомогою традиційної мікроскопії, так і за методом цитоломінесцентного аналізу з використанням люмінесцентного мікроскопа ЛЮАММ-8 3м на засадах принципу поляризованої флуоресценції з визначенням спектральних характеристик світіння вегетативних і цистних форм лямблій за допомогою фотометричної насадки ФМЕЛ-1.

**Результати дослідження та їх обговорення.** У жовчі методом світлооптичної мікроскопії лямблій виявлено у 80,0 % (28 осіб) усіх обстежених. Із них вегетативні форми лямблій (трофозоїти) виявлено в 46,4 % (13) хворих, зокрема, лише в порції А – у чотирьох пацієнтів, у порції С – у 5, у порціях А і С – у трьох, у всіх трьох порціях – в одного; цисти – у 55,5 % (15) обстежених осіб.

Дослідження жовчі методом поляризованої флуоресценції проведено в 31 хворого. Вегетативні форми лямблій виявлено в 90,3 % (28) обстежених пацієнтів ( $p > 0,05$ ) (рис. 1). У 19,4 % (6) пацієнтів поляризаційно-флуоресцентним методом виявлено цисти лямблій в окремих порціях жовчі додатково до результатів, отриманих із використанням традиційної світлооптичної мікроскопії. Крім того, у 9,7 % (3) обстежених осіб, результат паразитоскопії нативної жовчі, який був негативним, також виявлено лямблій.

Найхарактернішою відмінністю флуоресценції лямблій у поляризованому світлі є надвисокий рівень інтенсивності світіння клітинних ядер паразита. Так, наприклад, якщо інтенсивність світіння ядрових структур лейкоцитів (головним чином, це відповідає рівню біоенергетики клітинних ДНК і РНК) умовно прийняти за 100 %, то для аналогічних внутрішньоклітинних структур

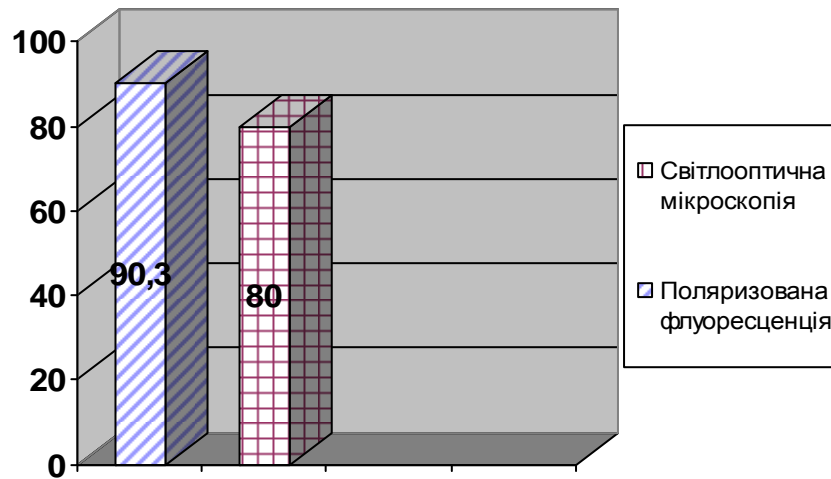
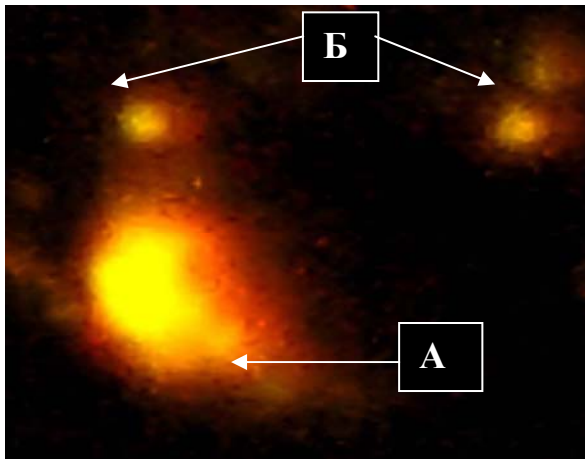


Рис. 1. Ефективність різних методів виявлення лямблій у дуоденальному вмісті (у %)

Рис. 2. Світіння вегетативних (А) і цистних (Б) форм лямблій у дуоденальному вмісті хворої В. О., 38 р. діагноз: хронічний алергічний контактний дерматит, супутній лямбліоз. Мікроскоп ЛЮМАМ Р 8. Ок  $\times 10$ , об  $\times 9$ 

лямблій цей показник є на порядок вищим. Саме цей факт набирає ознаки специфічності при паразитологічному дослідженні матеріалу на вміст лямблій: навіть при повному блокуванні поляризаційними фільтрами – поляризатором і аналізатором – проходження фотонів первинного світлового потоку, коли відбувається гасіння флуоресценції інших мікрооб'єктів, зокрема лейкоцитів, яскраве світіння клітин лямблій на будь-якому етапі життєвого циклу вирізняється особливо виразно (рис. 2).

Іншою характерною відмінністю цитоломінесцентного паразитологічного аналізу є залежність інтенсивності світіння лямблій у поляризованому світлі від місця знаходження паразита на момент діагностичного зондування (рис. 3). Так, найвищий рівень інтенсивності світіння притаманний лямбліям із порції А, взятий нами за 100 %, тоді як найнижчий встановлено в лямблій порції С – 71,6 $\pm$ 5,9 %. Проміжний рівень інтенсивності флуоресценції, а саме 82,7 $\pm$ 5,1 % мав місце при дослідженні жовчі порції В (p<0,05). Та-

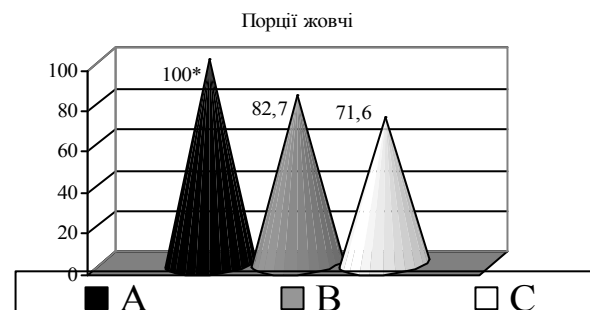


Рис. 3. Залежність інтенсивності флуоресценції лямблій від їх локалізації в порціях жовчі (А, В, С) хворих на лямбліоз

кий розподіл рівнів інтенсивності світіння лямблій відповідає рівням біоенергетики клітин паразитів із різних порцій жовчі й, очевидно, є відображенням адаптації клітин паразитів до несприятливих для них змін умов мікрооточення, зокрема компонентів жовчі хворих.

Таким чином, на відміну від традиційного світлооптичного мікроскопічного паразитологічного методу, обмеженого можливістю виявлення лише вегетативних форм та цист лямблій у порціях жовчі, отриманих під час діагностичного зондування, цитоломінесцентний метод дослідження живих паразитів характеризується винятковою чутливістю та інформативністю, оскільки виявляє рівень біоенергетичних процесів у клітинах паразитів на різних етапах і фазах паразитування в організмі людини і поза його межами. До того ж, особливості спектрального складу поляризованої флуоресценції клітини одноклітинного живого паразита відображають біоенергетику клітини залежно від місця дислокації, а отже, надають цінну інформацію про особливості перебування паразита в конкретний період часу з можливістю прогнозування подальшого перебігу паразитозу.

### Висновки

1. Завдяки діагностичним можливостям поляризованої флуоресценції в окремих порціях

жовчі додатково можна виявити лямблій, які не визначалися світлооптичною мікроскопією.

2. Розподіл паразитів із різних порцій жовчі за особливостями спектрального складу випромінювання їх флуоресценції в поляризованому світлі відображає зв'язок внутрішньоклітинної біоенергетики паразитів з умовами їх перебування в організмі хворого.

#### Література

1. Шкільна М.І. Гіардіаз (лямбліоз): особливості епідеміології збудника та паразитарної інвазії на сучасному етапі: матеріали науково-практичної конференції [„Актуальні проблеми екології мікроорганізмів”] / М.І.Шкільна. – Тернопіль, 2007. – С. 77-79.
2. Жевандров Н.Д. Поляризация света / Н.Д. Жевандров. – М.: Наука, 1969. – С. 125-140.
3. Уильямс З.В. Физическая химия для биологов / Пер. с англ. / З.В. Уильямс, Х. Уильямс. – М.: Мир, 1976. – С. 432-447.
4. Varma R. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface / R. Varma, S. Mayor // Nature. – 1998. – Vol. 394. – P. 798-801.
5. Шкільна М.І. Біофізичні засади клінічно-лабораторної інформативності поляризаційної флуоресценції лямблій / Розвиток наукових досліджень 2007: матеріали III Міжнародної науково-практичної конференції. 28-28 листопада 2007 / М.І. Шкільна, В.В. Дем'яненко. – Полтава: ІнтерГрафіка, 2007. – Т. 5. – С. 77-78.
6. Карнаухов В.Н. Люминесцентный спектральный анализ клетки / В.Н. Карнаухов. – М.: Наука, 1978. – 209 с.
7. Пат.29303 У. Спосіб діагностичного визначення лямблій / Андрейчин М.А., Шкільна М.І. – № u200709882; заявл. 03.09.2007; опубл. 10.01.2008. – Бюл. № 1.

### СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ ЛЯМБЛИОЗА ПРИ ПОМОЩИ СВЕТЛООПТИЧЕСКОЙ МИКРОСКОПИИ И ПОЛЯРИЗОВАННОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

*Е.В. Покрышко, М.И. Шкільна, В.В. Дем'яненко*

**Резюме.** Учитывая принадлежность макромолекулярных структур одноклеточных паразитов *Lamblia intestinalis* (*Giardia intestinalis*) к оптически активным веществам со свойствами жидких кристаллов, в статье на фактическом материале приведены методические и методологические преимущества диагностического цитолуминесцентного паразитологического анализа, основанного на принципе поляризованной флуоресценции.

**Ключевые слова:** лямблиоз, дуоденальное зондирование, люминесцентная микроскопия, поляризованная флуоресценция, спектральный анализ.

### A COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE METHODS OF DIAGNOSING GIRARDIASIS BY MEANS OF LIGHT OPTICAL MICROSCOPY AND POLARIZED FLUORESCENCE

*O.V. Pokryshko, M.I. Shkil'na, V.V. Demianenko*

**Abstract.** Taking into consideration the belonging of the macromolecular structures of unicellular parasites of *Lamblia intestinalis* (*Giardia intestinalis*) to the optically active matters with liquid crystal properties, some methodical and methodological advantages of the diagnostic luminescent parasitological analysis based on the principles of polarization fluorescence are presented in the paper based on the factual material.

**Key words:** girardiasis, duodenal sounding, luminescent microscopy, polarization fluorescence, spectrum analysis.

SHEE “I.Ya.Horbachevs'kyi State Medical University” (Ternopil’)

Рецензент – проф. С.Є. Дейнека

Buk. Med. Herald. – 2012. – Vol. 16, № 2 (62). – P. 198-200

Надійшла до редакції 10.01.2012 року