

UNIWERSYTET MEDYCZNY IM. KAROLA MARCINKOWSKIEGO
W POZNANIU
Wydział Lekarski II

mgr Waldemar Staroń

WYKORZYSTANIE DYSPERSJI
ROZMIARÓW MIKRO-OBIEKTÓW
ZAWIESZONYCH W PŁYNIU MÓZGOWO-RDZENIOWYM
DO JEGO OCENY

Rozprawa doktorska
Na stopień doktora nauk medycznych

Praca wykonana pod kierunkiem
Prof. dr hab. Leszka Kubisza

Badania przeprowadzono w
Instytucie Fizyki Uniwersytetu Szczecińskiego
przy współpracy z
Samodzielnym Publicznym Wojewódzkim Szpitalem Zespolonym w Szczecinie

Poznań 2014

Panu prof. dr hab. Leszkowi Kubiszowi

*Serdecznie dziękuję za opiekę naukową, pomoc
i ukierunkowanie pracy oraz życzliwość okazaną
w trakcie powstawania niniejszej rozprawy*

Panu dr hab. prof. US Henrykowi Gurgulowi

*Składam podziękowania za wskazanie kierunku badań
oraz cenne spostrzeżenia i uwagi, które przyczyniły się
do powstania tej pracy*

Panu dr Leszkowi Herbowskiemu

*bez którego, ta praca by nie powstała,
Dziękuję za okazaną pomoc i merytoryczne dyskusje*

Wszystkim pracownikom

*Katedry i Zakładu Biofizyki
Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu
Jestem wdzięczny za wszelkie rady, wskazówki i miłą
atmosferę w trakcie dyskusji i spotkań naukowych*

Koleżankom i kolegom

*z Zakładu Fizyki Morza i Środowiska
Uniwersytetu Szczecińskiego
Dziękuję za wsparcie i życzliwość*

SPIS TREŚCI

WSTĘP	5
1. PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY - OŚRODEK DYSPERSYJNY	11
- Klasyfikacja ośrodków dyspersyjnych	11
- Ruchy Browna	13
- Dyfuzja	14
- Koalescencja	15
- Flokulacja	16
- Koagulacja	17
2. PODSTAWOWE PARAMETRY CHARAKTERYZUJĄCE PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWY	19
- Barwa	19
- Mętność	20
- Stężenie chlorków	21
- Stężenie glukozy	21
- Stężenie białka całkowitego i immunoglobulin	22
- Cytoza	23
3. METODA MIKROSKOPOWA OKREŚLANIA CYTOZY	24
4. CEL PRACY	27
5. MATERIAŁ BADAWCZY	28
6. METODYKA BADAŃ	29
7. WYNIKI	40
8. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA	52
9. WNIOSKI	70
10. PIŚMIENNICTWO	71

WYKAZ RYCIN	78
WYKAZ TABEL	81
STRESZCZENIE	84
STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM	86
ZAŁĄCZNIKI	88

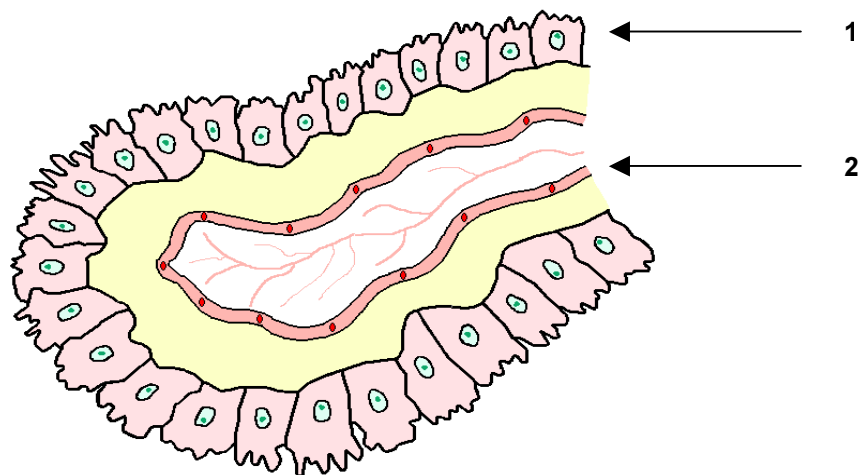
WSTĘP

Organizm człowieka składa się w większości z wody, która u kobiet stanowi około 52% masy ciała, a u mężczyzn około 63% masy ciała. Woda w organizmie występuje w postaci płynów ustrojowych. Płyny ustrojowe dzielą się na trzy grupy ze względu na przestrzeń, którą wypełniają. Pierwsza grupa to płyn przestrzeni wewnątrzkomórkowej, druga to płyny przestrzeni zewnątrzkomórkowej, do których między innymi możemy zaliczyć osocze krwi czy płyn tkankowy [1] oraz trzecia grupa związana z przestrzenią transkomórkową, do której zaliczamy płyn mózgowo-rdzeniowy (łac.:*liquor cerebrospinalis*; ang.:*cerebrospinal fluid*) [2].

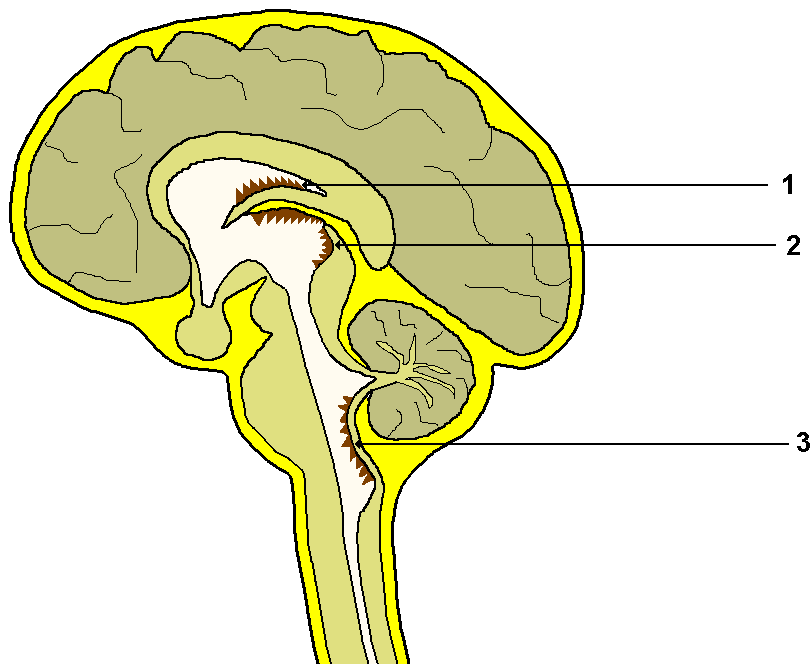
Pierwsze wzmianki dotyczące płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzą z XVIII wieku, kiedy to włoski lekarz Domenico Cotugno podczas sekcji zaobserwował płyn otaczający mózg i rdzeń kręgowy [3,4]. Odkrycie to zapoczątkowało badania nad płynem mózgowo-rdzeniowym. Przełomowy okazuje się wiek XIX, kiedy w roku 1827 francuski lekarz Francois Magendie potwierdza swoimi badaniami łączność między komorami mózgu, przestrzenią wokół mózgu i rdzenia kręgowego a przestrzenią podpajęczynówkową [5]. Kolejną ważną datą jest rok 1853, w którym Luschka stawia hipotezę, iż spłoty naczyniówkowe wytwarzają płyn mózgowo-rdzeniowy [6]. Rok 1876 przynosi informację, że płyn mózgowo-rdzeniowy wchłaniany jest do układu żylnego w ziarnistościach pajęczynówki [7]. Kolejne lata dostarczają nowych informacji na temat płynu mózgowo-rdzeniowego.

Ciągły postęp w dziedzinie nowych technologii umożliwia powstawanie doskonalszych narzędzi pomiarowych, za pomocą których badamy płyn mózgowo-rdzeniowy. W związku z powyższym, wiedza dotycząca płynu, jaką na przestrzeni wielu lat uzyskano w wyniku prowadzonych badań naukowych jest nieustannie weryfikowana lub uzupełniana o nowe fakty.

Płyn mózgowo-rdzeniowy powstaje w mózgu, w sposób ciągły. Dobowa produkcja u dorosłego człowieka szacowana jest na około 500-600ml [8-11]. Za produkcję płynu mózgowo-rdzeniowego odpowiadają głównie spłoty naczyniówkowe mózgu [12] (Ryc.1), które wytwarzają go z osocza krwi [13] oraz wyściółka układu komorowego [14]. Spłoty naczyniówkowe znajdują się w komorach mózgu (Ryc.2).



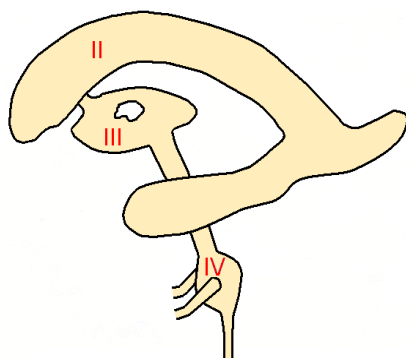
Ryc.1. Fragment splotu naczyniówkowego [15].
 1 - nabłonek złożony z komórek
 2 - drobne naczynia krwionośne



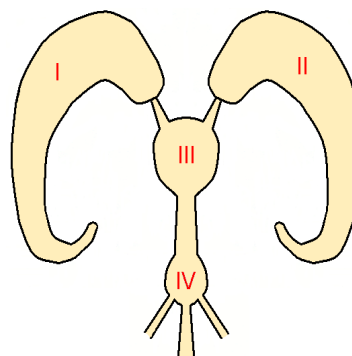
Ryc.2. Sploty naczyniówkowe komór mózgowych [15].
 1 - splot naczyniówkowy komory bocznej
 2 - splot naczyniówkowy komory trzeciej
 3 - splot naczyniówkowy komory czwartej

Komory mózgu są ze sobą połączone (Ryc.3). Płyn mózgowo-rdzeniowy wytwarzany przez sploty naczyniówkowe komór bocznych przepływa do komory trzeciej, dalej przez wodociąg mózgu dostaje się do komory czwartej. Z ostatniej komory płyn wypływa przez dwa boczne otwory Luschki i środkowy Magendiego. Po wypłynięciu z czwartej komory płyn rozptywa się, część płynie w kierunku kanału kręgowego, a część kieruje się do przestrzeni podpajęczynówkowej na podstawie mózgu [8,10].

Widok z boku – lewa strona.



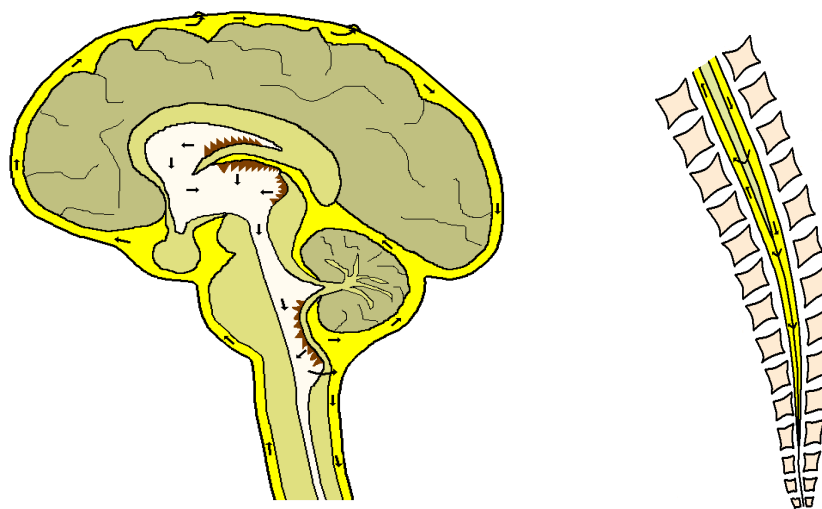
Widok z przodu.



Ryc.3. Połączenia komór mózgowych [15].

- I - pierwsza komora boczna mózgu,
- II - druga komora boczna mózgu,
- III - trzecia komora mózgu
- IV - czwarta komora mózgu

Przemieszczanie się płynu mózgowo-rdzeniowego jest procesem bardzo skomplikowanym, na który wpływ ma praca serca oraz proces oddychania [16]. W przypadku gdy serce kurczy się, krew płynie do przestrzeni podpajęczynówkowej i uciska mózgowie, w wyniku czego zmniejsza się objętość układu komorowego. Płyn jest wypychany z komór i płynie w dół rdzenia kręgowego. Gdy serce rozkurcza się, proces jest odwrotny. Uwzględniając ruch płynu w trakcie wydechu w kierunku głowy, a przy wdechu w stronę rdzenia [17], ustalenie jednego chwilowego kierunku przepływu jest bardzo trudne. Trzeba jeszcze uwzględnić wymuszony kierunek ruchu płynu w miejsca, gdzie jest wchłaniany do krwioobiegu – ziarnistości i kosmki pajęczynówki, wynikający z dobowej nadprodukcji płynu w stosunku do objętości przestrzeni, którą może zajmować (około 100-150ml) [8,9,11,16,18].



Ryc.4. Cyркуlacja płynu mózgowo-rdzeniowego wokół mózgu i rdzenia kręgowego [15].

Biorąc pod uwagę wyżej wymienione informacje stwierdzono, że płyn mózgowo-rdzeniowy po opuszczeniu komórek mózgowych opływa rdzeń kręgowy i mózg (Ryc.4), kierując się w większości do przestrzeni podpajęczynówkowej mózgu, gdzie jest wchłaniany do krwi.

Płyn mózgowo-rdzeniowy, ze względu na swoje umiejscowienie w organizmie człowieka, otaczając mózg i rdzeń kręgowy, w sposób naturalny pełni rolę amortyzatora, chroni mózg i rdzeń kręgowy przed urazami mechanicznymi [8].

Mózg jest „zawieszony” w cieczy, działa więc na niego siła wyporu - zgodnie z prawem Archimedesesa. W efekcie działania siły wyporu zmniejsza się ciężar mózgu, a płyn zachowuje się jak poduszka amortyzacyjna.

Płyn mózgowo-rdzeniowy pełni rolę kompensacyjną wobec ciśnienia wewnątrzczaszkowego. W przypadku, gdy wzrasta ciśnienie krwi wewnątrz czaszki, płyn mózgowo-rdzeniowy dzięki swojemu krążeniu, posiada możliwość cofnięcia się do kanału rdzenia kręgowego i w efekcie wyrównuje wzrost ciśnienia [14].

Płyn mózgowo-rdzeniowy nieustannie przemieszcza się wzdłuż rdzenia kręgowego oraz mózgu, a wraz z nim płyną składniki odżywcze do tkanek układu nerwowego. Tym samym płyn pełni rolę transportową [19].

Płyn odpowiedzialny jest również za usuwanie produktów przemiany metabolizmu mózgu, co wiąże się z transportowaniem tych produktów do krwioobiegu [8].

Przebieg procesów związanych z krążeniem oraz wchłanianiem płynu mózgowo-rdzeniowego zależy od właściwości płynu. W tabeli I zamieszczono wartości wybranych parametrów fizyko-chemicznych prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego.

Tabela I
Wartości wybranych parametrów charakteryzujących prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy

Parametr	Wartość parametru
Barwa	wodojasny [20]
Ciepło właściwe	4178 J/kgK [21]
Gęstość	1004 - 1007 kg/m ³ [22,23]
Konduktywność	1,79 S/m [24]
Lepkość	0,7-1,0 mPa·s [25]
Odczyn pH	7,33 – 7,35 [23]
Przewodność cieplna	0,623 W/mK [21]
Rezystywność	0,80 Ωm – dla 50 kHz [26]
Zapach	bezwonny [27]

Właściwości płynu zależą od jego budowy i składu. Płyn mózgowo-rdzeniowy zbudowany jest w 99% z wody, w której znajdują się między innymi jony chlorkowe (Cl⁻), magnezowe (Mg²⁺), potasowe (K⁺), sodowe (Na⁺) czy wapniowe (Ca²⁺) [28], odpowiadające za procesy elektrolityczne w płynie mózgowo-rdzeniowym.

Pozostała część płynu, to obiekty w nim zawieszony, do których zaliczymy głównie elementy komórkowe i białka [29-31].

Stwierdzono szczególną istotną zależność między właściwościami płynu mózgowo-rdzeniowego, a stanem chorobowym pacjenta w przypadku 6 parametrów charakteryzujących płyn. Zaliczono do nich: barwę/mętność, stężenie chlorków, stężenie białka całkowitego i immunoglobulin, stężenie glukozy oraz liczbę komórek występujących w płynie. Dla wymienionych parametrów ustalono normy (Tabela II), w oparciu, o które stwierdzamy czy płyn mózgowo-rdzeniowy jest prawidłowy czy patologiczny.

Tabela II
Wartości referencyjne podstawowych parametrów dla prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego

Parametr	Norma
Barwa/Mętność	wodjasny, przejrzysty [32]
Stężenie białka całkowitego i immunoglobulin	0,2 - 0,4 g/l [32]
Stężenie chlorków	110 - 129 mmol/l [33]
Stężenie glukozy	2,2 - 3,8 mmol/l [32]
Stężenie komórek	0 - 2 komórki/ μ l (najczęściej limfocyty) [32] 0 - 5 komórek/ μ l [33]

Stan chorobowy pacjenta wpływa na zmianę wartości parametrów wymienionych w tabeli II. Zależnie od rodzaju stanu chorobowego obserwuje się różne wartości parametrów. W tabeli III przedstawiono normatywne wartości parametrów płynu patologicznego, opisujące dwa wybrane, przykładowe stany chorobowe: ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych oraz wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych.

Tabela III
Wartości parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego w zależności od rozpoznania klinicznego [32]

Rozpoznanie	Wygląd	Białka g/l	Glukoza mmol/l	Elementy komórkowe liczba/ μ l
Płyn prawidłowy	Przejrzysty	0,2 - 0,4	2,2 - 3,8	0 - 2
Ropne zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Mętny	> 1	< 1	>1000 leukocyty wielojądrowe
Wirusowe zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych	Przejrzysty	< 0,8	2,5	0 - 100 limfocyty

Stwierdzono, że niektóre wartości parametrów w różnych stanach chorobowych są podobne, a nawet takie same, np. wygląd płynu patologicznego w przypadku wirusowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych jest taki sam jak płynu prawidłowego (Tabela III). Dlatego rozpoznanie stanu chorobowego opiera się na jednoczesnej analizie wartości wszystkich badanych parametrów.

Im więcej znamy parametrów opisujących płyn, tym dokładniejszy opis płynu można przedstawić, dlatego każdy nowy parametr przyczynia się w konsekwencji do dokładniejszego rozpoznania stanu chorobowego pacjenta.

Jednakże we wstępnej fazie diagnozowania stanu chorobowego pacjenta, w przypadku podstawowych badań diagnostycznych, zbyt duża ilość określanych i analizowanych parametrów, powoduje wydłużanie się czasu trwania przeprowadzanych badań oraz może prowadzić do tego, że wyniki badań stają się nieczytelne i utrudniają postawienie poprawnej diagnozy.

Opracowując nową metodę pomiarową lub ulepszając istniejącą np. przez określanie dodatkowych parametrów, powinniśmy mieć na uwadze dobro pacjenta oraz cechy charakteryzujące dobrą metodę - prostota, szybkość i skuteczność.

Jednym z parametrów używanych w diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego jest, określana metodą mikroskopową, liczba komórek w nim występujących [32]. Metoda ta wymaga odpowiedniego przygotowania preparatu, na które składa się między innymi barwienie wpływające na całkowity czas pomiaru.

W pracy przedstawiono metodę pomiarową umożliwiającą skrócenie czasu określenia liczby obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym oraz pozwalającą uzyskać dodatkowe informacje na temat ich parametrów geometrycznych, które to mają wpływ na właściwości płynu.

Płyn mózgowo-rdzeniowy, którego głównym składnikiem jest woda wraz z zawieszonymi w nim obiektami tworzy ośrodek dyspersyjny, którego właściwości zależą od parametrów obiektów.

1. PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY - OŚRODEK DISPERSYJNY

Układem dyspersyjnym nazywamy układ dwóch faz, w którym jedna jest fazą ciągłą (rozpraszającą) a druga fazą rozproszoną [34], np.: kosmetyki – tłuszcze w wodzie, lekarstwa – czynnik aktywny w obojętnym czy krew – leukocyty w osoczu.

W przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego fazę rozproszoną tworzą obiekty w nim zawieszone. Zaliczymy do nich głównie białka np. transferyna, hemopeksyna [30] czy albumina [35] oraz komórki, wśród których możemy wymienić komórki jednojądrzaste, wielojądrzaste czy nowotworowe [8]. Fazę ciągłą stanowi 99% wody, będącej składową płynu mózgowo-rdzeniowego.

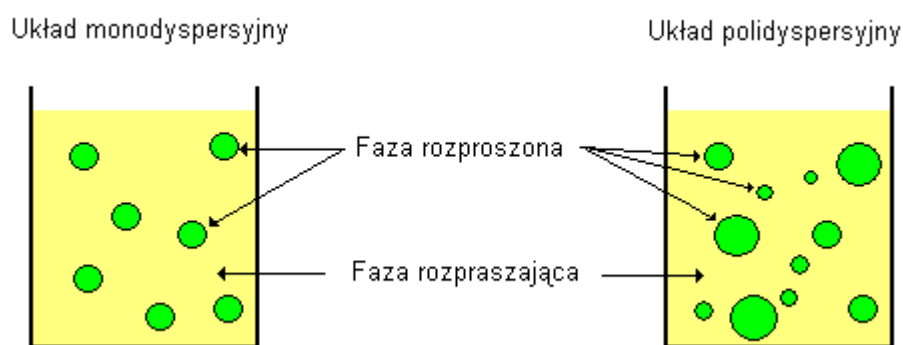
Układy dyspersyjne posiadają różne właściwości, które zależą od stopnia rozdrobnienia i jednorodności obiektów (wielkość, kształt) fazy rozproszonej oraz od samego stanu fazy rozproszonej i rozpraszającej. Różnorodność układów dyspersyjnych występujących w przyrodzie wymusiła stosowanie wielu rodzajów podziałów układów dyspersyjnych.

Klasyfikacja ośrodków dyspersyjnych

Układy dyspersyjne możemy podzielić, ze względu na jednorodność rozmiarów obiektów fazy rozproszonej na:

- monodispersyjne (jednorodne), obiekty rozproszone mają takie same rozmiary,
- polidispersyjne (niejednorodne), obiekty rozproszone mają różne rozmiary (Ryc.5)

Płyn mózgowo-rdzeniowy zaliczamy do grupy układów polidispersyjnych.



Ryc.5. Podział układów dyspersyjnych ze względu na jednorodność fazy rozproszonej [36].

Inny podział układów dyspersyjnych związany jest z rozmiarami obiektów fazy rozproszonej.

W tym przypadku układy dyspersyjne podzielono na trzy rodzaje układów: roztwory rzeczywiste, koloidy i zawiesiny (układy mechaniczne) [37].

Obiekty o rozmiarach poniżej 1nm tworzą roztwory rzeczywiste. Obiekty mają rozmiary zbliżone do rozmiarów pojedynczych cząsteczek związku fazy rozpraszającej, układ dwóch faz stwarza wrażenie jednorodnego pod względem wielkości cząsteczek tworzących ten układ.

Obiekty w zakresie od 1nm do 100nm [38] (zależnie od źródła: do 500nm a nawet 1000nm) tworzą układy koloidalne [38-40]. Koloidy są wszechobecne w naszym środowisku, zaczynając od atmosfery, w której występują mgły, chmury czy kurz poprzez wodę - zanieczyszczenia, dalej żywność - mleko, farmaceutyka - antybiotyki [41], czy kończąc na organizmie człowieka, gdzie koloidami są między innymi paznokcie, włosy, żółć, osocze krwi czy płyn mózgowo-rdzeniowy. W przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego fazą rozproszoną są białka w nim występujące, których rozmiary wahają się od 1,5nm do 12,4nm, np. prealbumina – 3,28nm, aldolaza – 4,81nm czy betalipoproteina – 12,4nm [30].

Z wyżej wymienionych przykładów wynika, że roztwory koloidalne występują w różnych stanach skupienia. W tabeli IV przedstawiono przykładowe koloidy dla różnych stanów skupienia.

Tabela IV
Przykłady koloidów w zależności od stanu skupienia faz [38]

Ośrodek rozpraszający	Ośrodek rozpraszany	Przykład
Gaz	Gaz Ciecz Ciało stałe	Mgła, Chmury Dym, Kurz
Ciecz	Gaz Ciecz Ciało stałe	Emulsje Zole
Ciało stałe	Gaz Ciecz Ciało stałe	Piany Piany Zole stałe

Zawiesiny (układy mechaniczne) powstają wtedy, gdy rozmiary obiektów fazy rozproszonej przyjmują wartości z zakresu 10^{-5} - 10^{-7} m [42].

Fazą rozproszoną w układach dyspersyjnych mogą być obiekty o różnych rozmiarach oraz różnej budowie chemicznej i fizycznej. Obiekty te mogą znajdować się w różnych stanach skupienia. Ta różnorodność powoduje, że procesy fizyko-chemiczne zachodzące w układach dyspersyjnych są skomplikowane i przebiegają zależnie od wła-

ściwości obiektów rozproszonych. Jednak podstawowe prawa fizyko-chemiczne i zachodzące zgodnie z nimi procesy są takie same, niezależnie od rodzaju układu dyspersyjnego. Należy tylko pamiętać o indywidualnym podejściu do każdego przypadku. Wśród wielu procesów zachodzących w układach dyspersyjnych możemy wymienić:

Ruchy Browna

Obiekty zawieszone w płynie mózgowo-rdzeniowym są w ciągłym chaotycznym ruchu, na który składają się ruch postępowy, obrotowy i oscylacyjny. Pierwszy raz taki ruch zaobserwował w 1827 roku Brown [38]. Na początku wieku XX w latach 1905 - 1906 teorię ruchów Browna niezależnie od siebie stworzyli Einstein i Smoluchowski [43].

Ruchy Browna mają charakter molekularno-kinetyczny. Obiekty koloidalne nieustannie zderzają się z cząsteczkami ośrodka dyspersyjnego. Jeżeli wypadkowy moment pędu jest różny od zera, to obiekt doznaje przesunięcia. Średnie kwadratowe przesunięcie można wyliczyć ze wzoru (1) [38]:

$$\bar{x}^2 = \frac{RT}{N_A} \frac{t}{3\pi\eta r} \quad (1)$$

gdzie:

- \bar{x}^2 - kwadrat średniego rzutu drogi obiektu na wybraną oś
- R - stała gazowa
- T - temperatura bezwzględna
- N_A - liczba Avogadra
- t - czas obserwacji
- η - współczynnik lepkości ośrodka dyspersyjnego
- r - promień obiektu

Obiekt, który wykonuje ruch posiada energię, w przypadku ruchu postępowego opisana ona jest wyrażeniem (2):

$$\frac{1}{2} m \bar{u}^2 = \frac{3}{2} kT \quad (2)$$

gdzie:

- m - masa obiektu
- \bar{u} - średnia prędkość
- k - stała Boltzmannna
- T - temperatura bezwzględna

Obiekty oprócz ruchu postępowego wykonują jeszcze ruch rotacyjny i oscylacyjny, więc istnieje energia kinetyczna tych ruchów. Całkowitą energię kinetyczną ruchu zapisujemy wzorem [44]:

$$\bar{E}_{kC} = \bar{E}_{kP} + \bar{E}_{kR} + \bar{E}_{kO} \quad (3)$$

gdzie:

- \bar{E}_{kC} - energia kinetyczna całkowita
- \bar{E}_{kP} - energia kinetyczna ruchu postępowego
- \bar{E}_{kR} - energia kinetyczna ruchu rotacyjnego
- \bar{E}_{kO} - energia kinetyczna ruchu oscylacyjnego

Dyfuzja

Dyfuzja jest związana z ruchami Browna. Obiekty będące w ciągłym ruchu tworzą lokalne nieciągłości. Efektem tego są różnice stężeń obiektów wewnątrz układu dyspersyjnego. Zjawisko przepływu obiektów wywołane gradientem stężenia nazywamy dyfuzją stężeniową [38]. Ruch dyfuzyjny odbywa się od stężeń większych do mniejszych aż do stanu równowagi [45] pod wpływem siły dyfuzji F_D - równanie 4.

$$F_D = -\frac{RT}{N_A} \frac{1}{c_i} \frac{dc_i}{dx} \quad (4)$$

gdzie:

- F_D - siła dyfuzyjna
- R - stała gazowa
- T - temperatura bezwzględna
- N_A - liczba Avogadra
- c_i - stężenie roztworu
- x - droga na jakiej działa siła

Dyfuzja może być stała lub zmienna w czasie. Jeżeli strumień dyfuzji objętościowej jest stały w czasie to do opisu procesu dyfuzji stosuje się I prawo Ficka, które wyraża się wzorem [34]:

$$J = -D\nabla c_i \quad (5)$$

gdzie:

- J - przepływ obiektów przez jednostkową powierzchnię w jednostce czasu
- D - współczynnik dyfuzji
- c_i - stężenie roztworu
- ∇ - operator nabra: $\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$

Wektor strumienia dyfuzji pokazuje, w którą stronę poruszają się obiekty [46]. W przypadku gdy strumień dyfuzji objętościowej zmienia się w czasie, to stosujemy II prawo Ficka [34]:

$$\frac{\partial c_i}{\partial t} = D \nabla^2 c_i \quad (6)$$

gdzie:

t - czas

D - współczynnik dyfuzji

c_i - stężenie roztworu

∇ - operator nabra: $\nabla = \left(\frac{\partial}{\partial x}, \frac{\partial}{\partial y}, \frac{\partial}{\partial z} \right)$

Jeżeli strumień dyfuzyjny wywołany jest gradientem temperatury, to współczynnik dyfuzji D należy przemnożyć przez bezwymiarową wielkość k_T (stosunek termodyfuzyjny). Iloczyn $k_T D$ nazywamy współczynnikiem termodyfuzji [47].

Współczynnik dyfuzji D wiąże się ściśle z współczynnikiem lepkości:

$$D = \frac{RT}{N_A} \frac{1}{6\pi\eta r} \quad (7)$$

gdzie:

D - współczynnik dyfuzji

R - stała gazowa

T - temperatura bezwzględna

N_A - liczba Avogadra

η - współczynnik lepkości

r - promień obiektu

oraz z przesunięciem obiektu w ruchach Browna, opisanym wzorem (8) [38]:

$$\bar{x}^2 = 2Dt \quad (8)$$

gdzie:

\bar{x}^2 - kwadrat średniego rzutu drogi obiektu na wybraną oś

D - współczynnik dyfuzji

t - czas

Koalescencja

Między obiektami w układach dyspersyjnych występują oddziaływania, które charakteryzują się przyciąganiem lub odpychaniem, w zależności od rodzaju oddziaływania.

Efektem działania tych sił jest wypadkowa siła, o określonej wartości, zwrocie i kierunku działania. Jeżeli w oddziaływaniach przeważają siły przyciągające to objekty dążą do połączenia się. Proces, w którym objekty łączą się i wypychają przylegającą do nich fazę rozpraszającą nazywamy koalescencją [38].

Flokulacja

Łączenie się obiektów w agregaty (skupiska obiektów) przy zachowaniu swojej odrębności nazywamy flokulacją [38]. Jest to proces nietrwały. Możemy go odwrócić np. przez mieszanie [48]. Objekty łączą się i rozpadają. Liczba agregatów oraz liczebność obiektów w skupiskach zmienia się w czasie.

Proces flokulacji opisuje równanie kinetyczne (9) [38]:

$$c_n = c_p \frac{\left(\frac{t}{\tau}\right)^{n-1}}{\left(1 + \frac{t}{\tau}\right)^{n+1}} \quad (9)$$

gdzie:

- c_n - stężenie n-obiektowych agregatów
- c_p - stężenie początkowe pojedynczych obiektów
- t - czas
- τ - czas połowicznej koagulacji

Flokulacja przebiega w układach z różną szybkością. Rozróżniamy dwa rodzaje flokulacji: powolną i szybką. Czas flokulacji zależy od współczynnika dyfuzji, promienia obiektu i stężenia w jednostce objętości, i dla flokulacji szybkiej wyraża się wzorem [38]:

$$t = \frac{1}{\beta} = \frac{1}{4\pi Dr V_0} \quad (10)$$

gdzie:

- t - czas
- β - stała szybkości flokulacji
- D - współczynnik dyfuzji
- r - promień obiektu
- V_0 - stężenie w objętości V_0

Natomiast dla flokulacji powolnej ma postać [38]:

$$t = \frac{1}{Z\beta} = \frac{1}{4\pi ZDrV_0} \quad (11)$$

gdzie:

- t - czas
- Z - ułamek liczby zderzeń obiektów prowadzących do połączenia się
- β - stała szybkości flokulacji
- D - współczynnik dyfuzji
- r - promień obiektu
- V_0 - stężenie w objętości V_0

Koagulacja

Flokulacja może przejść w koagulację. Proces nieodwracalnego łączenia się małych obiektów w duże nazywamy koagulacją [39]. Efektem tego jest wytrącenie się zwartej fazy obiektów [48].

Przebieg wyżej wymienionych procesów zależy głównie od struktury fazy rozproszonej, stężenia ilościowego i objętościowego obiektów oraz ich rozmiarów.

Dokładne poznanie struktury fazy rozproszonej pozwala prześledzić procesy zachodzące w układzie dyspersyjnym, a w konsekwencji dokładniej opisać właściwości samego układu.

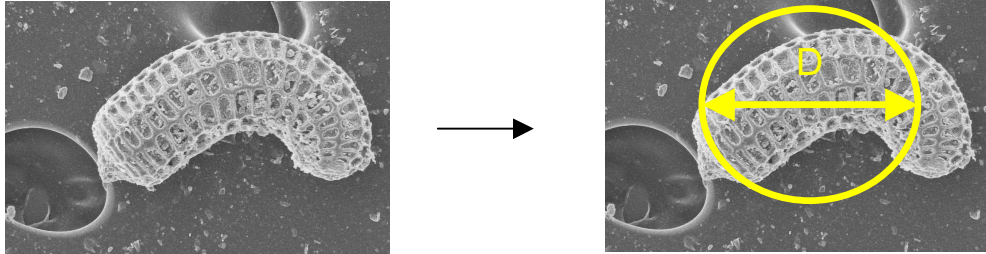
Fazę rozproszoną w przypadku płynów ustrojowych można scharakteryzować morfometrycznymi parametrami, opisującymi geometrię poszczególnych obiektów.

Parametry morfometryczne dzielą się na dwie grupy:

- parametry pojedynczych obiektów, związane z osobniczymi geometrycznymi właściwościami obiektu, na przykład: pole powierzchni obiektu, długość obwodu obiektu, średnica Fereta, średnica zastępcza czy szerokość lub długość obiektu [49],
- parametry zbiorcze obiektów, które określają właściwości fazy rozproszonej, na przykład: sumaryczne względne i bezwzględne pole powierzchni obiektów, sumaryczna długość względna i bezwzględna obwodów obiektów, gęstość liczbo- wa obiektów oraz liczba obiektów [49].

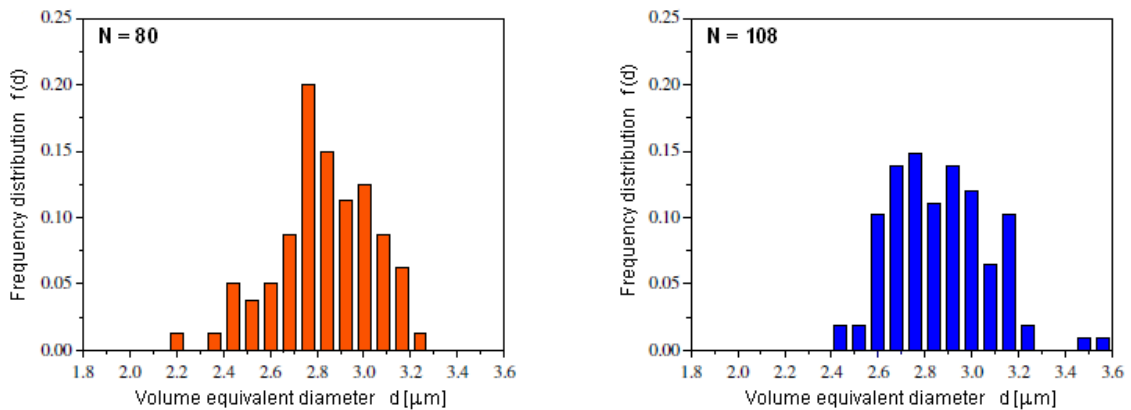
Do opisu pojedynczych obiektów stosuje się również geometryczne współczynniki kształtu, do których zalicza się między innymi: współczynnik kolistości, eliptyczności, pofałdowania czy średniej grubości obiektu [49].

W celu porównywania obiektów o różnych kształtach, a tak jest w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego, stosuje się średnicę zastępczą obiektu (średnica okręgu o polu powierzchni równym polu obiektu – Ryc.6).



Ryc.6. Średnica zastępcza obiektu - średnica okręgu o polu powierzchni równym polu obiektu [36].

Kolejnym parametrem, który wykorzystuje się przy porównywaniu ośrodków dyspersyjnych jest prawdopodobieństwo występowania obiektu o określonej średnicy zastępczej. W oparciu o prawdopodobieństwo występowania obiektów o określonych właściwościach tworzy się wykresy rozkładów prawdopodobieństwa występowania obiektów (Ryc.7), które umożliwiają w przejrzysty sposób porównywanie różnych ośrodków.



Ryc.7. Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w ośrodku dla dwóch różnych stężeń obiektów [50].

Istnieje wiele różnych parametrów charakteryzujących ośrodek dyspersyjny.

Jednakże każdy nowy określony parametr przyczynia się do pełniejszego opisu właściwości ośrodka. W przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego stanowi to dodatkową informację, którą można wykorzystać przy opisie stanu chorobowego pacjenta.

2. PODSTAWOWE PARAMETRY CHARAKTERYZUJĄCE PŁYN MÓZGOWO-RDZENIOWY

Płyn mózgowo-rdzeniowy jest płynem ustrojowym ściśle związanym z ośrodkowym układem nerwowym (OUN). Zmiany ilościowe w składzie prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego są wskaźnikiem wielu stanów chorobowych. Ze względu na miejsce wytwarzania płynu oraz funkcje pełnione w organizmie człowieka, głównie są to choroby związane z układem nerwowym, np. zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, guz mózgu czy zatory mózgowe [8].

W celu określenia zmian wartości parametrów charakteryzujących płyn mózgowo-rdzeniowy przeprowadza się badania analityczne, mikrobiologiczne oraz cytologiczne [51]. Materiał do badań uzyskuje się od pacjentów poprzez dokonanie punkcji, stosując nakłucie podpotyliczne, nakłucie komory bocznej mózgu (u niemowląt) lub najczęściej stosowane nakłucie lędźwiowe [52]. Pacjent, w tym ostatnim przypadku, jest w postawie „wygiętych pleców” – przyjmuje pozycję siedzącą z opuszczoną głową i rękami opartymi o stół ewentualnie o podudzie lub leżącą na boku, z podkurczonymi nogami i rękami oraz przyciągniętą głową do klatki piersiowej.

Nakłucie kanału kręgowego następuje w miejscu, które pozwala zminimalizować uszkodzenie rdzenia kręgowego, między trzecim a czwartym kręgiem lędźwiowym [53] lub czwartym a piątym [54].

Jednorazowo, jeżeli jest to możliwe, pobiera się około 5 - 10ml [54] płynu mózgowo-rdzeniowego, dzieląc go na trzy próbki [51] przeznaczone do różnych badań laboratoryjnych.

Pobrany płyn mózgowo-rdzeniowy wstępnie bada się pod kątem sześciu podstawowych parametrów: barwy, mętności, stężenia chlorków, stężenia glukozy, stężenia białka całkowitego i immunoglobulin oraz cytozy. Na podstawie wartości referencyjnych tych parametrów (Tabela II) określa się czy płyn jest prawidłowy czy patologiczny.

Barwa

Barwę płynu mózgowo-rdzeniowego określamy organoleptycznie, wykorzystując skalę barw wynikającą z właściwości płynu mózgowo-rdzeniowego oraz procesów fizykochemicznych zachodzących w płynie. Stosując barwy - odcienie żółci, czerwieni oraz

barwy łączonej mleczno-żółtej opisujemy zabarwienie próbki płynu [55]. Prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy jest bezbarwny, podobny barwą do czystej wody [56]. Barwa odbiegająca od normy jest rezultatem obecności innych obiektów w płynie np. elementów morfotycznych krwi lub zwiększonego stężenia składników, z których zbudowany jest płyn.

Stan chorobowy pacjenta ma wpływ na skład płynu mózgowo-rdzeniowego, a to wiąże się z określoną barwą płynu:

- Zabarwienie czerwone, od jasnej czerwieni po ciemną

Barwa taka świadczy o obecności krwi w płynie mózgowo-rdzeniowym, natomiast intensywność barwy o jej ilości w płynie. Krew dostaje się do płynu na dwa sposoby; w wyniku krwawienia podpajęczynówkowego lub została wprowadzona do niego podczas punkcji, w wyniku uszkodzenia naczyń oponowych [57]. Różnica między płynem z krwią, która dostała się do niego w wyniku punkcji a płynem z krwią, która dostaje się do niego w przypadku stanów patologicznych polega na tym, że płyn z krwią wprowadzoną podczas punkcji podczas pobierania do kolejnych próbek oczyszcza się, a po odwirowaniu jest bezbarwny, natomiast płyn patologiczny ma stałą barwę, a po odwirowaniu barwa zmienia się na żółtą.

- Zabarwienie mleczno-żółte

Barwa taka wskazuje na dużą ilość komórek w płynie (powyżej 1000/ μ l) [53]

- Zabarwienie żółte

Barwa taka powstaje w wyniku rozpadu krwinek, które dostały się do płynu w wyniku krwawienia podpajęczynówkowego lub może mieć to związek z żółtaczką, która w zależności od przebiegu może spowodować zabarwienie płynu [58].

Oprócz metody organoleptycznej, która jest obarczona „błędem” subiektywności, od kilku lat zaleca się stosowanie również metody spektrofotometrycznej, opartej na pochłanianiu światła o określonej długości fali [59]. Pozwala ona uzyskać dokładniejsze wyniki, szczególnie w przypadku płynu mózgowo-rdzeniowego z krwią [59,60].

Barwa płynu mózgowo-rdzeniowego wiąże się z mętnością płynu.

Mętność

Mętność jest właściwością cieczy, polegającą na oddziaływaniu promieniowania elektromagnetycznego z obiektami znajdującymi się w cieczy. Zależy od tego ile światła, w zakresie widzialnym, padającego na ciecz ulegnie rozproszeniu i pochłonięciu. Proces przechodzenia światła przez ośrodek, w którym znajdują się zawieszone obiekty opisują

teorie Mie i Rayleigha, z których wynika, że im większe stężenie obiektów w cieczy i większe ich rozmiary, tym mętność większa [61].

Mętność płynu określamy organoleptycznie, podobnie jak barwę, stosując skalę od (0) – płyn przejrzysty do (4+) - kiedy przez warstwę płynu nie da się przeczytać druku gazetowego [62]. Prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy jest przejrzysty [53]. Odchylenie od normy wskazuje na zwiększoną liczbę komórek (powyżej 300/ μ l) [58]. Może to świadczyć np. o gruźliczym zapaleniu opon [63] lub ostrym bakteryjnym zapaleniu opon mózgowo-rdzeniowych [64].

Oprócz metody organoleptycznej, którą prosto i łatwo określa się mętność, stosowane są jeszcze turbidymetria i nefelometria. Jednakże, ze względu na warunki, jakie muszą spełniać próbki badawcze, są bardzo rzadko stosowane [65].

Stężenie chlorków

Stężenie chlorków w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi od około 110 do 130mmol/l (110-129mmol/l [33], 112-130mmol/l [58], 120-130mmol/l [56]).

Pomiaru chlorków dokonujemy metodą potencjometryczną używając elektrod jonoselektywnych [58]. Metoda ta polega na oznaczaniu stężenia chlorków poprzez pomiar siły elektromotorycznej (SEM) ogniwa, które powstaje w wyniku zanurzenia w badanej cieczy elektrody porównawczej i jonoselektywnej – chlorkowej. Wartość SEM zależy od potencjału elektrody wskaźnikowej, na który ma wpływ stężenie badanych jonów [66].

Obecnie panuje pogląd, że chlorki nie mają dużego znaczenia klinicznego [62] i powoli odchodzi się od ich badania na rzecz dokładniejszej analizy pozostałych parametrów płynu. Jednakże są widoczne pewne związki między stężeniem chlorków, a stanem chorobowym, np. obniżony poziom stężenia chlorków wiąże się z występowaniem bakteryjnego zapalenia opon mózgowych, a zwiększony poziom obserwuje się w ostrych chorobach zakaźnych [67].

Stężenie glukozy

Stężenie glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym jest ściśle związane z jej stężeniem w osoczu krwi. Uwarunkowane to jest procesem powstawania płynu, który traktuje się jako wybiórcze wydzielanie składników osocza [62]. Stosunek glukozy w płynie do glukozy w osoczu szacuje się jako 2:3 [58]. Wartości referencyjne glukozy dla prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego wynoszą – od 2,22 do 4,40 mmol/l [58,62]. W

przypadku dużego stężenia glukozy mamy do czynienia z hiperglikemią, natomiast stężenie poniżej normy może być np. skutkiem hipoglikemii lub zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych [62].

Pomiaru glukozy w płynie mózgowo-rdzeniowym dokonuje się podobnie jak w osoczu, wykorzystując metody enzymatyczne [32].

Stężenie białka całkowitego i immunoglobulin

Jednym z podstawowych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego jest stężenie białka całkowitego, które określamy metodą turbidymetryczną Extona [58,62]. Białko wytrąca się związkami chemicznymi, a następnie mierzy mętność.

W prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym na jeden litr przypada od 0,2 do 0,4 grama białka [32]. Jeżeli stężenie białka wykracza poza dopuszczalne granice, mamy do czynienia z płynem patologicznym. Przykładowo, gdy stężenie białka jest znacznie większe od normy (większe od 1g/l), to taki płyn może pochodzić od pacjenta z ropnym zapaleniem opon [32], a jeżeli białko jest poniżej dopuszczalnej normy może pochodzić od pacjenta z rozerwaną oponą twardą [62].

Określenie tylko samego całkowitego stężenia białka jest niewystarczające, ponieważ prawidłowe stężenie białka nie wyklucza stanu chorobowego [58]. Przy prawidłowym stężeniu białka całkowitego mogą wystąpić różne stany chorobowe. Związane jest to ze zmianami ilościowymi poszczególnych frakcji białkowych składających się na białko całkowite. Procentowy udział frakcji białkowych, do których zaliczymy transtyretynę (prealbumina), albuminę, α_1 -globulinę, α_2 -globulinę, β -globulinę oraz γ -globulinę, w całkowitym stężeniu białka prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego (Tabela V) określa się metodą elektroforezy. Polega ona na analizie prędkości poruszających się obiektów, posiadających ładunek elektryczny, w zewnętrznym polu elektrycznym [45,66].

Tabela V

Procentowy skład białka całkowitego w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym [62,68]

Rodzaj białka	Procentowa zawartość w białku całkowitym
transtyretyna	2 – 7%
albumina	56 – 76%
α_1 -globulina	2 – 7%
α_2 -globulina	4 – 12%
β -globulina	8 – 18%
γ -globulina	3 – 12%

W oparciu o wyniki elektroforezy określa się stosunek ilościowy albuminy do globuliny. W prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi on 2:1 [58].

Cytoza

W płynie mózgowo-rdzeniowym mogą znajdować się różnego rodzaju komórki. Wśród nich możemy wymienić: erytrocyty, leukocyty, limfocyty, monocyty, granulocyty czy komórki nowotworowe. Ich liczba i rodzaj zależą od stanu chorobowego pacjenta np. zwiększona liczba limfocytów występuje w gruźliczym zapaleniu opon mózgowych, granulocyty pojawiają się przy chorobach pasożytniczych układu nerwowego [58], komórki nowotworowe mogą świadczyć o białaczce lub guzie ośrodkowego układu nerwowego [62].

W prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym jest mało komórek, norma wynosi od 0 do 2 komórek na μl (najczęściej limfocyty) [32], inne źródło 0 - 5/ μl [33].

Oszacowanie liczby komórek dokonuje się za pomocą hemacytomietru stosując mikroskopię optyczną. Wymaga to specjalnego przygotowania preparatu, w zależności od potrzeby, płyn mózgowo-rdzeniowy jest rozcieńczany, zagęszczany czy barwiony, co powoduje znaczne wydłużenie czasu pomiaru.

Zmiana jednego z wyżej wymienionych parametrów nie oznacza automatycznie zmian chorobowych, dlatego w ocenie stanu chorobowego pacjenta rozpatruje się relacje między wszystkimi parametrami.

Jako że, około 80% płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzi z krwi, należy w tym samym czasie przeprowadzić również badania krwi. Porównanie wartości parametru w płynie i krwi pozwala uzyskać więcej informacji na temat płynu mózgowo-rdzeniowego.

Tabela VI
Porównanie wybranych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego z surowicą [58,69]

Parametr	Płyn mózgowo-rdzeniowy	Surowica
sód	137-145 mmol/l	136-145 mmol/l
potas	2,7-3,9 mmol/l	3,5-5,0 mmol/l
wapń	1-1,5 mmol/l	2,2-2,6 mmol/l
chlorki	116-122 mmol/l	98-106 mmol/l
pH	7,31-7,34	7,38-7,44
glukoza	2,2-3,9 mmol/l	4,2-6,4 mmol/l
białko całkowite	0,2-0,5 g/l	55-80 g/l
albuminy	56-75%	50-60%

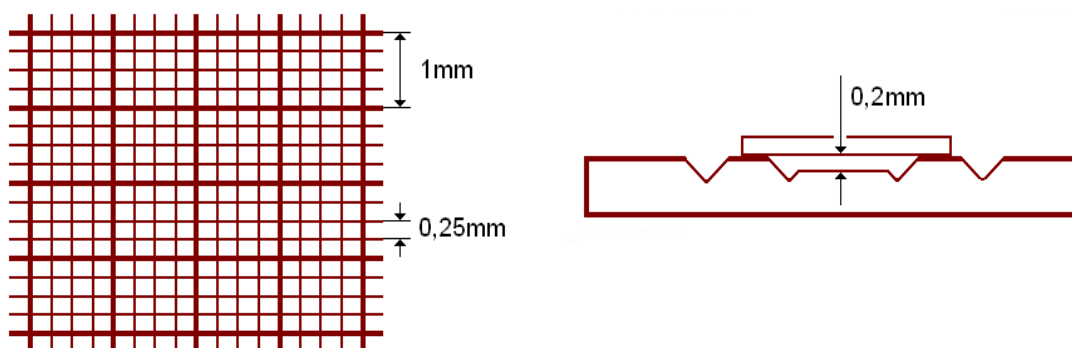
3. METODA MIKROSKOPOWA OKREŚLANIA CYTOZY

Podstawowym parametrem opisującym płyn mózgowo-rdzeniowy, oznaczanym w trakcie jego analizy, jest rodzaj komórek i ich stężenie przypadające na jednostkę objętości płynu ($1\mu\text{l}$). Wartość tego parametru wyznacza się metodą mikroskopową.

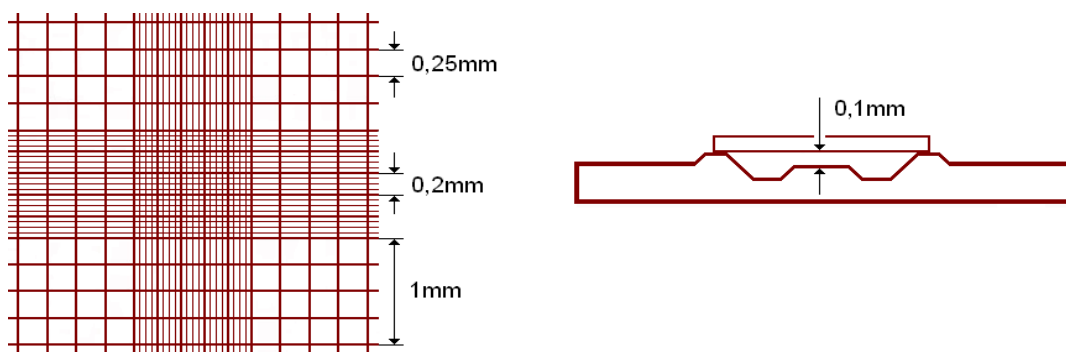
Badania przeprowadza się korzystając z mikroskopu optycznego o powiększeniu $\times 1000$ [70] (zaleca się stosowanie mikroskopii kontrastowo-fazowej) i hemacytometru (komora pomiarowa), w którym umieszczane są próbki płynu poddawane analizie mikroskopowej.

Istnieje wiele rodzajów komór, które różnią się wielkością i kształtem siatki pomiarowej oraz głębokością. Dla płynów o dużej cytozie najczęściej stosuje się komorę Fuchsa-Rosenthala, która posiada głębokość $0,2\text{mm}$ i siatkę pomiarową składającą się z 16 dużych kwadratów o boku 1mm , z których każdy podzielony jest na szesnaście mniejszych kwadratów o boku $0,25\text{mm}$ (Ryc.8) [71]. Natomiast dla płynów o małej cytozie stosuje się komorę Neubauera (Ryc.9) o głębokości $0,1\text{mm}$. Siatka pomiarowa składa się z 9 dużych kwadratów o boku 1mm . Każdy z czterech narożnych kwadratów jest podzielony na 16 mniejszych o boku $0,25\text{mm}$, a centralny kwadrat na 25 mniejszych o boku $0,2\text{mm}$ [71].

W przypadku komory Fuchsa-Rosenthala obserwowane obiekty zlicza się z powierzchni całej siatki - 16 dużych kwadratów o łącznym polu powierzchni 16mm^2 . Jeżeli korzysta się z komory Neubauera zliczaniu podlegają obiekty znajdujące się w dużych kwadratach, czterech narożnych i centralnym [72] o łącznej powierzchni 5mm^2 .



Ryc. 8. Komora Fuchsa-Rosenthala [71].



Ryc. 9. Komora Neubauera [71].

Płyn potrzebny do analizy pobiera się, dokonując punkcji lędźwiowej między 3 a 4 kręgiem lub 4 a 5 [73], w ilości około 10ml [54,74] do trzech probówek po 3-4ml w każdej [75]. Płyn z pierwszej probówki przeznaczony jest do badań biochemicznych, z drugiej do mikrobiologicznych, a z trzeciej do oceny liczby komórek i badań cytologicznych [51]. Kolejność ta ma związek z krwawieniem, które może występować czasami podczas punkcji, a płyn z krwią nie nadaje się do wielu badań. W przypadku krwawienia, najwięcej krwi znajduje się w pierwszej probówce, a w kolejnych mniej, niekiedy wcale.

Obecnie stosowana metoda mikroskopowego badania płynu mózgowo-rdzeniowego składa się z dwóch etapów.

Pierwszy etap to określanie liczby komórek przypadających na jednostkę objętości płynu. Wykorzystuje się do tego zawartość trzeciej probówki. Na wstępie, płyn ocenia się wizualnie pod kątem mętności. Jeżeli płyn jest przezroczysty, za pomocą pipety umieszcza się go w komorze pomiarowej (hemacytometr). W przypadku, gdy płyn jest mętny rozcieńcza się go solą fizjologiczną [72], miesza i dopiero przenosi do komory pomiarowej. Następnie umieszcza się komorę z płynem na stoliku mikroskopu i zlicza obiekty z określonych pól siatki pomiarowej, zależnych od rodzaju użytej komory. W dalszej kolejności wyznacza się stężenie komórek w 1 μ l, według ogólnej zasady opisanej wzorem [71]:

$$L = \frac{N}{S \cdot h \cdot k_r} \quad (12)$$

gdzie:

L - stężenie komórek w 1 μ l płynu

N - liczba zliczonych komórek

S - pole powierzchni, z jakiej zliczano komórki

h - głębokość komory pomiarowej

k_r - współczynnik rozcieńczenia

Drugi etap to określanie rodzaju obiektów występujących w płynie. Korzysta się z płynu znajdującego się w 2 lub 3 probówce. Wstępnie, organoleptycznie, określa się przejrzystość płynu. Jeżeli płyn jest mętny, to nadaje się do pomiarów. Umieszcza się go wtedy w komorze pomiarowej. Jeżeli płyn jest przezroczysty, to zagęszcza się go metodą grawitacyjną lub przy użyciu wirówki [76]. Czas trwania zagęszczania zależy od wybranej metody, a w przypadku wirówki, od prędkości wirowania. Może to trwać nawet około 15 minut przy prędkości 1000 obrotów/minutę [51]. Zagęszczony płyn (osad) przenosi się do komory pomiarowej i suszy. Potem następuje utwalenie preparatu poprzez kilkukrotne przesuwanie komory pomiarowej nad palnikiem. W dalszej kolejności barwi się preparat metodą Maya-Grunwalda-Giemsy'a [76]. Wybarwiony preparat umieszcza się na stoliku mikroskopu i dokonuje różnicowania komórek.

Analizując obecnie stosowaną metodę mikroskopowego badania płynu mózgowo-rdzeniowego można stwierdzić, że jest ona żmudna i czasochłonna, zwłaszcza przygotowanie preparatu mikroskopowego pochłania dużo czasu. Na czas trwania pomiaru wpływa również ilość elementarnych pól siatki, z jakich zliczamy obiekty. W komorze Fuscha-Rosenthala jest to 256 pól, a w komorze Neubauera - 89. [71].

W przypadku gdy szybkość postawienia poprawnej diagnozy ma istotne znaczenie w podjęciu odpowiedniej i skutecznej metody leczenia, czas oczekiwania na wyniki badań płynu ma duże znaczenie w procesie powrotu pacjenta do zdrowia.

Metoda mikroskopowa stosowana obecnie posiada pewne wady. Jest czasochłonna i nie wnosi informacji na temat wartości parametrów geometrycznych obiektów występujących w płynie, które mają wpływ na właściwości ośrodka dyspersyjnego jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy.

4. CEL PRACY

Metoda mikroskopowa stosowana obecnie jest czasochłonna i nie wnosi informacji na temat wartości parametrów geometrycznych obiektów występujących w płynie, które mają wpływ na właściwości ośrodka dyspersyjnego, jakim jest płyn mózgowo-rdzeniowy.

W związku z powyższym nasuwają się dwa pytania:

- Czy istnieje możliwość zmodyfikowania procedur, określających przygotowanie oraz badanie próbek płynu, w taki sposób, aby znacząco skrócić się czas uzyskania wyników?
- Jakie parametry geometryczne obiektów zawieszonych w płynie mózgowo-rdzeniowym będą dobrze charakteryzowały płyn jako ośrodek dyspersyjny?

Cele pracy wynikają bezpośrednio z postawionych pytań.

Cel główny pracy

Opracowanie alternatywnej metodyki mikroskopowej analizy mikro-objektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym, uwzględniającej dyspersję rozmiarów obiektów.

Cele szczegółowe pracy

Określenie parametrów geometrycznych mikro-objektów pozwalających różnicować próbki płynu mózgowo-rdzeniowego.

Wyznaczenie wartości następujących parametrów geometrycznych, mikro-objektów:

- średniej średnicy zastępczej obiektu,
- średniego obwodu obiektu,
- średniego pola powierzchni obiektu,
- gęstości liczbowej obiektów,
- sumarycznej długości obwodów obiektów,
- względnej sumarycznej długości obwodów obiektów,
- sumarycznego pola powierzchni obiektów,
- względnego sumarycznego pola powierzchni obiektów
- współczynnika kolistości obiektów,

występujących w prawidłowym i niebarwionym płynie mózgowo-rdzeniowym.

5. MATERIAŁ BADAWCZY

Materiał badawczy stanowiły próbki płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzące od pacjentów Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie. Płyn pobierany był w ramach standardowych badań diagnostycznych, od pacjentów z podejrzeniem zaburzenia krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego, którzy zostali przyjęci na Oddział Neurochirurgii i Neurotraumatologii wyżej wymienionego szpitala.

Płyn spełniał normy referencyjne dla płynu prawidłowego (Tabela II).

Grupa badana liczyła 51 pacjentów a grupa kontrolna składała się z 6 pacjentów (Tabela VII).

Tabela VII
Porównanie grupy badanej z kontrolną

Grupa	Liczebność grupy	Kobiety	Mężczyźni	Przedział wiekowy (lata)	Mediana (lata)
Badana	51	24	27	11 - 81	54
Kontrolna	6	1	5	11 - 61	57

Grupa kontrolna - pacjenci z wadami wrodzonymi (torbiel szyszynki), nie powodującymi zaburzeń krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego, od których pobrany płyn spełniał normy płynu prawidłowego.

Grupa badana - pacjenci z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego, od których pobrany płyn spełniał normy płynu prawidłowego.

W grupie badanej ze względu na rozpoznanie kliniczne wyodrębniono dwie podgrupy:

- Grupa A: pacjenci z poszerzonym układem komorowym
- Grupa B: pacjenci z wodogłowiem wewnętrznym

Badania płynu mózgowo-rdzeniowego prowadzono w ramach programu badawczego - „Zjawiska fizykochemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego”, realizowanego wspólnie z Samodzielnym Publicznym Wojewódzkim Szpitalem Zespolonym w Szczecinie, na które otrzymano zgodę Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie (Załączniki).

6. METODYKA BADAŃ

Badania mikroskopowe płynu mózgowo-rdzeniowego przeprowadzono wykorzystując „Zintegrowany system analizy obrazu” (Ryc.10), który składa się z:

- mikroskopu
- kamery cyfrowej
- komputera
- programu komputerowego umożliwiającego archiwizację i analizę obrazów.

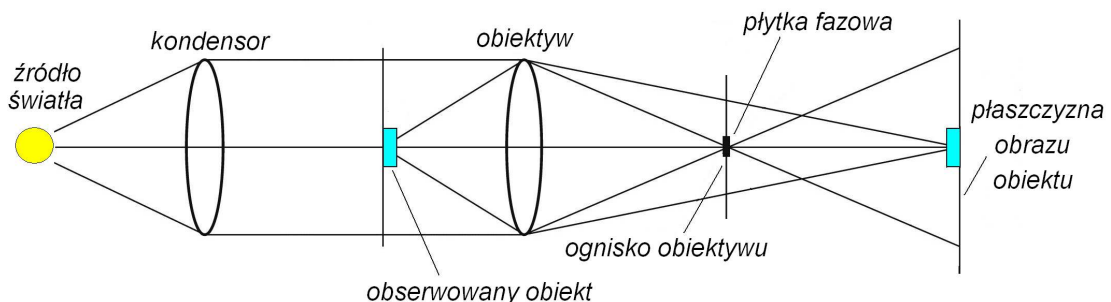
Mikroskop

W badaniach użyto mikroskopu optycznego. W mikroskopie zastosowano technikę kontrastu fazowego, co wynika ze specyfiki obserwowanego materiału:

- budowy (płyn jasny, przezroczysty),
- składu (obiekty występujące w płynie),

oraz założonych celów (płyn niebarwiony),

Technika kontrastu fazowego oparta jest na falowych właściwościach światła, wykorzystuje nakładanie się fal, przesuniętych w fazie. Mikroskopia kontrastowo-fazowa bez barwienia płynu mózgowo-rdzeniowego, które zaburza procesy w płynie (między innymi unicestwia komórki) oraz wydłuża czas pomiaru, pozwala obserwować obiekty słabo załamujące światło oraz umożliwia obserwację żywych obiektów (komórek) [77]. Po raz pierwszy zastosował ją w 1934 roku holenderski fizyk Frits Zernike [78]. Na rycinie 10 przedstawiono przykładowy przebieg promieni świetlnych w mikroskopie, w którym zastosowano kontrast fazowy.



Ryc.10. Bieg promieni świetlnych w mikroskopie kontrastowo-fazowym [78].

Promienie świetlne wychodzące ze źródła padają na kondensator. W kondensorze znajduje się przesłona (pierścień źrenicowy) modulująca promienie świetlne w równoległą

wiązkę świetlną, która pada prostopadłe na obserwowany preparat. Światło przechodzące przez badaną próbkę napotyka na swojej drodze różne obiekty. W efekcie część fali świetlnej, która napotkała na swojej drodze obiekt, ulega ugięciu (zmienia swój kierunek) względem fali świetlnej, która przeszła przez preparat bez zmian. Obie fale padają na obiektyw, tylko że pod innymi kątami (posiadają różne kierunki). Zgodnie z prawem załamania światła, ulegają w nim załamaniu i wychodzą z niego pod innymi kątami niż weszły. Po wyjściu z obiektywu (w dalszym ciągu posiadają różne kierunki) fale padają na płytkę fazową, która znajduje się w odległości ogniskowej obiektywu. Światło nieugięte skupia się w jednym punkcie dając duże natężenie, natomiast światło ugięte jest rozmyte i daje mniejsze natężenie [79]. Płytkę fazową zmienia fazę światła nieugiętego (fala pada na ciemne pierścienie płytki) względem światła ugiętego (fala pada na przezroczyste pierścienie płytki), powstaje fala modulowana fazowo [80] - fala opóźniona w fazie. W efekcie płytkę fazową opuszczają dwie fale o różnych fazach (przesunięcie fazowe wynosi około $\frac{1}{4}$ długości fali świetlnej), które interferują ze sobą dając kontrast w obrazie próbki [77,81].

Analizę optyczną badanych materiałów przeprowadzono za pomocą mikroskopu *Eclipse E600* firmy *Nikon* (Ryc.11) o powiększeniu 1200x.



Ryc.11. Mikroskop optyczny Nikon „Eclipse E600” [82].

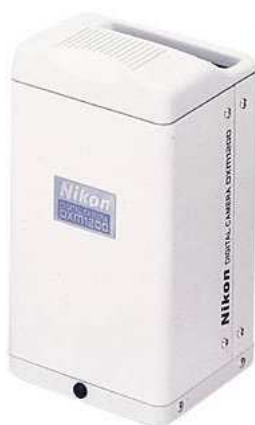
W tym przypadku, na główne elementy mikroskopu pozwalającego na obserwację obiektów metodą kontrastu fazowego składały się:

- a) źródło światła - żarówka halogenowa o mocy 100W i napięciu znamionowym 12V
- b) soczewka diafragmy polowej z pierścieniem
- c) filtr zielony - służący do poprawy kontrastu obrazu fazowego

- d) kondensator z przesłoną pierścieniową - specjalny kondensator Nikon: *Phase Contrast 0.9 Dry - Ph2* do kontrastu fazowego
- e) obiektyw do kontrastu fazowego - obiektyw Nikon: *Plan 40x/0.65 Ph2*
- f) kamera cyfrowa

Kamera

W skład zestawu wchodzi cyfrowa kamera mikroskopowa *DXM 1200* firmy Nikon (Ryc.12).



Ryc.12. Kamera mikroskopowa DXM 1200 Nikon [83].

Jest to kamera wysokiej jakości z przetwornikiem pozwalającym uzyskiwać obrazy z maksymalną rozdzielczością 3840 x 3072 pikseli. Obrazy mikroskopowe otrzymane za pomocą kamery przekazywane były z prędkością 12 klatek na sekundę do kolejnego elementu zestawu - komputera.

Komputer

Do przechwytywania obrazów z kamery i ich przechowywania wykorzystano mikrokomputer typu Pentium IV, z zegarem 1,6GHz, pamięcią operacyjną RAM 512 MB, dyskiem twardym o pojemności 40GB, systemem operacyjnym MS Windows XP oraz zainstalowanym specjalnym oprogramowaniem - „*Lucia*”.

Software

Do archiwizacji i analizy obrazów mikroskopowych wykorzystano program „*Lucia*” wersja 4.71 czeskiej firmy Laboratory Imaging, który umożliwia analizę ilościową i jakościową obserwowanych obiektów oraz wykonywanie obliczeń i tworzenie prostych wykresów. Program przechwytywał zdjęcia z kamery z rozdzielczością około 12 milio-

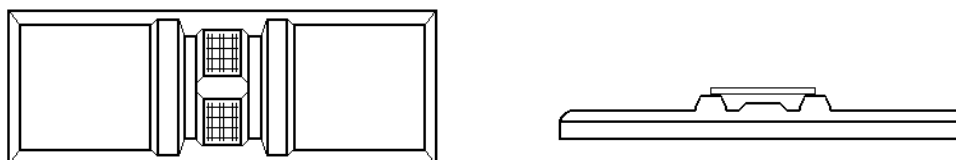
nów pixeli i umożliwiał zapis ich w wielu formatach, między innymi w formacie: BMP, JPEG czy TIF oraz w specjalnym formacie LIM. „Lucia” zapisuje dane pomiarowe w tabeli, którą tworzy automatycznie w pamięci oraz umożliwia eksport tych danych do pliku w trybie tekstowym, co pozwala na bardzo łatwą konwersję plików z danymi do dowolnego programu obliczeniowego, np. do arkusza kalkulacyjnego EXCEL.

Przed przystąpieniem do badań wyregulowano mikroskop, ustawiając natężenie oświetlenia odpowiednie dla badającego, dokonano regulacji przesłony połowej oraz aperturowej dla ustalonego obiektywu o powiększeniu 40x, wycentrowano pierścienie fazowe zgodnie z zaleceniami i procedurami podanymi przez producenta w instrukcjach obsługi mikroskopu Nikon: *Eclipse E600* oraz kondensora kontrastu fazowego Nikon: *Phase Contrast 0.9 Dry – Ph2* [84,85].

Wyznaczono, według standardowej procedury z wykorzystaniem podziałki mikrometrycznej, powiększenie mikroskopu dla układu optycznego z obiektywem o powiększeniu 40x oraz zamontowaną kamerą cyfrową Nikon: *DXM 1200* [86]. Układ pomiarowy powiększał obiekty 1200x. Uwzględniając współczynnik powiększenia mikroskopu program „Lucia” automatycznie przeliczył jednostki ekranowe (pixel) na rzeczywiste (μm), 1pixel równy był $0,173\mu\text{m}$.

Płyn mózgowo-rdzeniowy, wykorzystywany do analizy, uzyskiwano od pacjentów Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie w ramach rutynowych badań.

Część płynu z każdej próbki przeznaczono do badań mikroskopowych. Za pomocą automatycznej pipety pobierano porcję nieprzetworzonego, niebarwionego płynu mózgowo-rdzeniowego i umieszczano w komorze Bürkera (Ryc.13). Następnie komorę Bürkera przykrywano szkiełkiem nakrywkowym (Ryc.13) i umieszczano na stoliku mikroskopu.

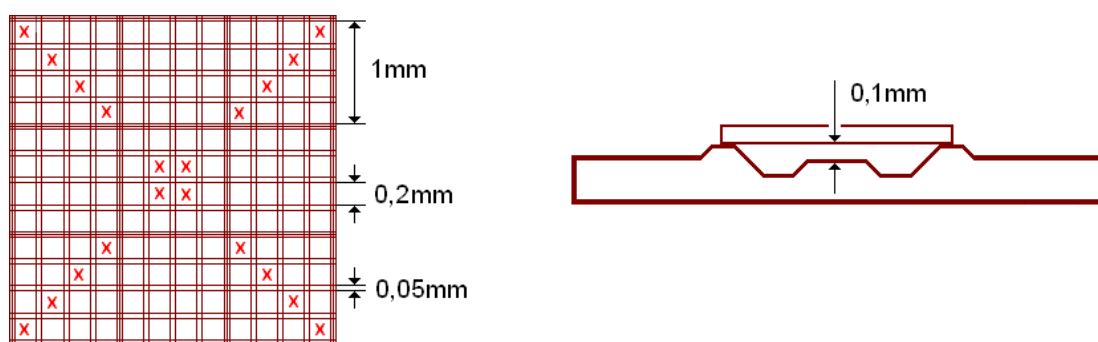


Ryc.13. Stolik Bürkera - widok z góry oraz boczny [71].

W dalszej kolejności ustalano ostrość obrazu, regulując wysokość położenia stolika mikropokrętłem.

W wyniku zastosowania płynu nie poddanego żadnej obróbce technicznej, czas przygotowania preparatu do badań stał się krótszy w porównaniu z czasem przygotowania preparatu według procedur obecnie ogólnie stosowanych.

Przy użyciu kamery cyfrowej, *DXM 1200 Nikon*, sprzężonej z mikroskopem i komputerem oraz oprogramowania *Lucia* firmy *Laboratory Imaging* (Czechy) każdej próbce płynu wykonywano zdjęcia o rozmiarach $(100 \times 100)\mu\text{m}$, centralnej części dwudziestu wybranych pól elementarnych, przedstawionych na rysunku 14.



Ryc. 14. Siatka komory Bürkera z zaznaczonymi wybranymi polami pomiarowymi [71].

Efektom zastosowania do badań nieprzetworzonego płynu mózgowo-rdzeniowego oraz zmniejszenia ilości analizowanych pól elementarnych jest skrócenie całkowitego czasu pomiaru o kilkadziesiąt minut w porównaniu z czasem pomiaru wynikającym z zastosowania standardowej metody pomiaru.

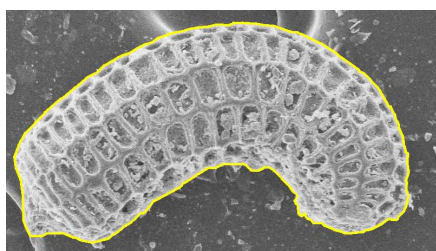
Otrzymane obrazy płynu mózgowo-rdzeniowego analizowano pod względem trzech poniższych, wybranych parametrów charakteryzujących obiekty występujące w płynie [49]:

- Liczba obiektów w próbce

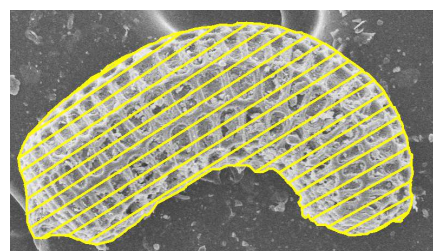
Obiekty zliczano z każdego zdjęcia danej próbki poprzez wskazanie kursorem myszy komputerowej zaobserwowanego obiektu (postawienie znaku „+”). Wszystkie zaznaczone obiekty program zliczał automatycznie i zapisywał dane w pliku tekstowym.

- Długość obwodu obiektu

Długość obwodu każdego obiektu mierzono automatycznie poprzez wskazanie kursorem myszy komputerowej obszaru obiektu. Program analizował obszar obiektu pod względem kontrastu i kreślił linię graniczną – obwód obiektu (Ryc.15), jednocześnie licząc całkowitą ilość pixeli tworzących linię ciągłą (obwód). Następnie zapisywał długość obwodu w pliku tekstowym przeliczając pixele, zgodnie z współczynnikiem skalowania, na μm .



Ryc.15. Obwód obiektu [36].



Ryc.16. Pole powierzchni obiektu [36].

- Pole powierzchni obiektu

Pole powierzchni każdego obiektu było mierzone automatycznie przez program, w podobny sposób jak długość obwodu. Najpierw wskazywano myszą komputerową obiekt, który miał być zmierzony, aby powstał odpowiedni obrys (obwód), następnie akceptowano obrysowany obszar (Ryc.16). Następowo automatyczne zliczanie pixeli w zamkniętym obszarze, przeliczanie ich na μm^2 i zapisywanie w pliku tekstowym.

Wybór trzech powyżej przedstawionych parametrów geometrycznych obiektów znajdujących się w płynie mózgowo-rdzeniowym wynika z celów pracy. Łatwość i szybkość wyznaczenia tych parametrów pozwala skrócić czas pomiaru. Większość dostępnych na rynku programów do analizy obrazów posiada możliwość automatycznego zliczania obiektów oraz pomiaru obwodu i powierzchni, co pozwala w krótkim czasie określić ich wartość.

Drugim czynnikiem jaki zdecydował o wyborze wymienionych parametrów do analizy, jest możliwość wykorzystania ich do wyznaczania innych parametrów, umożliwiających pełniejszą charakterystykę płynu. W efekcie pozwala to na dokładniejsze różnicowanie płynu mózgowo-rdzeniowego, co również jest celem pracy.

Wykorzystując wyniki pomiarów pól powierzchni zaobserwowanych obiektów obliczono średnicę zastępczą obiektu [49], która umożliwia porównywanie obiektów o różnych kształtach. W obliczeniach wykorzystano wzór na pole powierzchni koła. Pole powierzchni obiektu o dowolnych kształtach przyrównano do koła o takiej samej powierzchni:

$$S_o = S_k = \pi \cdot r^2 \quad (13)$$

gdzie:

S_o - pole powierzchni obiektu

S_k - pole powierzchni koła

π - stała matematyczna

r - promień koła

Następnie dokonując przekształceń matematycznych i podstawiając wyrażenie wynikające z właściwości koła gdzie $d_z = 2r$ otrzymano wzór na średnicę zastępczą obiektu. gdzie:

$$d_z = 2 \cdot \sqrt{\frac{S_o}{\pi}} \quad (14)$$

S_o - pole powierzchni obiektu

d_z - średnica zastępcza obiektu

π - stała matematyczna

Na podstawie wzoru (14) obliczono wartości średnic zastępczych obiektów, następnie utworzono szereg rozdzielczy rosnący liczebności średnic zastępczych dla płynu kontrolnego oraz płynu badanego. Zgodnie z kryterium o ilości przedziałów szeregu rozdzielczego, mówiącym że ilość przedziałów w szeregu nie powinna przekraczać wartości pierwiastka kwadratowego z liczby analizowanych obiektów [87], średnice pogrupowano w 25 przedziałów o szerokości $0,5\mu\text{m}$ i przedstawiono w sposób graficzny.

W oparciu o rozpoznanie kliniczne z grupy badanej płynu mózgowo-rdzeniowego wyodrębniono dwie grupy. Grupę A: rozpoznanie kliniczne - poszerzony układ komorowy oraz grupę B: rozpoznanie kliniczne - wodogłowie wewnętrzne. Następnie utworzono dla obu grup szeregi rosnące liczebności średnic zastępczych.

Dla powstałych szeregów wyznaczono miary położenia, modalną – wartość najczęściej występująca w badanej grupie, medianę – wartość środkowa szeregu [88] oraz pierwszy, drugi i trzeci kwartył (Q1, Q2, Q3) według poniższych wzorów [89]:

$$Q1 = X_{Q1} + \frac{\frac{N}{4} - \sum_{i=1}^{k-1} n_i}{n_{Q1}} \cdot i_{Q1} \quad (15)$$

gdzie:

- $Q1$ - pierwszy kwartył
- X_{Q1} - dolna granica przedziału, w którym znajduje się pierwszy kwartył
- N - ogólna liczebność danej grupy
- $\sum_{i=1}^{k-1} n_i$ - suma liczebności od klasy pierwszej do tej, w której znajduje się odpowiednio $Q1$
- n_{Q1} - liczebność przedziału, w którym znajduje się pierwszy kwartył
- i_{Q1} - rozpiętość przedziału, w którym znajduje się pierwszy kwartył

$$Q2 = X_{Me} + \frac{\frac{N}{2} - \sum_{i=1}^{k-1} n_i}{n_{Me}} \cdot i_{Me} \quad (16)$$

gdzie:

- $Q2$ - drugi kwartył
- X_{Me} - dolna granica przedziału, w którym znajduje się mediana
- N - ogólna liczebność danej grupy
- $\sum_{i=1}^{k-1} n_i$ - suma liczebności od klasy pierwszej do tej, w której znajduje się odpowiednio $Q2$
- n_{Me} - liczebność przedziału, w którym znajduje się mediana
- i_{Me} - rozpiętość przedziału, w którym znajduje się mediana

$$Q3 = X_{Q3} + \frac{\frac{3N}{4} - \sum_{i=1}^{k-1} n_i}{n_{Q3}} \cdot i_{Q3} \quad (17)$$

gdzie:

- $Q3$ - trzeci kwartył
- X_{Q3} - dolna granica przedziału, w którym znajduje się trzeci kwartył
- N - ogólna liczebność danej grupy
- $\sum_{i=1}^{k-1} n_i$ - suma liczebności od klasy pierwszej do tej, w której znajduje się odpowiednio $Q3$
- n_{Q3} - liczebność przedziału, w którym znajduje się trzeci kwartył
- i_{Q3} - rozpiętość przedziału, w którym znajduje się trzeci kwartył

Wykorzystując kwartyle, $Q1$ oraz $Q2$ wyznaczono z wyrażenia (18) procentowy współczynnik zmienności struktury:

$$V_{Q1Q3} = \frac{Q3 - Q1}{Q3 + Q1} \cdot 100\% \quad (18)$$

gdzie:

- V_{Q1Q3} - współczynnik zmienności struktury
- $Q1$ - pierwszy kwartył
- $Q3$ - trzeci kwartył

Analizę statystyczną rozkładów rozmiarów średnic zastępczych obiektów, dotyczącą postawionych hipotez przeprowadzono z wykorzystaniem testów:

- test zgodności Smirnova – Kołmogorowa [90]

Weryfikację hipotez przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, porównując tablicowy parametr λ_α z parametrem λ wyliczonym ze wzoru (19).

$$\lambda = \sup |Fn_1(x) - Fn_2(x)| \cdot \sqrt{\frac{n_1 \cdot n_2}{n_1 + n_2}} \quad (19)$$

gdzie:

- sup - maksymalna różnica
- Fn_1 - dystrybuanta pierwszego rozkładu
- Fn_2 - dystrybuanta drugiego rozkładu
- n_1 - liczebność pierwszej grupy
- n_2 - liczebność drugiej grupy

- test normalności rozkładu Shapiro-Wilka [89]

Weryfikację hipotez przeprowadzono podobnie jak w przypadku testu zgodności Smirnova-Kołmogorowa na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, porównując tablicowy parametr W_α z parametrem W wyliczonym ze wzoru (20).

$$W = \frac{\left[\sum_i a_i(n) (X_{n-i+1} - X_i) \right]^2}{\sum_{j=1}^n (X_j - \bar{X})^2} \quad (20)$$

gdzie:

- W - wartość statystyki
- $a_i(n)$ - stałe tablicowe
- X_n - n-ty wynik pomiarowy
- \bar{X} - średnia z pomiarów

Uwzględniając miary pozycyjne (kwartyle), określono asymetrię rozkładów rozmiarów średnic zastępczych obiektów według poniższych wzorów [89]:

$$\text{rozkład asymetryczny prawostronny} \quad (Q3 - Q2) - (Q2 - Q1) > 0 \quad (21)$$

$$\text{rozkład asymetryczny lewostronny} \quad (Q3 - Q2) - (Q2 - Q1) < 0 \quad (22)$$

gdzie:

$Q1$ - pierwszy kwartyl

$Q2$ - drugi kwartyl

$Q3$ - trzeci kwartyl

Siłę asymetrii (współczynnik skośności) [89] wyznaczono korzystając z poniższej zależności:

$$As = \frac{(Q3 - Q2) - (Q2 - Q1)}{(Q3 - Q2) + (Q2 - Q1)} \quad (23)$$

gdzie:

As - współczynnik skośności

$Q1$ - pierwszy kwartyl

$Q2$ - drugi kwartyl

$Q3$ - trzeci kwartyl

Podzielone rozkłady na „małe” i „duże” obiekty poddano ocenie podobieństwa struktur, wykorzystując względny wskaźnik podobieństwa struktur [90]:

$$Z = \frac{\sum_{i=1}^k \min(w_i)}{\sum_{i=1}^k \max(w_i)} \quad (24)$$

gdzie:

Z - wskaźnik podobieństwa struktur

w_i - częstość występowania obiektu o danej wartości cechy w stosunku do całej zbiorowości

$$w_i = \frac{n_i}{N}$$

n_i - liczebność obiektów posiadających określoną cechę

N - liczebność całej zbiorowości

W oparciu o wartości bezpośrednich pomiarów morfometrycznych wyliczono kolejne parametry, podane poniżej - zdefiniowane przez Zielińskiego i Strzeleckiego w

monografii „Komputerowa Analiza Obrazu Biomedycznego” [49], pozwalające różnicować badane próbki:

Parametry pojedynczych obiektów

- Średni obwód obiektu.
Średnia arytmetyczna obwodów wszystkich obiektów.
- Średnie pole obiektu.
Średnia arytmetyczna pól powierzchni wszystkich obiektów.
- Średnia średnica zastępcza obiektu.
Średnia arytmetyczna średnic zastępczych wszystkich obiektów.

Parametry zbiorcze obiektów

- Gęstość liczbowa obiektów.
Liczba zaobserwowanych obiektów przypadających na pole powierzchni obserwowanego obszaru.
- Sumaryczna długość obwodów obiektów.
Suma obwodów wszystkich obiektów.
- Względna sumaryczna długość obwodów obiektów.
Sumaryczna długość obwodów obiektów względem obwodu obserwowanego obszaru.
- Sumaryczne pole powierzchni obiektów.
Suma pól powierzchni wszystkich obiektów.
- Względne sumaryczne pole powierzchni obiektów.
Sumaryczne pole powierzchni obiektów względem pola powierzchni obserwowanego obszaru.

Współczynnik kolistości K .

Współczynnik kolistości obserwowanych obiektów wyznaczono korzystając ze wzoru:

$$K = \frac{4 \cdot \pi \cdot S_o}{O_o^2} \quad (25)$$

gdzie:

- K - współczynnik kolistości
- π - stała matematyczna
- S_o - pole powierzchni obiektu
- O_o - obwód obiektu

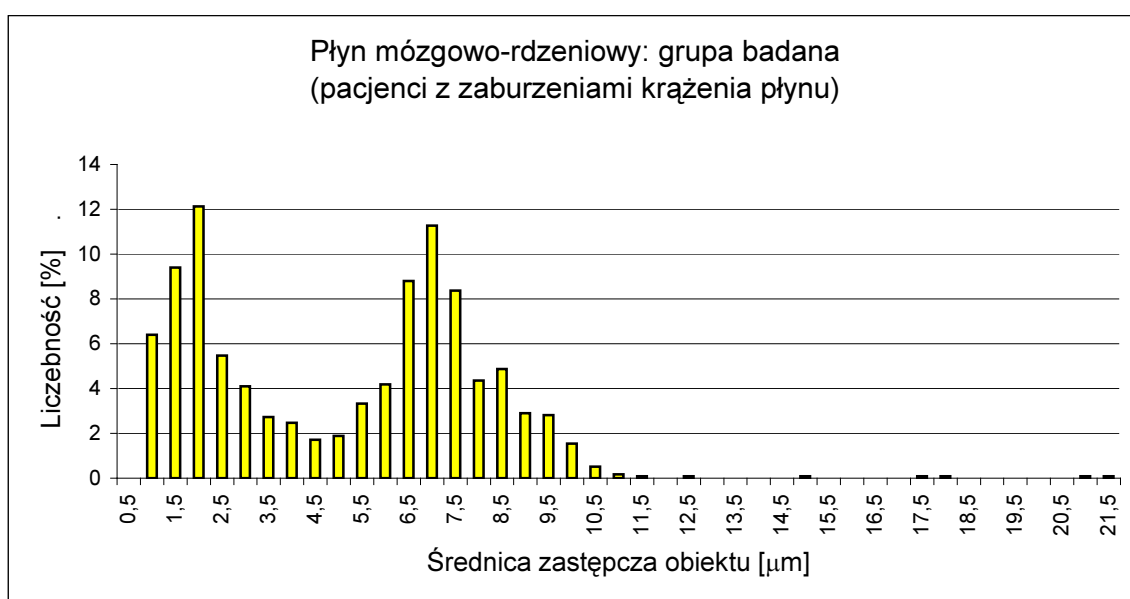
7. WYNIKI

Przeprowadzone badania pozwoliły uzyskać informacje dotyczące liczby, obwodów oraz pól powierzchni obiektów występujących w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z grupy kontrolnej i badanej.

W oparciu o pole powierzchni obiektów wyliczono ich średnice zastępcze i pogrupowano w przedziały o szerokości $0,5\mu\text{m}$, tworząc szereg rosnący, odpowiednio dla obu grup. Otrzymane wyniki przedstawiono na wykresach (Ryc.17 i Ryc.18).



Ryc.17. Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wadą wrodzoną (torbiel szyszynki).



Ryc.18. Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu - grupa badana.

Dla szeregów rozmiarów średnic zastępczych wyznaczono miary pozycyjne: medianę, modalną oraz kwartyle Q1, Q2 i Q3 (Tabela VIII).

Tabela VIII

Miary pozycyjne szeregu rozdzielczego średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z grupy kontrolnej i badanej

Miary pozycyjne	Grupa kontrolna	Grupa badana
Moda	2	2
Mediana	2,64	5,82
Pierwszy kwartył Q1	1,86	2,14
Drugi kwartył Q2	2,70	5,81
Trzeci kwartył Q3	4,06	7,33

Zgodnie z rozpoznaniem klinicznym z grupy badanej (płyn pochodzący od pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego) wyodrębniono dwie grupy,

- grupę A:

prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy pochodzący od pacjentów z rozpoznaniem klinicznie poszerzonym układem komorowym

- grupę B:

prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy pochodzący od pacjentów z rozpoznaniem klinicznie wodogłowiem wewnętrznym.

Podstawowe informacje o wyodrębnionych grupach prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego dotyczące liczebności grup A i B, płci pacjentów oraz przedziału wiekowego grup przedstawiono w tabeli IX.

Tabela IX

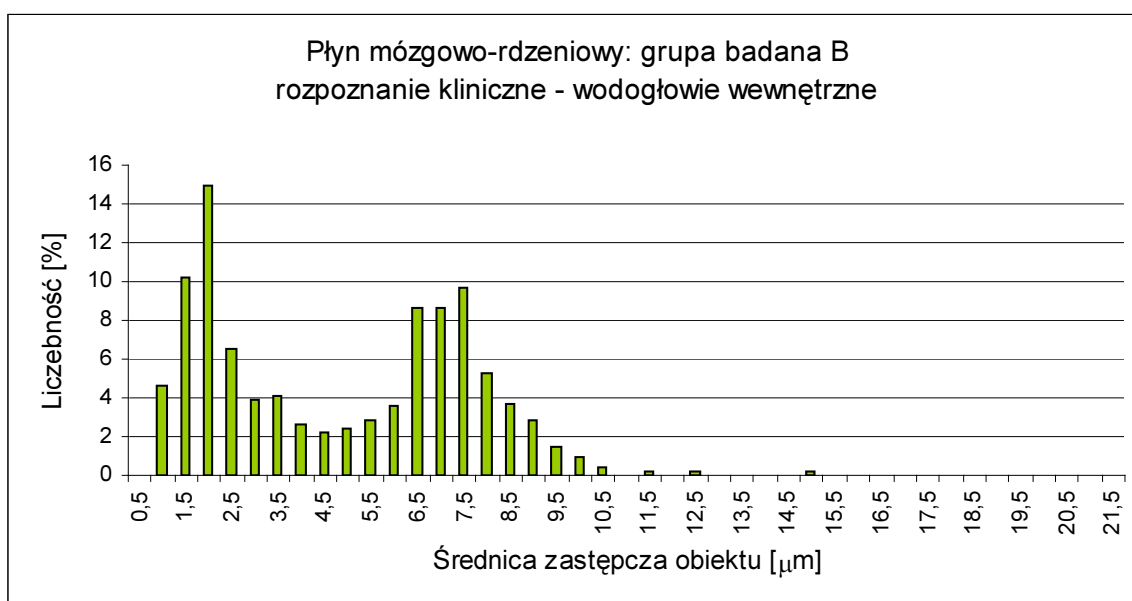
Porównanie struktury grup pacjentów, grupy badanej A (pacjenci z poszerzonym układem komorowym) z grupą badaną B (pacjenci z wodogłowiem wewnętrznym)

Grupa badana	Liczebność grupy	Kobiety	Mężczyźni	Przedział wiekowy (lata)	Mediana (lata)
Grupa A Pacjenci z poszerzonym układem komorowym	9	5	4	34 - 81	56
Grupa B Pacjenci z wodogłowiem wewnętrznym	17	11	6	31 - 79	59

Dla wyżej wymienionych grup utworzono szeregi średnic zastępczych zaobserwowanych obiektów o szerokości przedziału 0,5 μ m i przedstawiono w postaci graficznej (Ryc.19 i Ryc.20).



Ryc.19. Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym - grupa A płynu badanego.



Ryc.20. Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym - grupa B płynu badanego.

W wyniku testowania zgodności rozkładu średnic zastępczych grupy badanej A z grupą badaną B testem Smirnowa-Kołomogorowa otrzymano, w oparciu o wzór (19), wartość parametru $\lambda = 1,58$. Wartość krytyczna λ_{α} odczytana z tablic na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ wynosi 1,36, więc $\lambda > \lambda_{\alpha}$.

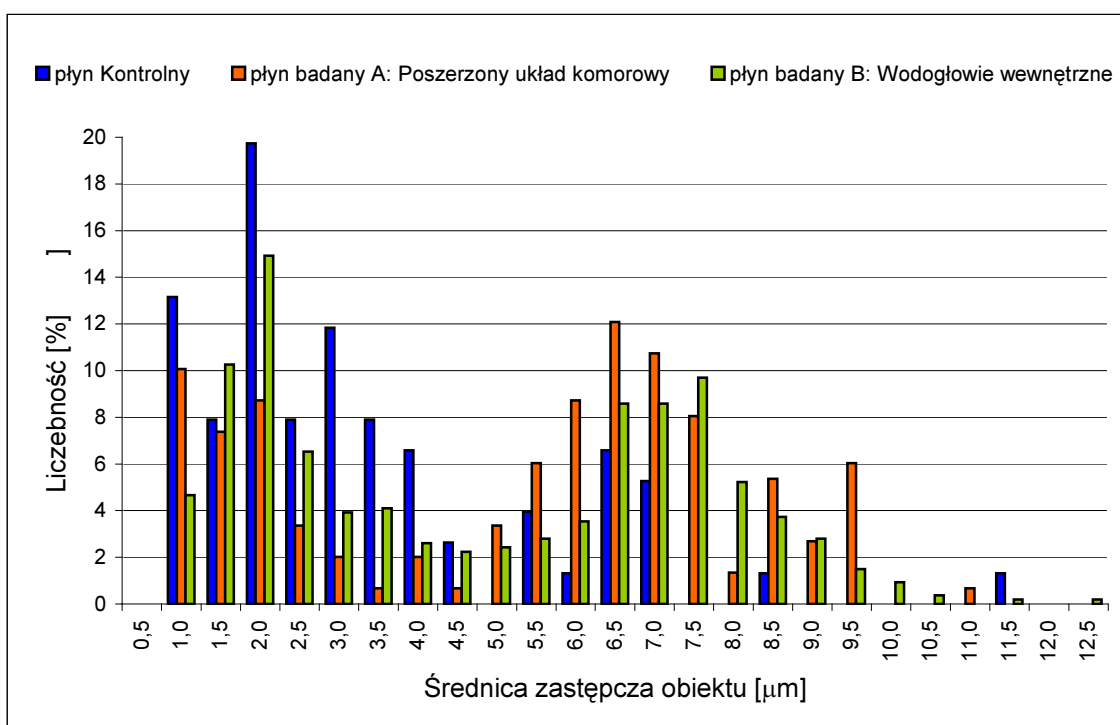
Następnie wyznaczono dla płynów z podgrupy A i B modę, medianę i kwartyle Q1, Q2 oraz Q3 (Tabela X).

Tabela X

Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, obiektów występujących w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego) oraz z rozpoznaniem wodogłowie wewnętrznym (grupa B płynu badanego)

Miary pozycyjne	Płyn A - poszerzony układ komorowy	Płyn B - wodogłowie wewnętrzne
Moda	6,5	2
Mediana	6,15	4,91
Pierwszy kwartyl Q1	2,20	2,10
Drugi kwartyl Q2	6,11	4,91
Trzeci kwartyl Q3	7,24	7,25

Analizowane szeregi średnic zastępczych obiektów ograniczono do przedziału wielkości od 1,0 μm do 12,5 μm , odrzucając zgodnie z zasadami statystyki dopuszczalną ilość wyników odstających (Ryc.21).



Ryc.21. Porównanie rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym: kontrolnym i pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego) i wodogłowie wewnętrznym (grupa B płynu badanego).

Ze względu na rozkład dwumodalny, w celu przeprowadzenia dokładniejszej analizy statystycznej, rozkłady podzielono na dwie części, - tzw. „małe objekty” (średnica zastępcza obiektu $\leq 4,5\mu\text{m}$) oraz „duże objekty” (średnica zastępcza obiektu $\geq 5,0\mu\text{m}$). Następnie wyliczono parametry rozkładu średnic zastępczych obiektów małych i dużych dla płynu kontrolnego oraz płynu badanego pochodzącego od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (grupa A) i wodogłowie wewnętrznym (grupa B).

Tabela XI

Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego

Miary pozycyjne	Płyn: kontrolny małe objekty	Płyn: kontrolny duże objekty
Moda	2	6,5
Mediana	2,22	6,71
Pierwszy kwartyl Q1	1,70	6,13
Drugi kwartyl Q2	2,24	6,61
Trzeci kwartyl Q3	3,13	7,04

Tabela XII

Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w badanej grupie A prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od pacjentów z poszerzonym układem komorowym

Miary pozycyjne	Płyn badany – grupa A poszerzony układ komorowy małe objekty	Płyn badany – grupa A poszerzony układ komorowy duże objekty
Moda	1	6,5
Mediana	1,74	6,87
Pierwszy kwartyl Q1	1,19	6,18
Drugi kwartyl Q2	1,76	6,88
Trzeci kwartyl Q3	2,26	7,76

Tabela XIII

Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w badanej grupie B płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od pacjentów z wodogłowie wewnętrznym

Miary pozycyjne	Płyn badany – grupa B wodogłowie wewnętrzne małe objekty	Płyn badany – grupa B wodogłowie wewnętrzne duże objekty
Moda	2	7,5
Mediana	2,08	7,20
Pierwszy kwartyl Q1	1,63	6,48
Drugi kwartyl Q2	2,08	7,22
Trzeci kwartyl Q3	2,83	7,98

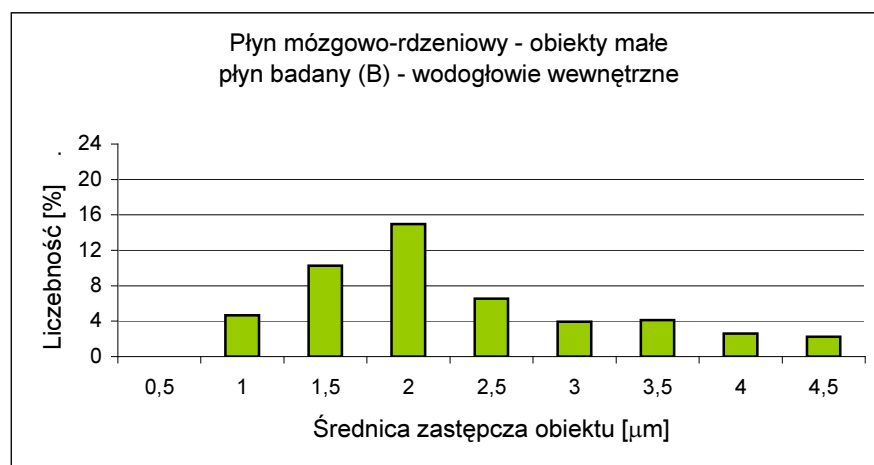
Podział rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym oraz w badanym płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (grupa A) i rozpoznaniem wodogłowie wewnętrznym (grupa B) na małe i duże objekty przedstawiono na wykresach (Ryc.22-27).



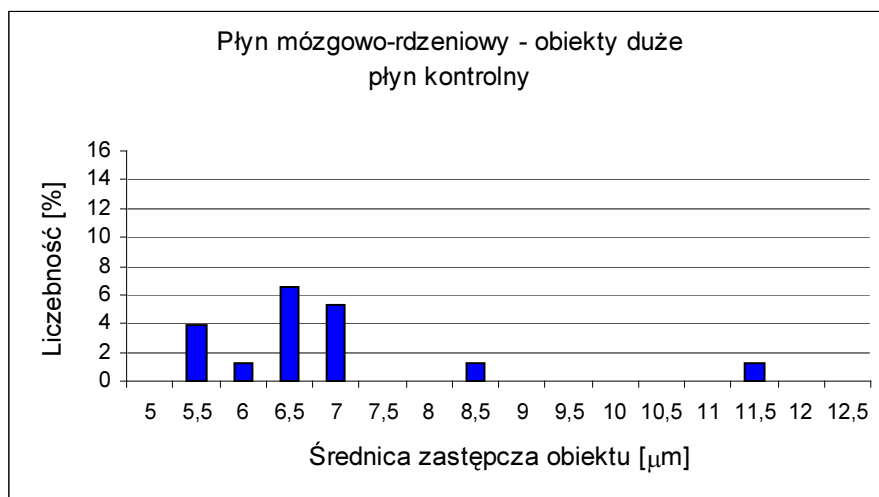
Ryc.22. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym.



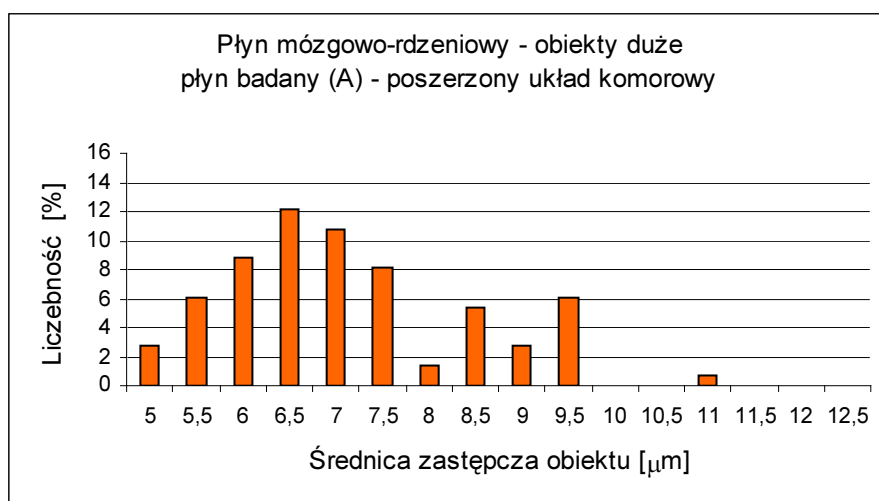
Ryc.23. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (grupa A badanego płynu).



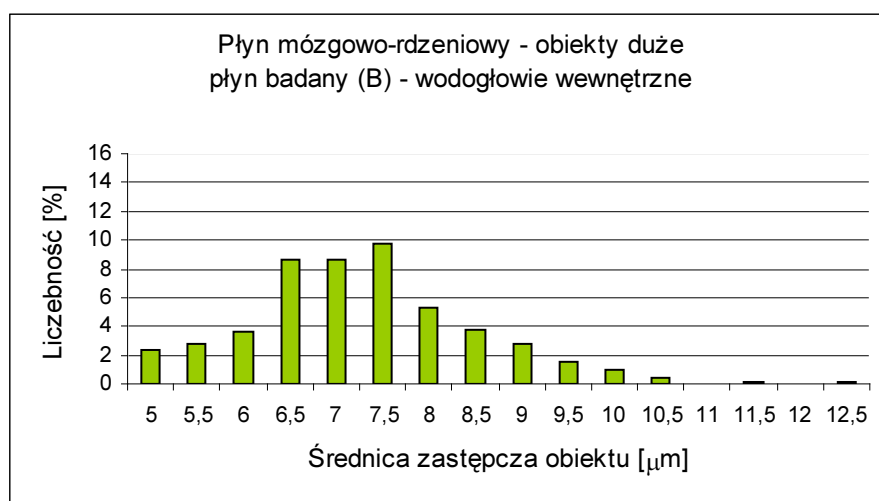
Ryc.24. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem wodogłowiem wewnętrznym (grupa B badanego płynu).



Ryc.25. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym.



Ryc.26. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (grupa A badanego płynu).



Ryc.27. Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem wodogłowiem wewnętrznym (grupa B badanego płynu).

Testem Shapiro-Wilka, wzór (20), na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ zweryfikowano hipotezę dotyczącą zgodności rozkładów rozmiarów dla grupy małych i dużych obiektów z rozkładem normalnym. Wyniki obliczeń statystyki (W) testu przedstawiono w tabelach, dla małych obiektów - tabela XIV, dla dużych obiektów - tabela XV.

Tabela XIV

Wartość statystyki W dla małych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Nazwa grupy	Parametr W
Grupa kontrolna	0,960
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	0,855
Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	0,841

Tabela XV

Wartość statystyki W dla dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Nazwa grupy	Parametr W
Grupa kontrolna	0,652
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	0,867
Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	0,847

Rozkłady średnic zastępczych obiektów, dla których odrzucono hipotezę H_0 mówiącą o normalności rozkładu, sprawdzono pod względem asymetrii rozkładu korzystając ze wzoru (21). Otrzymane wyniki zestawiono w tabeli XVI.

Tabela XVI

Wartość parametru określającego asymetryczność rozkładu średnic dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Nazwa grupy	Wynik formuły: $(Q_3 - Q_2) - (Q_2 - Q_1)$
Grupa kontrolna	-0,04
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	+0,18
Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	+0,02

Wartości siły asymetrii - A_s (współczynnik skośności), rozkładu średnic dużych obiektów występujących w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym wyliczone w oparciu o wyrażenie (23) dla płynu kontrolnego, płynu badanego pochodzącego od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym oraz płynu badanego pochodzącego od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym przedstawiono w tabeli XVII.

Tabela XVII

Wartości współczynnika skośności (A_s) rozkładu średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Nazwa grupy	Współczynnik skośności - A_s
Grupa kontrolna	-0,048
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	+0,110
Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	+0,014

Rozkłady średnic zastępczych dla małych obiektów (Ryc.22-24) różnią się między sobą, podobnie jak rozkłady średnic zastępczych dużych obiektów (Ryc.25-27). W celu określenia różnic między rozkładami z poszczególnych grup płynu mózgowo-rdzeniowego wyznaczono względne wskaźniki podobieństwa struktur - wzór (24), które przedstawiono w tabeli XVIII i XIX.

Tabela XVIII

Wartości względnego wskaźnika podobieństwa struktur w przypadku współczynnika rozkładu średnic zastępczych małych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Porównywane struktury grup płynu mózgowo-rdzeniowego	Względny wskaźnik podobieństwa struktur
Grupa kontrolna płynu ----- Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	37,54%
Grupa kontrolna płynu ----- Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	56,81%
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy ----- Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	54,14%

Tabela XIX

Wartości względnego wskaźnika podobieństwa struktur w przypadku rozkładu średnic zastępczych dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Porównywane struktury grup płynu mózgowo-rdzeniowego	Względny wskaźnik podobieństwa struktur
Grupa kontrolna płynu ----- Grupa badana A: poszerzony układ komorowy	27,83%
Grupa kontrolna płynu ----- Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	32,00%
Grupa badana A: poszerzony układ komorowy ----- Grupa badana B: wodogłowie wewnętrzne	60,12%

Wyznaczono również wartości parametrów pojedynczych obiektów dla każdej grupy płynu mózgowo-rdzeniowego (grupy kontrolnej, grupy badanej A – poszerzony układ komorowy, grupy badanej B – wodogłowie wewnętrzne) z podziałem na małe i duże obiekty (Tabela XX, XXI, XXII).

Tabela XX

Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego dla małych i dużych obiektów

Parametry pojedynczych obiektów	Wartość średnia	Odchylenie standardowe średniej
małe obiekty		
Obwód [μm]	8,24	0,76
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	5,28	0,39
Średnica zastępcza obiektu [μm]	2,42	0,12
duże obiekty		
Obwód [μm]	26,7	2,7
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	39,0	5,1
Średnica zastępcza obiektu [μm]	6,90	0,38

Tabela XXI

Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (grupa A badanego płynu), dla małych i dużych obiektów

Parametry pojedynczych obiektów	Wartość średnia	Odchylenie standardowe średniej
małe obiekty		
Obwód [μm]	6,42	0,40
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	3,59	0,46
Średnica zastępcza obiektu [μm]	1,97	0,12
duże obiekty		
Obwód [μm]	24,22	0,69
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	41,0	1,6
Średnica zastępcza obiektu [μm]	7,11	0,13

Tabela XXII

Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym (grupa B badanego płynu), dla małych i dużych obiektów

Parametry pojedynczych obiektów	Wartość średnia	Odchylenie standardowe średniej
małe obiekty		
Obwód [μm]	7,86	0,22
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	4,84	0,24
Średnica zastępcza obiektu [μm]	2,309	0,056
duże obiekty		
Obwód [μm]	23,93	0,30
Pole powierzchni obiektu [μm^2]	42,83	0,90
Średnica zastępcza obiektu [μm]	7,129	0,075

W oparciu o mierzone parametry pojedynczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym wyznaczono parametry zbiorcze: gęstość liczbowa obiektów (ilość obiektów przypadająca na jeden preparat – na powierzchnię $0,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) dla małych i dużych obiektów (Tabela XXIII) oraz bezwzględną i względną sumaryczną długość obwodów obiektów przypadających na jeden preparat (Tabela XXIV).

Tabela XXIII

Gęstość liczbowa małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym)

Parametry zbiorcze obiektów	Grupa Kontrolna	Grupa badana (A) Poszerzony Układ Komorowy	Grupa badana (B) Wodogłowcie wewnętrzne
małe objekty			
Gęstość liczbowa [obiekt/preparat]	10,2	5,8	15,5
Odchylenie standardowe średniej	1,2	1,2	3,2
duże objekty			
Gęstość liczbowa [obiekt/preparat]	2,50	10,7	16,0
Odchylenie standardowe średniej	0,56	2,3	2,7

Tabela XXIV

Wartości bezwzględnej i względnej sumarycznej długości obwodów małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym)

Parametry zbiorcze obiektów	Grupa Kontrolna	Grupa badana (A) Poszerzony Układ Komorowy	Grupa badana (B) Wodogłowcie wewnętrzne
małe objekty			
Bezwzględna sumaryczna długość obwodów obiektów w preparacie	83,8 μm	37,1 μm	122 μm
Odchylenie standardowe średniej	7,2 μm	6,5 μm	25 μm
Względna sumaryczna długość obwodów obiektów w preparacie	1,05 %	0,46 %	1,53 %
duże objekty			
Bezwzględna sumaryczna długość obwodów obiektów w preparacie	67 μm	258 μm	381 μm
Odchylenie standardowe średniej	11 μm	51 μm	71 μm
Względna sumaryczna długość obwodów obiektów w preparacie	0,83 %	3,23 %	4,77 %

Kolejnym parametrem zbiorczym jaki wyliczono było bezwzględne i względne sumaryczne pole powierzchni, obiektów występujących w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym, przypadające na jeden preparat. Wyniki obliczeń zawiera tabela XXV.

Tabela XXV

Wartości bezwzględnego i względnego sumarycznego pola powierzchni małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym)

Parametry zbiorcze obiektów	Grupa Kontrolna	Grupa badana (A) Poszerzony Układ Komorowy	Grupa badana (B) Wodogłowie wewnętrzne
małe objekty			
Bezwzględne sumaryczne pole powierzchni obiektów w preparacie	53,7 μm^2	20,8 μm^2	75 μm^2
Odchylenie standardowe średniej	4,9 μm^2	4,5 μm^2	16 μm^2
Względne sumaryczne pole powierzchni obiektów w preparacie	0,03 %	0,01 %	0,04 %
duże objekty			
Bezwzględne sumaryczne pole powierzchni obiektów w preparacie	98 μm^2	437 μm^2	680 μm^2
Odchylenie standardowe średniej	22 μm^2	105 μm^2	140 μm^2
Względne sumaryczne pole powierzchni obiektów w preparacie	0,05 %	0,22 %	0,34 %

Ostatnim parametrem jaki wyliczono był współczynnik kolistości obiektu. Wartości współczynnika dla poszczególnych grup prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego przedstawiono w tabeli XXVI.

Tabela XXVI

Wartości współczynnika kolistości małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym)

Parametry zbiorcze obiektów	Grupa Kontrolna	Grupa badana (A) Poszerzony Układ Komorowy	Grupa badana (B) Wodogłowie wewnętrzne
małe objekty			
Średni współczynnik kolistości	0,886	0,949	0,8980
Odchylenie standardowe średniej	0,017	0,012	0,0084
duże objekty			
Średni współczynnik kolistości	0,787	0,907	0,9340
Odchylenie standardowe średniej	0,075	0,018	0,0073

8. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Podstawowe badanie płynu mózgowo-rdzeniowego ma na celu określenie czy badany płyn spełnia normy płynu prawidłowego albo czy jest płynem patologicznym. Dokonuje się tego w oparciu o porównywanie wartości sześciu wyznaczanych parametrów charakteryzujących płyn z ich z wartościami referencyjnymi dla płynu prawidłowego.

Jednym z parametrów, który określamy w trakcie badania płynu jest liczba komórek występujących w jednym mikrolitrze płynu mózgowo-rdzeniowego. Wykorzystuje się do tego celu metodę mikroskopową analizując preparaty płynu mózgowo-rdzeniowego przygotowane według procedury obejmującej [70,91,92]:

- ocenę makroskopową płynu
- wirowanie płynu
- rozcieńczanie
- barwienie preparatu
- suszenie preparatu

Przygotowanie preparatu mikroskopowego płynu mózgowo-rdzeniowego, ze względu na ilość czynności jakie należy wykonać w trakcie przygotowywania preparatu i czas jaki na ich wykonanie należy przeznaczyć, jest żmudne i czasochłonne. W konsekwencji wydłuża się przez to całkowity czas pomiaru, na który wpływ ma również czas analizy mikroskopowej preparatu zależny od wielkości analizowanego pola powierzchni preparatu.

Pierwszym etapem pracy było opracowanie sposobu przygotowania preparatu mikroskopowego w czasie krótszym od czasu wynikającego ze standardowej procedury, mając jednocześnie na uwadze, że przygotowany preparat będzie umożliwiał analizowanie parametrów geometrycznych obserwowanych obiektów.

Efekt ten uzyskano stosując płyn pobrany prosto od pacjenta i eliminując z etapów przygotowania wirowanie, rozcieńczanie, barwienie oraz suszenie preparatu. Tym samym skrócono czas przygotowania preparatu do kilku minut. Stosując precyzyjną regulację ostrości obrazu oraz płynną regulację natężenia oświetlenia preparatu, otrzymano obrazy pozwalające analizować obiekty pod względem ilości i geometrii kształtów (Ryc.28).

Obiekty zawarte w płynie mózgowo-rdzeniowym czyli komórki, dla których wartość graniczna wynosi 5 komórek na mikrolitr [93] (powyżej tej wartości płyn określany jest jako patologiczny), białka oraz elementy rozpadu komórek można obserwować stosując różne metody mikroskopowe. Mikroskop stosowany w standardowej metodzie określania ilości komórek pozwala zaobserwować obiekty rzędu $1\mu\text{m}$. Jednak, przy wielkościach obiektów zbliżonych do wielkości minimalnych jakie możemy zaobserwować, wynikających z rozdzielczości mikroskopu, trudno jest jednoznacznie określić rodzaj obserwowanego obiektu, gdyż płyn nie jest jednorodny, a obiekty posiadają różne kształty i wielkości (Ryc.28).



Ryc.28. Obrazy obiektów zaobserwowanych w niebarwionym prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym [94].

W tym przypadku, wydaje się, że jedynymi wspólnymi kryteriami różnicującymi obiekty obserwowane w płynie mózgowo-rdzeniowym są wskaźniki wynikające z geometrii kształtu obiektów.

Konsekwencją powyższego stwierdzenia jest pytanie:

Czy istnieją kształty lub rozmiary obiektów, które występują częściej niż inne?

W oparciu o przeprowadzone badania mikroskopowe, wykorzystując średnicę zastępczą obiektu wyznaczoną ze wzoru (14) stwierdzono, że istnieją różnice w częstotliwości występowania obiektów w płynie mózgowo-rdzeniowym w zależności od ich średnicy. Najczęściej, w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym obserwowano obiekty o średnicy od 2 do $10,5\mu\text{m}$, sporadycznie natomiast o średnicy od 11 do $21,5\mu\text{m}$ (Ryc.16, 17). Wyniki pomiarów dotyczące wielkości obiektów są potwierdzeniem doniesień literaturowych mówiących o rozmiarach obiektów rzędu mikrometrów, np. $1-4\mu\text{m}$ (trombocyty) [95], $5-9\mu\text{m}$ (limfocyty małe), $9-15\mu\text{m}$ (limfocyty duże) [96] czy $15-20\mu\text{m}$ (monocyty) [97]. Zatem, zakres obserwowanych średnic obiektów w niebarwionym płynie pokrywa się z wartościami pomiarów wielkości obiektów w przypadku płynu

barwionego. Świadczy to o tym, że istnieje możliwość dokładnego określania (rzędu mikrometrów) rozmiarów obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym bez jego barwienia. W konsekwencji powoduje to skrócenie czasu pomiaru obiektów i jest przyczynkiem do stworzenia alternatywnej metody pomiaru obiektów w płynie mózgowo-rdzeniowym, co stanowiło jeden z celów niniejszej rozprawy.

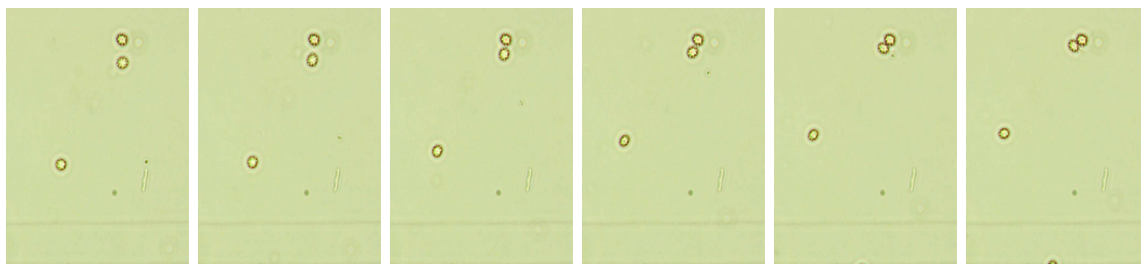
Porównując płyn kontrolny z badanym niebarwionym płynem mózgowo-rdzeniowym pod względem liczebności występowania obiektów, w zależności od ich średnic, zauważono między nimi pewne podobieństwa, jak i różnice.

Najczęściej występującymi obiektami w obu płynach były obiekty o średnicy $2\mu\text{m}$, przy czym w przypadku płynu kontrolnego stanowiły one około 20% wszystkich zaobserwowanych obiektów, a w badanym niebarwionym płynie około 12% wszystkich obiektów (Ryc.17 oraz Ryc.18). Przyczyną różnicy, około 8%, w ilości małych obiektów są najprawdopodobniej różne właściwości fizyko-chemiczne płynów, które mogą mieć wpływ na naturalne procesy rozpadu obiektów. Inną przyczyną może być przedstawianie się do płynu obiektów dużych np. w wyniku możliwych wewnętrznych krwawień, co w konsekwencji w grupie obserwowanych obiektów powoduje zmniejszenie procentowego udziału małych obiektów.

Średnica zastępcza obiektów najczęściej występujących w płynach w obu przypadkach znajdowała się w pierwszej połowie rozkładu rozmiarów średnic, dla których wartość mediany badanego płynu była 2,2 razy większa niż płynu kontrolnego i wynosiła odpowiednio $5,82\mu\text{m}$ i $2,64\mu\text{m}$ (Tabela VIII). Wartość mediany oraz kwartyli Q1, a w szczególności Q2 i Q3 świadczy o tym, że rozkład rozmiarów średnic obiektów w płynie badanym jest dłuższy od rozkładu średnic w płynie kontrolnym.

Rozstęp rozkładu dla płynu kontrolnego wynosił $10,5\mu\text{m}$ (od $1,0$ do $11,5\mu\text{m}$) i był krótszy o $10\mu\text{m}$ od rozkładu dla płynu badanego, dla którego wynosił $20,5\mu\text{m}$ (od $1,0$ do $21,5\mu\text{m}$), (Ryc.17 i Ryc.18). Grupę obiektów o rozmiarach średnic zastępczych większych od $11,5\mu\text{m}$ w badanym niebarwionym płynie mózgowo-rdzeniowym tworzą monocyty oraz obiekty, najprawdopodobniej powstałe w wyniku procesów koalescencji i flokulacji. W trakcie prowadzonych badań, wykonując zdjęcia poklatkowe preparatów płynu zaobserwowano proces łączenia się obiektów w agregaty. Dotyczyło to zarówno grupy małych jak i dużych obiektów (Ryc.29). Powstawanie agregatów zależy od właściwości płynu, które mają wpływ na charakter procesów fizykochemicznych w nim zachodzących. Różnice w przebiegu procesów sugerują, że płyn kontrolny i badany

posiadają odmienne właściwości. Najprawdopodobniej związane są one ze stanem chorobowym pacjenta.



Ryc.29. Obrazy wybranych etapów łączenia się dwóch obiektów, występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym, w agregaty – dwa górne obiekty [94].

Analizując przebieg rozkładu statystycznego średnic zastępczych obiektów zawieszonych w badanym niebarwionym płynie mózgowo-rdzeniowym stwierdzono, że rozkład jest dwumodalny (Ryc.18). Rozkład tego typu świadczy o tym, że ośrodek jest niejednorodny [88,98]. Niejednorodność ta może oznaczać, że istnieje duża zmienność rozmiarów obiektów wewnątrz badanej populacji płynu lub populacja składa się z grup płynu o odmiennych właściwościach związanych z obiektami w nim występującymi

Korzystając z danych dotyczących rozpoznania klinicznego wyodrębniono w badanym prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym dwie grupy związane ze stanem chorobowym pacjentów: grupę A, którą stanowił płyn pochodzący od pacjentów z rozpoznaniem klinicznie poszerzonym układem komorowym oraz grupę B, którą stanowił płyn pochodzący od pacjentów z rozpoznaniem klinicznie wodogłowie wewnętrznym.

Dla obu grup wykreślono rozkłady średnic zastępczych obiektów w nich występujących, które przedstawiono na rycinach 19 i 20.

W celu sprawdzenia czy istnieją różnice, istotne statystycznie, w dyspersji rozmiarów obiektów między grupami A i B zastosowano test zgodności Smirnowa – Kolmogorowa [89]. Postawiono dwie hipotezy:

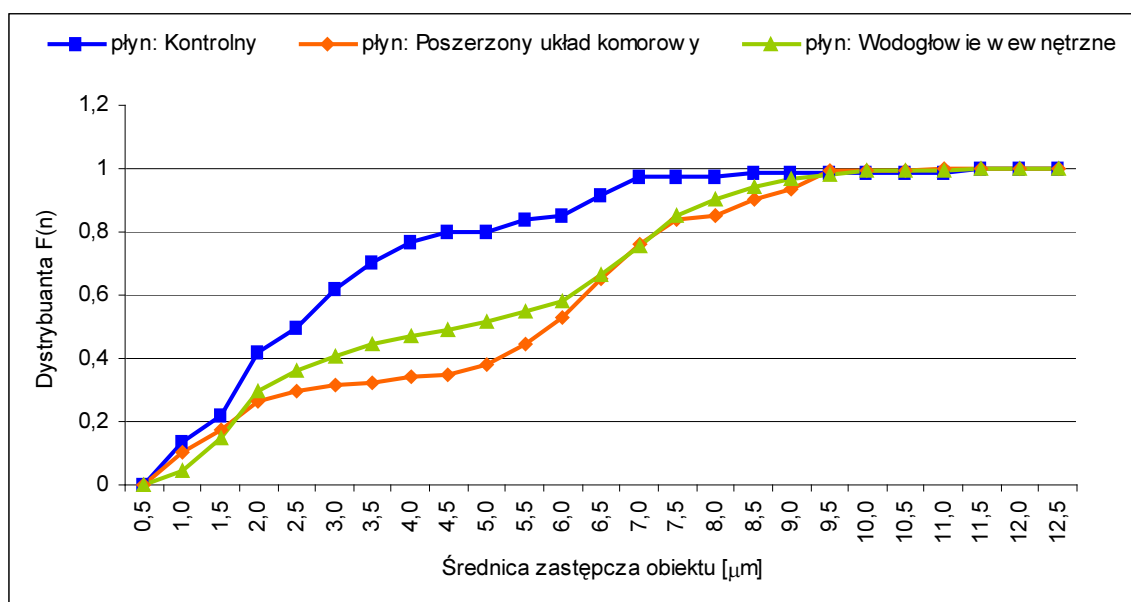
- Hipotezę zerową (H_0) - rozkłady średnic obiektów w obu grupach są takie same.
- Hipotezę alternatywną (H_1) - rozkłady średnic obiektów w obu grupach są różne.

Weryfikację hipotez przeprowadzono na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, porównując tablicowy parametr $\lambda_\alpha = 1,36$ z parametrem $\lambda = 1,58$ wyliczonym ze wzoru (19). Parametr λ_α jest mniejszy od parametru λ . Oznacza to, że hipotezę H_0 należy odrzucić na rzecz hipotezy H_1 .

Z przeprowadzonego testu wynika, że istnieją między rozkładami średnic zastępczych w grupie A i B różnice istotne statystycznie. Pozwala to przypuszczać, że kształt rozkładów średnic obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym ma związek z rozpoznany stanem klinicznym pacjenta.

Różnice między płynem pochodzącym od pacjentów z rozpoznany poszerzonym układem komorowym a płynem pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym potwierdzają miary pozycyjne szeregów średnic zastępczych wyznaczone dla obu płynów przedstawione w tabeli X. Wynika z nich, że środek szeregu średnic zastępczych w przypadku płynu pochodzącego od pacjentów z poszerzonym układem komorowym przypada na $6,15\mu\text{m}$, a w płynie pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym na $4,91\mu\text{m}$. Oznacza to, że szeregi mają inaczej rozłożone maksima (Ryc.21), które przypadają na obiekty o rozmiarach $6,5\mu\text{m}$ w pierwszym przypadku i $2\mu\text{m}$ w drugim przypadku.

W celu dokładniejszej analizy dyspersji średnic zastępczych obiektów ograniczono rozstęp szeregów do zakresu od $1,0\mu\text{m}$ do $12,5\mu\text{m}$, odrzucając, zgodnie z zasadami statystyki, odstające wartości wyników pomiarowych (w grupie badanej A wartość – $21,5\mu\text{m}$, a w grupie badanej B – $15,0\mu\text{m}$) i wykreślono przebieg dystrybuant średnic zastępczych obiektów (Ryc.30).



Ryc.30. Przebiegi dystrybuant średnic zastępczych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym oraz płynie badanym (A) – poszerzony układ komorowy i płynie badanym (B) – wodogłowie wewnętrzne.

Kształty przebiegu krzywych dystrybuant również potwierdzają odmienny charakter badanych grup płynu. Szczególnie widoczna jest różnica w ilości występujących obiek-

tów w zakresie średnic od 2,0 μ m do 5,0 μ m. W wymienionym zakresie, największy względny przyrost obiektów zaobserwowano w przypadku płynu kontrolnego. Pozostałe dwa płyny wykazywały zdecydowanie mniejszy względny przyrost obiektów, który dla płynu badanego A (poszerzony układ komorowy) wynosił 0,12, a dla płynu badanego B (wodogłowie wewnętrzne) - 0,22. Oznacza to, że w płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem wodogłowia wewnętrznego przeważają obiekty występujące w pierwszej połowie rozkładu średnic (małe obiekty), odwrotnie niż w płynie pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym.

Mimo rozdziału badanego niebarwionego płynu mózgowo-rdzeniowego na grupy płynu powiązane z rozpoznaniem klinicznym: grupa A (poszerzony układ komorowy) i grupa B (wodogłowie wewnętrzne), przebiegi rozkładów średnic zastępczych obiektów zawieszonych w płynie wykazują dalej rozkład dwumodalny (Ryc.19 oraz Ryc.20). Najprawdopodobniej związane jest to z różnorodną strukturą wewnętrzną płynu. Można przypuszczać, że występują w nim dwie populacje obiektów o różnych właściwościach tworzące swoje rozkłady rozmiarów średnic. Jedną z nich to małe obiekty, do których zaliczymy między innymi elementy rozpadu komórek, a drugą to większe obiekty, wśród których możemy wymienić różnego rodzaju komórki np. limfocyty, monocyty, makrofagi, granulocyty, erytrocyty czy komórki nabłonka wyściółki dróg płynu mózgowo-rdzeniowego [99].

Wartości współczynnika zmienności struktury obiektów, wyznaczone ze wzoru (18), które odpowiednio wynoszą, dla grupy płynu kontrolnego - 37,16%, dla grupy płynu badanego A: poszerzony układ komorowy - 53,39% oraz dla grupy płynu badanego B: wodogłowie wewnętrzne - 55,08%, świadczą o dużej zmienności wewnątrz struktury obiektów występujących w wymienionych grupach płynu. Zbliżone wartości współczynnika zmienności struktury dla grupy płynu A i B wskazują na podobne zróżnicowanie obiektów występujących (umownie nazwanych - małymi i dużymi obiektami) w obu grupach badanego płynu mózgowo-rdzeniowego. Nie informują nas jednakże o różnicach, jakie ewentualnie, istnieją między tymi grupami dla rozkładów średnic zastępczych małych i dużych obiektów.

Następstwem tego stwierdzenia oraz tego, że rozkłady są dwumodalne, a wartości współczynnika zmienności struktury w poszczególnych grupach są duże, jest podział każdego z rozkładów na dwa. Wartością graniczną rozdziału rozkładów dla wyżej wymienionych grup płynu mózgowo-rdzeniowego ustaloną w oparciu o analizę przebiegu rozkładów średnic zastępczych obiektów jest wartość 4,5 μ m (Ryc.21). W związku z

tym szeregi rozkładów średnic dla poszczególnych grup płynu podzielono na szeregi małych obiektów - szereg o średnicach obiektów $\leq 4,5\mu\text{m}$ (Ryc.22-24) oraz szeregi dużych obiektów - szereg o średnicach obiektów $> 5\mu\text{m}$ (Ryc.25-27).

Mając na uwadze, że rozkład dwumodalny często jest złożeniem dwóch rozkładów normalnych [100], otrzymane szeregi dla grupy małych i dużych obiektów poddano testowaniu statystycznemu w celu sprawdzenia normalności rozkładów średnic obiektów. Do tego celu wykorzystano test normalności rozkładu Shapiro-Wilka [88]. Postawiono dwie hipotezy:

- (H_0) rozkłady średnic obiektów mają rozkład normalny
- (H_1) rozkłady średnic obiektów nie mają rozkładu normalnego

W oparciu o statystykę W na poziomie istotności $\alpha = 0,05$, dla małych obiektów, wyliczoną ze wzoru (20), która odpowiednio wynosiła dla płynu kontrolnego - 0,96, dla płynu A: poszerzony układ komorowy - 0,8548 i dla płynu B: wodogłowie wewnętrzne - 0,8408 oraz o statystykę $W_\alpha = 0,818$ odczytaną z tablic rozkładu [101] stwierdzono, że nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy H_0 . Można twierdzić z 95% prawdopodobieństwem, że rozkłady średnic małych obiektów spełniają warunki rozkładu normalnego.

W przypadku dużych obiektów, porównując wartość statystyki W i W_α , na poziomie istotności $\alpha = 0,05$ hipotezę H_0 odrzucono.

Z analizy rozkładów średnic zastępczych dużych obiektów (Ryc.25-27) wynika, że są one asymetryczne. Jednakże w oparciu o wartości zawarte w tabeli XVI możemy stwierdzić, że dla dużych obiektów trudno jest określić skośność, szczególnie w przypadku płynu kontrolnego i płynu pochodzącego od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym, ponieważ wartości współczynników są bliskie zeru i wynoszą odpowiednio 0,04 i 0,02. Potwierdzają to również wyniki obliczeń współczynnika skośności (siła asymetrii) przedstawione w tabeli XVII.

Wydaje się, że skośność rozkładów dużych obiektów jako wskaźnik różnicowania rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w płynie jest obarczona zbyt dużym błędem aby wykorzystywać ją w porównywaniu płynów.

Porównując rozkłady średnic obiektów występujących w grupach płynu mózgowo-rdzeniowego wyznaczono wskaźnik podobieństwa struktur obiektów w płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznany poszerzonym układem komorowym (płyn badany A) i w płynie pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym (płyn badany B) dla małych (Tabela XVIII) i dużych obiektów (Tabela XIX). Wynika z nie-

go, że struktury małych obiektów w płynie pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym różnią się w 46% od struktury obiektów w płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem wodogłowiem. Dla dużych obiektów różnica między płynami wynosi około 40%. Wartość wskaźnika różnic struktur obiektów poniżej 50% świadczy o istotnym podobieństwie struktur, co jest oczywiste, ponieważ są to podgrupy wyodrębnione z grupy płynu prawidłowego, ale jednocześnie wartości te są na tyle znaczące, że można powiedzieć, iż płyny pochodzące od pacjentów z poszerzonym układem komorowym i wodogłowiem wewnętrznym różnią się między sobą strukturą obiektów.

Analizując wartości wskaźników podobieństwa struktur obiektów zawarte w tabeli XVIII i XIX można stwierdzić, że w przypadku małych obiektów ich struktura w płynie B (wodogłowiem wewnętrzne) jest bardziej podobna do płynu referencyjnego niż struktura płynu A (poszerzony układ komorowy). Różnica w podobieństwie wynosi około 20% na korzyść płynu z grupy B. Dla obiektów dużych różnica ta wynosi około 4%. Generalnie w całej swojej rozciągłości rozmiarów obiektów płyn z grupy B jest bardziej podobny do kontrolnego niż płyn z grupy A.

Mając na uwadze to, że przebiegi rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym mają kształt dwumodalny oraz to, że każda moda tworzy oddzielny rozkład o określonych parametrach można przypuszczać, że dla danej grupy płynu stosunek parametrów małych i dużych obiektów (I i II moda) jest wielkością charakterystyczną.

Analizując wartości względne zawarte w tabeli XXVII możemy stwierdzić, że wartość stosunku średniej średnicy zastępczej obiektów dużych i małych w przypadku płynu kontrolnego i płynu B (wodogłowiem wewnętrzne) jest zbliżona i wynosi odpowiednio 2,86 i 3,09. Świadczy to o tym, że średnia średnica dużych obiektów w obu płynach jest większa od średniej średnicy małych obiektów o k razy ($k \approx 3$). W przypadku płynu A (poszerzony układ komorowy) k wynosi około 3,6.

Wydaje się, że dobrym wskaźnikiem różnicującym niebarwiony płyn mózgowo-rdzeniowy jest względna wartość całkowitego pola powierzchni dużych i małych obiektów występujących w płynie. Jeżeli płyn mózgowo-rdzeniowy dąży do pewnej stabilizacji w określonym stanie chorobowym, to stosunek parametrów opisujących ten stan (np. pole powierzchni dużych i małych obiektów) powinien być stały dla danego stanu chorobowego i przypuszczalnie powinna istnieć wyraźna różnica wartości stosunku

parametrów między poszczególnymi grupami płynu powiązanych z określonymi stanami chorobowymi.

Tabela XXVII

Względne wartości średniej średnicy obiektu, całkowitego pola powierzchni obiektów oraz całkowitego obwodu obiektów w poszczególnych grupach płynu mózgowo - rdzeniowego

Porównywane obiektów płynu mózgowo-rdzeniowego	Względna wartość średniej średnicy obiektu	Względna wartość całkowitego pola powierzchni	Względna wartość całkowitego obwodu
Płyn: kontrolny - obiekty duże ----- Płyn: kontrolny - obiekty małe	2,86	1,82	0,79
Płyn A: poszerzony układ komorowy - obiekty duże ----- Płyn A: poszerzony układ komorowy - obiekty małe	3,61	21,06	6,96
Płyn B: wodogłowie wewnętrzne - obiekty duże ----- Płyn B: wodogłowie wewnętrzne - obiekty małe	3,09	9,08	3,12

Potwierdzają to wartości tego wskaźnika przedstawione w tabeli XXVII. W płynie A (poszerzony układ komorowy) jest on wyraźnie większy niż w płynie kontrolnym. W przypadku płynu B (wodogłowie wewnętrzne) również jest większy niż w płynie kontrolnym, ale już nie tak znacznie. W pierwszym przypadku wartość względnego całkowitego pola powierzchni obiektów jest większa o 19,24, a w drugim o 7,26.

W oparciu o przeprowadzoną analizę statystyczną rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w grupach badanego prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w płynie kontrolnym możemy stwierdzić, że zaobserwowane różnice między grupami A i B związanymi z określonym stanem chorobowym oraz płynem kontrolnym są na tyle istotne, iż przy zwiększonej liczbie pomiarów, kształty przebiegów rozkładów średnic zastępczych mogłyby stać się wzorcami płynu dla poszczególnych grup.

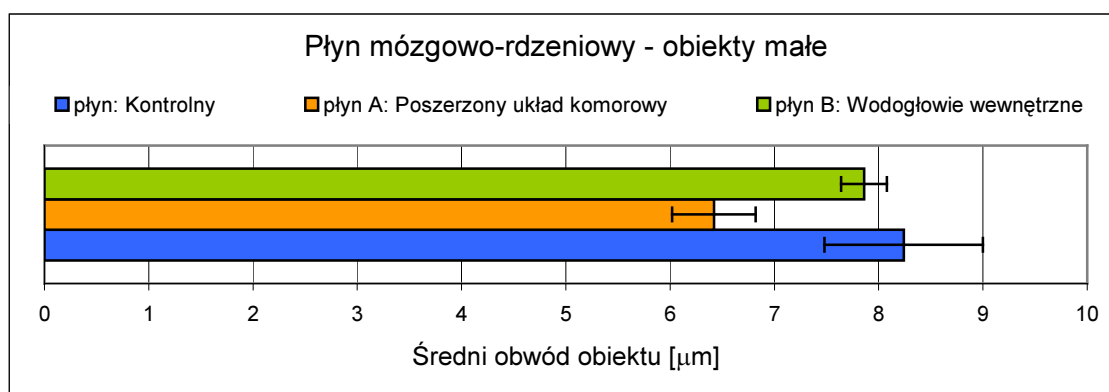
Podsumowując, standardowa metoda mikroskopowa z wykorzystaniem preparatu przygotowanego z płynu mózgowo-rdzeniowego nie poddanego żadnej obróbce technicznej pozwala uzyskać wyniki dotyczące geometrii obiektów w nim występujących, umożliwiające różnicować płyn mózgowo-rdzeniowy w powiązaniu z rozpoznaniem stanu chorobowego oraz znacznie skrócić czas pomiaru.

Drugim etapem niniejszej pracy było wyznaczenie wartości 9 wybranych parametrów (3 pojedynczych, 5 zbiorczych i jednego współczynnika kształtu [49]), charak-

teryzujących obiekty znajdujące się w płynie mózgowo-rdzeniowym pod względem ich ilości i geometrii kształtu. W oparciu o wyżej przedstawioną analizę, dotyczącą rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w płynie i ich struktur oraz o obrazy obiektów (Ryc.28, 29) można przypuszczać, że wartości parametrów geometrycznych obiektów są charakterystyczne dla poszczególnych grup płynu.

W pierwszej kolejności wyznaczono pojedyncze parametry obiektów: średni obwód, średnie pole powierzchni oraz średnią średnicę zastępczą małych i dużych obiektów dla płynu kontrolnego (Tabela XX). Następnie wyznaczono wartości tych samych parametrów dla płynu badanego A - pochodzącego od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (Tabela XXI) i płynu badanego B - pochodzącego od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym (Tabela XXII).

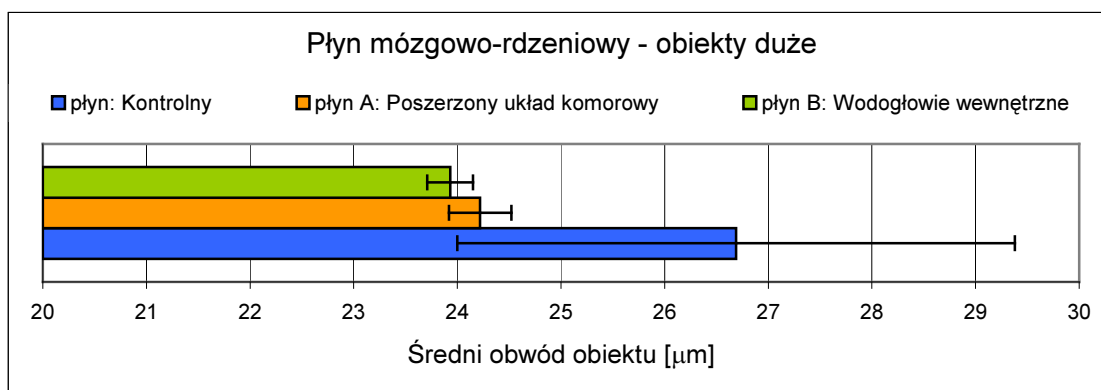
Porównując ze sobą wartości średnich obwodów obiektów występujących w płynie kontrolnym oraz w grupach badanego płynu: poszerzony układ komorowy (A) i wodogłowiu wewnętrznym (B) możemy zauważyć, że w przypadku małych obiektów (Ryc.31), największa średnia wartość obwodu obiektu jest w płynie kontrolnym i wynosi $8,24\mu\text{m}$. Krótszy o $1,82\mu\text{m}$ jest średni obwód obiektu w płynie pochodzącym od



Ryc.31. Średnie wartości obwodów, małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowcie wewnętrzne.

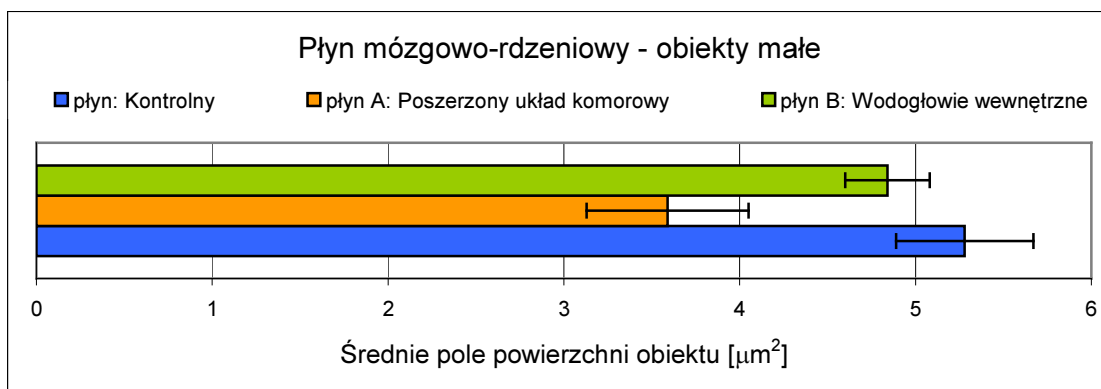
pacjentów z poszerzonym układem komorowym. W płynie pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym, wartość średniego obwodu obiektu jest zbliżona do wartości średniego obwodu obiektu z płynu kontrolnego i wynosi $7,86\mu\text{m}$. Różnica między grupami płynu A (poszerzony układ komorowy) a B (wodogłowcie wewnętrzne) w wartościach średniego obwodu obiektu jest na tyle duża, że parametr ten mógłby być dobrym parametrem różnicującym płyn mózgowo-rdzeniowy.

Niestety, w przypadku dużych obiektów parametr ten nie spełnia swojej roli. Wartości średniego obwodu obiektu w obu wymienionych wyżej grupach są niemal identyczne i wynoszą odpowiednio w grupie A - $24,22\mu\text{m}$ i B - $23,93\mu\text{m}$. Różnią się od wartości płynu kontrolnego, ale wszystkie wartości mieszczą się w granicach błędu (Ryc.32).



Ryc.32. Średnie wartości obwodów dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

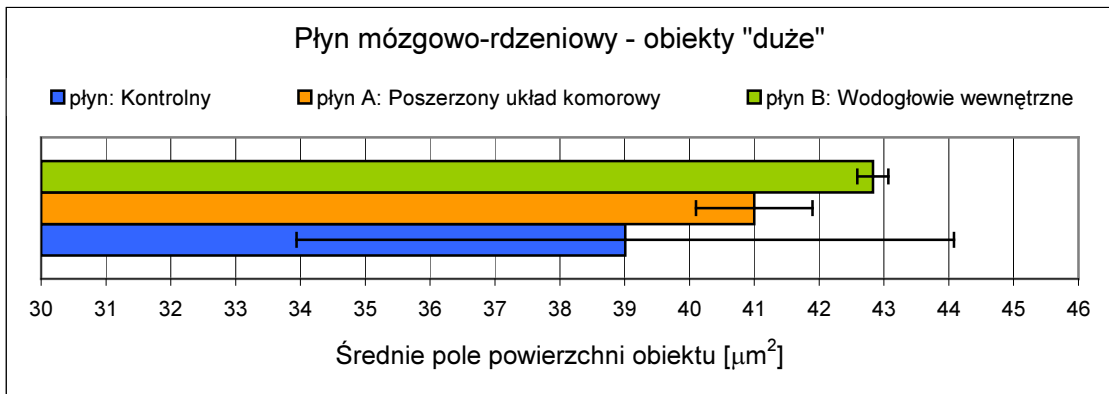
Ryciny 33 i 34 przedstawiają, odpowiednio dla małych i dużych obiektów, wartości kolejnego wyznaczonego parametru jakim była wartość średniego pola powierzchni obiektu.



Ryc.33. Średnie wartości pól powierzchni małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

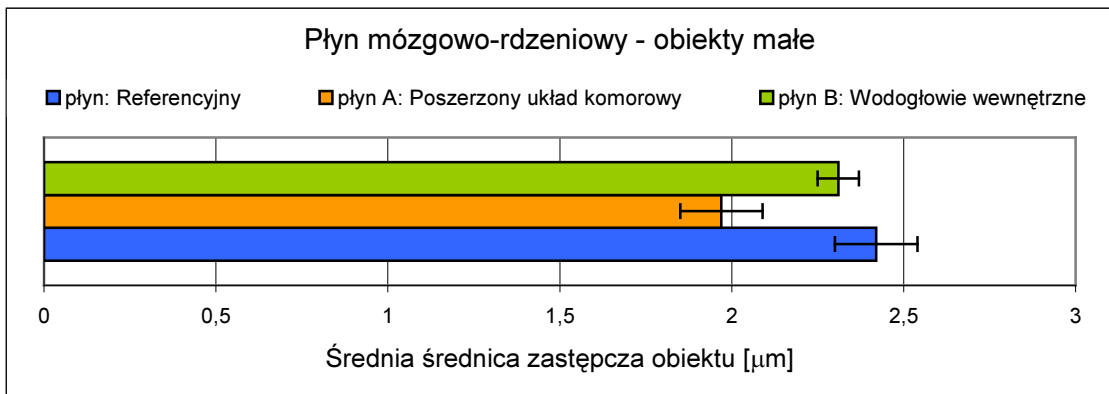
W przypadku małych obiektów największa wartość średniego pola powierzchni przypada na płyn kontrolny, najmniejsza na płyn - poszerzony układ komorowy. Różnice w wartościach średnich pól obiektów między płynem kontrolnym a płynem pochodzących od pacjentów z poszerzonym układem komorowym oraz między płynem kontrolnym a płynem pochodzącym od pacjentów z wodogłowie wewnętrznym wynosiły odpowiednio: $1,69\mu\text{m}^2$ i $0,44\mu\text{m}^2$, natomiast między płynami: poszerzony układ komorowy i

wodogłowie wewnętrzne różnica wynosiła $1,25\mu\text{m}^2$. Różnice między płynami są na tyle duże, iż parametr średniego pola obiektu może być użyty w różnicowaniu płynów. Biorąc pod uwagę duże obiekty wykorzystywanie tego parametru do różnicowania płynów nie jest tak oczywiste. Co prawda płyny A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) różnią się między sobą wartością średnich pól obiektów (Ryc.34), ale różnice między płynem kontrolnym a płynem grupy A czy B są w granicach błędu statystycznego.



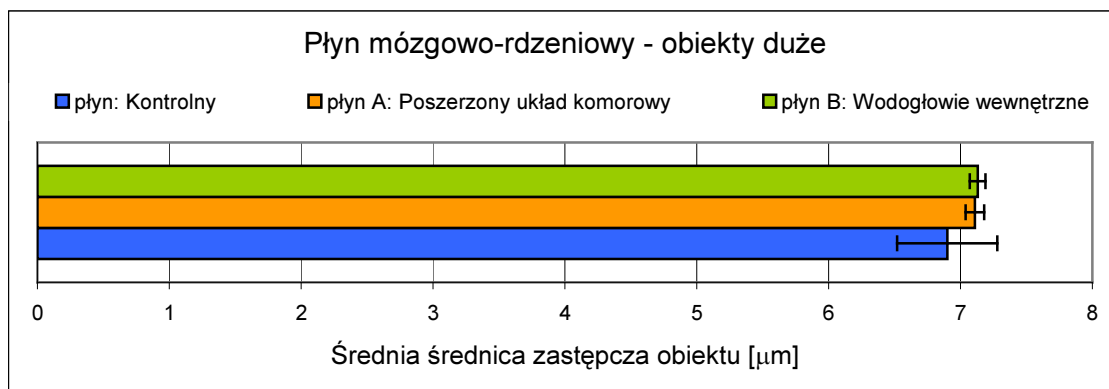
Ryc.34. Średnie wartości pól powierzchni dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

Podobnie jak poprzednie dwa parametry, tak i trzeci - średnia średnica zastępcza obiektu dobrze różnicuje tylko małe obiekty (Ryc.35). Wartości w tym przypadku dla płynu kontrolnego, płynu A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) wynoszą odpowiednio: $2,42\mu\text{m}$, $1,97\mu\text{m}$, $2,31\mu\text{m}$.



Ryc.35. Średnie wartości średnic zastępczych małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

Natomiast dla dużych obiektów (Ryc.36) wszystkie wartości mieszczą się w granicach błędu statystycznego i wynoszą odpowiednio dla płynu kontrolnego - $6,9\mu\text{m}$, dla A - $7,11\mu\text{m}$ i dla B - $7,13\mu\text{m}$.



Ryc.36. Średnie wartości średnic zastępczych dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

Z trzech wyznaczonych pojedynczych geometrycznych parametrów obiektów żaden nie różnicuje płynów w całej rozciągłości rozmiarów (małe i duże obiekty). Zarówno średni obwód obiektu, jak i średnie pole powierzchni obiektu czy średnia średnica zastępcza obiektu sprawdzają się dobrze tylko dla małych obiektów.

Wymienione parametry, dla dużych obiektów posiadają zbliżone wartości w poszczególnych grupach płynu. Na podstawie tego możemy wysnuć dwa wnioski.

Jeden, skoro wartości parametrów dużych obiektów dla grup płynu są zbliżone, mimo znacznej różnicy między nimi w podobieństwie struktur obiektów (wskaźnik podobieństwa struktur), prawdopodobnie proporcje poszczególnych rozmiarów obiektów w stosunku do całkowitej ilości obiektów w grupie są stałe.

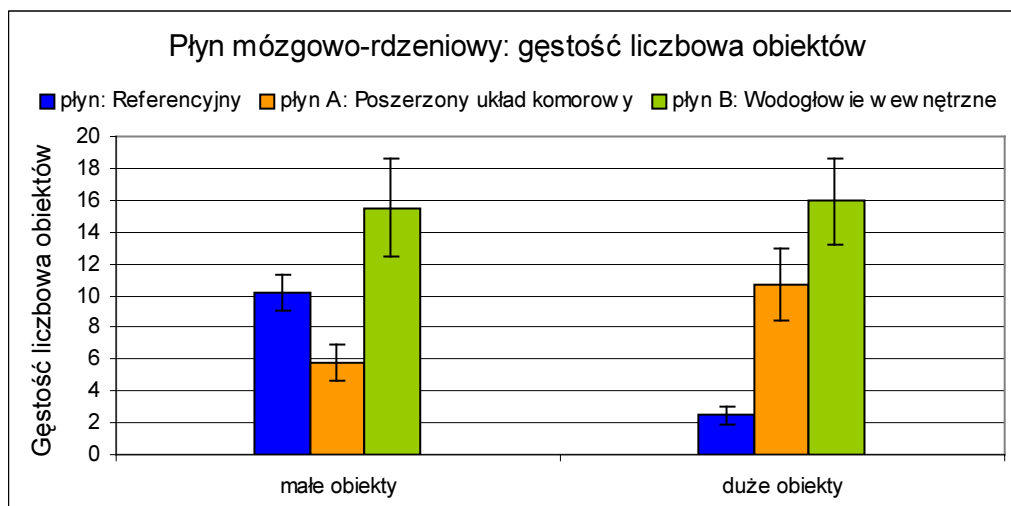
Drugi, że analizowane pojedyncze parametry geometryczne obiektów w przypadku dużych obiektów nie są dobrymi wskaźnikami różnicującymi płyn.

Istnieje zatem potrzeba znalezienia innych parametrów, które mogłyby różnicować rozkłady dużych obiektów.

Kolejnymi parametrami jakie poddano analizie były parametry zbiorcze obiektów [49]. Określono wartości pięciu parametrów.

Pierwszym parametrem zbiorczym, dotyczącym obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym, który wyznaczono, była gęstość liczbowa obiektów. Wartości liczbowe ilości obiektów przypadających na pole powierzchni ($0,2 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) obserwowanego preparatu przedstawiono w tabeli XXIII. Gęstość liczbowa małych

objektów w przypadku płynu kontrolnego wynosi 10,2 obiektu na pole obserwacji, a dużych obiektów - 2,5 obiektu na pole obserwacji. Porównanie gęstości liczbowej płynu kontrolnego z płynami A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) przedstawiono na rycinie 37.



Ryc.37. Gęstość liczbowo małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach: A – poszerzony układ komorowy, B – wodogłowie wewnętrzne.

Z wykresu wynika, że gęstość liczbowo obiektów w badanym płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem wodogłowie wewnętrznym (płyn B) jest większa od gęstości liczbowo obiektów w badanym płynie pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (płyn A), zarówno dla małych jak i dużych obiektów. W celu porównania płynów pod względem gęstości liczbowo obiektów, korzystając z danych tabelarycznych (Tabela XXIII), wyznaczono dla małych obiektów stosunek gęstości liczbowo obiektów płynu A (poszerzony układ komorowy) i obiektów płynu kontrolnego, który wynosił 0,57 oraz stosunek gęstości liczbowo obiektów płynu B (wodogłowie wewnętrzne) i obiektów płynu referencyjnego - 1,52, a dla dużych obiektów stosunek ten odpowiednio wynosił - 4,28 i 6,4. W przypadku płynu B (wodogłowie wewnętrzne) gęstość liczbowo małych i dużych obiektów jest większa niż w płynie kontrolnym, natomiast w płynie A (poszerzony układu komorowy) gęstość liczbowo jest większa tylko dla dużych obiektów. Różnice gęstości liczbowo w poszczególnych grupach płynu znacznie się różnią, co umożliwia wykorzystanie tego parametru do porównywania płynów.

Następnymi parametrami wyznaczonymi w niniejszej pracy były: bezwzględna i względna sumaryczna długość obwodów obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym kontrolnym i badanym. W oparciu o tabelę XXIV, w której przedstawiono

wyniki obliczeń wyżej wymienionych parametrów możemy stwierdzić, że bezwzględna sumaryczna długość obwodów obiektów w płynie B (wodogłowie wewnętrzne) wynosi odpowiednio dla małych obiektów 122 μm , a dla dużych obiektów 381 μm i jest w obu przypadkach większa od wartości tego parametru dla płynu A (poszerzony układ komorowy), który dla małych obiektów wynosił 37,1 μm , a dla dużych 258 μm . Porównując płyny A i B z płynem kontrolnym możemy zauważyć, że wartość bezwzględnej sumarycznej długości obwodów małych obiektów w płynie A jest mniejsza o 46,7 μm od wartości w płynie kontrolnym, a dla płynu B jest większa o 38,2 μm . Dla dużych obiektów wartość bezwzględnej sumarycznej długości obwodów obiektów w płynie A (poszerzony układ komorowy) jest większa o 191 μm , a w płynie B (wodogłowie wewnętrzne) większa o 314 μm od wartości tego parametru w płynie kontrolnym.

Wartości względnej sumarycznej długości obwodów obiektów dla płynu kontrolnego oraz badanego A i B w przypadku małych obiektów nie przekraczają 2% i wynoszą odpowiednio: płyn kontrolny - 1,05%, płyn badany A - 0,46% i płyn badany B - 1,53%. Dla dużych obiektów wartości parametru nie przekraczają 5% i wynoszą: płyn kontrolny - 0,83%, płyn badany A - 3,23% i płyn badany B - 4,77%. Wartość parametru w płynie B, zarówno dla małych jak i dużych obiektów jest większa niż w płynie A. Świadczy to o tym, że w płynie badanym B pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym jest więcej obiektów i są większe niż w płynie badanym A pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym.

Względna sumaryczna długość obwodu obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym wydaje się być bardziej przejrzystym parametrem i łatwiejszym do wykorzystania w dalszych analizach niż bezwzględna sumaryczna długość obwodów obiektów.

Ostatnimi dwoma wyznaczanymi zbiorczymi parametrami obiektów były bezwzględne i względne sumaryczne pole powierzchni obiektów zawieszonych w płynie mózgowo-rdzeniowym. Wartości wyznaczonych parametrów przedstawiono w tabeli XXV. Dla małych obiektów bezwzględne sumaryczne pole powierzchni w płynie A (poszerzony układ komorowy) wynosiło 20,8 μm^2 i było o 32,9 μm^2 mniejsze od wartości w płynie kontrolnym, natomiast w płynie B (wodogłowie wewnętrzne) stwierdzono wartość o 21,3 μm^2 większą od wartości płynu referencyjnego, wynoszącą 75 μm^2 . Wartość parametru w płynie A była około 3,6 razy mniejsza niż w płynie B. W przypadku dużych obiektów, wartości bezwzględnego sumarycznego pola powierzchni obiektów

występujących w płynie, były zarówno w badanym płynie A jak i B większe od wartości płynu kontrolnego. Dla płynu A (poszerzony układ komorowy) wartość ta była około 4,5 razy większa od wartości dla płynu kontrolnego a dla płynu B (wodogłowie wewnętrzne) około 7 razy większa. W płynie grupy B wartość bezwzględnego sumarycznego pola powierzchni dużych obiektów była większa o $243\mu\text{m}$ od wartości tego parametru w płynie grupy A.

Wartość względnego sumarycznego pola powierzchni małych obiektów dla płynu kontrolnego oraz płynu badanego grup A i B nie przekracza 0,1%, natomiast dla dużych obiektów wartość ta nie przekracza 0,4%. Pokrycie pola powierzchni analizowanego obszaru preparatu płynu mózgowo-rdzeniowego przez duże obiekty dla płynu kontrolnego jest 1,6 razy większe niż pokrycie tego obszaru przez małe obiekty. W przypadku płynu A (poszerzony układ komorowy) pokrycie to dla dużych obiektów jest 22-krotnie większe niż dla małych obiektów, natomiast w płynie B (wodogłowie wewnętrzne) jest ono 8,5 razy większe.

Wydaje się, że względny parametr sumarycznego pola obiektów, podobnie jak względna sumaryczna długość obwodów obiektów jest lepszym parametrem od bezwzględnego. Informacja procentowa, np. o pokryciu przez obiekty obserwowanej powierzchni jest bardziej czytelna niż podanie tylko wartości liczbowej w określonej jednostce pomiarowej.

Parametry zbiorcze są ze sobą ściśle powiązane. Jeśli zwiększy się gęstość liczbową obiektów, to zwiększy się bezwzględny sumaryczny obwód, bezwzględne sumaryczne pole powierzchni jak i względne ich wartości. Jednak jeżeli zwiększy się gęstość o kilka małych obiektów, to nie spowoduje takiej samej zmiany pozostałych parametrów jak zwiększenie gęstości o taką samą ilość dużych obiektów. Dlatego należy pamiętać, aby nie analizować płynu mózgowo-rdzeniowego pod kątem jednego parametru zbiorczego. W celu uniknięcia błędnych wniosków należy brać pod ocenę kilka parametrów jednocześnie.

Zaobserwowane w trakcie badań obiekty występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym posiadają różne kształty np. kształt koła czy elipsy o różnym stopniu spłaszczenia. W związku z powyższym, przy pomocy wzoru (25), wyznaczono współczynnik kolistości obiektów (Tabela XXVI), dla którego wartość równa jeden świadczy o kształcie idealnego koła.

Występujące różnice między wartościami współczynnika kolistości małych obiektów znajdujących się w płynie kontrolnym a wartościami współczynnika kolistości obiektów płynu A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) są niewielkie. Wskazują na to stosunki współczynników kolistości, których wartości odpowiednio wynoszą: współczynnik kolistości obiektów płynu A do współczynnika kolistości obiektów w płynie kontrolnego - 1,0714 oraz współczynnik kolistości obiektów płynu B do współczynnika kolistości obiektów płynu kontrolnego - 1,0133. Jednakże przy dokładnym wyznaczeniu wartości współczynników kolistości, dla których niepewności procentowe wynoszą odpowiednio: płyn kontrolny - 1,97%, płyn grupy A (poszerzony układ komorowy) - 1,27% i dla płynu grupy B (wodogłowie wewnętrzne) - 0,93%, mogą mieć istotne znaczenie.

W przypadku dużych obiektów, różnice między współczynnikami kolistości poszczególnych płynów są większe niż dla małych obiektów. Jeżeli jednak weźmiemy pod uwagę niepewność z jaką wyznaczono współczynnik kolistości obiektów płynu referencyjnego, wynoszącą - 7,5%, to uwzględniając ten fakt, stosunki współczynników zmniejszają swoją wartość i wynoszą wtedy: współczynnik kolistości obiektów płynu A do współczynnika kolistości obiektów płynu kontrolnego - 1,0524 oraz współczynnik kolistości obiektów płynu B do współczynnika kolistości obiektów płynu kontrolnego - 1,0834.

Współczynniki kolistości obiektów płynów A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) są większe od współczynnika kolistości płynu kontrolnego zarówno dla małych jak i dużych obiektów o około 10% (uwzględniając niepewność dużych obiektów).

Różnice wartości między współczynnikami kolistości obiektów w poszczególnych płynach umożliwiają różnicowanie płynu mózgowo-rdzeniowego.

W oparciu o dane zawarte w tabeli XXVI można stwierdzić, że małe i duże objekty płynu kontrolnego oraz badanego A i B mają kształty zbliżone do koła. W przypadku płynu kontrolnego, współczynnik kolistości dla dużych obiektów wynosi 0,787. Świadczy to o tym, że w płynie najprawdopodobniej występują produkty rozpadu komórek, które mają kształty owalne lub istnieją komórki zdeformowane czasowo. Skoro wartości współczynnika kolistości obiektów dla płynu A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) są większe w niektórych przypadkach od odpowiedniego współczynnika płynu kontrolnego, to nasuwa się w konsekwencji powyższego rozumo-

wania, pytanie. Dlaczego w tych płynach jest więcej obiektów zbliżonych kształtem do koła, a mniej spłaszczonych w porównaniu z obiektami płynu kontrolnego?

Przeprowadzona analiza parametrów geometrycznych, charakteryzujących obiekty występujące w niebarwionym płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje, że analizowane parametry posiadają różną „istotność” charakteryzowania płynu, co rzutuje na ich ewentualną przydatność w różnicowaniu płynu. W tabeli XXVIII przedstawiono parametry oraz zaznaczono sugestie o ich ewentualnej przydatności do różnicowania płynów. Określenie „+” oznacza, że parametr dobrze różnicuje niebarwiony płyn mózgowo-rdzeniowy (wyraźna różnica wartości parametru między grupami płynu).

Tabela XXVIII

Istotność parametrów geometrycznych charakteryzujących obiekty występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym, do różnicowania płynu

Nazwa parametru	Istotność parametru do oceny płynu	
	małe obiekty	duże obiekty
Średni obwód obiektu	+	wątpliwa
Średnie pole powierzchni obiektu	+	wątpliwa
Średnia średnica zastępcza obiektu	+	wątpliwa
Gęstość liczbowa obiektów	+	+
Bezwzględna sumaryczna długość obwodów obiektów	wątpliwa	wątpliwa
Względna sumaryczna długość obwodów obiektów	+	+
Bezwzględne sumaryczne pole powierzchni obiektów	wątpliwa	wątpliwa
Względne sumaryczne pole powierzchni obiektów	+	+
Średni współczynnik kolistości obiektów	+	+

Metoda mikroskopowa określania liczby komórek w płynie mózgowo-rdzeniowym jest znana od bardzo wielu lat i istnieje wiele doniesień literaturowych dokumentujących badania naukowe z wykorzystaniem tej metody.

Jednakże wykorzystanie metody mikroskopowej do badań rozkładów dyspersyjnych rozmiarów obiektów występujących w płynie oraz ich związków z określonym stanem chorobowym jest zagadnieniem mało rozpoznanym i brak jest dostępnej informacji na ten temat. W pracy podjęto próbę opracowania alternatywnej metodyki badań mikroskopowych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym, uwzględniającej ich rozmiary. Uzyskane wyniki pozwoliły na wyznaczenie parametrów geometrycznych obiektów, które charakteryzują płyn mózgowo-rdzeniowy pochodzący od pacjentów o określonym stanie chorobowym.

9. WNIOSKI

1. Stosowanie do analizy niebarwionego, nieprzetworzonego płynu mózgowo-rdzeniowego, umożliwia jego mikroskopową analizę pod względem liczby obiektów w nim zawieszonych oraz ich rozmiarów. W efekcie przyczynia się to do skrócenia czasu przygotowania preparatu i całkowitego czasu pomiaru.
2. Analiza szeregów rozdzielczych średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje, że rozkłady rozmiarów średnic obiektów w poszczególnych grupach płynu są dwumodalnymi, złożonymi z rozkładu małych obiektów oraz z rozkładu dużych obiektów. Rozkłady małych obiektów są rozkładami normalnymi, natomiast rozkłady dużych obiektów są rozkładami asymetrycznymi, o słabej skośności, zbliżonymi do normalnego.
3. Wyznaczone wartości wybranych parametrów geometrycznych obiektów występujących w płynie oraz wartości wielkości charakteryzujących szeregi średnic zastępczych obiektów są na tyle istotne statystycznie, iż mogą posłużyć jako wskaźniki różnicowania płynu, dostarczając jednocześnie dodatkowych informacji na temat płynu związanego z określonym stanem chorobowym.
4. Opracowana metoda mikroskopowej analizy obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym może stanowić alternatywną, w stosunku do standardowej, bądź uzupełniającą metodę badania tego płynu.

10. PIŚMIENICTWO

1. Bhawe G., Neilson E.G., 2011; „*Body Fluid Dynamics: Back to the Future*”, Journal of the American Society of Nephrology, Volume 22, Number 12, pp.2166-2181.
2. *Encyklopedia biologiczna.*, 1999; Agencja Publicystyczno-Wydawnicza Opres, Kraków, Tom VIII, strona 263/476
3. Pearce J.M.S, 2004; “*Cotugno and cerebrospinal fluid*”, Journal of Neurology, Neurosurger and Psychiatry, Volume 75 (9), p.1299.
4. Peltier L.F., 1988; “*The First Description of the Spinal Fluid*”, Clinical Orthopaedics Related Research, February; 227, p.6-9.
5. Craighead W. Edward (red.), Nemeroff Charles B. (red.), 2004; “*The Concise Corsini Encyklopedia of Psychology and Behavioral Science*”, Wydawnictwo WILEY, New York 2004, p. 118/1112.
6. Weed L.H., 1922; “*The cerebrospinal fluid*”, Physiological Reviews, Volume II, No2, April.
7. Key G., Retzius A., 1876; *Studien in der Anatomie des Nervensystems und des Bindegewebe.*Stocholm, Samson and Wallin.
8. Lewczuk P., Mantur M., 2002; „*Płyn mózgowo-rdzeniowy. Badanie i interpretacja wyników.*”, Wydawnictwo Ekonomia i Środowisko, Białystok, s.102.
9. Uszyński M. (red.), 1998; „*Płyny z jam ciała.*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 1998.
10. Wright E.M., 1978; “*Transport processes in the formation of the cerebrospinal fluid*”, Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology, Springer-Verlag, Volume 83, pp.1-34.
11. Zaidat O., Levner A., 2010; „*Neurologia*”, Wydawnictwo Elsevier Urban&Partner, Wrocław, str.666.
12. Skipor J., Thiery J., 2008; “*The choroids – cerebrospinal fluid system: Undervaluated pathway of neuroendocrine signaling into the brain.*”, Acta Neurobiologiae Experimentalis, Volume 68(3), pp.414-428.
13. Chen C., Chen R., Preston J., 2012; „*The influence of ageing in the cerebrospinal fluid concentrations of proteins that are from the choroids plexus, brain, and plasma.*”, Experimental Gerontology, Volume 47(4), pp.323-328.
14. Johanson C.E., Duncan J.A., Klinge P.M., Brinker T., Stopa E.G., Silverberg G.D., 2008; “*Multiplicity of cerebrospinal fluid functions: New challenges in health and disease.*”, Cerebrospinal Fluid Research, 2008, Volume 5:10, pp.1-32.

15. LifeART Collection Images, 1989-2001, Lippincott Williams & Wilkins
16. Adamek D., 2006; „*Badania płynu mózgowo-rdzeniowego w chorobach rdzenia.*”: „*Choroby rdzenia kręgowego*” - Banach M., Bogucki A., Liberski P., Wydawnictwo Medycyna Praktyczna, Kraków, s.36-40/163.
17. Hermann M., Bobek-Billewicz B., 1999; „*Badanie przepływu płynu mózgowo-rdzeniowego i prędkości przepływu krwi w tętnicach domózgowych za pomocą rezonansu magnetycznego.*”, *Polski Przegląd Radiologii*, Tom 64(3), s.207-209.
18. Brinker T., Stopa E., Morrison J., Klinge P., 2014; „*A new look at cerebrospinal fluid circulation.*”, *Fluids and Barriers of the CNS*, 2014, Volume 11:10, pp.1-16.
19. Dawson H., Welch K., Segal M.B., 1987; “*Physiology and pathophysiology of the cerebrospinal fluid*”, Churchill Livingstone, Edyinburgh UK, New York, p.1013.
20. Sokołowski R., Targowski T., 2012; „*Inwazyjna choroba meningokokowa.*”, *Polski Merkuriusz Lekarski*, Tom 33(197), s.255-260.
21. Smith K.D., Zhu L., 2010; “*Brain hypothermia induced by cold spinal fluid using a torso cooling pad: theoretical analyses.*”, *Medical & Biological Engineering & Computing*, Volume 48(8), pp.783-791.
22. Heydari M., Jani S., 2010; „*An ellipsoidal model for studying response of head impacts.*”, *Acta of Bioengineering and Biomechanics*, Volume 12(1), pp.47-53.
23. Citow J., Macdonald R., Refai D., 2009; “*Comprehensive Neurosurgery Board Review.*”, Thieme Medical Publishers, Inc New York, p.2/576.
24. Peratta C., Peratta A., 2010; “*Modelling the Human Body Exposure to ELF Electric Fields.*”, WIT Press, Southampton, UK, p.130.
25. Bloomfield I., Johnston I., Bilston L., 1998; “*Effects of Proteins, Blood Cells and Glucose on the Viscosity of Cerebrospinal Fluid.*”, *Pediatric Neurosurgery*, Volume 28, pp.246-251.
26. Latikka J., Kuurne T., Eskola H., 2001; „*Conductivity of living intracranial tissues.*” *Physics in Medicine and Biology*, Volume 46(6), pp.1611-1616.
27. Informacja własna – test organoleptyczny.
28. Segal M., 2000; “*The Choroid Plexuses and the Barriers Between the Blood and the Cerebrospinal Fluid.*”, *Cellular and Molecular Neurobiology*, Volume 20(2), pp.183-196.
29. Fishman R., 1992; “*Cerebrospinal Fluid in Diseases of the Nervous System*”, Saunders Co, Philadelphia-London-Toronto-Montreal-Sydney-Tokyo, p.431.

30. Thompson E., 2005; "*Protein of the Cerebrospinal Fluid - Analysis and Interpretation in the Diagnosis and Treatment of Neurological Disease*", Elsevier Academic Press, New York, p.332.
31. Barber A., Lovato J., Hill G., McLean T., 2008; "*Measurement of cerebrospinal fluid protein is unnecessary in children with leukemia*", Pediatric Blood & Cancer, Volume 51(3), pp.428-430
32. Caquet R., 2012; „250 badań laboratoryjnych.”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str. 558
33. Kokot F., Hyla-Klekot L., Kokot S., 2011; „*Badania Laboratoryjne – zakres norm i interpretacja.*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str.376
34. Pigoń K., Ruziewicz Z., 2009; „*Chemia Fizyczna – podstawy fenomenologiczne*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, Tom I, str.638.
35. Lewczuk P., Reiber H., Ehrenreich H., 1998; "*Prothombin in normal human cerebrospinal fluid originates from the blood*", Neurochemical Research, Volume 23(8), pp.1027-30.
36. Staroń W., „*Kolekcja własnych rysunków*”.
37. Kulawik A., Tal-Figiel B., 2008; „*Farmaceutyczne Układy Rozproszone*”, Czasopismo Techniczne, (z.13, 1-Ch), str. 31-44, Wydawnictwo Politechniki Krakowskiej.
38. Dutkiewicz E.T., 1998; „*Fizykochemia powierzchni*”, Wydawnictwo Naukowo-Techniczne, Warszawa, str.242.
39. Atkins P. W., 2001; „*Chemia Fizyczna*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.938.
40. Klaine J.S., Alvarez P.J., Batley G.E., Fernandes T.F., Handy R.D., Lyon D.Y., Mahendra S., McLaughlin J., Lead J.R., 2008; „*Nanomaterials in the Environment: Behavior, Fate, Bioavailability and Effects.*”, Environmental Toxicology and Chemistry, Volume 27, Number 9, pp.1825-1851.
41. Janicki S, Fiebig A, Sznitowska M, Achmatowicz T., 2003; „*Farmacja stosowana*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa
42. Sonntag H., 1999; „*Koloidy*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa
43. Haw M.D., 2002; „*Colloidal suspensions, Brownian motion, molecular reality: a short history.*”, Journal of Physics: Condensed Matter, Volume 14, Number 33, pp.7769-7779.
44. Staroń W., Herbowski L., 2006; „*Ruchy cząsteczek zawieszonych w niebarwionym płynie mózgowo-rdzeniowym.*”, Komputerowe Wspomaganie Badań Naukowych, Wydawnictwo Wrocławskiego Towarzystwa Naukowego, Wrocław, Tom 13, s.183-187.

45. Jaroszyk F., Pilawski A; 2008; „*Dyfuzja*”: „*Biofizyka*” – Jaroszyk F., Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str.167-168/911.
46. Boeker E., Grondelle R., 2002; „*Fizyka Środowiska*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.517.
47. Landau L.D., Lifszyc J.M., 2009; „*Hydrodynamika*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.672.
48. Atkins P.W., 1999; „*Podstawy Chemii Fizycznej*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.644.
49. Zieliński K.W., Strzelecki M., 2002; „*Komputerowa Analiza Obrazu Biomedycznego - Wstęp do morfometrii i patologii ilościowej.*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa-Łódź, 2002, str.368
50. Heng R.L., Lee E., Pilon L., 2014; “*Radiation characteristics and optical properties of filamentous cyanobacterium Anabaena Cylindrica*”, Journal of the Optical Society of America A, Volume 31, Issue 4, pp.836-845.
51. Skoczyńska A., Kadłubowski M., Hryniewicz W., 2004; „*Zasady postępowania w przypadku zakażeń ośrodkowego układu nerwowego wywołanych przez NEISSERIA MENINGITIDIS i inne drobnoustroje.*”, α-medica press, Bielsko-Biała, 2004, str.62.
52. Podemski R. (red.), 2008; „*Kompendium Neurologii*”, Copyright Via Medica, Gdańsk, str.588.
53. Berlit P., 2008; „*Neurologia-Kompedium*“, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str.420.
54. Plecka P., 2010; „*Nowoczesna diagnostyka i leczenie dokanałowe nowotworowego zapalenia opon mózgowo-rdzeniowych w guzach litych u dorosłych.*”, Onkologia w Praktyce Klinicznej, Tom 6, nr 3, str. 97-103, Copyright Via Medica.
55. Fischbach F.T., Dunning III M.B., 2009; „*A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests.*”, Wydawnictwo Wolters Kluwer/Lippincott Williams&Wilkins, Philadelphia, p.1317.
56. Prusiński A., 2003; „*Neurologia Praktyczna*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, str.500.
57. Rowland L.P., 2008; “*Neurologia Merritta*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, Tom 1, str.382.
58. Dembińska-Kieć A. (red.), Naskalski J. (red.), 2010; „*Diagnostyka Laboratoryjna z elementami biochemii klinicznej.*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, str 1120.

59. Petzold A., Keir G., Sharpe T., 2005; „*Why human Color Vision Cannot Reliably Detect Cerebrospinal Fluid Xanthochromia.*”, Copyright American Heart Association, Dallas, <http://stroke.ahajournals.org/36/6/1295.full.pdf>, pp.1295-97, DOI: 10.1161/01.STR.0000166344.75440.b9
60. Linn F., Voorbij H., Rinkel G., 2005; „*Visual inspection versus spectrophotometry in detecting bilirubin in cerebrospinal fluid.*”, Journal Neurology, Neurosurgery & Psychiatry, Volume 76(10), pp.1452-1454.
61. Meyer-Arendt J.R., 1977; „*Wstęp do optyki*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.470.
62. Brunzel N.A., 2010; „*Diagnostyka Laboratoryjna – Płyn mózgowo-rdzeniowy i inne płyny ustrojowe.*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, Tom 2, str.476.
63. Zaidat O., Lerner A., 2010; „*Neurologia – The Little Black Book*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, str.666.
64. Boon N.A., Colledge N.R., Walker B. R., Hunter J.A., 2010; „*Choroby wewnętrzne Davidsona*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, Tom 3, str.1304.
65. Pawlik-Sobecka L. (red), Placzkowska S.(red.), 2010; „*Podstawy diagnostyki laboratoryjnej.*”, Wydawnictwo: Akademia Medyczna we Wrocławiu, Wrocław, str.98.
66. Józwiak Z. (red.), Bartosz G. (red.), 2005; „*Biofizyka-Wybrane zagadnienia wraz z ćwiczeniami*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, (str.556)
67. Tomaszewski J., 2001; „*Diagnostyka laboratoryjna – podręcznik dla studentów medycyny*”, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa, (str. 416)
68. Pagana K., Pagana T., 2013; „*Testy laboratoryjne i badania diagnostyczne w medycynie.*”, Wydawnictwo Elsevier Urban&Partner, Wrocław, str.1000.
69. Mumenthaler M., Mattle H., 2001; „*Neurologia*”, Wydawnictwo Urban & Partner, Wrocław, str.914.
70. Vandepitte J., Verhaegen J., Engbaek K., Rohner P., Piot P., Heuck C.C., 2003; „*Basic laboratory procedures in clinical bacteriology.*”, World Health Organization, Geneva, p.168.
71. www.brand.de/pl/produkty/laboratorium-kliniczne/komory-zliczeniowe, godzina 17:00, 17.05.2014,.
72. Strasinger S.K., Di Lorenzo M.S., 2008; „*Urinalysis and Body Fluids*”, Wydawnictwo F.A. Davis Company, Philadelphia, USA, p.320.
73. Edis R., 2014; „*Lumbar puncture and CSF examination.*”: “Hankey’s Clinical Neurology” – Gorelick P.B., Testai F., Hankey G., Wardlaw J.M., Wydawnictwo Taylor&Francis Group, Boca Roton, USA, pp.42-45/976

74. Cibas E.S., 2009; “*Cerebrospinal Fluid*”: “Cytology: Diagnostic Principles and Clinical Correlates” - Cibas E.S., Ducatman B., Wydawnictwo Elsevier Health Sciences, Philadelphia, USA, p.171-196/537
75. Bandy B., 2010; “*Laboratory Examination of Miscellaneous Body Fluids*”: “Medical Laboratory Technology” – Mukherjee K.L., Wydawnictwo Tata McGraw-Hill Education, New Delhi, India, Volume 2, pp.771-795/1097.
76. Adamek D., 2006; “*Badanie płynu mózgowo-rdzeniowego w chorobach rdzenia*”: „Choroby rdzenia kręgowego” - Banach M., Bogucki A., Liberski P., Medycyna Praktyczna, Kraków, str.36-40/163.
77. Brunzel N.A., 2010; „*Diagnostyka Laboratoryjna – Płyn mózgowo-rdzeniowy i inne płyny ustrojowe*”, Elsevier Urban & Partner, Wrocław, Tom 1, str.476.
78. Nikon - <http://www.microscopyu.com/articles/phasecontrast/phasemicroscopy.html>
79. Ślósarska G., 2011; „*Biofizyka molekularna – Zjawiska-Instrumenty-Modelowanie*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, stron 600.
80. Hecht. E., 2012; „*Optyka*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.713.
81. Wojtaszek P. (red.), Woźny A. (red.), Ratajczak L. (red.), 2006; *Biologia komórki roślinnej – Struktura*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.478.
82. Prospekt reklamowy mikroskopu, „*Biological Microscopes E600/E400*”
83. http://www.microscopedealer.com/products/imagearchiving/nikon_dxm1200.php, godzina 20:00, 04.04.2014.
84. Instructions, „*Microscope ECLIPSE E600*”, Nikon
85. Instructions, „*C-C Phase Contrast Turrent Condenser*”, Nikon
86. Ratajczyk F., Lewowska L., 1999; „*Ćwiczenia laboratoryjne z fizyki – Optyka*”, Tom IV, Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław, str.244.
87. Zeliaś A., Pawełek B., Wanat S., 2002; „*Metody statystyczne*”, Polskie Wydawnictwo Ekonomiczne, Warszawa, str.463.
88. Watała C., 2002; „*Biostatystyka – wykorzystanie metod statystycznych w pracy badawczej w naukach biomedycznych.*”, Wydawnictwo α -medica pres, Bielsko Biała, str.429.
89. Sobczyk M., 2007; „*Statystyka*”, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa, str.427.
90. Sobczyk M., 1998; „*Statystyka – Podstawy teoretyczne*”, Wydawnictwo Uniwersytetu Marii Curie-Skłodowskiej, Lublin, str.407.

91. Deisenhammer F., Bartos A., Egg R., Gilhus N.E., Giovannoni G., Rauer S., Sellebjerg F., 2006; „*Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force*”, European Journal of Neurology, 2006, Volume. 13: pp.913–922.
92. Sidorkiewicz I., Mantur M., 2013; „*Standardy badania płynów z jam ciała*”, Diagnosta Laboratoryjny, Numer - 3 (32)/2013, s.15-17.
93. Abdul-Karim F.W., Brainard J., Michael C.W., 2011; “*Cytopathology*”: „*Essentials of Anatomic Pathology*” - Cheng L., Bostwick D.G., Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, pp.3-102/1894.
94. Staron W.: Kolekcja zdjęć autorskich.
95. Estridge B.H., Reynolds A.P., 2011; „*Basic Clinical Laboratory Techniques*”, Wydawnictwo Cengage Learning, p.910.
96. Young B., Lowe J.S., Stevens A., Heath J.W., 2006; “*Wheater’s Functional Histology: A Text and Colour Atlas*”, Churchill Livingstone & Elsevier, Philadelphia, p.437.
97. Kluge H., Linke E., Wiczorek V., Zimmermann K., Kuehn H.J., 2007; „*Cell Populations in the Normal Cerebrospinal Fluid*“;: “*Atlas of CSF Cytology*” – Kluge H., Wiczorek V., Linke E., Zimmermann K., Isenmann S., Witte O.W., Wydawnictwo Thieme, Stuttgart, Germany, pp.13-20/151
98. Shahbaba B., 2011; „*Biostatistics with R: An Introduction to Statistics Through Biological Data*”, Springer, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, p.368.
99. Adam P., Sobek O., Taborsky L., Prucha M., Zacek P., 2002; „*Cerebrospinal fluid cytology*”, Riv Med Lab - JLM, Vol. 3, N. 2-S1, pp.46-51.
100. Glaser A.N., 2013; “*High-Yield: Biostatistics, Epidemiology, and Public Health*”, Lippincott Williams & Wilkins – Wolters Kluwer business, Baltimore, Philadelphia, p.168.
101. Zieliński R., Zieliński W., 1990; „*Tablice statystyczne*”, PWN, Warszawa, str.456.

WYKAZ RYCIN

Rycina 1.	Fragment splotu naczyńnkowego.	6
Rycina 2.	Sploty naczyńnkowe komór mózgowych.	6
Rycina 3.	Połączenia komór mózgowych.	7
Rycina 4.	Cyrkulacja płynu mózgowo-rdzeniowego wokół mózgu i rdzenia kręgowego.	7
Rycina 5.	Podział układów dyspersyjnych ze względu na jednorodność fazy rozproszonej.	11
Rycina 6.	Średnica zastępcza obiektu - średnica okręgu o polu powierzchni równym polu obiektu.	18
Rycina 7.	Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w ośrodku dla dwóch różnych stężeń obiektów.	18
Rycina 8.	Komora Fuchsa-Rosenthala.	24
Rycina 9.	Komora Neubauera.	25
Rycina 10.	Bieg promieni świetlnych w mikroskopie kontrastowo-fazowym. ...	29
Rycina 11.	Mikroskop optyczny Nikon „Eclipse E600”.	30
Rycina 12.	Kamera mikroskopowa <i>DXM 1200</i> Nikon.	31
Rycina 13.	Stolik Bürkera - widok z góry oraz boczny.	32
Rycina 14.	Siatka pomiarowa komory Bürkera z zaznaczonymi wybranymi polami pomiarowymi.	33
Rycina 15.	Obwód obiektu.	34
Rycina 16.	Pole powierzchni obiektu.	34
Rycina 17.	Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wadą wrodzoną (torbiel szyszynki).	40
Rycina 18.	Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu - grupa badana.	40
Rycina 19.	Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym - grupa A płynu badanego.	42
Rycina 20.	Procentowy rozkład średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym - grupa B płynu badanego.	42

Rycina 21.	Porównanie rozkładów średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym: kontrolnym i pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego) i wodogłowiem wewnętrznym (grupa B płynu badanego).	43
Rycina 22.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym.	45
Rycina 23.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznany poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego).	45
Rycina 24.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla małych obiektów występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznany wodogłowiem wewnętrznym (grupa B płynu badanego).	45
Rycina 25.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym.	46
Rycina 26.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznany poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego).	46
Rycina 27.	Procentowy rozkład liczebności średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznany wodogłowiem wewnętrznym (grupa B płynu badanego).	46
Rycina 28.	Obrazy obiektów zaobserwowanych w niebarwionym prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym.	53
Rycina 29.	Obrazy wybranych etapów łączenia się dwóch obiektów, występujących w badanym płynie mózgowo-rdzeniowym, w agregaty - dwa górne obiekty.	55
Rycina 30.	Przebiegi dystrybuant średnic zastępczych, obiektów występujących w kontrolnym płynie mózgowo-rdzeniowym oraz płynie badanym (A) - poszerzony układ komorowy i płynie badanym (B) - wodogłowie wewnętrzne.	56
Rycina 31.	Średnie wartości obwodów, małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	61
Rycina 32.	Średnie wartości obwodów, dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A – poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	62

Rycina 33.	Średnie wartości pól powierzchni, małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A - poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	62
Rycina 34.	Średnie wartości pól powierzchni, dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A - poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	63
Rycina 35.	Średnie wartości średnic zastępczych, małych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A - poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	63
Rycina 36.	Średnie wartości średnic zastępczych, dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A - poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	64
Rycina 37.	Gęstość liczbowa małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego i grupach badanych: A - poszerzony układ komorowy, B - wodogłowie wewnętrzne.	65

WYKAZ TABEL

Tabela I	Wartości wybranych parametrów charakteryzujących prawidłowy płyn mózgowo-rdzeniowy.	8
Tabela II	Wartości referencyjne podstawowych parametrów dla prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego.	9
Tabela III	Wartości parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego w zależności od rozpoznania klinicznego.	9
Tabela IV	Przykłady koloidów w zależności od stanu skupienia faz.	12
Tabela V	Procentowy skład białka całkowitego w prawidłowym płynie mózgowo-rdzeniowym.	22
Tabela VI	Porównanie wybranych parametrów płynu mózgowo-rdzeniowego z surowicą.	23
Tabela VII	Porównanie grupy badanej z kontrolną.	28
Tabela VIII	Miary pozycyjne szeregu rozdzielczego średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z grupy kontrolnej i badanej.	41
Tabela IX	Porównanie struktury grup pacjentów, grupy badanej A (pacjenci z poszerzonym układem komorowym) z grupą badaną B (pacjenci z wodogłowiem wewnętrznym).	41
Tabela X	Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z rozpoznaniem poszerzonym układem komorowym (grupa A płynu badanego) oraz z rozpoznaniem wodogłowiem wewnętrznym (grupa B płynu badanego).	43
Tabela XI	Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej prawidłowego płynu mózgowo-rdzeniowego..	44
Tabela XII	Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w badanej grupie A płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od pacjentów z poszerzonym układem komorowym.	44
Tabela XIII	Miary pozycyjne szeregu średnic zastępczych, wyrażone w mikrometrach, dla małych i dużych obiektów występujących w badanej grupie B płynu mózgowo-rdzeniowego pochodzącego od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym.	44
Tabela XIV	Wartość statystyki W dla małych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	47

Tabela XV	Wartość statystyki W dla dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	47
Tabela XVI	Wartość parametru określającego asymetryczność rozkładu średnic dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	47
Tabela XVII	Wartości współczynnika skośności (As) rozkładu średnic zastępczych dla dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	48
Tabela XVIII	Wartości względnego wskaźnika podobieństwa struktur w przypadku współczynnika rozkładu średnic zastępczych małych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	48
Tabela XIX	Wartości względnego wskaźnika podobieństwa struktur w przypadku rozkładu średnic zastępczych dużych obiektów występujących w grupach płynu mózgowo - rdzeniowego.	48
Tabela XX	Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego dla małych i dużych obiektów.	49
Tabela XXI	Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z poszerzonym układem komorowym (grupa A badanego płynu), dla małych i dużych obiektów.	49
Tabela XXII	Wartości parametrów pojedynczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym pochodzącym od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym (grupa B badanego płynu), dla małych i dużych obiektów.	49
Tabela XXIII	Gęstość liczbowa małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz w grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym).	50
Tabela XXIV	Wartości bezwzględnej i względnej sumarycznej długości obwodów małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym).	50
Tabela XXV	Wartości bezwzględnego i względnego sumarycznego pola powierzchni małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym).	51

Tabela XXVI	Wartości współczynnika kolistości małych i dużych obiektów występujących w grupie kontrolnej płynu mózgowo-rdzeniowego oraz grupie badanej A (płyn pochodzi od pacjentów z poszerzonym układem komorowym) i grupie badanej B (płyn pochodzi od pacjentów z wodogłowiem wewnętrznym). .	51
Tabela XXVII	Względne wartości średniej średnicy obiektu, całkowitego pola powierzchni obiektów oraz całkowitego obwodu obiektów w poszczególnych grupach płynu mózgowo-rdzeniowego.	60
Tabela XXVIII	„Istotność” parametrów geometrycznych charakteryzujących obiekty występujące w płynie mózgowo-rdzeniowym, do różnicowania płynu.	69

STRESZCZENIE

Organizm dorosłego człowieka składa się w około 60-70% z wody, która występuje w ciele człowieka między innymi pod postacią płynów ustrojowych. Jednym z nich jest płyn mózgowo-rdzeniowy, wytwarzany przez sploty naczyniówkowe, które znajdują się w komorach mózgu. Płyn mózgowo-rdzeniowy zbudowany jest w 99% z wody. Pozostałą część stanowią elementy komórkowe i białka, które możemy obserwować przy użyciu różnych rodzajów mikroskopii. Liczba komórek, oceniana mikroskopowo, występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym, jest jednym z sześciu podstawowych parametrów, w oparciu o wartości których określamy prawidłowość płynu. Standardowe mikroskopowe badanie płynu składa się z dwóch etapów. Pierwszy to przygotowanie preparatu mikroskopowego, gdzie jedną z czynności jest jego barwienie, wydłużające czas przygotowania preparatu. Drugi etap to analiza preparatu pod względem liczby komórek (bez analizy geometrii kształtu).

Celem pracy było opracowanie alternatywnej metodyki mikroskopowego badania obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym, w stosunku do metody standardowej.

Główny cel pracy osiągnięto poprzez opracowanie metody pomiarowej uwzględniającej rozmiary obiektów oraz analizę ich kształtów. Mając na uwadze, że dobra metoda powinna być skuteczna, w miarę możliwości szybka - opracowano sposób pozwalający skrócić czas przygotowania preparatu mikroskopowego oraz jego analizy.

Materiał badawczy pozyskiwano od pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego. Badaniu poddawano, niebarwiony płyn mózgowo-rdzeniowy, który spełniał normy referencyjne płynu prawidłowego w przypadku sześciu podstawowych parametrów płynu. Badano płyn pochodzący od pacjentów z grupy kontrolnej oraz grup badanych: A – pacjenci z poszerzonym układem komorowym i B – pacjenci z wodogłowie wewnętrznym.

Po przygotowaniu preparatu płynu mózgowo-rdzeniowego przeprowadzano jego analizę pod kątem liczby obiektów występujących w płynie oraz ich obwodów i pól powierzchni. Do analizy wykorzystano „Zintegrowany system analizy obrazu” składający się z mikroskopu optycznego Nikon *Eclipse E600* z kontrastem fazowym, kamery cyfrowej Nikon *DXM 1200* oraz komputera z oprogramowaniem „Lucia”.

Otrzymane wyniki pomiarowe wykorzystano do osiągnięcia celów szczegółowych pracy. Wyznaczono dla grup kontrolnej oraz badanych A i B wartości następujących parametrów geometrycznych mikro-objektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym: średniej średnicy zastępczej obiektu, średniego obwodu obiektu, średniego pola powierzchni obiektu, gęstości liczbowej obiektów, sumarycznej długości obwodów obiektów, względnej sumarycznej długości obwodów obiektów, sumarycznego pola powierzchni obiektów, względnego sumarycznego pola powierzchni obiektów i średniego współczynnika kolistości obiektów.

Wykorzystując wyznaczone wartości średnicy zastępczej poszczególnych obiektów utworzono szeregi rozdzielcze średnic zastępczych o szerokości przedziału $0,5\mu\text{m}$. Powstałe szeregi małych (średnica $\leq 4,5\mu\text{m}$) i dużych (średnica $\geq 5\mu\text{m}$) obiektów w grupie kontrolnej oraz w grupie badanej A (poszerzony układ komorowy) i B (wodogłowie wewnętrzne) poddano analizie statystycznej.

Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że zastosowanie do analizy niebarwionego, nie przetworzonego płynu mózgowo-rdzeniowego umożliwia jego mikroskopową analizę pod względem liczby obiektów w nim zawieszonych oraz ich rozmiarów. W efekcie przyczynia się to do skrócenia czasu przygotowania preparatu i całkowitego czasu pomiaru.

Analiza szeregów rozdzielczych średnic zastępczych obiektów występujących w płynie mózgowo-rdzeniowym wskazuje, że rozkłady rozmiarów średnic obiektów w poszczególnych grupach płynu są dwumodalnymi, złożonymi z rozkładu małych obiektów oraz z rozkładu dużych obiektów. Rozkłady małych obiektów są rozkładami normalnymi, natomiast rozkłady dużych obiektów są rozkładami asymetrycznymi, o słabej skośności, zbliżonymi do normalnego.

Wyznaczone wartości wybranych parametrów geometrycznych obiektów występujących w płynie oraz wartości wielkości charakteryzujących szeregi średnic zastępczych obiektów są na tyle istotne statystycznie, iż mogą posłużyć jako wskaźniki różnicowania płynu.

Na obecnym etapie badań metoda ta może być zastosowana jako badanie uzupełniające w diagnostyce płynu mózgowo-rdzeniowego.

ABSTRACT

Adult human body consists of about 60-70% water which occurs, inter alia, in the form of body fluids. One of them is cerebrospinal fluid (CSF), produced by the choroid plexuses within the ventricles of the brain. CSF consists of water in 99 % with some cells and proteins which may be observed with the use of various microscopic methods. The count of cells, assessed microscopically, present in CSF is one of the six basic parameters which are used to determine the CSF is normal or not. The microscopic examination of CSF consists of two stages. The first stage includes the preparation of a microscopic section involving staining of the examined fluid. The staining significantly extends the time of making a section. Then the section is analyzed in terms of a number of cells (without analysis of their shapes).

The goal of the study was to develop an alternative methodology of microscopic analysis of objects present in CSF in comparison to the standard method.

The overriding goal of the dissertation was obtained developing the method of measurements which takes into account sizes of the objects suspended in CSF and analyzing their shapes. Bearing in mind that a good method should be effective and at the same time, as far as possible, fast, a method which allows one to shorten the measurement time of the sample was developed.

The material was taken from the patients diagnosed with the disorders of cerebrospinal fluid circulation. For the examinations one used unstained CSF which meets the reference standards in six basic parameters of the fluid. The CSF subjected to examinations comes from two groups of patients – the reference group and the test group divided according to clinical diagnosis into subgroup A – patients diagnosed with ventricular hydrocephalic enlargement and subgroup B - patients diagnosed with internal hydrocephalus.

After preparation of the studied material, there were determined the count of objects in CSF. Next, their profile specific perimeters and the object specific surface area were measured. The studied CSF was tested with *Integrated System of Picture Analysis* consisting of the Nikon *Eclipse E 600* microscope with phase contrast, Nikon *DXM 1200* digital camera and computer software “*Lucia*”.

The obtained results were used to gain detailed aims of the study which were to determine the following parameters describing the micro-objects suspended in the CSF: diameter of the area equivalent circle, the mean object boundary specific perimeter, the mean total object specific area, numerical density, relative and absolute boundary specific perimeter, relative and absolute field area and circular shape factor. All the parameters were determined for reference group and the tested subgroups A and B.

The determined values of these parameters were assigned to the reference group and the tested group divided according to clinical diagnosis into subgroup A – patients diagnosed with ventricular hydrocephalic enlargement and subgroup B - patients diagnosed with internal hydrocephalus.

Based on the equivalent diameters, the counted objects were classified according to their sizes every $0,5\mu\text{m}$. The statistical analysis was performed for the resulting series for “small” (with a diameter $\leq 4,5\mu\text{m}$) and “large” (with a diameter $\geq 5\mu\text{m}$) objects in all groups.

The examinations showed that unstained unprocessed CSF may be analyzed microscopically in terms of sizes of suspended objects in the fluid. As a result the time essential for preparation of the material is much shorter that means less time to complete the measurements.

The analysis of the series of distribution of equivalent diameters of objects present in the CSF indicate that the diameter size distributions of objects in each group are bimodal that means they are composed of both distributions of “small” and “large” objects. The “small” object size distributions are normal distributions but „large” object size distributions are asymmetrical distributions with low skew close to normal.

The determined values of geometric parameters of the object present in CSF and the values of parameters characterizing the distributions of equivalent diameters are statistically significant so enough that they can be used as indicators in the differentiation of CSF.

However, at this stage of research the method can be considered as complementary examination in the diagnosis of CSF.

ZAŁĄCZNIKI

Załącznik A:

Zgłoszenie badania do Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie.

Temat badania

„Zjawiska fizyko-chemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego”

Załącznik B:

Recenzja wykonana na zlecenie Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie dotycząca wyżej wymienionego tematu badań.

Załącznik C:

Zgoda Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie na badania prowadzone, przez grupę w składzie: dr n.med. Leszek Herbowski, mgr Waldemar Staroń, prof. US dr hab. Henryk Gurgul, w ramach tematu badawczego: *„Zjawiska fizyko-chemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego”* podjęta uchwałą nr 04/KB/II/2006 z dnia 05 lipca 2006 roku.

Załącznik D:

Oświadczenie promotora o zgodności prowadzonych badań z otrzymaną zgodą Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie.

**ZGŁOSZENIE BADANIA
DO KOMISJI BIOETYCZNEJ OKRĘGOWEJ IZBY LEKARSKIEJ W SZCZECINIE**

1. DATA WYŚLANIA ZGŁOSZENIA – 06.CZERWCA 2006 ROK
2. KIEROWNIK SAMODZIELNEJ JEDNOSTKI ORGANIZACYJNEJ –
DYREKTOR SAMODZIELNEGO PUBLICZNEGO WOJEWÓDZKIEGO
SZPITALA ZESPOŁONEGO W SZCZECINIE DR N.MED. ZENON
CZAJKOWSKI
3. KIEROWNIK TEMATU BADAWCZEGO : DR N. MED. LESZEK
HERBOWSKI
4. CZŁONKOWIE ZESPOŁU BADAWCZEGO :
 - MGR WALDEMAR STAROŃ – ASYSTENT
UNIwersytetu Szczecińskiego
 - PROF. US DR HAB. HENRYK GURGUL
5. TEMAT BADANIA:

**ZJAWISKA FIZYKOCHEMICZNE ZACHODZĄCE W PŁYNIE
MÓZGOWO-RDZENIOWYM U PACJENTÓW Z ZABURZENIAMI
KRĄŻENIA PŁYNU MÓZGOWO-RDZENIOWEGO**

Kierownik samodzielnej jednostki organizacyjnej

DYREKTOR
Samodzielnego Publicznego
Wojewódzkiego Szpitala Zespołowego
dr n. med. Zenon Czajkowski

Kierownik tematu

Dr n. med. Leszek Herbowski
specjalista
neurochirurg i neurofarmakolog
58 66 94 11 53 / 46 98 985

RECENZJA

projektu badawczego dr med. Leszka HERBOWSKIEGO i współpracowników pt.: **Zjawiska fizykochemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego**. Recenzja wykonana na zlecenie Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie.

Celem pracy jest analiza porównawcza wartości: ciśnienia wewnątrzczaszkowego, ciśnienia tętniczego krwi, ciśnienia atmosferycznego, temperatury ciała pacjenta i temperatury otoczenia, która to analiza pozwoli określić wpływ ciśnienia atmosferycznego i temperatury otoczenia na pozostałe wyżej wymienione parametry. Materiałem badawczym będzie również płyn mózgowo-rdzeniowy w którym autorzy będą oceniać ilość, rozmiary i ruchy zawartych w płynie cząstek, strukturę ich powierzchni, oraz zjawiska elektrostatyczne i sprężysto-elastyczne zachodzące pomiędzy cząstkami.

Proponowane badania są bardzo obiecujące zarówno pod względem praktycznym jak i poznawczym. Niewątpliwy, ale mało poznany, wpływ otaczającego nas ciśnienia i temperatury, oraz charakterystyka cząstek płynu mózgowo-rdzeniowego pozwoli nam lepiej zrozumieć mechanizmy metabolizmu tkanek mózgu w różnych stanach patologicznych zachodzących wewnątrz czaszki.

Badania będą przeprowadzone w oparciu o pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego różnego pochodzenia, u których rutynowo implantuje się czujnik do ciągłego pomiaru ciśnienia wewnątrzczaszkowego, wykonuje się testy infuzyjne oraz drenaż zewnętrzny płynu mózgowo-rdzeniowego. Wymienione badania wykonuje się poprzez nakłucie przestrzeni podpajęczynówkowej kanału kręgowego lub nakłucie komór mózgu. Zabiegi te łączą się z obligatoryjnym, leczniczo diagnostycznym, upustem płynu mózgowo-rdzeniowego. Jednym słowem, wszystkie wymienione wyżej zabiegi są włączone w proces diagnostyczno leczniczy, żaden z nich nie jest zabiegiem dodatkowym, niekoniecznym dla pacjenta w całej procedurze postępowania.

Na koniec pragnę dodać, że projekt jest przedstawiony jasno, zrozumiale i rokuje uzyskanie wyników, które mogą w sposób znaczący wpłynąć na lepsze poznanie patologii krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego i metabolizmu tkanek mózgu w przypadkach ich uszkodzenia. Osobiście jestem zadowolony, że znaczna część projektu byłaby realizowana w Oddziale Neurochirurgii którego jestem kierownikiem, dlatego z całą odpowiedzialnością proszę Wysoką Komisję o akceptację prezentowanego projektu.

Z poważaniem

ORDYNATOR
Oddziału Neurochirurgii
i Neurotraumatologii
Jan Ślósarek
Prof. dr hab. n. med. Jan Ślósarek



KOMISJA BIOETYCZNA
przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie
ul. Marii Skłodowskiej-Curie 11
71-332 Szczecin

Sekretariat (091) 48 74 936, tel/fax (091) 48 74 960

Konto: Bank Śląski S.A. Oddział Regionalny w Szczecinie 98 1050 1559 1000 0022 1716 8034

Uchwała Nr 04/KB/II/2006
Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie
z dnia 05 lipca 2006 roku

w sprawie wniosku dr n.med. Leszka Herbowskiego – Oddział Neurochirurgii i Neurotraumatologii Samodzielnego Publicznego Wojewódzkiego Szpitala Zespolonego w Szczecinie o akceptację projektu badania klinicznego:
„Zjawiska fizykochemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego”

Na podstawie art.29 ust. 2 ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarza i lekarza dentystry (tekst jednolity Dz.U.z 2005 r. Nr 226, poz.1943), ustawy z dnia 6 września 2001 r. Prawo farmaceutyczne (tekst jednolity Dz.U. z 2004r. Nr 53, poz.533, z późn.zm.) oraz rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999 r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz.U. Nr 47, poz.480) uchwała się, co następuje:

§ 1

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie stwierdza, że do wniosku zgłaszającego wyżej wskazany program badawczy dołączono następujące dokumenty:

1. Protokół badania.
2. Informację Dla Pacjenta.
3. Formularz tzw. „Świadomej Zgody Pacjenta”
4. Polisę Ubezpieczenia Odpowiedzialności Cywilnej Seria AA nr 0502913, na okres od 16.10.2005 do 15.10.2006, wystawioną przez Towarzystwo Ubezpieczeń INTER Polska S.A. w dniu 14.10.2005.
5. Kserokopię zgody Komisji Nadzoru nad Dokonywaniem Badań na Ludziach z dnia 31 marca 1988r. w temacie:
„Badanie i zastosowanie leczenia posturalnych mechanizmów ciśnienia wewnątrzczaszkowego u chorych z ciasnotą wewnątrzczaszkową”
6. Curriculum Vitae głównego badacza – dr n.med. Leszka Herbowskiego

§ 2

Komisja Bioetyczna Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie, po zapoznaniu się z w/w dokumentacją oraz opinią sporządzoną przez prof. dr hab.n.med. Jana Ślósarka, postanawia zaopiniować przedstawiony projekt badania klinicznego **p o z y t y w n i e**.

§ 3

Skład i działanie Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie są zgodne z zasadami Good Clinical Practice (GCP) oraz obowiązującymi przepisami.

§ 4

Podmiotom wymienionym w § 8 ust. 1 w/w rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej przysługuje prawo odwołania do Odwoławczej Komisji Bioetycznej przy Ministerstwie Zdrowia za pośrednictwem Komisji Bioetycznej OIL w Szczecinie w terminie 14 dni od dnia otrzymania niniejszej uchwały.

§ 5

Komisja Bioetyczna OIL w Szczecinie przypomina o obowiązku zgłaszania badań do Centralnej Ewidencji Badań Klinicznych mającej siedzibę w Warszawie, przy ul. Chelmskiej 30/34.

§ 6

Lista osób uczestniczących w obradach Komisji Bioetycznej Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie w dniu 05 lipca 2006 roku stanowi załącznik do niniejszej uchwały.

§ 7

Tekst uchwały sporządzono w dwóch jednobrzmiących egzemplarzach, po jednym dla wnioskodawcy i Komisji Bioetycznej OIL w Szczecinie.

§ 8

Niniejsza uchwała obejmuje swym zasięgiem wszystkie ośrodki biorące udział w badaniu, zgodnie z załącznikiem do uchwały.

§ 9

Uchwała wchodzi w życie z dniem podjęcia.

PRZEWODNICZĄCA
Komisji Bioetycznej
Okręgowej Izby Lekarskiej w Szczecinie
Prof. dr hab. n. med. *Halina Białaska*

OŚWIADCZENIE

Oświadczam, że Zgoda Komisji Bioetycznej przy Okręgowej Izbie Lekarskiej w Szczecinie na badania w ramach tematu: *„Zjawiska fizyko-chemiczne zachodzące w płynie mózgowo-rdzeniowym u pacjentów z zaburzeniami krążenia płynu mózgowo-rdzeniowego”* podjęta uchwałą nr 04/KB/II/2006 z dnia 05 lipca 2006 roku obejmuje zakres badań przedstawionych w niniejszej rozprawie doktorskiej.