

УДК 616.1/4-099-008.:535.24

Ю.М. Соловей

Вищий державний навчальний заклад
України "Буковинський державний
медичний університет", м. Чернівці

СПОСІБ ФОТОМЕТРИЧНО- БІОСЕНСОРНОГО ВИЗНАЧЕННЯ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ АБДОМІНАЛЬНОГО СЕПСИСУ В ЕКСПЕРИМЕНТІ

Ключові слова: експеримент,
абдомінальний сепсис, *Dunaliella*
viridis, оптична густина.

Резюме. В умовах експерименту на 46 білих щурах розроблено спосіб визначення рівня ендогенної інтоксикації із застосуванням фотометричного визначення реакції клітинної тест-системи суспензії *Dunaliella viridis* при абдомінальному сепсисі. Встановлено, що розвиток та перебіг експериментального абдомінального сепсису супроводжується зростанням показника оптичної густини на 0,05, 0,1 та 0,2 відповідно рівню ендотоксикозу та тяжкості перебігу абдомінального сепсису.

Вступ

Абдомінальний сепсис (АС) та синдром поліорганної недостатності (ПОН) на сьогодні є найбільш складними проблемами ургентної хірургії та головними причинами летальності, яка утримується на досить високому рівні та не має тенденції до зниження і складає від 19 до 70 % [1, 4]. Встановлено, що провідна роль у розвитку абдомінального сепсису (АС) належить синдрому ендогенної інтоксикації (СЕІ), який призводить до настання ПОН та вторинного імунодефіциту, що при прогресуванні спричиняє смерть хворого [2, 3]. Отже, рання діагностика СЕІ є важливою та актуальною, щодо оцінки тяжкості перебігу, можливості лікування та прогнозу АС [7, 8].

Мета роботи

Розробити спосіб діагностики абдомінального сепсису шляхом фотометричного визначення реакції клітинної тест *Dunaliella viridis* в умовах експерименту.

Матеріал і методи

Експериментальні дослідження проведені на 46 білих нелінійних статевозрілих щурах обох статей масою від 180 до 220 г. Тварин рандомізовано (з використанням генератора випадкових чисел) на три дослідні по 12 тварин у кожній та контрольну в кількості 10 тварин групи. Дослідним тваринам I, II та III груп АС моделювали за власною методикою [5]. При цьому для моделювання різного ступеня СЕІ застосовували уведення 30%, 15%, та 7,5% (згідно зі ступенем тяжкості ендогенної інтоксикації: тяжкий, середній та легкий) щойно приготовленого розчину автокалу, Через 12, 48 та 72 год перебігу АС проводили евтаназію тварин з дотриманням вимог Ванкуверської конвенції та проводили забір крові.

Оцінку ендогенної інтоксикації проводили за допомогою клітинної тест-системи *Dunaliella viridis* за власною методикою [2], що полягає в наступному: перший етап - забирали кров у декапітованих тварин у кількості 2 мл крові. Центрифугували її впродовж 10 хв при 1600 об/хв. За допомогою мікродозатора 50 мкл сироватки переносили в стандартний 96-лунковий імунологічний планшет і додавали 50 мкл готової синхронізованої тест-системи *Dunaliella viridis*. Наступний етап роботи полягав у сумісній інкубації в імунологічному планшеті заданих об'ємів по 50 мкл клітинної суспензії *Dunaliella viridis* (15x10⁶/мл) та досліджуваної сироватки крові впродовж 30 хв. Для контролю використовували 50 мкл буфера, до якого додавали 50 мкл клітинної суспензії *Dunaliella viridis*. На третьому етапі дослідження проводили візуальну оцінку (за допомогою світлової мікроскопії в камері Горяєва) реакції-відповіді на цитотоксичні чинники біодатчика: оцінку зміни форми і розмірів клітин водорості та клітинних мікро- і макро-агрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної з агрегатів, філаментів і включень, рухливість її клітин у 10 великих квадрантах камери. Результати визначали у відсотках змінених клітин від загальної їх кількості. Аналогічним способом підраховували за відсотком змінених клітин у контрольній пробі. Різниця між ними становила рівень ендогенної інтоксикації сироватки крові. Для скорочення часу дослідження та отримання більш достовірних результатів нами запропонований спосіб експрес-діагностики [6] який полягав у тому, що третій етап замість візуальної оцінки реакції клітинної суспензії *Dunaliella viridis* проводили визначення оптичної густини за допомогою аналізатора імуноферментних реакцій "УНПЛАН-М" при довжині хвилі 492 нм. Далі проводиться співставлення отриманого показника з показником оп-

тичної густини контролю (буферний розчин, що містить стандартизовану завись одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* в середовищі оптична густина якого дорівнює оптичній густині сироватки крові здорової людини). Збільшення досліджуваного показника більше ніж на 0,05 свідчило про наростання ендотоксикозу.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA 8.0 for Windows 7 ("Statsoft", USA). За критеріями Колмогорова-Смирнова, Лілієфорса та Шапіро Уїлка визначили, що розподіл ознак не відрізнявся від нормальних параметрів. Статистичний аналіз статистично значущих відмінностей проводили в підмодулі T-tests for independent groups (Т-тест для незалежних груп).

Обговорення результатів дослідження

Як свідчать дані таблиці 1, летальність тварин до 12 год перебігу експериментального

Летальність серед тварин дослідних груп, залежно від ступеня тяжкості перебігу гострого експериментального перитоніту

Група	Перебіг перитоніту (год)	Ступінь ендотоксикозу,
	12	
I	83 % (10)	важкий
Всього (шт.)	12	
II	58,3% (7)	Середній
Всього (шт.)	12	
III	8,3 % (1)	Легкий
Всього (шт.)	12	
Контрольна група	0	0
Всього (шт.)	10	

подібну форму, 50 % -еліпсоподібну і тільки 6 % клітин були округлими. Рухливість втратили 13 % всіх клітин, що знаходилися під спостереженням.

Після внесення сироватки крові дослідних щурів на 12 год перебігу перитоніту до культури *Dunaliella viridis* відсоток клітин, що змінили форму на овальну, збільшився в 10 раз (табл. 2).

Як свідчать дані таблиці 2, розвиток експериментального перитоніту вже на 12 год його перебігу супроводжується зростанням ендогенної інтоксикації в усіх дослідних групах тварин, на що вказує показник летальності як біологічний критерій рівня ендотоксикозу. Зміни в клітинах *Dunaliella viridis* проявлялося у вигляді втрати рухливості та зміни форми клітин. При легкому ступені ендогенної інтоксикації (рис. 4) у камері Горяєва майже всі клітини округлої форми. Проте їх було мало в квадраті, що зумовлено активнішою рухливістю клітин, які покинули зону квадрата. Най-

АС між групами істотно відрізнялися між собою, що свідчить про адекватність обраної методики моделювання різних ступенів тяжкості ендогенної інтоксикації, які ми умовно поділили на три категорії - легкий, середній та тяжкий. У першій дослідній групі за даний період загинуло 10 із 12 тварин, в другій 7 із - 12 і в третій - загинула тільки одна тварина із 12. Клітинний біосенсор *Dunaliella viridis*, що використовувався для оцінки ступеня ендогенної інтоксикації, представляє собою культуру поодиноких рухливих клітин, розмір яких коливається від 15 до 60 мкм. Внесення до тест-системи *Dunaliella viridis* сироватки крові дослідних тварин призводило до зміни форми, втрати рухливості клітин та утворення їх агрегатів. Найбільш вираженими змінами проявлялося у вигляді втрати рухливості, у меншій мірі - утворення агрегатів. Так, якщо в контрольній культурі (рис. 1) біля 40 % клітин мало грушо-

Таблиця 1

більше клітин, що втратили рухливість, у дослідній культурі *Dunaliella viridis* із сироваткою крові I та II груп дослідних тварин. Як видно на рис.2 та рис. 3 клітини втрачали рухливість, змінювали форму на округлу та розміщувалися попарно. Проте утворення агрегатів не спостерігалося на 12 год перебігу експериментального перитоніту. Таким чином, підсумовуючи вищевикладений матеріал, можна стверджувати, що застосування для оцінки ендогенної інтоксикації тест системи *Dunaliella viridis*, є простим, чутливим та достовірним методом діагностики, оскільки вже на 12 год розвитку перитоніту залежно від рівня ендотоксикозу спостерігали виражені зміни з боку клітин водоростей, що підтверджується показником летальності.

Наступним етапом дослідження стало визначення оптичної густини зависі одноклітинної

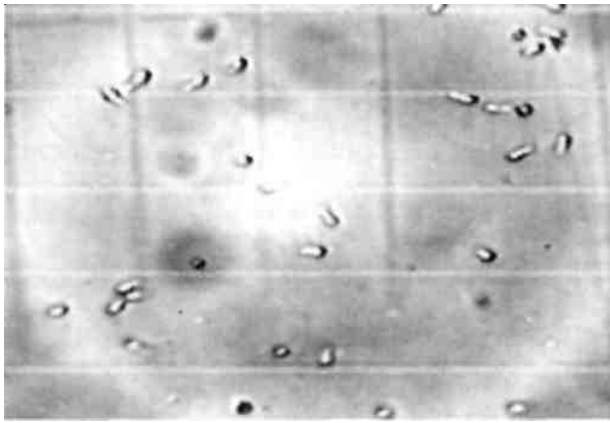


Рис. 1. Контрольна культура *Dunaliella viridis* + буфер

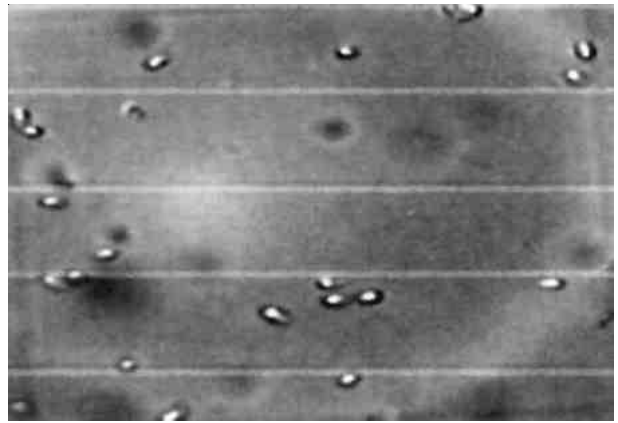


Рис. 2. Дослідна культура *Dunaliella viridis* +дослідна сироватка крові I групи тварин (тяжкий ступінь ендогенної інтоксикації)

Таблиця 2

Зміна форми та втрата рухливості клітин *Dunaliella viridis* при інкубації з сироваткою крові щурів з експериментальним перитонітом залежно від ступеня тяжкості ендогенної інтоксикації

Група	Загальна кількість клітин <i>Dunaliella viridis</i> , що втратили рухливість (%)	Загальна кількість клітин <i>Dunaliella viridis</i> , що змінили форму (%)
I група	55,9±2,3	55±2,1
II група	48,1±1,2	52±1,02'
III група	30,3±3,1	48±2,5
Інтактні	13,4±1,1	10±0,87
Контроль (буфер)	11,8±0,9	6±0,6

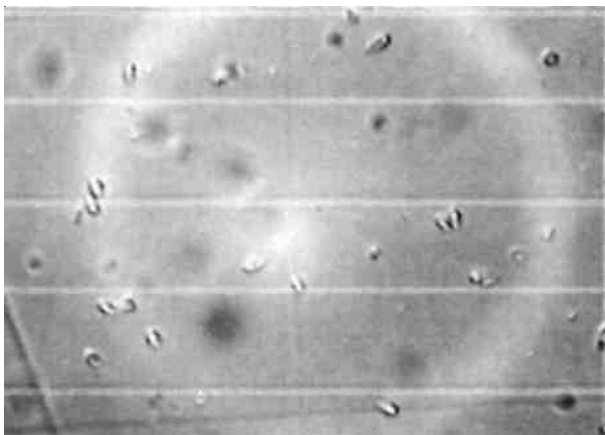


Рис. 3. Дослідна культура *Dunaliella viridis* +дослідна сироватка крові II групи тварин (середній ступінь ендогенної інтоксикації)

водорості *Dunaliella viridis* в сироватці крові тварин з експериментальним перитонітом за допомогою аналізатора імуноферментних реакцій типу УНПТЛАН-М при довжині хвилі 492 нм. В якості контролю визначали оптичну густину зависі одноклітинної водорості *Dunaliella viridis* в сироватці крові інтактних тварин. Отримані дані пред-

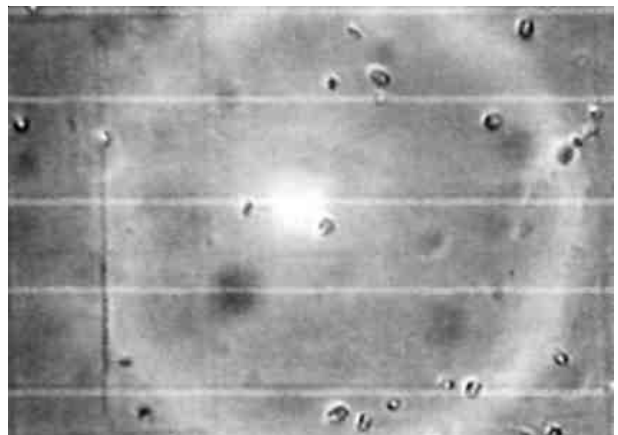


Рис. 4. Дослідна культура *Dunaliella viridis* +дослідна сироватка крові III групи тварин (легкий ступінь ендогенної інтоксикації)

тавлені в таблиці 3.

При визначенні оптичної густини досліджуваної сироватки крові встановлено, що розвиток та перебіг експериментального АС супроводжується зростанням показника оптичної густини на 0,05,0,1 та 0.2 відповідно рівню ендотоксикозу

Таблиця 3

Показники оптичної густини зависі *Dunaliella viridis* в сироватці венозної крові щурів з експериментальним перитонітом в залежності від тяжкості у перебігу

Групи тварин	Контроль	Перебіг перитоніту, год
		12
1	0,2525±0,0001	0,3355±0,002*
2	0,2525±0,0001	0,39075±0,0001*
3	0,2525±0,0001	0,4704±0,0003*

Примітка: коефіцієнт вірогідності Р між вказаними групами : * - < 0,05 ; -(наведені тільки статистично вірогідні відмінності)
та важкості перебігу АС.

Висновки

1. Для ранньої діагностики ступеня тяжкості ендотоксикозу при абдомінальному сепсисі, як чутливий, достовірний та простий у виконанні, може застосовуватися клітинна тест-система *Dunaliella viridis*.

2. При втраті рухливості від 15 % до 30 % клітин - легкий ступінь, від 30 до 50 % клітин середній ступінь та при втраті рухливості більше 50 % -тяжкий ступінь ендотоксикозу.

3. Найбільш простим та чутливим є визначення оптичної густини досліджуваної сироватки крові з клітинною тест-системою *Dunaliella viridis*, що супроводжується зростанням показника оптичної густини на 0,05, 0,1 та 0,2 відповідно рівню ендотоксикозу та важкості перебігу експериментального абдомінального сепсису.

Перспективи подальших досліджень

Перспективи подальших досліджень полягають в апробації розробленого способу діагностики в клінічних дослідженнях.

Література. 1. Абдомінальний сепсис: сучасний стан проблеми / Р.І. Сидорчук, П.Д. Фомін, О.Й. Хомко, та ін. // Клінічна та експериментальна патологія. - 2011. - Том X. - №3(37). - С.176-183. 2. Експериментальне обґрунтування застосування клітинної тест-системи *Dunaliella viridis* для оцінки ступеня ендогенної інтоксикації при перитоніті / В. П. Польовий, Ю. М. Соловей, В. В. Білоокий, С. П. Бродовський // Буковинський медичний вісник. - 2011. - №1 (57). - С. 144-147. 3. Кочетков А. В. Клинико-лабораторная диагностика и мониторинг гнойно-септических осложнений после операций на органах брюшной полости / А. В. Кочетков, М. С. Гудилков // Новости хирургии. - 2015. - № 1. - С. 105-111. 4. Лященко П.В. Лікування хірургічних хворих на абдомінальний сепсис / П.В. Лященко // Шпитальна хірургія. - 2013. - №2. - С.88-89. 5. Патент на корисну модель України 54919, МІЖ А 61 В 8/12. G 01 N 33/487. Спосіб моделювання гострого розповсюдженого перитоніту / Ю. М. Соловей; заявник та патентовласник Ю. М. Соловей. - № и201007174; заявл. 10.06.2010; опубл. 25.11.2010; Бюл. №22. 6. Патент на корисну модель України 83155 МІЖ (2013.01) АБІВ 5/00 Спосіб фотометрично-біосенсорного визначення рівня ендотоксикозу при перитоніті / Ю. М.

Соловей, В. П. Польовий М. М. Мігайчук та ін.; заявник та патентовласник Ю. М. Соловей Польовий В.П. Мігайчук М.М. та ін. -№201303375 заявл. 19.03.2013 опубл. 27.08.2013. Бюл №16. 7. The new sepsis marker, sCD14-ST (Presepsin), induction mechanism in the rabbit sepsis models / K. Naitoh [et al.] // Sepsis. - 2010. - Vol. 14. - Suppl. 2. - P. 19. 8. Wenzel R.P. Antibiotics for abdominal sepsis / R. P. Wenzel, M. B. Edmond // The New England Journal of Medicine. - 2015. - №2. - P.2062-2063.

СПОСОБ ФОТОМЕТРИЧЕСКИ-БИОСЕНСОРНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ АБДОМИНАЛЬНОГО СЕПСИСА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Ю.Н. Соловей

Резюме. В условиях эксперимента на 46 белых крысах разработан способ определения уровня эндогенной интоксикации с применением фотометрического определения реакции клеточной тест системы суспензии *Dunaliella viridis* при абдомінальному сепсисе. Установлено, что развитие и ход экспериментального абдомінального сепсиса сопровождается ростом показателя оптической плотности на 0,05, 0,1 и 0,2 соответственно уровню ендотоксикозу и тяжести течения абдомінального сепсиса.

Ключевые слова: эксперимент, абдомінальный сепсис, *Dunaliella viridis*, оптическая плотность.

A METHOD OF FOTOMETRICHNO-BIOSENSORNOGO OF DEFINITION OF ENDOGENOUS INTOXICATION OF ABDOMINAL SEPSIS IN EXPERIMENT

Yu. M. Solovay

Abstract. In experimental conditions on 46 white rats the way of determination of level of endogenous intoxication with application of photometric definition of reaction cellular the test of system of *Dunaliella viridis* suspension is developed at abdominal sepsis. It is established that development and the course of experimental abdominal sepsis is followed by growth of an indicator of optical density on 0,05, 0,1 and 0,2 according to level to an endotoksikoz and weight of the course of abdominal sepsis.

Key words: experiment, abdominal sepsis, *Dunaliella viridis*, optical density.

Higher State Educational Establishment of Ukraine

"Bukovinian State Medical University", Chernivtsi

Clin. and experim. pathol. - 2015. - Vol.14, №3 (53). - P.133-136.

Надійшла до редакції 1.08.2015

Рецензент – проф. Ф.В. Гринчук

© Ю.М. Соловей, 2015