

УДК 616.381-002:616-097-085

В.П.Польовий, Ю.М.Соловей, В.В.Білокий, С.П.Бродовський

**ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ОБҐРУНТУВАННЯ ЗАСТОСУВАННЯ  
КЛІТИННОЇ ТЕСТ-СИСТЕМИ *DUNALIELLA VIRIDIS* ДЛЯ ОЦІНКИ  
СТУПЕНЯ ЕНДОГЕННОЇ ІНТОКСИКАЦІЇ ПРИ ПЕРИТОНІТІ**

Буковинський державний медичний університет, м. Чернівці

**Резюме.** В умовах експерименту на 46 білих щурах розроблено спосіб оцінки ступеня ендogenous інтоксикації при гнійному перитоніті з використанням клітинної тест-системи.

**Ключові слова:** перитоніт, ступінь ендogenous інтоксикації, клітинна тест-система *Dunaliella viridis*.

**Вступ.** Відомо, що для патогенезу гострого перитоніту є характерними три провідних синдроми: синдром ендogenous інтоксикації, вторинного імунodefіциту та поліорганної недостатності [1, 2]. Окрім випадків, коли на ранній стадії його перебігу існує вже прихований імунodefіцит (цукровий діабет, злоякісні новоутворення тощо) [4]. Якщо останні два синдроми проявляються при вираженій клінічній картині, то синдром ендogenous інтоксикації виникає вже на початкових етапах розвитку гострого гнійного перитоніту, ініціює розвиток двох інших та є, згідно з даними різних авторів, причиною смерті хворих у 42-58 % випадків [1, 3].

Таким чином, проблема ранньої діагностики ендogenous інтоксикації при перитоніті та ступеня тяжкості його перебігу залишається на сьогоднішній день актуальною, оскільки саме вона визначає перебіг, прогноз та результати його лікування.

**Мета роботи.** В експерименті розробити спосіб оцінки ендogenous інтоксикації при перитоніті з використанням клітинної тест-системи.

**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 перитоніт моделювали шляхом внутрішньоочеревинного введення 30 %, 15 %, та 7,5 % (згідно зі ступенем втяжкості ендogenous інтоксикації: тяжкий, середній та легкий) щойно приготовленого розчину автокалу, попередньо процідженого через чотири шари марлі з розрахунку 0,5 мл на 100 г маси тіла. Через 12 год перебігу перитоніту проводили евтаназію тварин з дотриманням вимог Ванкуверської конвенції та проводили забір крові. Оцінку ендogenous інтоксикації проводили за допомогою клітинної тест-системи *Dunaliella viridis* за власною методикою [5], що полягає в наступному: перший етап - забірали 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 імуноло-

гічному планшеті заданих об'ємів по 50 мкл клітинної суспензії *Dunaliella viridis* ( $15 \times 10^6$ /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 макроагрегатів, а також наявності глікопротеїнової оболонки, утвореної в 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 ендogenous інтоксикації сироватки крові.

Статистичну обробку отриманих даних проводили за допомогою програми STATISTICA 8.0 for Windows 7 («Statsoft», USA). За критеріями Колмогорова-Смирнова, Лїлієфорса 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 (T-тест для незалежних груп).

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як свідчать дані таблиці 1, летальність тварин до 12 год перебігу експериментального перитоніту між групами істотно відрізнялися між собою, що свідчить про адекватність обраної методики моделювання різних ступенів тяжкості ендogenous інтоксикації, які ми умовно поділили на три категорії – легкий, середній та важкий. 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 ендogenous 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 грушоподіб-

Таблиця 1

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

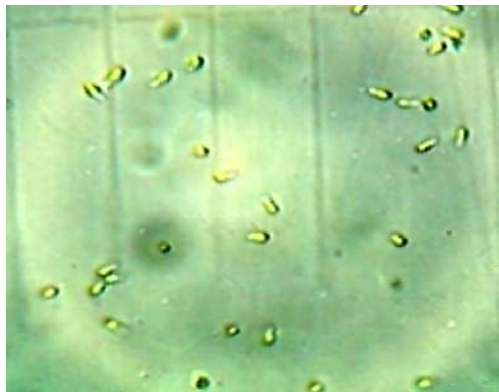
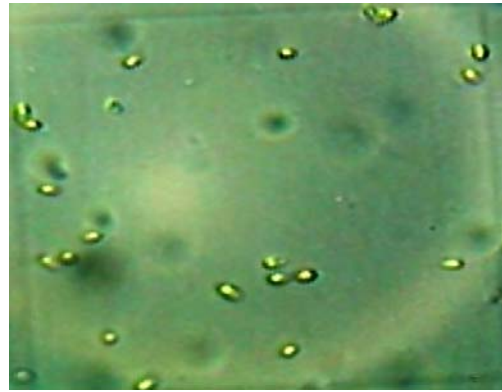
Група	Перебіг перитоніту (год)	Ступінь ендотоксикозу
	12	
I	83 % (10)	Тяжкий
Всього (шт.)	12	
II	58,3 % (7)	Середній
Всього (шт.)	12	
III	8,3 % (1)	Легкий
Всього (шт.)	12	
Контрольна група	0	0
Всього (шт.)	10	

Примітка. У дужках вказана абсолютна кількість загиблих тварин

Таблиця 2

Зміна форми та втрата рухливості клітин *Dunaliella viridis* при інкубації з сироваткою крові щурів з експериментальним перитонітом залежності 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. 1. Контрольна культура *Dunaliella viridis* + буферРис. 2. Дослідна культура *Dunaliella viridis* + дослідна сироватка крові I групи тварин (тяжкий ступінь ендогенної інтоксикації)

ну 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 ендоген-

ної 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. Найбільше 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 спостерігалось 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

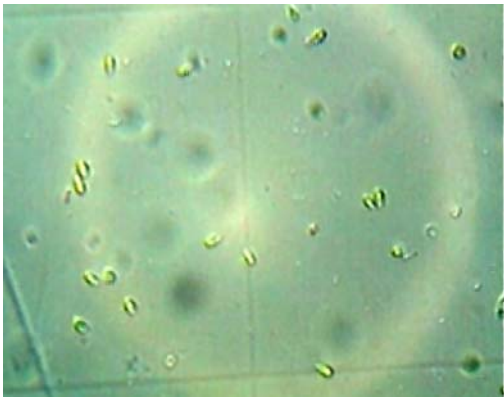


Рис. 3. Дослідна культура *Dunaliella viridis* +дослідна сироватка крові II групи тварин (середній ступінь ендогенної інтоксикації)

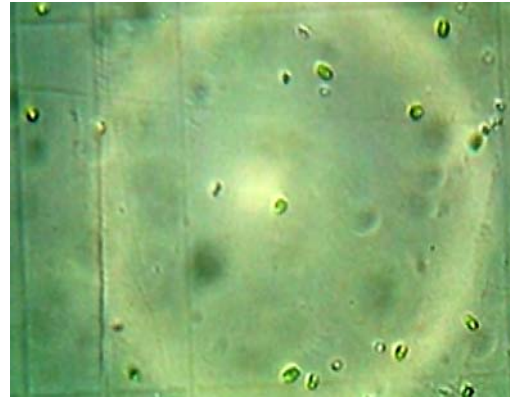


Рис. 4. Дослідна культура *Dunaliella viridis* +дослідна сироватка крові III групи тварин (легкий ступінь ендогенної інтоксикації)

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.

#### Висновки

1. Для ранньої діагностики ступеня тяжкості ендотоксикозу при гострому перитоніті, 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 чутливою до токсичних речовин плазми крові є зміна форми *Dunaliella viridis*, при наростанні ендогенної інтоксикації втрачається рухливість клітин вже на 12 год розвитку експериментального перитоніту.

#### Література

1. Бойко В.В. Распространенный гнойный перитонит: Монография / В.В.Бойко, И.Криво-ручко. – Х.: Прапор, 2008. – 280 с.
2. Бунятян К.А. Вторичная иммунная недостаточность у хирургических больных: рациональная диагностика и коррекция: автореф. Дис. На здобуття наук. ст. докт. мед. н.: спец. / 14.00.36 / К.А.Бунятян. РГМУ, 2007. – 50 с.
3. Иванов В.Г. Лабораторная диагностика эндогенной интоксикации в клинической практике: Учебное пособие / В.Г.Иванов. – Ижевск, 2006. – 36 с.
4. Гирш А.О. Иммунореактивность у больных сахарным диабетом с разлитым гнойным перитонитом / А.О.Гирш, В.Т.Долгих, О.А.Мальков // Бюлл. СО РАМН. – 2006. – № 1. – С. 27-34.
5. Пат. UA №50174 МПК G01N 33/48. Польовий В.П., Соловей Ю.М. Експрес діагностика стану компенсаторно-захисних сил організму на ендотоксикоз при перитоніті. – 200912992; заявл.14.12.2009; опубл.25.05.10; Бюл. № 10.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ОБОСНОВАНИЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КЛЕТОЧНОЙ ТЕСТ СИСТЕМЫ DUNALIELLA VIRIDIS ДЛЯ ОЦЕНКИ УРОВНЯ ЭНДОГЕННОЙ ИНТОКСИКАЦИИ ПРИ ПЕРИТОНИТЕ

*В.П.Полевой, Ю.М.Соловей, В.В.Белокий, С.П.Бродовский*

**Резюме.** В условиях эксперимента разработан способ оценки эндогенной интоксикации при перитоните с использованием клеточной тест системы *Dunaliella viridis*.

**Ключевые слова:** перитонит, эндогенная интоксикация, клеточная тест система *Dunaliella viridis*.

### EXPERIMENTAL SUBSTANTIATIONS OF USING A CELLULAR TEST- SYSTEM OF DUNALIELLA VIRIDIS FOR AN EVALUATION OF THE DEGREE OF ENDOGENOUS INTOXICATION IN PERITONITIS

*V.P.Poliovyi, Yu.M.Solovei, V.V.Bilo'okyi, S.P.Brodovskiy*

**Abstract.** A method of evaluating the degree of endogenous intoxications in purulent peritonitis, employing a cellular test- system has been elaborated under experimental conditions.

**Key words:** a peritonitis, endogenous intoxication degree, *Dunaliella viridis* cellular test-system.

Bukovinian State Medical University (Chernivtsi)

Рецензент – проф. Ю.Є.Роговий

Buk. Med. Herald. – 2011. – Vol. 15, № 1 (57). – P. 144-146

Надійшла до редакції 12.10.2010 року