

## СПЕКТРОФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ДИАГНОСТИКИ ПЕРИТОНИТА

В.В.Салмин, А.А.Ребенкова, А.Ю.Попов, А.Б.Салмина,  
А.В.Степаненко, А.Г.Соколович, А.С.Проворов\*

*Исследована флуоресценция in situ брыжейки, кишечной стенки и париетальной брюшины у здоровых животных (кролики) и при развитии острого экспериментального перитонита. Выявлены длины волн, при которых наиболее достоверно различаются здоровые и пораженные ткани: для брыжейки – 452 и 473 нм (достоверность по T-тесту  $p=99,723\%$ ), для кишечной стенки – 433 и 473 нм ( $p=99,997\%$ ) и для париетальной брюшины – 452 и 471 нм ( $p=99,998\%$ ).*

Флуоресцентный анализ с успехом применяется в медицине [1-6]. В настоящее время разработано большое количество диагностических методик, основанных на регистрации собственной флуоресценции, позволяющих отслеживать развитие онкологических заболеваний, оценивать степень ишемии, а также характер развития воспалительных и дегенеративных изменений. Использование лазерных источников света в данной области является технически более выигрышным благодаря возможности применения волоконно-оптической техники и управления энергетическими характеристиками излучения. Импульсные лазеры позволяют исключить эффекты термического воздействия на ткань, реализовать методики кинетических измерений флуоресценции, обладающие более высокой информативностью, повысить отношение сигнал-шум при неинвазивных методах регистрации собственной флуоресценции ткани [6].

Несмотря на значительное количество клинических и экспериментальных исследований, многие звенья патогенеза перитонита до сих пор остаются мало изученными или дискуссионными. Важный компонент патогенеза перитонита — увеличение проницаемости брюшины, приводящее к облегчению миграции лейкоцитов в очаг воспаления, а также к трансперитонеальной дислокации белков и жидкости. Основную роль в изменении проницаемости перитонеальной мембраны отводят воспалительным цитокинам (ИЛ-6, ФНО- $\alpha$ ), метаболитам арахидоновой кислоты (6-кето-PgF $_{1\alpha}$ , PgE $_2$ ), локальной продукции оксида азота [7]. Сочетание патологической проницаемости брюшины с повышенной проницаемостью сосудистой стенки, обусловленной, в свою очередь, гиперпродукцией вазоактивных аминов и пептидов, производных коагуляционного и фибринолитического каскадов, простаноидами и лейкотриенами [8], приводит к значительной потере белков и плазмы, нарушению микроциркуляции, способствует генерализации воспаления и развитию системного воспалительного ответа.

Значительная роль в осуществлении этих процессов принадлежит мезотелиоцитам и эндотелиоцитам. Клетки брюшины обладают способностью синтезировать и секретировать основные метаболиты арахидоновой кислоты [8], цитокины и экспрессировать молекулы клеточной адгезии, осуществляющие направленную миграцию лейкоцитов. Значительная секреторная активность клеток мезотелия подтверждается доминированием эухроматина и присутствием выраженных ядрышек, хорошим развитием комплекса Гольджи, секреторная функция мезотелиальных клеток значительно усиливается при их активации адгезировавшимися бактериальными клетками [9]. При нарушении функциональной активности мезотелиальных клеток, недостаточной эффективности клиренса микроорганизмов в перитонеальной полости сохраняющиеся в мезотелиоцитах и макрофагах клетки-возбудители воспаления могут стать причиной развития рецидивирующего перитонита [9].

Таким образом, разработка высокоинформативного и чувствительного способа оценки функционального состояния клеток эпителиальной и эндотелиальной природы в очаге воспаления является актуальным и перспективным направлением в развитии методов диагностики, прогнозирования течения и оценки эффективности проводимой терапии. Необходимо признать, что использование флуоресцентной диагностики при возбуждении ультрафиолетовым излучением представляет собой один из наиболее многообещающих подходов к решению этой проблемы, коль скоро позволяет оценивать состояние клеток поверхностного эпителия без нарушения их целостности.

Целью данного исследования стала выработка спектрофлуориметрических критериев для оценки состояния внутренних органов при перитоните, обладающих максимальной достоверностью.

\*© В.В.Салмин, Красноярский государственный университет, salmin@lan.krasu.ru; А.А.Ребенкова, Красноярский государственный университет, arebenkova@mail.ru; А.Ю.Попов, Красноярский государственный университет; А.Б.Салмина, Красноярский государственный университет; А.В.Степаненко, Краевая клиническая больница №1; А.Г.Соколович, Красноярская государственная медицинская академия; А.С.Проворов, Красноярский государственный университет, asp@lan.krasu.ru, 2006.

Первоочередной задачей исследования было выявление тканей, наиболее значимых для диагностики и длин волн, при которых достоверно различаются здоровые и пораженные перитонитом ткани.

## 1. Материал и методы

Работа выполнена на беспородных кроликах-самцах массой 2,5-3,0 кг, содержащихся на обычном рационе в стандартных условиях вивария. Манипуляции с животными выполнены с соблюдением правил гуманного отношения к лабораторным животным.

В эксперименте использованы две группы животных: 1) контрольная группа интактных животных ( $n=9$ ); 2) экспериментальная группа ( $n=13$ ). Использована стандартная модель перитонита с применением жидкой культуры метициллинрезистентного штамма *Staphylococcus aureus*, вводимой внутрибрюшинно однократно (микробное число  $10^7$  на пептонном бульоне в количестве 10 мл/животное).

На 8-е сутки с момента введения культуры животные оперировались под общей анестезией. Аутофлуоресценция ткани париетальной брюшины, кишечной стенки и брыжейки регистрировалась *in situ* с помощью экспериментального лазерного спектрофлуориметра с оптоволоконной доставкой излучения [6]. Для записи спектров флуоресценции использовался контактный метод: оптический зонд накладывался на участок исследуемой ткани площадью  $2 \text{ мм}^2$ , плотно прижимался к нему и оставался неподвижным в течение всего периода записи. Поскольку ткань обладает мозаичностью, спектры флуоресценции решено было записывать *in situ* с нескольких участков исследуемых тканей каждого кролика в диапазоне 425 — 495 нм. Спектры записывались с шагом в 1 нм. Спектры, записанные от каждого участка ткани больных и здоровых кроликов, собирались в массив данных. Интенсивность флуоресценции нормировалась на площадь под спектральной кривой, после чего находился усредненный по всем участкам спектр для каждого вида ткани отдельно для больных и здоровых кроликов и среднееквадратичное отклонение от среднего:

$$I_d^t = \bar{I}_d^t \pm \Delta I_d^t, \quad (1)$$

где  $I_d^t$  — интенсивность флуоресценции;  $\bar{I}_d^t$  — усредненная интенсивность;  $\Delta I_d^t$  — среднееквадратичное отклонение от среднего;  $t$  — вид ткани: брыжейка (Б), кишечная стенка (КС), париетальная брюшина (ПБ);  $d$  — диагноз: больные (i) или здоровые (h) кролики.

На следующем этапе для определения длин волн, при которых максимально различаются спектры больных и здоровых кроликов, строились разностные спектры. Интенсивность разностного спектра имеет следующий вид:

$$\check{I}^t = \frac{\bar{I}_i^t - \bar{I}_h^t}{\Delta I_i^t + \Delta I_h^t}. \quad (2)$$

Из разностных спектров находились длины волн, соответствующие их максимальному и минимальному значениям  $\lambda_{max}$  и  $\lambda_{min}$ . На заключительном этапе из исходных спектральных данных определялось отношение вида:

$$\mathfrak{S}_d^t = \frac{I_d^t(\lambda_{min})}{I_d^t(\lambda_{max})}, \quad (3)$$

и с помощью Т-теста производилась оценка достоверности различий между  $\mathfrak{S}_i$  и  $\mathfrak{S}_h$  для каждого вида тканей.

## 2. Результаты и их обсуждение

Развитие перитонита, характеризующееся появлением классических признаков воспаления (гнойный экссудат содержал нейтрофилы и другие лейкоциты, некротизированные клетки мезотелия, отечную жидкость), сопровождалось достоверным увеличением количества апоптотических клеток мезотелия, сохранившихся на поверхности брюшины, а также появлением апоптотических лейкоцитов в интерстициальном пространстве париетальной брюшины. В совокупности с данными макроскопической картины это подтверждало адекватность используемого способа моделирования острого перитонита.

Усредненные согласно формулам (1)–(3) спектры флуоресценции тканей больных и здоровых кроликов представлены на рис. 2 (А, Б, В).

На рис. 1 (А, Б, В) показаны разностные спектры, вычисленные согласно формуле (3). Из рис. 1 можно определить  $\lambda_{max}$  и  $\lambda_{min}$  (табл. 1).

Данные Т-теста по оценке достоверности различий между  $\mathfrak{S}_i$  и  $\mathfrak{S}_h$ , найденных согласно формуле (3) для каждого вида тканей, представлены в табл. 1.

Таблица 1. Оценка пригодности тканей для диагностики

Характеристики	Брыжейка		Кишечная стенка		Париетальная брюшина	
	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые	Больные	Здоровые
$\lambda_{max}$ , нм	452		433		452	
$\lambda_{min}$ , нм	473		473		471	
$\mathfrak{S}$ , отн.ед.	1,09±0,01	1,05±0,01	0,99±0,02	0,88±0,01	1,07±0,01	1,02±0,01
Достоверность по Т-тесту, %	99,723		99,997		99,998	

Особенно интересным представляется то, что указанные длины волн соответствуют максимумам флуоресценции свободной формы НАД(Ф)Н (473 нм) и связанной с белками формы НАД(Ф)Н (433 нм). Следовательно, наиболее вероятным механизмом, вносящим вклад в появление различий в интенсивности флуоресценции, служит активность НАД(Ф)Н-зависимых внутриклеточных ферментов и/или редокс-состояние клеток. Вместе с тем, не исключен вклад молекул гемоглобина в интегральный показатель аутофлуоресценции в области длин волн, соответствующих пикам поглощения окси- и дезоксиформ гемоглобина в полосе Соре (412, 430 нм). Таким образом, изменение аутофлуоресценции париетальной брюшины, кишечной стенки и брыжейки у животных с перитонитом может быть индикатором нарушений микроциркуляции и оксигенации тканей.

Наши данные свидетельствуют в пользу того, что мезотелий играет ключевую роль в иницировании, амплификации и контроле перитонеального воспаления за счет развития дисметаболических изменений. Регистрация аутофлуоресценции тканей брюшной полости может использоваться в качестве дополнительного маркера функционального состояния перитонеальной мембраны при остром воспалении.

### 3. Выводы

Найденные экспериментально оптимальные условия регистрации аутофлуоресценции тканей брюшной полости, при которых различия между исследуемыми группами носят наиболее очевидный и достоверный характер, позволяют применять этот метод для оценки метаболического статуса тканей *in situ*. На основании полученных данных был сделан вывод о том, что для диагностики могут использоваться все три вида исследованных тканей.

### Список литературы

- [1] ЛИСОВСКИЙ В.А. *Люминесцентный анализ в гастроэнтерологии* / В.А.Лисовский. – Л.: Наука, 1984. – С. 3-27.
- [2] RAMANUJAM N. *Fluorescence Spectroscopy In situ. Encyclopedia of Analytical Chemistry* / N.Ramanujam. – Chichester: 2000. – P. 18-30.
- [3] CHWIROT B.W. / B.W.Chwirot, S.Chwirot, N.Sypniewska, Z.Michniewicz, J.Redzinski, G.Kurzawski, W.Ruka // *J. Invest. Dermatol.* – 2001. – №117(6). – P. 1449-1451.
- [4] GEORGAKOUDI I. / I.Georgakoudi, B.C.Jacobson, M.G.Muller, E.E.Sheets // *Cancer Research.* – 2002. – №2. – P. 682-687.
- [5] BRANCALEON L. / L.Brancaleon, A.J.Durkin, J.H.Tu, G.Menaker, J.D.Fallon // *Photochem. and Photobiol.* – 2001. – №73(2). – P. 178-183.
- [6] ПОПОВ А.Ю. *Спектрофлуориметрический метод оценки ишемии миокарда* / А.Ю.Попов, В.В.Салмин, А.Б.Салмина и др. // *Вестник КрасГУ. Сер. физ-мат. науки.* – 2004. – Вып. 4 – С. 89-92.

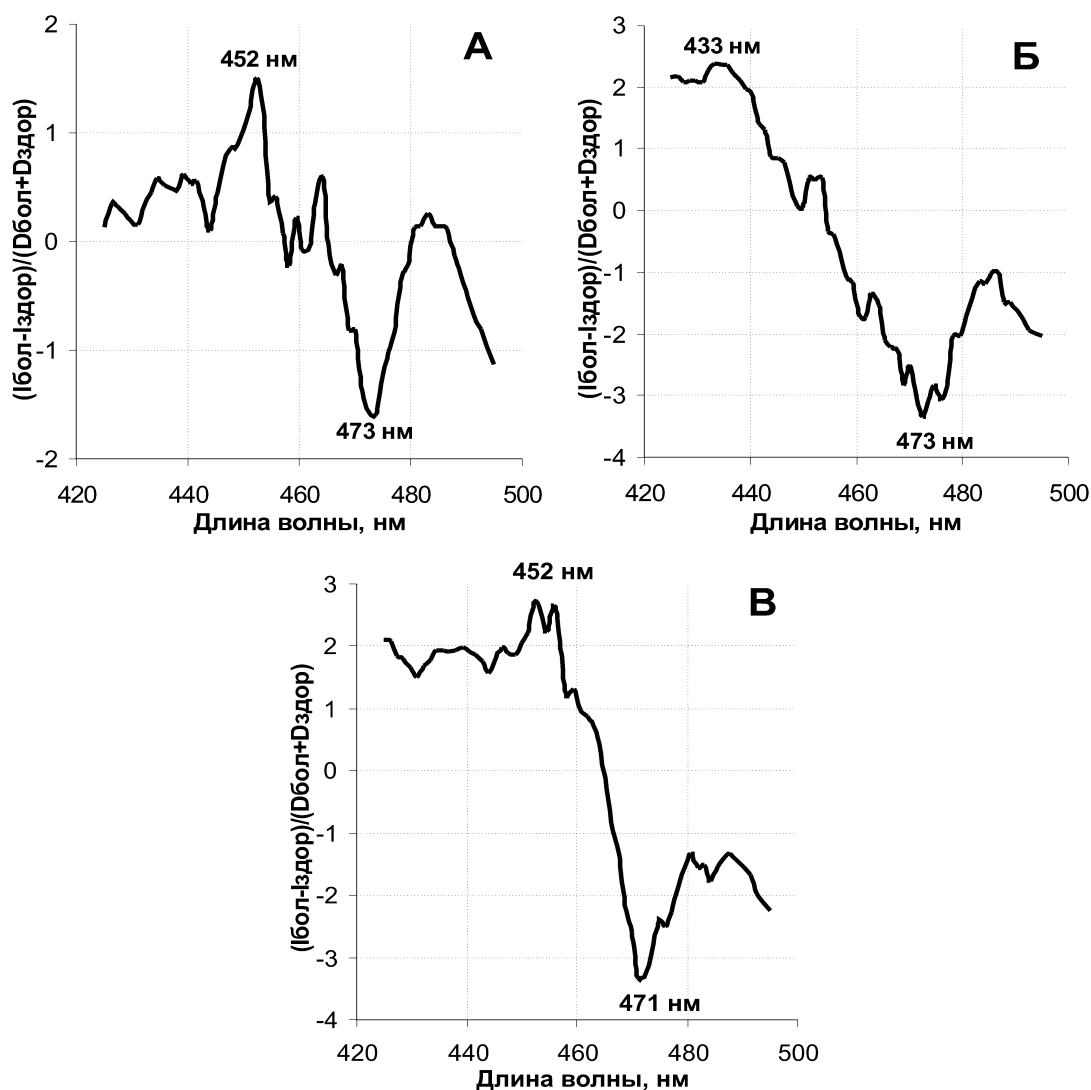


Рис. 1. Разностные спектры для брыжейки (А), кишечной стенки (Б) и париетальной брюшины (В) больных и здоровых кроликов: Iбол, Iздор – интенсивность флуоресценции здоровых и пораженных перитонитом тканей больных и здоровых кроликов; Dбол, Dздор – среднеквадратичное отклонение от среднего

- [7] PENG H. / H.Peng, A.K.Cheung, L.G.Reimer, C.D.Kamerath, J.K.Leyoldt // *Kidney International*. – 2001. – №59. – P. 44-51.
- [8] KOLACZKOVSKA E. / E.Kolaczkovska, S.Shahzidi, R.Seljelid, N.V.Rooijen, B.Plytycz // *Inflammation*. – 2002. – №26. – P. 61-71.
- [9] ZEILMAKER A.M. / A.M.Zeillemaker, R.J.A.Diepersloot, P.Leguit // *Sepsis*. – 1999. – №3. – P. 285-291.

#### SPECTROFLUOROMETRIC METHOD OF PERITONITIS DIAGNOSTICS

V.V.Salmin, A.A.Rebenkova, A.Yu.Popov, A.B.Salmina,  
A.V.Stepanenko, A.G.Sokolovich, A.S.Provorov

*In situ fluorescence of peritonitis, intestinal wall and parietal peritoneum at healthy animals (rabbits) and rabbits with acute experimental peritonitis was investigated. It were found the wavelength*

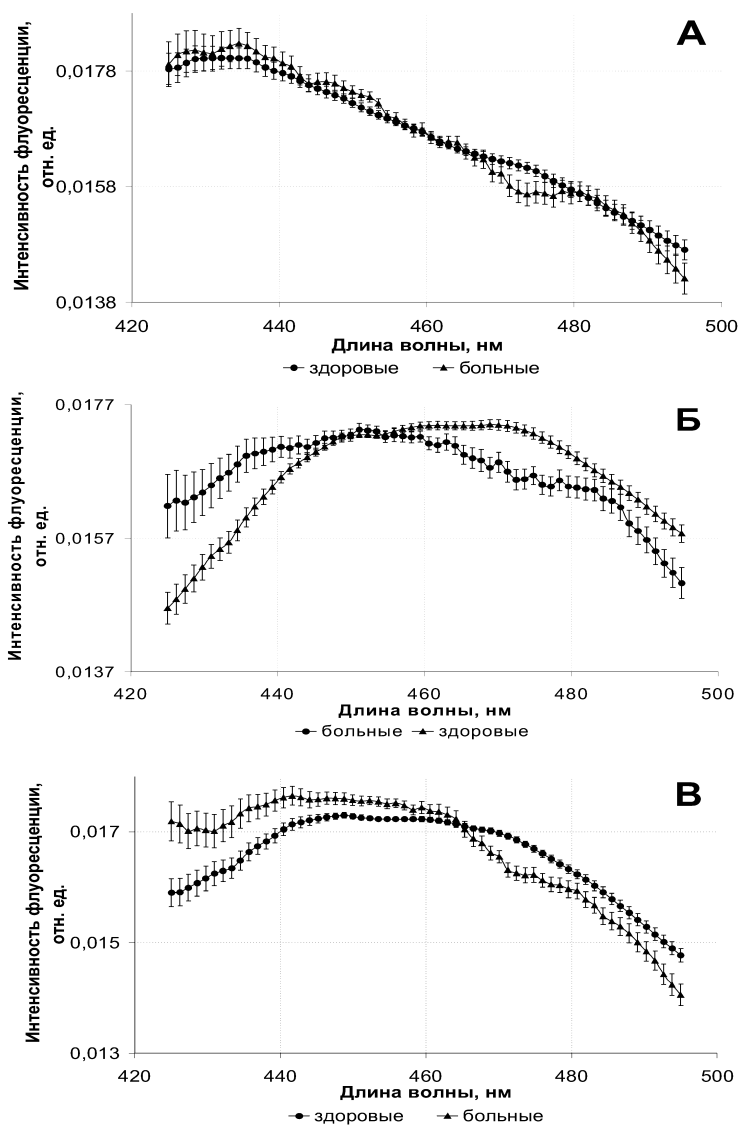


Рис. 2. Усредненные спектры флуоресценции для брыжейки (А), кишечной стенки (Б) и париетальной брюшины (В) больных и здоровых кроликов

*at which healthy and affected tissues are the most authentically differ: for peritonitis - 452 and 473 nm (reliability under the T-test  $p=99,723\%$ ), for intestinal wall - 433 and 473nm  $p=99,997\%$  and for parietal peritoneum - 452 and 471 nm  $p=99,998\%$*