



УКРАЇНА

(19) UA (11) 36811 (13) A

(51) 7 G01N33/48, A61B1/12

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ  
НА ВИНАХІДвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ АНТИТОКСИЧНОЇ ЗДАТНОСТІ ЗАМІННИКІВ ШКІРИ

(21) 2000020758

(22) 11.02.2000

(24) 16.04.2001

(33) UA

(46) 16.04.2001, Бюл. № 3, 2001 р.

(72) Дем'яненко Василь Васильович, Бігуняк Тетяна Володимирівна, Бех Микола Дмитрович, Кулянда Ігор Сергійович

(73) Тернопільська державна медична академія імені І.Я.Горбачевського

(57) Спосіб визначення антитоксичної здатності замінників шкіри, який включає виконання діагностичних проб in vitro шляхом інкубації сироватки крові

організму реципієнта з клітинами діагностичної тест-системи, який відрізняється тим, що у сироватці крові спочатку інкубують клапоть зразка замінника шкіри при співвідношенні від 1:10 до 1:20 протягом 45 хвилин при 37°C, після чого до 0,05 мл надосаду на предметному склі додають аналогічні об'єми зависі лейкоцитів і флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, після чого мікропрепарат додатково витримують 30 хвилин при 37°C та досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу шляхом підрахунку процентного вмісту поліхромно люмінуючих клітин з визначенням індексу токсичності.

Винахід стосується медицини, зокрема, трансплантології, і може бути використаний в хірургічній комбустіології для вибору оптимальних з точки зору клінічної ефективності штучних і природних замінників шкіри.

Відомий спосіб визначення антитоксичної здатності замінників шкіри, який включає виконання діагностичних проб in vitro шляхом інкубації сироватки крові організму реципієнта з клітинами діагностичної тест-системи [1]. Оцінку антитоксичної здатності замінників шкіри здійснюють шляхом порівняння функціонального стану клітин тест-системи в оточенні токсичних компонентів сироватки крові опечених хворих до і після операції трансплантації: чим менш виражені цитотоксичні прояви в ізольованих клітинах в мікропрепараті, тим більш висока антитоксична здатність трансплантованого замінника шкіри.

Недоліком відомого способу є недостатній рівень інформативності. Оскільки результат діагностичного дослідження отримують після виконання хірургічної операції трансплантації, то він може бути використаним лише для оцінки ефективності лікування конкретного пацієнта в динаміці, але не може бути використаним для формування прогностичної оцінки з метою попереднього (перед трансплантацією) вибору найбільш оптимального замінника шкіри з точки зору його антитоксичної здатності, що може негативно позначитися на ефективності лікування в цілому. Крім того, до недоліків слід віднести недостатню точність, оскільки феномен зменшення концентрації токсинів у крові опечених після трансплантації замінника шкіри бе-

руть участь фактори, що безпосередньо не пов'язані з дією саме того чи іншого замінника.

В основу винаходу поставлене завдання удосконалити спосіб визначення антитоксичної здатності замінників шкіри, в якому шляхом постановки in vitro цитотоксичних тестових реакцій крові реципієнта з компонентами субстрату замінника шкіри досягають підвищення точності та інформативності способу.

Поставлене завдання вирішують тим, що у відомому способі визначення антитоксичної здатності замінників шкіри, який включає виконання діагностичних проб in vitro шляхом інкубації сироватки крові організму реципієнта з клітинами діагностичної тест-системи, у відповідності до винаходу, у сироватці крові спочатку інкубують клапоть зразка замінника шкіри при співвідношенні від 1:10 до 1:20 протягом 45 хвилин при 37°C, після чого до 0,05 мл надосаду на предметному склі додають аналогічний об'єм зависі лейкоцитів реципієнта, після чого мікропрепарат додатково витримують 30 хвилин при 37°C та досліджують в полі зору люмінесцентного мікроскопу шляхом підрахунку процентного вмісту поліхромно люмінесціюючих клітин з визначенням індексу токсичності.

Спосіб здійснюють таким чином.

В стерильну пробірку з 5 мл сироватки крові опеченого вносять 0,25 г дослідного зразка сухого замінника шкіри й вміщують в термостат при 37°C на 45 хвилин, після чого клапоть замінника шкіри з пробірки виймають, а сироватку центрифугують (15 хвилин при 3000 об·хв<sup>-1</sup>). До 0,05 мл надосадової рідини на предметному склі вносять 0,05 мл

(19) UA (11) 36811 (13) A

завису лейкоцитів крові реципієнта та 0,05 мл флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000. Отриману суміш накривають покривним скельцем і інкубують при 37°C протягом 30 хвилин. Мікропрепарат досліджують у полі зору люмінесцентного мікроскопу, визначаючи процентний вміст лейкоцитів з поліхромним світінням ядерних субстанцій, а саме зеленим, оранжевим і червоним кольорами. Здатність дослідного зразка заміниці шкіри зв'язувати токсини з сироватки крові оцінюють за індексом токсичності, який визначають як середню кубічну показників процентного вмісту поліхромних клітин в мікропрепараті [2].

Приклад 1. В стерильну пробірку з 4,0 мл сироватки крові опеченого занурили 0,20 г клаптя сухого ксенодермотрансплантату - ліофілізованого препарату шкіри свині й вмістили в термостат при 37°C на 45 хвилин. Після цього клапоть ксенодермотрансплантату витягли, а сироватку відцентрифугували. На предметне скло до 0,05 мл сироватки мікропіпеткою внесли 0,05 мл завису лейкоцитів

периферичної крові і такий же об'єм флюорохрому акридину оранжевого в розведенні 1:10000, усе змішали і накрили покривним скельцем. Після 30-хвилинної інкубації при 37°C мікропрепарат досліджували у полі зору люмінесцентного мікроскопу, визначаючи процентний вміст лейкоцитів з поліхромним світінням клітинних ядер.

Про рівень антитоксичної здатності клаптя ксенодермотрансплантату судили за величиною індексу токсичності, порівнюючи його відхилення (в процентах) від значення індексу контрольного препарату, тобто без інкубації в сироватці клаптя трансплантату.

Результати дослідження наведені в таблиці 1, з яких видно, що дослідний препарат заміниці шкіри на 37% зменшив рівень токсичності сироватки крові, що свідчить про доцільність його застосування для лікування опеченого, наприклад, як біологічної пов'язки на опечену рану.

Таблиця 1

№ п/п	Серії дослідів	Співвідношення поліхромних лейкоцитів в мікропрепараті			Індекс токсичності	Δ% %
		Зелені	Оранжеві	Червоні		
1	Контроль (лейкоцитотоксичність сироватки крові опеченого хворого перед ксенотрансплантацією)	82	14	4	16,6	100
2	Дослід (ксенодермотрансплантат шкіри свині)	92	6	2	10,4	-37,3

Приклад 2. При допомозі запропонованого способу провели дослідження антитоксичної здатності заміників шкіри природного і штучного походження у хворого П., 34 років, який перебував на

стаціонарному лікуванні в опіковому центрі з приводу термічного опіку шкіри ніг III-А.Б ступеня (18%). Результати дослідження антитоксичної здатності заміників шкіри наведені в таблиці 2.

Таблиця 2

№ п/п	Серій дослідів	Співвідношення поліхромних лейкоцитів в мікропрепараті			Індекс токсичності	Δ% %
		Зелені	Оранжеві	Червоні		
1	Контроль	82	14	4	16,6	100
2	Штучна шкіра "Duo Dem E"	88	8	4	14,1	-15,1
3	Штучна шкіра "Duo Dem"	81	13	6	18,5	+11,4
4	Штучна шкіра "Comfeel"	73	17	10	23,2	+39,8
5	Дослід (ксенодермотрансплантат шкіри свині)	92	6	2	10,4	-37,3

Як видно з наведених в табл. 2 даних, різні за походженням заміники шкіри не в однаковій мірі виявляють здатність блокувати токсичні фактори сироватки крові опечених хворих, що, перш за все, засвідчує факт необхідності проведення індивідуалізованого вибору найбільш оптимального заміника шкіри для лікування опечених. Отже, за результатами наведеного контрольного дослідження можна зробити висновок, що заміники шкіри "Duo Dem E" та "Duo Dem" не тільки не здатні зв'язувати токсини, але й ініціюють або/і посилюють цитотоксичні реакції клітин тест-системи. В той же час ксенодермотрансплантат на основі ліофілізованої шкіри свині забезпечує високу антитоксичну здатність. Обраний з використанням зазначеного способу для трансплантації у хворого П. заміник

шкіри забезпечив ефективне лікування опікової рани шляхом ксенотрансплантації.

Таким чином, запропонований спосіб визначення антитоксичної здатності заміників шкіри виявився більш точним і значно інформативнішим, ніж спосіб-прототип, що має важливе значення для підвищення клінічної ефективності трансплантаційного лікування в цілому.

Джерела інформації, які слід взяти до уваги:

1. Способ определения токсичности сыворотки крови / А. с. № 1476382, 1989 // Бигуляк В.В., Бех Н.Д., Романюк А.Н., Мурованый И.В.
2. Методи дослідження ендогенної інтоксикації організму (методичні рекомендації) / Андрейчин М.А., Бех М.Д., Дем'яненко В.В. та ін. Київ, 1998. - 32 с.

---

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)  
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26  
(044) 295-81-42, 295-61-97

---

Підписано до друку \_\_\_\_\_ 2001 р. Формат 60х84 1/8.  
Обсяг \_\_\_\_\_ обл.-вид. арк. Тираж 50 прим. Зам. \_\_\_\_\_

---

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180.  
(044) 268-25-22

---