

МОДИФІКАЦІЯ МЕТОДУ РОЗВЕДЕННЯ ФАРБИ ДЛЯ ВИЗНАЧЕННЯ ЗАГАЛЬНОГО ОБ'ЄМУ КРОВІ У ХОВРАХІВ ТА ЩУРІВ

П. В. Белошицький

Відділ гіпоксичних станів Інституту фізіології ім. О. О. Богомольця АН УРСР,
Київ

Методи дослідження гемодинамічних показників при введенні у кров'яне русло фарби Еванса (Т-1824) широко відомі. Проте при застосуванні методу розведення барвника для визначення загального об'єму крові (ЗОК) у дрібних тварин (ховрашки, щури) ми натрапляли на ряд труднощів.

Після деяких методичних, технічних доробок та трирічної експериментальної роботи наводимо модифікацію методу.

1. Готуємо 0,025% фарбу Т-1824 на фізіологічному розчині (в 1 мл—250 мкг синьки Еванса).

2. Одержуємо 10—15 мл плазми з крові не менше 10 тварин таким же способом, як і в досліді — при декапітації, з підключичної артерії чи з серця. Кров центрифугуємо двічі по 20 хв при 3000 об/хв.

3. Готуємо розчин А, змішуючи 4 мл плазми з 1 мл 0,025% розчину фарби Еванса (в 1 мл — 50 мкг фарби).

4. Користуючись мікропіпеткою, в 12 пробірок відміряємо розчин А від 0,05 до 0,60 мл і додаємо стільки плазми, щоб загальна кількість у кожній пробірці дорівнювала 1 мл. Як видно з табл. 1, одержуємо різні концентрації фарби — від 2,5 до 30,0 мкг в 1 мл.

5. Користуючись ФЕК, розчини в пробірках 1—12 колориметруємо в кюветі 3,0 мм при червоному світлофільтрі проти фізіологічного розчину. Одержані дані використовуємо для складання на міліметровому папері графіка залежності показника екстинкції від концентрації барвника.

Після проведення підготовчих операцій приступаємо до визначення ЗОК. Для цього фіксованій тварині препаруємо гомілкову вену, заздалегідь розширену протиранням толуюлом, і за допомогою тонкої голки та одноміліметрового шприца вводимо 150 мкг (0,6 мл 0,025% розчину) фарби Еванса (щуром фарбу можна вводити в хвостову вену). Рану забинтовуємо, а через 10 хв збираємо кров (при декапітації, чи з серця, чи з підключичної артерії). Кров центрифугуємо двічі по 20 хв, а забарвлену плазму колориметруємо на ФЕК у кювету 3,0 мм при червоному світлофільтрі проти фізіологічного розчину.

Розрахунок проводимо за формулою: $X = \frac{10000 \cdot I}{C \cdot P(100 - H)}$, де X — загальна кількість крові в мл на 100 г ваги тварини, I — кількість введеної фарби в мкг, C — кількість фарби в 1 мл плазми в мкг (знаходимо по графіку), P — вага тварини в г, H — показник гематокриту в %. Наприклад: ховрашку, вагою 300 г, ввели 150 мкг фарби. За допомогою графіка встановили — в плазмі фарба розбавилась до 15 мкг в 1 мл.

$$H = 40\%. X = \frac{10000 \cdot 150}{15 \cdot 300(100 - 40)} = 5,55.$$

Цей метод достатньо простий і точний. Проте він допускає незначні похибки, зв'язані з різною оптичною густиною плазми у різних піддослідних тварин. Для уникнення цих помилок користуємось описаним методом екстракції синьки [1]. Його застосування особливо бажане при визначенні ЗОК у ховрахів у динаміці, тому що в період зимової сплячки різко змінюються оптичні властивості сироватки.

Подаємо модифікацію цього методу для визначення ЗОК у ховрахів та щурів. Для зручності при користуванні обома методами, для можливості їх порівняння ми зберегли однаковими дози та ряд технічних прийомів.

Перш за все для побудовання графіка залежності показника екстинкції від концентрації барвника готуємо розчини Б (абсолютний етиловий спирт — 31 мл, 25% гідроксид амонію — 3 мл, льодова оцтова кислота — 6 мл) і В (4,5 мл розчину Б і 0,5 мл 0,025% синьки). Згідно табл. 2, утворюємо різні концентрації барвника і колориметруємо на ФЕК у кюветі 10,0 мм в червоному світлофільтрі проти розчину Б.

Після введення фарби тварині одержуємо забарвлену сироватку і далі роботу проводимо так:

1. До 1,0 мл сироватки додаємо 0,5 мл 20% трихлороцтової кислоти і центрифугуємо 10 хв при 1500 об/хв. Надосадову рідину зливаємо.

2. Осад двічі промиваємо абсолютним етиловим спиртом. Після кожного промивання центрифугуємо.

3. До осаду додаємо 0,2 мл 25% гідроокису амонію і старанно змішуємо. Додаємо 1 мл абсолютного етилового спирту.

4. 10 хв струшуємо, центрифугуємо 15 хв (3000 об/хв), надосадову рідину збираємо.

Таблиця 1

Вихідні дані для визначення показників екстинкції

№ пробки	Розчин А, в мл	Кількість плазми, в мл	Кількість фарби, в 1 мл (в мкг)
1	0,05	0,95	2,5
2	0,10	0,90	5,0
3	0,15	0,85	7,5
4	0,20	0,80	10,0
5	0,25	0,75	12,5
6	0,30	0,70	15,0
7	0,35	0,65	17,5
8	0,40	0,60	20,0
9	0,45	0,55	22,5
10	0,50	0,50	25,0
11	0,55	0,45	27,5
12	0,60	0,40	30,0

Таблиця 2

Визначення показників екстинкції при застосуванні методу екстракції

№ пробки	Розчин Б, в мл	Розчин В, в мл	Концентрація фарби, в мкг
1	3,95	0,05	1,25
2	3,90	0,10	2,50
3	3,85	0,15	3,75
4	3,80	0,20	5,00
5	3,75	0,25	6,25
6	3,70	0,30	7,50
7	3,65	0,35	8,75
8	3,60	0,40	10,00
9	3,55	0,45	11,25
10	3,50	0,50	12,50

Примітка. При наявності лише 10 мл плазми, кількість точок для складання графіка можна зменшити до 8, пропустивши пробки з № 2, 4, 9, 11.

5. До осаду додаємо 1 мл абсолютного етилового спирту і повторюємо дії, зазначені в пункті 4.

6. До осаду додаємо 0,1 мл 25% гідроокису амонію і 1,1 мл абсолютного етилового спирту і повторюємо дії, зазначені в пункті 4.

7. Всі екстракти змішуємо, додаємо 0,6 мл льодової оцтової кислоти і колориметруємо в кюветі 10,0 мм.

Одержану з допомогою графіка величину концентрації фарби, відповідно знайденого значення екстинкції, підставляємо замість C у наведену вище формулу.

Література

1. Ковалева О. А., Канаева М. А., Монашкіна Е. А. — Кардиология, 1966, 2, 136.

Надійшла до редакції
28.III 1974 р.