

УДК 616.718.41-021.4-002.4-08-039.75

Лушпай О.¹, Товстокорий О.², Головченко І.¹

МЕТОДИКА ДОСЛІДЖЕННЯ ДІЇ АСЕПТИЧНИХ ПРЕПАРАТІВ НА РЕАКЦІЮ ОРГАНІЗМУ

¹ Херсонський державний університет

² Херсонська обласна клінічна лікарня

У даній статті розроблена методика визначення впливу метиленового синього на організм. Унікальні асептичні властивості метиленового синього відкрилися світовій спільноті ще в 19 столітті. Суть ефективності дії лікарського препарату полягає в нанесенні рідини з метиленової синню на поверхню інфікованого епітелію, де відразу ж утворюється міцне з'єднання органічної речовини з ДНК хвороботворних мікроорганізмів, в результаті чужорідні клітини миттєво гинуть. Асептична дія метилена синього широко використовується для знезараження у хірургії, стоматології, багатьох інших галузях медицини, ветеринарії, володіє відмінними протизапальними властивостями.

Ключові слова: метиленовий синій, запалення, асептичні властивості, показники крові.

Дія метилена синього на організм ще недостатньо вивчена, даний засіб належить до препаратів, які здатні попередити розвиток і розмноження шкідливих мікроорганізмів у відкритих ранах. Розчину метиленового синього притаманні окислювально-відновні характеристики. Потрапляючи в організм в невеликій кількості, розчин метиленового синього відновлює метгемоглобін Нb, в протилежному випадку (перебуваючи в підвищених дозах) – переводить Нb метгемоглобін, який з'єднується з ціанідами.

Мета. Розробити методику впливу метилена синього на запальні процеси в організмі.

Унікальні асептичні властивості метиленового синього відкрилися світовій спільноті ще в 19 столітті. Суть ефективності дії лікарського препарату полягає в нанесенні рідини з метиленової синню на поверхню інфікованого епітелію, де відразу ж утворюється міцне з'єднання органічної речовини з ДНК хвороботворних мікроорганізмів, в результаті чужорідні клітини миттєво гинуть. Асептична дія метилена синього широко використовується для знезараження у хірургії, стоматології, багатьох інших галузях медицини, ветеринарії, володіє відмінними протизапальними властивостями [2].

Методика дослідження впливу метилена синього включає в себе такі етапи:

- 1) Вимірювання кількості лейкоцитів в крові.

Принцип. Підраховують лейкоцити під мікроскопом в певному об'ємі лічильної камери при постійному розведенні крові після руйнування еритроцитів.

Реактив: 3-5% розчин оцтової кислоти, підфарбований водним розчином метиленового синього для фарбування ядер лейкоцитів і полегшення їх підрахунку. Розчин блакитного кольору, стійкий при зберіганні.

Спеціальне обладнання: мікроскоп, камера Горяєва.

Хід визначення. У агглютинаційну пробірку з допомогою мірної піпетки або автоматичного дозатора наливають точно 0,4 мл розчину оцтової кислоти і вносять у нього 0,02 мл (капіляр Салі) крові. Промивають капіляр кілька разів розчином кислоти і перемішують вміст пробірки. При цьому виходить розведення крові в 20 разів. Залишають до моменту рахунку, але не більш 2-4 годин після забору крові. Підготовлюють до роботи камеру Горяєва, притираючи покривне скло так, щоб з'явилися райдужні кільця. Ще раз ретельно струшують вміст пробірки і заповнюють цією сумішшю камеру Горяєва за допомогою пастерівської піпетки або скляної палички з оплавленим кінцем. Залишають заповнену лічильну камеру на 1 хвилину в горизонтальному положенні для осідання лейкоцитів. Підраховують лейкоцити в 100 великих не разграфлених квадратах лічильної камери при умовах: опущений конденсор, окуляр 10x або 15x, об'єктив 8x. Рахунок починають від лівого верхнього кута сітки камери Горяєва. При підрахунку лейкоцитів керуються правилом: рахують всі клітини, що знаходяться всередині квадрата і на розмежувальних лініях, якщо вони здебільшого заходять всередину квадрата. Клітини ж, пересічені розмежувальною лінією точно навпіл, підраховують лише на двох сторонах квадрата (наприклад, лівої і верхньої).

Розрахунок. При розрахунку кількості лейкоцитів в 1мкл крові використовують формулу:

$$X = (A \times 4000 \times 20) / 1600 = a \times 50, \text{ де}$$

X – кількість лейкоцитів в 1мкл крові;

a – кількість лейкоцитів, підраховану в 100 великих квадратах;

4000 – коефіцієнт переведення обсягу на 1мкл, виходячи з об'єму малого квадрату, який становить 1/4000 мкл;

1600 – кількість полічених малих квадратів;

20 – розведення крові.

Для переведення кількості лейкоцитів в одиниці СІ (в 1л крові) отриману цифру множать на 10^6 .

Практично для визначення вмісту лейкоцитів в 1 л крові кількість лейкоцитів, підраховану в 100 великих квадратах лічильної камери, множать на 50, ділять на 1000 (тобто переносять кому на 3 знаки ліворуч) і множать на 10^9 .

2) Вимірювання кількості еритроцитів в крові.

Принцип. Підраховують еритроцити під мікроскопом в певному об'ємі лічильної камери при постійному розведенні крові.

Реактив: 0,9% розчин хлориду натрію (фізіологічний розчин).

Спеціальне обладнання: мікроскоп, рахункова камера Горяєва.

Хід визначення. В чисту суху пробірку з допомогою мірної піпетки або автоматичного дозатора наливають точно 4мл фізіологічного розчину і 0,02 мл (капіляр Салі) крові. Промивають капіляр розчином 2-3 рази і перемішують вміст пробірки – при цьому виходить розведення крові в 200 разів. Залишають до моменту рахунку, але не більше 2-3 годин. При підозрі на анемію підрахунок проводять відразу ж після взяття крові, так як еритроцити при деяких видах анемій швидко руйнуються. Підготовлюють до роботи камеру Горяєва. Ще раз ретельно перемішують вміст пробірки і заповнюють цією сумішшю камеру Горяєва за допомогою пастерівської піпетки або скляної палички з оплавленим кінцем. Залишають заповнену лічильну камеру на 1 хвилину в горизонтальному положенні для осідання еритроцитів. Підраховують еритроцити в 5 великих квадратах, розграфлених кожен на 16 малих квадратів і розташованих по діагоналі сітки Горяєва. Таким чином, вважають еритроцитів в 80 малих квадратах. Рахунок починають з лівого верхнього кута сітки і ведуть при умовах: опущений конденсор, окуляр 10X або 15X, об'єктив 8X. При підрахунку еритроцитів керуються тими ж правилами, що й при підрахунку лейкоцитів, тобто вважають всі клітини, що знаходяться всередині квадрата і на розмежувальних лініях, якщо вони здебільшого заходять всередину квадрата. Клітини ж, пересічені розмежувальною лінією точно навпіл, підраховують лише на двох сторонах квадрата (наприклад, лівої і верхньої).

Розрахунок. Кількість еритроцитів в 1мкл крові розраховують за формулою:

$$X = (A \times 4000 \times 200) / 80 = a \times 10000, \text{ де}$$

X – кількість еритроцитів в 1мкл крові;

a – кількість еритроцитів, підрахованих в 80 малих квадратах,

4000 – коефіцієнт переведення обсягу на 1мкл (об'єм одного малого квадрата дорівнює мкл); 200 – розведення крові; 80 – кількість полічених малих квадратів.

Щоб перевести вміст еритроцитів в одиниці СІ (1л крові), кількість еритроцитів у мільйонах множать на 10^{12} . Практично для визначення вмісту еритроцитів в 1 л крові на кількість еритроцитів, підраховану в 5 великих квадратах, ділять на 100 (тобто переносять кому на 2 знака вліво) і множать на 10^{12} .

Підрахунок еритроцитів в лічильній камері є трудомістким і недостатньо точним методом. На результати підрахунку позначаються найменша неточність при взятті крові в капіляр, недостатнє перемішування

крові з 0,9% розчином NaCl, будь-яке відхилення від правил підготовки лічильної камери, її заповнення і підрахунку клітин, а також недоброякісність реактиву і мокра або брудний посуд (пробірки, піпетки, капіляри).

3) Вимірювання кількості гемоглобіну за допомогою тест-системи (ціанідним методом).

Гемоглобін в присутності окислювача та ціанід аніонів утворює у водному розчині ціанметгемоглобін, забарвлення якого пропорційне концентрації гемоглобіну у крові [3,4].

Обладнання:

1) Фотометричне обладнання, яке здатне вимірювати оптичну щільність розчинів при довжині хвилі 540 (520-550) нм. в діапазоні (0-1) од. опт. щільності та довжині оптичного шляху 10 мм.

2) Мірна колба місткістю 2000 мл. Пробірки місткістю 20 мл.

3) Піпетки місткістю 0,1 та 5 мл.

Приготування робочих розчинів:

1) Трансформуючий розчин. Вміст флакону з окислювальним реагентом та ампули з ацетонціангідрином КІЛЬКІСНО переносять в мірну колбу місткістю 2000 мл, доводять до мітки дистильованою водою та перемішують. Потім перенести у ємність темного скла, що герметично закривається.

2) Калібрувальний розчин геміглобінціаніду – придатний для використання. Після відкупорювання ампули розчин стійкий на протязі 6 місяців, при зберіганні у холодильнику від плюс 2 °С до плюс 8 °С (у закритому стані).

Проведення аналізу:

1) Дослідна проба. 0,2 мл крові перемішують, запобігаючи утворенню піни, з 5 мл трансформуючого розчину, витримують 15 хв і фотометрують проти трансформуючого розчину. Остаточне забарвлення стабільне протягом 2 год після закінчення інкубації за умови запобігання від улучення прямого сонячного світла.

2) Калібрувальна проба. Вимірюють оптичну щільність калібрувального розчину геміглобінціаніду проти трансформуючого розчину (оптична щільність відповідає пробі крові з концентрацією гемоглобіну 150 г/л).

Концентрація гемоглобіну розраховують за формулою:

$$C = (E_{\text{досл.}} / E_{\text{кал.}}) \times 150 \text{ г/л, де}$$

C – концентрація гемоглобіну в крові, г/л;

150 – концентрація гемоглобіну у калібрувальному розчині, г/л;

E_{досл.} – оптична щільність дослідної проби, од. опт. щільності;

E_{кал.} – оптична щільність проби калібрувальної проби, од. опт. щільності.

Дослідження впливу метиленового синього на організм шляхом порівняння нормальних показників крові з патологічними показниками [1, 5, 6], виявлення міграції лейкоцитів при запаленні, виявлення реакції організму на дію препарату, простежування стадій запалення, дану методику можна застосувати при дослідженні інших препаратів для подальшого їх використання при лікуванні організму.

ЛІТЕРАТУРА

1. Абрикосов, А. И. Патологическая анатомия / А.И. Абрикосов, А.И. Струков. – М.: Государственное издательство медицинской литературы, 2014. – 360 с.
2. Беликов В. Г. Фармацевтическая химия: учебн. пособие для вузов / В.Г. Беликов. – 3-е изд. – М.: МЕДпресс-информ, 2009. – 615с.
3. Назаренко Т. И. Клиническая оценка результатов лабораторных исследований / Т. И. Назаренко, А. А. Кишкун. – М. : Медицина, 2002. – 544с.
4. Козловская, Л. В. Учебное пособие по клиническим лабораторным методам исследования (с элементами программирования) : для мед. ин-тов / Л. В. Козловская, М. А. Мартынова; под ред. акад., проф. Е. М. Тареева и проф. А.В. Сумарокова. – М. : Медицина, 1975. – 352 с.
5. Крылов, Ю. В. Основы патологической анатомии / Ю.В. Крылов, А.Ю. Крылов. – М.: Медицинская литература, 2011. – 288 с.
6. Струков, А. И. Патологическая анатомия / А.И. Струков, В.В. Серов. – М.: ГЭОТАР-Медиа, 2013. – 880 с.

Lushpai O.¹, Tovstokory O.², Golovchenko I.¹

METHOD OF RESEARCH OF ACCEPTANCE DRUGS EFFECT ON REACTION OF ORGANISM

In this article, a method for determining the effect of methylene blue on the body is developed. Unique aseptic properties of methylene blue have opened to the world community as early as the 19th century. The essence of the effectiveness of the drug is the application of liquid from the methylene sinne to the surface of the infected epithelium, where immediately formed a solid connection of organic matter with DNA pathogenic microorganisms, resulting in foreign cells immediately die. The aseptic effect of methylene blue is widely used for decontamination in surgery, dentistry, many other branches of medicine, veterinary medicine, has excellent anti-inflammatory properties.

Key words: methylene blue, inflammation, aseptic properties, blood parameters.