**УДОСКОНАЛЕННЯ ФУКСИНОВОЇ ПРОБИ**

Гриньова А. О., Андрєєва С. В., Андросов Є. Д.

**Мета роботи** – удосконалити методику визначення ступеня знебарвлення кислого фуксину, як одну з нетрудомістких і недорогих для оцінки стану організму при дії на нього факторів навколишнього середовища.

**Матеріал і методи**. Вивчена методика К.С. Косякова, в якій кислий фуксин знебарвлюється при відновленні, але зберігає безбарвність лейкобази й в присутності кисню, а ступінь його знебарвлення може бути виміряна в фотоелектроколориметрі (ФЕК), що дозволяє одержати цифрове відбиття результатів. Цей принцип використаний автором та іншими дослідниками в якості нового симптому загальної реакції на пошкодження, який добре корелює з такими показниками стрес-синдрому, як нейтрофільно-лімфоцитарний коефіцієнт, вміст холестеролу в сироватці крові, 17-оксикортикостероїдів у крові та сечі, альбумінів і глобулінів у крові й дозволяє оцінити тяжкість стану хворого.

**Результати дослідження та їх обговорення.** Як показали наші спостереження, по мірі того як із основного розчину фуксину й дистильованої води в окремій пробірці приготовлена робоча концентрація реактиву й потрібний об’єм якого внесено в досліджувану кювету, екстинкція його проти дистильованої води не є постійною, а протягом певного проміжку часу знижується на деяку величину, що вказує на факт знебарвлення барвника під дією якихось причин. А в такому випадку й відсоток знебарвлення фуксину сироваткою, зокрема за першу хвилину реакції, може бути штучно збільшеним, причому кожен раз на невизначену величину в залежності від оперативності експериментатора (швидкості запуску ним реакції) та існуючого відновлювального фону. У зв’язку з цим нами проведена серія досліджень, у ході яких робочий розчин барвника швидко вносили в досліджувану кювету й виявлялася проти контролю його величина екстинкції. Як було встановлено (n=9), навіть при використанні свіжоприготовленої дистильованої води, старанно вимитих пробірок і кювет для робочого розчину, мало місце зниження значення екстинкції вмісту дослідної кювети – до 1,71%. Причому, за першу хвилину відмічався найбільший відсоток знебарвлення (х1=1,39%), за другу хвилину він помітно зменшувався (х2=0,29%) і стабілізувався за третю-четверту хвилину (х3=0,03%; х4=0%). Приймаючи до уваги відсутність у відомій методиці даних про знебарвлення розчину кислого фуксину in vitro іншими конкретними донаторами водню, крім глютатіону та цистеїну, слід тоді пояснити описаний феномен все ж хоча й незначним, але певним забрудненням використовуваних піпеток, пробірок, кювет і дистильованої води, які зумовлюють у кінцевому підсумку певний відновлювальний фон. Тому ми готували таку робочу концентрацію фуксину, щоб значення її екстинкції знаходилося ближче до верхньої межі відомого інтервалу (0,350±0,030 од.), тобто вкладалось у межах 0,350–0,380 од. Протягом мінімум трьох хвилин стежили за її величиною й при відхиленні стрілки гальванометру від умовного нуля знову добивалися її повернення на нульову відмітку. Переконавшись у стабільності оптичної щільності барвника, знімали показання ФЕК, яке було початковим для виявлення якості досліджуваної сироватки.

Візуальна диференціація сироватки на гемолізовану та негемолізовану, що широко практикується, неприйнятна в силу свого суб’єктивізму. У той же час, у доступній нам літературі має місце лише єдина вказівка вважати сироватку непридатною для дослідження, зокрема для виявлення активності церулоплазміну, коли екстинкція її розведення 0,4 М ацетатним буфером у відношенні 1:1 перевищує 0,1 од. У зв’язку з цим, по мірі внесення 0,1 мл сироватки в кювету з водою й перемішування, ми знову знімали показання приладу, яке й було остаточним для виявлення якості біооб’єкту й початковим для самої реакції. У випадку встановлення зниження показання приладу більш ніж на 0,012 од. екстинкції, сироватка визнавалася непридатною для дослідження й фуксинова проба з нею не проводилась.

Крім того, практика проведення великої кількості визначень підказала можливість полегшення виміру показників екстинкції аналізованого вмісту, особливо за першу хвилину протікання реакції. Так, було встановлено, що величина екстинкції відомого об’єму робочого розчину барвника після хвилинної дії на нього відновлювальних компонентів досліджуваної сироватки вкладається кожен раз у цілком певний інтервал значень барабана ФЕКа, який, зокрема для сироватки людини, дорівнював 0,109–0,166 од. (у середньому 0,130 од.; n=20), а для сироватки кроликів – 0,172–0,222 од. (у середньому 0,201 од.; n = 27). Це дозволило скоротити кількість маніпуляцій шляхом попередньої установки барабана у вищеназвані інтервали значень уже після виміру початкової величини екстинкції й ще до початку реакції. У такому випадку при відчиненні шторки гальванометра стрілка його, у силу мінімально можливого розходження фотострумів, набуває лише незначної амплітуди коливань від умовного нуля, у зв’язку з чим виникає можливість швидко й плавно встановити її на останньому точно в заданий момент протікання реакції. Було також установлено, що величина екстинкції вмісту дослідної кювети після 10-хвилинної дії на нього сироватки укладається кожен раз в інтервал значень барабана, рівний 0,052–0,067 од. для сироватки людини (у середньому 0,059 од.) і в інтервалі 0,043–0,087 од. (у середньому 0,067 од.) для сироватки кроликів. І в даному випадку, правда, вже не стільки з метою економії часу на виконання самої маніпуляції, а більш обережного відношення до гальванометру, барабан ФЕК також попередньо установлюється у вищевказані інтервали значень екстинкції відповідно природи досліджуваної сироватки.

**Висновки.** Урахування запропонованих нами рекомендацій при проведенні фуксинової проби дозволяють уникнути можливості дослідження непридатної для цього сироватки крові й штучного збільшення знебарвлення барвника до 1,71%, а також підвищують точність виявлення відсотка відновлення реактиву за 10 хвилин та особливо першу хвилину протікання реакції.