

FRANCISZEK M. SPIOCH, JERZY ROZMUS

PROSTA METODA OZNACZANIA ZUŻYCIA TLENU U MAŁYCH ZWIERZĄT DOŚWIADCZALNYCH

Z Zakładu Fizjologii Śląskiej A. M. w Zabrze-Rokitnicy
p. o. Kierownika: dr M. Krause

Z Ośrodka Badań Lekarskich przy Centralnej Stacji Ratownictwa Górniczego
w Bytomiu

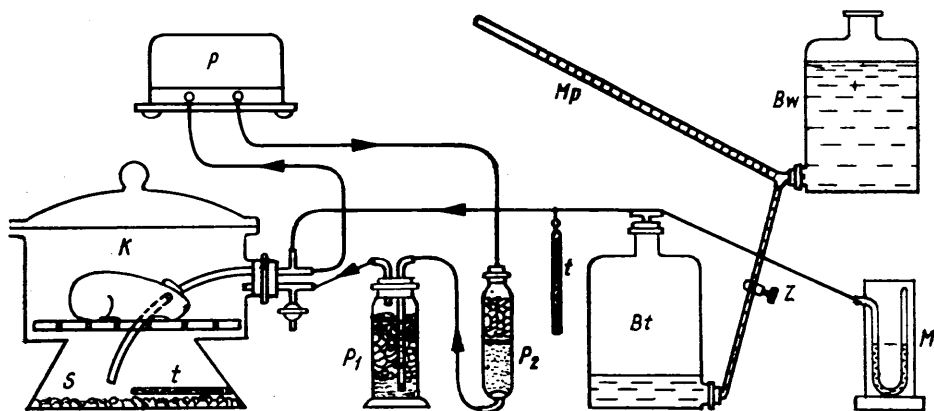
Dyrektor: inż. mgr K. Cehak

Podczas badań nad wpływem tlenu węgla oraz niektórych środków farmakologicznych na zużycie tlenu przez małe zwierzęta, wyłoniła się konieczność zbudowania odpowiedniej aparatury. Urządzenie takie powinno odpowiadać następującym warunkom: a) komora winna być tej wielkości, by badane zwierzę pozostawało w wygodnej pozycji, b) powinno być dostatecznie czułe na zmiany w zużyciu tlenu przez małe zwierzęta, c) pozwalać na ciągłą rejestrację zużycia tlenu, względnie w możliwie krótkich odstępach czasu, d) nie powinno być kosztowne, a łatwe do wykonania w pracowni o przeciętnych możliwościach. Opisy podobnych urządzeń spotkaliśmy w piśmiennictwie, przeważnie były one bądź zbyt skomplikowane w budowie względnie zbyt kosztowne lub nie odpowiadały wszystkim stawianym przez nas warunkom [1, 2, 3, 5].

OPIS URZĄDZENIA I ZASADA JEGO DZIAŁANIA

Ryc. 1 przedstawia urządzenie pomiarowe. Komorę K, w której przebywa zwierzę doświadczalne może stanowić dobrze uszczelniony ekzykator lub inne naczynie szklane względnie z polimetakrylanu wielkością dostosowane do wielkości badanych zwierząt. Jeden koniec pompy ssąco-tłoczącej P połączony jest z komorą, drugi poprzez naczynie P₁, zawierające materiał chłonnący CO₂ (wodorotlenek sodu) połączony jest również z komorą. W obwód może być włączony np. pochłaniacz P₂ absorbujący tlenek węgla, który po zatruciu w czasie odtruwania był wydychany przez zwierzęta, jak to miało miejsce w naszych badaniach. Na dnie komory K znajduje się chlorek wapnia S pochłaniający parę wodną. Wewnątrz i na zewnątrz komory znajdują się termometry t. Naczynie K połączone jest

z butlą B_t zawierającą czysty tlen. Butla z tlenem połączona jest ze zwykłym manometrem wodnym M . Na niewielkim podwyższeniu ustawiona jest cylindryczna butla B_w z wodą destylowaną połączona przez dolny tubus z poziomowskazem pochyłym M_p , w postaci rurki szklanej o świetle około 2—3 mm i długości od 60 do 80 cm. Do niej przymocowana jest podziałka milimetrowa. Dolny tubus butli B_t połączony jest z dolnym tubusem butli B_w . Na węźle łączącym znajduje się zacisk Z , którym reguluje się dopływ wody z butli B_w do butli B_t . Wszystkie połączenia muszą być bezwzględnie szczelne. Pompa w naszym urządzeniu posiadała wydajność



Ryc. 1. Aparatura do oznaczania zużycia tlenu u małych zwierząt doświadczalnych.
Opis w tekście.

Fig. 1. Apparatus for the determination of oxygen uptake of small experimental animals. Description in the text.

około 4 l na minutę, a pojemność komory wynosiła około 4 l. Pochłaniacz CO_2 powinien zawierać NaOH w granulkach o wielkości od 3—6 mm. Na dno pochłaniacza daje się warstwę waty szklanej. Kierunek prądu powietrza powinien być taki jak zaznaczono na ryc. 1.

Po sprawdzeniu aparatury na szczelność, wkładamy zwierzę do komory i szczelnie zamykamy. Puszczamy w ruch pompę. Przy zamkniętym zacisku Z , zużywany tlen przez zwierzę będzie uzupełniany z butli B_t , czego wyrazem będzie wychylenie się manometru M . Wydalany CO_2 zostaje pochłaniany przez pochłaniacz P_1 . Powoli zwalnimy zacisk Z i dopuszczamy wodę z butli B_w do butli B_t w takiej ilości by manometr M nie wykazywał wychylenia. Ubytek wody z butli B_w odczytujemy na poziomowskazie pochyłym M_p . Urządzenie można tak wykalibrować, że każdemu milimetrowi na rurce M_p odpowiada pewna objętość wody, a ta z kolei objętości O_2 . Każdorazowy odczyt należy wykonać w chwili wyrównania poziomów na manometrze M . Przed przystąpieniem do oznaczania i na końcu doświad-

czenia odczytujemy ciśnienie barometryczne. Temperaturę natomiast odczytujemy na termometrach umieszczonych w komorze i na zewnątrz w odstępach 15 minutowych. Zwykle różnica na termometrach nie przekracza 1°C . Jeśli różnica ta znajduje się w granicach od 0° — 1°C , to nie odgrywa ona większej roli przy obliczaniu. Przy większych różnicach należy ją uwzględnić przy sprowadzaniu objętości tlenu do warunków normalnych, o czym szczegółowo będzie mowa w podanym przykładzie. Zużycie tlenu jest zależne między innymi od temperatury otoczenia. Z badań Bargeton'a i współpr. wynika, że obniżenie temperatury otoczenia z $29,5^{\circ}\text{C}$ do 10°C powoduje prawie dwukrotne zwiększenie zużycia tlenu [1]. Jeśli więc urządzenie nie znajduje się w łaźni wodnej, należy aparaturę ustawić w pomieszczeniu o możliwie jednostajnej temperaturze. Jeżeli komora K i butla B_t są zanurzone w basenie wodnym, w którym utrzymana jest stała temperatura przy pomocy termostatu, wtedy pomija się sprowadzanie wyników do warunków normalnych, w wypadku gdy chodzi o wartości porównawcze, a nie wartości bezwzględne. Co pewien czas należy sprawdzać szczelność urządzenia oraz wymieniać substancje absorbujące CO_2 lub inne stosowane przy badaniach, w zależności od liczby przeprowadzonych doświadczeń.

Przy pomocy opisanego urządzenia wykonano kilkaset oznaczeń zużycia tlenu przez świnki morskie i szczury w warunkach normalnych, w czasie zatruwania tlenkiem węgla i po podaniu środków farmakologicznych [6]. Uzyskane wyniki potwierdzają przydatność aparatury, która spełnia warunki podane na wstępie. O czułości aparatury świadczy fakt, że poruszenie się zwierząt lub nawet wzmoczone żucie świnek morskich natychmiast znajdowało odzwierciedlenie we wzroście zużycia tlenu. Zwierzęta włożone po raz pierwszy do komory wykazują niepokój wpływający na wyniki. Wobec tego, w celu adaptacji zwierząt do nowego otoczenia, należy je wkładać kilka razy do komory w ciągu kilku dni bez oznaczania zużycia tlenu.

SFOSÓB SPRAWDZENIA SZCZELNOŚCI APARATURY

Warunkiem sprawnego działania urządzenia jest jego bezwzględna szczelność. Sprawdzanie szczelności odbywa się w ten sposób, że w miejsce manometru wodnego włączamy manometr rtęciowy. Z kolei zwalniamy zacisk Z, przez co woda z butli B_w spływa do butli B_t , tak długo aż wytworzy się nadciśnienie około 50 mm Hg wykazane przez manometr rtęciowy. Zakrećmy zacisk Z i w ciągu kilku minut obserwujemy zachowanie się manometru. Następnie włączamy pompę P. Początkowo może nastąpić nieznaczna zmiana na manometrze, ale po krótkim czasie ustala się

poziom, który nie ulega już zmianom. Jest to dowodem szczelności aparatury. Początkowe nieznaczne zmiany na manometrze mogą być spowodowane absorpcją CO_2 w układzie.

SPOSÓB KALIBROWANIA POZIOMOWSKAZU POCHYLEGO

Rurkę szklaną o długości od 60 do 80 cm umocowuje się na statywie pod takim kątem, który pozwala na odczytywanie możliwie największego ubytku wody z butli B_w (ryc. 1). Przy użyciu butli B_w o pojemności około 2 l, jeden mm na poziomowskazie odpowiada około 2 ml wody. Po napełnieniu wodą destylowaną butli B_w i oznaczeniu menisku wody na poziomowskazie, wypuszczamy partiami wodę np. w ilości 200 ml do cylindra miarowego. Ubytkowi wody w butli B_w odpowiada przesunięcie menisku na poziomowskazie, które z kolei zaznaczamy na taśmie milimetrowej przytwierdzonej do poziomowskazu. Przy dokładnie cylindrycznej butli i prostej rurce P_m , jednakowym ilościom odpuszczonej wody odpowiadają jednakowe odcinki przesunięcia się menisku na poziomowskazie pochyłym. Wtedy wystarcza przyjęcie jednego współczynnika przeliczeniowego. W razie stwierdzenia różnic pomiędzy odcinkami na poziomowskazie przy jednakowych ilościach odpuszczonej wody, należy sporządzić wykres na układzie współrzędnych i przy jego pomocy odczytywać odpowiednie ubytki wody. Znacznie prostszy sposób postępowania i dokładniejsze pomiary uzyskuje się przy dobraniu dokładnie cylindrycznej butli B_w .

Jeśli po wykonanym cechowaniu urządzenia nastąpi z jakichkolwiek powodów zmiana położenia butli B_w lub poziomowskazu, należy kalibrowanie powtórzyć.

OZNACZENIE ZUŻYCIA TLENU PRZEZ ŚWINKI MORSKIE

Oznaczono zużycie tlenu przez dwie świnki morskie o ciężarze 523 i 734 g. Ustaloną ilość pożywienia otrzymywały one wieczorem w dniu poprzedzającym badania. W czasie dokonywania oznaczeń, pożywienia nie otrzymywały. Pomiary wykonywano w godzinach przedpołudniowych. Zużycie tlenu oznaczano w ciągu 90 minut, dokonując odczytów co 10 minut (można je wykonywać w dowolnych odstępach czasu w zależności od potrzeb). Zużycie tlenu w pierwszych 10—15 minutach wykazywało pewne wahania ze względu na zachowanie się zwierząt i zależało od szybkości ich adaptacji do pobytu w komorze. Pomiary wykonywano na tych samych świnkach morskich w ciągu 11 dni. Notowano ciśnienie barometryczne i jego zmiany oraz odczytywano temperaturę na termometrach wewnątrz i na zewnątrz komory i jej zmiany w ciągu doświadczenia. Ciśnienie baro-

metryczne i temperatura służyły do sprowadzenia odczytywanych wartości zużycia tlenu do warunków normalnych.

W tab. 1 zestawiono wyniki oznaczeń zużycia tlenu w ciągu 11 dni u świnki o ciężarze 523 g w ciągu 90 minut, dokonując odczytów co 10 minut. Tab. 2 zawiera wyniki uzyskane z pomiarów u świnki o ciężarze 734 g (tab. 1, 2, 3).

Tabela 1. Zużycie tlenu przez świnkę morską o ciężarze 523 g w ciągu 90 min. oznaczone w odstępach 10 minutowych w ciągu 11 dni.

Table 1. Oxygen uptake of a 523-g guinea pig during 90 min. determined at 10-minute intervals in the course of 11 days.

Data 3)	Zużycie tlenu w ml (V_0) w odstępach 10 min. 1)									Średnio na min. 2)
	10'	20'	30'	40'	50'	60'	70'	80'	90'	
6.4	103	75	75	75	75	70	79	75	64	7,67
7.4	109	95	85	85	87	90	75	88	66	8,66
8.4	87	76	76	71	66	76	81	78	68	7,55
11.4	82	76	70	69	66	69	88	85	85	7,66
12.4	89	86	88	78	76	76	65	75	84	7,96
14.4	74	64	64	66	69	56	69	74	64	6,66
15.4	74	62	72	66	71	66	71	66	74	6,91
19.4	71	64	74	70	64	63	63	66	72	6,74
21.4	60	64	68	60	57	55	55	55	64	5,97
22.4	66	72	71	60	72	66	65	69	66	6,75
25.4	56	58	63	63	56	65	83	58	69	6,34

Oxygen uptake in ml. (V_0) at 10 min. intervals 1); Average per 1 min. 2); Date 3).

Aparaturę można zmodyfikować w ten sposób, że pozwala na równoczesne oznaczanie wydychanego CO_2 . Dzięki temu można ustalić iloraz oddechowy RQ. W tym wypadku, na drodze przepływu powietrza w aparaturze, włącza się osusacz (np. stężony kwas siarkowy lub silikażel) a następnie naczynie z dokładnie odważoną ilością NaOH. Absorbowany CO_2 zwiększa ciężar NaOH i z różnicy ciężarów oblicza się ilość zaabsorbowanego CO_2 . Można również w miejsce wodorotlenku sodu *in substantia* użyć mianowany roztwór NaOH i następnie przez miareczkowanie oznaczyć ilość związanego NaOH, a stąd ilość zaabsorbowanego CO_2 .

Oznaczenie przemiany podstawowej u zwierząt zgodnie z jej przyjętą definicją jest bardzo trudne, jeśli w ogóle możliwe. Zachowanie tych sa-

Tabela 2. Zużycie tlenu przez świnkę morską o ciężarze 734 g w ciągu 90 min. oznaczone w odstępach 10 minutowych w ciągu 11 dni.

Data	Zużycie tlenu w ml (V_0) w odstępach 10 min.									Średnio na min.
	10'	20'	30'	40'	50'	60'	70'	80'	90'	
6.4	120	93	114	96	97	119	104	101	130	10,82
7.4	104	104	104	94	100	127	97	94	98	10,24
8.4	98	110	125	94	94	102	105	98	94	10,24
11.4	101	101	111	101	92	101	107	111	114	10,43
12.4	112	103	109	103	101	93	104	97	112	10,37
14.4	92	103	109	114	100	101	96	116	111	10,46
15.4	98	106	111	148	129	118	120	125	114	11,87
19.4	111	107	111	120	114	111	107	114	120	11,27
20.4	98	94	92	92	122	107	94	103	110	10,13
21.4	132	133	130	110	99	100	100	102	100	11,17
25.4	145	90	119	127	123	118	139	105	94	11,76

As in Table 1.

Tabela 3. Zużycie tlenu w ml/min./kg i w ml/min. przez świnki morskie o ciężarze 523 i 734 g oznaczone w ciągu 90 min. i w ciągu 11 dni.

Table 3. Oxygen uptake in ml/min./kg and in ml/min. by guinea pigs weighing 523 and 734 g determined over 90 min. in the course of 11 days.

Świnki morskie o ciężarze 1)	523 g		734 g
Zużycie tlenu w ml/min. 2)	7,17	P<0,001	10,79
Błąd standardowy 3)	0,25		0,19
Współczynnik zmienności 4)	11,5%		5,8%
Zużycie tlenu w ml/min./kg 2)	13,69	P>	14,52
Błąd standardowy 3)	0,45		0,29
Współczynnik zmienności 4)	11,0%		6,6%

Guinea pigs weighing 1); Oxygen uptake in ml/min. 2); Standard error 3); Coefficient of variation 4).

mych warunków w powtarzających się doświadczeniach dostatecznie gwarantuje porównywalność wyników. Niektórzy autorzy zwracają uwagę na to, że w urządzeniach, w których zastosowane jest krążenie powietrza, sam

ruch powietrza jest czynnikiem powodującym zwiększenie zużycia tlenu przez zwierzęta. Dodać jeszcze należy, że w pierwszych minutach pobytu zwierzęcia w komorze, zużycie tlenu jest większe i wykazuje wyraźne zmiany i wahania w poszczególnych minutach, do czasu przyzwyczajenia się zwierzęcia i ustalenia się temperatury w całym urządzeniu.

Ф. М. Спюх, Е. Розмус

ПРОСТОЙ МЕТОД ОБОЗНАЧЕНИЯ ПОТРЕБЛЕНИЯ КИСЛОРОДА У МАЛЫХ ПОДОПЫТНЫХ ЖИВОТНЫХ

Резюме

В статье дано описание аппаратуры для обозначения потребления кислорода малыми подопытными животными и указаны принципы ее действия. Характерной особенностью этой аппаратуры является ее большая чувствительность на каждое изменение в поглощении кислорода, простой способ пользования ею, а также ее небольшая стоимость и возможность легко изготовить ее в мастерской, располагающей средними возможностями. Приведенные примеры подтверждают большую пригодность описанного устройства и практического применения его при исследовании влияния токсических и фармакологических средств на метаболизм подопытных животных.

Аппаратура может быть модифицирована таким образом, что позволить одновременно отмечать выдыхаемый животным углекислый газ и определять величину дыхательного коэффициента.

F. Spioch and J. Rozmus

A SIMPLE METHOD FOR THE DETERMINATION OF THE OXYGEN UPTAKE OF SMALL EXPERIMENTAL ANIMALS

Summary

An apparatus for determination the oxygen uptake in small experimental animals and its mode of functioning are described. The device responds with great sensitivity to each change in oxygen uptake, is simple to operate, inexpensive, and easy to build in any average laboratory. The examples quoted confirm the usefulness of the device and its practical applicability in research on the effects of toxic and pharmaceutical agents on animal metabolism.

The equipment allows of such modification as enables determinations of exhaled carbon dioxide and calculations of the respiratory quotient QR to be made simultaneously.

PIŚMIENNICTWO

1. *Bargeton D., Krumm-Heller C.*: C. R. Soc. Biol. 1948, 142, 899.
2. *Grad B.*: Endocrinology, 1952, 50, 94.
3. *Harvey D. G.*: J. Pharm. a. Pharmacol. 1958, 483.
4. *Lústinec K.*: Fysiologie, 1956, 2, 250.
5. *Spioch Fr. M., Hrycko-Spiochowa M.*: Post. Hig. i Med. Dośw. 1960, 8, 759.

Otrzymano: 11. VI. 1960 r.

Adres autorów: Zakład Fizjologii Śl. A. M. w Zabrze-Rokitnicy, ul. K. Marksa 19.