

## Určovanie osmotickej rezistencie erytrocytov

### Princíp

**Rezistencia erytrocytov** je odolnosť voči rôznym vonkajším vplyvom, účinkom ktorých nastáva hemolýza, t.j. únik hemoglobínu z erytrocytov v dôsledku zmenenej priepustnosti alebo poškodenia ich membrány. Podľa faktora, ktorý vyvoláva hemolýzu, ide o hemolýzu osmotickú, mechanickú, chemickú, termickú, toxickú a pod. Pre diagnostiku niektorých ochorení (napr. vrodených alebo získaných hemolytických anémií) má význam vyšetrenie osmotickej rezistencie erytrocytov (obr. č. 1). Pre vyšetrenie sa používajú hypotonické roztoky NaCl s postupne stúpajúcou koncentráciou NaCl (väčšinou v rozsahu 0,2% až 0,9%). V hypotonickom prostredí nastáva prestup vody cez bunkovú membránu dovnútra erytrocytov, čím sa zväčšuje ich objem, až nastáva prasknutie membrány a vyplavenie hemoglobínu do okolia – **osmotická hemolýza**.

Najmenej odolné erytrocyty u zdravého človeka hemolyzujú pri koncentrácii 0,45% - 0,40% NaCl (**minimálna osmotická rezistencia**). S klesajúcou koncentráciou NaCl hemolyzuje čoraz viac erytrocytov a pri koncentrácii 0,35% - 0,30% nastáva hemolýza aj najodolnejších erytrocytov (**maximálna osmotická rezistencia**) (obr. č. 1). Rozdiel medzi týmito dvoma hodnotami udáva **rezistenčnú šírku**.

### Úlohy

V priloženej prezentácii v moodli sú uvedené fotografie výsledkov testu osmotickej rezistencie.

1. Je výsledok vyšetrenia osmotickej rezistencie u dvoch pacientov na obrázku na snímke v norme? Ak nie, o aké ochorenie pravdepodobne ide?
2. V tabuľke na obrázku je uvedený počet objemových dielov 0,5% NaCl, destilovanej vody (DW) a krvi v skúmavkách označených od 25 po 14. Vypočítajte koncentráciu NaCl v jednotlivých skúmavkách a na základe toho určte, v ktorej skúmavke bude maximálna a v ktorej minimálna osmotická rezistencia, za predpokladu, že krv je od zdravého človeka.

### Materiál a potreby

Destilovaná voda, NaCl, skúmavky so stojanom, zátky na skúmavky, pipety, váhy, čerstvá krv, resp. krv ošetrená heparínom (10-30 IU/ml krvi)\*, váhy, centrifúga.

\* Pre vyšetrenie osmotickej rezistencie sa citrát sodný ani EDTA neodporúčajú, nakoľko zvyšujú hemolýzu v hypotonických roztokoch.

### Postup

1. Pripravíme si stojan so skúmavkami, označíme ich od 1-13.
2. Pripravíme si 1% a 20 % roztok NaCl.
3. Roztok s koncentráciou 1% napipetujeme do skúmaviek 1-11 (v objemoch podľa tabuľky 1).
4. Pridáme destilovanú vodu (viď tabuľka 1), čím získame rad roztokov s koncentráciou NaCl od 0,2% po 0,9%.
5. Do skúmavky 12 napipetujeme 20% NaCl (tabuľka 1), do skúmavky 13 destilovanú vodu.
6. Do každej skúmavky pipetou pridáme 3 kvapky krvi, uzatvoríme, premiešame a necháme stáť 30 minút.

7. Skúmavky centrifugujeme 5 minút pri 1500 rpm.
8. Pozorujeme stupeň hemolýzy a popíšeme vzhľad roztoku v skúmavkách, priložíme fotografiu celého stojana (fotografiu robíme oproti bielemu pozadiu a v uhle, pri ktorom je viditeľné dno skúmavky).
9. Uvedieme hodnotu minimálnej osmotického rezistencie (v skúmavke, kde sa už roztok nad sedimentom erytrocytov začína sfarbovať do červena) a maximálnej osmotického rezistencie (v skúmavke, kde roztok je intenzívne červený a sediment chýba), s označením príslušných skúmaviek na priloženej fotografii.
10. Zhodnotíme výsledok vyšetrenia a vypracujeme úlohy uvedené v prezentácii k 6. cvičeniu v Moodle.

**Tab.č. 1**

Číslo skúmavky	1% NaCl (ml)	Destilovaná voda (ml)	Výsledná koncentrácia NaCl v %
1.	0,8	3,2	0,20
2.	1,2	2,8	0,30
3.	1,4	2,6	0,35
4.	1,6	2,4	0,40
5.	1,8	2,2	0,45
6.	2,0	2,0	0,50
7.	2,2	1,8	0,55
8.	2,4	1,6	0,60
9.	2,8	1,2	0,70
10.	3,2	0,8	0,80
11.	3,6	0,4	0,90
12.	4 ml 20% NaCl	-	20
13.	-	4 ml destilovanej vody	0

**Obr. č. 1**

