

УДК: 612.111.17.014.462.2

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДА ОПРЕДЕЛЕНИЯ
ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

Горшкова М.А., Петрова М.Б., Миллер Д.А.

*ФГБОУ ВО Тверской государственный медицинский университет
Минздрава России*

Предложена модификация определения осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) на основе применяемого метода Л.И. Идельсона (1974). Доказательно показана возможность уменьшения материальных и временных затрат, а также повышения чувствительности метода определения ОРЭ. Проанализированы образцы крови 90 здоровых добровольцев в возрасте от 18 до 24 лет.

Ключевые слова: осмотическая резистентность эритроцитов, метод Л.И. Идельсона

Определение осмотической резистентности эритроцитов (ОРЭ) является одним из наиболее доступных в лабораторной диагностике методом оценки физико-химических свойств мембран эритроцитов, как у здоровых лиц, так и при различной патологии. Существующие тесты определения осмотической резистентности эритроцитов построены по принципу определения выраженности их гемолиза, вследствие разрушения мембран эритроцитов под воздействием растворов натрия хлорида с различной гипосмотической концентрацией.

Для изучения ОРЭ в нашей стране применяется метод Л.И. Идельсона (1974). Однако из-за сложностей его выполнения метод не получил должного распространения в лабораторной практике. Это связано с необходимостью использования венозной крови в объеме 3 мл, приготовлением 14 растворов с различными концентрациями натрия хлорида, необходимостью повторной постановки теста на следующий день со второй порцией крови, что значительно увеличивает время выполнения теста и сопряжено с возможными неточностями в преаналитическом этапе исследования и получения недостоверных результатов. При этом для определения концентраций свободного гемоглобина, применяемая фотометрия с длиной волны 500-560 нм не дает достаточную чувствительность измерения, так как миллимолярный коэффициент экстинкции гемоглобина при этой длине волны ниже, чем при длине волны в области полосы Соре. При интерпретации результатов учитываются только концентрации натрия хлорида, вызывающие начало появления гемолиза (минимальная резистентность эритроцитов) и полный гемолиз (максимальная резистентность эритроцитов), а степени гемолиза при всех других рабочих концентрациях

используемого раствора рассчитываются, но не учитываются при оценке результатов.

Целью нашего исследования была модификация ОРЭ, которая бы предусматривала уменьшение количества используемых разведений натрия хлорида, изменения длины волны и объемов реагентов, применяемых в методике, что существенно может увеличить чувствительность и снизить стоимость метода.

Материалы и методы

Для выполнения указанной цели было проведено изучение осмотической резистентности эритроцитов крови 20 здоровых добровольцев (по методу Идельсона и 70 – в нашей модификации. Среди них было 47 женщин и 43 мужчины, возраст которых колебался от 18 до 24 лет, с медианой равной 21 году. Исследовалась венозная кровь стабилизированная ЭДТА.

Исследование осмотической резистентности эритроцитов венозной крови по нашей модификации определяли только в 0,9% и 0,45% растворах натрия хлорида. Использование 0,9% раствора натрия хлорида отражает минимальное воздействие и характеризует исходное физико-химическое состояние мембран эритроцитов. Для определения максимальной ответной реакции нами была выбрана концентрация 0,45% натрия хлорида, которая находится в зоне, где наблюдаются достоверные различия в уровне гемолиза изучаемых образцов крови.

Выбор наиболее оптимальной длины волны с наибольшим коэффициентом чувствительности был проведен при анализе спектра поглощения свободного гемоглобина у здоровых добровольцев при исследовании у них ОРЭ. По данным литературы (Кушаковский М.С., 1968) известно, что в видимой области спектра поглощения гемоглобина присутствуют три хорошо заметных полосы: а) первая наиболее интенсивная полоса Соре (Soret) в области 400-430 нм с максимумом поглощения при длине волны 414 нм; с шириной полосы 35 нм (397-432нм); $\epsilon = 4838,1 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; б) вторая полоса - бета (β) в области 530-555 нм с максимумом поглощения при 545 нм с шириной полосы 12 нм (572-584нм); $\epsilon = 564,6 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$; в) третья полоса – альфа (α) в области 570-585 нм с максимумом поглощения при 580 нм с шириной полосы 19 нм (534-553нм); $\epsilon = 589,2 \text{ л} \times \text{моль}^{-1} \times \text{см}^{-1}$.

На рисунке показано, что измерение концентраций гемоглобина для исследования степени гемолиза, особенно малых его концентраций, и определения ОРЭ целесообразно использовать длину волны 414 нм с наибольшим молярным коэффициентом экстинкции, что повышает чувствительность лабораторного исследования.

При исследовании ОРЭ в первую пробирку помещают 2,5 мл дистиллированной воды, во вторую – 2,5 мл изотонического (0.9%) раствора

натрия хлорида, в третью – по 1,25 мл дистиллированной воды и изотонического раствора натрия хлорида (для получения 0,45% раствора NaCl) .

Затем во все пробирки добавляют по 0,01 мл крови. Перемешивают и центрифугируют в течение 10 минут при 2000 оборотов в минуту. Измеряют оптическую плотность надосадочных жидкостей трех проб на спектрофотометре при длине волны 414 нм в кювете с длиной поглощающего слоя 1 см против дистиллированной воды.

ОРЭ оценивали по степени гемолиза эритроцитов в растворах с разной концентрацией натрия хлорида по сравнению со степенью гемолиза в образце с дистиллированной водой, который принимали за 100%.

Степень гемолиза рассчитывали дважды в образцах с 0,9% и 0,45% растворами натрия хлорида по формуле:

$$H = 100 \times E_{\text{оп.}} / E_{\text{к.}}, \text{ где}$$

H - степень гемолиза (%),

100 - степень гемолиза в образце с дистиллированной водой,

$E_{\text{оп.}}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости в образце,

$E_{\text{к.}}$ – оптическая плотность надосадочной жидкости в пробирке с дистиллированной водой.

Результаты

Исследованиями ОРЭ у здоровых добровольцев по методу Идельсона показано, что в первый день постановки анализа (рис. 3, ряд №1) наибольший лизис красных клеток крови отмечалась при концентрации 0.45% раствора хлористого натрия и нарастал по мере ее уменьшения, а минимальный распад эритроцитов выявлялся при 0.55% раствора NaCl. Длительная экспозиция крови и изучение ОРЭ на второй день (рис. 3, ряд 2) позволила определить фотометрически распад эритроцитов при более высокой (0.65%) концентрации раствора хлористого натрия. Однако достоверных различий между показателями первого и второго дня не выявлено ($P > 0.05$).

Изучение ОРЭ модифицированным методом в сравнении с методикой Идельсона показало, что начало максимального лизиса эритроцитов также определялось при 0.45 % концентрации раствора хлористого натрия. Однако минимальные литические процессы методом Идельсона определялись при концентрации NaCl от 0.5 до 0.65%, в то время как модифицированный метод при спектрофотометрии с длиной волны 414 нм позволяет зафиксировать их практически до 1% раствора хлористого натрия. Но при сравнительном анализе по основным точкам достоверных различий между этими методиками нет, кроме концентрации раствора хлорида натрия 0.85 и 0.9%. Все исследования были выполнены в один этап, так как было показано выше.

Таким образом, модифицированным методом определена ОРЭ венозной крови у здоровых добровольцев, которая составила в 0,9% раство-

ре натрия хлорида – $0,15 \pm 0,08$ %, а при 0,45% растворе натрия хлорида – $28,5 \pm 9,49$ %.

Аналитические характеристики модифицированного метода.

После соответствующих статистических вычислений коэффициент вариации (воспроизводимость) для модифицированной методики определения осмотической резистентности эритроцитов составил 5,66% и чувствительность метода $S=0,011$.

Обсуждение

Определение осмотической (гипоосмолярной) резистентности эритроцитов имеет широкое распространение в клинической лабораторной диагностике. Это положение определяется достаточно высокой информативностью теста и простотой его выполнения. Метод оценивает физико-химическое состояние эритроцитарных мембран, как в норме, так и патологии, а также как в клинике, так и эксперименте. До настоящего времени ОРЭ в клинике оценивалась методом Л.И. Идельсона. Однако его выполнение связано с некоторыми трудностями: необходим большой объем материала и реактивов для исследования, длительность проведения теста и другие. Эти сложности были преодолены в модификации нами этого метода (заявка на изобретение № 2007116258/15 (017661)). Результатом этой работы стало значительное сокращение времени проведения теста, его одноэтапность вместо двух этапного по методу Л.И. Идельсона, уменьшение количества разведений с 14 до 3, использование промышленно изготовленных растворов натрия хлор, выбор и использование наиболее оптимальной длины волны определения свободного гемоглобина в пробе исследуемой крови, что сделало метод более чувствительным. Все это представляется нам достаточным поводом для внедрения модифицированного метода в лабораторную практику любой клинической лаборатории.

Использование промышленно изготовленного физиологического раствора натрия хлорида (0.9%) и дистиллированной воды делает метод более точным, простым и экономически выгодным, так как исключает колебания концентраций натрия хлорида, связанные с погрешностями приготовления растворов, измерений.

Выводы:

1. Используемый в настоящее время метод Идельсона представляется для исполнения достаточно сложным, материально затратным.
2. Предложенная модификация этого метода определения осмотической резистентности эритроцитов является более чувствительной, мало затратной по времени и материально, легко выполняемой в любой клинической лаборатории и достоверно воспроизводимой.

Список литературы.

1. Медицинские лабораторные технологии. Справочник в 2-х томах / Под редакцией профессора А.И. Карпищенко. – Санкт-Петербург: Интермедика, 2002. – Т.1. – 408 с., ил.
2. Борисов Ю.А., Спиридонов В.Н., Суглобова Е.Д. Резистентность эритроцитарных мембран: механизмы, тесты, оценка (обзор литературы). – Клиническая лабораторная диагностика. - 2007. - №12. – С.36-40.
3. Василевская Н.Л. Метод определения осмотической резистентности // Бюллетень экспер. и биол. медицины.- 1955. - № 12. - С.66-72.
4. Предтеченский В.Е. Руководство по клиническим лабораторным исследованиям / под. ред. Л.Г. Смирновой, Е.А. Кост. – М.: МедГиз. – С.95-99.
5. Dacie J.V., Lewis S.M. Practical Haematology.- London, J. and A. Churchill./ LTD, 1968. – p. 166.
6. Миллер Д.А., Некрасова И.Л. Микроциркуляторные расстройства - основа ремоделирования слизистой оболочки верхних отделов пищеварительного тракта // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 2016. - № 2 (126). - С. 132-132b.
7. Каукова А.Н., Белякова Н.А., Миллер Д.А., Васюткова О.А. Состояние микроциркуляции и факторы, влияющие на неё у больных гипертонической болезнью // Сибирский медицинский журнал (Иркутск). - 2015. - Т. 136. - № 5. - С. 50-53.
8. Каукова А.Н., Белякова Н.А., Миллер Д.А. Особенности системы гемостаза и артериолярного кровотока у женщин больных сахарным диабетом 2 типа // Тверской медицинский журнал. 2015. № 4. С. 71-88.
9. Миллер Д.А., Миллер Т.М., Некрасова И.Л., Колесная Т.М., Галочкина А.Б. Участие фосфолипидов плазмы крови в регенерации сож у больных хроническим гастритом // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2013. № 10. С. 36.
10. Воронов С.Н., Миллер Д.А., Голубев А.А. Профилактика венозного тромбоза при хирургическом лечении пациентов с хроническим калькулезным холециститом // Новости хирургии. - 2012. - Т. 20. - № 4. - С. 42-47.
11. Воронов С.Н., Миллер Д.А., Голубев А.А., Еремеев А.Г., Кононова А.Г. Изучение тромбоцитарного гемостаза у больных хроническим калькулезным холециститом для оценки риска развития тромбоэмболических осложнений после лапароскопической холецистэктомии // Эндоскопическая хирургия. - 2009. - Т. 15. - № 4. - С. 22-27.
12. Ткачев В.А., Миллер Д.А., Матяш Б.Л. Клинико-морфологические особенности хронического гастрита у лиц пожилого возраста // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. - 1999. - № 4. - С. 141.