ОПРЕДЕЛЕНИЕ ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

**Цели занятия:** усвоить

*представления*: диагностическое значение определения осмотической резистентности эритроцитов;

*знания:* причины и виды гемолитических анемий, картина крови при них;

*умения:* определение осмотической резистентности эритроцитов.

ФАКТОРЫ ПРЕАНАЛИТИЧЕСКОГО ЭТАПА,

ВЛИЯЮЩИЕ НА ОСМОТИЧЕСКУЮ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ЭРИТРОЦИТОВ

* Нельзя использовать в качестве антикоагулянта оксалат или цитрат натрия.
* Свежая кровь с антикоагулянтом сохраняется в течение 2 часов при комнатной температуре.

УНИФИЦИРОВАННЫЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ

ОСМОТИЧЕСКОЙ РЕЗИСТЕНТНОСТИ ЭРИТРОЦИТОВ

 Под резистентностью (стойкостью) клеток понимают их способность противостоять разрушительным воздействиям: осмотическим, механическим, тепловым, химическим и др. В клинической практике наибольшее распространение получило определение осмотической резистентности эритроцитов.

 В растворе с осмотическим давлением, равным осмотическому давлению крови, эритроциты не изменяются. Солевой раствор, имеющий осмотическое давление, одинаковое с осмотическим давлением крови, называется изотоническим. Изотоническим солевым раствором для эритроцитов является 0,85% раствор хлорида натрия. Часто 0,85% раствор NaCl называют ещё физиологическим (физраствор).

 В гипертонических солевых растворах эритроциты сморщиваются, а в гипотонических – набухают и разрушаются (гемолизируются).

 Осмотическую резистентность эритроцитов исследуют по отношению к гипотоническим растворам хлорида натрия разной концентрации. Концентрацию хлорида натрия, при которой начинают гемолизироваться первые, наиболее слабые эритроциты, принимают за начало гемолиза, а при которой разрушаются все эритроциты – за полный гемолиз.

***Принцип.*** Осмотическая резистентность эритроцитов определяется по степени их гемолиза в гипотонических растворах хлорида натрия.

***Реактивы:***

1. Основной раствор, по осмотической концентрации соответствующий 10% хлориду натрия:

 двузамещенный фосфат натрия – 27,31г;

 однозамещенный фосфат натрия – 4,86г;

 хлорид натрия - 180г;

 дистиллированная вода - до 2л.

 рН основного раствора составляет 7,4.

1. Рабочий раствор - готовится из основного путем разведения в 10 раз. По

 осмотической концентрации он соответствует 1% раствору хлорида натрия.

1. Гепарин.

***Оборудование:*** 14 центрифужных пробирок;

 пипетки на 5 мл, капилляры Сали;

 оборудование для прокола кожи;

 центрифуга, ФЭК.

***Ход определения.***

* В две стерильные пробирки, содержащие по 2 капли гепарина, вносят по 1,5мл крови, хорошо перемешивают.
* Кровь из одной пробирки используют сразу для исследования, а вторую ставят на сутки в термостат при 37ºС.
* В 14 центрифужных пробирках готовят ряд разведений из рабочего раствора хлорида натрия в соответствии с таблицей:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| №пробирок | Количество 1% NaCl, мл | Дистил. вода,мл | КонцентрацияNaCl | экстинцияЕ | Гемолиз, % |
| Исслед.крови | В норме |
| 1 | 5,0 | - | 1% | контроль | 0% | 0 |
| 2 | 4,25 | 0,75 | 0,85% |  |  | 0 |
| 3 | 3,75 | 1,25 | 0,75% |  |  | 0 |
| 4 | 3,5 | 1,5 | 0,7% |  |  | 0 |
| 5 | 3,25 | 1,75 | 0,65% |  |  | 0 |
| 6 | 3,0 | 2,0 | 0,6% |  |  | 0 |
| 7 | 2,75 | 2,25 | 0,55% |  |  | 0 |
| 8 | 2,5 | 2,5 | 0,5% |  |  | 0-6% |
| 9 | 2,25 | 2,75 | 0,45% |  |  | 5-45% |
| 10 | 2,0 | 3,0 | 0,4% |  |  | 50-100 |
| 11 | 1,75 | 3,25 | 0,35% |  |  | 90-100 |
| 12 | 1,5 | 3,5 | 0,3% |  |  | 97-100 |
| 13 | 1,0 | 4,0 | 0,2% |  |  | 98-100 |
| 14 | 0,5 | 4,5 | 0,1% |  | 100% | 100% |

* В каждую пробирку вносят по 1 капилляру Сали гепаринизированной крови.
* Перемешивают содержимое всех 14 пробирок, начиная с первой, и оставляют стоять 30 минут при комнатной температуре.
* Центрифугируют содержимое пробирок в течение 5 минут при 2000 об/мин.
* Колориметрируют надосадочные жидкости пробирок №№ 2-14 при условиях: светофильтр – зеленый (длина волны 500-560нм);

 кювета 10 мм;

 против холостой пробы.

 Холостая проба - надосадочная жидкость в пробирке, содержащей 1% раствор NaCl (пробирка № 1).

* На следующий день повторяют исследование с инкубированной кровью, так как при некоторых видах гемолитических анемий понижение осмотической резистентности эритроцитов выявляется только после инкубации.

***Расчет.***

 Процент гемолиза рассчитывают для пробирок № 2-13 (пробирка № 1 – холостая проба, гемолиз в пробирке № 14 принимается за 100%).

Расчет ведут по формуле , где

X - процент гемолиза исследуемой пробы;

Ех – экстинция исследуемой пробы;

Е14 – экстинция надосадочной жидкости в пробирке с 0,1% NaCl (пробирка № 14);

100 – процент гемолиза в пробирке № 14.

*Пример*.

 Экстинция надосадочной жидкости в пробирке № 10 составляет 0,66; экстинция надосадочной жидкости в пробирке № 14 - 0,88.

 Гемолиз эритроцитов при концентрации хлорида натрия 0,4% (в пробирке

№ 10) равен

 

***Нормальные величины***

 В свежей крови начало гемолиза отмечается при концентрации хлорида натрия 0,5-0,45%, а полный гемолиз – при 0,4-0,35%.

***Клинико-диагностическое значение***

 Исследование осмотической резистентности эритроцитов проводят при подозрении на гемолитическую анемию.

 Понижение осмотической резистентности эритроцитов, то есть появление гемолиза при более высокой, чем в норме, концентрации хлорида натрия (0,7-0,65%) характерно для наследственного микросфероцитоза.

 Повышение осмотической резистентности эритроцитов наблюдается при талассемии и гемоглобинопатиях.

Рисунок №1



Задания для самостоятельной работы

1. Законспектировать методику.
2. Зарисовать рис.№1
3. Заполнить таблицу.
4. Оценить гематологические показатели (зад №№1-3), рассчитать ЦПК,СГЭ, ИС, абс.содержание моноцитов и сделать заключение (какой вид анемии). (письменно)
5. Ответить на тестовые вопросы(письменно)

Задание №3.

|  |  |
| --- | --- |
| Показатели | Гемолитическая анемия(Минковского-Шоффара) |
| Соэ |  |
| Гемоглобин |  |
| Эритроциты |  |
| Морфология ЭР |  |
| ЦПК,СГЭ |  |
| лейкоциты |  |
| RTC |  |
| Осмотическаярезистентность |  |

Задание №4.

Задача №1

|  |
| --- |
| Клинико-диагностическая лаборатория краевой клинической больницы № 1 |
| **Анализ крови №** 1 ноября 2012г. *отделение*  гематологическое |
| **ФИО**  больного Алексеев Н.Г. 34 г. |
|  Эритроциты 2,9 · 1012/л анизоцитоз микросфероцитоз ++ Гемоглобин 85г/л пойкилоцитоз + ЦПК СГЭ анизохромия - |
| Лейкоциты 6,5 х109//л | СОЭ 19 мм /час |
| Бласты -Промиелоциты -Миелоциты -Метамиелоциты -Н п/я 5%Индекс сдвига  | Нс/я 65%Базофилы 1%Эозинофилы 2%Лимфоциты 25%Моноциты 5%Плазматические клетки - |
| Дегенеративные изменения лейкоцитов: - |
| Тромбоциты 200 · 109/л | Ретикулоциты 18 % |
|  |
| Резистентность эритроцитов: начало гемолиза в 0,6% NaCl , конец гемолиза в 0,4% NaCl |
|  |

Задача №2

|  |
| --- |
| **ФИО**  больного Алексеева Н.Г. 34 г. |
|  Эритроциты 1,.2 · 1012/л мегалоциты + . мегалобласты +  Гемоглобин 56г/л пойкилоцитоз + макроанизоцитоз +  ЦПК СГЭ тельца Жоли, кольца Кебота - |
| Лейкоциты 3,5х109/л  | СОЭ 24 мм /час |
| Бласты -Промиелоциты -Миелоциты -Метамиелоциты -Н п/я 1%Индекс сдвига 0,07 | Нс/я 46%Базофилы Эозинофилы Лимфоциты 48%Моноциты 5%Плазматические клетки - |
| Дегенеративные изменения лейкоцитов: - |
| Тромбоциты 100 · 109/л | Ретикулоциты 0,1 % |

Задача №3

|  |
| --- |
| **ФИО**  больного Винокурова К. В. |
|  Эритроциты 3,6х1012/л анизоцитоз + микроцитоз+ Гемоглобин 80 г/л пойкилоцитоз +ЦПК СГЭ анизохромия гипохромия |
| Лейкоциты 7,3 · 109/л | СОЭ 16 мм /час |
| Бласты -Промиелоциты -Миелоциты -Метамиелоциты -Н п/я 3%Индекс сдвига  | Нс/я 64%Базофилы -Эозинофилы 3%Лимфоциты 20%Моноциты 10%Плазматические клетки - |
| Дегенеративные изменения лейкоцитов: - |
| Тромбоциты 200·109/л | Ретикулоциты 12 ‰ |

Задание №5.

Выберите один или несколько правильных ответов.

1. Стерилизации подвергаются:

А. камеры Горяева

Б. кварцевые кюветы для ФЭКов

В. капалляры Панченкова

Г. стекла с лункой

Д. покровные стекла

2. Использование ватных шариков при заборе крови из пальца:

|  |  |
| --- | --- |
| 1- ый шарик со спиртом | А.протирание перчаток до прокола кожи |
| 2 - ой шарик со спиртом | Б.протирание кожи пациента |
| 3 - ий шарик со спиртом | В.прикладывание к ранке |
| 4 - ый шарик со спиртом | Г.протирание перчаток после взятия крови |
| сухой шарик | Д.снятие первой капли |
|  | Е.протирание предметного стекла |

1. Специфическое изменение морфологии эритроцитов при наличии метгемоглобина:

А пойкилоцитоз

Б анизоцитоз

В гипохромия

Г гиперхромия

Д тельца Гейнца

1. Специфическое изменение морфологии эритроцитов при наличии метгемоглобина:

А пойкилоцитоз

Б анизоцитоз

В гипохромия

Г гиперхромия

Д тельца Гейнца

1. Наибольшее разведение крови производят для определения содержания:

А эритроцитов

Б гемоглобина

В лейкоцитов

Г тромбоцитов

***6.*** Характерные особенности анализа крови при В12-дефицитной анемии:

А. резкое снижение количества гемоглобина и эритроцитов

Б. увеличение ЦПК

В. панцитопения

Г. гиперсегментация нейтрофилов

Д. ретикулоцитоз

Е. панцитоз

7. Дополните

Уменьшение количества всех видов клеток в крови - .....

8. Основные гематологические проявления гипо(а)пластических анемий:

А. гипохромия

Б. микроцитоз

В. сдвиг лейкоформулы влево

Г. панцитопения

***9.*** Ретикулоциты:

А. молодые эритроциты

Б. содержат зернисто - нитчатую субстанцию

В. окрашиваются суправитальным методом

Г. подсчитываются одновременно с подсчетом лейкоформулы

***10.*** Количество ретикулоцитов в норме (%):

А. 0,2 - 1,2

Б. 2 - 12

В. 15 - 20