

APP: MISURA DELLA RESISTENZA OSMOTICA DEI GLOBULI ROSSI.

Il globulo rosso è una piccola cellula del sangue deputata al trasporto dell'ossigeno e priva di nucleo e di organelli. Per assolvere la sua funzione, il globulo rosso (o eritrocita o emazia) contiene una elevata concentrazione di emoglobina, una proteina che ha la funzione di combinarsi reversibilmente con l'ossigeno. Il globulo rosso non può riprodursi e la sua vita media è di 120 giorni; nuovi globuli rossi vengono costantemente prodotti nel midollo osseo dalle cellule staminali specializzate (gli eritroblasti).

Come per qualunque altra cellula, la concentrazione attiva dei soluti nel citoplasma del globulo rosso è la stessa che nel plasma del sangue ed esercita una pressione osmotica di circa 7,6 atm a 37°C. Questa pressione osmotica è la stessa di una soluzione 0,15 M di NaCl e corrisponde a 300 mMoli di soluti osmoticamente attivi per litro (300 mOsm).

Poiché le membrane cellulari sono semipermeabili e possono essere attraversate dall'acqua, se i globuli rossi vengono sospesi in soluzioni a concentrazione minore di quella interna assorbono acqua e si rigonfiano, fino a scoppiare.

E' possibile misurare la resistenza della membrana dei globuli rossi sospendendoli in soluzioni a concentrazione via via decrescente e misurando la frazione delle cellule che vanno incontro alla lisi osmotica. Il modo più semplice per quantificare i risultati di un esperimento di questo genere è quello di centrifugare le cellule e determinare la concentrazione dell'emoglobina nel sovrantante. Infatti la lisi osmotica libera l'emoglobina contenuta nei globuli rossi e la concentrazione di questa proteina nel sovrantante è direttamente proporzionale al numero di cellule che hanno subito la lisi.

Esistono malattie nelle quali, per difetti della membrana o degli enzimi contenuti nel citoplasma, la resistenza del globulo rosso allo stress osmotico è diminuita. Il quadro clinico risultante è quello di una anemia emolitica (quadro clinico spurio, che può essere dovuto a molte cause diverse, non tutte connesse con la resistenza osmotica della membrana). Esempi di difetti ereditari della membrana del globulo rosso sono la sferocitosi e l'ellittocitosi. La procedura che sarà presentata in questa APP non è di uso comune nella pratica clinica, perché richiede tempo e non si presta allo studio di grandi numeri di pazienti: indagini più semplici quali la conta dei reticolociti (globuli rossi immaturi) danno indicazioni sulla possibile presenza di anemie emolitiche in modo più economico (ma meno diretto).

METODO

Viene preparata una soluzione isotonica di NaCl (0,15 M, corrispondente a 0,9% peso/peso).

Vengono preparate 5 provette da centrifuga segnate con le diciture 300 mOsm, 200 mOsm, 150 mOsm, 100 mOsm, zero. Una sesta provetta, non segnata sarà usata per bilanciare i campioni.

Le provette vengono riempite con 1 ml di soluzione alla concentrazione osmolare che è stata scritta su ciascuna, nel modo seguente:

300	1 ml NaCl 0,15M		
200	0,67 ml	"	+ 0,33 ml acqua
150	0,5 ml	"	+ 0,5 ml "
100	0,33 ml	"	+ 0,67 ml "
zero	-		+ 1 ml "

Dopo aver mescolato le provette, a ciascuna vengono aggiunti 0,05 ml di una sospensione di globuli rossi del paziente (nel nostro esperimento un individuo sano i cui globuli rossi non presentano anomalie di membrana). Le provette vengono ancora mescolate delicatamente e inserite nel rotore della centrifuga. Poiché il rotore deve essere bilanciato, è necessario aggiungere una sesta

provetta contenente 1 ml di acqua che serve soltanto ad evitare di danneggiare la centrifuga.



Dopo 2 min. di centrifugazione a 5000 giri /min. la centrifuga viene fermata e si estraggono le provette.

RISULTATI

Si osserva che nella provetta segnata con 300 mOsm (soluzione isotonica) non si è verificata emolisi: i globuli rossi appaiono come un precipitato rosso scuro sul fondo, mentre il sovrantante è incolore.

Le provette segnate con 200 mOsm e 150 mOsm presentano un moderato grado di emolisi: il precipitato di cellule sane è ben evidente ed il sovrantante ha una tonalità rosata più intensa nella soluzione 150 mOsm.

La provetta segnata con 100 mOsm presenta emolisi di grado rilevante: il precipitato è scarso mentre il sovrantante è rosso per l'abbondante liberazione di emoglobina.

La provetta segnata con zero presenta il 100% di emolisi: il precipitato non è evidenziabile o è pressoché incolore, mentre il sovrantante è intensamente rosso.

