

## 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.

