

Определение осмотической стойкости эритроцитарных мембран

Принцип количественного метода определения осмотической стойкости мембраны эритроцитов основан на степени во время нахождения их в смеси растворов с разным объемным содержанием изотонического и гипертонического растворов хлористого натрия и мочевины. Снижение осмотической стойкости мембраны эритроцитов говорит о снижении антиокислительной защиты организма и активации перекисного окисления липидов.

Необходимая аппаратура:

- центрифуга;
- спектрофотометр.

Необходимые реактивы:

1. **0,9% изотонический раствор хлорида натрия** (к 9,0 г NaCl добавить 991,0 мл дистиллированной воды);
2. **1,8% гипертонический раствор мочевины** (к 18,0 г NH_2CONH_2 мочевины добавить 982,0 мл дистиллированной воды);
 - **рабочие растворы** готовят из этих двух растворов:
 1. 40 мл р-ра мочевины + 60 мл р-ра NaCl;
 2. 45 мл р-ра мочевины + 55 мл р-ра NaCl;
 3. 50 мл р-ра мочевины + 50 мл р-ра NaCl;
 4. 55 мл р-ра мочевины + 45 мл р-ра NaCl;
 5. 60 мл р-ра мочевины + 40 мл р-ра NaCl;
 6. 65 мл р-ра мочевины + 35 мл р-ра NaCl;
 7. 100 мл р-ра мочевины исходной концентрации.

Ход определения С любым антикоагулянтom берут около 1,5 мл крови, центрифугируют, отбирают плазму и к оставшемуся осадку эритроцитов, добавляют двукратный объем физиологического раствора, осторожно перемешивают, центрифугируют 5-7 минут, удаляют надосадочную жидкость и повторяют эту процедуру ещё раз (*по мере необходимости делают трижды*). Из отмытых эритроцитов отбирают 0,3 мл и добавляют 0,6 мл изотонического раствора NaCl, перемешивают и по 0,1 мл вносят в семь центрифужных пробирок, содержащих по 5,0 мл растворов, приготовленных согласно вышеприведенной схеме. Полученные пробы перемешивают, а затем спустя 10 минут центрифугируют в течение 10 минут при 1500 оборотах. После чего измеряют оптическую плотность центрифугата при длине волны 540 нм против контроля из дистиллированной воды.

Расчет О степени осмотической стойкости эритроцитарных мембран судят по результатам спектрофотометрии, принимая показания 7-й пробирки за 100% гемолиз и, по отношению к ней, рассчитывают степень гемолиза в каждой пробирке.

Камышников В.С. Клинико-биохимическая лабораторная диагностика. 2003. т. II. -463с. (с.209-211)