

ZNAČAJ IZVOĐENJA TESTA OSMOTSKE REZISTENCIJE ERITROCITA KOD DECE SA PRISUTNOM INDIRECTNOM HIPERBILIRUBINEMIJOM

Gordana Bjelaković¹, Tatjana Jevtović¹, Gordana Kostić², Ivana Stojanović¹ i Dušan Sokolović¹

Test osmotske rezistencije eritrocita često se koristi u dijagnostici raznih tipova hereditarnih hemolitičkih anemija praćenih hiperbilirubinemijom. Hemolitičke anemije, koje se karakterišu ubrzanom destrukcijom eritrocita, obično su posledica nekih metaboličkih poremećaja kao što su membranski defekti, poremećaji enzima eritrocita ili poremećaji u strukturi hemoglobina – hemoglobinopatije. Predmet naših istraživanja bio je utvrđivanje odnosa vrednosti osmotske rezistencije eritrocita i stepena indirektnog hiperbilirubinemije kod nekih urođenih poremećaja metabolizma eritrocita. Osmotsku rezistenciju eritrocita ispitivali smo korišćenjem Dacie's metode sa normalnim vrednostima za hemolizu eritrocita koja počinje i završava se između 0,48 do 0,34 NaCl (minimalna i maksimalna hemoliza). U slučaju hereditarne sferocitoze fragilnost eritrocita bila je povećana sa početnom hemolizom eritrocita pri koncentraciji NaCl od 0,50 do potpune hemolize pri 0,44% NaCl (min. 0,50% NaCl i max. 44% NaCl). Kod deteta sa β -talasemijom i srpastom anemijom fragilnost eritrocita je bila smanjena (min. pri 0,42 – max. pri 0,32% NaCl), odnosno 0,40% min. hemolize i max. pri 0,34% NaCl. Kod novorođenčadi sa visokim vrednostima indirektnog bilirubina u serumu kao posledica fiziološke žutice osmotska rezistencija eritrocita se kretala u normalnim granicama. Naši rezultati potenciraju značaj izvođenja testa osmotske rezistencije eritrocita u ispitivanju bolesnika sa indirektnom hiperbilirubinemijom. Ovaj jednostavan i značajan laboratorijski test ne zahteva skupocenu opremu i može se izvoditi i u malim laboratorijama. *Acta medica Mediana* 2005;44(3): 47 – 51.

Ključne reči: osmotska rezistencija, eritrociti, hiperbilirubinemija, detinjstvo

Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta u Nišu¹
Dečja interna klinika Kliničkog centra u Nišu²

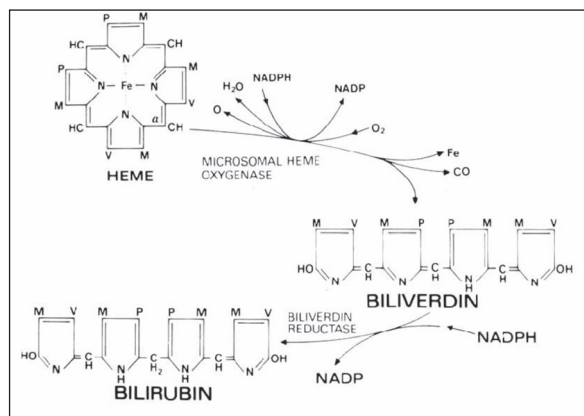
Kontakt: Gordana Bjelaković
Institut za biohemiju Medicinskog fakulteta
Bulevar dr Zorana Đinđića 81
18000 Niš, Srbija i Crna Gora

Uvod

Test osmotske rezistencije eritrocita jeste rutinska laboratorijska analiza koja se koristi u cilju dijagnostikovanja poremećaja metabolizma eritrocita praćenih ubrzanom hemolizom eritrocita (1,2). Ovi poremećaji posledica su, bilo poremećene strukture ćelijske membrane eritrocita (slučaj kod sferocitoze) bilo povećane propustljivosti i lakše fragilnosti, kao posledica izmenjenog metabolizma unutar samih eritrocita (Slika 1).

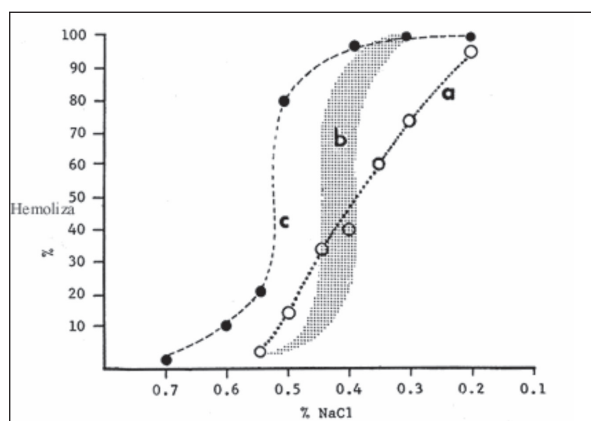
Ovi poremećaji se najpre manifestuju kroz biohemijsko utvrđivanje prisustva blago ispoljenje ili izrazite indirektnog hiperbilirubinemije (3–6).

Indirektno hiperbilirubinemije ukazuju na postojanje ubrzane hemolize eritrocita i prisustva hemolitičke anemije, kao posledice raznih metaboličkih i funkcionalnih poremećaja eritrocita:



Slika 1. Katabolizam hema i sinteza bilirubina

- defekta u ćelijskoj membrani – hereditarna sferocitoza,
- poremećaja u enzimskoj aktivnosti eritrocita:
 - glukoza-6-fosfat dehidrogenaze,
 - piruvat kinaze,
- poremećaja u strukturi hemoglobina (globina)
 - kvalitativne hemoglobinopatije,
 - kvantitativne hemoglobinopatije (talasemije) (Slika 2).



Slika 2. Fragilnost eritrocita

Fragilnost eritrocita: a-Talasemija; b-Normalan nalaz; c-Hereditarna sferocitoza (1)

Princip testa osmotske rezistencije eritrocita zasniva se na činjenici da eritrociti suspendovani u hipotoničnom rastvoru natrijum hlorida prihvataju vodu, bubre, postaju sferični i posle dostizanja kritičnog volumena, prskaju.

Materijal i metode

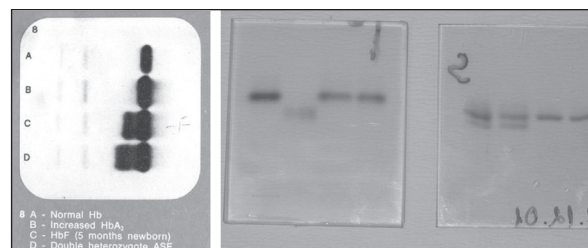
Kod izvođenja testa koristi se puna krv uzeta sa Na-citratom ili heparinom. Posle blagog centrifugiranja pune krvi (5–7 minuta na 3500 ob/min.) izdvaja se plazma i sloj istaloženih leukocita i trombocita "buffy coat". Istaloženi eritrociti ispiraju se fiziološkim rastvorom do momenta dobijanja bistrog supernatanta. Od ispranih eritrocita napravi se suspenzija od koje se dodaje po 2–3 kapi Pasterovom pipetom u 5 ml rastvora NaCl različitih koncentracija počevši od 0,9% NaCl (služi kao kontrola) završno sa epruvetom u kojoj se ne nalazi NaCl. Različite koncentracije NaCl pripremaju se prema priloženoj Tabeli 1.

Posle blagog mućkanja epruvete se ostavljaju da stoje 24 časa na sobnoj temperaturi kada se posmatra stepen hemolize eritrocita. Kod zdravih osoba početna hemoliza se zapaža u epruveti sa 0,48% NaCl, a završna (potpuna) hemoliza se zapaža u epruveti sa 0,34% NaCl, (minimalna i maksimalna hemoliza).

Kod svih uzoraka krvi, kod kojih je ispitivana osmotska rezistencija eritrocita, određivana je i količina ukupnog i direktnog bilirubina, odnosno izračunavana je količina indirektnog bilirubina. Za merenje nivoa ukupnog bilirubina korišćena je kolorimetrijska

metoda Evelyn Malloy, u kojoj se koristi metanol kao akcelerator, a sam bilirubin se boji u prisustvu diazo reagensa pripremljenog po metodi Jandrossik-Grofa.

Kod nekih bolesnika sa indirektnom hiperbilirubinemijom, pored ispitivanja osmotske rezistencije eritrocita meren je nivo Na^+ i K^+ u eritrocitima primenom metode plamene fotometrije, pri čemu su se normalne vrednosti natrijuma kretale u granicama od 18 do 21 mmol/l, a normalne vrednosti kalijuma od 80 do 86 mmol/l. Takođe je vršena elektroforeza hemoglobina na celogelu uz korišćenje TRIS-Glicin pufera pH 8,6 (Slika 3).



Slika 3. Elektroforeza hemoglobina na celogelu (pH 8,6)

Rezultati

Dobijeni laboratorijski nalazi, zajedno sa citološkom analizom hemograma i kliničkom slikom obolele dece, ukazivali su kod tri deteta na postojanje sferocitoze, kod jednog deteta na prisutnost β -talasemije i kod dva deteta je utvrđeno postojanje srpaste anemije, HbS (HbA + HbS) (Tabela 2).

Kod ostale dece se radilo o fiziološkoj, neonatalnoj hiperbilirubinemiji.

U slučaju hereditarne sferocitoze fragilnost eritrocita bila je povećana sa početnom hemolizom eritrocita pri koncentraciji NaCl od 0,50 od potpune hemolize eritrocita pri 0,44% NaCl (min. 0,50% NaCl i max. 0,44% NaCl); količina Na^+ u eritrocitima bila je povećana na 30 mmol/l (normalno 18–21 mmol/l); količina K^+ u eritrocitima bila je niža, 76,0 mmol/l (normalno 80–86 mmol/l). Kod dece sa β -talasemijom i srpastom anemijom fragilnost eritrocita bila je smanjena (min. 0,42% – max. 0,32% NaCl), odnosno 0,40% max. i min. pri 0,34% NaCl. Kod dece sa izrazitom hipohromnom anemijom (bez prisustva hiperbilirubinemije) osmotska rezistencija je bila povećana (fragilnost smanjena) – 0,46% NaCl–0,30 % NaCl (Slika 4).

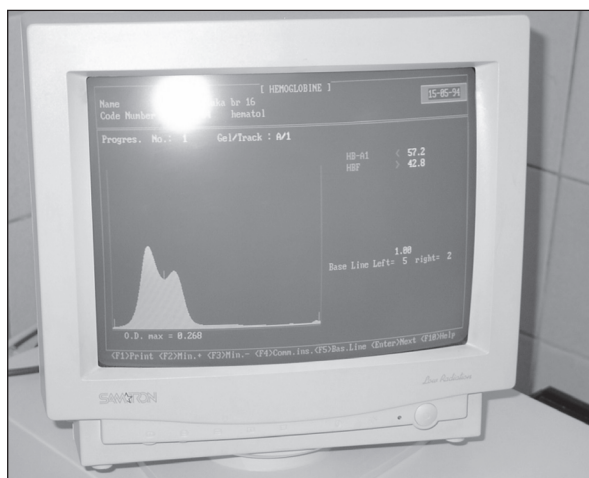
Tabela 1. Koncentracije NaCl

0,7% NaCl (ml)	3,5	2,5	2,4	2,3	2,2	2,1	2,0	1,9	1,8	1,7	1,6	1,5	0
Dest. voda	/	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7	1,8	1,9	2,0	3,5
%NaCl	/	0,50	0,48	0,46	0,44	0,42	0,40	0,38	0,36	0,34	0,32	0,30	0

Normalne vrednosti : početna hemoliza _____ 0,48 - % NaCl
totalna hemoliza _____ 0,34 - % NaCl

Tabela 2. Fragilnost eritrocita kod nekih bolesti

Smanjena fragilnost (kada hemoliza počinje ili se završava u rastvorima nižih koncentracija)	
Povećana fragilnost (kada se eritrociti delimično ili potpuno hemoliziraju u koncentrovanijim rastvorima nego normalno)	
Smanjena	Povećana
HbC hemoglobinopatija	Stečena autoimuna hemolitička anemija
Sideropenijska anemija	Hemolitička anemija novorođenčadi
Srpasta anemija (HbS)	Hereditarna sferocitoza
Talasemija major	Trovanja hemikalijama



Slika 4. Prikaz denzitometrijskog snimka elektroforeze hemoglobina

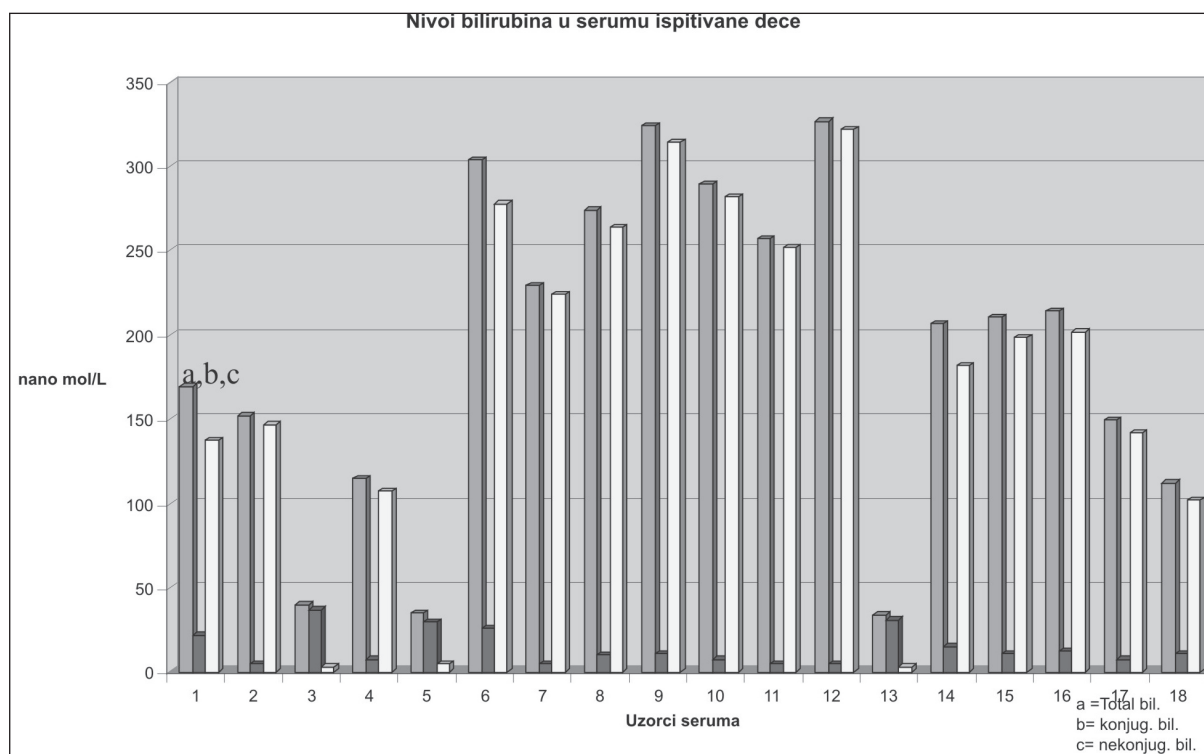
Kod novorođenčadi sa visokim vrednostima indirektnog bilirubina u serumu, kao posledice fiziološke žutice, osmotska rezistencija eritrocita se kretala u normalnim granicama.

Naši rezultati ukazuju na dijagnostičku vrednost testa osmotske rezistencije eritrocita u ispitivanju bolesnika sa indirektnom hiperbilirubinemijom (Slika 5).

Neke od Laboratorijskih analiza ispitivane dece

A. Am Na^+ – 18.6; K^+ – 84.5; Osm. rez. 0.50–0.40; Bil. totalni – 93.121, Dir. 9.96, Ind. 83.16 El Hb: Hb A1 – 70%, HbS – 30%

St. T Na^+ – 14.2; K^+ – 86.4; Osm. rez. 0.48 – 0.36; Bil. totalni – 181.77, Dir. 9.96, Ind.169.32; El. Hb – HbA1–30.7 HbF–69.3



Slika 5. Nivo bilirubina u serumu ispitivane dece

Po.K Na⁺ – 15.9; K⁺ – 99.3; Osm. rez. 0.62–0.44; Bil. Totalni 17.43, Dir. 4.98, Inds. 12.45; El. Hb: HbA₁ 97.3 HbF–2.7

Ab.M Na⁺ – 21.2; K⁺ – 86.0; Osm.rez. 0.48–0.22; Bil. Totalni 34.86, Dir. 21.42, Ind–13.44; El. Hb. HbA₁ HbF Stečena autoimuna hem.an.

T.Lu Na⁺ – 16.4; K⁺ – 90.6; Osm.rez. 0.46 –0.38; Bil Totalni. 69.72, Dir. 7.47, Ind. 62.25; HbA₁–58.2, HbF–39.0, HbA2 – 2.8

T.M Na⁺ –16.1; K⁺ – 84.8; Osm. rez. 0.48–0.38; Bil. Totalni 19.92 Dir. 4.98, Ind. 14.94 Sideropen. anemija

St.O Na⁺ – 19.6; K⁺ – 88.6; Osm. rez 0.42–0.32; Bil. Totalni 27.39 Dir.–4.98, Ind. 22.41

Diskusija i zaključak

Princip testa osmotske rezistencije eritrocita zasniva se na ubrzanom hemolizi eritrocita suspendovanih u hipotoničnom rastvoru NaCl u poređenju sa ponašanjem eritrocita u fiziološkom rastvoru, 0,9% NaCl (7).

Oboljenja eritrocita praćena ubrzanom hemolizom imaju raznu etiologiju i mogu da budu odraz postojanja urođenih defekata u strukturi plazma mebrane eritrocita; postojanja urođene deficijencije nekog od enzima uključenih u metabolizam glukoze ili glutaciona takođe su praćeni pojavom ubrzanog hemolize eritrocita bilo zbog neadekvatnog stvaranja energije u vidu ATP-a, ili zbog postojanja uslova za povećan proces lipidne peroksidacije koja izaziva ubrzanu hemolizu eritrocita (8–11).

Kod hereditarne sferocitoze, zbog izmenjene propustljivosti plazma membrane eritrocita za katjone, eritrociti imaju sferičan izgled i ograničenu sposobnost bubrenja. Zbog toga eritrociti lako prskaju posle ulaska male količine vode pri relativno visokim koncentracijama soli; njihova osmotska fragilnost je povećana, a osmotska rezistencija smanjena.

S druge strane, tanke ili pljosnate ćelije kod hipohromnih (gvožđe deficijentnih) anemija mogu da prihvate značajnu količinu vode i dostignu kritičan volumen za liziranje pri nižim koncentracijama NaCl u odnosu na normalne eritrocite. Njihova osmotska fragilnost je smanjena, a rezistencija je povećana. Sličan nalaz se sreće kod talasemija, srpaste anemije i drugih anemija sa prisutnim target ćelijama. Kod talasemije izvestan procenat ćelija može da ostane nehemoliziran i pri koncentracijama NaCl nižim od 0,3%, pa čak i u prisustvu destilovane vode .

Literatura

1. Turgeon ML. Clinical Hematology. Philadelphia: Little Brown Company; 1993.
2. Nelson AD. Erythrocytic disorders . In : John Berbarad Henry: Clinical diagnosis and management by laboratory methods, Philadelphia Ed. W.B.Saunders Company; 1979 pp. 964-1035.
3. Maccioni L, Cao A. Osmotic fragility test in heterozygotes for alpha and beta thalassaemia. Journal of Medical Genetics 1985; 22: 374-6.
4. Iyanagi T, Emi Y, Ikushiro SD. Biochemical and molecular aspects of genetic disorders of bilirubin metabolism. Biochem Biophys Acta 1998;1407:173-84.
5. Nowicki M, Poley RJ. The hereditary hyperbilirubinemias. Baill Clin Gastroenterol 1998;12:355-66.
6. Segel BG. Definition and classification of hemolytic anemias. Behrman: Nelson Textbook of Pediatrics, Chapter 463, 1-8 (2000), 16th ed., Copyright. W.B.Saunders Company; 2000.
7. Bjelaković G, Milenović D, Živić S, Kostić G, Bjelaković B.B: Indirektna hiperbilirubinemija dečjeg uzrasta kao posledica sferocitoze . Acta Medica Medianae 2000;3:39-46.
8. Zuckerman SK. Approach to the anemias. In: Goldman: Cecil textbook of Medicine, Chapter 159, 21st ed., Copyright 2000. W.B.Saunders Company; 2000.
9. Allen HR. Megaloblastic anemias. In: Wyngaarden BJ, Smith HL, Bennett CJ. Cecil textbook of medicine. 19th Ed. WB Saunders Company; 1992.
10. Segel BG. Hemolytic anemias. Definitions and classification of hemolytic anemias. In: Behrman: Nelson Textbook of Pediatrics. Ed. WB Saunders Company; 2000; pp.1473-80.
11. Bunn FH. Pathogenesis and treatment of sickle cell disease. New Eng Med 1997;337(11): 762-9.

THE IMPORTANCE OF THE ERYTHROCYTES OSMOTIC FRAGILITY TEST PERFORMED IN CHILDREN WITH INDIRECT HYPERBILIRUBINEMIA

Gordana Bjelakovic, Tatjana Jevtic , Gordana Kostic, Ivana Stojanovic and Dusan Sokolovic

The osmotic fragility test of erythrocytes is useful in the diagnosis of different types of hereditary hemolytic anemias followed with hyperbilirubinemia. Hemolytic anemias, characterized by accelerated destruction of red blood cells, are usually the consequence of many metabolic abnormalities like cellular membrane defect, erythrocyte enzymes defect or hemoglobin abnormalities – hemoglobinopathies. The object of our study was to assess the relationship between osmotic fragility test of erythrocytes and severity of indirect hyperbilirubinemia in some inherited erythrocytes' disorders. We did the osmotic fragility test of erythrocytes by using Dacie's method with normal values of erythrocytes hemolysis between 0,48 to 0,34% NaCl (minimal to maximal hemolysis). In hereditary spherocytosis, fragility of erythrocytes was increased (min. at 0,50 % NaCl to max. 0,44 % NaCl). In the child with β -thalassemia and sickle cell anemia erythrocytes fragility was decreased (min. at 0,42 to max. 0,32 % NaCl), that is 0,40% min. of hemolysis and 0,34% max. hemolysis in the second case. In newborn infants with high levels of indirect bilirubin in serum as a cause of physiological jaundice, the osmotic fragility test was within a normal range.

Our findings point out the diagnostic value of osmotic fragility test in assessing patients with the indirect hyperbilirubinemia. This simple and important diagnostic test can be performed in small laboratories. *Acta Medica Medianae 2005; 44 (3): 47 – 51.*

Key words: *osmotic fragility test, erythrocytes, hyperbilirubinemia, childhood*