

PRACE ORYGINALNE • ORIGINAL PAPERS

Metoda optyczna badania oporności osmotycznej erytrocytów w praktyce lekarza rodzinnego

The optical method of erythrocyte osmotic fragility investigation in family doctor practice

ALICJA SZOŁNA-CHODÓR^{1, A-F}, BRONISŁAW GRZEGORZEWSKI^{1, D, E, G}, MACIEJ BOSEK^{1, C-E}, KRZYSZTOF DOBOSZ^{2, C-E}¹ Katedra i Zakład Biofizyki Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu² Poradnia Ogólna Przychodni Rejonowej NZOZ „Ogrody” w Bydgoszczy

A – przygotowanie projektu badania, B – zbieranie danych, C – analiza statystyczna, D – interpretacja danych, E – przygotowanie maszynopisu, F – opracowanie piśmiennictwa, G – pozyskanie funduszy

PL ISSN 1734-3402

Streszczenie Wstęp. Szybkie i skuteczne określenie oporności osmotycznej erytrocytów pozwoli lepiej monitorować stan ludzi chorych, jak również skuteczność podawanych im leków.**Cel pracy.** Prezentacja optycznej metody wyznaczenia oporności osmotycznej erytrocytów.**Materiał i metody.** Pobrano krew 5 zdrowych dawców. Przygotowano zawiesiny erytrocytów o hematokrycie 1% w izotonicznych i hipotonicznych roztworach NaCl. Użyto układu mierzącego nierozproszoną składową światła przechodzącego przez zawiesinę erytrocytów o różnej grubości, co pozwoliło wyznaczyć makroskopowy współczynnik rozpraszania światła.**Wyniki.** Współczynnik rozpraszania światła przy stężeniach od 0,63% do 0,9% NaCl przyjmuje wartości zbliżone. Poniżej tej wartości stężenia NaCl następuje gwałtowne zmniejszanie się tego współczynnika. Ostatecznie w przedziale 0,09–0,36% współczynnik ten staje się bliski zera.**Wnioski.** Makroskopowy współczynnik rozpraszania zawiesiny erytrocytów może być miarą oporności osmotycznej erytrocytów.**Słowa kluczowe:** biofizyka, diagnostyka laboratoryjna, erytrocyty, lekarz rodzinny, oporność osmotyczna, rozpraszanie światła.**Summary Background.** Quick and effective assessment of erythrocyte osmotic fragility allows a better monitoring ill subjects' condition and effectiveness of used medicines.**Objectives.** The presentation of the optical method of erythrocyte osmotic fragility estimation.**Material and methods.** The venous blood was drawn from five healthy subjects. The erythrocyte suspensions of 1% hematocrit in isotonic and hypotonic NaCl solutions were prepared. The experimental setup measuring unscattered component of light passing through erythrocyte suspension of different thickness was used, what allows macroscopic scattering coefficient of light assessment.**Results.** Scattering light coefficient from 0.63% to 0.9% of NaCl concentrations attained similar values. Below this concentration of NaCl, this coefficient suddenly decreased. Finally in the concentrations range from 0.09 to 0.36% this coefficient became close to zero.**Conclusions.** Macroscopic scattering coefficient of erythrocyte suspension can be used as a measure of erythrocyte osmotic fragility.**Key words:** biophysics, laboratory diagnostics, erythrocytes, family doctor, osmotic fragility, light scattering.

Wstęp

Choroby społeczne, jakimi są cukrzyca, choroby sercowo-naczyniowe oraz choroby przewodu pokarmowego, mogą być przyczyną zmian w oporności erytrocytów na stres osmotyczny. Oporność osmotyczna erytrocytu zależy od kształtu komórki, jak również od zaburzeń w budowie jego błony. Poddając erytrocyty zdrowych dawców działaniu hipotonicznych roztworów NaCl w wodzie destylowanej, obserwujemy początek hemolizy (hemoliza częściowa) dla stężenia 0,45% NaCl, a koniec hemolizy (hemoliza całkowita) – dla 0,3% NaCl. Wartości te określamy mianem referencyjnych. Określając różnice w wartości oporności badanych erytrocytów względem wartości referencyjnych, można monitorować choroby, jak również oceniać skuteczność podawanego leku. Powszechnie stosowany jest standardowy test oporności osmotycznej (ang. *osmotic resistance test* – ORT) [1–3]. Zaproponowano również inne metody

oceny oporności osmotycznej [4–6], jednak jak wskazuje ENERCA (*European Network for Rare and Congenital Anemias*) test ORT jest najczęściej stosowanym testem [7].

Cel pracy

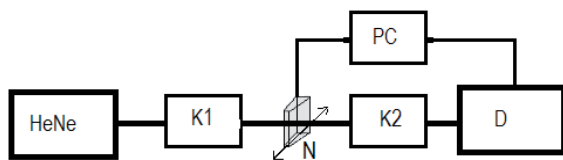
Celem pracy było przedstawienie nowej metody wyznaczenia oporności osmotycznej erytrocytów z pomiaru zależności natężenia światła przechodzącego przez próbkę od jej grubości.

Materiał i metody

Krew 5 zdrowych dawców pobraną na K₃EDTA uzyskano z Regionalnego Centrum Krwiodawstwa i Krwiolecznictwa w Bydgoszczy i wykorzystano w ciągu kilku godzin od pobrania. Krew wirowano przez 5 minut z prędkością 3000 obr./min w temperaturze 4°C. Erytrocyty oddzielono i trzy-

krotnie wyplukano. Przygotowano zawiesiny erytrocytów o hematokrycie 1% w roztworach o stężeniu: 0,09; 0,18; 0,27; 0,36; 0,45; 0,54; 0,63; 0,72; 0,81; 0,9% NaCl dla każdego dawcy.

Układ eksperymentalny użyty w tej metodzie został wcześniej opisany [8, 19]. Schemat układu pomiarowego pokazano na rycinie 1. Źródłem światła jest laser HeNe emitujący promieniowanie o długości fali 632,8 nm. Układ optyczny K1 kolimuje wiązkę światła ze źródła i kieruje ją na wybrane miejsce naczynia klinowego. Układ optyczny K2 wybiera składową nierozproszoną światła i kieruje ją do detektora. Naczynie klinowe porusza się w osi horyzontalnej, co umożliwia pomiar natężenia wiązki w zależności od grubości próbki. Ruchem naczynia klinowego steruje komputer.



Rycina 1. Schemat układu eksperymentalnego

HeNe – laser, K1 – układ kolimujący wiązkę, N – naczynie klinowe na ruchomej podstawie, K2 – układ wybierający składową nierozproszoną światła, D – detektor, PC – komputer zbierający dane i sterujący ruchem naczynia.

Pomiaru dokonano dla grubości naczynia od 122 do 677 μm . Jeden pomiar trwał 42,2 s. Pomiaru wykonano w temperaturze pokojowej ($21 \pm 1^\circ\text{C}$).

Badania przeprowadzono za zgodą Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu przy Collegium Medicum im. Ludwika Rydygiera w Bydgoszczy.

Natężenie składowej nierozproszonej światła I_c można określić zależnością;

$$I_c = I_0 e^{-\mu_s d},$$

w której I_0 – jest wartością natężenia padającego, μ_s jest makroskopowym współczynnikiem rozpraszania, d – jest grubością próbki.

Korzystając z pomiarów natężenia światła I_c dla różnych grubości próbki, możemy wyznaczyć makroskopowy współczynnik rozpraszania światła.

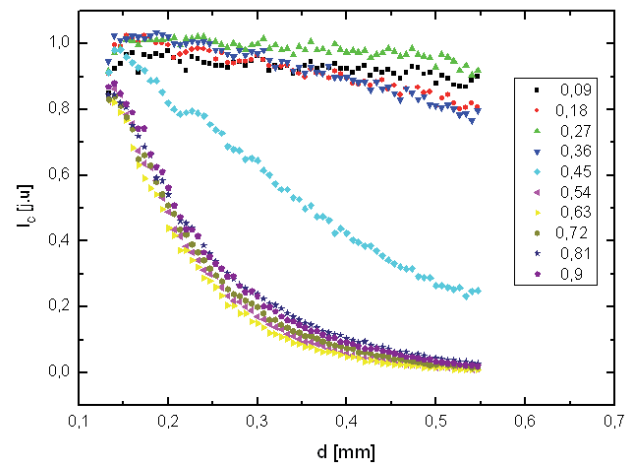
Wyniki

Makroskopowy współczynnik rozpraszania zawiesiny erytrocytów można wyznaczyć z pomiaru natężenia światła dla różnych grubości próbki. Na rycinie 2 przedstawiono zależność natężenia składowej nierozproszonej światła od grubości próbki dla zawiesin erytrocytów przy różnych stężeniach NaCl.

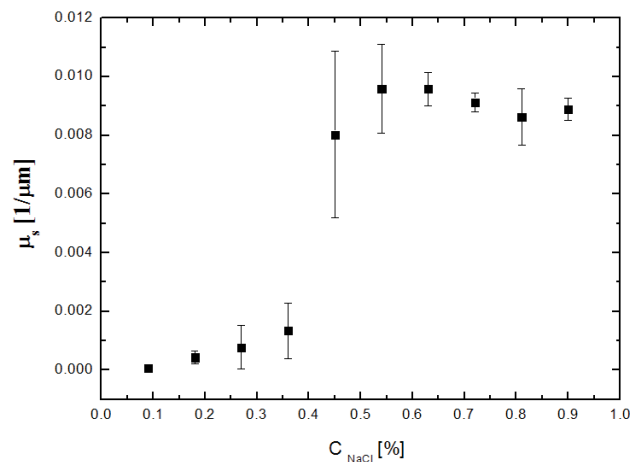
Na podstawie danych przedstawionych na rycinie 2 wyznaczono wartości makroskopowych współczynników rozpraszania μ_s zawiesiny erytrocytów dla każdego z 10 stężeń NaCl. Na rycinie 3 przedstawiono średnie wartości μ_s dla badanych dawców w zależności od stężenia NaCl.

W tej pracy jako wskaźnik liczby erytrocytów, które uległy degradacji, wykorzystano wartość współczynnika μ_s . Spadek wartości tego współczynnika wskazuje na wzrost liczby erytrocytów, które uległy hemolizie. Współczynnik μ_s przy stężeniach 0,63–0,81% NaCl przyjmuje wartość zbliżoną do wartości tego współczynnika dla stężenia 0,9% NaCl. Zmniejszające się stężenie NaCl skutkuje gwałtownym spadkiem współczynnika μ_s , który przyjmuje wartości

zblizone do zera w przedziale 0,09–0,36%. W obszarze spadku wartości współczynnika μ_s odchylenie standardowe przyjmuje duże wartości, co odzwierciedla różnice międzyosobnicze.



Rycina 2. Zależność natężenia składowej nierozproszonej światła od grubości próbki dla zawiesin erytrocytów przy różnych stężeniach NaCl. Pomiar dla jednego dawcy



Rycina 3. Zależność parametru μ_s będącego miarą oporności osmotycznej od stężenia NaCl w wodzie destylowanej. Parametry uśrednione dla 5 dawców

Wnioski

Pokazano, że makroskopowy współczynnik rozpraszania zawiesiny erytrocytów może być wskaźnikiem liczby erytrocytów, które uległy hemolizie. Duża wartość tego współczynnika dla stężeń bliskich stężeniu izotonicznemu wskazuje na brak hemolizy, natomiast mała jego wartość dla małych stężeń NaCl wskazuje na całkowitą hemolizę. Metoda ta może być zatem wykorzystana do pomiaru oporności erytrocytów na stres osmotyczny. ENERCA wskazuje na dużą niejednorodność stosowanych metod wyznaczania oporności osmotycznej erytrocytów, jak również na potrzebę zwiększenia dokładności i czasu wykonania badania [7]. Wychodząc naprzeciw oczekiwaniom współczesnej analityki, proponujemy w tej pracy metodę, która jest prosta, tania, a czas wykonania jest krótki, natomiast automatyzacja badania morfologii ma duże znaczenie dla poprawy jakości diagnostyki [10].

Piśmiennictwo

1. Parpart AK, Lorenz PB, Parpart ER, et al. The osmotic resistance (fragility) of human red blood cells. *J Clin Investigat* 1946; 26(4): 636–640.
2. Hsi ED. *Hematopathology*. 2nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2012: 35.
3. Fischbach TF, Dunning MB. *A manual of laboratory and diagnostic tests*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2009.
4. Danon D, Marikovsky Y, Kohn A. Red Cell Agglutination Kinetics: a method for automatic recording with the fragiligraph. *Cel Molec Life Sci* 1969; 25(1): 104–106.
5. Mazon P, Didelon J, Muller S, et al. A theoretical approach of the measurement of osmotic fragility of erythrocytes by optical transmission. *Photochem Photobiol* 2000; 72(2): 172–178.
6. Zanella A, Izzo C, Rebulli P, et al. Acidified glycerol lysis test: a screening test for spherocytosis. *Br J Haematol* 1980; 45(3): 481–486.
7. Paleari R, Mosca A. Controversies on the osmotic fragility test. *Enerca. News* 2008: 2.
8. Szolna A, Grzegorzewski B. Optical analysis of red blood cell suspension. *Proc SPIE* 2008; 7141: 714119.
9. Szolna-Chodór A, Kempczyński A, Grzegorzewski B. Scattering coefficient of suspension of aggregating red blood cells. *Photon Lett Poland* 2011; 4: 153–155.
10. Płaczkowska S, Pawlik-Sobecka L, Małolepsza E. Jak powstaje wynik badania morfologii krwi obwodowej? Zasada działania analizatora hematologicznego. *Fam Med Prim Care Rev* 2009; 11(2): 163–167.

Adres do korespondencji:

Mgr Alicja Szolna-Chodór

Katedra Biofizyki, Collegium Medicum w Bydgoszczy, UMK w Toruniu

ul. Jagiellońska 13

85-068 Bydgoszcz

Tel.: 52 585-34-16

E-mail: alicja.szolna@cm.umk.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 25.02.2014 r.

Po recenzji: 14.04.2014 r.

Zaakceptowano do druku: 25.04.2014 r.