STANOVENÍ OSMOTICKÉ FRAGILITY ERYTROCYTŮ

Princip:
Buňky reagují na změnu osmotického tlaku. V hypotonickém prostředí buňka nasává vodu, zvětšuje se a dochází k popraskání její plasmatické membrány a k uvolnění buněčného obsahu. Pro studium tohoto fenoménu použijeme erytrocyty, které po popraskání (hemolýze) uvolňují hemoglobin, jenž se dá snadno stanovit. Hemolýza je patrná i pouhým okem.
K stanovení hemoglobinu uvolněného z erytrocytů se používá Drabkinovo činidlo. Princip reakce spočívá v tom, že se hemoglobin a jeho deriváty oxidují na methemoglobin v přítomnosti alkalického ferikyanidu draselného. Methemoglobin reaguje s kyanidem draselným za vzniku barevného kyanomethemoglobinu. Intenzita barvy měřená při 400 nm je úměrná celkové koncentraci hemoglobinu.
Použijeme lidské erytrocyty, které byly promyty fyziologickým roztokem, a tedy již neobsahují plasmu.

Chemikálie:
Drabkinovo činidlo – ferikyanid draselný ($K_3[Fe(CN)_6]$) a kyanid draselný (KCN) v alkalickém prostředí

Pracovní postup:

POZOR! NOSTE RUKAVICE A PLÁŠŤ – PRACUJETE S BIOLOGICKÝM MATERIÁLEM, POTENCIÁLNĚ **INFEKČNÍM**, A S VYSOCE TOXICKÝM **DRABKINOVÝM** ČINIDLEM!

1. Označte si 5 eppendorfek (malé plastové zkumavky) čísly 1–5 a do každé zkumavky napipetujte 1 ml odpovídajícího roztoku:

   Roztok 1: neředěný fyziologický roztok

   Roztok 2: fyziologický roztok ředěný vodou v poměru 3:1

   Roztok 3: fyziologický roztok ředěný vodou v poměru 2:1

   Roztok 4: fyziologický roztok ředěný vodou v poměru 1:1

   Roztok 5: fyziologický roztok ředěný vodou v poměru 1:5, obsahující NH_4Cl
   (NH_4Cl navodí zkrat zbývajících membránových pump)

2. Do zkumavek 1–5 napipetujte po 50 µl suspenze erytrocytů, jemně promíchejte a nechte 10 min. stát. Pak zkumavky centrifugujte (3000×*g*/ 3 min.) a opatrně odeberte supernatant na stanovení hemoglobinu.
   Poznámka: supernatant je tekutina nad sedimentem, jenž vzniká při centrifugaci.

3. Připravte si 5 skleněných zkumavek 1–5 s 2 ml Drabkinova činidla. Do každé zkumavky přidejte 50 µl supernatantu z předchozího kroku a jemně promíchejte.

   Změřte absorbanci ve všech vzorcích při vlnové délce 400 nm proti slepému vzorku (obsahuje pouze Drabkinovo činidlo).

Vzhledem k tomu, že se nejedná o čerstvou krev, zjistíte částečnou hemolýzu i ve zkumavce č. 1. Množství hemoglobinu v ní stanovené považujte za kontrolu a odečtěte je od hodnot naměřených ve zkumavkách 2–5. Množství hemoglobinu změřené ve zkumavce č. 5 je maximální možné a vyjádříme je jako 100 % hemolýzy. Na tomto základě potom vypočítejte % hemolýzy ve zkumavkách 2–4.
Pomocí kalibrační křivky (k dispozici v laboratoři) vyjádřete své výsledky jako koncentraci hemoglobinu v mg/l.

Vyhodnocení

Zkumavka	**% hemolýzy**
2	
3	
4	