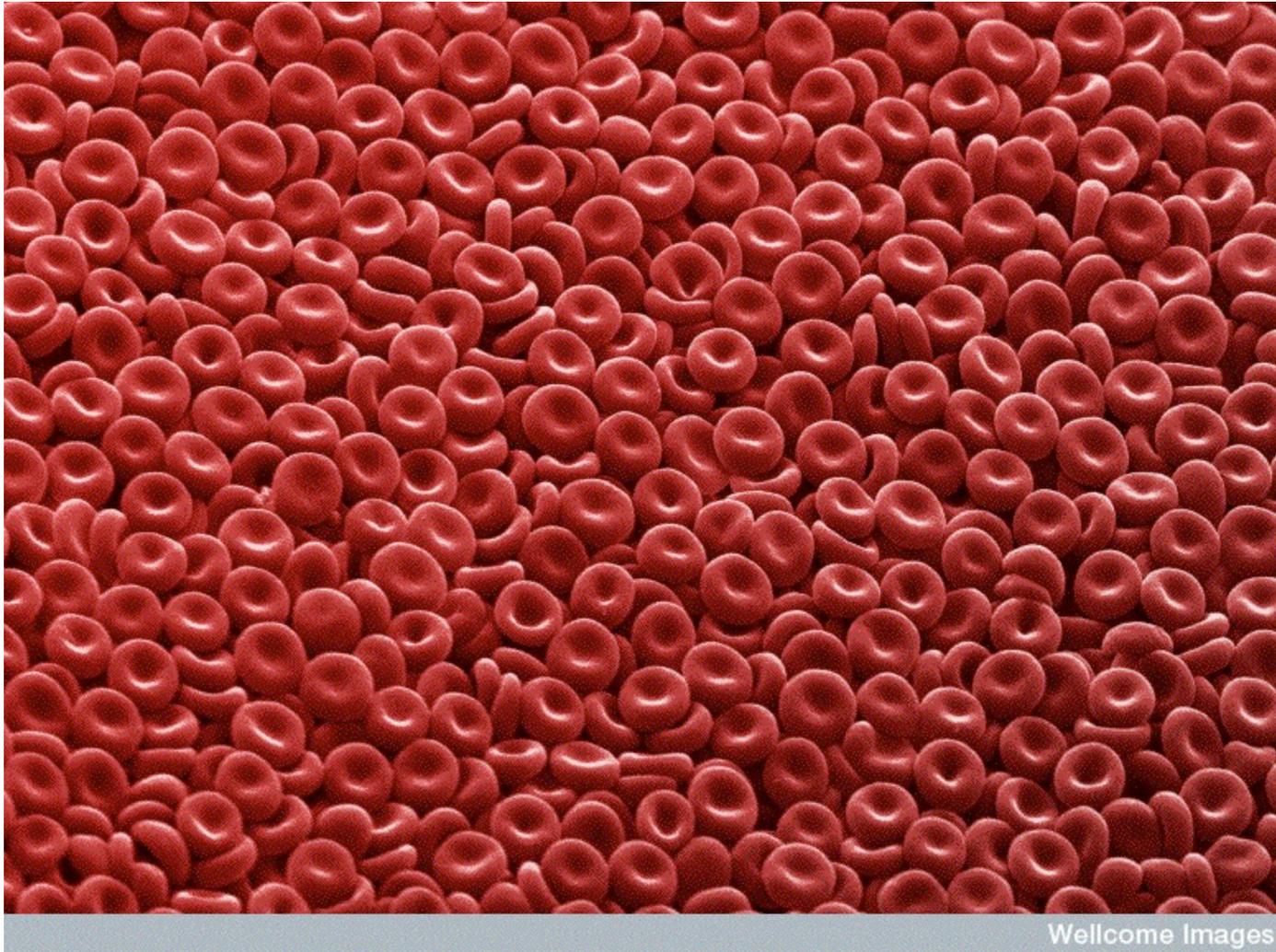


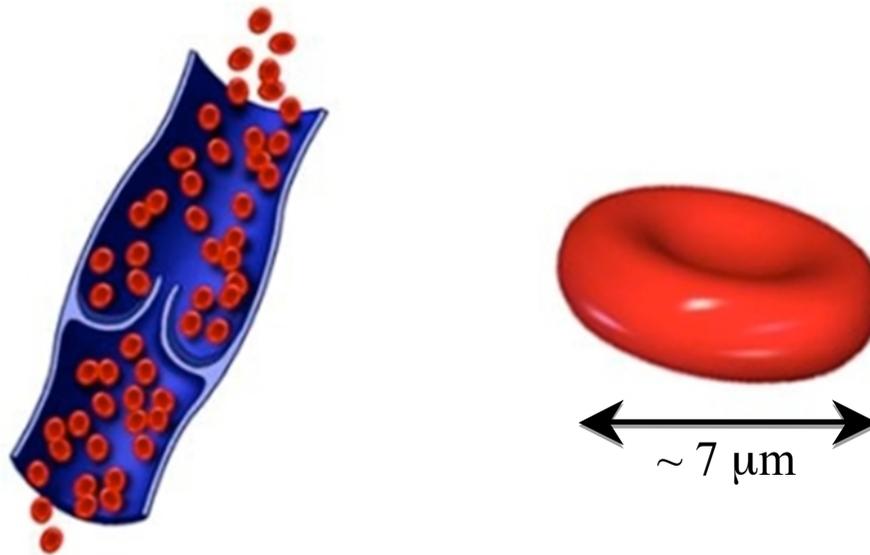
Osmometria ed Emolisi



Wellcome Images

APP: MISURA DELLA RESISTENZA OSMOTICA DEI GLOBULI ROSSI (2/12/08).

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).



sezione di un vaso
sanguigno

L'osmolarità

L'osmolarità è un'unità di misura della concentrazione delle soluzioni, ed in particolare rappresenta la concentrazione del numero totale di molecole e ioni presenti in un litro di soluzione.

È definita come il numero di osmoli per litro di soluzione, dove l'osmole è l'unità di misura del numero di particelle che contribuiscono alla pressione osmotica della soluzione.

Per il calcolo delle osmoli, e quindi dell'osmolarità, occorre considerare il **grado di dissociazione α** che il soluto presenta. Ad esempio, una mole di glucosio in soluzione acquosa corrisponde ad una osmole, dal momento che il glucosio non subisce in acqua alcuna dissociazione, mentre una mole di cloruro di sodio corrisponde a due osmoli, dal momento che il cloruro di sodio subisce dissociazione liberando uno ione cloruro e uno ione sodio. Per acidi, basi e sali poco solubili, occorrerà tener conto del grado di dissociazione.

In generale **l'osmolarità** si calcola come il **prodotto tra la molarità e il coefficiente di Van'tHoff** (il numero di particelle di soluto che si formano in seguito alla dissociazione del soluto stesso). Ovviamente se il soluto non è un elettrolita l'osmolarità sarà uguale alla molarità.

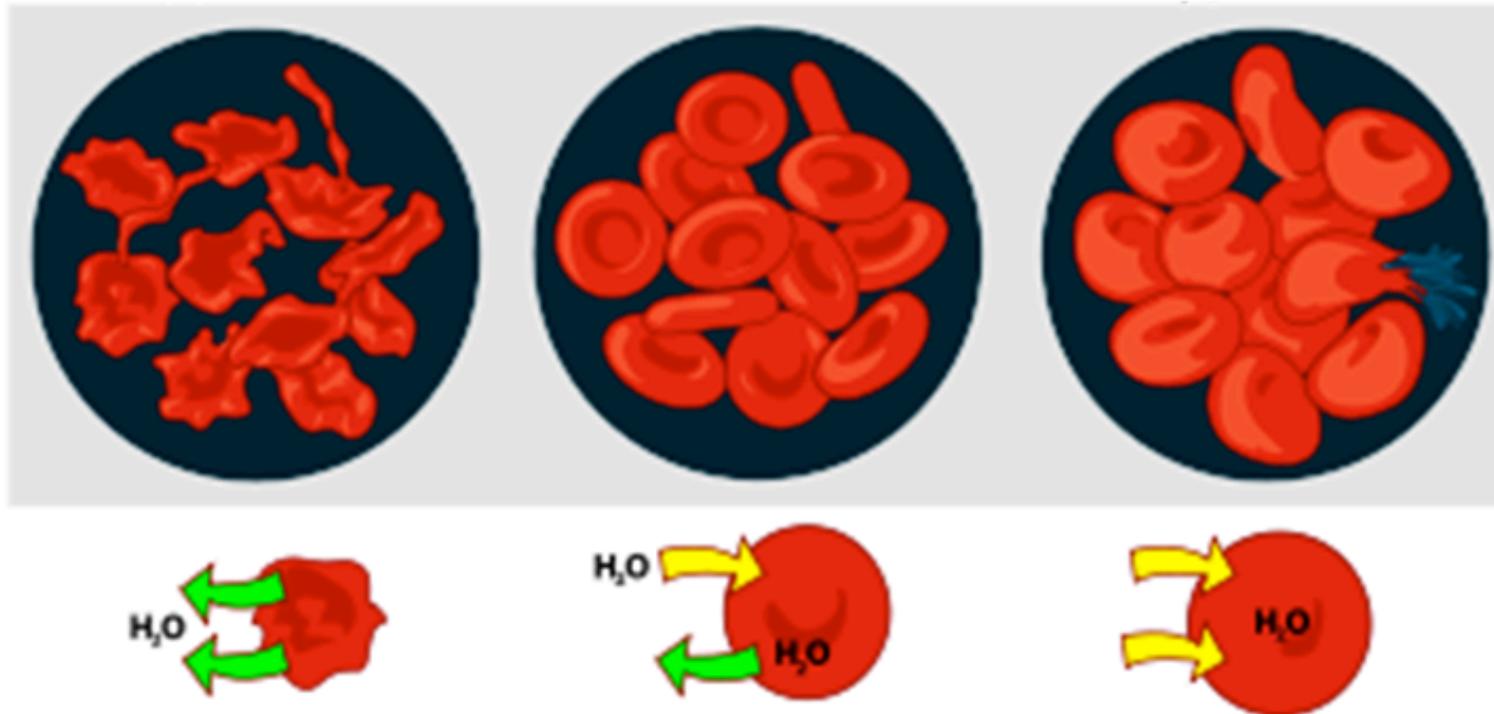
$$\text{osmolarità} = [1 + \alpha \cdot (v - 1)] \cdot \text{molarità}$$

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 7.8 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.

ipertonica

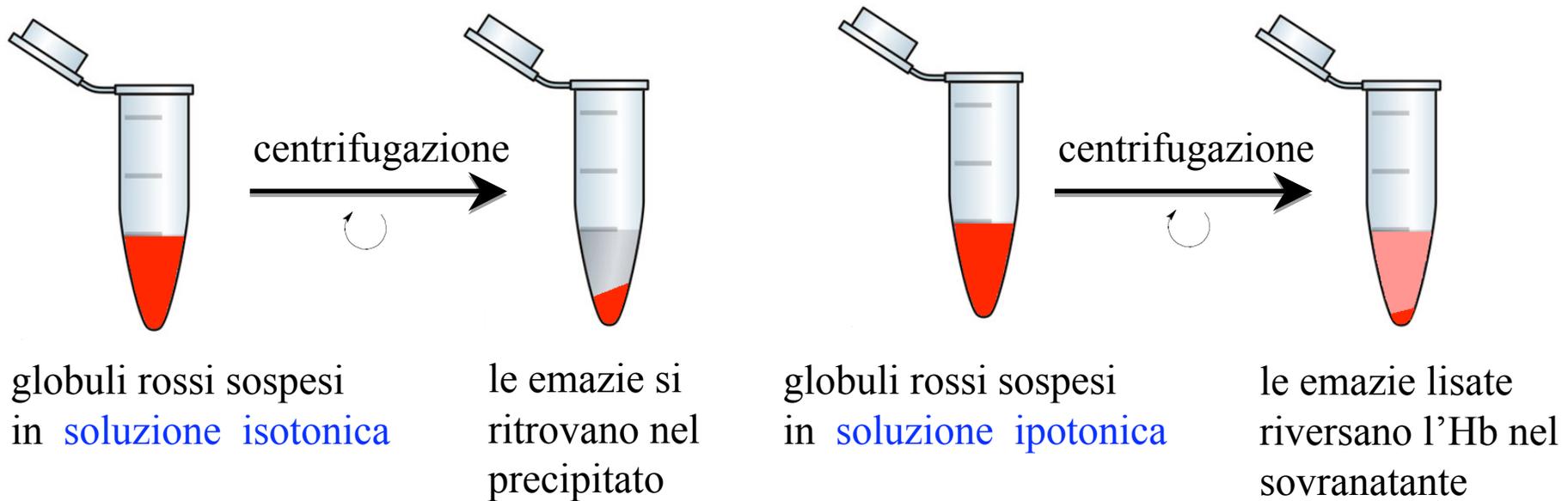
isotonica

ipotonica

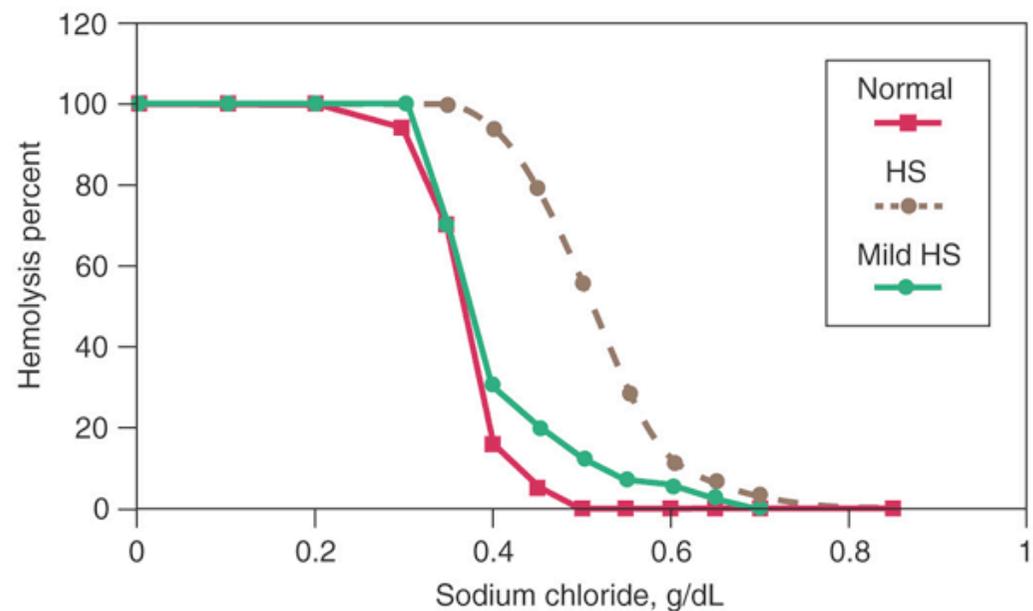
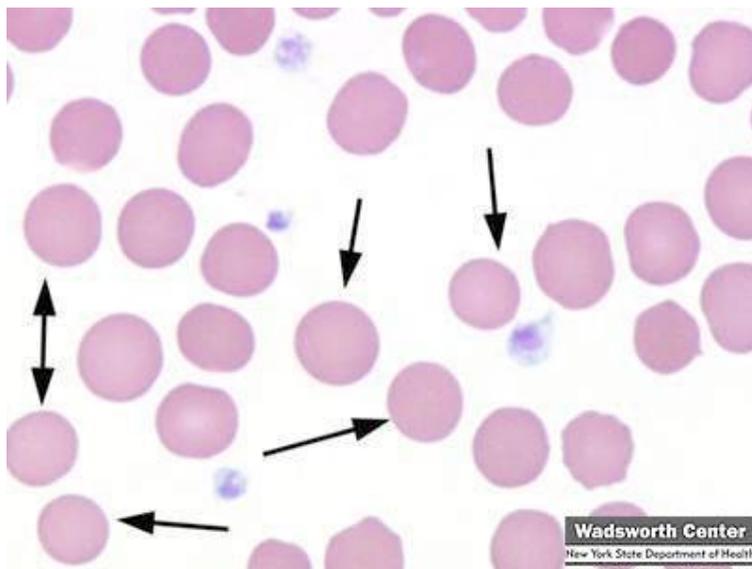


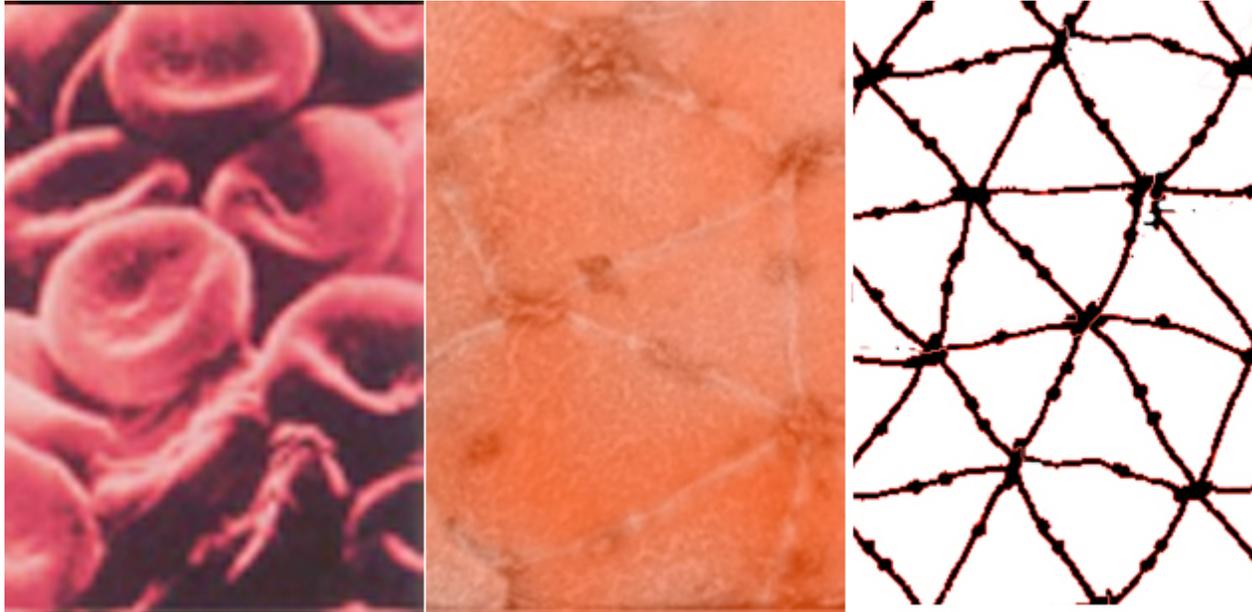
E' possibile misurare la resistenza della membrana dei globuli rossi sospendendoli in soluzioni a concentrazione via via decrescente e misurando la frazione delle cellule che vanno incontro alla lisi osmotica.

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 (Hb) nel sovrinatante. Infatti la lisi osmotica libera l'emoglobina contenuta nei globuli rossi e la concentrazione di questa proteina nel sovrinatante è direttamente proporzionale al numero di cellule che hanno subito la lisi.



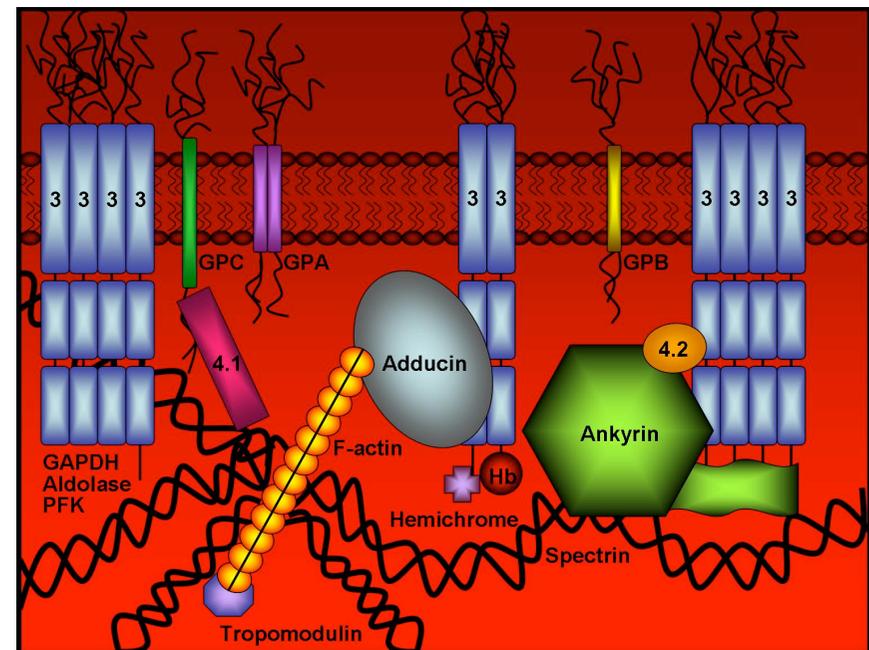
Esistono malattie nelle quali, per difetti della membrana o degli enzimi contenuti nel citoplasma, la resistenza del globulo rosso allo stress osmotico è diminuita. Il quadro clinico risultante è quello di una anemia emolitica (quadro clinico spurio, che può essere dovuto a molte cause diverse, non tutte connesse con la resistenza osmotica della membrana). Esempi di difetti ereditari della membrana del globulo rosso sono la sferocitosi e l'ellittocitosi.





Difetti nel citoscheletro sono responsabili in parte della fragilità osmotica delle emazie.

L'analisi del citoscheletro della membrana dei globuli rossi mostra che la maggior parte delle alterazioni strutturali ereditarie o acquisite, deriva da modificazioni derivanti dalle proteine di membrana. Gli studi di queste proteine del citoscheletro (α - e β -spectrina, proteina 4,1, F-actina, anchirina) hanno evidenziato in queste anemie emolitiche anomalie quantitative e funzionali. I casi congeniti spesso presentano una familiarità. Tuttavia il meccanismo per il quale queste alterazioni delle proteine strutturali determinano l'emolisi è sconosciuto.



Hereditary spherocytosis

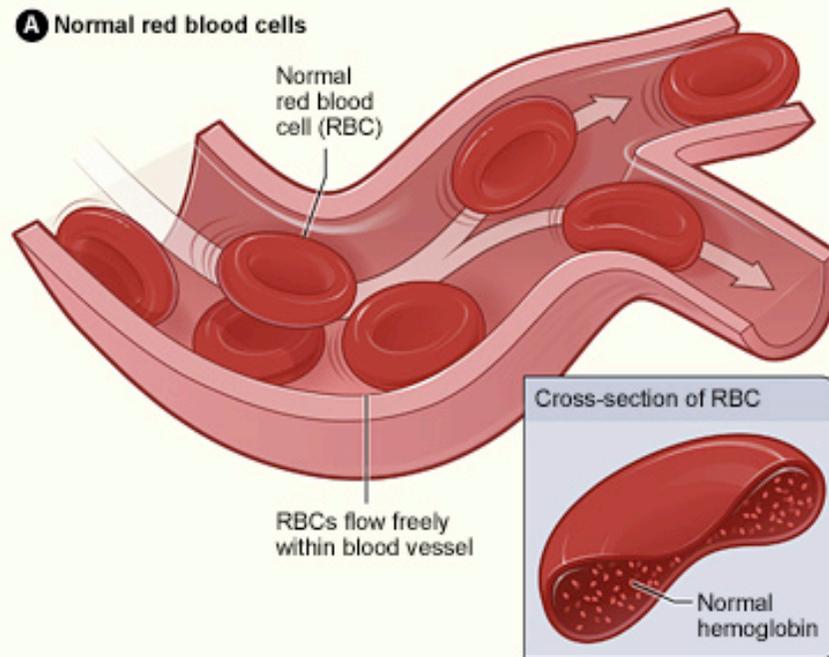
Hereditary Spherocytic Hemolytic Anemia is an inborn error of metabolism that can be inherited as an autosomal dominant or autosomal recessive genetic trait.

The HS gene, that for ANK1, has been mapped to chromosome 8 and, specifically, to chromosome band 8p11.2.

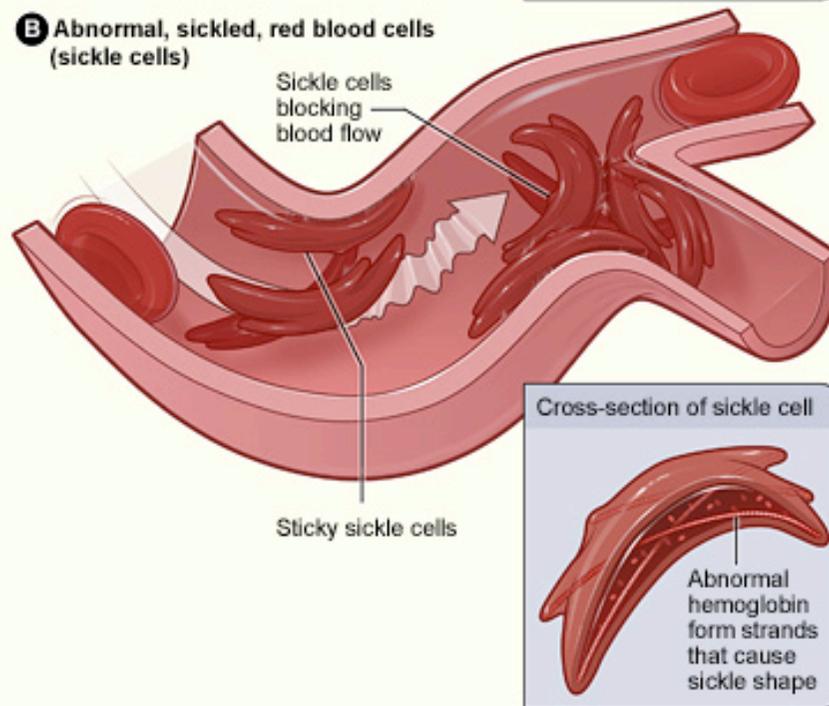
HS can be inherited as a dominant trait so, if a person with HS reproduces, their child (irrespective of whether it is a boy or girl) has a 50:50 chance to have HS.

The more severe forms of Hereditary Spherocytic Hemolytic Anemia are inherited as autosomal recessive genetic traits. In recessive disorders, the condition does not appear unless a person inherits the same defective gene for the same trait from each parent.

A Normal red blood cells



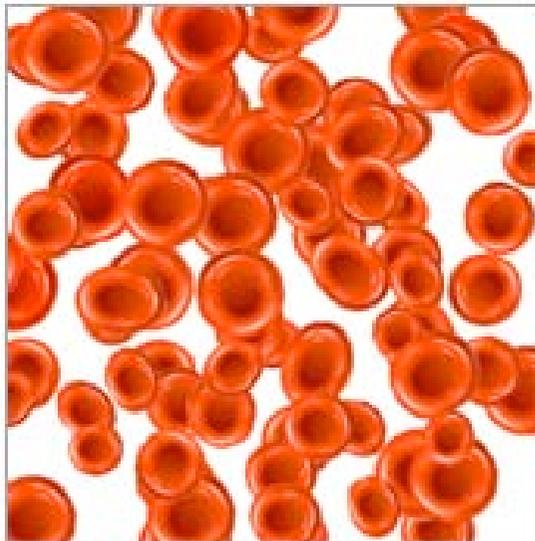
B Abnormal, sickled, red blood cells (sickle cells)



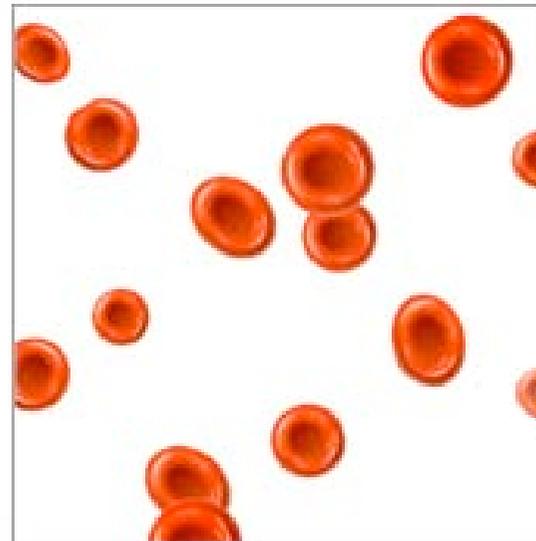
Anche nell'anemia falciforme la ridotta deformabilità del globulo rosso porta all'emolisi.

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).

Normal amount of
red blood cells



Anemic amount of
red blood cells



Misura della resistenza osmotica dei globuli rossi

Materiali:

provetta contenente globuli rossi da sangue umano di donatore sano.

soluzione fisiologica di NaCl = 0.15 M = 0.9% peso/volume

provette da centrifuga

centrifuga

fotometro

Procedura:

calcolare la concentrazione effettiva (C_1) di NaCl fisiologico (OsM)

$$[\text{NaCl}] = 0.15 [1 + \alpha(v-1)] = 300 \text{ OsM}$$

Tabella 1: Riempire gli spazi vuoti secondo la legge delle diluizioni: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$.

N.B.: Prima di calcolare il volume di H₂O da aggiungere, bisogna sottrarre il volume di globuli rossi.

	1	2	3		
	Globuli rossi	ml di NaCl (soluzione concentrata) V1	ml di H ₂ O	Volume finale V2	Concentrazione OsM finale C2
A	0.05ml	1.95 ml	0 ml	2 ml	0.3 OsM
B	0.05ml	ml	ml	2 ml	0.2 OsM
C	0.05 ml	ml	ml	2 ml	0.16 OsM
D	0.05ml	ml	ml	2 ml	0.15 OsM
E	0.05ml	ml	ml	2 ml	0.1 OsM
F	0.05ml	ml	ml	2 ml	0 OsM

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad V_2 = V_{\text{globuli}} + V_{\text{NaCl}} + V_{\text{H}_2\text{O}}$$

$$V_{\text{NaCl}} = V_1 = \frac{C_2}{C_1} V_2 \quad V_{\text{H}_2\text{O}} = V_2 - V_{\text{globuli}} - V_1$$

Tabella 1: Riempire gli spazi vuoti secondo la legge delle diluizioni: $C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$.

N.B.: Prima di calcolare il volume di H₂O da aggiungere, bisogna sottrarre il volume di globuli rossi.

	1	2	3		
	Globuli rossi	ml di NaCl (soluzione concentrata) V1	ml di H ₂ O	Volume finale V2	Concentrazione OsM finale C2
A	0.05ml	1.95 ml	0	2 ml	0.3 OsM
B	0.05ml	1.33 ml	0.62 ml	2 ml	0.2 OsM
C	0.05 ml	1.06	0.88 ml	2 ml	0.16 OsM
D	0.05ml	1 ml	0.95 ml	2 ml	0.15 OsM
E	0.05ml	0.8 ml	1.15 ml	2 ml	0.12 OsM
F	0.05ml	0.67 ml	1.28 ml	2 ml	0.1 OsM
G	0.05ml	0 ml	1.95 ml	2 ml	0 OsM

Riempire le provette da centrifuga con le quantità scritte nelle colonne 1, 2, 3.

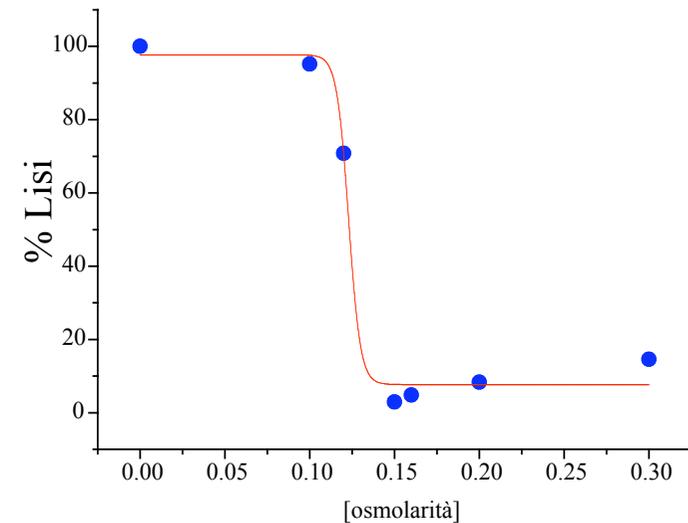
Centrifugare 1 minuto a 5000rpm.

Prelevare le provette e depositarle sul supporto

Trasferire il supernatante in una cuvetta e misurarne l'assorbanza con lo spettrofotometro.

Tabella 2 – Eseguire la lettura di assorbanza (OD) a 560nm con lo spettrofotometro, scriverne i valori convertirli in % di lisi, con la seguente proporzione: $OD(F) : 100\% = OD(x) : X$

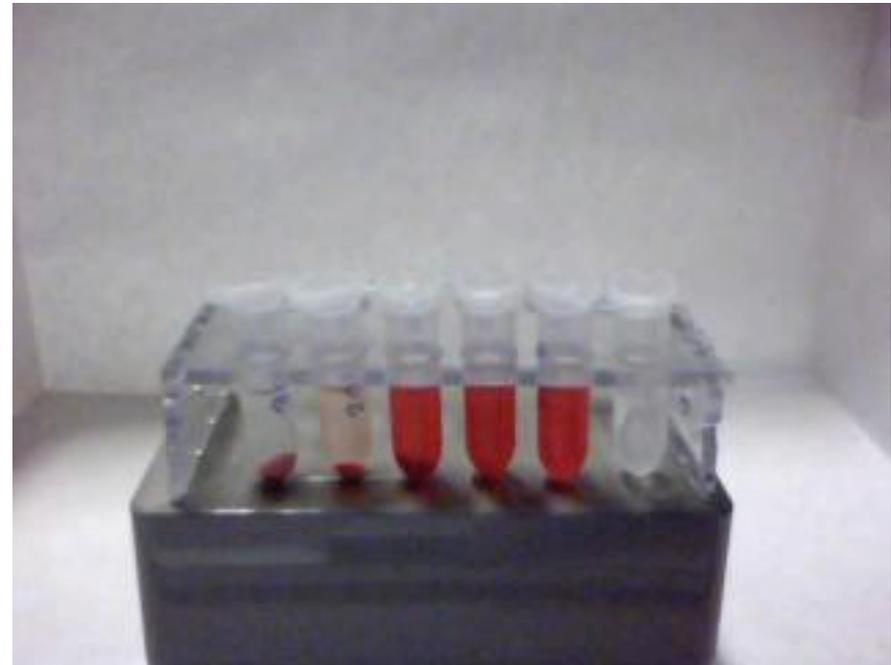
	Concentrazione NaCl (ascisse)	OD a 560 nm	% lisi (ordinate)
A	0.3 OsM		0%
B	0.2 OsM		
C	0.16 OsM		
D	0.15 OsM		
E	0.1 OsM		
F	0 OsM		100%



La centrifuga utilizzata



Alcuni campioni ottenuti



ipotonicità
crescente