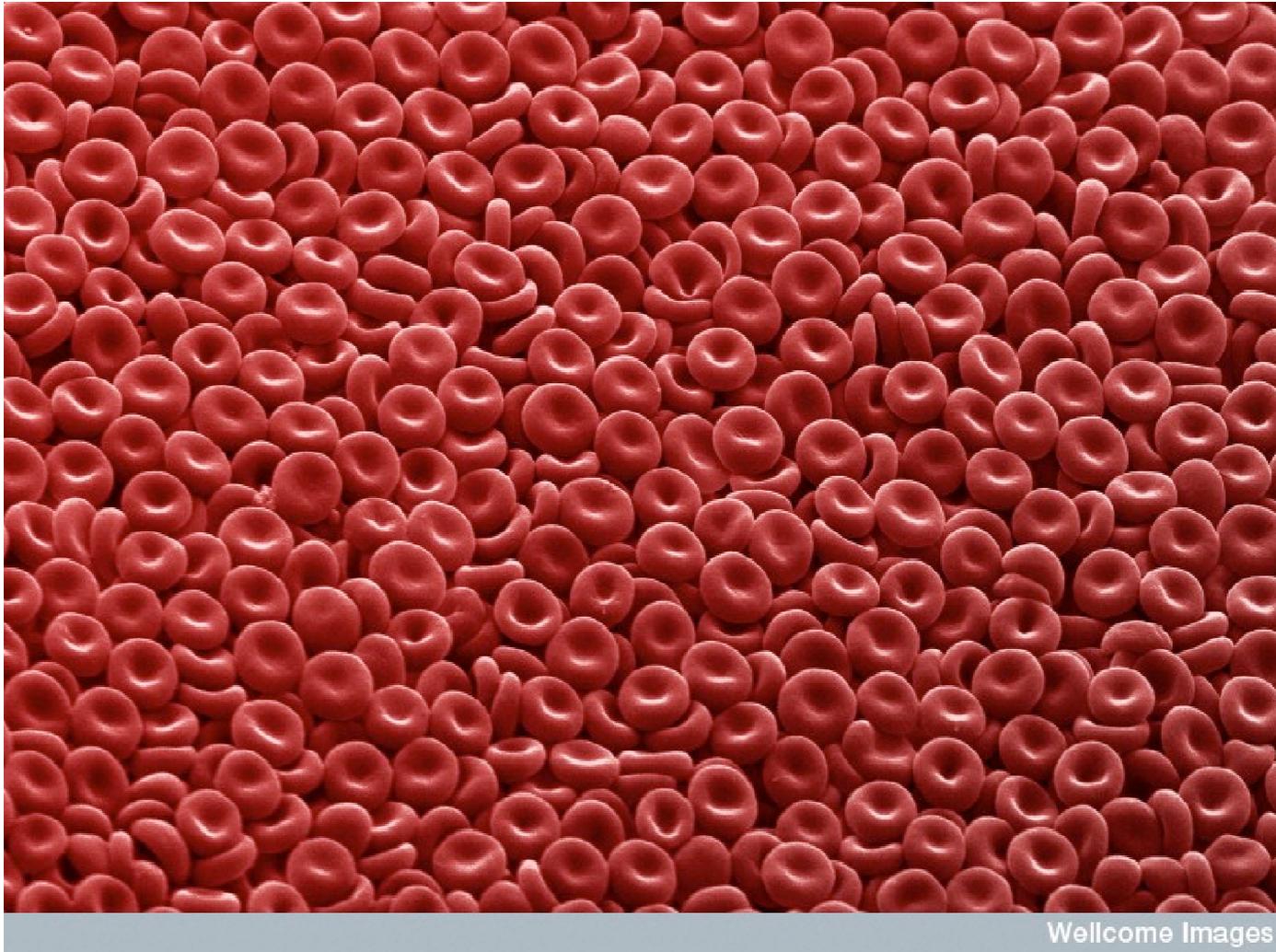


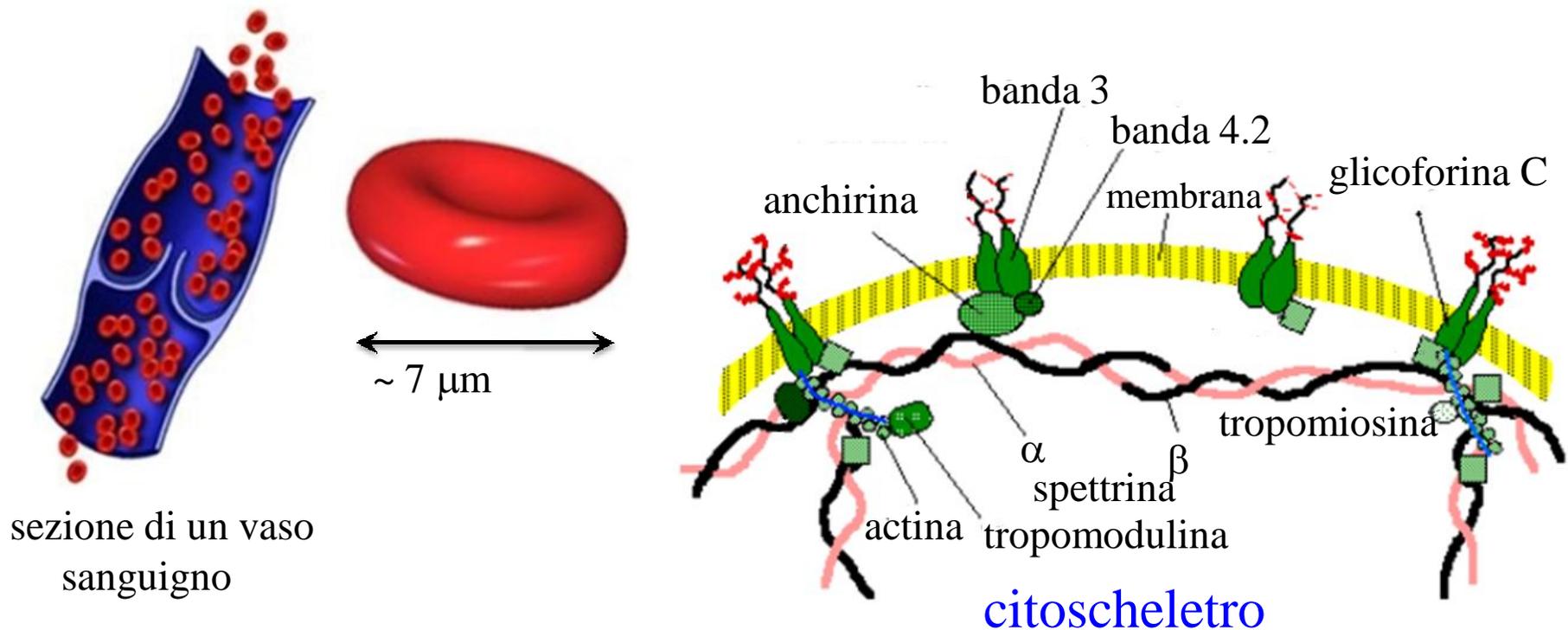
Osmometria ed Emolisi



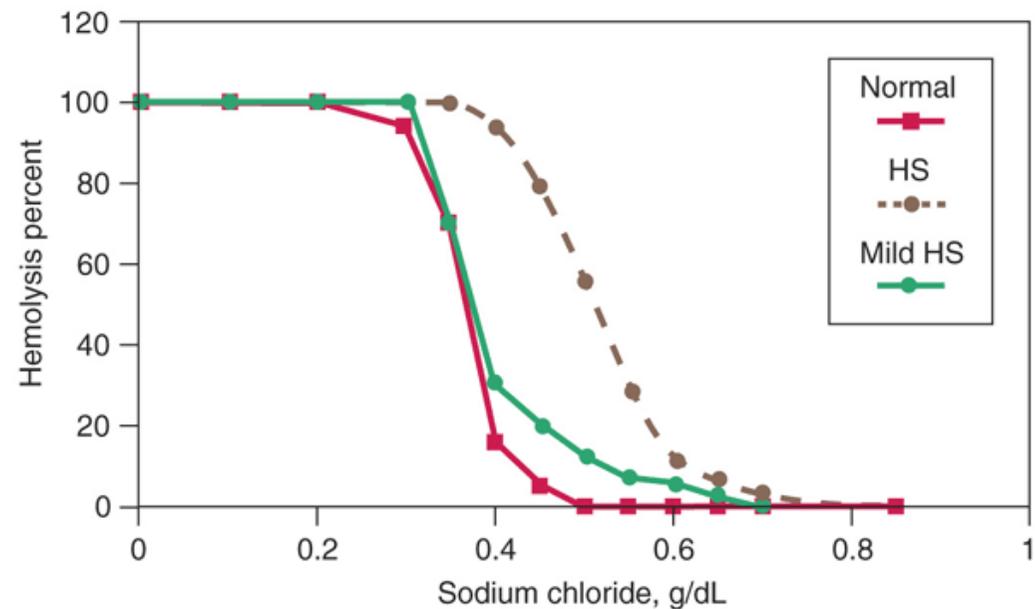
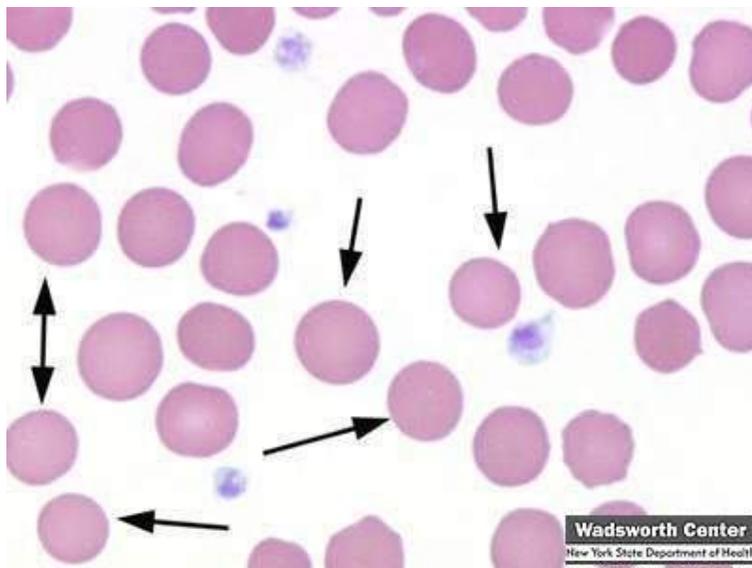
Wellcome Images

APP: MISURA DELLA RESISTENZA OSMOTICA DEI GLOBULI ROSSI (26/11/09).

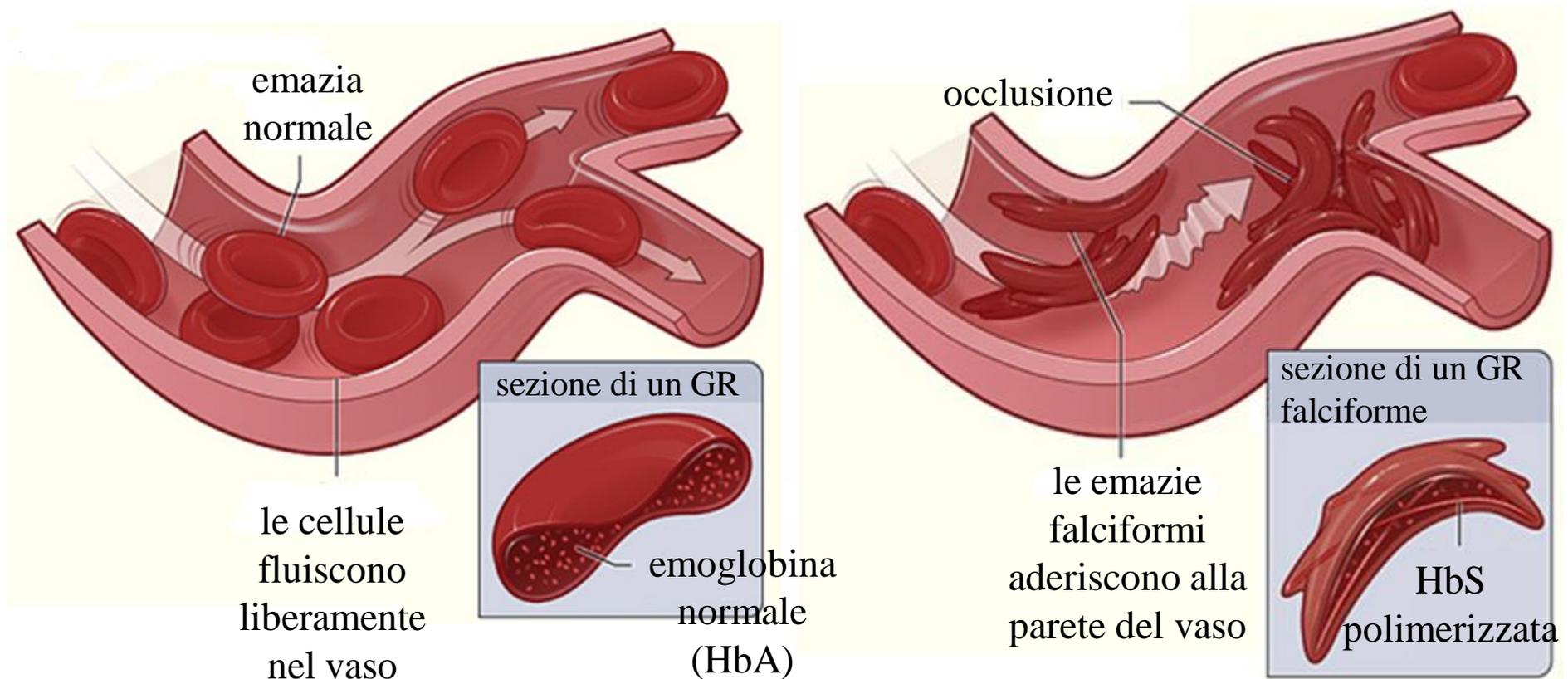
Il globulo rosso è una piccola cellula del sangue deputata al trasporto dell'ossigeno e priva di nucleo e di organelli. Per assolvere la sua funzione, il globulo rosso (o eritrocita o emazia) contiene una elevata concentrazione di emoglobina, una proteina che ha la funzione di combinarsi reversibilmente 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).



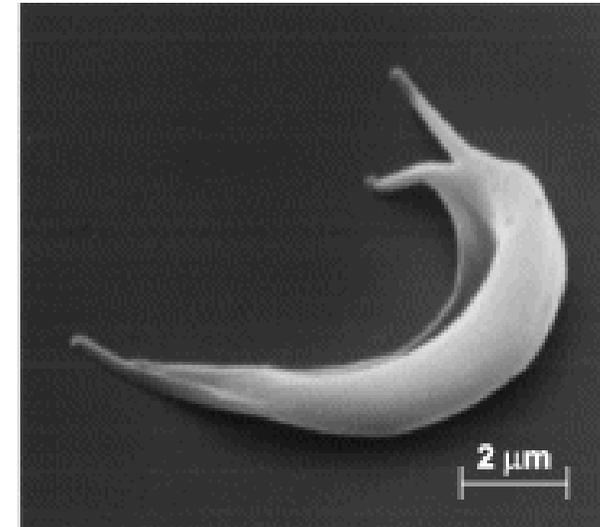
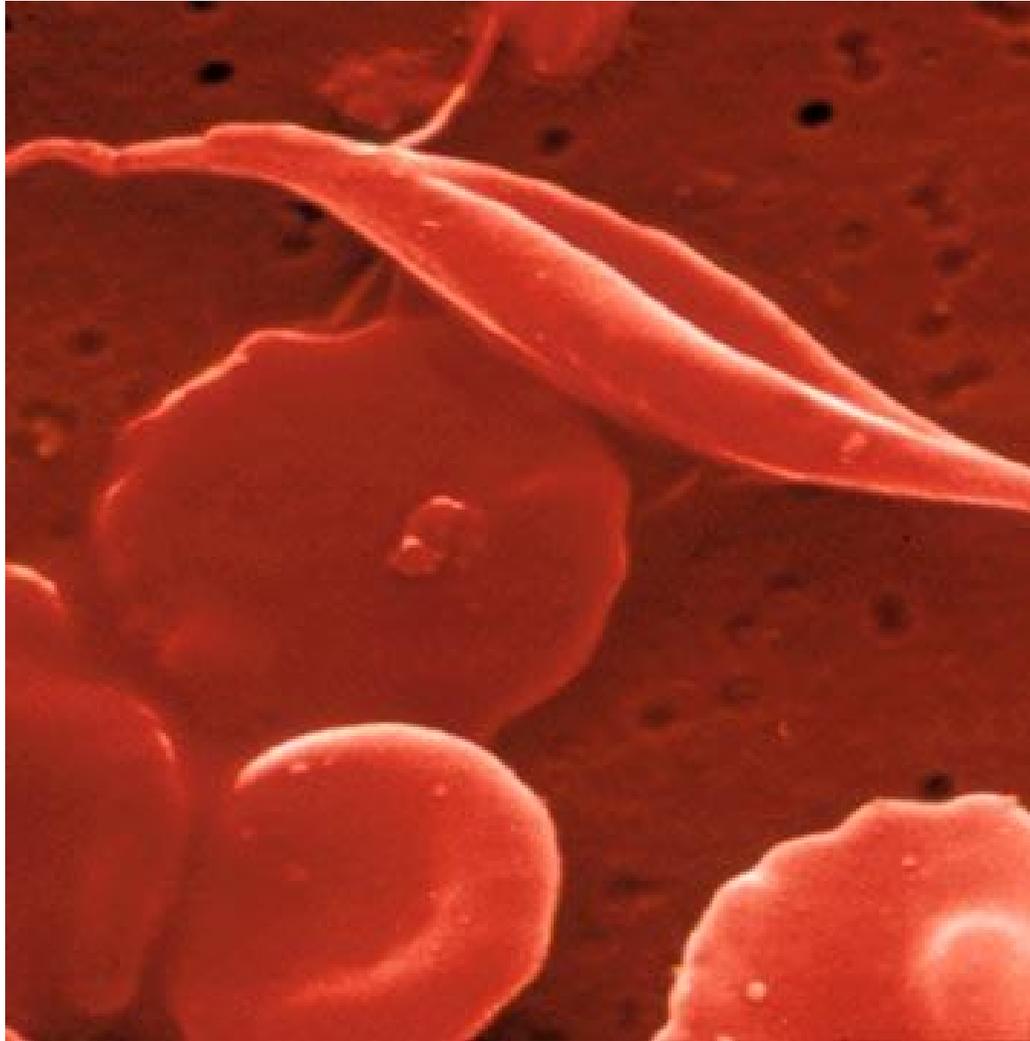
Esistono malattie nelle quali, per difetti della membrana o degli enzimi contenuti nel citoplasma, la resistenza del globulo rosso allo stress osmotico è diminuita. Il quadro clinico risultante è quello di una **anemia emolitica** (quadro clinico spurio, che può essere dovuto a molte cause diverse, non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

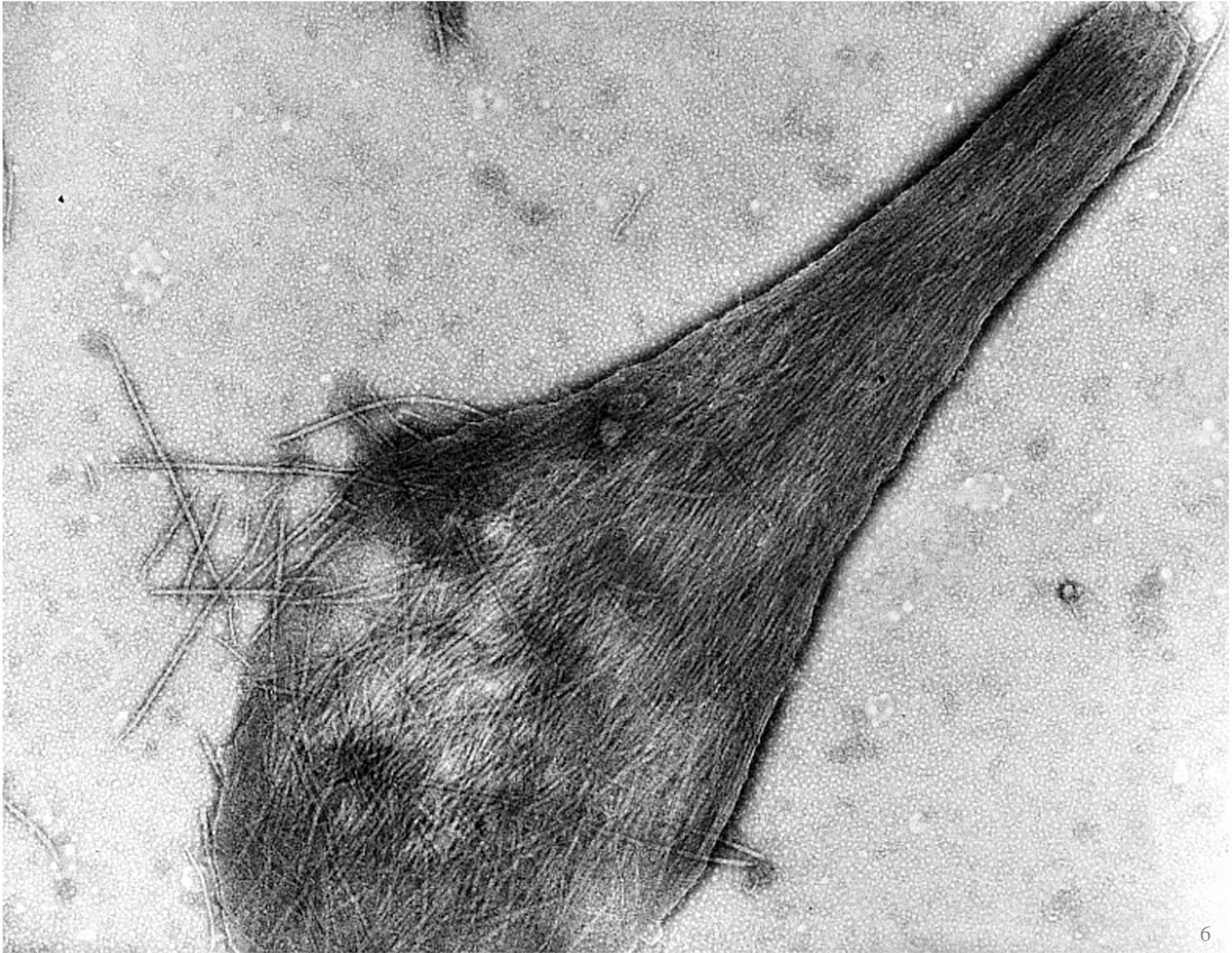


Anche nell'**anemia falciforme** la ridotta deformabilità del globulo rosso (GR) porta all'emolisi. Nelle cellule falciformi è presente l'emoglobina S (HbS) che in assenza di O₂ (capillari tissutali) polimerizza per formare lunghi filamenti che deformano la cellula.



L'emoglobina S. Una mutazione importante: Glu A3(6) β \rightarrow Val determina l'anemia falciforme (ipotesi di Linus Pauling 1945)





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 e il numero di particelle generate dalla dissociazione. Ad esempio, 1 mole di glucosio in soluzione acquosa corrisponde ad 1 osmole, dal momento che il glucosio non subisce in acqua alcuna dissociazione, mentre 1 mole di NaCl corrisponde a 2 osmoli, dal momento che il NaCl subisce dissociazione liberando uno ione cloruro e uno ione sodio.

In generale **l'osmolarità** si calcola come il **prodotto tra la molarità e il coefficiente isotnico di van't Hoff** (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.

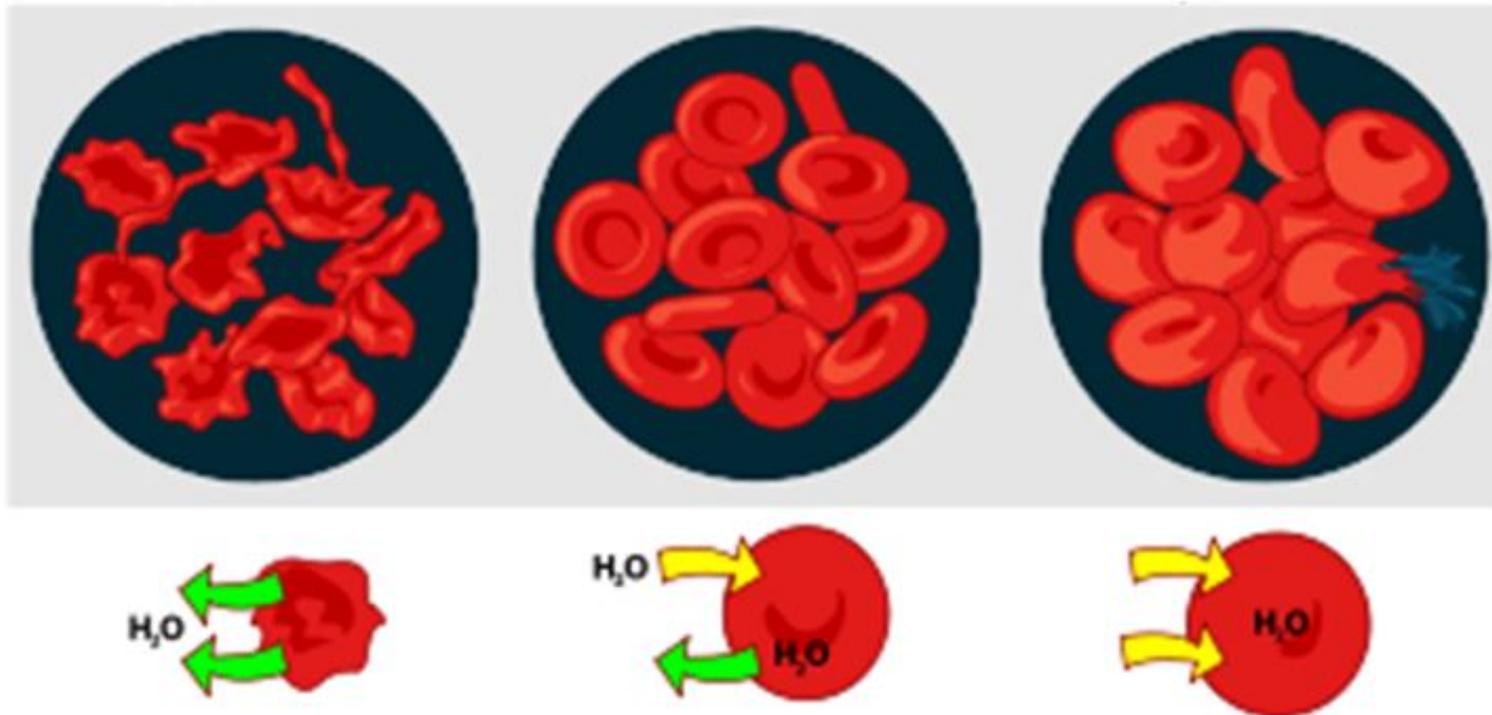
$$\text{osmolarità} = [1 + \alpha \cdot (v - 1)] \cdot \text{molarità}$$

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.

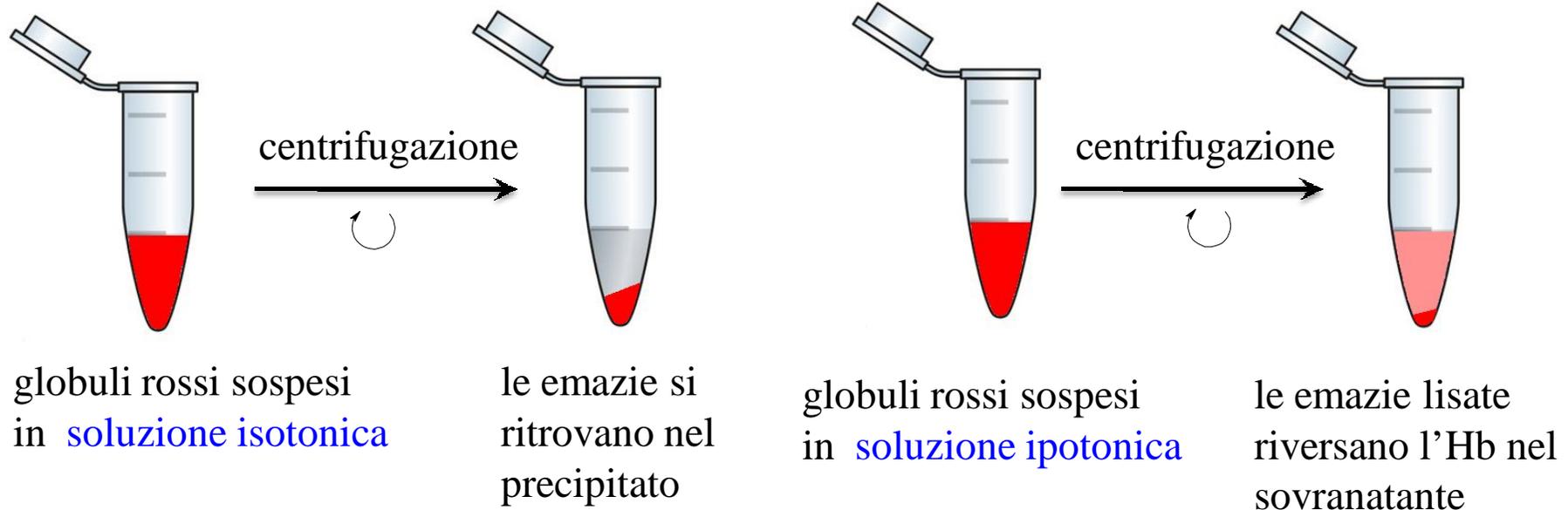
ipertonica

isotonica

ipotonica



È possibile misurare la **resistenza della membrana dei globuli rossi** sospingendoli in soluzioni a concentrazione via via decrescente e misurando la frazione delle cellule che vanno incontro alla lisi osmotica. La frazione di cellule emolizzate sarà misurata dall'incremento di assorbanza nel sovrinatante dopo centrifugazione, che è indice della presenza dell'emoglobina



La centrifuga utilizzata



Alcuni campioni ottenuti

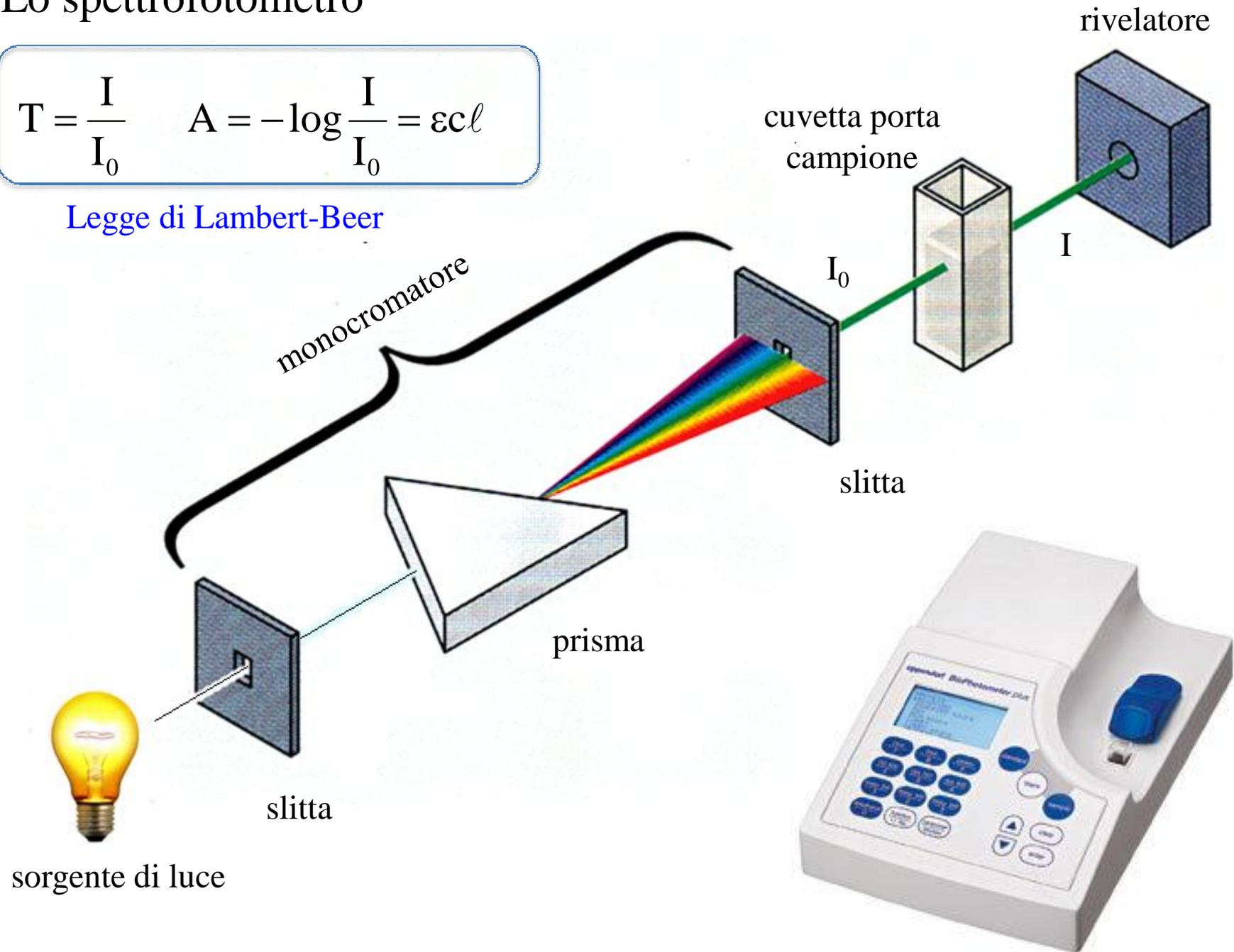


ipotonicità
crescente

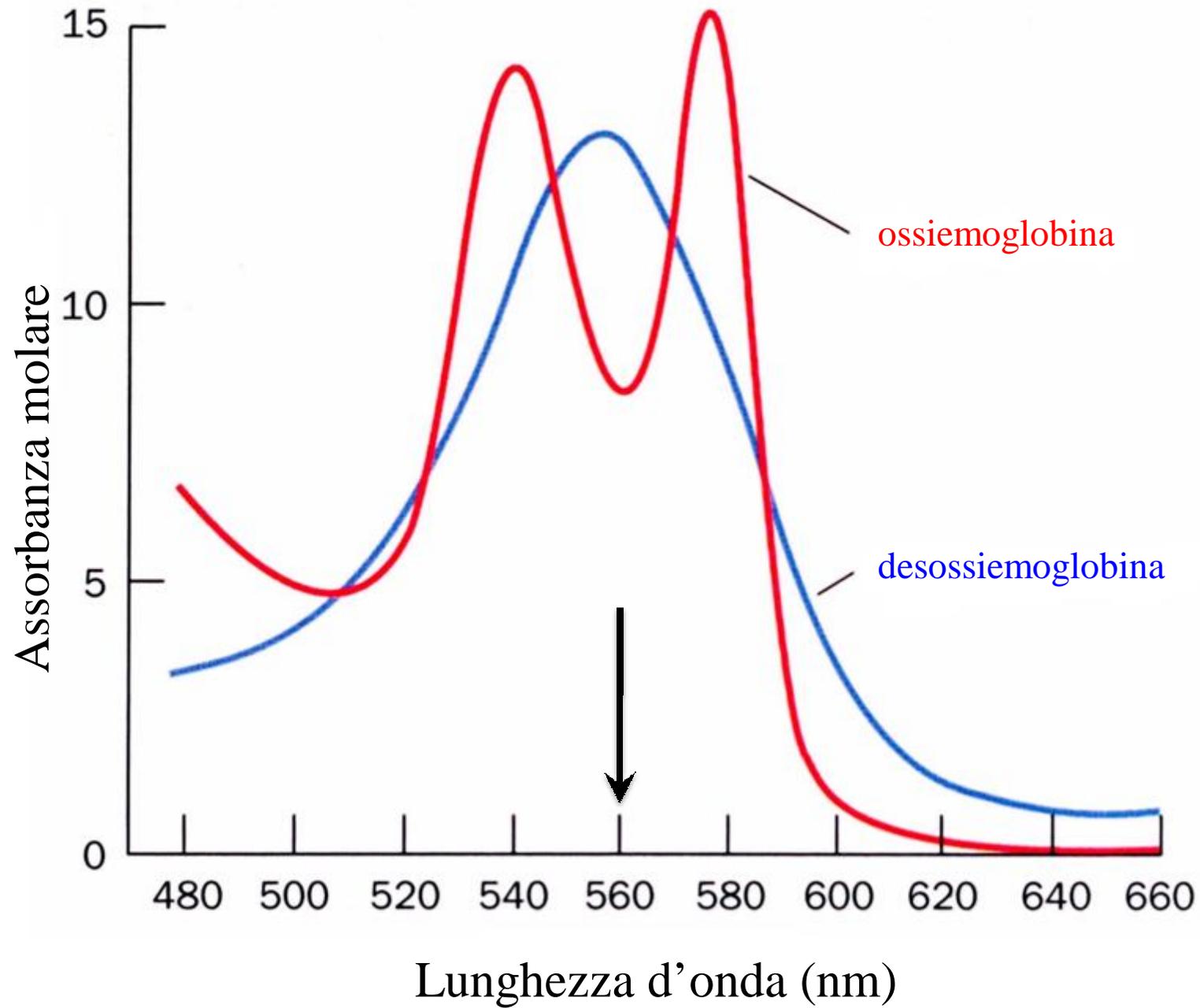
Lo spettrofotometro

$$T = \frac{I}{I_0} \quad A = -\log \frac{I}{I_0} = \epsilon c l$$

Legge di Lambert-Beer



Spettro di assorbimento dell'emoglobina



Misura della resistenza osmotica dei globuli rossi

Materiali:

- provetta contenente globuli rossi da sangue umano di donatore sano.
- soluzione fisiologica di NaCl allo 0.9% peso/volume = 0.154 M
- provette da centrifuga
- centrifuga
- fotometro

Procedura:

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

$$[\text{NaCl}] = 0.154 [1 + \alpha(v-1)] = 0.154 [1 + 1(2-1)] = 0.308 \text{ OsM}$$

Completate la tabella 1 utilizzando la legge delle diluizioni $C_1V_1 = C_2V_2$

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

	1	2	3	4	5
campione	volume di globuli rossi	volume di NaCl 0.3 OsM V_1	volume di H ₂ O	volume finale V_2	Concentrazione OsM finale
A	0.05 ml	1.95 ml	0 ml	2 ml	0.3
B	0.05 ml	1.33 ml	0.62 ml	2 ml	0.2
C	0.05 ml	ml	ml	2 ml	0.16
D	0.05 ml	ml	ml	2 ml	0.15
E	0.05 ml	ml	ml	2 ml	0.1
F	0.05 ml	ml	ml	2 ml	0

$$C_1 V_1 = C_2 V_2 \quad V_{\text{NaCl}} = V_1 = \frac{C_2}{C_1} V_2$$

$$V_2 = V_{\text{globuli}} + V_{\text{NaCl}} + V_{\text{H}_2\text{O}} \rightarrow V_{\text{H}_2\text{O}} = V_2 - V_{\text{globuli}} - V_1$$

Tabella 1 completata

	1	2	3		
campione	volume di globuli rossi	volume di NaCl 0.3 OsM V_1	volume di H_2O	volume finale V_2	concentrazione OsM finale
A	0.05 ml	1.95 ml	0 ml	2 ml	0.3
B	0.05 ml	1.33ml	0.62 ml	2 ml	0.2
C	0.05 ml	1.07 ml	0.88 ml	2 ml	0.16
D	0.05 ml	1.00 ml	0.95 ml	2 ml	0.15
E	0.05 ml	0.67 ml	1.28 ml	2 ml	0.1
F	0.05 ml	0 ml	1.95 ml	2 ml	0

- Riempire le provette da centrifuga con le quantità scritte nelle colonne 1, 2, 3.
- Centrifugare 1 minuto a 5000 rpm.
- Prelevare le provette e depositarle sul supporto
- Trasferire il supernatante in una cuvetta e misurarne l'assorbanza con il fotometro.

Tabella 2– Eseguire la lettura di assorbanza (OD) a 560 nm con il fotometro, scriverne i valori convertirli in % di lisi, con la seguente proporzione: $OD_F: 100\% = OD_x:x$

Durante l'esperimento abbiamo determinato i seguenti valori di assorbanza:

	[NaCl] (OsM) (ascisse)	OD a 560 nm	% lisi (ordinate)
A	0.3	0.037*	6.3
B	0.2	0.134	23.0
C	0.16	0.307	52.6
D	0.15	0.375	64.3
E	0.1	0.517	88.7
F	0	0.583	100

*La presenza di Hb nella soluzione isotonica è dovuto al fatto che il sangue è stato raccolto qualche giorno in precedenza all'esperimento. Le emazie non sono completamente stabili nel tempo.

Diagrammando i dati della tabella 2 si ottiene:

