آزمایش اسمز

هدف: تحقیق عملی پدیده اسمز (Osmosis) در سلول‌های زنده و مشاهده میکروسکوپی رفتار گلبول‌های قرمز خون انسان در مجاورت با محلول کلرور سدیم با غلظت‌های مختلف می‌باشد.

وسایل و مواد مورد نیاز:

۱- خون حاوی ماده ضدانعقاد
۲- سری لوله آزمایش
۳- پیپت ۱ ، ۲ ، ۵ و ۱۰ میلی لیتری
۴- محلول کلرید سدیم ۲درصد
۵- آب مقطر
۶- میکروسکوپ
۷- لام
۸- اوره

مقدمه: اسمز جریان خالص آب از عرض یک غشاء نیمه تراوا از ناحیه‌ای با غلظت بیشتر آب به ناحیه‌ای با غلظت کمتر آب است. چون غشاء سلول برای اکثر مواد محلول نسبتاً غیرقابل نفوذ، اما برای آب بسیار نفوذپذیر می‌باشد، هر زمان که غلظت بیشتری برای ماده محلول (نظیر کلرید سدیم) در یک طرف غشاء سلولی وجود داشته باشد، آب از عرض غشاء به همان طرف جریان می‌یابد تا هنگامی که غلظت ماده محلول در دو طرف غشاء برابر گردد. مثلاً اگر غلظت یک ماده محلول مثل کلرید سدیم در خارج سلول کاهش یابد، آب از خارج سلول به داخل سلول جریان می‌یابد.

ارتباط بین مول و اسمول:

چون غلظت آب یک محلول بستگی به تعداد ذرات ماده حل شده در محلول دارد. تعداد کل ذرات در یک محلول را بر حسب اسمول اندازه‌گیری می‌کنند. یک اسمول برابر با یک مول ($۶/۰۲۲\times۱۰^{۲۳}$) از ذرات ماده حل شده است. بنابراین یک محلول محتوی ۱ مول(یک مول عبارت است از گرم- وزن مولکولی ماده) گلوکز در هر لیتر دارای غلظت یک اسمل در لیتر 1 osm/L است. به همین ترتیب ماده‌ای که به ۲،۳ یا ۴ یون تجزیه گردد، به ترتیب ۱ مول آن برابر با ۲،۳ یا ۴ اسمول خواهد بود.

محاسبه اسمولاریته یک محلول: جهت محاسبه میزان ماده حل شونده بر حسب مول برای تهیه محلولی با اسمولاریته مشخص از فرمول زیر استفاده می‌کنیم:

$Osm=C\times n\times \Phi$

C=molar concentration

N= number of particles

Φ=Osmotic coefficient

Φ ضریب اسمزی یک فاکتور ضریب ثابت (ضریب تصحیح) است تا یون‌های مثبت و منفی موجود در محلول که به واسطه جاذبه یونی بین آنها کاملاً مستقل از هم عمل نمی‌کنند، از محاسبه حذف گردند. این ضریب برای مواد مختلف، متفاوت و معمولاً از یک کمتر است.

مثال: برای تهیه محلول ۲۹۰ میلی اسمول کلرور سدیم مقدار این ماده را به صورت ذیل محاسبه می شود

$Osm=C\times n\times \Phi$

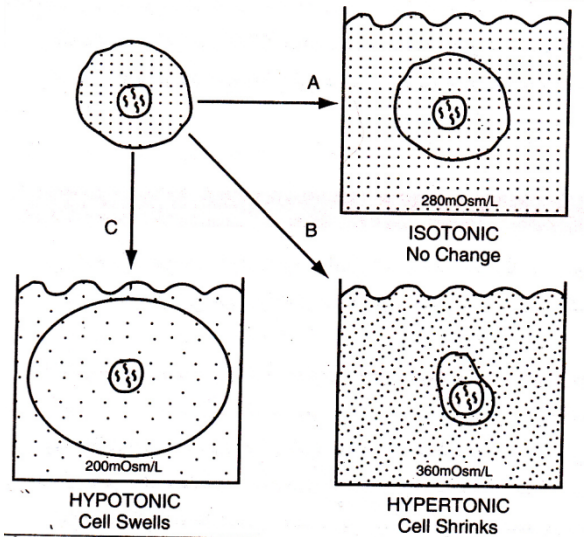
$0.290= C\times 2\times 0.93$

$C=2\times 0.93/0.29=0.155$ mol

با توجه به وزن مولکولی کلرور سدیم که(۲۳+۳۵/۵=۵۸/۵) است میزان کلرور سدیم بر حسب گرم برابر با ۹/۰۶۷ می‌باشد.

$C=0.155mole = 9.067$ gram

بنابراین چنانچه ۹گرم کلرور سدیم را در یک لیتر آب مقطر حل کنیم، محلول ۲۹۰میلی اسمول از کلرور سدیم درست کرده‌ایم که اسمولاریته‌ای برابر با مایعات داخل بدن دارد و به آن ایزواسمولار گفته می‌شود. طبق رابطه بالا مشخص است که محلول ۰/۹٪ کلرور سدیم(۰/۹ گرم کلرور سدیم در ۱۰۰سی سی آب مقطر) نیز ایزو اسمولار می-باشد.



مایعات ایزوتونیک، هیپوتونیک و هیپرتونیک

اگر سلول را در محلولی از ماده غیر نافذ با اسمولاریته‌ای برابر با مایعات داخل سلولی (۲۹۰ mosml/lit) رار دهیم، سلول‌ها نه چروکیده می‌شوند و نه متورم، زیرا غلظت آب در مایعات داخل و خارج سلول برابر است به چنین محلولی ایزوتونیک می‌گویند، زیرا نه باعث تورم سلول‌ها می‌شود نه سبب چروکیدگی آن‌ها. محلول ۰/۹درصد کلرید سدیم و محلول ۰/۵درصد گلوکز نمونه‌هایی از محلول ایزوتونیک هستند.

اگر سلول را در محلولی قرار دهیم که غلظت مواد غیر نافذ آن کمتر از ۲۹۰ mosm/lit باشد آب به درون سلول منتشر خواهد شد و سبب تورم آن می‌گردد. آب پیوسته به درون سلول منتشر می‌شود و همزمان با رقیق کردن مایع داخل سلولی، مایع خارج سلولی را غلیظ خواهد ساخت. این عمل تا زمانی ادامه می‌یابد که اسمولاریته دو محلول تقریباً برابر شود. محلول‌های کلرید سدیم با غلظت کمتر از ۰/۹ درصد هیپوتونیک هستند و سلول را متورم می‌سازند.

اگر سلول را در محلولی که حاوی غلظت بیشتر از مواد غیر نافذ است قرار دهیم، آب از سلول وارد مایع خارج سلولی خواهد شد و ضمن تغلیظ مایع داخل سلولی، مایع خارج سلولی را رقیق خواهد کرد. در این مورد سلول چروکیده خواهد شد تا اینکه غلظت دو طرف برابر شود. محلولی که سبب چروکیدگی سلول‌ها شود هیپرتونیک می‌گویند. محلول‌های کلرید سدیم با غلظت بیشتر از ۰/۹درصد هیپرتونیک هستند.

مایعات ایزواسموتیک، هیپراسموتیک و هیپواسموتیک.

اصطلاحات ایزوتونیک، هیپوتونیک و هیپرتونیک بر این مطلب دلالت می‌کنند که آیا محلول مورد نظر باعث تغییر حجم سلول خواهد شد یا نه. تونیسته محلول‌ها به غلظت مواد غیر نافذ آن‌ها بستگی دارد. اما برخی از مواد حل شدنی می‌توانند از غشای سلول عبور کنند. اگر اسمولاریته محلول با سلول یکی باشد، صرف نظر از اینکه مواد محلول آن می‌توانند از غشای سلول بگذرند یا نه، به آن ایزواسموتیک می‌گویند.

اصطلاحات هیپراسموتیک و هیپواسموتیک برای محلول‌هایی به کار می‌روند که به ترتیب اسمولاریته بیشتر یا کمتر نسبت به مایع طبیعی خارج سلولی دارند، صرف نظر از اینکه مواد حل شده می‌توانند از غشای سلول بگذرند یا نه.

شماره لوله	حجم محلول ۲درصد Nacl	حجم آب مقطر	غلظت نهایی محلول NaCl تهیه شده	اسمولاریته محلول	تونیسیته محلول	پیش‌بینی: لیز، ادم یا چروکیدگی سلولها/شفافیت-کدورت	نتیجه آزمایش بعد ازسانتریفیوژ: رسوب-عدم رسوب/رنگ محلول رویی
یک	0.25 ml	4.75 ml					
دو	1 ml	4 ml					
سه	2ml	3 ml					
چهار	2.25 ml	2.75 ml					
پنج	5 ml	0 ml					
شش	5 ml محلول مجهول						
هفت	5ml محلول اوره						

روش کار:

۱- در لوله‌های آزمایش ۵-۱ مطابق ستون‌های دوم و سوم جدول ضمیمه مقادیر تعیین شده محلول سدیم کلراید ۲٪ و آب بریزید.

۲- در لوله‌های آزمایش ۷-۶ به ترتیب محلول ایزواسموتیک اوره و یا محلول مجهول بریزید.

۳-یک قطره خون به‌کمک سمپلر بطور یکسان در همه لوله های آزمایش بچکانید و به آرامی با محلول کلرور سدیم مخلوط کنید.

۴- غلظت محلول کلرور سدیم حاصل در هر لوله آزمایش را محاسبه کرده و در ستون چهارم جدول یادداشت کنید . برای محاسبه غلظت نهایی محلول نمک طعام (NaCl) در هر یک از ۵ لوله آزمایش از فرمول زیر استفاده می کنیم

$C_1 \times V_1 = C_2 V_2$

V_1: حجم اولیه محلول نمک طعام **C_1**: غلظت اولیه محلول نمک طعام

V_2: حجم نهائی محلول نمک طعام **C_2**: غلظت نهائی محلول نمک طعام

۵- با اطلاعات داده شده در جدول بنظر شما در کدامیک از لوله های آزمایش همولیز کامل، همولیز نسبی و چروک شدن گلبولها (Shrinkage) خواهید دید و کدام لوله آزمایش احتمالاً تغییر محسوسی نخواهد داشت.

۶- لوله‌های آزمایش را با دقت نگاه کنید و مشاهدات قبلی خود را در مورد رنگ محلولها در جدول یادداشت کنید (شفافیت کامل – نیمه شفافی- تیرگی-کدر بودن و.....)

۷- لوله‌های آزمایش را در دستگاه سانتریفیوژ با ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۵دقیقه قرار داده و مشاهدات خود را از لحاظ میزان رسوب و رنگ مایع رویی یادداشت کنید.

آزمایش دوم: همولیز اسمزی یا شکنندگی گویچه های سرخ

وسایل و مواد مورد نیاز:

-محلول کلرور سدیم یک درصد

-آب مقطر

-خون سیتراته

-دستگاه سانتریفوژ

-تعداد ۱۵ عدد لوله آزمایش کوچک

روش کار:

۱-با استفاده از محلول کلرور سدیم ۱ درصد و آب مقطر یک سری محلول که حجم همگی آنها به ۱۰ میلی لیتر برسد با غلظت های مختلف به شرح زیر آماده نموده و در ۱۵ لوله آزمایش قرار دهید.

شماره لوله	مقدار گرم در صد	شماره لوله	مقدار گرم در صد
۱	۰/۳ درصد	۹	۰/۴۴ درصد
۲	۰/۳۲ درصد	۱۰	۰/۴۶ درصد
۳	۰/۳۳ درصد	۱۱	۰/۴۸ درصد
۴	۰/۳۴ درصد	۱۲	۰/۵۰ درصد
۵	۰/۳۵ درصد	۱۳	۰/۵۵ درصد
۶	۰/۳۸ درصد	۱۴	۰/۶۰ درصد
۷	۰/۴۰ درصد	۱۵	۰/۹۰ درصد
۸	۰/۴۲ درصد		

۲- به هریک از لوله‌ها ۲-۱ قطره خون اضافه کرده و آنها را به آرامی یکبار وارونه کنید تا محلول بخوبی مخلوط شود.
۳- سپس لوله ها را بمدت ۵ دقیقه در دستگاه سانتریفوژ با سرعت متوسط قرار دهید (۳۰۰۰ دور در دقیقه).
نتایج مشاهدات خود را یاداشت کنید.

در افراد طبیعی همولیز از غلظت ۴۵/ ۰درصد شروع و در غلظت ۰/۳۵درصد کامل می‌شود. لذا در غلظت ۰/۳۵ درصد حداکثر مقاومت گلبولی و در ۰/۴۵ درصد حداقل مقاومت گلبولی وجود دارد. در غلظت ۰/۴۰ تا ۰/۴۲ درصد نصف سلول‌ها لیز و نصف آنها ادم کرده‌اند.

شرایطی که باعث افزایش یا کاهش شکنندگی گلبول‌های قرمز می‌شوند، به ترتیب زیر است:

افزایش فراژیلیتی: افزایش فراژیلیتی گلبول‌های قرمز در شرایط زیر بوجود می‌آید:

۱ - **اسفروسیتوز ارثی:** این حالت یکی از متداول‌ترین آنمی همولیتیک است. نقص در پروتئین ساختمان RBC باعث کروی شدن، سختی و افزایش شکنندگی آن می‌شود. بعضی از آنها در طحال به دام افتاده و می‌شکنند، در حالی که عده‌ای دیگر در خون همولیز می‌شوند.

۲ - **آنمی همولیتیک خود ایمنی:** آنتی‌بادی‌های خودی به ساختمان‌های پروتئینی آسیب می‌رساند.

۳ - **مواد شیمیایی سمی، عفونت‌ها و بعضی داروها (آسپرین):** در بعضی اشخاص حساس، این عوامل شکنندگی RBCها را افزایش می‌دهند.

۴ - **کمبود گلوکز ۶-فسفات دهیدروژناز (G6PD):** این آنزیم برای اکسیداسیون گلوکز از راه هگزوزمنوفسفات که NADPH تولید می‌کند لازم است. شکنندگی نرمال RBCها مقداری به NADPH وابسته است. کمبود G6PD متداول‌ترین آنومالی کمبود آنزیمی در انسان است تمایل گلبول‌های قرمز به همولیز را در اثر داروهای ضد مالاریایی و عوامل دیگر افزایش می‌دهد.

۵ - **لسیتیناز:** سم مار کبری و بعضی حشرات دارای لسیتیناز است. این آنزیم لسیتین غشاء RBCها را حل کرده و شکنندگی آنها را افزایش می‌دهد.

کاهش فراژیلیتی: کاهش فراژیلیتی در یرقان انسدادی و در بعضی آنمی‌ها دیده می‌شود. افزایش اندازه RBC در آنمی پرنیسیوز شکنندگی اسموتیکی آنها را نسبت به RBCهای نرمال کاهش می‌دهد.

نکات ایمنی جهت آزمایش اسمز :

هنگام اضافه کردن خون به لوله ها از دستکش استفاده نمائید.

نوک سمپلر های آلوده ، پارافیلم و همچنین گازهای آغشته به نمونه خون را در سطلهای مربوط به نمونه های عفونی دفع نمائید.

توجه داشته باشید که برای پر کردن پیپت هرگز از مکش به وسیله ی دهان خود استفاده نکنید زیرا بخارات برخی مایعات سمی بوده و یا ممکن است مایع درون پیپت وارد دهان شما شود. برای پر کردن پیپت از پیپت پر کن (پو آر پیپت) استفاده کنید.

هنگام برداشتن مواد شیمیایی یا خون با میکروپی پت مراقب باشید تنها تیپ با آنها تماس یابد و خود میکروپیپت آلوده نشود.

در صورت آلوده شدن میکروپیپت به خون، فراورده های خونی یا سوسپانسیون میکروبی، اگر میکروپیپت قابل اتوکلاو کردن است از این روش استفاده کنید .درغیر اینصورت قسمت آلوده را با دقت از میکروپیپت جدا کرده و به مدت یکساعت در ساولن ۱۰٪ و پس از شستشو با آب به مدت ۱۰ دقیقه در الکل ۷۰٪ قرار دهید. در نهایت وسیله را با مقادیر فراوانی آب شستشو داده و در هواخشک کنید.

پرسش:

۱- عمل همولیز در کدامیک از محلول‌ها شروع شده بود و دلیل آن چیست؟

۲- در کدامیک از محلول‌ها همولیز کامل انجام گرفت.

۳- به چه علت همه گلبولهای سرخ در یک غلظت خاصی از محلول همولیز نمی‌شوند؟