



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

---

## **BIO 323. BIOFIZIKA**

Laboratorinis darbas

### **OSMOSAS: ERITROCITŲ OSMOSINIO ATSPARUMO TYRIMAS**

#### **DARBO TIKSLAS:**

Susipažinti su osmosinio slėgio prigimtimi ir jo vaidmeniu biologinėse sistemose.

#### **DARBO UŽDUOTYS:**

1. Apskaičiuoti įvairių koncentracijų NaCl tirpalų osmosinį slėgį;
2. Išmatuoti eritrocitų hemolizės laipsnio priklausomybę nuo tirpalo osmosinio slėgio;
3. Rasti kokias NaCl koncentracijas esant hemolizuoja 50% eritrocitų;
4. Nustatyti kokiam osmosiniam slėgiui esant hemolizuoja daugiausia eritrocitų.

## TEORIJA:

### Osmosas

**Difuzija** tai savaiminis pasyvus energijos panaudojimo nereikalaujantis molekulių judėjimas iš didesnės koncentracijos tirpalo į mažesnės koncentracijos tirpalą. Plazminė ląstelių membrana yra puslaidė membrana. Ji leidžia prasiskverbti kai kurioms molekulėms.

Vandens molekulių difuzija pro atrankiai laidžią membraną vadinama **osmosu** (gr. *osmos* – spaudimas, slėgimas). Tirpalo vanduo (tirpiklis) pro jam laidžią membraną juda į tą pusę, kur daugiau ištirpusių medžiagų (tirpinio) ir mažiau vandens. Toje membranos pusėje, kurioje didesnė ištirpusios medžiagos koncentracija, susidaro didesnis osmosinis slėgis.

**Osmosinis slėgis** - tai yra slėgis, kurį turėtų tirpalas, atskirtas nuo vandens pusiau pralaidžia membrana. Pakankamai praskiestuose tirpaluose ištirpusios medžiagos molekulės elgiasi panašiai kaip praretintose dujose. Osmosinis slėgis  $P$  yra lygus tų molekulių praretintų dujų slėgiui.

Tirpalo osmosinį slėgį galima apskaičiuoti pagal van't Hoff-o lygtį:

$$\Pi = icRT \quad (1)$$

Čia  $i$  yra ištirpusios medžiagos disociacijos laipsnis (NaCl atveju  $i \approx 2$ ),  $c$  - koncentracija ( $\text{mol l}^{-1}$ ),  $R$  - universali dujų konstanta ( $0,0821 \text{ atm l K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$ ), o  $T$  - absoliutinė temperatūra.

#### Toniškumas.

**Toniškumas** atspindi dviejų tirpalų osmosinių slėgių skirtumą. Ląstelės gali patekti į tirpalą, kuriame ištirpusių medžiagų koncentracija gali būti tokia pati, didesnė arba mažesnė negu jose. Pagal tai tirpalai skirstomi į izotoninius (izoosmosinius), hipertoninius (hiperosmosinius) ir hipotoninius (hipoosmosinius).

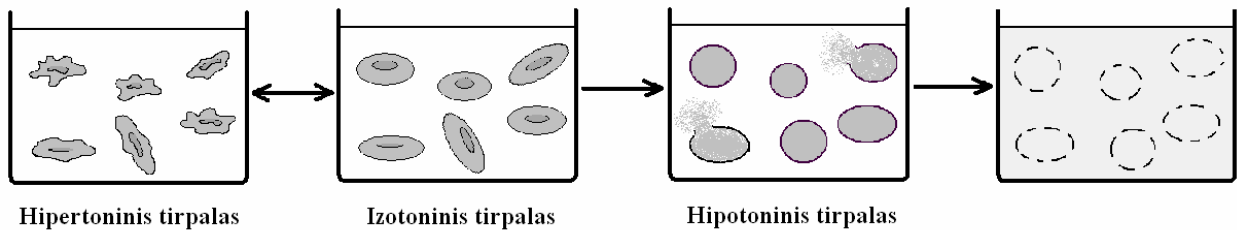
**Izotoniniu** (gr. *isos* - lygus, vienodas; *tonos* – įtempimas, spaudimas) tirpalu vadinamas toks tirpalas, kuriame yra tokia pati ištirpusių medžiagų (tirpinio) koncentracija kaip ir jame esančių ląstelių viduje. Todėl abiejose membranos pusėse osmosiniai slėgiai, kuriuos kuria ištirpusios molekulės bei jonai, yra tokie patys. Tokiame tirpale per šių ląstelių membraną vandens molekulių praeina tiek pat tiek iš ląstelės į tirpalą, tiek iš tirpalo į ląstelę. Ląstelių tūris tokiame tirpale nesikeičia. 0,9% (154 mM) NaCl tirpalas eritrocitams yra izotoninis. Tokiame tirpale jie nei išpampsta, nei susitraukia.

**Hipertoniniu** (gr. *hyper* – pirmoji sudurtinių žodžių dalis, rodanti normos viršijimą, buvimą daugiau negu norma) tirpalu vadinamas toks tirpalas, kuriame ištirpusių medžiagų (tirpinio) koncentracija yra didesnė, negu jame esančių ląstelių viduje. Ląstelę palaikius tokiame tirpale, praranda vandenį, nes, dėl osmoso, daugiau vandens išeina iš ląstelės, negu į ją patenka.

Ląstelė raukšlėjasi ir traukiasi. Augalo ląsteles patalpinus į hipertoniinį tirpalą, didelė centrinė vakuolė netenka vandens ir plazminė membrana gali net atsitraukti nuo ląstelės sienelės. Reiškiny, kai dėl osmoso susitraukia ląstelės citoplazma, vadinamas *plazmolize*.

**Hipotoniniu** (gr. *hypo* – priešdėlis parodantis, kad kažko yra mažiau negu norma) tirpalu vadinamas toks tirpalas, kuriame ištirpusių medžiagų (tirpinio) koncentracija yra mažesnė, negu ląstelių viduje. Ląstelę palaikius hipotoniniame tirpale, į ląstelę patenka daugiau vandens molekulių, negu iš jos išeina. Dėl to jos tūris padidėja, ji išpampsta. Hipotoniniame tirpale ląstelė gali net sprogti – tuomet sakoma, kad įvyko ląstelių lizė. Eritrocitų lizė vadinama *hemolize*. Mažesnės nei 0,9% NaCl tirpalai yra hipotoniniai eritrocitams. Tokiuose tirpaluose į eritrocitus priteka vandens, jie išsipučia. Jei jų tūris viršija 140-160% pradinio tūrio, membrana plyšta ir eritrocitai susprogsta - hemolizuoja.

Įprasto vandens ir druskų santykio palaikymas organizmo skysčiuose vadinamas *osmoreguliacija*.



1 pav. Ląstelės elgesys įvairaus toniškumo tirpaluose.

### **DARBO PRIEMONĖS:**

1. Spektrofotometras Pye-Unicam SP600;
2. Laboratorinė centrifūga;
3. Stiklinėlės
4. Stiklinės pipetės 0, 2, 5, 10 ml
5. Matavimo kolbos.

### **MEDŽIAGOS, REAGENTAI, TIRPALAI:**

1. Distiliuotasis vanduo;
2. 0,9% NaCl tirpalas;
3. Žmogaus kraujas.

### **DARBO EIGA:**

1. Įjungiamo spektrofotometrą ir leidžiame jam šilti.
2. Atskiriame eritrocitus nuo kraujo plazmos ir kitų forminių elementų. Tam:
  - a. nusodiname eritrocitus centrifuguodami kraują 10 minučių, esant 1000 aps/min sukimosi dažniui;
  - b. su pipete atsargiai nusiurbiamo kraujo plazmą;
  - c. eritrocitus skiedžiame 3-4 tūriais 0,9% NaCl tirpalo, nusodiname centrifuguodami 10 minučių, esant 1000 aps/min sukimosi dažniui ir nusiurbiamo supernatantą;
  - d. plovimo procedūrą pakartojame 2 kartus, paskutinįjį kartą eritrocitus nusodindami esant 1500 aps/min sukimosi dažniui.
3. Paruošiame dviejų skirtingų žmonių eritrocitų suspensijas, 0,4 ml nuplautų eritrocitų skiesdami su 50 ml 0,9% NaCl tirpalo.
4. Paruošiame šių koncentracijų NaCl tirpalus: 0,1, 0,35, 0,4, 0,45, 0,5, 0,55, 0,6, 0,65, 0,7 ir 0,9%.
5. Apskaičiuojame kiekvieno tirpalo osmosinį slėgį (atm) pagal van't Hoff-o lygtį (1). Gautus rezultatus surašome į lentelę 1.

Lentelė 1. Eritrocitų osmosinio atsparumo nustatymas.

NaCl koncentracija, %	0.1	0.35	0.4	0.45	0.5	0.55	0.6	0.65	0.7	0.9
Osmosinis slėgis, atm										
<i>Pirmas mėginys</i>										
Optinis tankis, $D$										
Hemolizė, %	100									
Hemolizavusių ląstelių dalis, %										
<i>Antras mėginys</i>										
Optinis tankis, $D$										
Hemolizė, %	100									
Hemolizavusių ląstelių dalis, %										

6. Į centrifuginius mėgintuvėlius įpilame po 10 ml paruoštų koncentracijų tirpalų (po 2 mėgintuvėlius kiekvienai koncentracijai). Tada į 10 mėgintuvėlių su skirtingų koncentracijų tirpalais pridedame po 0,2 ml pirmo žmogaus eritrocitų suspensijos. Į kitus 10 mėgintuvėlių - po 0.2 ml kito žmogaus eritrocitų suspensijos.

7. Palaukiame 15 minučių, kad eritrocitai hemolizuotųsi. Tada nusodiname eritrocitus centrifuguodami 15 minučių, esant 1500 aps/min. sukimosi dažniui.

8. Randame eritrocitų hemolizės laipsnio priklausomybę nuo tirpalo koncentracijos (osmosinio slėgio). Tam spektrofotometru UNICAM SP600 išmatuojame supernatantų optinius tankius 413 nm šviesos bangos ilgiui. Optinio tankio nulį nustatome supernatantui nuo 0,9% NaCl tirpalo. Duomenis surašome į lentelę 1.

10. Kiekvienai koncentracijai apskaičiuojame hemolizuotų eritrocitų dalį pagal formulę:

$$F_{hem} = \frac{D(c_x) - D(c_{0,9\%})}{D(c_{0,1\%}) - D(c_{0,9\%})} 100\%$$

kur  $D(c_{0,1\%})$ ,  $D(c_{0,9\%})$  ir  $D(c_x)$  yra optiniai tankiai supernatantams nuo tirpalų su NaCl koncentracijomis 0,1%, 0,9% ir  $c_x$ . Duomenis taip pat surašome į lentelę 1.

11. Gautą priklausomybę pavaizduojame grafiškai abscisių ašyje atidėdami NaCl koncentraciją (%), o ordinačių ašyje - hemolizės laipsnį.

12. Randame, kokiai NaCl koncentracijai esant hemolizuojasi 50% eritrocitų.

13. Grafiškai pavaizduojame prie tam tikros NaCl koncentracijos hemolizavusių ląstelių kiekio priklausomybę nuo tirpalo osmosinio slėgio.

14. Randame, kokiam osmosiniam slėgiui esant hemolizuoja daugiausiai eritrocitų.

15. Parašome išvadas.

### **KONTROLINIAI KLAUSIMAI:**

1. Osmosinio slėgio prigimtis.
2. Kaip osmosinis slėgis priklauso nuo ištirpusių medžiagų koncentracijos (van't Hoff'o dėsnis).
3. Osmosinio slėgio vaidmuo biologinėse sistemose.

### **LITERATŪRA:**

- 1) G. Saulis, „Biofizikos paskaitų konspektas“, Kaunas, 2005.
- 2) R. Glazer, Biophysics. – Berlin: Springer Verlag, 2001. - 361 p.
- 3) Hope W., Lohmann W., Markl H., Ziegler H. (Eds.) Biophysics. Berlin: Springer-Verlag, 1983.