

Ćwiczenie nr 3

dr Bożena Kuran

Bufory

Repetitorium

1. Woda i przestrzenie wodne. Różnice w składzie jonowym płynów ustrojowych.
2. Osmoza i ciśnienie osmotyczne.
3. Bufory, pojemność buforowa, obliczanie pH i pojemności buforowej.
4. Homeostaza.
5. Zaburzenia równowagi kwasowo - zasadowej.

Repetitorium

1. Woda i przestrzenie wodne. Różnica w składzie jonowym płynów ustrojowych

Woda jako składnik ustrojowy zajmuje ilościowo pierwsze miejsce, całkowita jej ilość w organizmie wynosi w przybliżeniu ok. 45-65 % masy ciała i zmienia się wraz z wiekiem. Ogromne znaczenie wody dla organizmów żywych przejawia się m.in. w tym, że stanowi środowisko, w którym przebiega większość niezbędnych dla życia reakcji chemicznych oraz transportuje cząsteczki do miejsca, gdzie te reakcje mogą zachodzić.

Większość wody zawartej w ustroju stanowi rozpuszczalnik dla nieorganicznych i organicznych cząsteczek i jonów, a razem z białkami, tłuszczami i węglowodanami tworzy układy koloidalne właściwe strukturze komórkowej, a niezbędne dla prawidłowego przebiegu zjawisk biologicznych. Tylko dzięki odpowiedniej zawartości wody w komórkach możliwe jest zachowanie prawidłowych struktur cząsteczkowych i właściwości biochemicznych białek i kwasów nukleinowych,

jonizacja związków organicznych itp. Dlatego też utrata niewielkiej ilości wody ok. 5 % prowadzi do zaburzeń w funkcji organizmu, utrata natomiast ok. 20 % nawet do jego śmierci.

Cały zasób wody ustrojowej i rozpuszczonych w niej jonów nieorganicznych jest rozdzielony między trzy obszary:

Płyn wewnątrzkomórkowy (śródkomórkowy) (ICF – intracellular fluid) obejmuje 2/3 całkowitej ilości wody. Stanowi środowisko dla wytwarzania, magazynowania i wykorzystania energii, procesów samonaprawczych, replikacji i wykonywania określonych funkcji komórki.

Płyn zewnątrzkomórkowy (pozakomórkowy) (ECF – extracellular fluid) zawiera 1/3 wody ustrojowej. Rozdzielony jest między osocze krwi i płyn śródmiąższowy. Ten płyn jest układem dostawczym. Tą drogą dostarczane są do komórek składniki odżywcze (np. glukoza, kwasy tłuszczowe, aminokwasy, tlen, jony, hormony). Płyn pozakomórkowy usuwa dwutlenek węgla, substancje odpadowe, składniki toksyczne ze środowiska komórek.

Trzecia przestrzeń obejmująca np. soki trawienne, mocz w pęcherzu moczowym, płyn w jamie opłucnej i otrzewnej itd.

Stały stosunek kationów K^+ , Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} zapewnia stan równowagi jonowej niezbędny dla prawidłowych funkcji organizmu. Wszelkie zmiany w równowadze jonowej prowadzą do zaburzeń w procesach fizjologicznych różnych narządów, a w szczególności układu nerwowego.

2. Osmoza i ciśnienie osmotyczne

Osmoza to zjawisko polegające na samorzutnym przechodzeniu cząsteczek rozpuszczalnika przez błonę półprzepuszczalną, oddzielającą rozpuszczalnik od roztworu. Błonami półprzepuszczalnymi są błony komórkowe, nieprzepuszczalne dla substancji wielokocząsteczkowych obecnych w płynie komórkowym, ale przepuszczalne dla cząsteczek wody.

W organizmie żywym procesy osmozy warunkują prawidłowy poziom jonów w określonych przestrzeniach. Między innymi osmoza i towarzyszące temu zjawisku ciśnienie osmotyczne, są odpowiedzialne za stałość środowiska wewnętrznego, warunkującą prawidłowe funkcjonowanie komórek, narządów i całego organizmu. Ciśnienie osmotyczne jest wartością ciśnienia wywieranego na półprzepuszczalną membranę przez dwie cieczki, które ona rozdziela. Przyczyną jego pojawienia się jest różnica stężeń związków chemicznych lub jonów po obu stronach błony i dążenie układu do ich wyrównania. Ciśnienie to zależy od stężenia substancji, temperatury i rodzaju substancji, a w szczególności czy rozpatrywana substancja jest elektrolitem czy nie.

Ciśnienie osmotyczne wyraża wzór van't Hoffa:

$$\Pi = T R i c$$

Π - ciśnienie osmotyczne [atm]

c - stężenie molowe [mol/dm³]

R - stała gazowa [0.083 dm³ · atm/mol · K]

T - temperatura [K]

i - współczynnik van't Hoffa, dla elektrolitów równy liczbowo ilości jonów na jakie dany elektrolit dysocjuje, a dla nieelektrolitów zawsze równy jedności.

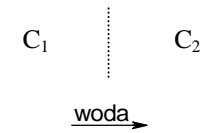
Rodzaje roztworów:

Roztwór hipertoniczny to roztwór o wyższym ciśnieniu osmotycznym niż roztwór po drugiej stronie błony.

Roztwór o niższym ciśnieniu osmotycznym od roztworu porównywanego nazywany jest roztworem hipotonicznym.

Roztwory o jednakowym ciśnieniu osmotycznym nazywa się izotonicznymi.

Kierunek przepływu wody przez błonę półprzepuszczalną odbywa się zgodnie ze schematem:



$C_1 < C_2$, po obu stronach błony znajduje się ta sama substancja, $T = \text{const}$

Woda zawsze przepływa w kierunku roztworu hipertonicznego. Jest to tzw. transport bierny gdyż odbywa się zgodnie z gradientem stężeń, czyli z przestrzeni o niższym stężeniu osmotycznym do przestrzeni o wyższym stężeniu. Z tego względu woda przenika swobodnie przez większość błon komórkowych.

3. Bufory, pojemność buforowa, obliczanie pH i pojemności buforowej. Wpływ rozcieńczenia na pojemność buforową.

Roztwory buforowe

Roztwory buforowe są to związki posiadające zdolność buforowania, czyli przeciwstawiania się gwałtownym zmianom pH po dodaniu do nich niewielkich ilości mocnego kwasu lub mocnej zasady.

Podział roztworów buforowych:

- słaby kwas i jego sól z mocną zasadą (CH₃COOH/CH₃COONa – bufor octanowy)
- słaba zasada i jej sól z mocnym kwasem (NH₄OH/NH₄Cl – bufor amonowy)
- dwie sole kwasu wielozasadowego o różnej zawartości atomów wodoru (KH₂PO₄/K₂HPO₄ – bufor fosforanowy)

Utrzymanie stałej wartości pH jest bardzo ważne dla fizjologii każdego organizmu. Odczyn środowiska jest czynnikiem decydującym o aktywności enzymów i przebiegu reakcji enzymatycznych, co ma wpływ na prawidłowy przebieg metabolizmu żywej

komórki. W komórkach znajduje się wiele substancji (sole mineralne, rozpuszczalne białka, kwasy organiczne i inne), które tworzą układy buforujące.

pH buforów określa wzór Hendersona – Hasselbacha:

$$pH = pK_k + \log \frac{c_s}{c_{kw}}$$

gdzie:

$pK_k = -\log K_k$, K_k – stała dysocjacji słabego kwasu

c_s – stężenie soli

c_{kw} – stężenie kwasu

Wyrażenia na pH wybranych buforów:

bufor węglanowy

$$pH = pK_{H_2CO_3} + \log \frac{[HCO_3^-]}{[H_2CO_3]}$$

bufor fosforanowy

$$pH = pK_{H_2PO_4^-} + \log \frac{[HPO_4^{2-}]}{[H_2PO_4^-]}$$

bufor amonowy

$$pOH = pK_z + \log \frac{[NH_4Cl]}{[NH_3 \cdot H_2O]}$$

$$pH = 14 - pOH$$

gdzie:

$pK_z = -\log K_z$, K_z – stała dysocjacji zasadowej amoniaku

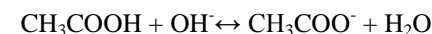
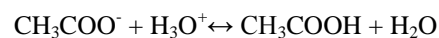
albo:

$$pH = 14 - pK_z + \log \frac{[NH_3 \cdot H_2O]}{[NH_4Cl]}$$

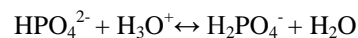
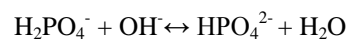
Podane powyżej wzory stosuje się tylko dla roztworów rozcieńczonych.

Mechanizm działania buforów

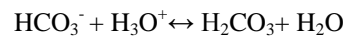
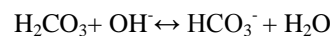
bufor octanowy:



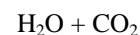
bufor fosforanowy:



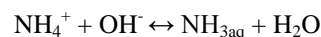
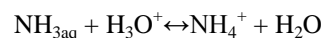
bufor węglanowy:



↓



bufor amonowy:



Pojemność buforowa

Właściwość utrzymania określonej wartości pH przez roztwór buforowy po wprowadzeniu z zewnątrz jonów H^+ i OH^- jest ograniczona. Po wprowadzeniu nadmiaru tych jonów mogą zostać całkowicie wyczerpane wiążące je składniki buforu i wówczas następuje wyraźna zmiana pH. Roztwór ulega alkalizacji lub zakwaszeniu w zależności od tego jakie jony zostały wprowadzone.

Stabilizujące pH działanie roztworu buforowego, zależy od jego pojemności buforowej, którą określa się jako zdolność wiązania jonów H^+ i OH^- (pochodzących od mocnych kwasów i zasad).

Miarą pojemności buforowej jest stosunek liczby dodanych moli jonów wodorowych lub hydroksylowych do zmiany pH, jaka ten dodatek wywołał, w przeliczeniu na 1 dm^3 buforu

$$A = \frac{\Delta n}{\Delta pH}$$

gdzie:

A – pojemność buforowa

Δn – liczba moli dodanego mocnego kwasu lub mocnej zasady do 1 dm^3 roztworu buforowego

ΔpH – zmiana pH

HOMEOSTAZA

Homeostaza jest to stan dynamicznej równowagi czynnościowej organizmu, której zachwianie prowadzi do choroby lub śmierci. Równowaga kwasowo-zasadowa gwarantuje, że w organizmie utrzymywane są stałe stężenia jonów wodorowych w przestrzeniach wodnych. W warunkach fizjologicznych stężenie kationów H^+ w przestrzeniach wodnych ustroju jest bardzo niskie w porównaniu z innymi jonami. W płynie wewnątrzkomórkowym stężenie jonów wodorowych wynosi około 100 nmol/l czemu odpowiada wartość pH około 7. W komórkach o zredukowanym metabolizmie stężenie kationów wodorowych jest niższe i wynosi około 65 nmol/l . W płynie pozakomórkowym stężenie jonów wodorowych utrzymywane jest w granicach od 35 do 45 nmol/l któremu odpowiada wartość pH od 7,35-7,45. W warunkach fizjologicznych pH ulega tylko nieznacznym zmianom, które są szybko wyrównywane dzięki sprawnie działającym mechanizmom regulującym.

Stołość środowiska wewnętrznego czyli homeostazę zapewniają trzy czynniki:

- układy buforowe krwi i tkanek
- układ oddechowy
- czynność nerek

W różnych stanach chorobowych obserwowany zakres zmian stężeń jonów wodorowych we krwi mieści się w granicach od 160 do 20 nmol/l , czemu odpowiadają wartości pH w zakresie 6,8 – 7,7. Stan, w którym równowaga kwasowo-zasadowa ma tendencję do przesunięcia się w stan wartości pH niższych od normalnego, nazywa się kwasicą (acidosis), a stan w którym istnieje tendencja przeciwna, określa się jako zasadowicę (alcalosis).

Kwasica:

- metaboliczna – wzrost stężenia jonów wodorowych pochodzących np. z nadmiernej produkcji kwasów organicznych lub ze zmniejszenia zdolności nerek do ich wydalania lub spadek stężenia jonów wodorowęglanowych (utrata przez przewód pokarmowy lub nerki)
- oddechowa – wzrasta ciśnienie parcjalne CO_2 w pęcherzykach ze względu na zmniejszoną zdolność płuc do jego usuwania spowodowaną np. uszkodzeniem nerwowej regulacji oddychania w OUN, chorobami płuc, zmianami w opłucnej itd.

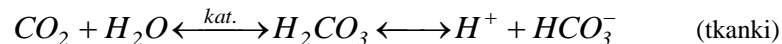
Zasadowica:

- metaboliczna – wzrost stężenia jonów HCO_3^- lub spadek stężenia jonów wodorowych na skutek np. nadmiernej podaży związków alkalicznych – przedawkowanie leków alkalizujących w chorobie wrzodowej
- oddechowa – wskutek hiperwentylacji spada zawartość CO_2 we krwi, rośnie pH; sytuacje stresowe, czynniki drażniące ośrodek oddechowy, zmiany zwyrodnieniowe w OUN

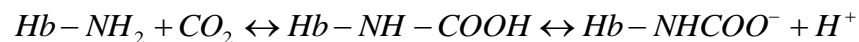
Podstawowymi roztworami buforowymi organizmu człowieka są: bufor wodorowęglanowy, bufor hemoglobinowy, bufor fosforanowy i bufory białczanowe. Większość uwalnianych jonów H^+ w płynach ustrojowych jest natychmiast przyłączana przez składniki anionowe buforów białczanowych i fosforanowych w przestrzeni wewnątrzkomórkowej, natomiast w przestrzeni pozakomórkowej głównie przez HCO_3^- buforu wodorowęglanowego.

Bufor wodorowęglanowy $H_2CO_3/NaHCO_3$

Bufor wodorowęglanowy jest najważniejszym elementem równowagi kwasowo-zasadowej. Z całej puli dwutlenku węgla powstającego w organizmie około 75 % wchodzi w reakcje z wodą (reakcję katalizowaną przez anhidrazę węglanową), której produktami są jony H^+ i HCO_3^- .



Okolo 15 % dwutlenku węgla tworzy połączenia karbaminianowe z wolnymi grupami α -aminowymi N-terminalnych reszt waliny łańcuchów polipeptydowych, szczególnie hemoglobiny.



Jedynie 5 % dwutlenku węgla jest transportowane w postaci gazu fizycznie rozpuszczonego w wodzie przestrzeni wewnątrznaczyniowej.

Bufor wodorowęglanowy działa w organizmie w układzie otwartym, bezwodnik kwasu węglowego CO_2 jest usuwany przez płuca. W ten sposób kontrolowane jest stężenie kwasu. Natomiast poziom drugiego składnika kontrolowany jest działaniem nerek (poprzez resorpcję i regenerację HCO_3^-).

Bufor hemoglobinianowy $KHbO_2/HHb$

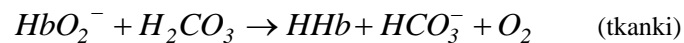
Bufor hemoglobinianowy współdziała z buforem wodorowęglanowym w regulacji równowagi kwasowo-zasadowej. Hemoglobina zawiera aż 38 reszt histydynowych, których pierścienie imidazolowe biorą bezpośredni udział w wiązaniu i uwalnianiu jonów H^+ . Bogactwo w reszty histydynowe hemoglobiny sprawia, że ma ona sześciokrotnie większy udział w buforowaniu płynu pozakomórkowego niż białka osocza. Oksyhemoglobina jest mocniejszym kwasem ($pK=6,81$) niż deoksyhemoglobina ($pK=8,03$). Działanie hemoglobiny jako buforu jest zatem uzależnione od jej funkcji jako transportera tlenu.

Hemoglobina jest chromoproteidem zawierającym HEM i GLOBINĘ. Hem tworzy pierścień porfirynowy złożony z czterech pierścieni pirolowych połączonych mostkami metinowymi. W centrum znajduje się dwuwartościowy jon żelaza umożliwiający wiązanie tlenu. Globinę tworzą dwa łańcuchy polipeptydowe α i dwa łańcuchy polipeptydowe β . Każdy z nich łączy się z jedną cząsteczką hemu.

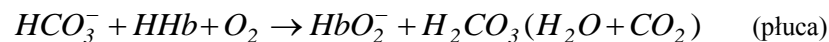
Procentowe nasycenie hemoglobiny tlenem jest zależne od pO_2 w osoczu. Przy ciśnieniu tlenu powyżej 60 mmHg nawet znaczne zmiany ciśnienia wywołują tylko małe różnice w nasyceniu tlenem hemoglobiny, co sprzyja prawie maksymalnemu pobieraniu tlenu w płucach. Jednak przy ciśnieniu parcjalnym niższym niż 60 mmHg zdolność wiązania tlenu gwałtownie spada. Sprzyja to uwalnianiu tlenu na obwodzie, natomiast utrudnia lub uniemożliwia pobieranie O_2 w płucach z powietrza o niskim pO_2 . Powstały w tkankach CO_2 dyfunduje do krwi, w erytrocytach powstaje z niego H_2CO_3 , który dysocjuje na jon H^+ i HCO_3^- .

Zakwaszenie powoduje zmniejszenie powinowactwa hemoglobiny do tlenu w tkankach czego konsekwencją jest oddawanie tlenu tkankom, a wiązanie przez hemoglobinę jonów H^+ , które transportuje do płuc. Ten mechanizm wyrównania stężenia jonów H^+ w erytrocytach nazywa się efektem Bohra. Jon HCO_3^- dyfunduje do osocza na wymianę z jonem Cl^- , stanowiąc stałe źródło uzupełniające poziom podstawowej zasady buforującej krwi. W naczyniach włosnaczkowych płuc reakcje przebiegają w kierunku przeciwnym niż w innych tkankach. Z hemoglobiny powstaje

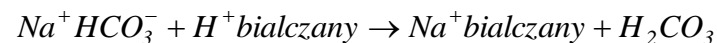
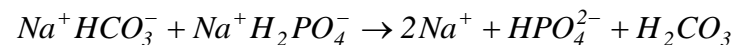
oksyhemoglobina, mocniejszy kwas od którego oddysocjowują jony H^+ . Uwolniony jest także CO_2 z połączeń karbaminianowych. Aniony HCO_3^- przechodzą z osocza do erytrocytów na wymianę z jonami Cl^- . Powstały H_2CO_3 jest rozkładany przy udziale anhidrazy węglanowej do CO_2 i H_2O . Dwutlenek węgla dyfunduje do powietrza pęcherzykowego. Stężenie anionów HCO_3^- maleje. Działanie układu hemoglobinianowego sprowadza się więc do wiązania jonów H^+ powstających w wyniku dysocjacji kwasu węglowego:



oraz uwalniania CO_2

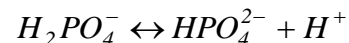


Zachodzą również reakcje pomiędzy układami buforowymi, które dostarczają jonów H^+ i powodują dalsze (20-25 %) obniżenie poziomu anionów HCO_3^- :



Bufor fosforanowy $H_2PO_4^-/HPO_4^{2-}$.

Bufor fosforanowy jest buforem przestrzeni wewnątrzkomórkowej, stanowi około 6 % pojemności buforowej krwi. Dla buforu fosforanowego w zakresie pH około 7 ważna jest stała równowagi następującej reakcji:



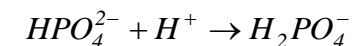
W buforze fosforanowym krwi, którego pH = 7,4 stosunek stężeń fosforanu II-rzędowego do fosforanu I-rzędowego wynosi 4:1.



Fosforany obecne w moczu pierwotnym warunkują wydalanie jonów H^+ oraz powstawanie wodorowęglanów w nerkach. Bufor fosforanowy jest najważniejszym pod względem ilościowym buforem moczu, biorącym udział w wytwarzaniu kwaśności miareczkowej (kwaśność miareczkowa określa wydalanie jonu H^+ , wydalanego przez nerki w postaci NaH_2PO_4). W buforze fosforanowym moczu (pH około 6) stosunek stężeń fosforanu II-rzędowego do fosforanu I-rzędowego wynosi 1:4.



Zmiana stosunku fosforanów w buforze fosforanowym moczu w porównaniu z ich stosunkiem w buforze krwi wynika ze zmiany fosforanu II-rzędowego w fosforan I-rzędowy na skutek wiązania jonów wodorowych wydzielanych przez kanaliki dystalne i zbiorcze podczas zaoszczędzania zasad przez nerki.



Wydalanie z moczem nadmiernych ilości fosforanów I-rzędowych ($H_2PO_4^-$) podwyższa pH krwi, natomiast nadmierne wydalanie fosforanów II-rzędowych (HPO_4^{2-}) obniża pH krwi. Zwiększone wydalanie jonów fosforanowych z moczem następuje w nadczynności przytarczyc. Fosforany tylko częściowo są resorbowane w kanalikach nerkowych. Jeżeli moczu ma odczyn alkaliczny, jony fosforanowe łatwo reagują z obecnymi w moczu jonami wapniowymi i magnezowymi tworząc nierozpuszczalne sole – będące najczęstszą przyczyną kamieni nerkowych.