
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

RODOLFO MARGARIA, GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI

Definizione matematica della curva di dissociazione dell'HbO₂

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.5, p.
606–613.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_5_606_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Fisiologia. — *Definizione matematica della curva di dissociazione dell'HbO₂* (*). Nota di RODOLFO MARGARIA, GIORGIO TORELLI e ADOLFO PINI, presentata (**) dal Socio R. MARGARIA.

Presupponendo che l'ossigenazione dell'emoglobina si svolga secondo quattro reazioni successive, la frazione di emoglobina saturata con O₂ può essere espressa (Adair, 1925) [1] da:

$$(I) \quad S = \frac{K_1 P_{O_2} + 2 K_1 K_2 P_{O_2}^2 + 3 K_1 K_2 K_3 P_{O_2}^3 + 4 K_1 K_2 K_3 K_4 P_{O_2}^4}{4 (1 + K_1 P_{O_2} + K_1 K_2 P_{O_2}^2 + K_1 K_2 K_3 P_{O_2}^3 + K_1 K_2 K_3 K_4 P_{O_2}^4)}$$

Roughton, Otis e Lister (1952) [2], applicando il metodo dei minimi quadrati all'equazione (I), hanno calcolato con una calcolatrice elettronica le quattro costanti di equilibrio delle curve di dissociazione dell'ossiemoglobina di pecora *in vitro* (concentrazione dell'Hb al 3-4%, basi totali 200 mM).

Lo stesso hanno fatto Fenne e Nahas (1960) [3], servendosi della curva di dissociazione del sangue dell'uomo ottenuta *in vivo* da Lambertsen e coll. (1952) [4]. Tre di queste costanti risultarono negative (K₁, K₂, K₄) e quindi prive di significato. Secondo gli stessi Autori, la inattendibilità dei risultati risiederebbe, o nell'inadeguatezza del metodo di misura della P_{O₂} e della S, o nell'impossibilità di esprimere mediante la semplice ipotesi dei composti intermedi di Adair [1] l'equilibrio tra Hb e O₂.

A nostro parere l'inattendibilità dei valori delle costanti può anche essere dovuta al fatto che il metodo di calcolo non era adeguato: infatti, quando la matrice dei coefficienti del sistema normale (che è il finale sistema risolutivo per le K) è critica, cioè quando è prossimo allo zero il valore del suo determinante, il metodo dei minimi quadrati non è più applicabile, perché il sistema presenta allora una enorme sensibilità, e piccolissime variazioni di P_{O₂} ed S possono ripercuotersi con enormi deviazioni del valore effettivo dei vari K. Questa possibilità di errore è minore qualora i dati sperimentali siano rilevati con estrema precisione, come si verifica nella determinazione della curva di dissociazione dell'Hb o del sangue *in vitro*.

Si è quindi preferito determinare i valori delle quattro costanti di ossigenazione, dagli stessi dati di Lambertsen [4], con il metodo indicato da Margaria e coll. (1960) [5].

Poiché il pH del sangue non era costante in tutte le determinazioni, tutti i dati di P_{O₂} sono stati corretti per pH = 7,4 servendosi della formula (Mar-

(*) Dall'Istituto di Fisiologia umana dell'Università di Milano.

(**) Nella seduta del 12 maggio 1962.

garia e coll., 1960) [6]:

$$(2) \quad -\frac{d \log P_{O_2}}{d pH} = \frac{[H^+]}{[H^+] + K_R} - \frac{[H^+]}{[H^+] + K_O} = \frac{[H^+](K_O - K_R)}{(K_O + [H^+])(K_R + [H^+])}$$

dove K_O e K_R esprimono le costanti di dissociazione acidica del gruppo O_2 sensibile dell'Hb ridotta e ossigenata ed hanno i valori di $3,42 \cdot 10^{-7}$ e $1,29 \cdot 10^{-8}$ alla temperatura di 37° .

Si è determinato dapprima K_4 servendosi, anziché della formula 14 di Margaria e coll. (1960) [5] semplificata in modo da tener conto solo dell'ultima reazione dell'ossigenazione, della formula:

$$(3) \quad S = 1 - \frac{1}{4 K_4} \cdot \frac{1}{P_{O_2}} - \dots$$

dove il secondo membro rappresenta il primo termine dello sviluppo in serie di potenze dell'equazione (1): con questo procedimento si riduce l'errore che si compie nella estrapolazione a zero.

Se il calcolo è eseguito sulle due ultime, anziché solo sulla ultima reazione di ossigenazione, si ottiene, sviluppando in serie la (1):

$$(4) \quad S = 1 - \frac{1}{4 K_4} \cdot \frac{1}{P_{O_2}} - \left(\frac{1}{2 K_3 K_4} - \frac{1}{4 K_4^2} \right) \frac{1}{P_{O_2}^2} + \dots$$

e dando a K_3 un valore prossimo al reale, ma sicuramente maggiore, il valore di K_4 che si ottiene per estrapolazione a zero risulta più preciso e attendibile (fig. 1).

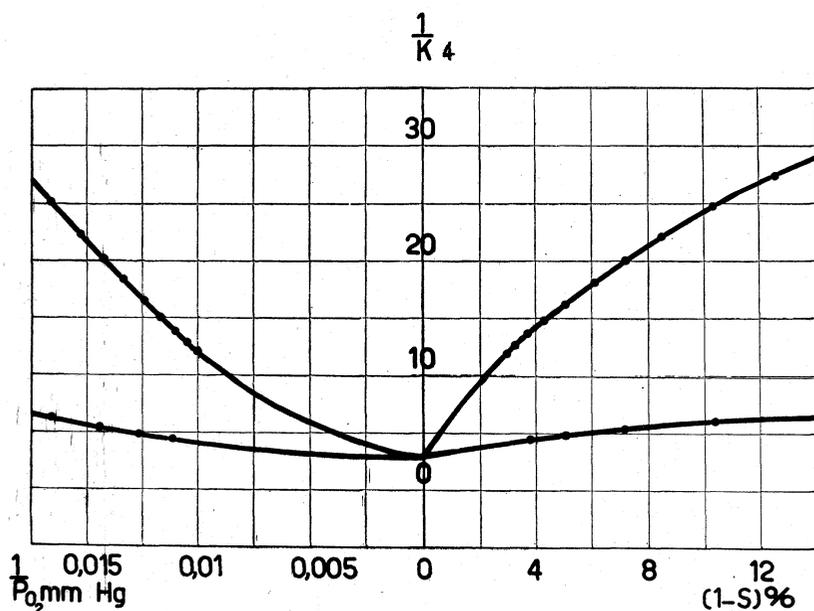


Fig. 1. - I valori di $1/K_4$ in funzione di $(1-S)\%$ e di $1/P_{O_2}$. Le curve superiori rappresentano i valori ottenuti mediante la (3), le curve inferiori i valori ottenuti mediante la (4).

Nota K_4 è possibile con analogo procedimento calcolare esattamente K_3 , sempre usufruendo della (4).

Tale procedimento non è stato applicato nel calcolo delle prime due costanti, poiché richiede dati sperimentali a bassi valori di saturazione che non si possono ottenere *in vivo*. K_1 e K_2 sono state pertanto calcolate facilmente, note le ultime due costanti, mediante la formula:

$$(5) \quad \underbrace{\frac{P_{O_2}(1-4S)}{4S}}_y = \frac{1}{K_1} + \underbrace{K_2 P_{O_2}^2 \left(1 + K_3 P_{O_2} + K_3 K_4 P_{O_2}^2 - \frac{2+3K_3 P_{O_2} + 4K_3 K_4 P_{O_2}^2}{4S} \right)}_x$$

che non è se non un arrangiamento della (1), e rappresenta, dando a x e y il significato della (5), l'equazione di una retta avente $1/K_1$ come origine e K_2 come parametro angolare (fig. 2).

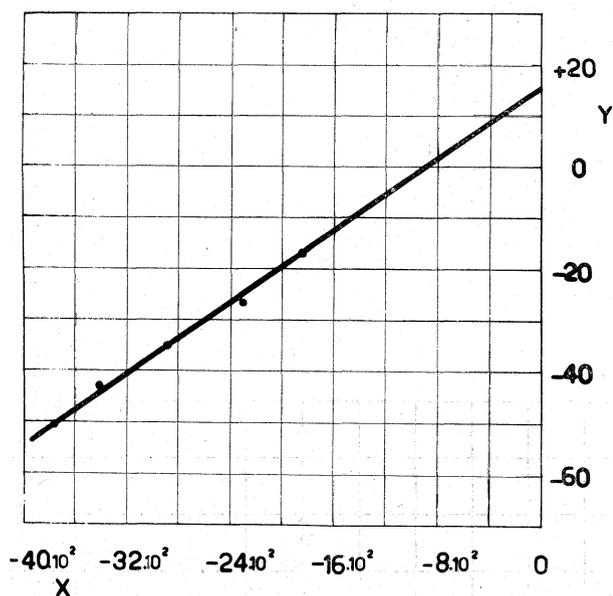


Fig. 2. - È rappresentata la funzione $y = 1/K_1 + K_2 x$ dove x ed y hanno i valori indicati nella (5).

Con procedimento analogo sono state calcolate anche le costanti di dissociazione del sangue *in vitro* dai dati sperimentali di Dill (1944) [7] e di una soluzione di emoglobina (al 7 %) dai dati sperimentali di Milla (1961) [8]: in ambedue questi casi gli esperimenti erano stati condotti a $pH = 7,4$; $T = 37^\circ C$; $P_{CO_2} = 40$ mm Hg e forza ionica = 0,15 M circa.

Per queste due serie di dati, K_4 è stato ottenuto con il procedimento indicato precedentemente, e K_1 con metodo analogo, servendosi della formula (6), che è l'espressione dello sviluppo in serie di potenze dell'equa-

zione di Adair (1), quando si tenga conto delle prime due reazioni di ossigenazione

$$(6) \quad S = \frac{K_1}{4} P_{O_2} - \frac{2K_1K_2 - K_1^2}{4} P_{O_2}^2 + \dots$$

K_2 e K_3 sono state determinate mediante la trascrizione della (1) nella forma:

$$(7) \quad \underbrace{\frac{K_1 P_{O_2}^2 (2 - 4S)}{4S + K_1 P_{O_2} (4S - 1)}}_{y'} = \frac{1}{K_2} + K_3 \underbrace{\frac{K_1 P_{O_2}^3 (4S - 3) + K_1 K_4 P_{O_2}^4 (4S - 4)}{4S + K_1 P_{O_2} (4S - 1)}}_{x'}$$

I valori delle costanti così ottenuti sono riportati nella Tabella I.

TABELLA I.

AUTORI	Substrato	K_1	K_2	K_3	K_4
Lambertsen [4]	Sangue <i>in vivo</i> (uomo)	0,066	0,018	0,010	0,36
Dill [7]	Sangue <i>in vitro</i> (uomo)	0,040	0,029	0,0065	0,40
Milla [8]	Emoglobina <i>in vitro</i> (cavallo)	0,050	0,020	0,0078	0,48

Se non vi fosse interazione tra ossigenazione di un eme e quella degli emi successivi della stessa molecola, la curva di dissociazione dell'ossiemoglobina potrebbe essere rappresentata da un'iperbole:

$$(8) \quad S = \frac{K P_{O_2}}{1 + K P_{O_2}}$$

dove K è la costante di equilibrio della reazione $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$.

La (1) è ridotta all'espressione della (8) qualora i valori delle costanti K_1, K_2, K_3, K_4 assumano i valori indicati nella Tabella II.

TABELLA II.

$$K_1 = 4 K$$

$$K_2 = 1,5 K$$

$$K_3 = 0,66 K$$

$$K_4 = 0,25 K$$

Questi sono perciò i dati delle 4 costanti che si dovrebbero ottenere dai dati sperimentali qualora non vi fosse interazione nella ossigenazione degli emi. I valori delle prime tre costanti stanno effettivamente tra loro in un

rapporto simile, sia che siano stati calcolati dai dati di Lambertsen [4] sul sangue umano *in vivo*, o dai dati di Dill [7] sul sangue *in vivo*, o dai dati di Milla [8] sulle soluzioni di emoglobina di cavallo, o dai dati di Roughton [7] a $\text{pH} = 7,1$; non vi sarebbe cioè alcuna interazione nella ossigenazione dei primi tre emi.

La quarta costante ha invece un valore in media 125 volte maggiore di quello indicato nella Tabella II, previsto sulla base del suddetto presupposto; l'ossigenazione dell'ultimo eme è dunque molto facilitata dalla presenza di tre molecole di O_2 nei primi tre emi.

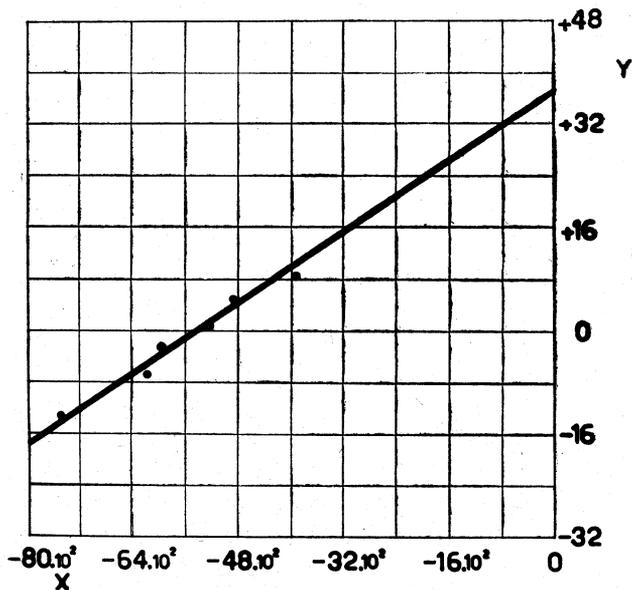


Fig. 3. - È rappresentata la funzione $y' = 1/K_2 + K_3 x'$ dove x' ed y' hanno i valori indicati nella (7).

Nella Tabella III i valori delle 4 costanti sono stati divisi per i coefficienti indicati in Tabella II: essi dovrebbero avere tutti lo stesso valore, qualora non vi fosse alcuna interazione tra gli emi; è pure riportata la media delle prime tre costanti (K medio) e l'aumento m di K_4 rispetto al valore calcolato da K medio sul presupposto che non vi sia interazione nella ossigenazione dell'ultimo eme.

È dunque possibile esprimere l'equilibrio tra ossigeno ed emoglobina mediante un'equazione che contenga le sole costanti K e m . Sostituendo nelle (1) i valori di K_1, K_2, K_3, K_4 coi valori corrispondenti in funzione di K sopra riferiti (Tabella II), si ottiene la formula semplificata:

$$(9) \quad S = \frac{\left(\frac{1 + KP_{O_2}}{KP_{O_2}}\right)^3 + m - 1}{\left(\frac{1 + KP_{O_2}}{KP_{O_2}}\right)^4 + m - 1}.$$

TABELLA III.

AUTORI	pH	$K = 1/4 K_1$	$K = 2/3 K_2$	$K = 3/2 K_3$	$K = 4 K_4$	K medio per i valori delle prime 3 colonne	$m = \frac{K_4}{1/4 K \text{ medio}}$
Dill [7]	7,4	0,0100	0,0193	0,0097	1,600	0,0130	123
Lambertsen [4]	7,4	0,0160	0,0120	0,0150	1,440	0,0144	100
Milla [8]	7,4	0,0125	0,0133	0,0117	1,920	0,0125	154
Roughton [2] ^(*)	7,1	0,0157	0,0165	0,0225	2,322	0,0182	127

(*) Valori ottenuti su soluzioni di emoglobina di pecora in assenza di CO₂.

Dando a K e m i valori calcolati su ciascuna serie di dati sperimentali risp. di Dill [7], di Lambertsen [4] e di Milla [8], si ottengono le curve di

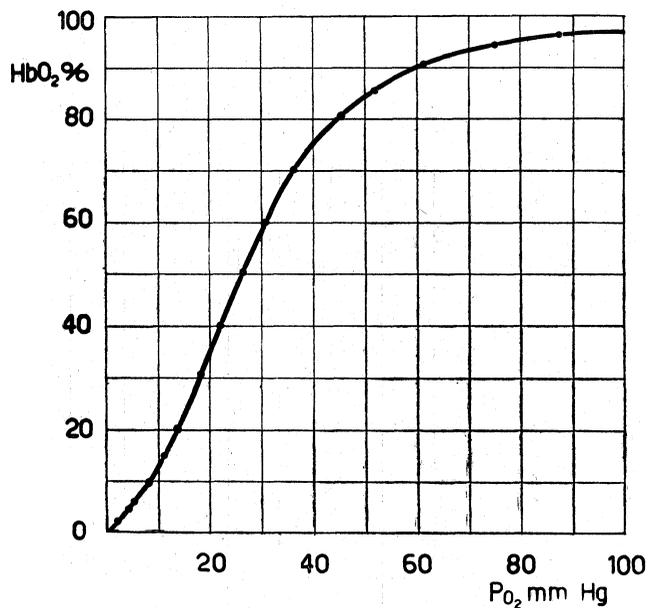


Fig. 4 - Curva di dissociazione del sangue *in vitro* calcolata mediante la (9) sui dati di D. B. Dill [7].

dissociazione dell'emoglobina definite dall'equazione (9); riportate nei grafici 4, 5 e 6 insieme con i dati sperimentali; esse rappresentano con buona approssimazione l'andamento della funzione.

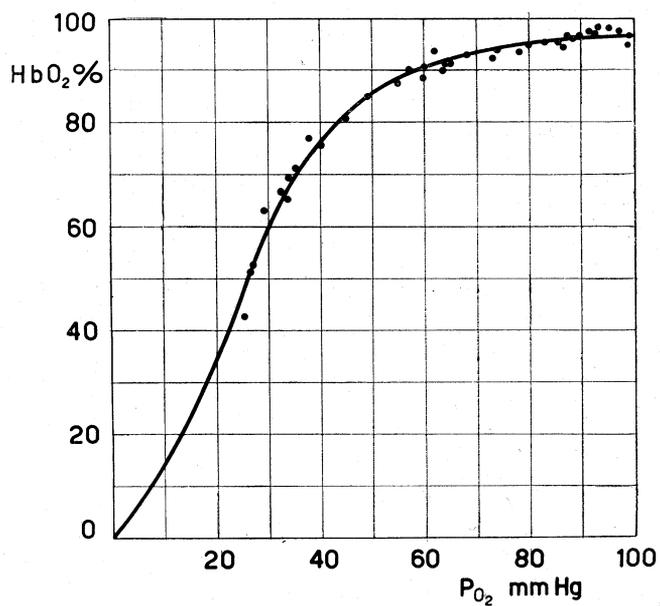


Fig. 5. - Curva di dissociazione del sangue *in vivo* calcolata mediante la (9) dai dati di Lambertsen [4].

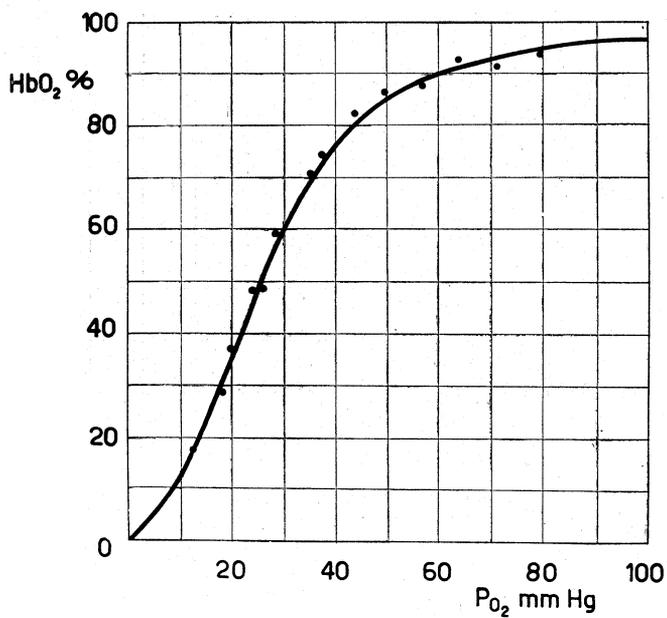


Fig. 6. - Curva di dissociazione di una soluzione di Hb calcolata mediante la (9) dai dati di Milla [8].

BIBLIOGRAFIA.

- [1] C. S. I. ADAIR, « J. Biol. Chem. », 63, 529 (1925).
- [2] F. J. W. ROUGHTON, A. B. OTIS and R. L. J. LYSTER, « Proceeding of the Royal Society of London », 144, 829 (1954).
- [3] D. W. FENNE and G. G. NAHAS, « J. Appl. Physiol. », 15, 315 (1960).
- [4] C. J. LAMBERTSEN, P. L. BUNCEAND, D. L. DRABKIN and C. F. SCHMIDT, « J. Appl. Physiol. », 4, 873 (1952).
- [5] R. MARGARIA, S. MARCHI, L. ROSSI, « Acc. Naz. Lincei », 28, 581 (1960).
- [6] R. MARGARIA, S. MARCHI, L. ROSSI, « Acc. Naz. Lincei », 28, 304 (1960).
- [7] D. B. DILL, *Handbook of Respiratory Data in Aviation*, Washington, 1944.
- [8] E. MILLA, Comunicazione personale, 1961.