

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI, RODOLFO MARGARIA

## **Influenza della forza ionica sulla interazione intramolecolare fra le reazioni di ossigenazione dell'Hb**

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 36 (1964), n.6, p. 798–803.*  
Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_36\\_6\\_798\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_36_6_798_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.** — *Influenza della forza ionica sulla interazione intramolecolare fra le reazioni di ossigenazione dell'Hb* (\*). Nota di GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI e RODOLFO MARGARIA, presentata (\*\*) dal Socio R. MARGARIA.

L'insuccesso dei tentativi di assegnare alle costanti di ossigenazione di Adair (1925) [1] dei valori costanti ed attendibili ha indotto alcuni ricercatori a formulare meccanismi di reazioni differenti da quello sul quale era basata la equazione di Adair [1], e che con maggiore approssimazione potessero adattarsi ai dati sperimentali (Gomez, Radford, Schjter e coll.) [2-3-4]. Tuttavia tale incapacità di attribuire valori attendibili alle costanti di ossigenazione non implica necessariamente la inadeguatezza del meccanismo indicato da Adair [1]; può essere inadeguato invece il metodo dei minimi quadrati, quale è stato usato per determinare i valori delle costanti (Torelli e coll.) [5]. Dati apparentemente più attendibili infatti sono stati ottenuti usando, per determinare i valori delle costanti, il metodo delle estrapolazioni di Margaria e coll. [6-7].

I valori delle costanti  $K_1$ ,  $K_2$ ,  $K_3$ ,  $K_4$ , ottenuti con questo metodo sono tali da essere conciliabili con il meccanismo postulato da Adair [1] di quattro successive reazioni di ossigenazione della molecola di Hb considerata come un tetrapolimero: essi per di più conducono ad ammettere come probabile l'ipotesi che l'affinità dell'O<sub>2</sub> per l'Hb<sub>4</sub> sia la stessa per i primi tre processi ossidativi, mentre sia molto aumentata (di  $m$  volte) per la quarta ossigenazione. La formula di Adair [1] può allora essere semplificata nella:

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

contenente una sola costante di equilibrio, e quindi di facile uso nelle applicazioni fisiologiche [7-8].

Rossi Fanelli e coll. [9] dimostrarono che la forma sigmoide della curva di dissociazione dell'Hb<sub>4</sub> aumenta con l'aumentare della forza ionica. Poiché la forma sigmoide della curva è dovuta all'aumentata affinità della quarta molecola di O<sub>2</sub> per l'Hb<sub>4</sub>, si è voluto calcolare dai dati di questi Autori i valori delle costanti  $K$  e  $m$  della (1) per vedere se la variazione in funzione della forza ionica di queste costanti, il cui significato è più chiaro e definito che non quello della costante  $n$  di Hill, calcolata dagli stessi Autori, potesse dare informazioni più indicative sulla natura del processo della ossigenazione.

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

(\*\*) Nella seduta del 10 giugno 1964.

## DETERMINAZIONE DELLE COSTANTI.

Le curve di dissociazione sono state ottenute su soluzioni di Hb tamponate con miscele di fosfati a concentrazione crescente: in quella a concentrazione maggiore (2 M) l'Hb era quasi completamente scissa in due unità (dati di Rossi-Fanelli e coll.) (1961 a) [10]; ad eccezione di quest'ultima le curve sono raccolte nella fig. 6.

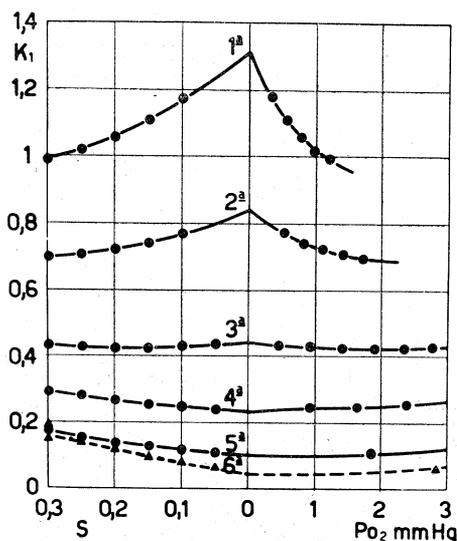


Fig. 1. - Valori di  $K_1$  in funzione di  $S$  e  $P_{O_2}$  calcolati mediante l'equazione  $S = \frac{1}{4} K_1 P_{O_2}$  da curve di dissociazione di Hb in soluzioni di fosfati a pK 7 e diverse concentrazioni, come qui indicato.

$1^a < 2,5 \cdot 10^{-4} M$ ;  $2^a = 2,5 \cdot 10^{-4} M$ ;  $3^a = 2,5 \cdot 10^{-3} M$ ;  $4^a = 2,4 \cdot 10^{-2} M$ ;  $5^a = 2,5 \cdot 10^{-1} M$ ;  $6^a$  (tratteggiata perché l'Hb è allo stato di dimero) = 2 M (dai dati di Rossi-Fanelli e coll. 1961) [9].

Le figure 1 e 2 illustrano il procedimento di estrapolazione con il quale sono ottenuti i valori di  $K_1$  e  $K_4$  (vedi Margaria e coll. per i dettagli del metodo) [7]. Risulta evidente che coll'aumentare della forza ionica il valore di  $K_1$  diminuisce sensibilmente, mentre il valore di  $K_4$  non varia apprezzabilmente. Va tuttavia tenuto presente che il metodo delle estrapolazioni conduce ad una più esatta determinazione dei valori di  $K_1$  che non dei valori di  $K_4$  la cui determinazione richiede una precisione dei dati maggiore.

Per ottenere maggiori informazioni sul valore di  $K_4$  è stato usato anche metodo di Torelli e coll. (1962) [11] che presuppone la validità dell'equazione (1) in quanto fornisce i valori di  $K$  e di  $m$  della (1). Da questi si risale a quelli della prima ed ultima costante mediante le equazioni  $K_1 = 4 K$  e  $K_4 = \frac{1}{4} m K$  (vedi Margaria e coll.) [6-7]. I valori di  $m$  e  $K$  ottenuti con

questo metodo da una curva sono illustrati dal grafico della fig. 3. Non è stato possibile applicare il metodo alla curva 1 in quanto il valore di  $m$  è troppo piccolo e quindi grande l'errore relativo, né alle curve 5 e 6 in quanto

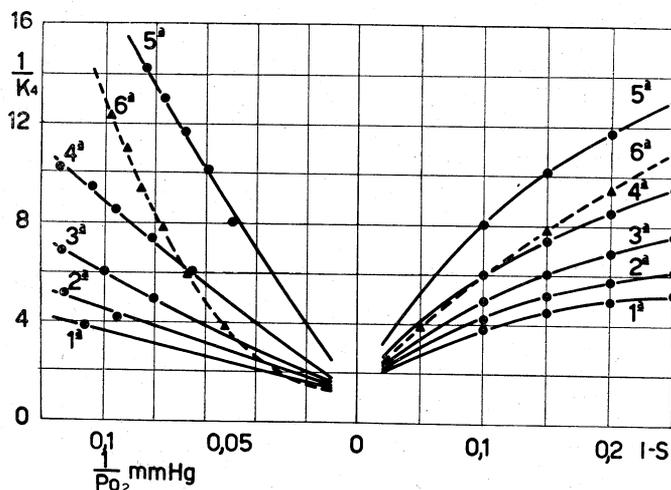


Fig. 2. - Valori di  $\frac{1}{K_4}$  in funzione di  $(1-S)$  e  $\frac{1}{P_{O_2}}$  calcolati mediante l'equazione  $S = 1 - \frac{I}{4 K_4} \cdot \frac{I}{P_{O_2}}$  dalle stesse curve di dissociazione della precedente figura.

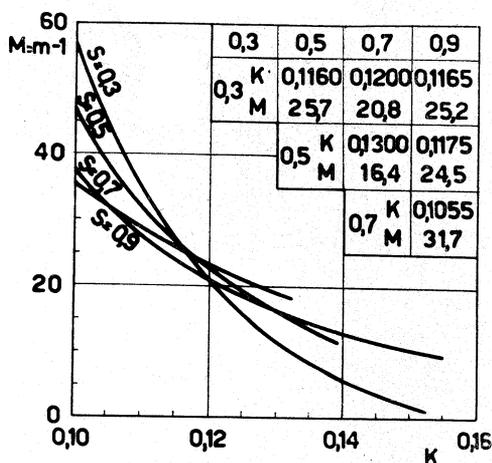


Fig. 3. - Le curve rappresentano la funzione  $M = f(K)$  secondo l'equazione 1 per diversi valori di saturazione ( $3^a$  curva).

Le intersezioni rappresentano la risoluzione dei sistemi e sono indicate nella tabella accanto.

l'equazione [1] non si adegua ai dati sperimentali. I Valori di  $K_4$  ottenuti con questo metodo, risultarono leggermente maggiori di quelli ottenuti mediante estrapolazione.

Per determinare con maggior precisione l'ultima costante di ossigenazione delle curve 1, 5, 6 si è usato il seguente sviluppo in serie dell'equazione di Adair [1].

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

Da esso è possibile risalire al valore di  $K_4$  assegnando a  $K_3$  un valore approssimativo (Margaria e coll.) [6-7].

Quando l'Hb si trova allo stato di dimero l'ultima reazione di ossigenazione è la seconda, e la sua costante  $K_2$ : ciò nonostante anche su questa soluzione sono state calcolate le quattro costanti, ignorando le modifiche alle quali è andata incontro la molecola emoglobinica.

#### INFLUENZA DELLA FORZA IONICA E DELLA NATURA DELL'ELETTROLITA SUL VALORE DELLE COSTANTI DI EQUILIBRIO.

Dalla fig. 4 appare che una relazione lineare esiste tra forza ionica e i valori della prima e dell'ultima costante di ossigenazione dell'Hb; nessuna netta discontinuità della funzione si osserva anche quando la forza ionica

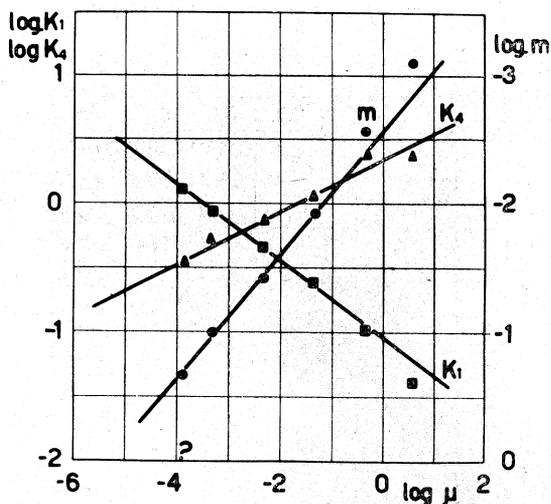


Fig. 4. - Valori della 1ª e 4ª costante di equilibrio e di  $m$  della (1) calcolati dai dati di Rossi-Fanelli e coll. (1961 *b*) [9] posti in funzione della forza ionica delle soluzioni di Hb.

raggiunge valori ai quali la molecola di Hb passa da tetrapolimero a dimero. L'affinità per l'O<sub>2</sub> dell'ultimo eme, sia che l'Hb si trovi allo stato di tetrapolimero o di dimero, risulta dello stesso ordine di grandezza di quella della mioglobina. L'affinità di questo eme aumenta di poco con l'aumentare della

forza ionica in analogia a quanto si verifica per la mioglobina. (Rossi-Fanelli e Antonini 1958) [12].

Questi fatti suggeriscono l'ipotesi che soltanto l'ultima reazione di ossigenazione non è affetta da interazione alcuna, ed esprime quindi la reale

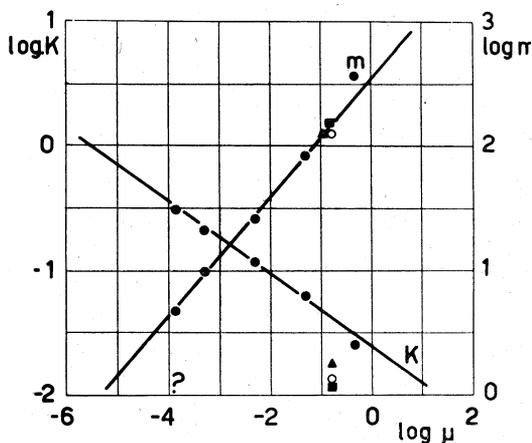


Fig. 5. - Valori di  $K$  e  $m$  della (1) in funzione della forza ionica delle soluzioni di Hb.

- Dati di Rossi-Fanelli e coll. (1961 *b*) [9].
- Dati di Dill (1944) [13].
- + Dati di Milla (1961) [14].
- △ Dati di Roughton e coll. (1954) [15].

affinità dell'eme per l' $O_2$ . Non sarebbe cioè l'ossigenazione dei primi tre emi ad aumentare l'affinità del quarto eme per l' $O_2$ , ma piuttosto sono le prime tre reazioni ad essere inibite dalla presenza di un eme ridotto nella molecola.

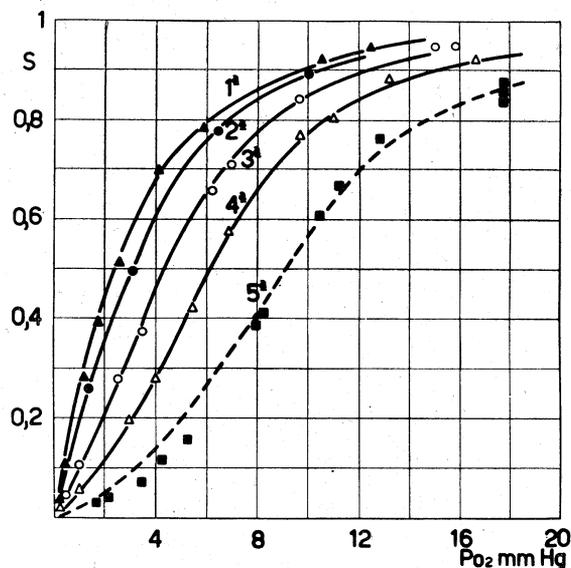


Fig. 6. - Curve di dissociazione per l'Hb calcolate mediante la (1) dai dati di Rossi-Fanelli e coll. (1961 *b*) [9].

La 5ª curva è tratteggiata perché non si adegua ai dati sperimentali.

Analogo meccanismo era stato invocato da Radford (1962) [3] in un'analisi statistico-meccanica dell'equilibrio  $O_2$ —Hb.

Presupponendo identica l'affinità dei primi tre emi per l' $O_2$ , la curva di dissociazione dell'Hb<sub>4</sub> può essere espressa dalla formula (1) e l'interazione da  $m = 16 K_4/K_1$ : quando  $m = 1$  l'interazione è nulla. Anche  $m$  aumenta linearmente con l'aumentare della forza ionica  $\mu$  (fig. 4). Questa relazione è indipendente dalla natura dell'elettrolita a differenza di quanto si verifica per la relazione  $K = f(\mu)$  (fig. 5).

Rossi-Fanelli e coll. (1961 *b*) [9] avevano già rilevato su questi dati che la costante  $n$  di Hill varia in funzione della sola forza ionica, mentre l'affinità dell'Hb per l' $O_2$ , espressa da  $P_{O_2}$  a semisaturazione, varia anche con la natura dell'elettrolita.

Si può quindi concludere che l'equazione (1) descrive in maniera soddisfacente le curve di dissociazione dell'Hb per l' $O_2$  ottenute su soluzione di Hb con concentrazione in fosfati inferiore a 0,25 M (fig. 6).

Entro questi limiti l'accentuarsi della forma ad «S» pare essere espressione dell'aumento dell'interazione intramolecolare, che risulta essere tanto maggiore quanto più elevata è la forza ionica. L'inapplicabilità dell'equazione (1) a valori più elevati di forza ionica può essere interpretata come dovuta ad una interazione extramolecolare.

Il risultato inoltre che il fattore  $m$ , espressione dell'interazione, sia correlato alla forza ionica, fa supporre che l'inibizione postulata dell'eme ridotto sulla ossigenazione di un altro eme prossimo dipenda dalle proprietà elettrostatiche dell'eme ridotto.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] G.S.I. ADAIR, « J. Biol. Chem. » 63, 529 (1925).
- [2] D.M. GOMEZ, « Am. J. Physiol. », 200, 135 (1961).
- [3] E. RADFORD, Proc. Int. Union of. Physiol. Sci. XII Int. Congr. Leyden (1962).
- [4] A. SCHITER, A. D. ADLER e GLAUSER S. C., in corso di pubblicazione.
- [5] G. TORELLI, A. PINI, F. BRAMBILLA e R. MARGARIA, « Exper. Med. and Surg. », in corso di pubblicazione.
- [6] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Acc. Naz. Lincei » 32, 606 (1962).
- [7] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Exp. Med. and Surg. », 21, 127 (1963).
- [8] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Acc. Naz. Lincei », 32, 831 (1962).
- [9] A. ROSSI FANELLI, E. ANTONINI e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. » 236, 397 (1961 *b*).
- [10] A. ROSSI FANELLI, E. ANTONINI e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. », 236, 391 (1961 *a*).
- [11] G. TORELLI e A. PINI, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 38, 1634 (1962).
- [12] A. ROSSI FANELLI e E. ANTONINI, « Arch. Biochem. Biophys. », 77, 478 (1958).
- [13] D. B. DILL, in *Handbook of Respiratory Data in Aviation*, Washington (1944).
- [14] E. MILLA, Comunicazione personale (1961).
- [15] F.J.W. ROUGHTON, A. B. OTIS and R.L.J. LYSTER, « Proc. Roy. Soc. of London B », 144-829 (1954).