
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI, RODOLFO MARGARIA

Relazione fra interazione intra ed extramolecolare fra le reazioni di ossigenazione dell'Hb

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.3-4, p.
123-128.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_3-4_123_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. — *Relazione fra interazione intra ed extramolecolare fra le reazioni di ossigenazione dell'Hb^(*).* Nota di GIORGIO TORELLI, ADOLFO PINI e RODOLFO MARGARIA, presentata (**) dal Socio R. MARGARIA.

È stato messo in evidenza che nel processo di ossigenazione dell'emoglobina (Hb₄) l'affinità dell'eme è simile per le prime tre molecole di O₂, mentre è sensibilmente maggiore per l'ultima molecola di O₂, che entra in combinazione, di un fattore m : questo fenomeno pare dovuto all'influenza inibitoria, sul processo del legame dell'O₂ con l'Hb, di emi ridotti appartenenti alla stessa molecola (interazione extramolecolare): in soluzioni concentrate di Hb₄ anche emi ridotti di altre molecole vicine possono però diminuire l'affinità del quarto eme per l'O₂ (interazione extramolecolare).

L'interazione extramolecolare sembra correlata alla distanza media statistica (d) fra i due emi interreagenti dalla

$$(1) \quad m = \frac{a}{d^2}$$

dove la costante a dipende dalla forza ionica μ della soluzione ed ha un valore di circa 3,720 quando $\mu = 4$ M circa (Torelli e coll.) [1]. L'interazione sia intra che extra-molecolare pare legata alla forza ionica μ dalla:

$$(2) \quad \log m = b + 0,45 \log \mu$$

(Torelli e coll.) [2].

Dalle (1) e (2) risulta che

$$(3) \quad \log a = 2 \log d + b + 0,45 \log \mu$$

da cui il valore di b è facilmente calcolabile quando si ponga $d = 1$, e si conoscano μ , e quindi il valore corrispondente di a : ai valori sopra indicati di μ e di a , $b = 3,27$.

Dalle (1) e (3) si ottiene quindi

$$(4) \quad \log m = 3,27 + 0,45 \log \mu - 2 \log d$$

che esprime la relazione tra interazione extramolecolare e la distanza media di una molecola che si sta ossigenando da altre molecole che contengano almeno un eme ridotto, per differenti valori di forza ionica.

Tale relazione è rappresentata graficamente nella fig. 1: la linea in grassetto corrisponde ad un valore di forza ionica di 0,17 M, quale si ha nei

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

(**) Nella seduta del 10 giugno 1964.

liquidi interni dei mammiferi, e taglia l'ascissa a $d = 30 m\mu$, che corrisponde all'incirca ad una concentrazione di Hb_4 di 0,5%: l'interazione extramolecolare è quindi nulla ($m = 1$) per soluzioni di $Hb_4 = 0,5\%$, ed aumenta progressivamente con l'aumentare della concentrazione dell' Hb_4 al di sopra di questo valore critico. Questo fatto rende ragione del riscontro fatto da Rossi-Fanelli e coll. [3] che il numero n di Hill, indice della sigmoidicità della curva di dissociazione aumenta progressivamente con la concentrazione di emoglobina.

Non pare invece sia rilevabile alcuna interazione extramolecolare sul sangue *in vitro* dai dati di Dill [4] (Margaria e coll.) [5, 6] pur essendo la concentrazione di Hb_4 negli eritrociti del 33%.

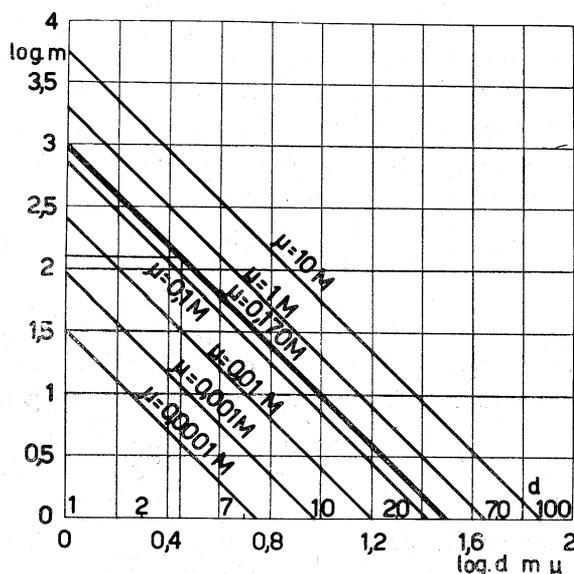


Fig. 1. - Valori di m in funzione della distanza d per differenti valori di forza ionica secondo la (4).

DISTANZA DEGLI EMI NELLA MOLECOLA DI Hb_4 ED INTERAZIONE INTRAMOLECOLARE.

L'interazione intramolecolare è espressa da un valore di m di circa 125 (Margaria e coll.) [5, 6, 7]. Dal grafico della fig. 1 si può osservare che, ad un valore fisiologico di forza ionica, il valore di $m = 125$ si ottiene quando la distanza fra gli emi è $2,9 m\mu$.

Poiché dagli studi roentgenografici (Perutz) [8] risulta che gli emi della molecola dell' Hb_4 si trovano ai vertici di un rettangolo di dimensioni di circa $2,5 \times 4,0 m\mu$ è presumibile che anche l'interazione intramolecolare dipenda dalla distanza degli emi in via di ossigenazione dall'eme ridotto.

Nella polimerizzazione dell'Hb₄ i 4 emi si unirebbero in modo da essere tra loro ad una distanza così piccola da essere apprezzabile la inibizione delle prime tre reazioni di ossigenazione: se essi fossero a distanza maggiore l'Hb₄ avrebbero un comportamento simile a quello dell'Mb, avrebbe cioè una molto maggiore affinità per l'O₂ specialmente a bassi valori di P_{O₂} quali sono quelli che si hanno a livello dei tessuti.

POSSIBILE INTERPRETAZIONE DELL'EQUILIBRIO Hb-O₂.

Se si considera valido il presupposto che la 4^a reazione si possa svolgere liberamente, senza inibizione alcuna, e che sia K* la costante di equilibrio di questa reazione, le costanti dalle prime tre reazioni di ossigenazione avranno un valore di $1/m$ rispetto al valore che avrebbero se non esistessero emi ridotti in prossimità.

L'inibizione è, secondo la (1), tanto maggiore quanto minore è la distanza.

La possibile distanza degli emi di una molecola di Hb, rappresentati schematicamente ai vertici di un rettangolo, è data rispettivamente dal lato minore (d') da quello maggiore (d'') e dalla diagonale (d'''): ad ogni distanza corrisponderà secondo la (1) un particolare valore di m , e cioè m' , m'' ed m''' .

La concentrazione di ognuna delle possibili forme dell'emoglobina [Hb₄], [Hb₄O₂], [Hb₄O₄], [Hb₄O₆], [Hb₄O₈], può essere calcolata per ogni valore di P_{O₂} dalla probabilità che le reazioni di ossigenazione che conducono alla formazione di quel composto abbiano luogo. Questa probabilità dipende dalla affinità per l'O₂ di ognuno di essi e dal numero delle differenti possibilità che ha l'ossigeno di legarsi agli emi nella molecola dell'Hb₄.

Una molecola di O₂ ha 4 possibilità, 1 per ognuno degli emi, di legarsi all'Hb₄: 2 molecole di ossigeno hanno 6 possibilità, potendosi esse trovare agli opposti delle due diagonali o dei due lati minori o dei due lati maggiori del rettangolo: 3 molecole di O₂ hanno 4 possibilità, poiché l'eme ridotto può essere uno qualsiasi dei quattro emi; infine per il legame di 4 molecole di O₂ sull'Hb₄ non esiste che una sola forma possibile.

Ma oltre che da questa possibilità, il legame dell'O₂ con un eme dipende anche dalle possibili interazioni m' , m'' e m''' che tendono a diminuire l'affinità di un eme per l'O₂. La probabilità perciò che si formi un certo composto intermedio dipenderà non solo dalle possibili combinazioni cui si è detto sopra, ma anche dai fattori di interazione m corrispondenti ad ogni combinazione.

Per la 1^a reazione di ossigenazione, essendo 4 le possibilità e m' l'interazione, poiché l'eme ossigenato si troverà certamente a distanza d' da un eme ridotto, la costante di equilibrio sarà: $\frac{4}{m'} K^*$.

Per la seconda ossigenazione essendovi due su 6 possibilità che la distanza fra l'eme interessato e un eme ridotto più prossimo siano d'' e 4 su 6 che

siano di d' , la costante di equilibrio dovrebbe avere un valore per la prima possibilità $6 \times \frac{2}{6} \times \frac{K^*}{m''}$ e per la seconda $6 \times \frac{4}{6} \times \frac{K^*}{m'}$: il valore complessivo risulterà essere:

$$6 \times \frac{2}{6} \times \frac{K^*}{m''} + 6 \times \frac{4}{6} \times \frac{K^*}{m'} = 2 K^* \left(\frac{2}{m'} + \frac{1}{m''} \right).$$

Analogamente si può calcolare che la costante per la terza reazione di ossigenazione sarà:

$$\frac{4}{3} K^* \left(\frac{1}{m'} + \frac{1}{m''} + \frac{1}{m'''} \right)$$

e per la quarta K^* , che è legata alla costante K_4 , secondo la formula classica di Adair, dalla relazione $K^* = 4 K_4$.

Ponendo uguale a 1 la concentrazione dell' Hb_4 ridotta, la concentrazione molare dell' Hb_4 totale, ossigenata o non, sarà data dalla somma delle singole concentrazioni,

$$1 + 4 \frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + 2 \left(\frac{2}{m'^2} + \frac{1}{m' m''} \right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \frac{4}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \\ + \frac{1}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*4} P_{O_2}^4$$

e la concentrazione degli emi totali sarà 4 volte maggiore.

La concentrazione degli emi ossigenati sarà invece uguale a

$$[Hb_4O_2] + 2 [Hb_4O_4] + 3 [Hb_4O_6] + 4 [Hb_4O_8]$$

e quindi:

$$4 \left[\frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + \left(\frac{2}{m'^2} + \frac{1}{m' m''} \right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \right. \\ \left. + \frac{1}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*4} P_{O_2}^4 \right].$$

La saturazione può essere espressa come il rapporto fra le concentrazioni di emi ossigenati ed emi totali, ed è perciò:

$$(5) \quad S = \frac{\frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + \left(\frac{2}{m'^2} + \frac{1}{m' m''} \right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \\ + \frac{1}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*4} P_{O_2}^4}{1 + 4 \frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + 2 \left(\frac{2}{m'^2} + \frac{1}{m' m''} \right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \frac{4}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \\ + \frac{1}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''} \right) K^{*4} P_{O_2}^4}$$

Le costanti m' , m'' ed m''' possono essere calcolate dalla (1) quando si conosce la distanza di un eme ridotto d ed il valore di a che dipende dalla forza ionica secondo la (3).

Sostituendo nella (5) si ottiene:

$$(6) \quad S = \frac{\frac{d'^2}{a} K^* P_{O_2} + \left(\frac{2d'^4 + d'^2 d''^2}{a^2}\right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \left(\frac{2d'^4 d''^2 + d'^4 d'''^2}{a^3}\right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \frac{1}{3} \left(\frac{2d'^4 d''^2 + d'^4 d'''^2}{a^3}\right) K^{*4} P_{O_2}^4}{1 + 4 \frac{d'^2}{a} K^* P_{O_2} + 2 \left(\frac{2d'^4 + d'^2 d''^2}{a^2}\right) K^{*2} P_{O_2}^2 + \frac{3}{4} \left(\frac{2d'^4 d''^2 + d'^4 d'''^2}{a^3}\right) K^{*3} P_{O_2}^3 + \frac{1}{3} \left(\frac{2d'^4 d''^2 + d'^4 d'''^2}{a^3}\right) K^{*4} P_{O_2}^4}$$

nella quale si ha una sola costante non determinata K^* .

La distanza fra gli emi di una molecola in effetti non si conosce con esattezza. Da ricerche roentgenografiche (Perutz) [8] appare essere all'incirca $d' = 2,8 m\mu$ e $d'' = 4 m\mu$: per la (1) deve essere perciò $2 \frac{1}{m'} = \frac{1}{m''}$: poiché d'' e d''' hanno un valore elevato, si può supporre che sia approssimativamente $\frac{1}{m''} = \frac{1}{m'''}$, e la (5) può allora essere semplificata nella:

$$(7) \quad S = \frac{\frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + 4 \frac{1}{m'^2} K^{*2} P_{O_2}^2 + 6 \frac{1}{m'^3} K^{*3} P_{O_2}^3 + 2 \frac{1}{m'^3} K^{*4} P_{O_2}^4}{1 + 4 \frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + 8 \frac{1}{m'^2} K^{*2} P_{O_2}^2 + 8 \frac{1}{m'^3} K^{*3} P_{O_2}^3 + 2 \frac{1}{m'^3} K^{*4} P_{O_2}^4}$$

Le costanti di questa equazione sono di facile determinazione col metodo delle estrapolazioni indicato da Margaria e coll. [4,5], usufruendo per la determinazione di $\frac{1}{m'} K^*$ dello sviluppo in serie della (7):

$$(8) \quad S = \frac{1}{m'} K^* P_{O_2} + \dots$$

Noto il valore di $\frac{1}{m'} K^*$ dalla (8), si calcola il valore di K^* dalla (7) e quindi il valore di $\frac{1}{m'}$.

L'equazione (7) differisce dall'equazione precedentemente suggerita per descrivere l'equilibrio O_2 -Hb₄ da Margaria e coll. [6, 7]:

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

in quanto questa presuppone la stessa affinità per l' O_2 delle prime tre reazioni di ossigenazione, m essendo l'aumento del valore della costante per la 4^a reazione di ossigenazione rispetto alle prime 3.

Nella (7) si presuppone invece che l'affinità per l' O_2 dei primi tre emi aumenti progressivamente, in funzione della maggiore distanza media degli emi ridotti nella proporzione $1 : 1,33 : 1,5$.

L'errore sperimentale che si compie nella determinazione del valore delle prime tre costanti di equilibrio è però troppo elevato per poter stabilire

con sicurezza dalla sola analisi della curva di dissociazione quale delle due equazioni si adatta meglio ai dati sperimentali.

Si può quindi comunque affermare:

a) l'affinità dell'eme, per l'O₂ dipende dalla natura e concentrazione dell'elettrolita in soluzione;

b) l'interazione fra le successive reazioni di ossigenazione può essere rappresentata come una riduzione dell'affinità di un eme per l'O₂ per effetto della vicinanza di un eme ridotto;

c) tale effetto pare essere inversamente proporzionale al quadrato della distanza dell'eme ridotto, sia che questo si trovi nella stessa molecola di emoglobina (interazione intramolecolare) o in una molecola vicina (interazione estramolecolare).

d) l'inibizione pare essere indipendente dalla natura dell'elettrolita e funzione solo della forza ionica;

e) si prospetta perciò l'ipotesi che l'inibizione sia una caratteristica legata alle proprietà elettriche dell'eme ridotto.

BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. TORELLI, A. PINI e R. MARGARIA, « Acc. Naz. Lincei », 2^a nota (1964).
- [2] G. TORELLI, A. PINI e R. MARGARIA, « Acc. Naz. Lincei », 1^a nota (1964).
- [3] A. ROSSI-FANELLI, J. WYMAN, E. ANTONINI e A. CAPUTO, « Acc. Naz. Lincei », 30, 449 (1961).
- [4] D. B. DILL, in *Handbook of Respiratory Data in Aviation*, Washington (1944).
- [5] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Exp. Med. and Surg. », 21, 127 (1963).
- [6] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Acc. Naz. Lincei », 37, 606 (1962).
- [7] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Acc. Naz. Lincei », 32, 831 (1962).
- [8] M. P. PERUTZ, *Proteins and Nucleic Acid*, Elsevier Pub. Comp. Amsterdam (1962).
- [9] A. ROSSI-FANELLI, A. ANTONINI e A. CAPUTO, « J. Biol. Chem. », 236-297 (1961).