

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

# RENDICONTI

---

GIORGIO TORELLI, ELOISA MILLA, ADOLFO PINI,  
RODOLFO MARGARIA

## Curva di dissociazione del sangue in vitro

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 37 (1964), n.5, p. 231–236.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1964\\_8\\_37\\_5\\_231\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1964_8_37_5_231_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.** — *Curva di dissociazione del sangue in vitro* (\*). Nota di GIORGIO TORELLI, ELOISA MILLA, ADOLFO PINI e RODOLFO MARGARIA, presentata (\*\*) dal Socio R. MARGARIA.

È stata prospettata in una precedente Nota (Torelli e coll. [1]) la possibilità che in una soluzione di Hb<sub>4</sub> a concentrazione > 0,5 % emi non ossigenati possano intervenire nel processo di ossigenazione di emi di molecole vicine diminuendone l'affinità per l'O<sub>2</sub> (interazione extramolecolare).

L'emoglobina all'interno dei globuli rossi ha una concentrazione di circa 32 %; l'interazione extramolecolare dovrebbe quindi essere molto manifesta.

Tuttavia, elaborando dati di Dill [2] su sangue umano, Margaria e coll. [3] non hanno ottenuto dati compatibili con l'ipotesi di una interazione extramolecolare; si è creduto pertanto opportuno rilevare la curva di dissociazione anche su sangue di cavallo, di cui era stato studiato in precedenza il comportamento dell'emoglobina in soluzione.

Le curve sono state ottenute sia in assenza di CO<sub>2</sub> che in presenza (P<sub>CO<sub>2</sub></sub> = 40 mm Hg), equilibrando il sangue per gorgogliamento a 37° e mantenendo il pH del plasma a 7,4, secondo la tecnica descritta da Milla e coll. [4, 5].

I risultati sono riportati nel grafico della fig. 1.

La presenza di CO<sub>2</sub> sposta a destra la curva di dissociazione dell'Hb<sub>4</sub> indipendentemente dal pH, come era stato descritto da Margaria e Green [6], l'elaborazione delle costanti in questa condizione è però complicata dalla presenza dei carboamino composti, che dipendono quantitativamente dal grado di saturazione e dal pH nel corpuscolo rosso.

La curva di dissociazione in assenza del CO<sub>2</sub> è influenzata invece dalla sola diminuzione del pH all'interno del corpuscolo rosso durante il processo di ossigenazione, dovuta all'aumento della dissociazione dell'emoglobina.

Il valore di pH all'interno del corpuscolo rosso può essere determinato dal valore della costante *r* di Gibson-Donnan secondo la (van Slyke e coll. [7])

$$(I) \quad r = 1 - \frac{[X^-] + [Hb]}{2([B^+]_1 - [X^-]) + [Hb]} - \frac{[P^-]}{2[B^+]_2 - [P^-]}$$

dove le costanti hanno il seguente significato e valore:

[Hb] = mM di emoglobina (P.M. 17000) per l. di sangue = 8,2 mM;

[P<sup>-</sup>] = mE di proteine plasmatiche dissociate per l. di sangue = 7 mE;

[B<sup>+</sup>]<sub>1</sub> = mE di basi totali nei corpuscoli per l. di sangue = 64 mE;

[B<sup>+</sup>]<sub>2</sub> = mE di basi totali nel plasma per l. di sangue = 90 mE.

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

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

La variabile  $[X^-]$ , mE di emoglobina dissociata per litro di sangue è funzione lineare della saturazione (Antonini e coll. [8]) ed ha il valore di 15,6 mE per l'emoglobina completamente ossigenata e di 9,8 mE per quella ridotta.

Poiché il pH del plasma ( $\text{pH}_p$ ) è mantenuto costante a 7,4 durante tutto l'esperimento il pH dei corpuscoli ( $\text{pH}_c$ ) sarà espresso, noto il valore di  $r$ , dalla:

$$(2) \quad \text{pH}_c = \text{pH}_p + \log r.$$

Esso risulta uguale a 7,303 per il sangue ridotto e di 0,040 inferiore per il sangue ossigenato.

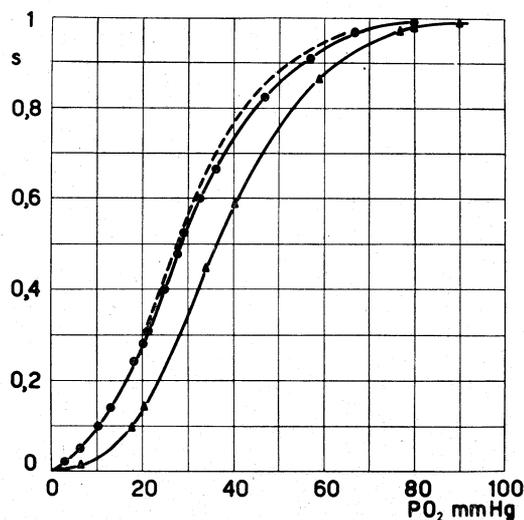


Fig. 1. - Curve di dissociazione per l'O<sub>2</sub> del sangue *in vitro* in presenza  $P_{\text{CO}_2} = 40 \text{ mmHg}$  - ●—●—● ed in assenza di CO<sub>2</sub> - ▲—▲—▲.

La curva tratteggiata rappresenta la funzione corrispondente ad un pH del corpuscolo al valore costante di 7,3 (vedi testo).

Nota la variazione di pH, si può correggere, per ogni valore di saturazione, il valore di  $P_{\text{O}_2}$  corrispondente mediante la (Margaria e coll. [9])

$$(3) \quad \frac{d \log P_{\text{O}_2}}{d \text{pH}} = \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_0} - \frac{[\text{H}^+]}{[\text{H}^+] + K_r}$$

dove  $K_0 = 3,42 \cdot 10^{-7}$  e  $K_r = 1,29 \cdot 10^{-8}$ .

Con questo procedimento si ottiene la curva di dissociazione che il sangue avrebbe qualora il pH nell'interno del corpuscolo rosso fosse mantenuto costante al valore di 7,3 (linea tratteggiata della fig. 1).

## DETERMINAZIONE DEL VALORE DI INTERAZIONE ESTRAMOLECOLARE.

La funzione tratteggiata della fig. 1 dovrebbe essere definita, qualora non vi fosse una interazione estramolecolare (Torelli e coll. [10]), dalla:

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

In presenza di interazione estramolecolare il valore di  $K^*$ , e cioè di  $4K_4$  dell'equazione di Adair, anziché essere costante, dovrebbe aumentare con la saturazione della  $Hb_4$  (Torelli e coll.) [1].

Sono stati quindi calcolati col metodo delle estrapolazioni (Margaria e coll. [3]) i valori  $\frac{1}{m'} K^*$  e  $\frac{1}{m''} K^*$ , che risultarono essere rispettivamente 0,006875 e 0,03925; da questi valori, presupponendo che i quattro emi si trovino ai vertici di un rettangolo e che sia quindi la distanza maggiore  $d''' = \sqrt{d'^2 + d''^2}$ , si può anche calcolare (Torelli e coll. [10])

$$\frac{1}{m'''} K^* = 0,006875 + 0,03925 = 0,046125.$$

È possibile ora calcolare  $K^*$  dalla (4), quando si pongano per semplicità i termini noti

$$(5) \quad \frac{1}{m'} K^* = \alpha \quad , \quad \left(\frac{2}{m'^2} + \frac{1}{m' m''}\right) K^{*2} = \beta \quad , \quad \frac{1}{3} \left(\frac{2}{m'^2 m''} + \frac{1}{m'^2 m'''}\right) K^{*3} = \gamma$$

$$K^* = \frac{S + (4S - 1)\alpha P_{O_2} + (2S - 1)\beta P_{O_2}^2 + (4S - 3)\gamma P_{O_2}^3}{(1 - S)\gamma P_{O_2}^4}$$

I valori di  $K^*$  così calcolati aumentano con l'aumentare della saturazione, mentre diminuisce il valore  $m = \frac{K_u^*}{K_s^*}$  che è l'espressione dell'interazione extramolecolare (Tabella I).

Questi valori indicano che nel sangue a valori fisiologici di pH e forza ionica è presente una modica interazione estramolecolare, inferiore certamente al valore che si poteva desumere dai dati sulle soluzioni di emoglobina e dalla elevata concentrazione del  $Hb_4$  nei corpuscoli.

Nella fig. 2 la saturazione e il valore  $m$  sono posti in relazione alla frazione di  $Hb_4$  contenente almeno un eme ridotto ( $Hb^r$ ), calcolata dalla:

$$(6) \quad \frac{[Hb^r]}{[Hb^{Tot}]} = \frac{[Hb_4] + [Hb_4O_2] + [Hb_4O_4] + [Hb_4O_6]}{[Hb_4] + [Hb_4O_2] + [Hb_4O_4] + [Hb_4O_6] + [Hb_4O_8]}$$

da cui

$$(7) \quad \frac{[\text{Hb}^r]}{[\text{Hb}^{\text{Tot}}]} = \frac{1 + 4\alpha P_{\text{O}_2} + 2\beta P_{\text{O}_2}^2 + 4\gamma P_{\text{O}_2}^3}{1 + 4\alpha P_{\text{O}_2} + 2\beta P_{\text{O}_2}^2 + 4\gamma P_{\text{O}_2}^3 + 4K^* P_{\text{O}_2}^4}$$

Presupponendo la molecola di  $\text{Hb}_4$  puntiforme, la distanza media di ognuna di esse da una molecola contenente almeno un eme ridotto, (Torelli e coll. [1]) sarà:

$$(8) \quad d = \frac{1}{3} \frac{1}{\sqrt{NC}} \times 10^8 \text{ m}\mu$$

dove  $N$  è il numero di Avogadro e  $C$  la concentrazione molare di  $\text{Hb}_4^r$ .

TABELLA I.

Sat	$K_s^*$	$m$
0,1	0,93	2,97
0,2	0,98	2,82
0,3	1,02	2,71
0,4	1,04	2,66
0,5	1,10	2,52
0,6	1,23	2,25
0,7	1,37	2,10
0,8	1,44	1,92
0,9	1,87	1,48
	$K_u^*$	
1,0	2,77	1,00

Nel grafico della fig. 3 questa distanza è stata posta in funzione dei corrispondenti valori di  $m$ , è evidente che  $\log m$  è ancora funzione lineare di  $\log d$  come per le soluzioni di  $\text{Hb}_4$ : tuttavia per gli eritrociti la linea è spostata notevolmente in basso ed a sinistra, denunciando un molto minor valore di  $\log m$ , e quindi di  $m$  per ogni valore di  $d$ .

Il differente comportamento fra  $\text{Hb}_4$  in soluzione e nel corpuscolo era facilmente desumibile anche dal valore empirico  $n$  di Hill che nel presente caso è di 2,95 mentre in soluzione di  $\text{Hb}$  di cavallo al 26 % raggiunge il valore di 3,7 (Milla [11]).

La funzione continua della fig. 3 è espressa 4 dalla:

$$(9) \quad \log m = \log a + 2 \log d.$$

I valori di  $m$  rilevati dalla curva di dissociazione per il sangue verrebbero a coincidere con quelli della funzione (9) se la distanza fra emi interagenti nel sangue ( $d'$ ) venisse corretta di un fattore  $11 \text{ m}\mu$ , per cui:

$$(10) \quad \log m = \log a + 2 \log (d' + 11).$$

Ciò fa supporre che gli emi interreagenti nell' $Hb_4$  legata nell'eritrocita si comportano come gli emi dell' $Hb_4$  libera in soluzione quando questi siano ad una distanza media  $11\text{ m}\mu$  superiore: verosimilmente il comportamento

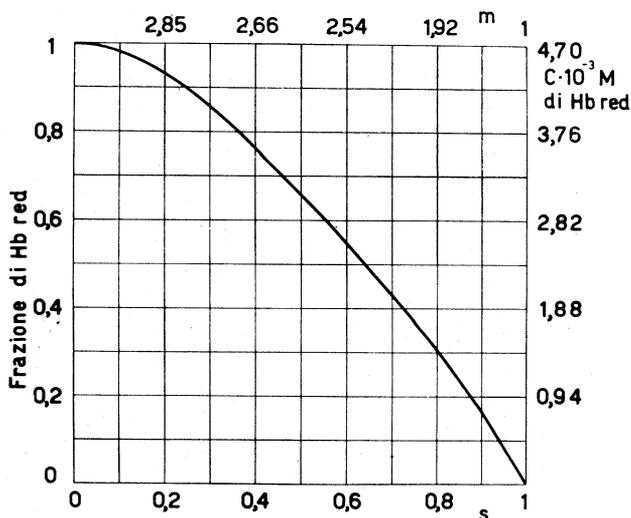


Fig. 2. - Concentrazione molare e frazione dell' $Hb_4$  contenente almeno un eme ridotto posti in funzione della saturazione con i corrispondenti valori di  $m$ .

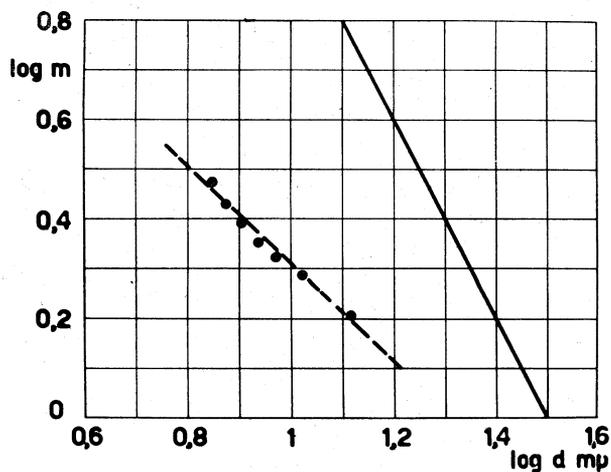


Fig. 3. - Relazione fra  $m$  e distanza media fra le molecole interreagenti.

La linea continua rappresenta la funzione riscontrata su soluzioni di emoglobina.

dell' $Hb_4$  in quest'ultima condizione è legata alla maggiore mobilità delle molecole di  $Hb_4$  e quindi alla maggiore attività inibitoria degli emi ridotti che essa contiene.

È infatti verosimile che le molecole di  $Hb_4$  nel corpuscolo abbiano un definito orientamento che implica una minore mobilità e quindi una minore possibilità di approssimarsi ad emi di altre molecole in soluzione.

Se la mobilità delle molecole di  $Hb_4$  è molto alta l'interazione dovrà inoltre essere riferita ad un valore medio di distanza, che risulta minore di quella corrispondente alla distanza media, poiché l'interazione non è funzione lineare della distanza, ma del suo quadrato.

La distanza fra gli emi di una stessa molecola è espressa dalla (Torelli e coll. [10])

$$(12) \quad d = \sqrt{\frac{a}{m}}.$$

Dai valori di  $m'$  e  $m''$  calcolati sperimentalmente secondo la (4) e dalla (12), raffigurando gli emi ai vertici di un rettangolo, si può calcolare il lato minore ( $d'$ ) e il lato maggiore ( $d''$ ).

Questi valori risultano essere differenti per l' $Hb_4$  in soluzione ( $m' = 160$ ,  $m'' = 120$ ) e per l' $Hb$  degli eritrociti ( $m' = 400$ ,  $m'' = 70$ ).

La molecola di  $Hb_4$  nel corpuscolo rosso risulterebbe cioè più allungata e stretta di quella in soluzione.

Ciò implica che la parte proteica dello stroma interreagisce con la parte proteica della molecola emoglobinica, modificandone la struttura terziaria.

#### BIBLIOGRAFIA.

- [1] G. TORELLI, A. PINI e R. MARGARIA, « Acc. Naz. Lincei », nota 2<sup>a</sup>, ser. 8<sup>a</sup>, XXXVII, 1-2 (1964).
- [2] D. B. DILL, in *Handbook of respiratory data in aviation*, Washington (1944).
- [3] R. MARGARIA, G. TORELLI e A. PINI, « Exp. Med. and Surg. », 21, 127 (1963).
- [4] E. MILLA, G. GIUSTINA e R. MARGARIA, « Giorn. Biochim. », 2, 434 (1953).
- [5] E. MILLA, R. MARGARIA, « Boll. Soc. It. Biol. Sper. », 31, 9 (1955).
- [6] R. MARGARIA e A. GREEN, « J. Biol. Chem. », 102, 611 (1933).
- [7] D. D. VAN SLYKE, H. WU e F. C. MCLEAN, « J. Biol. Chem. », 56, 765 (1923).
- [8] E. ANTONINI, J. WYMAN, M. BRUNORI, E. BUCCI, C. FRONTICELLI, A. ROSSI-FANELLI, « J. Biol. Chem. », 238, 2950 (1963).
- [9] R. MARGARIA, « Clin. Chem. », 9, 745 (1963).
- [10] G. TORELLI, A. PINI e R. MARGARIA, « Acc. Naz. Lincei », nota 3<sup>a</sup>, ser. 8<sup>a</sup>, XXXVII, 3-4 (1964).
- [11] E. MILLA, Comunicazione personale (1962).