
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI
RENDICONTI

ROBERTO RASCHIETTI, GIORGIO MORPURGO, CONCETTA
OCCHIONERO, PAOLO SARTOR, ANTONIO SENNI, ANNA
MARIA TORRACA

Adattamento alla temperatura in Triton cristatus

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.3-4, p.
301-309.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_3-4_301_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/>

SEZIONE III

(Botanica, zoologia, fisiologia e patologia)

Fisiologia. — *Adattamento alla temperatura in Triton cristatus* (*).

Nota (**) di ROBERTO RASCHETTI, GIORGIO MORPURGO, CONCETTA OCCHIONERO, PAOLO SARTOR, ANTONIO SENNI e ANNA MARIA TORRACA, presentata dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — Oxygen dissociation curves of crude haemolysates and of haemolysates purified through filtration by Sephadex of *Triton cristatus* raised at 4°C and 21°C were determined at the pH's of 6.4, 6.8, 7.0, 7.4, 8.0, at different temperatures.

The results confirm previous findings that during acclimatation strong adaptive phenomena occur in the blood of the newts without any change of the molecule of haemoglobin.

The adaptive phenomena are determined by the allosteric action of a small molecule on the haemoglobin. The nature of the molecule has not yet been determined: at present it seems rather unlikely that all the adaptive phenomena are mediated by the concentration of organic phosphates.

Triton cristatus è un anfibio urodelo a vita prevalentemente acquatica. La temperatura del suo habitat può variare durante i cicli stagionali in maniera molto notevole (approssimativamente tra 1-2°C ed i 30°C). Soltanto quando ci si approssima ai 30°C *Triton cristatus* tende ad uscire dall'acqua e a passare in uno stato di vita latente, in condizioni, cioè, di estivazione.

La vita in un tale ambito di temperatura pone all'organismo, oltre alla risoluzione di difficili problemi metabolici, complessi problemi nel trasporto dell'ossigeno. Infatti al variare della temperatura variano le curve di dissociazione dell'emoglobina, il che può provocare o difetti nella saturazione della molecola a livello dei polmoni o, al contrario, l'impossibilità di rilasciare l'ossigeno a livelli dei tessuti.

In un precedente lavoro [1] si è stabilito come, pur restando inalterata la molecola dell'Hb, l'adattamento graduale a diverse temperature cambi la curva di dissociazione in relazione alla temperatura ed al pH (effetto Bohr); cosa unica tra tutti i vertebrati, si è anche visto che l'effetto Bohr può, a seconda della temperatura, assumere valori negativi.

L'adattamento della curva di dissociazione era dovuto chiaramente all'effetto di una piccola molecola che agiva come effettore allosterico.

(*) Istituto Superiore di Sanità. Laboratorio di Chimica Biologica e Istituto di Genetica dell'Università di Roma.

(**) Pervenuta all'Accademia il 19 ottobre 1972.

MATERIALI E METODI

I campioni di sangue prelevati da singoli animali e raccolti in una soluzione 0,9 % di NaCl (contenente EDTA come anticoagulante) sono stati centrifugati una prima volta allo scopo di far precipitare le emazie e di separarle dal siero. Dopo averle lavate con una ulteriore centrifugazione in soluzione fisiologica, le emazie sono state infine trattate con acqua distillata contenente una goccia di CCl_4 e centrifugate a 23.000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall, allo scopo di poter separare gli emolisati dalle membrane plasmatiche. Tutti gli emolisati sono stati poi esaminati mediante elettroforesi in gel d'amido con un sistema tampone a pH 9, secondo Goldberg [2] e ciò perchè, come conseguenza di un polimorfismo genetico, l'Hb di alcuni animali presenta una singola banda « lenta », altri una singola banda « veloce » ed altri ancora ambedue le bande.

Sono stati infine raccolti e diluiti a differenti pH solo i campioni che presentavano una banda lenta.

Le curve di dissociazione sono state ottenute misurando la variazione di assorbimento a 560 nm mediante uno spettrofotometro Beckman DU termoregolato.

Le pressioni parziali dell' O_2 nelle vaschette dello spettrofotometro sono state determinate per mezzo di un apparato manometrico già descritto in un precedente lavoro [3].

Per poter controllare all'inizio di ogni esperimento che l'Hb fosse completamente ridotta si è fatto uso di uno spettrofotometro registratore Beckman ACTA III.

La separazione dell'Hb da eventuali fosfati organici presenti negli emolisati è stata ottenuta per filtrazione attraverso colonne di Sephadex G 25 equilibrate con tampone fosfato al pH desiderato. In un esperimento che aveva lo scopo di dimostrare l'esistenza di un fattore indipendente dell'Hb ma allostericamente attivo su questa molecola, anche se derivate da una specie differente, si è separata l'Hb delle molecole più piccole presenti negli emolisati per mezzo di filtri Amicon del tipo CF50.

Tutto il lavoro è stato effettuato su Tritoni catturati nei dintorni di Roma e dopo un periodo di acclimatazione di un mese alle temperature di 4 e 21°C.

RISULTATI

I grafici delle figg. 1 e 2 mostrano come varia la curva $\log P_{50} = f(\text{pH})$ (che esprime la variazione di affinità delle curve di dissociazione dell'Hb al variare del pH) in funzione sia della temperatura di adattamento che della temperatura cui viene effettuata la misura.

In fig. 3 il grafico mostra la stessa curva su emolisati di Tritone dopo passaggio attraverso una colonna di Sephadex G 25 che, come è noto, separa le molecole proteiche dalle molecole di basso peso molecolare.

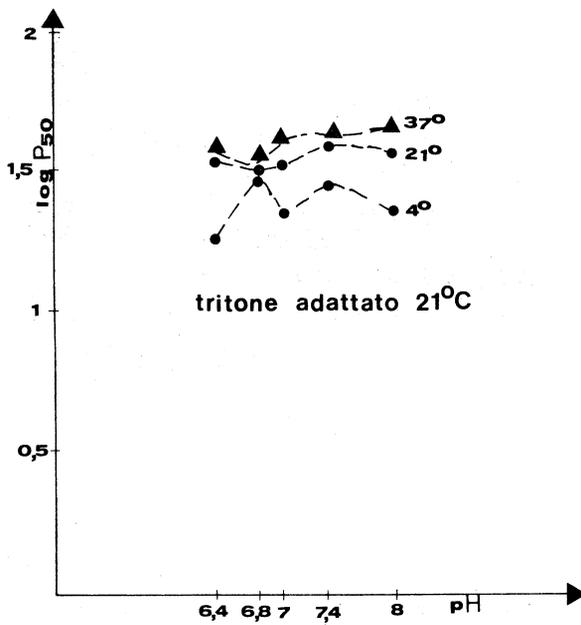


Fig. 1. - Variazione del $\log P_{50}$ in funzione del pH in Tritoni adattati a 21°C. La variazione è stata misurata a 37°C, 21°C e 4°C.

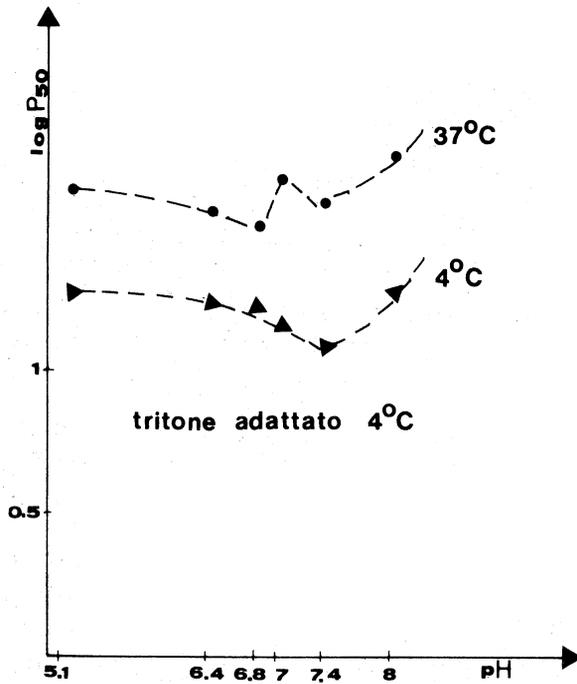


Fig. 2. - Variazione del $\log P_{50}$ in funzione del pH in Tritoni adattati a 4°C. La variazione è stata misurata a 4°C e 37°C.

Dall'esame dei grafici risulta evidente che l'andamento della curva dipende 1) dalla temperatura cui è stato adattato l'animale, 2) dalla temperatura cui vengono effettuate le misure, 3) dalla presenza o meno, negli emolisati, di piccole molecole: quando l'emolisato sia privo di queste la forma della curva rimane pressoché identica quale che sia la temperatura cui viene effettuata la misura.

È stata anche osservata la variazione della pressione di O_2 che assicura la semisaturazione in relazione alle differenti temperature cui è effettuata la misura e alle temperature cui sono stati adattati i Tritoni (queste misure sono state effettuate ai due pH 6,8 e 7,4).

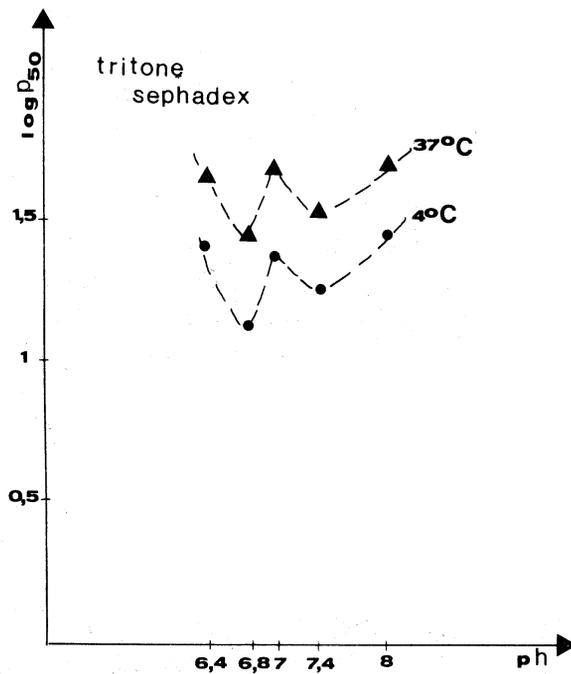


Fig. 3. - Variazione del log P_{50} in funzione del pH in emolisati di Tritone passati per Sephadex. La variazione è stata misurata a 4°C e 37°C.

I risultati sono riportati nella fig. 4 in cui si trovano i dati relativi a tritoni adattati a 4°C e 21°C ed a emolisati passati per Sephadex.

Anche in questo caso si vede che la temperatura di adattamento influisce sull'andamento delle curve e che l'effetto è differente ai due pH. Gli effetti dell'andamento dipendono dalla presenza di piccole molecole dal momento che il P_{50} rimane inalterato alle differenti temperature sugli emolisati passati per Sephadex.

La presenza di un fattore diverso dall'emoglobina attivo su questa in maniera « specie aspecifica » è stata anche dimostrata con il seguente esperimento: un emolisato di sangue di Tritone è stato filtrato attraverso un filtro

Amicon del tipo CF50 capace di trattenere le molecole di peso molecolare superiore a 50.000.

0,2 ml di filtrato sono stati aggiunti ad un emolisato sempre di Tritone passato per Sephadex (Conc. Hb $0,012 \times 10^{-3} M$). L'aggiunta del filtrato ha provocato lo spostamento nella direzione delle curve di dissociazione e dell'effetto Bohr, come si può vedere dalle fig. 5 (a e b).

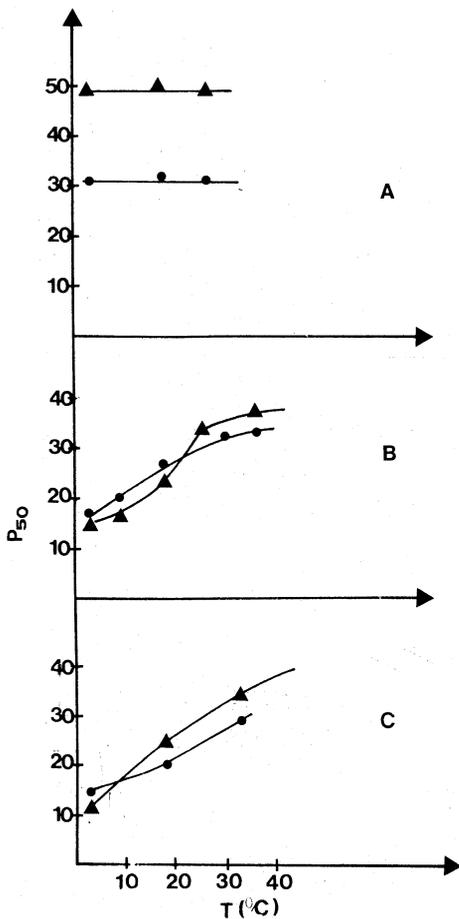


Fig. 4. - Variazione del P_{50} al variare della temperatura in emolisati di tritone:

- A) emolisati di Tritone passati per Sephadex;
- B) Tritoni adattati a $21^{\circ}C$;
- C) Tritoni adattati a $4^{\circ}C$;
- pH 6,8;
- ▲ pH 7,4.

L'esperimento è stato ripetuto in un secondo momento utilizzando però un emolisato passato per Sephadex di *Carassius auratus* (Canc. Hb $0,020 \times 10^{-3} M$). Anche in questo caso, fig. 6 (a e b) l'aggiunta di ultrafiltrato di Tritone ha provocato una variazione di affinità per O_2 nelle curve del Carassio.

È noto [4] che i fosfati organici esercitano una azione di tipo allosterico sull'Hb. Poiché i pesci e gli anfibi urodela hanno ATP come principale fosfato organico dei globuli rossi [5], si è voluto vedere se l'aggiunta di quantità crescenti di ATP ad un emolisato passato per Sephadex modificasse l'effetto Bohr in maniera simile a quello che si osserva come conseguenza dell'adattamento. Le curve sono state fatte ai pH di 6,8 e 7,4 ed alla temperatura di $4^{\circ}C$.

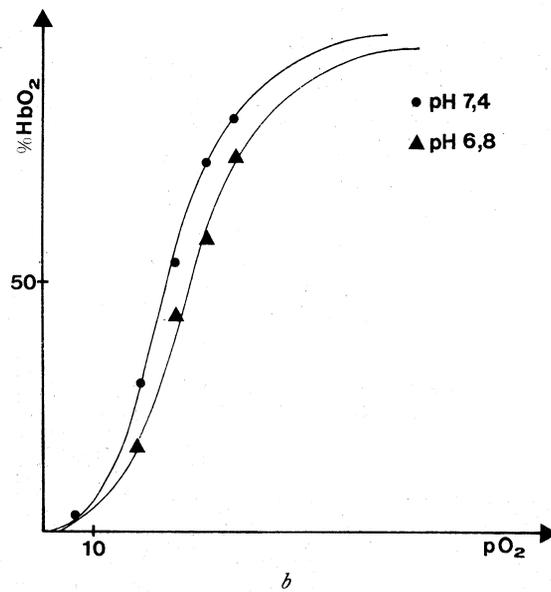
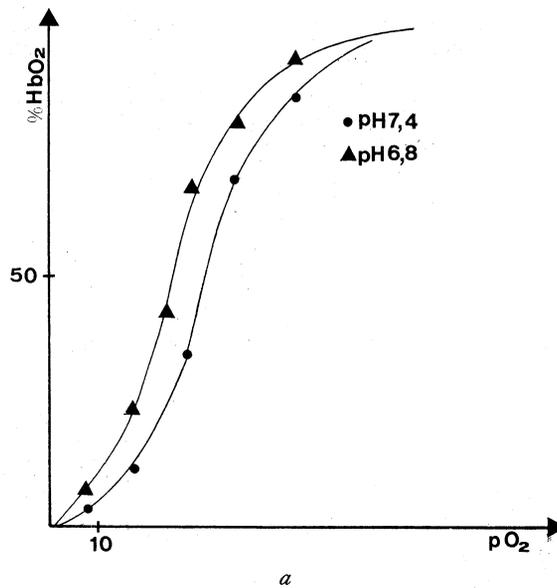


Fig. 5. - a) Curve di dissociazione dell'Hb di Tritone purificata per Sephadex.
b) Curve di dissociazione dell'Hb di Tritone purificata per Sephadex con l'aggiunta di ultrafiltrato di Tritone adattato a 4°C.

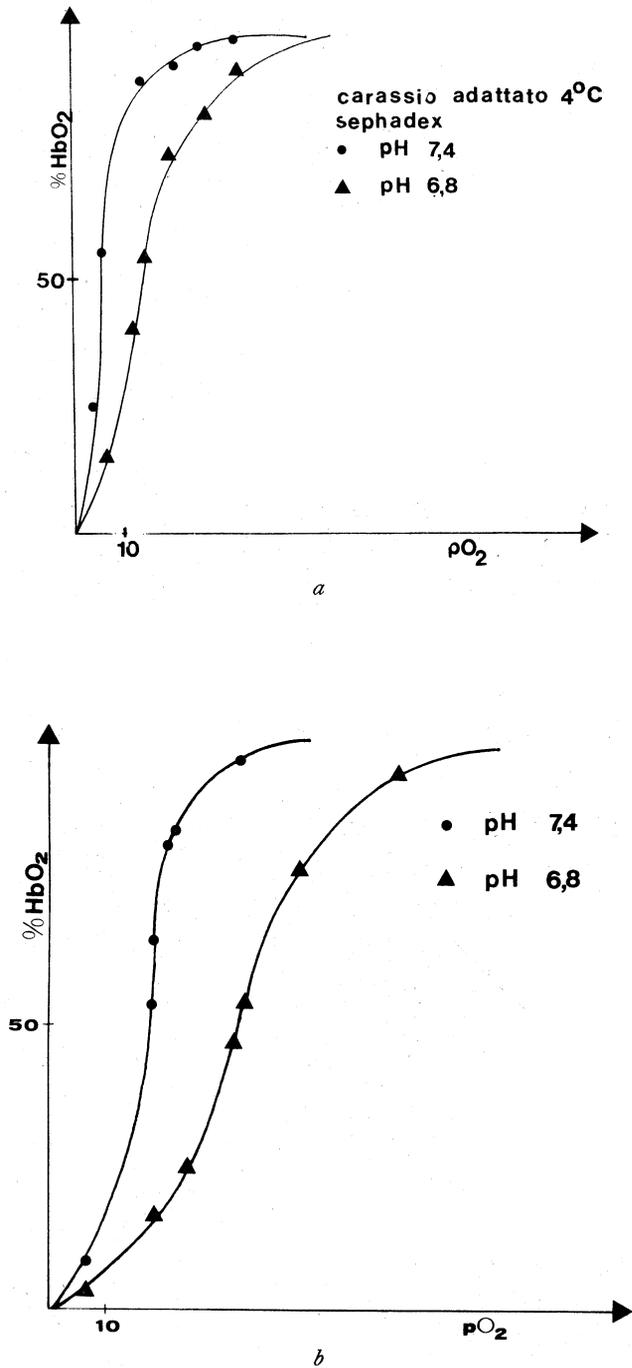


Fig. 6. - a) Curve di dissociazione di *Carassius auratus* con Hb purificata mediante Sephadex. b) Curve di dissociazione di *Carassius auratus* con Hb purificata mediante Sephadex e con aggiunta di ultrafiltrato di Tritone adattato a 4°C.

I risultati sono riportati nella fig. 7 come differenza di affinità tra le curve fatte ai due pH in relazione al rapporto molare ATP/Hb.

Si vede in realtà che l'aggiunta di quantità crescenti di ATP modifica l'effetto Bohr da negativo a positivo come in effetti accade durante l'adattamento. Vi sono tuttavia due considerazioni che fanno sussistere dei dubbi che l'ATP sia l'unico effettore allosterico attivo nel modulare l'adattamento respiratorio alla temperatura nei Tritoni:

1) per ottenere la stessa intensità di effetto Bohr che si osserva in seguito ad adattamento alla temperatura di 4°C è necessaria una elevata quantità di ATP (è necessario un rapporto ATP/Hb pari a 4);

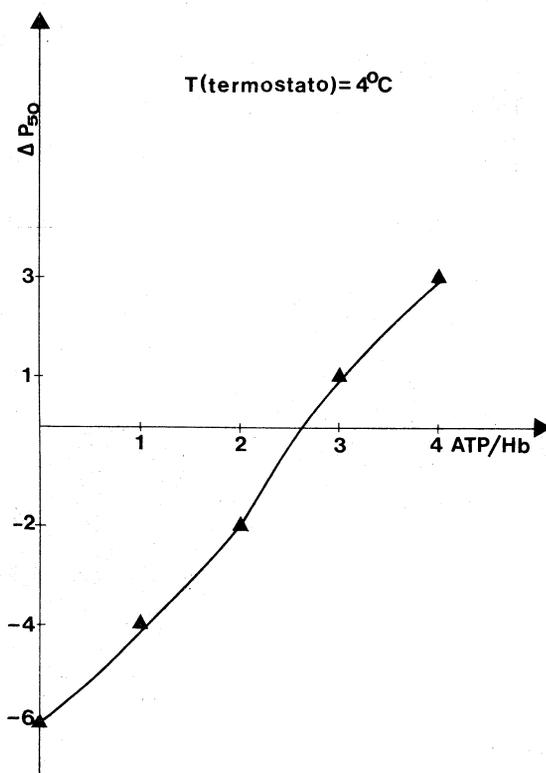


Fig. 7. - Variazione dell'intensità dell'effetto Bohr in relazione al rapporto ATP/Hb in emolisati di Tritone.

2) le curve di dissociazione ottenute aggiungendo ATP ad emolisati di Tritoni passati per Sephadex sono più affini di quelle osservate per l'adattamento di Tritoni a 4°C.

Questo esperimento comunque porta a concludere che l'emoglobina di Tritone si comporta rispetto ai fosfati organici in maniera differente dalla Hb umana. Infatti l'Hb umana, quando si lavora in concentrazione 0,1 M di fosfato, è praticamente insensibile all'azione dei fosfati organici [6] mentre l'affinità dell'Hb di Tritone continua a variare col crescere della concentrazione dell'ATP.

Per chiarire questi punti saranno necessarie ulteriori ricerche. Per quanto riguarda poi l'interpretazione a livello fisiologico dei fenomeni osservati non è possibile per il momento arrivare a conclusioni definitive per la mancanza di un dato essenziale e, cioè, la conoscenza del pH a livello arterioso e a livello dei tessuti in Tritoni adattati alle diverse temperature e si tratta di un dato che è oltremodo difficile ottenere.

In mancanza di questi dati non si può che confermare in via provvisoria le conclusioni precedentemente raggiunte che la comparsa di un effetto Bohr negativo ad alte temperature costituisce una forma di adattamento fisiologico per diminuire, nello stato di estivazione, la cessione di O₂ ai tessuti e passare così in uno stato di vita latente.

Ringraziamenti. — Si ringrazia il sig. Giuseppe Conti per l'abile assistenza tecnica.

BIBLIOGRAFIA

- [1] G. MORPURGO, P. A. BATTAGLIA e T. LEGGIO, «Nature», 225, 5227 (1970).
- [2] C. A. GOLDBERG, «Clin. Chem.», 4, 485 (1958).
- [3] T. LEGGIO e G. MORPURGO, «Ann. Ist. Super. Sanità», 4, 373 (1968).
- [4] R. BENESH e R. E. BENESH, «Nature», 221, 619 (1969).
- [5] E. ANTONINI, G. AMICONI e M. BRUNORI, *Oxygen affinity of hemoglobin and red cells acid basis status*. M. Rorth and E. Astrup ed., Munksgaard, Copenhagen 1972.
- [6] S. RAPOPORT e G. GUEST «J. Biol. Chem.», 138, 269 (1941).