

---

ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI  
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI  
**RENDICONTI**

---

CONCETTA OCCHIONERO, GIORGIOE MORPURGO,  
ROBERTO RASCHETTI, PAOLO SARTOR, ANTONIO SENNI,  
ANNA MARIA TORRACCA

**Adattamento respiratorio alla temperatura in  
*Carassius auratus***

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,  
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 53 (1972), n.3-4, p.  
310-315.*

Accademia Nazionale dei Lincei

<[http://www.bdim.eu/item?id=RLINA\\_1972\\_8\\_53\\_3-4\\_310\\_0](http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1972_8_53_3-4_310_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.** — *Adattamento respiratorio alla temperatura in Carassius auratus* (\*). Nota (\*\*) di CONCETTA OCCHIONERO, GIORGIO MORPURGO, ROBERTO RASCHETTI, PAOLO SARTOR, ANTONIO SENNI e ANNA MARIA TORRACCA, presentata dal Socio G. MONTALENTI.

SUMMARY. — The variation of the oxygen dissociation curves of haemolysates during acclimatation has been studied on *Carassius auratus* raised at 4°C, 21°C and 37°C.

The results show that acclimatation produces a strong change of the affinity of haemolysates to O<sub>2</sub>.

The change is due to the presence of a small molecule with allosteric effect.

The observed variation has a physiological adaptive value if life at high temperature causes a change in blood pH as observed in other poikilothermal animals.

*Carassius auratus*, il comune pesce rosso, è un animale acquatico capace di vita attiva in un ambito di temperatura molto vasto e cioè tra circa 0°C e 40°C. Nel presente studio si esaminano i fenomeni di adattamento respiratorio, a livello dell'emoglobina, di Carassi allevati a differenti temperature.

È ben noto che in una grande varietà di organismi [1] con il variare della temperatura corporea varia profondamente l'affinità dell'emoglobina per l'O<sub>2</sub>. Inoltre con l'aumentare della temperatura diminuisce la solubilità dell'O<sub>2</sub> nell'acqua mentre aumenta il metabolismo dell'animale. Questi fatti congiunti portano certamente, ove non intervengano meccanismi compensatori, a gravissime difficoltà respiratorie.

Precedenti ricerche su *Triton cristatus* hanno tuttavia dimostrato la possibilità di modificare l'affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub> in seguito a stimoli ambientali.

Lo scopo della presente ricerca è quello di vedere se anche in un'altra specie animale si osservano fenomeni di adattamento del tipo di quelli osservati nel *Triton cristatus*.

#### MATERIALI E METODI

I Carassi sono stati allevati in vasche termostatate ed areate alle temperature di 4°C, 21°C e 37°C. Tutte le osservazioni sono state effettuate dopo un periodo minimo di permanenza di un mese alle temperature suindicate.

Il sangue prelevato da singoli animali è stato raccolto in una soluzione allo 0,9 % di NaCl (contenente EDTA come anticoagulante) e centrifugato una prima volta per poter rimuovere il siero. Dopo un'ulteriore centrifuga-

(\*) Istituto Superiore di Sanità: Laboratorio di Chimica Biologica. Istituto di Genetica dell'Università degli studi di Roma.

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

zione in soluzione fisiologica avente per scopo il lavaggio delle emazie, queste sono state risospese in acqua distillata e centrifugate a circa 23.000 g in una centrifuga refrigerata Sorvall per rimuovere gli emolisati dalle membrane plasmatiche. Gli emolisati così ottenuti da 25 Carassi sono stati poi esaminati mediante elettroforesi su gel d'amido a pH 9 secondo Goldberg [2]. Gli emolisati di 2 campioni sono stati anche esaminati per elettroforesi su gel di poliacrilammide; in questo caso le corse elettroforetiche sono state eseguite in accordo ad Ornstein [3] e Davis [4]. La concentrazione di acrilammide è stata del 7,5 %; le composizioni delle soluzioni per i gel e per i tamponi sono descritte nei fogli informativi della Shandon Scientific Company, per un sistema gel-tampone a pH 9,5.

In tutte queste analisi il risultato è stato che l'Hb di *Carassius auratus* presenta una singola banda elettroforetica.

In alcuni esperimenti dove era necessario separare l'Hb dalle piccole molecole presenti nell'emolisato si è fatto uso della tecnica di filtrazione attraverso Sephadex G 25.

Le curve di dissociazione sono state determinate facendo uso di tamponi fosfati ai pH di 6,1, 6,4, 6,8, 7, 7,4, e 6,8 mediante una tecnica precedentemente descritta [5]. Per controllo si è sempre esaminato, prima e dopo aver fatto le curve di dissociazione, lo spettro dell'Hb nella regione compresa tra 500 e 650 nm (con uno spettrofotometro Beckman ACTA III) allo scopo di accertare la presenza di metaemoglobina. Nei casi in cui vi fosse una quantità apprezzabile di metaemoglobina il dato non è stato utilizzato.

## RISULTATI

Le figg. 1, 2 e 3 esprimono la variazione del logaritmo della pressione di semisaturazione ( $\log P_{50}$ ) in funzione del pH in Carassi adattati, rispettivamente, a 4°C, 21°C e 37°C.

Risulta chiaro come la differente acclimatazione produca una profonda variazione nell'andamento delle curve che esprimono l'affinità dell'Hb per l'ossigeno in funzione del pH. L'esperimento è stato condotto a due o tre temperature di termostatazione per poter vedere contemporaneamente anche la variazione d'affinità in relazione alla temperatura cui si effettua la misura.

Poiché le profonde variazioni nel comportamento dell'Hb non corrispondono ad una variazione elettroforetica della velocità di migrazione della molecola, tali variazioni si devono attribuire, verosimilmente, alla presenza di piccole molecole che alterano il comportamento della Hb.

Si è potuto esaminare il comportamento dell'Hb dopo passaggio su colonne di Sephadex G 25 equilibrate ai vari pH (fig. 4). Il sangue è stato prelevato da Carassi allevati a 21°C. Come si vede le curve risultano profondamente modificate rispetto a quelle dell'emolisato di partenza, confermando l'ipotesi che il comportamento dell'Hb è determinato dalla presenza di piccole molecole con azione allosterica.

Quanto dipenda la curva di affinità dell'emolisato di Carassio dalla presenza di piccole molecole di vede ancor più chiaramente nella fig. 5 ove vengono direttamente confrontate le curve di dissociazione di un Carassio adattato a 4°C prima e dopo passaggio per Sephadex. La temperatura cui è stato effettuato l'esperimento è di 4°C.

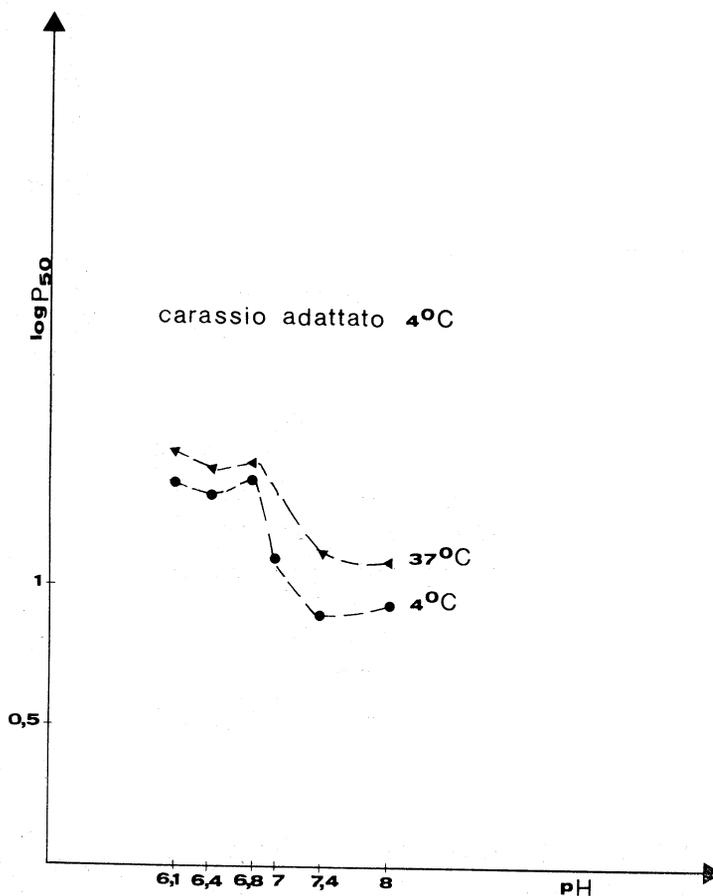


Fig. 1. - Variazione del  $\log P_{50}$  in funzione del pH in Carassi adattati a 4°C. La variazione è stata misurata a 4°C ed a 37°C.

Da un punto di vista fisiologico i dati su riportati spiegano l'adattamento respiratorio dei Carassi purché si ammetta che ad una variazione della temperatura di acclimatazione corrisponda anche una variazione di pH, nel senso di un abbassamento di questo nei pesci allevati ad alte temperature. Infatti i pesci acclimatati a 4°C hanno un massimo di effetto Bohr tra i pH di 7 e 7,4 mentre i pesci acclimatati a 37°C presentano un massimo tra i pH di 6,4 e 6,8.

Per quanto manchino i dati a riguardo, è plausibile che ciò sia quanto realmente avviene. È noto infatti [6], [7], che gli animali eterotermi non

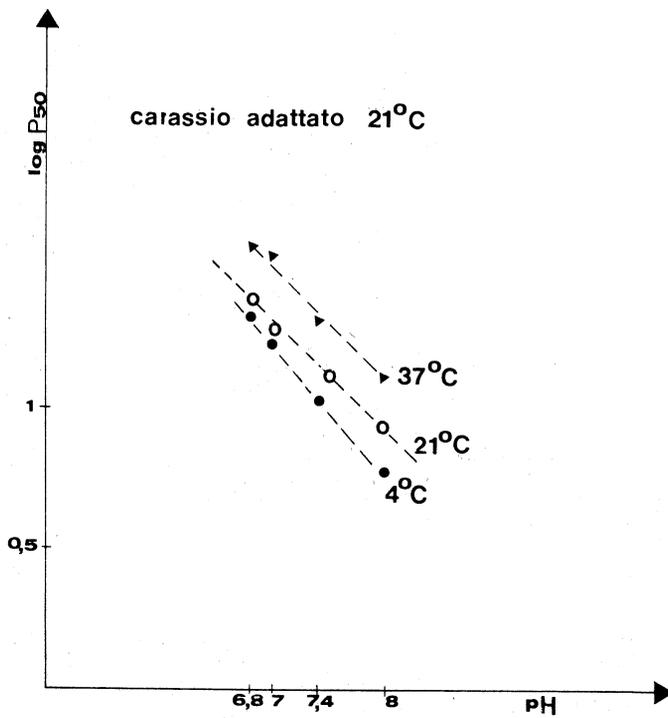


Fig. 2. - Variazione del  $\log P_{50}$  in funzione del pH in Carassi adattati a 21°C. La variazione è stata misurata a 4°C, 21°C e 37°C.

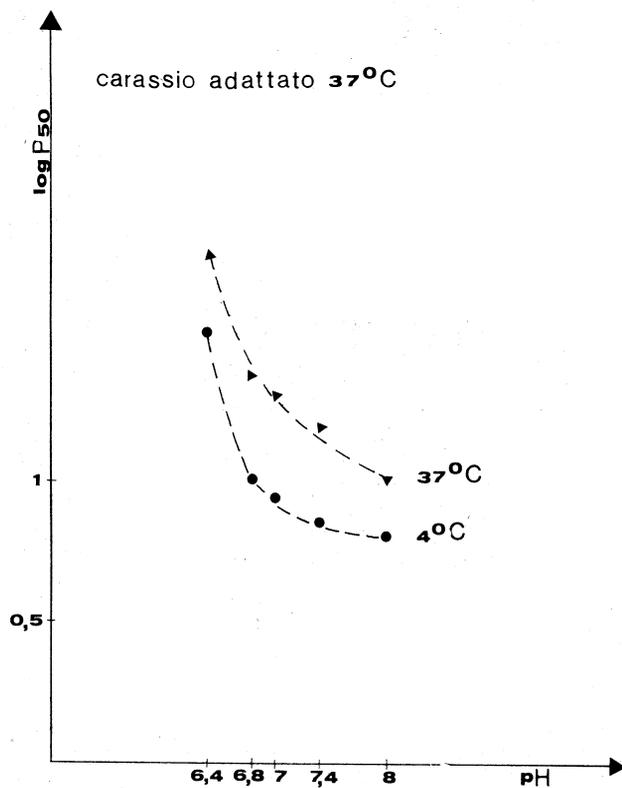


Fig. 3. - Variazione del  $\log P_{50}$  in funzione del pH in Carassi adattati a 37°C. La variazione è stata misurata a 4°C e 37°C.

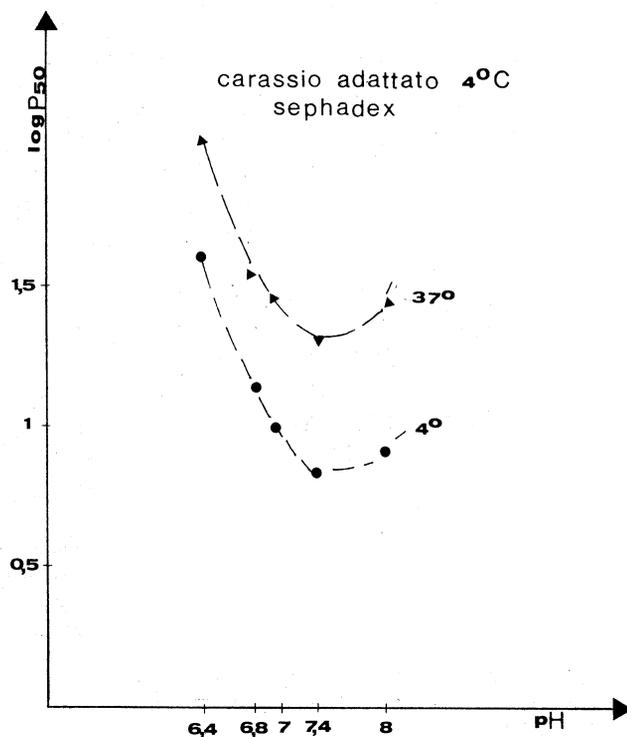


Fig. 4. - Variazione del log P<sub>50</sub> in funzione del pH in emolisi di Carassius purificati mediante Sephadex. La variazione è stata misurata a 4°C e 37°C.

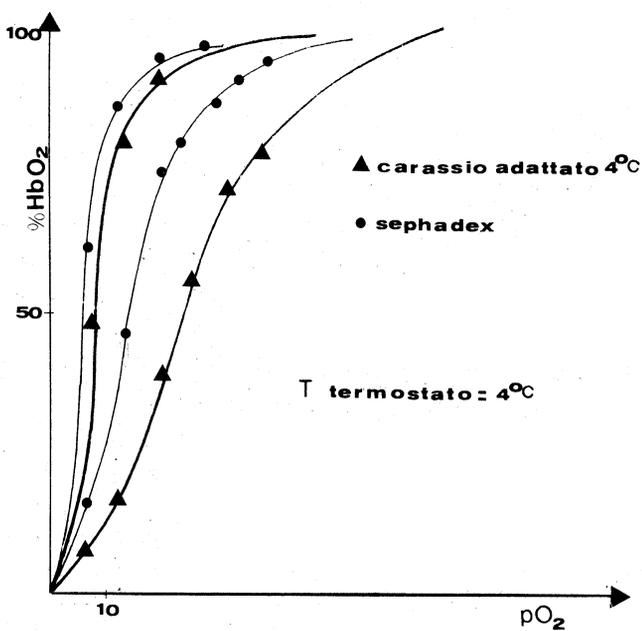


Fig. 5. - Curve di dissociazione di emolisi di Carassius adattato a 4°C: ▲ prima di Sephadex; ● dopo Sephadex.

hanno come gli animali omeotermi la costanza del pH corporeo e sembra che sia l'aumento della temperatura, sia l'ipossia portino ad una diminuzione di questo, forse a causa di un'aumentata produzione di lattato ed un'aumentata liberazione di CO<sub>2</sub>.

Ove si considerino i risultati raggiunti sui *Triton cristatus* [8] e l'esperimento riportato precedentemente [9], in cui filtrato di emolisato di Tritone è stato aggiunto a emolisato di Carassio filtrato per Sephadex, si può concludere 1) che il sistema generale di adattamento dell'Hb negli animali eterotermi avviene attraverso variazioni nella concentrazione di una piccola molecola che agisce allostericamente sull'Hb; 2) che il sistema è largamente « specie aspecifico ».

È ormai ben noto [10], [11], che i fosfati organici agiscono come effettori allosterici dell'Hb in tutti i vertebrati. È tuttavia praticamente certo [12], [13], [14], che esiste un secondo sistema di natura sconosciuta capace anch'esso di regolare l'affinità dell'Hb per l'O<sub>2</sub>. Saranno comunque necessarie ulteriori ricerche per poter stabilire con esattezza la natura di questo secondo sistema di regolazione.

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

#### BIBLIOGRAFIA

- [1] G. MORPURGO, L. BERNINI, P. BATTAGLIA, A. M. PAOLUCCI, G. MODIANO e T. LEGGIO « *Giornale Botanico Italiano* », 104, 4 (1970).
- [2] C. A. GOLDBERG, « *Clin. Chem.* », 4, 485 (1958).
- [3] L. ORNSTEIN, « *Ann. N.Y. Acad. Sci.* », 121, 321 (1964).
- [4] B. DAVIS, « *Ann. N.Y. Acad. Sci.* », 121, 404 (1964).
- [5] T. LEGGIO e G. MORPURGO, « *Ann. Ist. Super. Sanità* », 4, 373 (1968).
- [6] E. D. ROBIN, « *Nature* », 195, 4838 (1962).
- [7] S. C. WOOD e K. JOHANSEN, « *Nature* », 237, 278 (1972).
- [8] G. MORPURGO, P. BATTAGLIA e T. LEGGIO, « *Nature* », 225, 5227 (1970).
- [9] R. RASCHETTI, G. MORPURGO, C. OCCHIONERO, P. SARTOR, A. SENNI e A. M. TORRACCA, « *Atti Accademia Naz. dei Lincei* », in stampa.
- [10] A. CHANUTIN e R. R. CURNISH, « *Arch. Biochem. Biophys.* », 121, 96 (1967).
- [11] R. BENESH e R. E. BENESH, « *Nature* », 221, 619 (1969).
- [12] G. MORPURGO, P. BATTAGLIA, L. BERNINI, A. M. PAOLUCCI e G. MODIANO, « *Nature* », 227, 5256 (1970).
- [13] P. BATTAGLIA, G. MORPURGO e S. PASSI, « *Experientia* », 27, 321 (1971).
- [14] M. ALBERTI, P. M. EMERSON, J. H. DARLEY e T. D. R. HOCKADAY, « *The Lancet* », 26 agosto 1972.