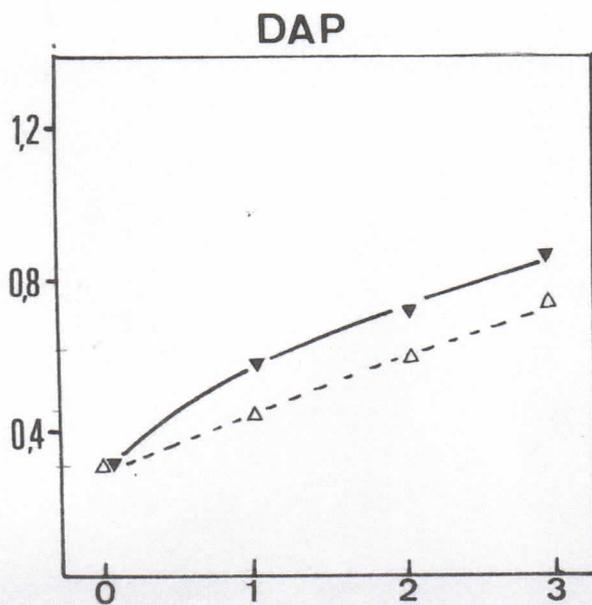
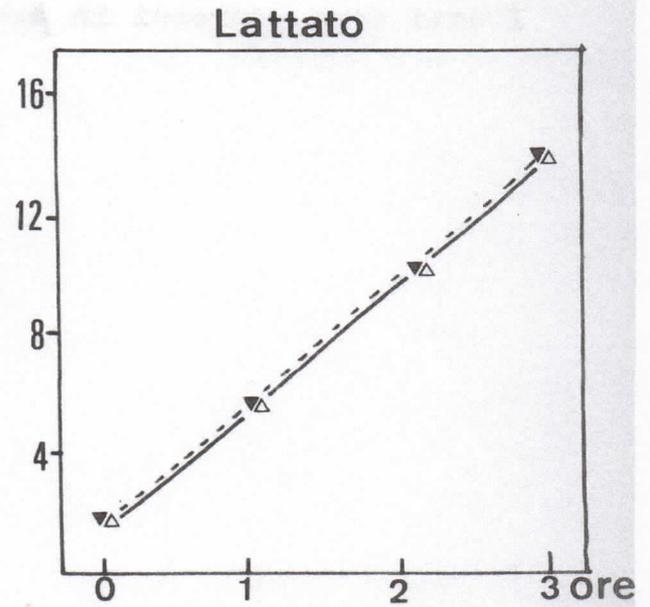
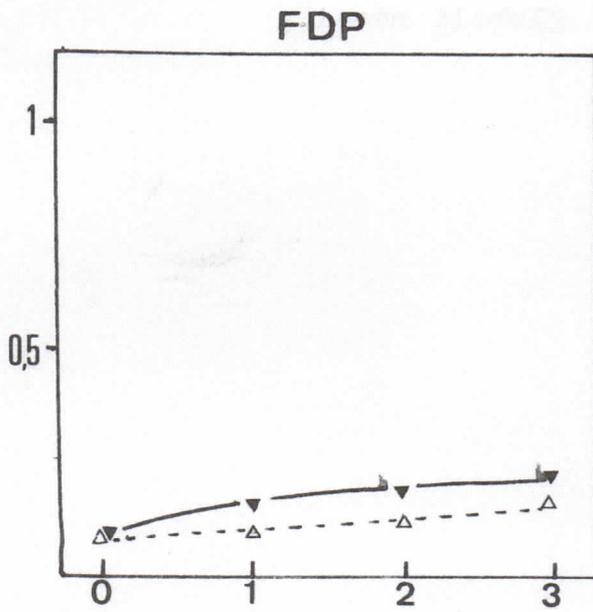
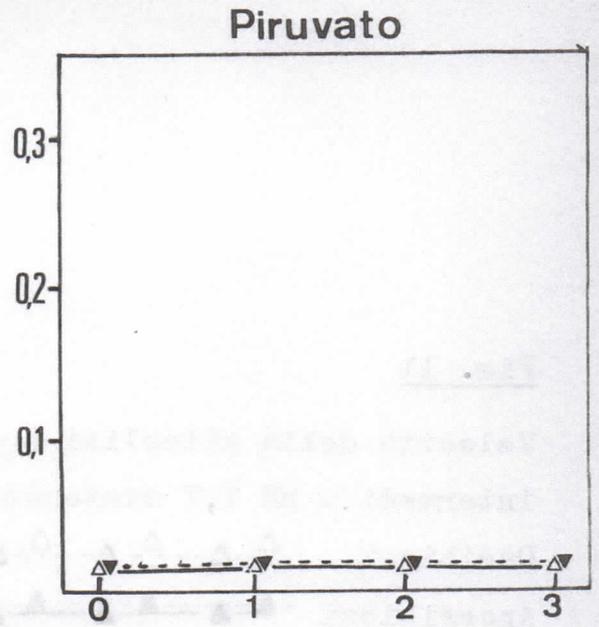
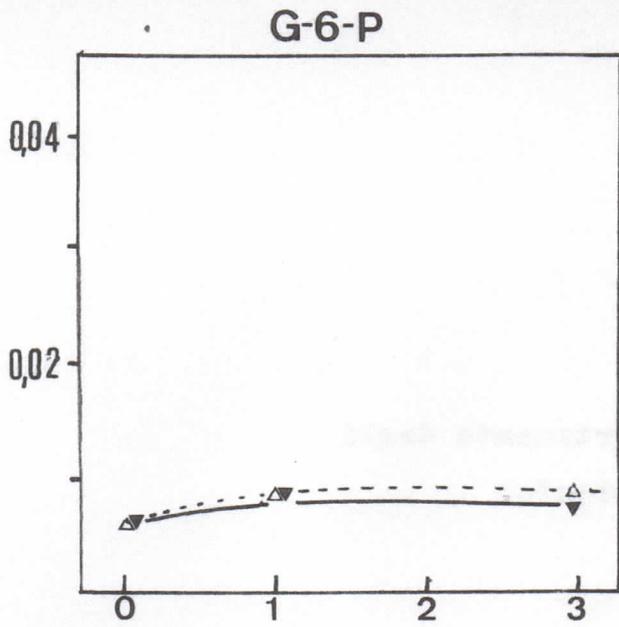


Fig.10



pH 7,5

Fig. 11

Velocità della glicolisi e comportamento degli intermedi a pH 7,7 mantenuto costante.

Ossibiosi      --Δ---Δ---Δ--

Anossibiosi    --▲---▲---▲--

I dati sono espressi in  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

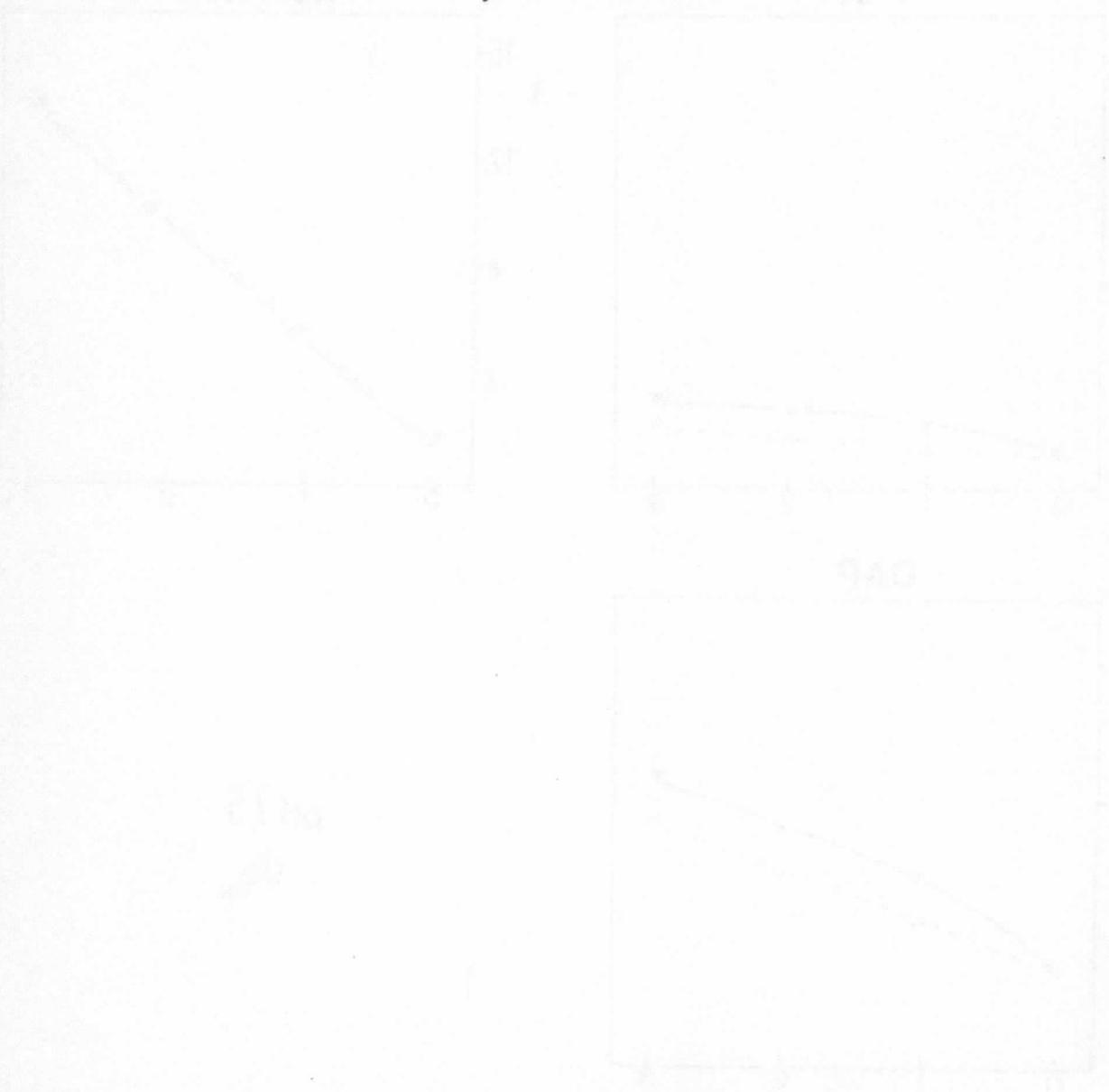
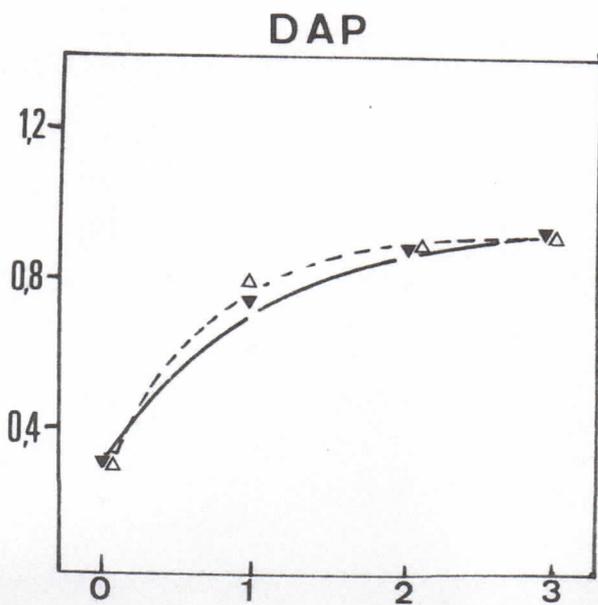
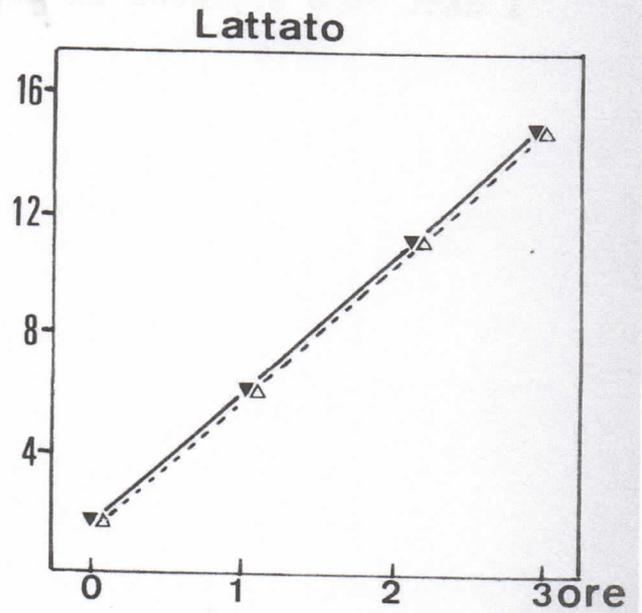
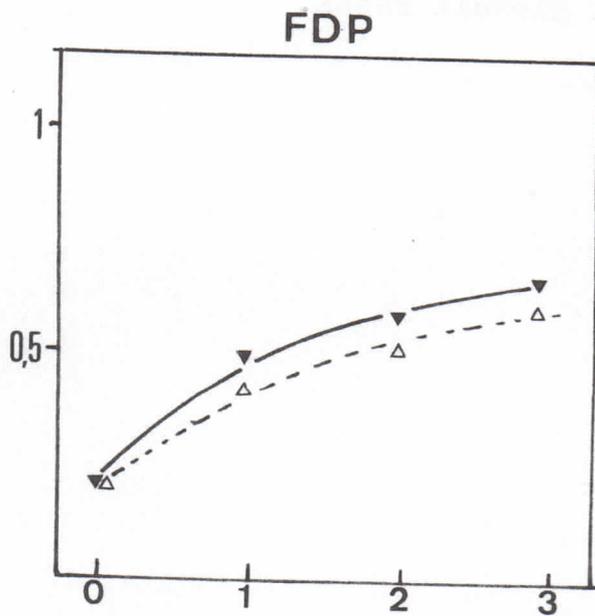
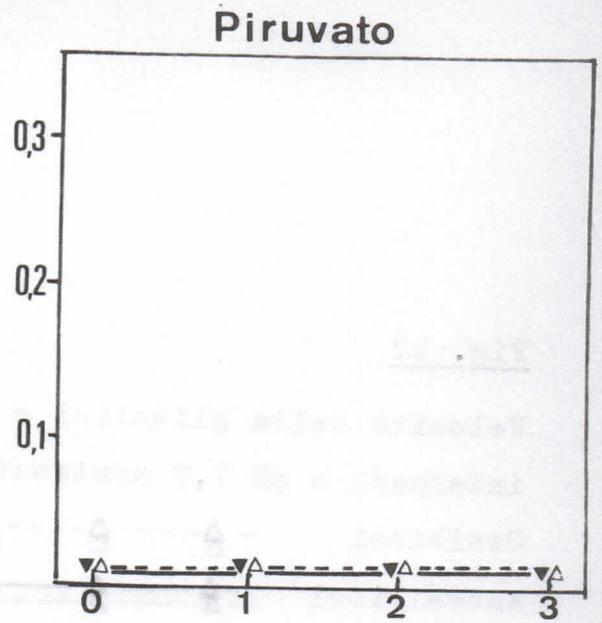
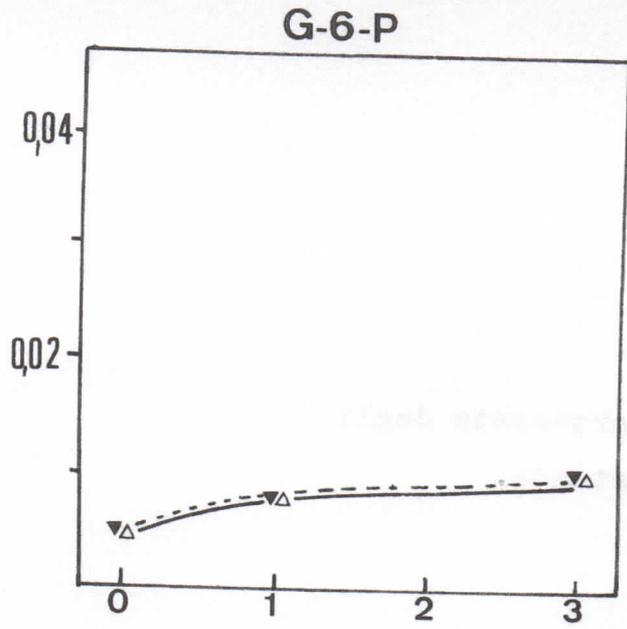


Fig.11



pH 7,7

Fig. 12

Velocità della glicolisi e comportamento degli intermedi a pH 7,9 mantenuto costante.

Ossibiosi       $-\Delta-----\Delta-----\Delta--$

Anossibiosi     $-\blacktriangle-----\blacktriangle-----\blacktriangle--$

I dati sono espressi in  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

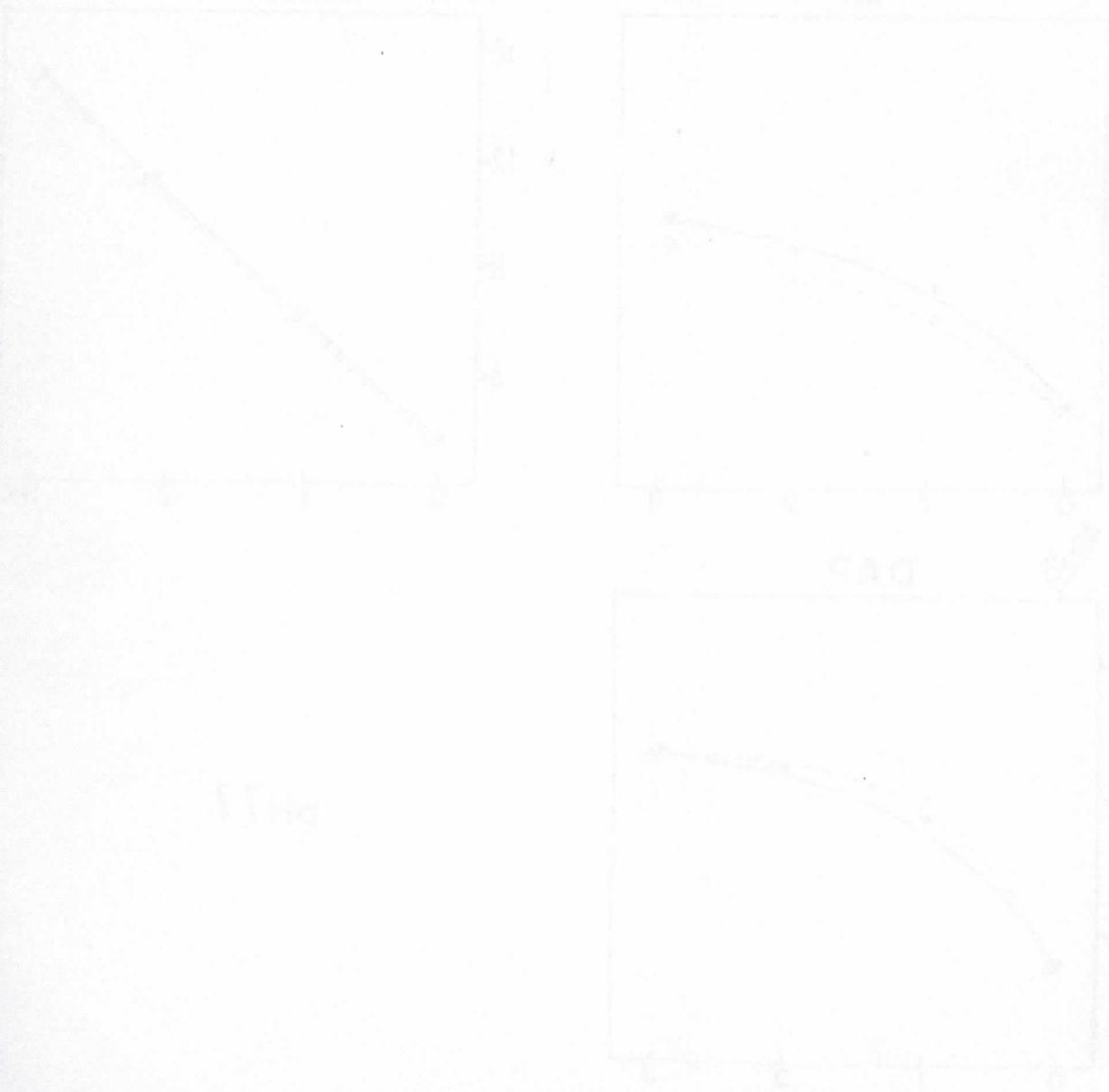
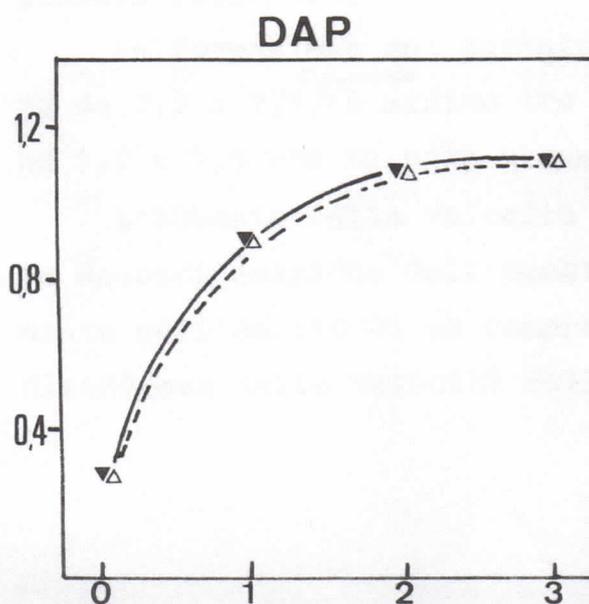
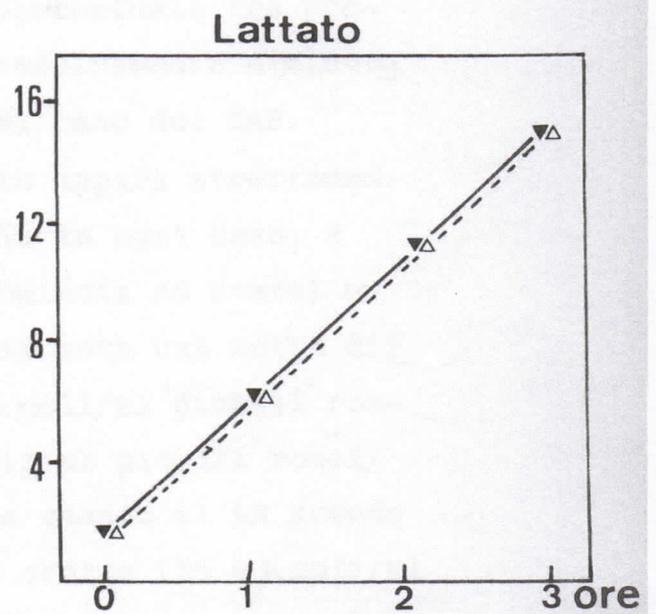
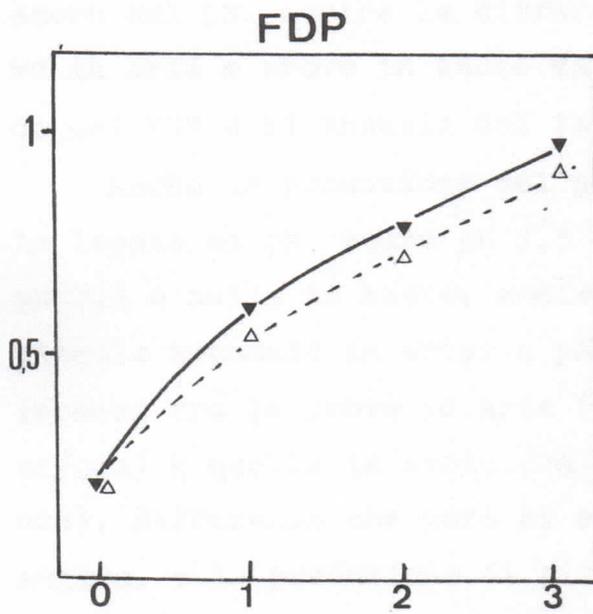
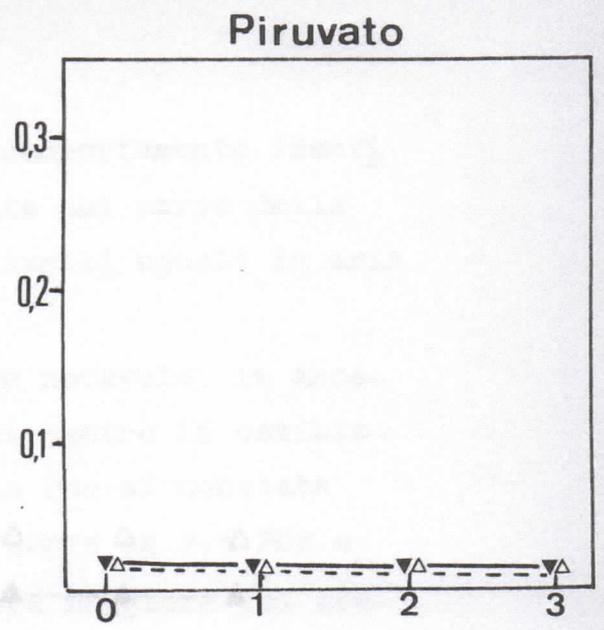
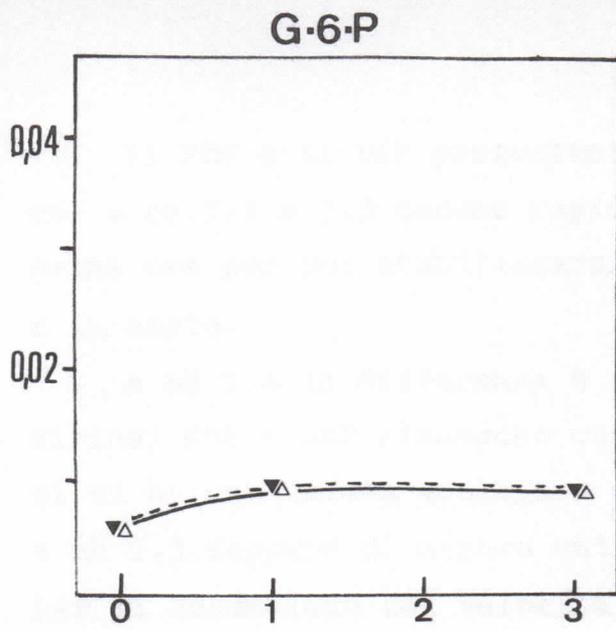


Fig.12



pH 7,9

Il FDP e il DAP presentano un comportamento identico: a pH 7,2 e 7,3 cadono rapidamente nel corso della prima ora per poi stabilizzarsi a livelli uguali in aria e in azoto.

A pH 7,4 la differenza è invece notevole: in anossibiosi FDP e DAP rimangono costanti mentre in ossibiosi si ha una caduta analoga a quella che si constata a pH 7,3 seppure di minore entità. Sopra pH 7,5 FDP e DAP si accumulano con velocità sempre maggiore col crescere del pH, mentre la differenza percentuale tra prove in aria e prove in azoto va progressivamente diminuendo nel FDP e si annulla del tutto nel caso del DAP.

Anche la produzione del piruvato appare strettamente legata al pH: sopra pH 7,5 è nulla in ogni caso, a pH 7,4 è nulla in azoto, mentre incomincia ad aversi un piccolo accumulo in aria; a pH 7,3 si nota una netta differenza tra le prove in aria (70  $m\mu$  moli/ml globuli rossi/ora) e quelle in azoto (25  $m\mu$  moli/ml globuli rossi/ora), differenza che però si annulla quando il pH scende ancora, e la produzione di piruvato cresce (85  $m\mu$  moli/ml globuli rossi/ora).

La formazione del lattato aumenta col crescere del pH da 7,2 a 7,7, <sup>l'aumento</sup> è minimo tra pH 7,5 e 7,7, mentre tra pH 7,7 e 7,9 non si nota alcuna differenza.

L'aumento della velocità della glicolisi dovuto alla desossigenazione dell'emoglobina si manifesta unicamente nell'ambito di pH compreso tra 7,2 e 7,5 in cui la dipendenza della velocità della glicolisi dal pH è note-

vole e scompare a pH 7,5 e oltre.

Concludendo si può dire che la desossigenazione provoca il suo effetto massimo a pH 7,2 per quello che riguarda il G-6-P, e ad un pH compreso tra 7,3 e 7,4 per quello che riguarda gli altri metaboliti e la produzione di lattato.

### 3) Effetto del piruvato sulla glicolisi

E' stato infine indagato l'effetto del piruvato sulla glicolisi.

Nelle Fig. 13 e 14 sono indicati i risultati di uno dei nostri esperimenti che si svolgeva con pH iniziale di 7,3 non mantenuto costante. Il piruvato (concentrazione finale 0,12 mM) era aggiunto immediatamente prima del glucosio. La linea continua indica l'andamento di una prova senza piruvato nelle medesime condizioni.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche a pH più elevato (7,4 - 7,5), sia che il piruvato venisse aggiunto prima o dopo il glucosio e anche con concentrazioni più elevate (3mM). Quando il piruvato era aggiunto dopo il glucosio si poteva vedere come la caduta del DAP e del FDP fosse rapidissima.

L'esame delle Fig. 13 e 14 permette di constatare come, mentre l'aggiunta di piruvato modifica di poco la produzione di lattato (che è un po' diminuito), è del tutto senza effetto sul livello del G-6-P, e invece è molto efficace su quello del FDP e DAP che cadono con grande rapidità. Da notarsi che mentre in assenza di pi

... e scendere a pH 7,3 e oltre.  
 ... al fine che la deossigenazione pro-  
 ... a pH 7,3 per quello che ri-  
 Fig. 13.

Effetto del piruvato sulla velocità e sugli  
 intermedi della glicolisi a pH 7,3 non man-  
 tenuto costante, in ossibiosi.

Prove con piruvato 0,12 mM - O - - - - - O - - - - - O - - - - -

Prove senza piruvato - □ - - - - - □ - - - - - □ - - - - -

I dati sono espressi in  $\mu$ mol/ml globuli rossi.

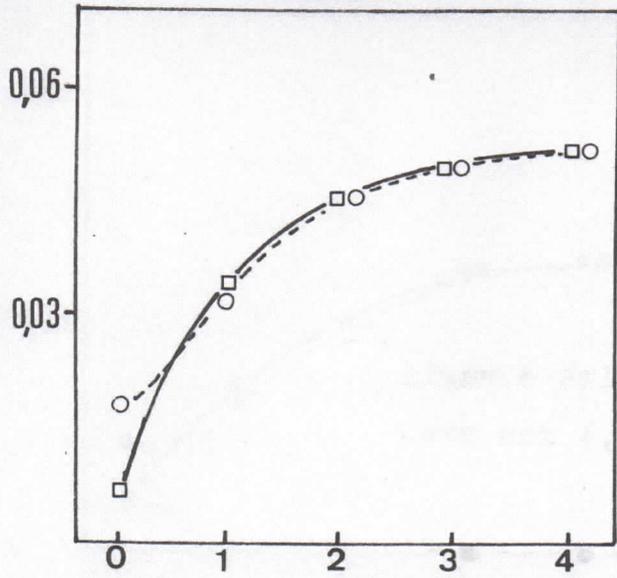
... del nostri esperimenti che si svolgeva con pH iniziale  
 di 7,3 non mantenuto costante. Il piruvato (concentrazio-  
 ne finale 0,12 mM) era aggiunto immediatamente prima del  
 glucosio. La linea tratteggiata indica l'andamento di una  
 prova senza piruvato nelle medesime condizioni.

Risultati analoghi sono stati ottenuti anche a pH  
 più elevato (7,4 - 7,5), sia che il piruvato venisse ag-  
 giunto prima o dopo il glucosio e anche con concentrazio-  
 ni più elevate (3mM). Quando il piruvato era aggiunto  
 dopo il glucosio si poteva vedere come la caduta del DAP  
 e del PM fosse rapidissima.

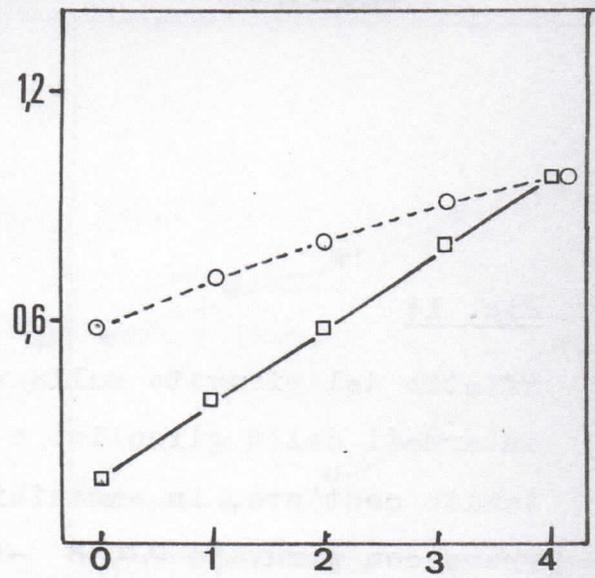
L'esame delle Fig. 12 e 13 permette di constatare  
 come, mentre l'aggiunta di piruvato modifica di poco la  
 produzione di lattato (che è un po' diminuita), e del  
 tutto senza effetto sul livello del 2,6-P, e invece è  
 molto efficace su quello del 2-P e PAI che cadono con  
 grande rapidità. Da notare che mentre in assenza di pi-

Fig.13

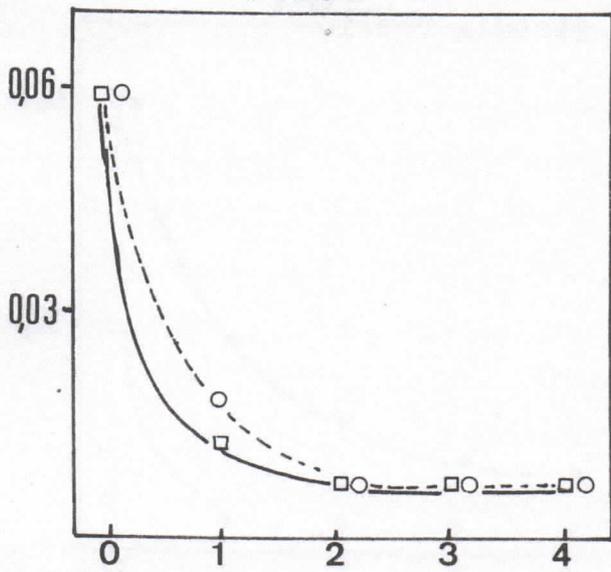
G·6·P



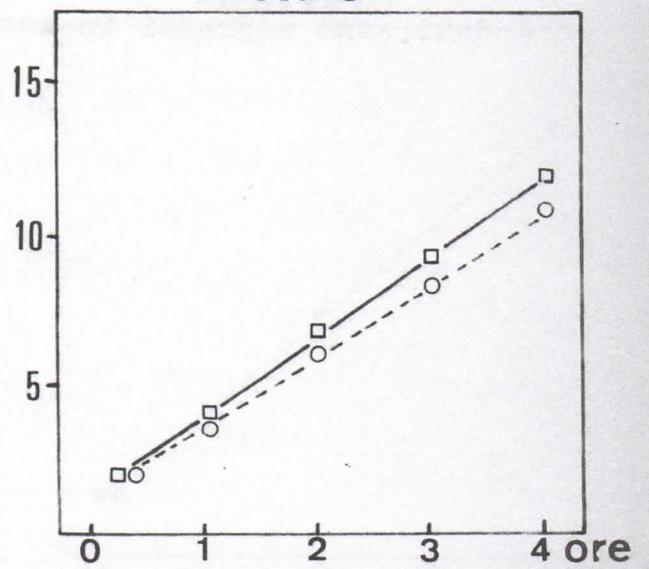
Piruvato



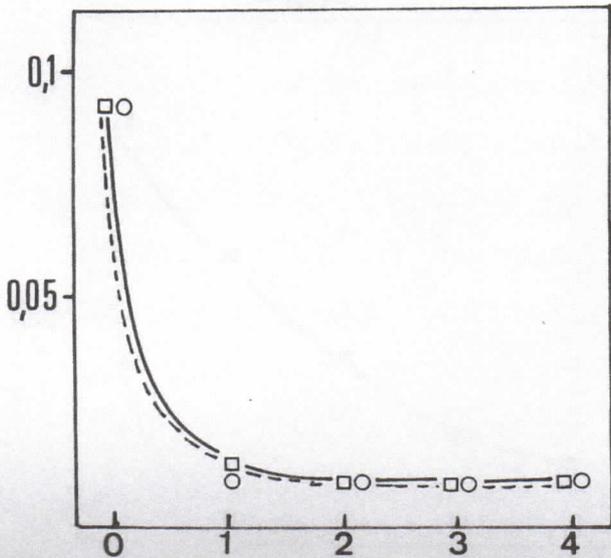
FDP



Lattato



DAP



Ossibiosi

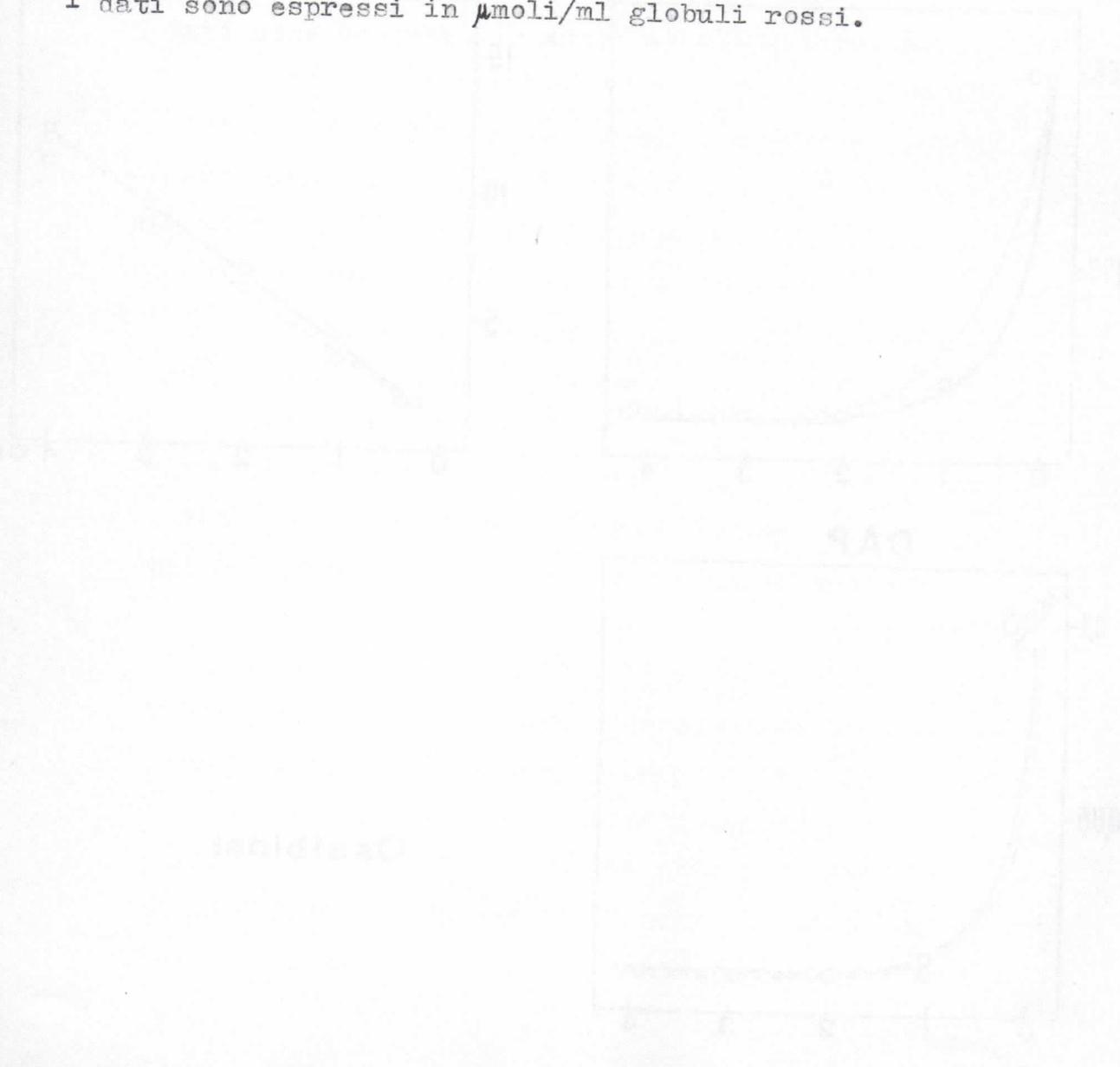
Fig. 14

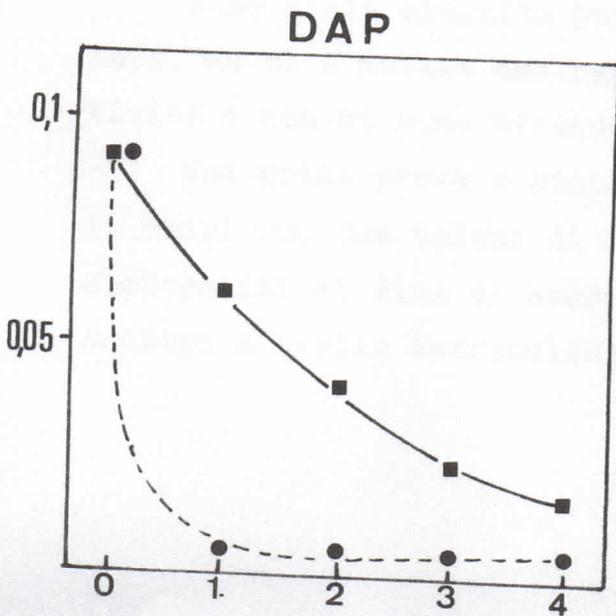
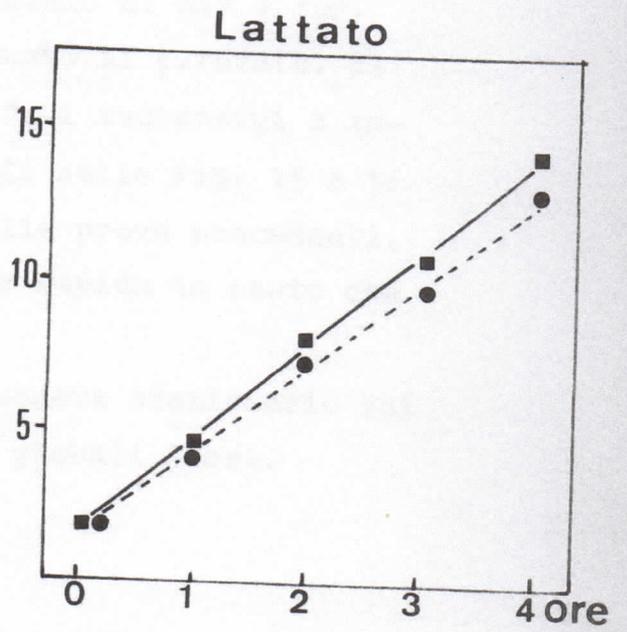
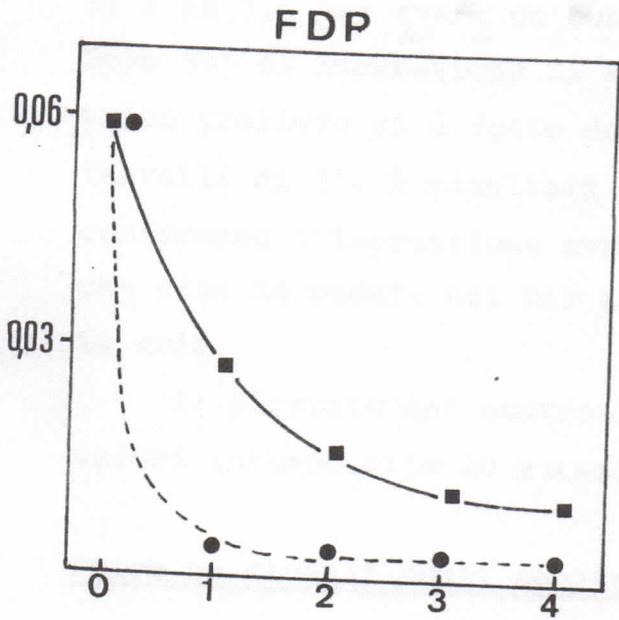
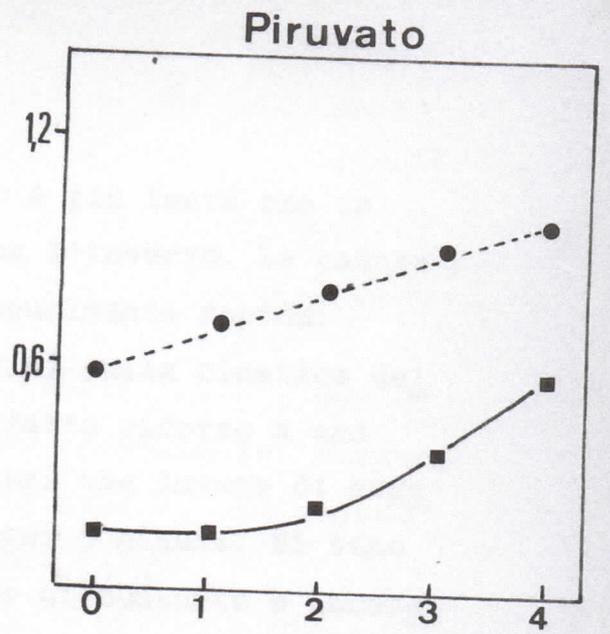
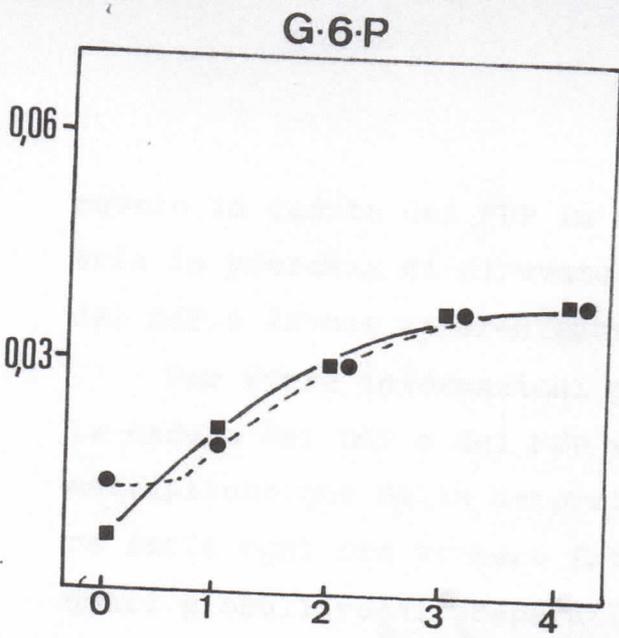
Effetto del piruvato sulla velocità e sugli intermedi della glicolisi a pH 7,3 non mantenuto costante, in anossibiosi.

Prove con piruvato 0,12 mM -●- -●- -●-

Prove senza piruvato -■- -■- -■-

I dati sono espressi in  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.





Anossibiosi

ruvato la caduta del FDP in azoto è più lenta che in aria in presenza di piruvato si ha l'inverso. La caduta del DAP è invece apparentemente ugualmente rapida.

Per avere informazioni più fini sulla cinetica della caduta del DAP e del FDP si è fatto ricorso a una moltiplicazione delle determinazioni che invece di essere fatte ogni ora vennero fatte ogni 5 minuti. Si sono usati globuli rossi preparati come di consueto e incubati a pH 7,6 per avere un buon accumulo di DAP e FDP. Dopo 30' di incubazione si è aggiunto il piruvato, il primo prelievo si è fatto dopo 30", i successivi a intervalli di 5'. I risultati esposti nelle Fig. 15 e 16 confermano l'impressione avuta nelle prove precedenti, che cioè la caduta del DAP sia più rapida in azoto che in aria.

Il piruvato nei controlli rimaneva stazionario sui valori intorno alle 20  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

#### Prove su globuli rossi emolizzati

Sono state eseguite pure alcune prove con emolizzati, ma si è notata una rapidissima scomparsa dell'attività e non si sono ottenuti risultati utili.

Una prima prova è stata fatta emolizzando i globuli rossi con due volumi di  $\text{H}_2\text{O}$  e aggiungendo poi alcuni elettroliti al fine di avere una concentrazione ionica analoga a quella intracellulare.

Fig. 15

Effetto del piruvato sugli intermedi della glicolisi a pH 7,6 costante. Il piruvato è aggiunto dopo 30' di incubazione.

Prove con piruvato 3 mM —○—○—●—●—

Prove senza piruvato ---△---△---▲---▲---

I dati sono espressi in  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

Il piruvato nei controlli rimaneva stazionario sui valori intorno alle 30  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

Prove su globuli rossi emulsi

Sono state eseguite pure alcune prove con emulsi, ma si è notata una rapidissima scomparsa dell'attività e non si sono ottenuti risultati utili. Una prima prova è stata fatta emulsiando i globuli rossi con due volumi di H<sub>2</sub>O e aggiungendo poi alcuni elettroliti al fine di avere una concentrazione ionica analoga a quella intracellulare.

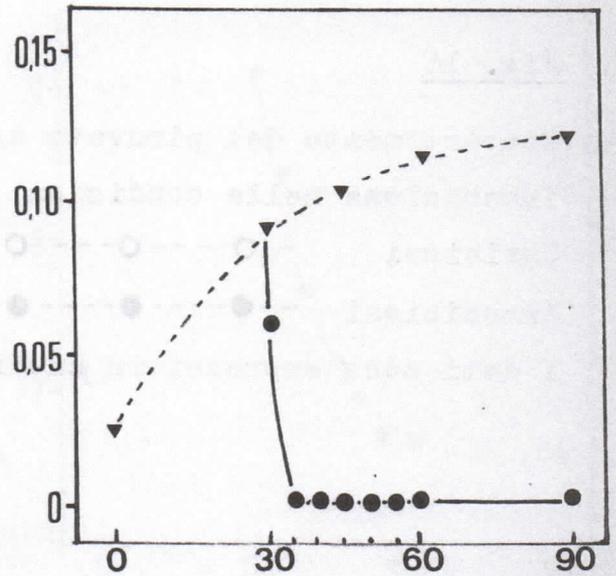
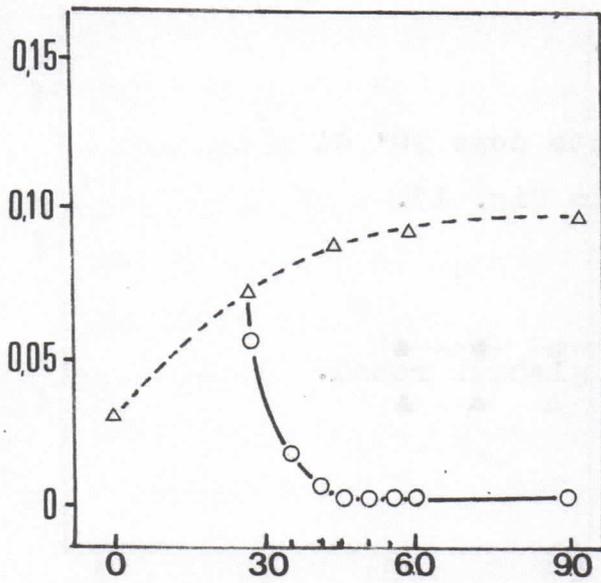
Fig.15

Ossibiosi

Anossibiosi

FDP

FDP



DAP

DAP

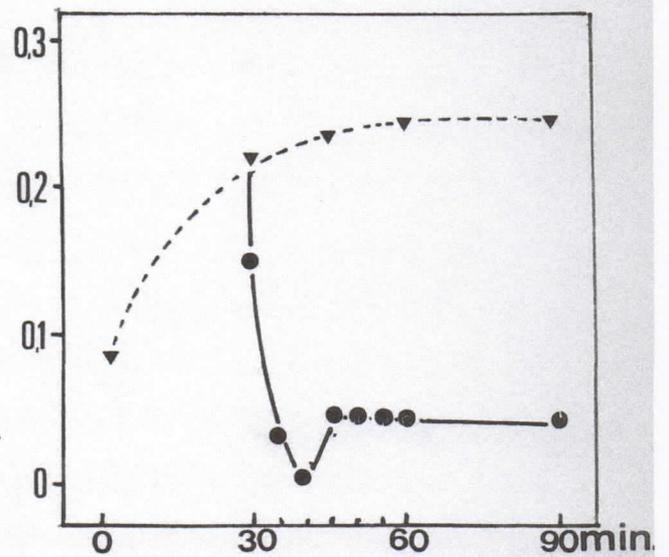
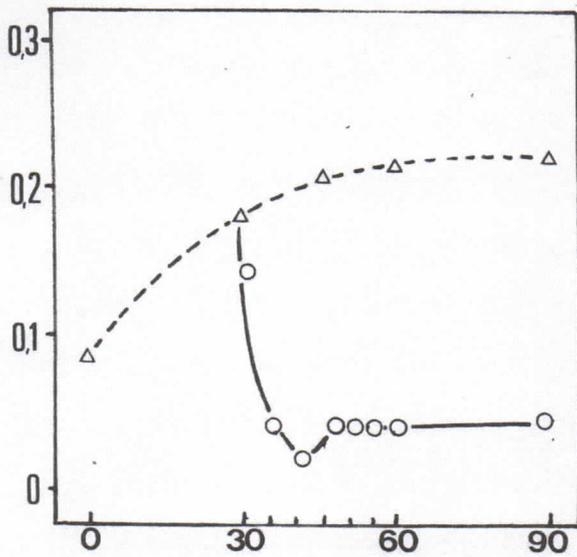


Fig. 16

Comportamento del piruvato aggiunto dopo 30' di incubazione nelle condizioni della Fig. 15.

Ossibiosi      --○---○---○---

Anossibiosi   --●---●---●---

I dati sono espressi in  $\mu\text{moli/ml}$  globuli rossi.

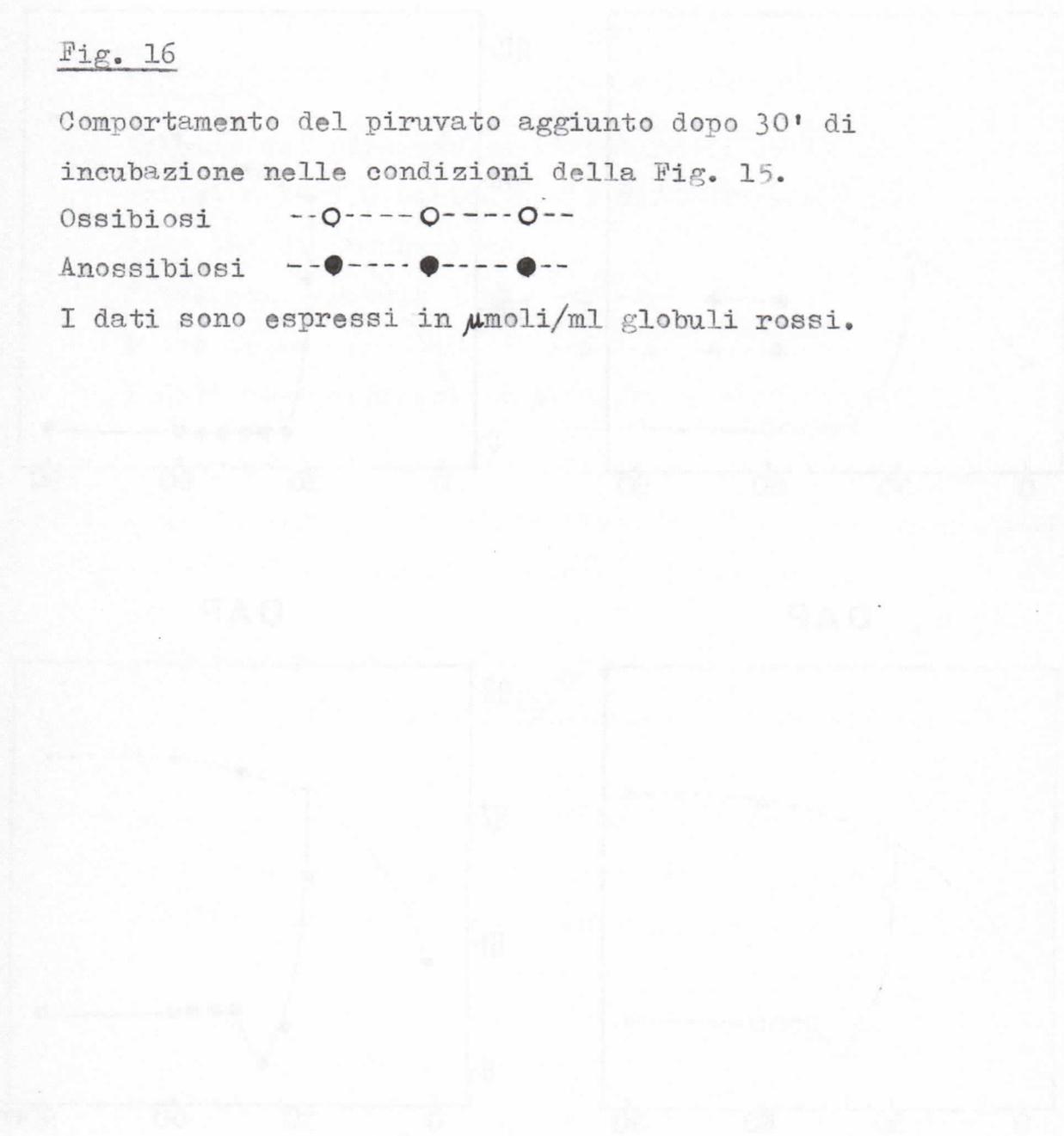
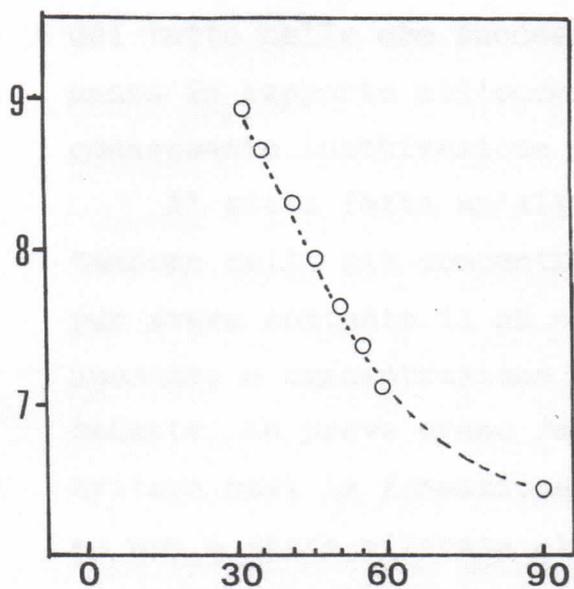
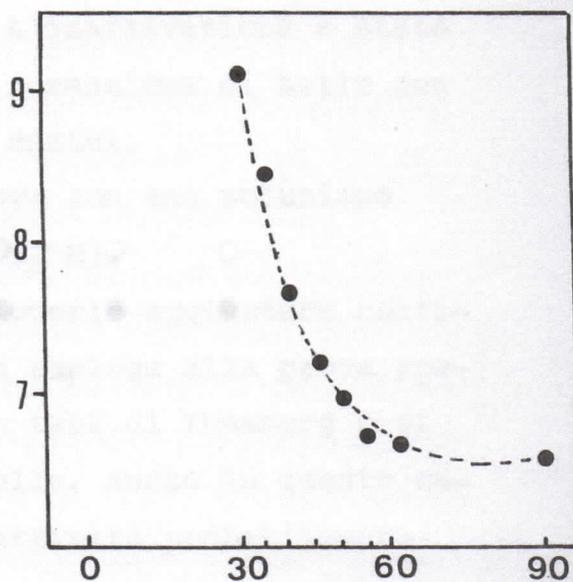


Fig.16

Piruvato



Piruvato



Il pH era 7,3 e veniva mantenuto costante. Nelle prime ore si è notata una lieve attività, scomparsa del tutto nelle ore successive. L'inattivazione è stata messa in rapporto all'eccessiva formazione di bolle con conseguente inattivazione degli enzimi.

E' stata fatta un'altra prova con una soluzione tampone molto più concentrata (0,2 M), per avere costante il pH e non doverlo aggiustare continuamente e concentrazione ionica analoga alla prova precedente. Le prove erano fatte in tubi di Thumberg e si evitava così la formazione di bolle. Anche in questo caso non è stata rilevata alcuna attività probabilmente per effetto del tampone troppo concentrato. D'altronde le precedenti prove coi globuli rossi interi avevano dimostrato come le differenze degli intermedi fossero notevoli tra prove con pH costante e no, e pertanto non si è ritenuto conveniente fare alcuna prova a pH non costante, cosa che sarebbe stata possibile perché si poteva fare in Thumberg e con un tampone non molto concentrato, conservando quindi l'attività.

## DISCUSSIONE

La velocità della glicolisi, misurata dalla produzione del lattato di una sospensione di eritrociti lavati in opportuno tampone, aumenta chiaramente con la diminuzione della concentrazione degli idrogenioni.

Lo stato di ossigenazione dell'emoglobina non influenza il punto di velocità massima, raggiunta sia in aria che in azoto a pH 7,50. Anche la maggior produzione di lattato in anossibiosi è funzione del pH extracellulare. La differenza di 1,18 volte a pH 7,20, di 1,17 volte a pH 7,30 e di 1,14 volte a pH 7,40, cade a 0 per pH pari o superiori di 7,47.

Anche la formazione dell'altro prodotto terminale della via glicolitica, il piruvato, mostra una netta dipendenza dal pH. La produzione di piruvato, massima sia in ossi- che in anossibiosi a pH 7,2, è nulla a pH 7,5 o superiore. Come per il lattato, anche per il piruvato la differenza tra la produzione in ossi- ed anossibiosi rilevabile tra pH 7,3 e 7,4 è in funzione del pH ed è massima a pH 7,3, in cui viene formato in ossibiosi 3,3 a pH 7,4 3 volte più piruvato che in anossibiosi.

Gli Autori giapponesi (34), i cui risultati hanno offerto lo spunto per questa ricerca, hanno effettuato misure soltanto a pH 7,4: per quanto vi sia un sostanziale accordo con i dati presentati nelle tabelle II e V, essi hanno riscontrato un aumento in anossibiosi, della produzione di lattato, di 1,25 volte (questo lavoro: 1,14

volte), mentre la produzione di piruvato diminuiva di 2,2 volte (questo lavoro: 3 volte). L'interpretazione di queste discrepanze è da ricercare nel fatto che gli AA. giapponesi non correggevano gli spostamenti di pH da noi osservati in seguito alla desossigenazione e nel corso dell'incubazione; con grande probabilità le loro prove venivano compiute ad un pH più acido di quanto indicato. L'aumento della concentrazione di idrogenioni ha come conseguenza, come viene dimostrato dalla tabella II e Figg. 7 e 8, una maggior differenza nella produzione di lattato ed una minore differenza nella formazione di piruvato tra i due stati di ossigenazione e desossigenazione delle emazie. Un'ulteriore conferma è il forte accumulo di piruvato osservato dai giapponesi (34) (370  $m\mu$  moli/ml cellule/ora - in anossibiosi -: 800  $m\mu$  moli/ml cellule/ora - in ossibiosi) cui si contrappongono i ben minori accumuli della tabella V (0,015  $m\mu$  moli/ml cellule/ora - in ossibiosi -; 0,005  $m\mu$  moli/ml cellule/ora - in ossibiosi -). Come dimostra la Fig.2, un 'accumulo del chetoacido dello stesso ordine di grandezza degli AA. giapponesi (34) si è rilevato soltanto a pH 7,2, incubando per di più in condizioni di pH non costante. La dipendenza della differente velocità della glicolisi in ossi - e anossibiosi dà piccole variazioni di pH, evidente in particolare a concentrazioni di idrogenioni prossime a quelle del plasma normale ha suggerito di effettuare un'analisi più dettagliata del comportamento degli intermedi a diversi pH, per cercare di in-

dividuare le reazioni con funzione di controllo direttamente influenzate dallo stato di ossigenazione o desossigenazione dell'emoglobina.

A pH 7,7 e 7,9 lo stato di ossigenazione dell'emoglobina non ha alcun potere di modificare né la velocità né il controllo della glicolisi. Infatti, tutti e cinque i metaboliti si comportano durante l'intera incubazione in modo esattamente uguale (nei limiti dell'errore sperimentale) indipendentemente dalle condizioni di ossigenazione.

A pH 7,5 per quanto la produzione del lattato sia uguale e il piruvato bassissimo e costante nelle due condizioni, si nota una piccola ma significativa modificazione nel diossiacetone fosfato e nel fruttosio difosfato i quali, partendo da livelli uguali, si accumulano in misura maggiore in anossia che non in ossibiosi. La modificazione è indicativa, di un rallentamento in ossibiosi della reazione fosfofruttocinasica. Per quanto non molto evidente, il lieve aumento del glucoso-6-fosfato, osservabile in ossibiosi, conferma questa interpretazione. Data la modesta entità dell'inibizione è comprensibile come non si rilevi alcun effetto a livello dei prodotti terminali: l'accumulo di ca.  $0,095 \mu$  moli/ml cellule/4 ore di fruttosio difosfato corrisponde per es. a circa il 6% del livello finale del lattato e rientra ampiamente nei limiti dell'errore sperimentale.

A pH 7,4 si ha il quadro di una evidente modificazione della regolazione della glicolisi in relazione al-

lo stato di ossigenazione dell'emoglobina. L'inibizione in ossibiosi della fosfofruttocinasi è molto più palese che a pH 7,5 e risulta nella forte e quasi parallela ca da ta dei livelli del fruttosio difosfato e del diossiacetone fosfato. In questo caso il rallentamento della reazione, che conduce all'accumulo di ca.  $0,3 \mu$  moli/ml cellule/4 ore è sufficiente si da ripercuotersi in modo misurabile anche sulla produzione di lattato, che è in fatti minore in ossibiosi. Anche l'accumulo ossibiontico del glucoso-6-fosfato, appena accennato a pH 7,5, si fa ben evidente a pH 7,4 e caratterizza il classico fenomeno del "crossover" secondo Chance e Higgins (37) consistente nell'aumento del substrato posto a monte e nella diminuzione del o dei prodotti di reazione della reazione enzimatica inibita.

A pH 7,3 sia in ossi- che in anossibiosi, la situa zione metabolica è assai simile a quella osservata a pH 7,4 con emazie ossigenate, specie per quanto riguarda i livelli di diossiacetone fosfato e fruttosio difosfato, che tendono ambedue rapidamente a zero.

Se a pH 7,4 l'inibizione ossibiontica della fosfofruttocinasi poteva essere sufficiente a spiegare la mi nor produzione di lattato, a pH 7,3 dove l'inibizione è di pari misura nelle due condizioni, è necessario il concorso di altri fattori. Tra i vari possibili, il più probabile è una accelerata utilizzazione del 2,3-difosfoglicerato, un substrato presente nelle emazie in forte concentrazione (38).

Tra il pH 7,4 e 7,5 la situazione cambia notevolmente: mentre a pH 7,4 l'effetto della ossibiosi si esplicava su tutti i metaboliti determinati, a pH 7,5 si hanno lievi differenze soltanto nel fruttosio difosfato e nel fosfodiossiacetone, i quali aumentano nel corso dell'incubazione maggiormente nei globuli rossi in azoto che non in ossigeno.

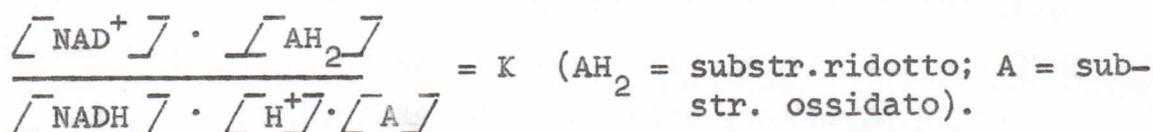
Un'altra importante differenza con l'esperimento a pH 7,4 è l'accumulo di fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato, stazionari a pH 7,4 in azoto ed in diminuzione abbastanza rapida in ossibiosi. Tali effetti sono agevolmente interpretabili con una attivazione della fosfofruttocinasi, maggiore in azoto che non in ossibiosi. L'attivazione è di lieve entità e non si ripercuote sulla velocità complessiva della glicolisi. Essa è infatti uguale nelle due condizioni e corrisponde esattamente alla velocità dei globuli rossi incubati in azoto a pH 7,4. In queste condizioni anche la triosofosfato deidrogenasi diventa enzima limitante; il blocco cinetico di quest'ultimo enzima può venire molto rapidamente rimosso aggiungendo un opportuno ossidante, quale ad es. il piruvato, in grado di sottrarre la cozimasi ridotta formatasi in eccesso. Questo effetto dell'aggiunta del piruvato, messo già in evidenza da Reinhauer e Bruns (39) è dimostrato nelle Fig.15 e 16. Fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato, in costante aumento sia in ossi- che in anossibiosi, cadono rapidamente in seguito all'aggiunta (a pH costante) di piruva-

to. Il fruttosio difosfato cade più rapidamente in azoto e dopo 5 min. non è più determinabile. Sempre in azoto è meglio apprezzabile il curioso effetto di "rebound" osservato nel diossiacetone fosfato. A pH più basso, per es. pH 7,3 (Figg. 13 e 14), in cui la reazione triosodeidrogenasica non è limitante e invece lo diventa quella fosfofruttocinasica, l'effetto del piruvato è ovviamente assai minore: sono da notare alcune interessanti particolarità riguardanti l'effetto della anossibiosi. In anossia, la caduta di fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato è sensibilmente più lenta che in ossibiosi, ma viene accelerata in pari misura dalla presenza di piruvato. Si noti invece che in ossibiosi, l'assenza o la presenza di piruvato (valori alla prima ora) influiscono di pochissimo sulla caduta di fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato. L'interpretazione di questo fenomeno verrà tentata in seguito.

Le prove effettuate a pH 7,7 e 7,9 mostrano un quadro sostanzialmente simile a quello a pH 7,5, con la differenza che lo stato di ossibiosi non modifica nessuno dei metaboliti studiati nel corso dell'incubazione, se si prescinde da un accumulo lievemente inferiore di fruttosio difosfato. E' ancora evidente dunque il quadro di una attivazione della fosfofruttocinasi e di un blocco cinetico della triosofosfatodeidrogenasi.

Che la produzione del lattato non aumenti ulteriormente è spiegabile ammettendo che si accumulino il 2,3-difosfoglicerato, considerato da molti autori come un me-

tabolita di riserva dell'eritrocita; di fatti, un aumento di questo metabolita è stato dimostrato da Asakusa et al. (38) incubando gli eritrociti a pH più alcalini. L'accumulo della cozimasi ridotta, probabile responsabile del blocco cinetico della triosofosfato deidrogenasi, è comprensibile se si considera una qualsiasi reazione catalizzata da deidrogenasi cozimasi-dipendenti, rappresentabile genericamente dalla seguente equazione:



All'equilibrio, ogni diminuzione della concentrazione di idrogenioni deve corrispondere ad un aumento del livello della cozimasi ridotta e ad un aumento del quoziente substrato ridotto/substrato ossidato. Anche quest'ultima assunzione è verificata sperimentalmente, dall'evidente aumento, per es., del quoziente lattato/piruvato a pH maggiori di 7,4.

Sia la glicolisi "in toto" che il comportamento degli intermedi sono chiaramente influenzati dalle variazioni di concentrazione degli idrogenioni. L'effetto sugli intermedi è spiegabile ammettendo una progressiva attivazione della fosfofruttocinasi, che da uno stato di inibizione a pH 7,2 (caduta del diossiacetone fosfato e fruttosio difosfato) raggiunge uno stato stazionario a pH 7,4 in anossibiosi e un massimo di attivazione a pH 7,9. Ciò è in accordo con quanto trovato da Temkine (40) secondo

la quale il pH ottimale di tale enzima nel globulo rosso umano è 8,55, con curva a rami ascendenti e discendenti più ripidi che per gli altri enzimi glicolitici. Anche la velocità della glicolisi "in toto" aumenta progressivamente con l'aumentare del pH: l'attivazione della fosfofruttocinasi, notoriamente uno degli enzimi chiave nel determinare l'intensità del flusso glicolitico, è in relazione con l'aumento della velocità glicolitica "in toto": infatti il massimo incremento nella formazione di lattato si ha tra pH 7,3 e 7,4 in anossibiosi, quando la fosfofruttocinasi da uno stato limitante passa ad una velocità stazionaria. I fattori che possono spiegare l'accumulo del piruvato a pH inferiori di 7,5 (vedi Figg. 2,7,10) sono essenzialmente due. La prima alternativa presuppone che lattato e piruvato siano in equilibrio con le porzioni attive della cozimasi.

All'equilibrio, per la reazione catalizzata dalla lattato deidrogenasi si ha che:

$$\frac{[\text{NAD}^+][\text{Lattato}]}{[\text{NADH}][\text{H}^+][\text{Piruvato}]} = K$$

Ad alta concentrazione di idrogenioni e posta la somma  $\text{NAD}^+ + \text{NADH} = \text{costante}$  per il tempo d'incubazione, si avrà uno spostamento del quoziente  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  a favore della forma ossidata; la lattato deidrogenasi, non più saturata di coenzima sarebbe inibita cinematicamente e il piruvato si potrebbe accumulare. Diminuendo pro-

gressivamente la concentrazione di idrogenioni, si presenta la situazione precedentemente descritta a proposito della triosofosfato deidrogenasi, con aumento del quoziente lattato/piruvato e diminuzione del rapporto  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

La seconda spiegazione si può basare sull'osservazione di Rapoport e Guest (41), ripetuta e confermata recentemente dagli autori giapponesi (38), che abbassamenti anche assai piccoli di pH provocano un forte aumento nella velocità di demolizione del 2,3-difosfoglicerato, secondo un meccanismo non ancora chiaro, probabilmente per attivazione della 2,3-difosfoglicerato fosfatasi. L'aumentato livello del fosfoenolpiruvato, in equilibrio con il 3- ed il 2-fosfoglicerato stimola in modo lineare la piruvico cinasi eritrocitaria, la quale, come hanno chiaramente dimostrato Rose et al. (42), ha (a differenza dell'analogo enzima del muscolo scheletrico) una costante di Michaelis assai alta ( $K_{\text{fosfoenolpir.}}: 1-4 \text{ mM}$ ).

Una interpretazione unitaria degli effetti osservati variando lo stato di ossigenazione dell'emoglobina può basarsi sui seguenti meccanismi:

- 1) azione diretta dell' $\text{O}_2$  disciolto all'interno del glo**lo** rosso indipendentemente dalla presenza o meno dell'emoglobina, su uno o più sistemi enzimatici.
- 2) azione indiretta, mediata da variazioni di una o più caratteristiche fisico-chimiche dell'emoglobina (in particolare variazione di pH) in relazione allo stato di ossigenazione, o dipendente da un mutamento degli equilibri ionici.

1) L'ossigeno molecolare prende parte a numerosi sistemi enzimatici: sono da citare fra le altre, le reazioni catalizzate da: omogentisato ossigenasi, 3-idrossiantranilato ossigenasi, triptofanossigenasi, inositol ossigenasi, p-idrossifenil piruvato ossigenasi. Da notare come l'omogentisato ossigenasi e la 3-idrossiantranilato ossigenasi siano attivate da ioni ferrosi e la triptofanossigenasi da ematina (43).

E' possibile pensare che nell'eritrocita, l'azione di uno di questi enzimi catalizzi in ossibiosi la formazione di composti con azione specificamente inibente o attivante una delle tappe della glicolisi. Nessuno degli enzimi succitati è stato peraltro finora studiate nei globuli rossi umani. Un'altra possibilità è che l'ossigeno molecolare venga attivato da qualche sistema enzimatico e agisca selettivamente su gruppi reattivi di enzimi (gruppi sulfidrilici ad esempio) mediante una alterazione del potenziale ossido-riduttivo cellulare. A questo proposito sono da citare alcune vecchie ricerche di Lipmann (44,45) il quale dimostrò come blandi ossidanti o sostanze in grado di alterare il potenziale ossidoriduttivo della cellula provocassero modificazioni nella velocità della glicolisi. Per lo meno uno dei due enzimi particolarmente implicati nelle modificazioni da ossi- e anossibiosi, la triosofosfato deidrogenasi è assai sensibile a reattivi dei gruppi sulfidrilici.

2) La seconda alternativa è basata sull'ammissione che l'ossigenazione dell'emoglobina provochi all'interno

dei globuli rossi incubati nelle condizioni sperimentali riferite per questo lavoro, un aumento della concentrazione di idrogenioni e caratteristici spostamenti ionici.

L'ossigenazione dell'emoglobina, cioè il legame di una molecola di  $O_2$  per atomo di  $Fe^{++}$ , provoca una serie di modificazioni sia nell'eme che nella molecola completa: oltre ai mutamenti nelle caratteristiche spettrali l'ossiemoglobina perde completamente il paramagnetismo tipico dell'emoglobina. Questo è imputabile al legame covalente del Fe. Conseguentemente i valori di pH dei due residui di imidazolo si modificano e il gruppo -NH- di un imidazolo può dissociare cedendo un protone. L'ossiemoglobina è pertanto molto più acida (70 volte) dell'emoglobina. Il punto isoelettrico si sposta da 6,81 a 6,70. In vivo, nel globulo rosso sospeso nel plasma normale, la desossigenazione è inscindibilmente unita alla funzione di trasporto del  $CO_2$ . L'aumento di concentrazione del  $CO_2$  nel sangue desossigenato provoca schematicamente all'interno dell'eritrocita, le seguenti reazioni:



catalizzata dall'anidrasi carbonica eritrocitaria e



dove K $\text{Hb}$  è l'emoglobina rappresentata quale sale di K.

La reazione b) è favorita dalla minore acidità dell'emoglobina desossigenata.

Secondo le reazioni a) e b) viene legata circa il 60% della differenza in  $\text{CO}_2$  tra sangue arterioso e venoso. Il restante 40% reagisce direttamente con l'emoglobina desossigenata, con formazione del carbaminoacido, secondo lo schema seguente:  $\text{Hb-NH}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{HbN}-\underset{\text{COOH}}{\text{H}}$

L'acido carbonico è in massima misura ionizzato, in parte diffonde al di fuori del globulo rosso e viene sostituito da ioni  $\text{Cl}^-$  (Chloride-shift o fenomeno di Hamburger). Prevalentemente per la maggior quantità di  $\text{CO}_2$  disciolto, il pH del sangue venoso è più basso (di ca. 0,02 unità di pH) del sangue arterioso. Secondo misure indirette, il pH intracellulare delle emazie è da 0,08 (Best-Taylor (46)) a 0,2 (Rapoport (1)) unità di pH inferiore a quello del plasma. Nelle condizioni sperimentali adottate il sangue desossigenato o ossigenato per continuo gorgogliamento di  $\text{N}_2$  o  $\text{O}_2$  era fortemente impoverito di  $\text{CO}_2$ . Con emoglobina desossigenata, nelle condizioni sperimentali adottate, quindi:

- 1) non si formava carbaminoemoglobina
- 2) non si formavano ioni  $\text{HCO}_3^-$
- 3) non si aveva il fenomeno di Hamburger.

Per la ripartizione secondo l'equilibrio di Gibbs-Donnan degli ioni tra plasma ed eritrociti, la seguente relazione è però valida nelle condizioni sperimentali adottate:

$$1 - \frac{[\text{Prot}^-]_{\text{Er}}}{2 [\text{An}^-]_{\text{Pl}}} = \frac{[\text{An}^-]_{\text{Er}}}{[\text{An}^-]_{\text{Pl}}} = r \quad 1)$$

dove  $r$  (fattore di Donnan) è il quoziente di ripartizione degli anioni diffusibili e dipende quindi in prima linea dal rapporto degli anioni non diffusibili  $[\text{Prot}^-]$  con la concentrazione totale degli ioni nel plasma.

Sono inoltre valide le seguenti eguaglianze:

$$\frac{[\text{H}_2\text{O}]_{\text{Er}}}{[\text{H}_2\text{O}]_{\text{Pl}}} = \frac{[\text{An}^-]_{\text{Er}}}{[\text{An}^-]_{\text{Pl}}} = \frac{[\text{H}^+]_{\text{Pl}}}{[\text{H}^+]_{\text{Er}}} \quad 2)$$

Nel sangue desossigenato la ionizzazione dell'emoglobina diminuisce ed aumentano quindi l' $\text{H}_2\text{O}$  e la somma degli anioni intracellulari (in particolare di fosfato inorganico): parallelamente la concentrazione di idrogenioni intracellulari diminuisce. Inversamente, l'emoglobina ossigenata è maggiormente ionizzata e diminuiscono  $r$  (fattore di Donnan) la somma degli anioni ed il contenuto di  $\text{H}_2\text{O}$  intracellulari: aumenta invece la concentrazione di idrogenioni all'interno dell'emazia.

Nel corso dei nostri esperimenti abbiamo sempre osservato una lieve caduta del pH extracellulare verificantesi in corrispondenza dell'ossigenazione: questo fatto, più che con una fuoriuscita di protoni, è interpretabile con lo spostamento del  $\text{CO}_2$  dall'interno all'esterno del-

la cellula.

I risultati riferiti, riguardanti l'effetto della ossigenazione e desossigenazione dell'emoglobina sono interpretabili in armonia agli spostamenti ionici sopra esposti, che si possono così sintetizzare:

emazie in azoto: minore concentrazione di idrogenioni, maggior concentrazione di fosfato inorganico.

emazie in ossigeno: maggiore concentrazione di idrogenioni, minore concentrazione di fosfato inorganico e di anioni.

Dapprima gli effetti osservati verranno interpretati in base a variazioni del pH intracellulare: in seguito verrà considerato l'effetto del cambiamento della concentrazione intracellulare di fosfato inorganico.

Nella prova condotta a pH 7,4, il pH dei globuli rossi in ossigeno sarebbe inferiore che in azoto: infatti il comportamento degli intermedi e la formazione di lattato corrispondono quasi esattamente, benché si tratti del sangue di donatori differenti, alla prova a pH 7,3 in azoto. Analogamente, nella prova condotta a pH 7,3, i globuli rossi ossigenati si comportano in modo quasi perfettamente corrispondente a quelli in azoto, ma a pH 7,2 (forte produzione di lattato, piruvato, sensibile aumento del glucoso-6-P, rapida caduta di fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato, rallentata produzione di lattato.

Anche a pH 7,5, i globuli rossi in ossigeno si avvicinano, per quanto molto meno perfettamente (l'analogo-

gia è limitata a fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato) al comportamento in azoto a pH 7,4.

Il comportamento dei metaboliti nelle prove in cui è studiato l'effetto dell'aggiunta del piruvato è ugualmente interpretabile alla luce di un abbassamento del pH intracellulare in ossibiosi. Analizzando le Figg. 13 e 14 (esperimenti condotti a pH 7,3 non costante) si rileva che l'aggiunta del piruvato ha effetto sulla velocità di caduta del fruttosio difosfato e diossiacetonefosfato soltanto in azoto (pH più alto) mentre in ossibiosi non si notano differenze e si ha lo stesso andamento cinetico che nei globuli rossi incubati in anossibiosi a pH 7,2. Anche l'accumulo di piruvato è maggiore in ossibiosi che in anossia; nella prima condizione i livelli convergono dopo 4 ore di incubazione, come avviene in azoto al pH inferiore (pH 7,2 vedi Fig. 7), mentre sono notevolmente differenti in anossibiosi, con un distacco tra le due condizioni (con e senza piruvato) che non viene colmato nel corso dell'incubazione.

Analoga interpretazione è possibile per le Figg. 15 e 16, in cui la caduta di fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato (e piruvato), più lenta in ossibiosi che non in azoto, è caratteristica di una maggiore concentrazione di idrogenioni.

E' singolare osservare, e questo è in accordo con l'ammissione di un abbassamento del pH intracellulare in seguito ad ossigenazione dell'emoglobina, come l'entità dell'effetto dell'ossigenazione vada di pari passo con

le modificazioni osservate in relazione al pH di globuli rossi emolizzati (vedi Tab. IV): è cioè massimo a pH 7,2-7,4; assai scarso a pH 7,5 ancora minore a pH 7,7 e 7,9.

La concentrazione intracellulare del fosfato inorganico nelle emazie è inversamente proporzionale alla concentrazione degli idrogenioni (vedere Eguaglianze 21) ed è quindi crescente col crescere del pH a cui son state fatte le prove e, per ogni pH, maggiore in azoto che in ossigeno. Anche queste assunzioni si accordano con i risultati sperimentali; infatti l'insieme delle modificazioni osservate da Rose et al. (42) aumentando la concentrazione del fosfato in.intracellulare coincidono con quelle riscontrate in questo lavoro diminuendo progressivamente la concentrazione di idrogenioni. A basse concentrazioni di fosfato in. ( $1,5\mu\text{moli/ml}$  gl.rossi) si accumulava glucoso-6-fosfato mentre fruttosodifosfato e diossiacetone fosfato erano prossimi a zero (come a pH 7,2 e 7,3, Fig. 7 e 8).

Alte concentrazioni di fosfato in.intracellulare ( $16\mu\text{moli/ml}$  gl.rossi), oltre a stimolare l'utilizzazione di glucoso e la formazione di lattato provocavano caratteristici spostamenti dei metaboliti intermedi: si accumulavano fruttosio difosfato e diossiacetone fosfato, mentre il glucoso-6-P rimaneva costante (come in questo lavoro a pH 7,4 in azoto e a pH 7,5 e superiori in azoto e ossigeno)(vedi Figg.9,10,11,12).

Anche i singolari mutamenti tra ossigeno e azoto a pH 7,4 vengono agevolmente compresi ammettendo, con una caduta del pH intracellulare anche una diminuzione del fosfato inorg. in ossibiosi. Osservazioni preliminari, non riferite nella parte sperimentale perché non ancora sistematicamente condotte, hanno effettivamente permesso di osservare una diminuzione del fosfato inorg. intracellulare in emazie incubate in  $O_2$ .

Uguale accordo esiste con i dati di Tsuboi e Eukunaga (31), riguardanti l'effetto del fosfato inorganico sulla glicolisi del globulo rosso stimolazione nella produzione di lattato aumentando il fosfato inorg., con un massimo per una concentrazione di 10 mM, vista dagli AA. è in analogia con l'aumento della produzione di lattato in funzione del pH. La forte accumulazione del fosfato in legame organico (ATP e 2,3 difosfaoglicerato) secondo T. e F. (31) concorda con l'accumulo di ATP, maggiore in  $N_2$  (maggiore conc. di fosfato in.) che non in  $O_2$  (fosfato più basso) (vedi Fig.3) e con l'accumulo di 2,3 difosfaoglicerato rilevato da Asakura et al. (38) aumentando il pH d'incubazione. Anche la progressiva attivazione della fosfofruttocinasi discussa precedentemente ed evidente tra pH 7,4 (in azoto) e 7,9 nonché l'attivazione maggiore in  $N_2$  che in  $O_2$  è in accordo con i dati di T. e F. (31). Gli AA. hanno purificato l'enzima dal globulo rosso e osservato una fortissima attivazione da fosfato inorg., proporzionale con il livello dell'anione per concentrazioni comprese tra 1 e 25 mMoli/l.

E' notevole in proposito il fatto che la concentrazione intracellulare di fosfato inorganico nel globulo rosso è di ca. 10 mMoli/l, corrispondente circa a metà del ripido braccio ascendente della curva di (47) attivazione dell'enzima. Tra i vari meccanismi possibili, l'effetto combinato di variazioni nella concentrazione di idrogenioni e del fosfato inorganico in funzione del pH extracellulare e dello stato di ossidazione dell'emoglobina pare essere quello maggiormente in accordo con i dati sperimentali ottenuti nel corso di questa ricerca. Mentre la verifica indiretta della concentrazione di idrogenioni nell'emazia in vivo è oltremodo ardua, la misura della concentrazione del fosfato inorganico intracellulare pare per contro possibile.

ABBREVIAZIONI USATE NEL CORSO DEL LAVORO

ADP	:	adenosin-di-fosfato
AMP	:	adenosin-mono-fosfato
ATP	:	adenosin-tri-fosfato
DAP	:	diossiacetonfosfato
DPN-DPNH <sub>2</sub>	:	difosfopiridinnucleotide (codeidrogenasi 1) ossidato e ridotto. (NAD-NADH <sub>2</sub> )
FDP	:	fruttosio-di-fosfato
F-6-P	:	fruttosio-6-fosfato
G-6-P	:	glucosio-6-fosfato
TPN-TPNH <sub>2</sub>	:	trifosfopiridinnucleotide (codeidrogenasi 2) ossidato e ridotto.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) RAPOPORT S.M. : Medizinische Biochemie VEB Verlag Volk und Gesundheit, Berlin 1962 pag. 595.
- 2) RAPOPORT S.M., HINTERBERGER U., HOFMANN E.C.G. : Naturwissenschaften, 48, 501 (1961).
- 3) GRIGNANI F., LÖHR G.W.; Klin. Wochschr., 35, 871 (1960).
- 4) ELDJARN L., BREMER G. : Biochem. J., 84, 286 (1962).
- 5) NOLTMANN E., BRUNS F.H. : Z. Physiol. Chem., 313, 194 (1958).
- 6) BARTLETT G.R.: J. Biol. Chem., 234, 449 (1959).
- 7) MARKS P.A., JOHONSON A.B., HIRSCHBERG E., BANKS J.: Ann. N.Y. Acad. Sci., 75, 95, (1958).
- 8) TSUBOI K.K., ESTRADA J., HUDSON P.B.: J. Biol. Chem., 231, 19, (1958).
- 9) BLANCHAER M.C., BROWNSTONE S., WILLIAMS H.R.; Am. J. Physiol., 183, 95, (1955).
- 10) BRUNS F.H., NOLTMANN E., WILLEMSSEN A.: Biochem. Z., 330, 411, (1958).
- 11) BROWNSTONE Y.S., BLANCHAER M.C.: Am. J. Physiol., 189, 105, (1957).
- 12) COLTORTI M., DI SIMONE A., BUDILLON G.: Boll. Soc. It. Biol. Sper., 35, 1630, (1959).
- 13) LOHR G.W., WALLER H.D.; Klin. Wochschr., 37, 833, (1959).
- 14) BLOSTEIN R., DENSTEDT F.: Can. J. Biochem. Physiol., 40, 1005, (1962).
- 15) WIESMANN U., TONZ U.: Nature, 209, 612, (1966).
- 16) POWELL L.D., DE GOWIN R.L.: Nature, 205, 507, (1963).
- 17) BIRBECK J.A., STEWARD A.G.: Can. J. Biochem. Physiol., 39, 257, (1961).

- 18) BERTOLINI A.M., MASSARI N., CIVARDI F.: Gior. Gerontol., 9, 547, (1961).
- 19) GREEN D.E., MURER E., HULTIN H., RICHARDSON S.H., SALMON B., BRIERLEY G.P., BAUM H.: Arch.Biochem. Biophys., 112, 635, (1965).
- 20) RAPOPORT S., LUEBERING G.: J. Biol. Chem., 183, 507, (1950).
- 21) RAPOPORT S., LUEBERING G.: J. Biol. Chem., 189, 683, (1951).
- 22) RAPOPORT S., LUEBERING G. : J. Biol. Chem., 196, 583, (1952).
- 23) RAPOPORT S., NIERADT C.: Biochem. Z., 326, 231, (1955).
- 24) BARTLETT G.R., MARLOW A.A.: J. Labor. a. Clin. Med., 42, 188, (1953).
- 25) SCHROTER W.V., HEIDEN H. : Biochem. Z., 341, 387 (1965).
- 26) LOHR G.W., WALLER H.D.: Fol. Haemat., (Frankfurt) N.F., 8, 377, (1963).
- 27) DISCHE Z.: Bull. Soc. Chim. Biol., 23, 1140, (1941).
- 28) SOLOMON R.Z., HALD P.M., PETERS J.P.: J. Biol. Chem., 132, 723, (1940).
- 29) ROSE I.A., O'CONNELL E.L.: J. Biol. Chem., 239, 12, (1964).
- 30) MINAKAMI S., SAITO T., SUZUKI C., YOSHIKAWA H., Biochem. Biophys. Res. Comm., 17, 748, (1964).
- 31) TSUBOI K.K., FUKUNAGA K.: J. Biol. Chem., 240, 2806, (1955).
- 32) MINAKAMI S., YOSHIKAWA H.: Biochem. Biophys. Res.Comm., 18, 345, (1965).
- 33) WHITTAM R., AGAR M.E., WILEY G.S.: Nature, 202, 1111, (1964).
- 34) ASAKURA T., SATO Y., MINAKAMI S. : J. Biochem. (Tokio), 59, 524, (1966).

- 35) BERGMEYER H.V.: "Methods of Enzymatic Analysis",  
Academic Press, N.Y., pagg.117,134,246,253,  
266, 543, 573, (1963).
- 36) MINAKAMA S., SUZUKI C., SAITO T., YOSHIKAWA H.: J.  
Biochem. (Tokio), 58, 543, (1965).
- 37) CHANCE B., HIGGIBS G., HOLMES W., CONNELLY C.M.: Na-  
ture (London), 182, 1190, (1958).
- 38) ASAKURA T., SATO Y., MINAKAMI S., YOSHIKAWA H.: Clin.  
Chim. Acta, 14, 840, (1966).
- 39) REINHAUER H., BRUNS F.H.: Biochem. Z., 340, 503, (1964).
- 40) TEMKINE H.; Bull. Soc. Chim. Biol., 48, 771, (1966).
- 41) RAPOPORT S., GUEST G.M. : J. Biol. Chem., 129, 781,  
(1939).
- 42) ROSE I.A., WARMS J.V.B.: J. Biol. Chem., 241, 4848,  
(1966).
- 43) KING T.E., MASON H.S., MORRISON M. (Eds.): "Oxidases  
and Related Redox Systems" Vol. I, p. 263,  
John Wiley & Sons, Inc. (1965).
- 44) LIPMANN F.: Biochem.Z.265, 133, (1933).
- 45) LIPMANN F.; Biochem. Z., 268, 205, (1934).
- 46) BEST C.H., TAYLOR N.B.: "The Physiological Basis of  
Medical Practice, VI Ed." pag. 395, The Williams  
and Wilkins Co. 1955.
- 47) DITTMER D.S. (Ed.): "Blood a. other Body Fluids" p.  
189, Federation of American Societies for  
Experimental Biology, Washington 1961.