

A T T I
DELLA
SOCIETÀ TOSCANA
DI
SCIENZE NATURALI

RESIDENTE IN PISA

MEMORIE - SERIE B
VOL. LXXVII - ANNO 1970

PROCESSI VERBALI 1970

I N D I C E

NOMELLINI E., MILANESI Q. - Variazioni ritmiche nell'assorbimento della emoglobina nella banda di «Soret»	Pag. 1
GARBARI F. - Il genere <i>Brimeura Salisb. (Liliaceae)</i>	» 12
LAZZERONI GIOVANNA - Ricerche sugli pseudoscorpioni. VIII. Su alcune interessanti specie raccolte allo Scoglio d'Affrica (Arcipelago Toscano)	» 37
ONNIS A. - Il numero cromosomico di « <i>Althenia filiformis</i> » Petit	» 51
GIUSTI F. - Notulae Malacologicae. X. <i>Testacelloides</i> Wagner e <i>Testacella (Testacelloides) gestroi</i> Issel, un buon sottogenere ed una buona specie della Sardegna	» 56
GIUSTI F. - Notulae Malacologicae. X. Alcune nuove specie di molluschi terrestri dell'isola di Sardegna	» 67
PAOLI G. - Determinazione del gruppo sanguigno del sistema ABO in scheletri egiziani d'età dinastica	» 88
GARBARI F., TORNADORE N. - The genus <i>Ornithogalum</i> L. (<i>Liliaceae</i>). I. <i>Ornithogalum kochii</i> Parl.: morphological and cytotypical analysis	» 101
GARBARI F. - <i>Pseudomuscari</i> , nuovo genere di <i>Liliaceae</i>	» 112

PROCESSI VERBALI

Adunanza del 15 gennaio 1970	Pag. 113
Adunanza del 12 marzo 1970	» 115
Adunanza del 14 maggio 1970	» 117
Adunanza del 12 novembre 1970	» 118
Adunanza straordinaria del 10 dicembre 1970	» 119
<i>Statuto</i>	» 121
<i>Regolamento</i>	» 127
<i>Elenco dei soci per l'anno 1970</i>	» 131

E. NOMELLINI, Q. MILANESI *

VARIAZIONI RITMICHE NELL'ASSORBIMENTO DELL'EMOGLOBINA NELLA BANDA DI «SORET»

Riassunto — Nel corso di numerose osservazioni spettrofotometriche su soluzioni di emoglobina è stato rilevato che, nella banda di *Soret*, durante un periodo di alcuni giorni, si verificano spostamenti del picco di massima densità ottica (*shift*).

Il fenomeno si verifica indipendentemente dalle condizioni nelle quali viene conservato il campione; non è influenzato dalla concentrazione dell'Hb disciolta; non può essere attribuito a ossigenazione del gruppo prostetico né alla sua associazione con la globina; è influenzato dal pH del tampone.

Osservazioni ripetute a intervalli di tempo opportunamente scelti, nel corso di 24 ore ed oltre, hanno permesso di dimostrare che lo *shift* è reversibile e si ripete con una certa ritmicità legata alla frequenza delle osservazioni.

Gli Autori attribuiscono questi fenomeni all'azione della luce necessaria ad eseguire la lettura spettrofotometrica (con un apparecchio manuale) e al successivo periodo di riposo.

Summary — A number of experiments performed for several days on aqueous haemoglobin solutions showed some shift phenomena as regards the position of the maximum optical density of the *Soret* band. These phenomena may occur independently from different storage conditions of the sample and they are not related with oxygenation reactions of the prosthetic moiety or with the concentration of the haemoglobin solution.

Further experiments allowed to observe, during 24 hrs. or more, that the shift was reversible and repeated itself in a rhythmical way.

These phenomena could be related with the action of the light passing through the solution during the spectrophotometric measurement, and in fact the return of the maximum absorption to its normal position took place during the pauses between two subsequent tests. The reversible transformation of the haemoglobin molecule should affect its prosthetic moiety and can be influenced by pH of the buffer solution.

* Istituto di Antropologia dell'Università di Firenze.

Nel corso di osservazioni spettrofotometriche di soluzioni di emoglobina umana, abbiamo avuto occasione di rilevare che i valori di densità ottica (D.O.) letti alla stessa lunghezza d'onda non rimanevano costanti ma presentavano, da una lettura all'altra, variazioni che non apparivano casuali. Le variazioni risultavano più evidenti in un intorno della banda di *Soret* (J. L. SORET [1883]), compreso fra la lunghezza d'onda da 390 a 430 m μ . Prendendo pertanto in esame questa zona dello spettro, ove si verifica il più intenso assorbimento delle porfirine e dei loro composti (J. E. FALK [1964], pag. 72), abbiamo rilevato fenomeni che, almeno nella loro integrità, non abbiamo trovato descritti nella letteratura e che crediamo valga la pena di rendere noti.

Shift del punto di massimo assorbimento

Una prima osservazione (Q. MILANESI et Al. [1967]), fu costituita dal fatto che le variazioni rilevate si verificavano in alcune zone dello spettro nel senso di un aumento di D.O., in zone prossime a queste nel senso di una diminuzione. I due fatti possono essere spiegati con una medesima ipotesi: quella di uno *shift* del punto di massimo assorbimento (v. fig. 1).

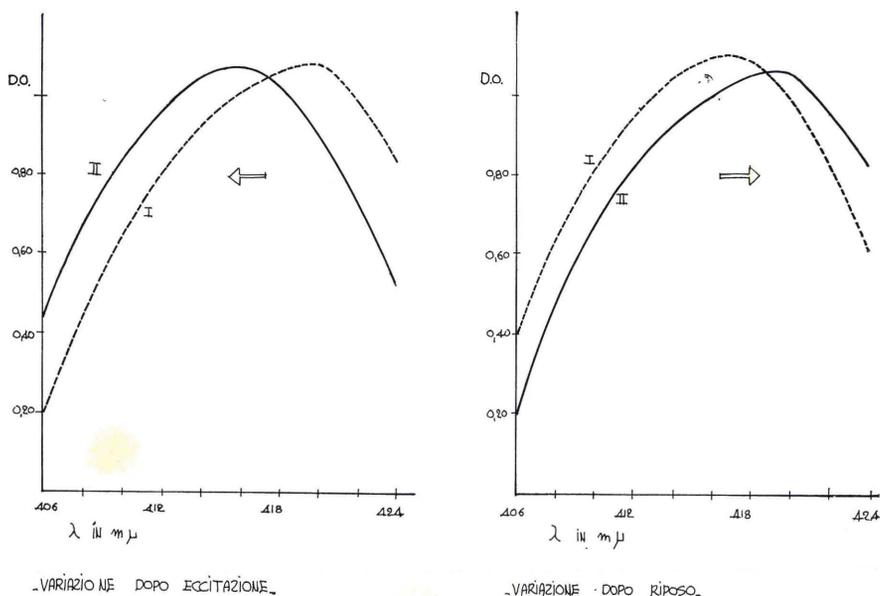


Fig. 1

Ivi il grafico di sinistra spiega il caso in cui una lettura successiva (curva continua) presenta rispetto alla precedente (curva tratteggiata) D.O. maggiori dal lato delle lunghezze d'onda minori e D.O. minori dal lato delle lunghezze d'onda maggiori; il grafico a destra mostra il fenomeno inverso.

L'osservazione ha importanza in quanto permette di considerare significative piccole variazioni della posizione, rispetto alla lunghezza d'onda, del punto di massimo assorbimento; variazioni che, in qualche caso, potrebbero apparire comprese nei limiti dell'errore sperimentale. Infatti non è possibile attribuire al caso variazioni che sistematicamente si verificano, in un senso o nell'altro, a seconda che la lunghezza d'onda alla quale si fa la lettura si trovi dall'uno o dall'altro lato rispetto alla lunghezza d'onda corrispondente al punto di massima D.O.

Individuazione dei fattori determinanti.

Per poter meglio chiarire quali fattori avessero effetto determinante sulle variazioni differenziali della D.O. e sul conseguente *shift* del punto di massimo assorbimento, abbiamo sottoposto le soluzioni di Hb sia a diversi tipi di purificazione, sia a modificazione artificiale delle condizioni d'ambiente in cui si svolgeva la esperienza, sia a variazioni dell'intervallo di tempo intercorrente tra una lettura e la successiva.

In concreto, sono stati eseguiti questi tipi di prove:

- 1) lettura in parallelo di soluzioni di Hb purificata con diversi metodi (CCl₄, dialisi, filtrazione attraverso colonne di Sephadex G. 100);
- 2) due o tre letture immediatamente consecutive;
- 3) una lettura ritardata rispetto al momento in cui era stato preparato il campione;
- 4) due letture separate da un intervallo di tempo durante il quale il campione rimaneva esposto alla luce ambiente;
- 5) due letture separate da un intervallo di tempo durante il quale il campione era mantenuto all'oscuro;
- 6) due letture intervallate da una esposizione del campione al calore (Termostato a 38° C);
- 7) due letture intervallate da conservazione in frigorifero.

Tutte queste prove di cui per brevità non sono riportati i risultati quantitativi, ci hanno dimostrato che le variazioni di assorbimento di cui sopra si verificavano sempre, essenzialmente, in maniera indipendente dalle condizioni introdotte. Abbiamo perciò concluso che, in una fase di ricerca qualitativa, avremmo potuto utilizzare emolisati purificati con semplice trattamento con $C Cl_4$ (LEHMAN et Al. [1966] pag. 268) e limitare l'attenzione ai due fattori che erano rimasti costanti in tutte le esperienze e che, facendo parte del metodo, non possono essere eliminati: *l'esposizione alla luce* (durante la lettura) ed *il tempo*, sia quello intercorso fra una lettura e la successiva, sia quello relativo alla durata totale dell'esperimento.

Materiale di osservazione e tecnica standard

Oggetto del nostro studio è stata l'Hb umana normale, utilizzata in forme e stati diversi:

- a) Hb bicristallizzata del commercio;
- b) Hb essicata, proveniente da campioni di sangue procurati dalla A.V.I.S.;
- c) Hb fresca ottenuta da emolisi immediatamente successiva al prelievo del sangue (il sangue proveniva quasi esclusivamente dallo stesso donatore);
- d) Hb CN, sia del commercio che preparata espressamente (LEHMAN H. et Al. [1966], pag. 278);
- e) Hb F preparata espressamente (LEHMAN H. et Al. [1966], pagg. 278-79);
- f) Eme e globina separati espressamente (LEHMAN H. et Al. [1966] pag. 300 e FALK J. E. [1964] pag. 153).

Le condizioni standard erano le seguenti: tutti i rilievi sono stati compiuti con uno spettrofotometro monoraggio CGA a regolazione manuale, modello CP 2200; lo sperimentatore è stato, quasi senza eccezioni, il medesimo (E. NOMELLINI); l'Hb, salvo diversa precisazione, era disciolta in tampone di fosfati a pH 6,9 con meriolato di sodio all'1‰ e letta contro un bianco di tampone con meriolato nelle stesse proporzioni.

Unico fattore variabile in modo arbitrario restava il tempo. Dopo alcune esperienze orientative, abbiamo distribuito le letture come segue: due o tre letture, intervallate da un'ora, al mattino, subito dopo la preparazione della soluzione di Hb; due o tre letture al pomeriggio dopo un intervallo di tre ore durante il quale il campione in esame veniva posto all'oscuro in frigorifero. Il mattino seguente erano riprese le osservazioni spettrofotometriche dopo un intervallo di circa 18 ore, durante le quali il campione veniva conservato ancora all'oscuro e in frigorifero.

In tal modo l'Hb veniva sottoposta alternativamente a *eccitazioni* il cui effetto si leggeva a distanza di un'ora, e a *periodi di riposo*, il cui effetto si leggeva a una distanza di tempo di 4 o di 16-18 ore dall'ultima lettura.

Come abbiamo già detto, le variazioni osservate si verificano sistematicamente in sensi opposti sulla destra o sulla sinistra del punto di massimo assorbimento e sono esplicabili con una medesima ipotesi: quella di uno *shift* del massimo assorbimento.

Questo spostamento del punto di massima D.O. non risente di piccole differenze di concentrazione; ma, soprattutto quando le osservazioni vengono continuate a lungo, si verifica gradualmente un appiattimento generale dei picchi.

Abbiamo perciò continuato lo studio considerando con particolare attenzione le influenze, sulle variazioni di D.O. di un medesimo campione di Hb, nella gamma d'onda suddetta (banda di *Soret*) per un periodo fra quattro e otto o più giorni con la tecnica descritta.

Venivamo così a disporre di un sistema di osservazioni costituito da letture spettrofotometriche separate da intervalli di tempo relativamente brevi (un'ora) o medi (3 o 4 ore) o lunghi (16-18 ore). Il cestello contenente il campione di Hb e il bianco di confronto nelle rispettive cuvette, veniva posto in frigorifero subito dopo ogni lettura spettrofotometrica. Per evitare variazioni della concentrazione dovute all'evaporazione coprivamo la soluzione nelle cuvette con silicone liquido.

Variazioni ritmiche

Nel ripetere sistematicamente le letture secondo l'orario sopra riportato abbiamo notato che le variazioni di D.O. non apparivano casuali, ma non sembravano seguire neppure un andamento uni-

forme e orientato nello stesso senso. Si trattava di un fenomeno ritmico e reversibile e le variazioni si comportavano come se lo spostamento del picco di massima D.O. avvenisse ora in un senso e ora nel senso opposto.

I risultati di tutte queste prove possono essere riassunti come segue:

A) - Esiste un periodo di tempo durante il quale l'Hb, di recente preparazione, appare poco sensibile all'azione della luce; indicando come azione della luce quella dovuta alla illuminazione necessaria cui viene sottoposta l'Hb durante ogni lettura nel campo della gamma d'onda innanzi precisata. Anche in questo primo periodo, tuttavia, le piccole variazioni che riusciamo a cogliere seguono il ritmo e il verso che in seguito appare assai più evidente.

B) - In una fase successiva l'Hb appare più sensibile sia all'azione della luce che a quella del riposo. In particolare, nel corso delle letture separate dalle precedenti da un intervallo di un'ora (circa), il picco di massima D.O. si sposta verso le lunghezze d'onda minori; nelle letture precedute da un intervallo di tempo medio o lungo, il picco di massima D.O. torna verso le lunghezze d'onda maggiori. Il fenomeno sebbene con intensità molto ridotta (2-5 m μ) ricorda, qualitativamente, quello assai più intenso osservato nella Rodopsina (CONE et Al. [1969] pag. 818). Per renderlo più intuitivo e visualizzarne la periodicità, abbiamo rappresentato il fenomeno da noi osservato nella figura n. 2; ivi sono stati riportati in ascisse gli intervalli di tempo, e in ordinate le lunghezze d'onda corrispondenti al punto di massima D.O.. Sullo stesso grafico è stata inserita una curva che, interpolando i valori di D.O. prossimi al massimo del picco, indica e misura un fenomeno che si svolge parallelamente e che assume valori elevati solo verso la fine dell'esperienza: la caduta del picco di massima D.O. e il progressivo appiattimento del grafico spettrofotometrico.

C) - In una terza fase di ogni singola esperienza il fenomeno prevalente ed imponente è quello sopra ricordato della caduta della densità ottica in corrispondenza del picco di massima D.O.. Questo fenomeno che non è di nuova osservazione (FALLANI M. [1957] pag. 228) è da attribuire alla denaturazione dell'Hb.

Osservazioni di questo tipo sono state compiute da noi in gran numero ed hanno sempre confermato i risultati sopra esposti.

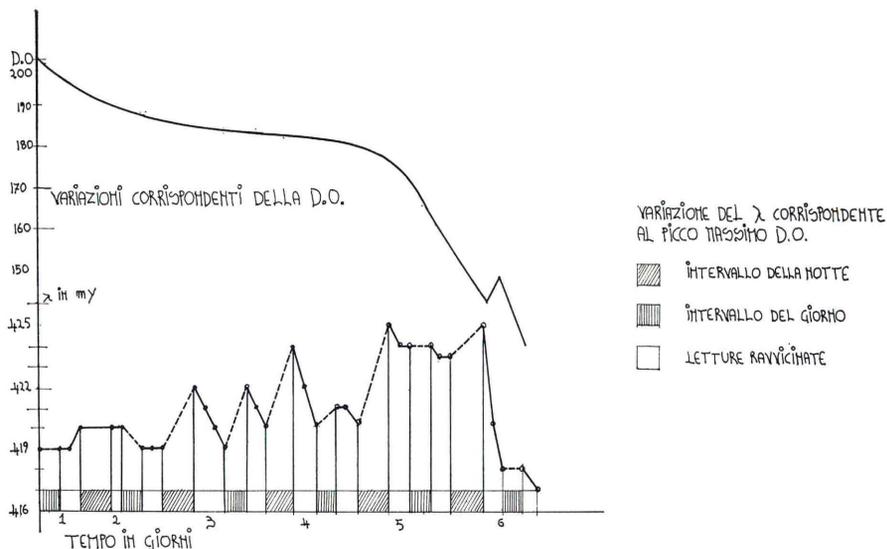


Fig. 2

Esperienze complementari

Pur non pretendendo di giungere a dare una interpretazione scientifica del fenomeno riteniamo opportuno riferire i risultati di alcune esperienze da noi compiute allo scopo di accumulare dati di fatto che potessero gettar luce sul meccanismo interno del fenomeno stesso.

1) - Osservazioni compiute usando nelle stesse condizioni Hb.CN invece di Hb, avevano lo scopo di indicare se i fenomeni descritti potessero essere determinati da parziale ossigenazione del Ferro. Questo dubbio era sollecitato dal fatto che lo spostamento osservato dopo eccitazione avviene nella stessa direzione nella quale giace il picco di Hb O₂ rispetto a quella del picco di Hb (GILLAM H. E. et Al. [1962] pag. 86). I risultati non differiscono da quelli delle prove su Hb.

2) - Osservazioni compiute sull'*eme* isolato dalla *globina* con la tecnica indicata da LEHMAN (LEHMAN H. et Al. [1966] pag. 300), avevano lo scopo di vedere se la globina intervenisse direttamente nel fenomeno, per esempio funzionando da donatrice o da accettrice di elettroni a somiglianza di quanto viene ipotizzato per la cloro-

filla (ARNON D. I. [1959]). Anche in questo caso si sono trovati risultati qualitativamente uguali a quelli forniti dalla soluzione di Hb integra, salvo una maggiore irregolarità nelle oscillazioni che possono risultare talvolta più intense, talaltra meno. Pertanto i fenomeni osservati nell'Hb sembrano derivati essenzialmente dallo eme: la globina potrebbe avere una funzione regolarizzatrice.

3) - Osservazioni compiute su una soluzione di blu destrano (della ditta Pharmacia di Uppsala) in tampone di fosfati a pH 6,9 mostrano ancora lo stesso fenomeno, salvo una più breve durata del periodo di scarsa sensibilità iniziale.

4) - Osservazioni compiute su Fucsina acida (CONN H. J. [1940] pag. 36) in soluzione in tampone di fosfati e nelle medesime condizioni di tempo e di stimolo luminoso non sembrano dimostrare un comportamento analogo. Si è osservato infatti che la posizione del picco di massima densità ottica resta costante nel tempo, mentre i valori di assorbimento, nel complesso, presentano una graduale diminuzione d'intensità (in tutto lo spettro osservato).

Influenza del pH

Alcune esperienze più recenti, compiute su Hb di un datore differente da quello utilizzato nelle osservazioni precedenti, si proponevano di rilevare se e quanto il fenomeno fosse influenzato dal variare del pH. Furono usati tamponi di fosfati a pH 5,4; 6,0; 7,8 e tampone tris a pH 8,6 secondo HUISMAN T. H. J., DOZY A. M. [1965].

Riferiamo schematicamente i risultati:

A) - A pH 5,4 l'assorbimento diminuisce molto rapidamente riducendosi, in 24 ore, al 50% del valore iniziale. Si sovrappone a questo fenomeno, che consideriamo di denaturazione (NICHOL L. W. et AL. [1964] pag. 391), un fenomeno a senso unico di *shift* del punto di massima D.O. verso le lunghezze d'onda minori, che potrebbe essere influenzato dalla diminuzione globale di D.O..

B) - A pH 6 si verifica un periodo di relativa insensibilità nelle prime 24 ore (variazioni casuali). Successivamente si rilevano fenome-

ni che nel complesso rientrano nella categoria di quelli tipici, cioè quelli che avvengono a pH 6,9.

C) - A pH 7,8 si verificano le condizioni di maggiore stabilità (relativa); ma dopo 24 ore si ha l'impressione che si comincino a verificare fenomeni del tipo indicato al comma che segue.

D) - A pH 8,6 si distinguono abbastanza chiaramente due fasi: una di relativa inerzia (con *shifts* piccoli e di dubbia validità) e una che si inizia dopo 24 ore, durante la quale l'assorbimento resta costante e si verificano *shifts* alternati verso lunghezze d'onda maggiori (dopo eccitazioni) o minori (dopo riposo): cioè in senso inverso da quelli che si verificavano in condizione di neutralità (che abbiamo indicato come «tipici»).

In conclusione il tampone acido tende a favorire lo *shift* verso le lunghezze d'onda minori; il tampone neutro (o prossimo a neutro) permette il verificarsi alternativo di *shifts* verso le lunghezze d'onda minori dopo eccitazioni e di *shifts* verso le lunghezze d'onda maggiori nei periodi di riposo; il tampone alcalino tende a favorire il verificarsi (per breve tempo) di *shifts* alternati ma di senso inverso a quanto si verificava a pH neutro.

Rinunziando alla interpretazione dei particolari (i quali, probabilmente dovrebbero essere studiati in forma quantitativa) si potrebbe pensare a variazioni della distribuzione di elettroni π nel nucleo o alla periferia della porfirina (FALK J. E. [1964] pagg. 72 e 81-84).

CONCLUSIONI

I fenomeni che abbiamo descritti e che formano l'oggetto del nostro studio ci sembrano sufficientemente dimostrati sebbene solo da un punto di vista puramente qualitativo. Entro tali limiti vogliamo qui di seguito puntualizzare gli aspetti che riteniamo ormai più sicuri e presentare altresì qualche ipotesi di lavoro per una possibile interpretazione dei fatti osservati.

1°) - La molecola emoglobinica è sensibile alla luce come è possibile rilevare sperimentalmente sottoponendo una soluzione di Hb diluita in adatto tampone ad una osservazione spettrofotome-

trica sufficientemente prolungata. Probabilmente essa è più sensibile, al pari della clorofilla, alla luce intermittente (FRUTON J. S. et Al. [1963] pag. 549).

2°) - Alla eccitazione luminosa consegue uno spostamento (*shift*) del picco di massima densità ottica della soluzione in esame nell'ambito della banda di *Soret* verso lunghezze d'onda minori (in ambiente neutro).

3°) - Il fenomeno di *shift*, è reversibile durante un'adeguato periodo di riposo; dopo questo si dimostra infatti, in ambiente a pH neutro, un ritorno del picco di massima densità ottica verso lunghezze d'onda maggiori.

4°) - Prolungando l'osservazione per più giorni si dimostra la ritmicità degli spostamenti della densità ottica a tutte le lunghezze d'onda comprese entro la banda di *Soret*, indipendentemente dalle variazioni ambientali ma in funzione dell'alternarsi delle eccitazioni luminose e dei periodi di riposo.

5°) - Il fenomeno di *shift* del punto di massima densità ottica, dopo eccitazione luminosa, in ambiente neutro, ci sembra rappresentare un innalzamento di livello energetico quando è diretto verso lunghezze d'onda minori, in armonia con l'assorbimento di energia luminosa. Dopo il periodo di riposo seguirebbe un abbassamento del livello energetico con ritorno della molecola ad uno stato di equilibrio.

6°) - Tale assorbimento sembra esaurirsi essenzialmente nel gruppo prostetico (o eme) al quale ci riporta in modo particolare la banda di *Soret* che è tipica di tutte le porfirine e dei loro composti. La globina sembrerebbe avere un'azione regolarizzatrice forse connessa al modo con cui essa avvolge l'eme e si lega ad esso con legami secondari.

7°) - La reversibilità e la ripetibilità di questi *shifts* durante l'osservazione prolungata, con l'alternanza di *eccitazioni* e di *periodi di riposo*, è un fenomeno ritmico che si verifica più agevolmente quando il pH della soluzione è neutro o prossimo alla neutralità; ma tende a modificarsi sensibilmente quando varia il pH del tampone in cui l'Hb è disciolta.

Gli Autori ringraziano sentitamente il Prof. Raffaello Parenti per l'opera di consulenza fornita durante lo svolgimento di questo lavoro.

OPERE CITATE

- ARNON D. I. (1959) - Citato in: DAVIES D. D. et Al. (1966), 265-269.
- CHANCE B., ESTABROOK R. W., YONETANI T. (1966) - Hemes and Hemoproteins. *Acad. Press, New-York, London.*
- CONE R. A. and BROWN P. K. (1969) - Spontaneous regeneration of Rhodopsin in the isolated Rat Retina. *Nature*, **221**, 818-820.
- CONN H. J. (1940) - Biological Stains. *Bistach Publ., Geneva, N. Y., U.S.A.*
- DAVIES D. D., GIOVANNELLI G., REES T. AP. (1966) - *Biochimica vegetale. Ed. Angeli, Milano (traduzione di E. Marrè).*
- FALK J. E. (1964) - Porphyrins and metalloporphyrins. *Elsevier Publ. Co. Amsterdam, London, New-York.*
- FALLANI M. (1957) - Contributo allo studio delle modificazioni cadaveriche. *Lo Sperimentale*, **107**, 226-242.
- FRUTON J. S., SIMMONDS S. (1963) - General Biochemistry; V^a edizione. *Wiley and S. Ed., New-York.*
- GILLAM H. E. and STERN E. S. (1962) - An introduction to Electronic Absorption Spectroscopy in Organic Chemistry. *E. Arnold Publ., London.*
- HILL R., HOLDEN H. F. (1926) - The preparation and some properties of the globin of oxihæmoglobin. *Biochem. J.*, **20**, 1326-1330.
- HUISMAN T. H. J., DOZY A. M. (1965) - *Chromatog.*, **19**, 160-169.
- LEHMANN H., HUNTSMAN P. B. (1966) - Man's Haemoglobins. *North Holland Pub., Amsterdam.*
- LONG C. (1961) - Biochemists' Handbook. *Spon Ltd., London.*
- MILANESI Q., NOMELLINI E., CIUFFI M. (1967) - Rilievo di variazioni reversibili nell'assorbimento spettrofotometrico dell'Hb nella banda di Soret. *Archivio per l'Antropologia e l'Etnologia*, **97**, 222-223.
- NEURATH H. (1964) - The Proteins: Composition, Structure and Function; II^a Ed., *Academic Press, New-York, London.*
- NICHOL L. W., BETHUNE J. T., KEGELES G., HESS E. L. (1964) - Interacting Protein Systems. In H. NEURATH (1964), 305-403.
- SORET J. L. (1883) - *Compt. Rend.* **97**, 1267 - Citato in FALK J. E. (1964), pag. 73.

(ms. pres. il 12 marzo 1970; ult. bozze il 3 aprile 1970)