

De invloed van elektrolyten op de functionele
en structurele eigenschappen van haemoglobine

van

Arenicola marina L.

door

J.M. Everaarts

Intern verslag

over

werkzaamheden verricht als doctorale studie
in de tijdvakken februari 1969 - juli 1969
en juni 1970 - februari 1971

aan

het NIOZ te Texel

voor

Prof. Dr. G.P. Baerends

Zoölogisch Laboratorium

Rijks Universiteit te Groningen

onder supervisie van

Dr. Roy E. Weber

maart 1971

NEDERLANDS INSTITUUT VOOR ONDERZOEK DER ZEE

PUBLIKATIES EN VERSLAGEN:

nummer 1971-3

Rechten voorbehouden

Van interne verslagen zijn nadruk of aanhalingen slechts
toegestaan met uitdrukkelijke toestemming van het NIOZ.

De invloed van elektrolyten op de functionele
en structurele eigenschappen van haemoglobine
van
Arenicola marina L.

door

J.M. Everaarts

intern verslag

<u>Inhoud</u>	pag.
1. Samenvatting	2
Summary	3
2. Inleiding	4
2.1 Probleemstelling	4
2.2 Functionele eigenschappen van haemoglobine	7
2.2.1 Haem-haem interactie	9
2.2.2 Het Bohr-effekt	10
2.2.3 Het zouteffect	10
2.3 Parameters voor de zuurstofbindende eigenschappen van haemoglobine	11
2.4 Haemoglobine van <u>Arenicola marina</u> L. (Annelida, Polychaeta)	12
3. Materiaal en Methodes	13
4. Resultaten, conclusies en discussie	18
4.1 Onderzoek naar de dissociatie van <u>Arenicola</u> -Hb bij hoge elektrolyt-concentraties	18
4.2 Over de reproduceerbaarheid van zuurstofbin- dingskurven, geregistreerd met de zuurstof- diffusie kamer volgens NIESEL en THEWS	19
4.3 Effect van Hb-concentratie op de zuurstof- binding van <u>Arenicola</u> -Hb	19
4.4 Effect van dialyse op de zuurstofbinding van <u>Arenicola</u> -Hb	22
4.5 Het Bohr-effekt bij <u>Arenicola marina</u>	23
4.6 De invloed van elektrolyten ("zouteffect") op de zuurstofbinding aan het haemoglobine van <u>Arenicola marina</u>	25
4.7 Over het werkingsmechanisme van de zout- effecten op het Hb-O ₂ -evenwicht	35
4.8 Adaptatie-experimenten met <u>Arenicola marina</u>	37
4.9 Over de biologische betekenis van de zouteffecten	39
5. Referenties	42
6. Grafieken	

1. Samenvatting.

1e De effecten van elektrolyt-concentraties op de zuurstofbinding aan het haemoglobine van Arenicola marina L. werden bestudeerd.

2e De zuurstofaffiniteit van Arenicola-Hb neemt toe bij toenemende elektrolyt-concentratie; tweewaardige kationen (Ca^{2+} , Mg^{2+}) verhogen de O_2 -affiniteit meer dan éénwaardige kationen (K^+ , Na^+); of het anion nu Cl^- of SO_4^{2-} is, lijkt geen verschil in O_2 -affiniteit te veroorzaken. Toename van de elektrolyt-concentratie veroorzaakt bovendien een toename van de haem-haem interactie; éénwaardige kationen hebben een geringer effect op HILL's interactie constante n, dan tweewaardige kationen. Het tweewaardig anion SO_4^{2-} heeft, vergeleken met het éénwaardig anion Cl^- , een dempend effect op de haem-haem interactie.

De effecten van elektrolyten op de zuurstofbinding aan het haemoglobine van Arenicola blijken te verschillen van de zouteffecten op mens-Hb.

3e Het Bohr-effekt werd gemeten om pH-correcties toe te kunnen passen op Hb - O_2 -evenwichten, bij verschillende elektrolyt-concentraties.

4e Om de resultaten van het onderzoek te kunnen interpreteren in termen van de fysiologische betekenis van

de zouteffekten in vivo, zijn een aantal adaptatie-experimenten gedaan. Hierbij werd de interne elektrolyt-concentratie van Arenicola bij verschillende saliniteiten van het milieu gemeten. Arenicola marina vertoont geringe elektrolytregulatie. De concentratie van elektrolyten in het bloed is lager dan in het omringende water en het verschil neemt toe bij toenemende saliniteit.

5e De resultaten werden vergelijkend geïnterpreteerd, speciaal met betrekking tot de zouteffekten van mens-haemoglobine, waaraan kwalitatief en kwantitatief onderzoek is verricht.

Summary.

1e The effects of electrolytes on the O_2 -binding characteristics of Arenicola marina haemoglobin is studied.

2e The oxygen affinity of the haemoglobin increases with increasing electrolyte concentration. This facilitating effect is greater for divalent cations (Ca^{2+} , Mg^{2+}) than for monovalent ones (K^+ , Na^+) irrespective of whether the anion is SO_4^{2-} or Cl^- . Increase in electrolyte concentration simultaneously cause an increase in the apparent haem-haem interaction. Again the effect of monovalent cations is smaller than that of divalent ones. The divalent anion SO_4^{2-} has an

inhibiting effect compared to the monovalent Cl^- .
 The effects of electrolyte on Arenicola haemoglobin show radical differences than on the human pigment.

3e The Bohr effect is measured at different electrolyte concentrations in order to apply pH corrections to the salt effect data.

4e In order to interpret the above data physiologically the electrolyte regulation is studied. The internal concentrations are determined as a function of environmental salinities. Arenicola marina shows slight electrolyte regulation. The blood electrolyte concentration is lower than in the surrounding water, this difference increases with increasing salinity.

5e The results are discussed comparatively, with special reference to salt effects of human haemoglobin for which some qualitative and quantitative data are available.

2. Inleiding.

2.1 Probleemstelling.

In een organisme vindt transport van zuurstof van het respiratoire oppervlak naar de weefsels plaats, door middel van een bloedpigment. Kooldioxide wordt getrans-

porteed als vrij HCO_3^- of gebonden aan de NH_2 -groepen van de peptide ketens van het bloedpigment, als carbamaat.

De voornaamste ademhalingspigmenten zijn haemoglobine(Hb) en haemocyanine; het koperhoudende haemocyanine komt alleen voor bij de evertibraten, het ijzerhoudende haemoglobine bij evertibraten en vertibraten.

Tussen individuen van dezelfde diersoort bestaat, onder vergelijkbare omstandigheden van zuurgraad en temperatuur, een grote variatie in de zuurstofbindende eigenschappen. Het Hb -molecuul vertoont geen variatie in molecule grootte tussen individuen van een soort. Dit blijkt uit experimenten waarbij de eigenschappen van Hb werden bepaald door middel van ultracentrifugatie, gel-chromatografie, electroforese en electrofocusing (ongepubl. geg./ pers. meded.).

Andere factoren dan verschil in molecuul-structuur, temperatuur en zuurgraad, moeten dus mede invloed hebben op de oxygenatie van Hb.

ALLEN, WYMAN en SMITH (1953) konden aantonen dat, door oplossingen van gelijke ionensamenstelling en ionsterkte te gebruiken, verschillen tussen functionele eigenschappen van bloed van de mens en de menselijke foetus berusten op het chemisch milieu, waarmee het Hb in kontakt was en niet op intrinsieke verschillen van het molecuul.

Weber (1971) vond verschillen tussen de zuurstof-

affiniteit van coeloom-Hb en bloedvat-Hb in vivo van Nephtys hombergü, bij dezelfde pH en temperatuur, waardoor een duidelijk zuurstof-overdracht systeem aangetoond kon worden. Er werden evenwel geen aanwijzingen gevonden voor inherente verschillen in de O_2 binding van deze bloedpigmenten wanneer gemeten werd in dezelfde ionische samenstelling.

Uit het voorgaande blijkt de noodzaak om tot een systematisch onderzoek te komen, waarbij de invloed van alle fysisch-chemische factoren die de zuurstofbinding aan Hb beïnvloeden bestudeerd worden.

De bedoeling van dit onderzoek is om kwalitatieve en kwantitatieve gegevens te verkrijgen over de invloed van elektrolyten ("zouteffekt") op de functionele eigenschappen van Hb.

Onderzoek naar de invloed van elektrolyten op de functionele eigenschappen van Hb is van belang om, op moleculair niveau, inzicht te krijgen in het werkingsmechanisme van ionen op Hb- O_2 -evenwichten en van interactie van ionen in oplossing met eiwitten; bovendien om na te gaan in hoeverre er sprake is van aanpassing van deze eiwitten aan verschillende saliniteiten van het milieu.

Het zouteffekt op de O_2 -binding kan van biologische betekenis zijn, in verband met de verspreiding van Arenicola en van organismen met Hb als bloedpigment in het algemeen. Afgezien van deze fysiologische motivaties zijn kwantitatieve gegevens van belang om

literatuurgegevens, resultaten van onderzoek waarbij veelal verschillende zoutconcentraties zijn gebruikt, te vergelijken.

2.2 Functionele eigenschappen van haemoglobine.

Haemoglobine is een proteïne opgebouwd uit een aantal peptide ketens, die onderling door waterstofbruggen zijn verbonden, en één of meer actieve of prostetische groepen. Elke peptide keten heeft een haem als prostetische groep. De haem, een ijzer-porphyrine ring, is aan de peptide keten verbonden door histidine (vgl. PERUTZ, 1960; Fig.: 1).

De belangrijkste eigenschap van Hb is de reversibele reactie met zuurstof, die gebaseerd is op de binding van 1 molecuul O_2 aan de zesde koördinatieplaats van het ferro-ion van de haem-groep. Het ijzer-atoom blijft hierbij tweewaardig (KARLSON, 1964).

Bij deze reactie van O_2 met Hb treden conformatie veranderingen op in het gehele molecuul (vgl. BENESCH & BENESCH, 1964), wat interactie tussen haem-groepen veroorzaakt; een sigmoidale vorm van een zuurstofbindingskurve duidt op haem-haem interactie (MANWELL, 1963; WEBER, 1965. Zie 2.2.1). Andere functionele eigenschappen van haemoglobine zijn het Bohr-effekt (2.2.2) en het zouteffect (2.2.3). De reacties van haem-proteïnen met "ligands" (stoffen die reversibel gebonden worden door het ijzer-atoom

van de haem-groep) omvatten belangrijke "linked functions" (vgl. ROSSI-FANELLI et al., 1964). "Linked functions" ontstaan door de onderlinge afhankelijkheid van de reactie-constanten van twee of meer specifieke bindingsplaatsen voor "ligand" op het eiwit-molecuul (WYMAN, 1948).

Zo is het Bohr-effekt een "linked function"; veranderingen in de affiniteit van Hb voor "ligands" bij pH-veranderingen worden veroorzaakt door interactie tussen de haem-groepen en diè protonbindende groepen van het proteïne die kunnen ionizeren. Haem-haem interacties en het zouteffect zijn ook voorbeelden van "linked functions" en worden waarschijnlijk veroorzaakt door hetzelfde mechanisme van conformatie-verandering.

PERUTZ (1970) onderscheidt in dit mechanisme van conformatie-veranderingen drie stappen: de binding van de "ligand" (O_2) aan de subeenheden van het molecuul; als gevolg daarvan de configuratieveranderingen van de subeenheden, waarna een verandering in de totaal structuur van het hele molecuul optreedt.

Welke factoren de conformatie-veranderingen "aanzet" is niet met zekerheid te zeggen. Dat elektromagnetische interacties geen rol spelen komt doordat de afstand tussen de haem-groepen te groot is (25-37 Å). Het zal dus een stereochemische "trigger" moeten zijn die de conformatie-veranderingen aanzet; of de veranderingen geactiveerd worden door een verandering van de haem-groep door zuurstofbinding of door de "ligand" is

niet te zeggen (vgl. PERUTZ, 1970).

2.2.1 De haem-haem interactie.

De zuurstofbindingskurven van haemoglobine van Cyclostomata en van myoglobine, bloedpigmenten met één haem-groep, zijn hyperbolisch. Bij moleculen met meer dan één haem-groep bestaat de mogelijkheid van stapsgewijze oxygenatie, zò dat de vrije energie om zuurstof te binden van de haem-groepen die nog geen O_2 gebonden hebben, beïnvloed wordt door andere haem-groepen die wèl O_2 gebonden hebben (vgl. WEBER, 1965). Dit verschijnsel wordt haem-haem interactie genoemd.

Het $Hb - O_2$ -evenwicht kan worden gekarakteriseerd met behulp van de vergelijking van HILL (1910),

$\% \text{ OxyHb.} = K \cdot p^n / 1 + K \cdot p^n$, waarin p de partiële zuurstofspanning is, K de $Hb - O_2$ -affiniteits constante en n een maat voor de haem-haem interactie (HILL's interactie constante).

n is de richtingscoëfficiënt van de lijn die wordt verkregen wanneer het saturatiepercentage van het Hb (OxyHb / Hb) dubbellogaritmisch wordt uitgezet tegen de zuurstofspanning (pO_2).

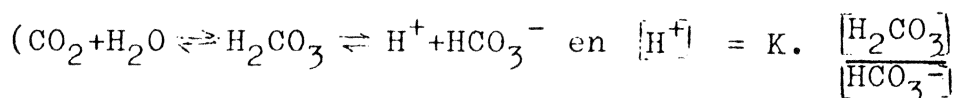
Een waarde van $n=1$, bij een hyperbolische curve, geeft aan dat er geen haem-haem interactie optreedt. Wanneer $n>1$ is er interactie tussen de haem-groepen; de dissociatiekurven zijn sigmoïdaal.

WYMAN (1948) geeft aan dat bij een n -waarde van 2.8, voor

zoogdieren-Hb , tenminste drie haem-groepen interactie vertonen.

2.2.2 Het Bohr-effekt.

Bohr et al. (1907; vgl. WOLVEKAMP, 1961) vonden dat een toename van de kooldioxide spanning een afname van de zuurstofaffiniteit veroorzaakt. Dit verschijnsel, het Bohr-effekt, berust op de verandering van de zuurgraad (pH) bij verandering van $p\text{CO}_2$; bij toename van $p\text{CO}_2$ in de weefsels neemt de pH af



formule van HASSELBALCH-HENDERSON).

BENESCH en BENESCH (1961) concluderen dat het mechanisme van het Bohr-effekt berust op reversibele dissociatie van protonen tijdens het oxygenatieproces. Het is een interactie tussen het zuurstof dissociatie-evenwicht en de protondissociatie.

De grootte van het Bohr-effekt kan gedefiniëerd worden als de verandering van p_{50} (de zuurstofspanning, waarbij het bloed voor 50% geoxygeneerd is) per pH-eenheid. De Bohr-effekt index, $\beta = \Delta \log p_{50} / \Delta \text{pH}$ (vgl. PROSSER en BROWN, 1962).

2.2.3 Het zouteffekt.

Het zouteffekt kan gedefiniëerd worden als de invloed

van het totaal aan opgeloste elektrolyten en van de ionen in oplossing afzonderlijk op de zuurstofaffiniteit ($\sim$ ligging van de O_2 -bindingskurve) en de haem-haem interactie ($\sim$ sigmoidale vorm van de O_2 -bindingskurve).

Het mechanisme van het zouteffect op de oxygenatie zal waarschijnlijk berusten op reciproke interactie tussen de in oplossing zijnde ionen en het proteïne. De grootte van het zouteffect zullen wij karakteriseren door de coëfficiënten δ en c ; δ is een maat voor de verandering van p_{50} per concentratie-eenheid ($\Delta \log p_{50} / \Delta i$) en c geeft een relatieve waarde voor het effect van verschillende kationen op de zuurstofaffiniteit (zie onder 4.6).

Zuurstof-dissociatiekurven van gedialyseerde oplossingen van mens-Hb vertoonden een nauwelijks sigmoidale vorm, terwijl oplossingen van Hb met zouten een S-vormige dissociatiekurve te zien gaven (BARCROFT et al. 1909; vgl. WOLVEKAMP, 1961). Dit duidt op de invloed van elektrolyten op het oxygenatieproces.

2.3 Parameters voor de zuurstofbindende eigenschappen van haemoglobine.

Als parameters voor de zuurstofbindende eigenschappen van alle bloedpigmenten worden de $\log p_{50}$ en de n -waarden gebruikt.

De waarde van $\log p_{50}$ als maat voor de zuurstofaffiniteit en de n -waarden als maat voor de haem-haem interactie.

2.4 Haemoglobine van Arenicola marina L. (Annelida-Polychaeta).

Vergeleken met het uitgebreide onderzoek naar de relatie tussen de structuur en functie van het haemoglobine bij vertebraten, is hieraan bij evertobraten en in het bijzonder bij Anneliden, nog weinig gedaan. Voor dit onderzoek werd gebruik gemaakt van bloed van Arenicola marina, vanwege de aanwezigheid van basische gegevens over de reactie van het Hb met zuurstof (WOLVEKAMP en VREEDE, 1941; WEBER, 1970, 1971).

Het macromoleculaire pigment van Arenicola (mol. gew. $3 \cdot 10^6$, $\pm$ 180 haem-groepen - SVEDBERG) is niet aanwezig in bloedlichaampjes, maar vrij opgelost in de bloedvloeistof. Het Hb -molecuul heeft een zeer complexe structuur (LEVIN, 1963) en is opgebouwd uit 12 subeenheden, die ieder bestaan uit $\pm$ 15 peptide ketens, met elk een haem als prostetische groep (WEBER, 1970).

De zuurstofbindingskurve van Arenicola-Hb heeft een sterke sigmoidale vorm. De zuurstofaffiniteit van het Hb is hoog en de p_{50} bedraagt 1.6-2.0 mm pO_2 (WOLVEKAMP en VREEDE, 1941).

Voor menselijk haemoglobine varieert de waarde van

de p_{50} tussen de 25.6 en 28.2 mm pO_2 (DILL, 1931). Het pH-effekt op de zuurstofbinding wordt door WOLVEKAMP en VREEDE (1941) als gering en door MANWELL (1960) als niet-aanwezig omschreven.

Voor de Bohr-effekt index van Arenicola-Hb. geven PROSSER en BROWN (1962) een waarde van nul.

Wanneer de zuurstofbindingskurve grafisch dubbel logaritmisch wordt weergegeven blijkt er een tweefasige lineaire correlatie tussen de zuurstofspanning en het oxygenatiepercentage te bestaan (Fig. 2). Dit difasische karakter van de dissociatiekurve geeft aan dat er een geringere haem-haem interactie optreedt tot ongeveer 40% verzadiging (n_1 varieert van 2.2-2.7) en een sterkere haem-haem interactie bij een hoger verzadigings percentage, van 40-90% (n_2 varieert van 4.2-4.6). In de eerste fase vindt dus interactie plaats tussen tenminste drie haem-groepen en tijdens de tweede fase zijn de interacties veel gecompliceerder en betreffen tenminste vijf haem-groepen. De plotselinge overgang tussen de intensiteit van de haem-haem interacties bij 40% verzadiging duidt op een verschuiving in de conformatie van het molecuul als geheel (WEBER, 1970).

3. Materiaal en Methoden.

Individueen van de soort Arenicola marina L. (Annelida -Polychaeta) werden verzameld van het wad aan de noordoost-kust van Texel. Van de dieren

werd de lichaamswand aan anterior-dorsale zijde over vier segmenten opengeknijpt. Hierbij stulpten de ingewanden naar buiten, werden afgespoeld en gedroogd. De over het intestinum lopende bloedvaten werden opgeknijpt en het bloed opgevangen in een ijs gekoelde centrifugebuis. Gesuspendeerd materiaal werd afgecentrifugeerd (MSE "minor" centrifuge; RCF waarde=2300·g). Eventuele grote individuele variaties in de zuurstofbindende eigenschappen van het Hb werden opgeheven, door bloed van een groot aantal individuen te verzamelen waardoor een gemiddelde waarde voor de parameters van het oxygenatieproces werden verkregen.

Om de effecten van de pH en elektrolyten op de O₂-binding te onderzoeken is uitgegaan van gedialyseerd bloed. Het bloed werd gedialyseerd bij 4°C. gedurende 24 uur in Visking-dialyse slang (gem. poriëngrootte 24 Å) tegen gedestilleerd water en later gedurende 96 uur tegen aqua dest. waaraan een ionenwisselaar werd toegevoegd (Permutit Bioaeminrolit) (PATEL en SPENCER, 1962).

De dialysevloeistof werd drie keer verversst, tot geen halogenen (voornamelijk Cl⁻) meer konden aangetoond worden met de zilvernitraat-reaktie.

Van het gedialyseerde bloed werden series monsters gemaakt van verschillende zuurgraad en elektrolyt (zout) concentraties. Steeds werd ook van een ongedialyseerd bloedmonster en van een gedialyseerd monster een zuurstofbindings kurve gemaakt.

Om het Bohr-effekt te kwantificeren (om eventueel een pH-verloop te corrigeren) werden twee series experimenten gedaan, waarbij fosfaatbuffers ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 + \text{KH}_2\text{PO}_4$ - pH range 5.82-7.34) en tris-buffers (TrisHCl - pH range 7.30-8.52) met een ionsterkte van 0.2 aan de monsters werden toegevoegd. Van natriumchloride (NaCl), kaliumchloride (KCl), calciumchloride (CaCl_2), kaliumsulfaat (K_2SO_4) en magnesiumsulfaat (MgSO_4) werden de effecten op de zuurstofbinding onderzocht. Alle gebruikte chemicaliën waren pro-analyse.

De zoutconcentraties in de monsters varieerden van 0.005-3.1 molair. Eventuele dissociatie van het haemoglobine bij hoge zoutconcentraties werd gecontroleerd door bloedmonsters op een sucrose-gradient in centrifugebuizen te brengen. De monsters werden in de ultracentrifuge (MSE 65 Superspeed centrifuge - $\text{RCF} \pm 261.000$) geplaatst en gedurende $1\frac{1}{2}$ uur bij 50.000 r.p.m. gecentrifugeerd.

Aan de kleur van het monster kon gezien worden of autoxidatie was opgetreden (Hb -helderrood en MetHb -bruin). De bloedmonsters werden bewaard bij 4°C ., waardoor denaturatie van het Hb. werd voorkomen. Van alle bloedmonsters is de haemoglobine-concentratie (met behulp van de "Lovibond 1000 comparator") en de zuurgraad ("Radiometer" pH meter model 27 met glaskalomel microelektrode) gemeten.

De concentratie van het haemoglobine van de monsters

varieerde van 23-27% ($\sim 3.8-4.5$ gr. Hb/100 ml.) en 43-48% ($\sim 7.2-8.0$ gr. Hb/100 ml.) op de "Lovibond comparator". De kleurschijven van de Lovibond comparator waren vooraf geijkt, met behulp van WONG's ijzerbepaling en de cyaan-methaemoglobine-methode van ZIJLSTRA (vgl. WEBER, 1965).

De molariteit van de monsters werd bepaald door geleidbaarheidmetingen met de Philips geleidbaarheidmeter PW 9501/01 met microgeleidbaarheiddeel PR 9513. Van alle zouten waarvan de invloed op de zuurstofbinding is onderzocht, zijn ijkcurves gemaakt zodat de geleidbaarheid (mmho/cm.) direkt uitgedrukt kon worden in molariteit (gmol/l.) resp. ionensterkte (gion/l.) (Fig. 3) (WOLF, 1968). Alle metingen werden gedaan bij een temperatuur van 20°C .

Zuurstofbindingskurven werden geregistreerd met behulp van de "zuurstofdiffusie kamer" volgens NIESEL en THEWS (1961). Het apparaat is geschikt gemaakt voor het gebruik van O_2/N_2 -gasmengsels voor diffusie- en ijkassen.

Oxygenatie wordt als volgt gemeten: Van een bloedmonster wordt een uitstrijkje op een microscoopglaasje gemaakt en in de O_2 -diffusie kamer geschoven, zò dat het in de lichtweg van een fotometer valt (Eppendorf 1101 fotometer met kwiklamp en filter van 436 nm.).

Achtereenvolgens worden N_2 -gas (voor deoxygenatie), diffusiegas (160, 100.2 of 50.9 mm p O_2 - voor oxygenatie), O_2 -gas (om bloed volledig met O_2 te

verzadigen), ijkgas I en II (resp. 0.20 en 0.54% O_2 in H_2) en dan weer N_2 -gas over het bloedmonster geleid.

Zuurstofbinding aan het haemoglobine wordt met behulp van een fotoreceptorcel gemeten als verandering van lichtadsorptie door het monster en weergegeven als extinctie-verandering. Via een elektronische transmissie-extinctie-omvormer wordt deze extinctie-verandering weergegeven op een Servogor-schrijver. Stikstofgas wordt geleid door gaswasflessen, gevuld met FIESER's oplossing (FIESER en FIESER, 1924) en zilvernitraat om spoortjes zuurstof er uit te halen. Om de eventueel aanwezige kooldioxideverontreiniging uit de diffusie- en ijkgasen te verwijderen worden deze gasen gewassen in een 6 normaal KOH-oplossing. Alle gasen worden verzadigd met waterdamp om uitdrogen van de bloedmonsters tegen te gaan.

Tijdens de oxygenatie van het Hb bestaat er een verband tussen de zuurstofspanning van het diffusie-gas en de tijd, die met minder dan 1% van een lineair verband afwijkt, als de zuurstofspanning van het diffusiegas 20 à 30 keer zo hoog is als de p_{50} van het Hb. (NIESEL en THEWS, 1961; SICK en GERSONDE, 1968).

4. Resultaten, conclusies en discussie.

4.1 Onderzoek naar de dissociatie van Arenicola-Hb bij hoge elektrolytconcentraties.

ROSSI-FANELLI et al. (1961, 1964) en BENESCH et al. (1964) toonden aan dat bij mens-haemoglobine bij hoge elektrolytconcentraties (2 Molair) dissociatie van het molecuul in subeenheden optreedt. WEBER (1970) kon aantonen dat bij toenemende dissociatie van Arenicola-Hb in drie componenten, die konden worden onderscheiden na gradiënt-centrifugatie van het Hb in een sterk alkalisch milieu (pH=10.4), een toename van de zuurstofaffiniteit optreedt.

Om na te gaan of bij hoge elektrolytconcentraties ook bij Arenicola-Hb dissociatie optreedt zijn een aantal sedimentatie-analyses gedaan. Het is noodzakelijk hierover kwalitatieve gegevens te verkrijgen, in verband met de interpretatie van de p_{50} en n-waarden van Hb-oplossingen bij hoge zoutconcentraties.

In Figuur 4 zijn de resultaten weergegeven van drie sedimentatie-analyses. Elke serie bestond uit vier monsters, nl. ongedialyseerd-Hb (I), gedialyseerd-Hb in een oplossing van 5 M. NaCl (II), gedialyseerd-Hb (III) en ongedialyseerd-Hb in fosfaatbuffer, pH=10.5 (IV).

Geconcludeerd kan worden dat bij hoge elektrolyt-

concentraties ($\pm$ 2 Molair NaCl) geen dissociatie van Arenicola-Hb optreedt.

4.2 Over de reproduceerbaarheid van zuurstofbindingskurven, geregistreerd met de zuurstof-diffusie kamer volgens NIESEL en THEWS.

Om de reproduceerbaarheid van de gebruikte methoden voor het registreren van Hb-O₂-evenwichtskurven van Arenicola-Hb na te gaan werden van één bloedmonster zeven bloeditstrijkjes gemaakt, waarvan dertien dissociatiekurven zijn geregistreerd. De gemiddelde halfverzadigingsspanning ($\bar{p}_{50}$) en de standaard deviatie, bij pH=7.40, bedroegen resp. 2.13 en 0.16 mm pO₂.

Met de gebruikte apparatuur voor het registreren van de zuurstofbindingskurven kunnen goede duplo's gemaakt worden.

De resultaten van de registraties van Hb-O₂-evenwichtskurven van verschillende bloedmonsters kunnen dus goed met elkaar vergeleken worden.

4.3 Effekt van de Hb-concentratie op de zuurstofbinding van Arenicola-Hb.

Bij zoogdieren-Hb treedt een duidelijk concentratie-effekt op de zuurstofbinding op ; verdunde oplossingen hebben een hogere affiniteit voor O₂ dan geconcen-

treerde oplossingen (vgl. WOLVEKAMP, 1961).

Om na te gaan of ook bij Arenicola de concentratie van het haemoglobine van invloed is op de oxygenatie, werden een aantal proefseries gedaan waarbij het concentratie-effekt werd bestudeerd.

In Tabel II zijn de resultaten vermeld van zeven proefseries, waarbij de waarden voor p_{50} en de n-waarden zijn gecorrigeerd voor $pH=7.00$. Er zijn aanwijzingen dat er een gering concentratie-effekt optreedt.

Verdunde oplossingen van Arenicola-Hb hebben een iets hogere affiniteit voor zuurstof dan geconcentreerde oplossingen.

Het verschil in concentratie-effekt op de O_2 -affiniteit tussen zoogdieren-Hb en Arenicola-Hb komt overeen met een groot verschil in het aantal zuurstofbindende groepen per haemoglobine-molecuul; 4 in zoogdieren-Hb en 180 in Arenicola-Hb.

Om mogelijke afwijkingen in de $\log p_{50}$ en n-waarden als gevolg van een Hb-concentratieverschil te voorkomen, werden bij de experimenten de Hb-concentraties zoveel mogelijk gelijk gehouden.

Tabel II

Effekt van Hb-concentratie en dialyse op de zuurstof-
binding bij Arenicola.

mon- ster	C _{Hb} (op Lovibond)	normaal-Hb			C _{Hb}	gedialyseerd-Hb		
		p ₅₀	n ₁	n ₂		p ₅₀	n ₁	n ₂
1	36	2.92	1.90	2.99	36	4.00	1.69	2.29
2	46	6.65	1.59	2.97	46	10.33	1.70	2.63
3a	44	8.52	1.90	3.14	44	12.11	-	-
b	-	-	-	-	32	11.35	-	-
c	-	-	-	-	24	13.06	-	-
4	26	9.75	2.32	2.84	24	12.40	2.03	2.56
5	-	-	-	-	24	12.62	2.12	2.80
6	-	-	-	-	25	16.37	2.64	3.66
7	34	3.14	2.15	3.09	30	11.65	1.73	2.29
gem.:		6.20	1.97	3.01		11.54	1.99	2.71
st. dev.:		± 2.76	± 0.25	± 0.11		± 3.10	± 0.34	0.46

Op "Lovibond comparator" (schijf 5/8 A) komt schaal 24
overeen met 4.0 gr. Hb/100ml, 36 met 6.0 gr. Hb/100ml
en 48 met 8.0 gr. Hb/100ml.

4.4 Effekt van dialyse op de zuurstofbinding van Arenicola-Hb.

Alvorens de zouteffecten op de oxygenatie van Arenicola-Hb uitgebreid te onderzoeken, is het van belang te weten hoe en in welke mate elektrolyten het oxygenatieproces kunnen beïnvloeden. Om na te gaan of elektrolyten een rol spelen bij de oxygenatie zijn een aantal experimenten gedaan, waarin werd onderzocht of de zuurstofbindende eigenschappen van Hb in gedialyseerde oplossing verschillen van die van Hb als zodanig.

De resultaten van de experimenten staan vermeld in tabel II. De gemiddelde waarden voor p_{50} , n_1 en n_2 en hun standaarddeviaties zijn berekend.

Geconcludeerd kan worden dat na dialyse de zuurstofaffiniteit is afgenomen; elektrolyten lijken geen effect te hebben op de haem-haem interactie tot 40% zuurstofverzadiging van Hb (n_1 -waarde) en bij hogere verzadigingspercentages leidt de aanwezigheid van elektrolyten tot een toename van de haem-haem interactie (n_2 -waarden).

De resultaten van deze experimenten om het effect van dialyse op de oxygenatie te bepalen, kunnen als uitgangspunt dienen voor het onderzoek naar de zouteffecten.

4.5 Het Bohr-effekt bij Arenicola marina.

Om na te gaan of de oxygenatie van Arenicola-Hb wordt beïnvloed door de zuurgraad zijn twee series experimenten gedaan, waarbij in het pH-gebied van 5.8 tot 8.5 zuurstofbindingskurven zijn geregistreerd. Het Bohr-effekt werd gekwantificeerd om de waarden van $\log p_{50}$, n_1 en n_2 van Hb-O₂-evenwichten bij verscheidene elektrolyt-concentraties te kunnen corrigeren voor pH=7.00.

In de Figuren 5 en 6, die gebruikt zullen worden als ijkcurven bij het onderzoek naar het zouteffect, wordt het effect van de zuurgraad op resp. de $\log p_{50}$ en de n_1 - en n_2 -waarden grafisch weergegeven. Bij afnemende pH (toenemende H⁺-concentratie) neemt de zuurstofaffiniteit van het haemoglobine af (p_{50} neemt toe); de afname van de zuurstofaffiniteit is het grootst in de pH-range van 7.6 tot 6.8. In de pH-range van 7.6 tot 7.4 bereiken de n_1 - en n_2 -waarden een maximum van resp. 2.4 en 4.0.

Geconcludeerd kan worden dat een toename van het aantal protonen (lagere pH) een reductie van de zuurstofaffiniteit veroorzaakt. Of de zuurstofaffiniteit tevens beïnvloed wordt door de aard van de in oplossing zijnde ionen kan niet zonder meer uit Figuur 5 geconcludeerd worden. Uit Figuur 6 blijkt dat er een verschil bestaat tussen de n -waarden verkregen in fosfaatbuffer en trisbuffer.

De haem-haem interactie wordt dus niet alleen beïnvloed door de specifieke aard van de in oplossing zijnde elektrolyten.

In tegenstelling tot de gegevens uit de literatuur (WOLVEKAMP en VRELDE, 1941; MANWELL, 1960; vgl. 2.4, blz. 13) blijkt uit de resultaten een uitgesproken invloed van de zuurgraad op de zuurstofbinding aan Arenicola-Hb.

De grootte van het Bohr-effekt, σ , bedraagt -0.74 (van pH 7.0 tot 8.0). Voor zoogdier-haemoglobinen varieert deze index van -0.38 tot -0.96 (PROSSER en BROWN, 1962). Het bloedpigment chlorocruorine van Spirographis, vertoont ook een duidelijk Bohr-effekt ($\sigma = -0.45$). De overeenkomst tussen het pH-effekt op chlorocruorine en zoogdier-Hb veronderstelt dat de voor het effect verantwoordelijke groepen in beide pigmenten identiek zijn (ANTONINI et al., 1961). Volgens ALLEN en WYMAN (1952) treedt bij Arenicola cristata een pH-effekt op, vergelijkbaar met het pH-effekt op mens-Hb.

BENESCH en BENESCH (1961) concluderen dat het werkingsmechanisme van het Bohr-effekt berust op reversibele dissociatie van protonen tijdens het oxygenatie proces. Aan het proteïne zijn specifieke plaatsen waar protonen gebonden kunnen worden. De groepen die protonen reversibel binden, zouden amino-groepen, sulfhydryl-groepen en imidazole-groepen kunnen zijn (RIGGS, 1952; BENESCH en BENESCH,

1961, 1962).

RIGGS (1952) toonde een correlatie aan tussen de grootte van het Bohr-effekt en het aantal sulfhydryl groepen. BENESCH en BENESCH echter konden de -SH groepen blokkeren zonder dat de grootte van het Bohr-effekt veranderde; ook amino-groepen zouden niet bij de ionizatie betrokken zijn vanwege de hoge dissociatie constante, pK, en de hoge ionizatie-warmte. Volgens hen zijn dus de imidazole groepen de proton-bindende groepen aan het proteïne.

MANWELL (1960) suggereerde meer algemeen dat op die plaats van het proteïne waar tijdens de oxygenatie conformatie verandering optreedt, elke groep met proton-bindende capaciteiten geïoniseerd kan worden en dus bij kan dragen tot de grootte van het Bohr-effekt.

De biologische betekenis van het Bohr-effekt tenslotte, is de facilitatie van zuurstofafgifte in de weefsels, bij een lage zuurstofspanning en een hoge kooldioxidespanning (WOLVEKAMP, 1961).

4.6 De invloed van elektrolyten ("zouteffekt") op de zuurstofbinding aan het haemoglobine van Arenicola marina L.

Alleen de functionele eigenschappen van het haemoglobine van de mens zijn intensief onderzocht (WYMAN, 1948; ANTONINI en ROSSI-FANELLI, 1961, 1962,

1965; BENESCH en BENESCH, 1961, 1962, 1964 en PERUTZ, 1970).

Uit onderzoek naar de effecten van elektrolyten bleek dat zowel de ionsterkte als de specifieke aard van de in oplossing zijnde ionen van invloed zijn op de zuurstofbinding.

Hoe de zouteffecten zich manifesteren tijdens de oxygenatie van de zeer gecompliceerde haemoglobine moleculen van Arenicola is als uitgangspunt genomen voor dit onderzoek.

Gedialyseerd bloed van Arenicola marina heeft een geringere affiniteit voor zuurstof dan ongedialyseerd bloed (zie 4.4). Een oriënterend experiment naar het zouteffect van Arenicola-Hb, waarvan de resultaten vermeld staan in Tabel III, toonde aan dat toevoeging van elektrolyten (natriumchloride-oplossing) aan gedialyseerd bloed een verschuiving van de dissociatie-kurve veroorzaakt, in de richting van lagere zuurstofspanningen. Tevens neemt de sigmoidale vorm van de kurven toe in aanwezigheid van ionen in oplossing. Na correctie van $\log p_{50}$ voor $\text{pH}=7.00$, bleek het zouteffect nog duidelijker.

Voor natriumchloride, kaliumchloride, calciumchloride, kaliumsulfaat en magnesiumsulfaat in oplossing zijn de effecten op het oxygenatie proces bestudeerd.

Tabel IIIInvloed van natriumchloride op de zuurstofbinding.

monster	pH	Molariteit gmolNaCl/l	log p ₅₀	n ₁	n ₂	log p ₅₀ (pH=7.00)
1 gedial.-Hb + NaCl-opl.	6.69	3.75	0.142	2.16	3.42	0.070
2 idem	6.77	2.50	0.301	2.93	3.66	0.196
3 idem	6.85	1.25	0.363	2.38	3.06	0.288
4 ongedialy- seerd-Hb	6.92	?	0.480	1.86	2.91	0.445
5 gedialy- seerd-Hb	7.06	-	0.565	1.71	2.36	0.600

De invloed van natriumchloride in oplossing in het gebied van 0.2-3.0 molair, bij verschillende pH, is weergegeven in de Figuren 7 en 8, waarin de molariteit (gmol NaCl/l) is uitgezet tegen resp. log p₅₀ en n₁ en n₂. Een toename van de concentratie NaCl veroorzaakt een afname van de p₅₀, dus een toename van de zuurstofaffiniteit. De mate van afname van de p₅₀ is in de pH-range van 6.20-7.50 ongeveer dezelfde. Het niveauverschil tussen de vier kurven uit Figuur 7 geeft het Bohr-effekt weer.

De waarden n₁ en n₂ nemen toe bij toename van NaCl-concentratie; dus een sterkere haem-haem interactie bij een grotere ionensterkte. Ook in Figuur 8 is het pH-effekt op de haem-haem interactie weergegeven.

Het verloop van de grafieken voor $\log p_{50}$ en n_1 en n_2 is niet lineair. In het lagere concentratie-gebied is het zouteffect op de zuurstofaffiniteit sterker dan bij hogere concentraties.

In de volgende proefseries zijn de effecten van natrium-, kalium- en calciumchloride nagegaan. Wanneer nu de anionconcentratie van de monsters wordt uitgezet tegen de zuurstofaffiniteit (Figuur 9) en tegen HILL's interactie constante (Figuur 10), dan kunnen verschillen in effecten, veroorzaakt door de verschillende kationen, uit de grafiek worden afgelezen.

NaCl , KCl en CaCl_2 veroorzaken een facilitatie van het oxygenatie-proces bij toenemende concentratie. Calciumchloride heeft een sterk effect op de $\log p_{50}$ en de n -waarden; ook in het hogere concentratie-gebied van 0.5-3.0 molair neemt de $\log p_{50}$ nog sterk af. Bij toenemende zoutconcentratie tot 0.5 molair treedt een sterke toename van n_2 op, terwijl bij hogere concentraties CaCl_2 (0.5-3.0 M) een opvallend remmend effect op de haem-haem interactie optreedt (n -waarden nemen sterk af).

Figuur 11 geeft het verband tussen de $\log p_{50}$ en de zoutconcentratie in de range van 0.005-0.6 molair voor kaliumchloride en -sulfaat, calciumchloride en magnesiumsulfaat. De ionsterkte is als kationconcentratie (gion./l) uitgezet, om zo behalve eventuele verschillen tussen de effecten van kationen, ook

verschillen tussen de effecten van SO_4^{2-} en Cl^- op de oxygenatie na te gaan.

Uit het niveauverschil tussen de kurven uit Figuur 11 kan geconcludeerd worden dat de tweewaardige ionen Mg^{2+} en Ca^{2+} een sterkere faciliterende invloed op de zuurstofbinding hebben dan de éénwaardige Na^+ en K^+ -ionen, over de gehele concentratie-range.

Of de anionen nu Cl^- of SO_4^{2-} zijn, lijkt geen verschil te maken op het oxygenatie proces. Op de haem-haem interactie hebben de kationen Ca^{2+} en Mg^{2+} eveneens een sterkere faciliterende invloed dan de éénwaardige kationen en heeft SO_4^{2-} een remmend effect vergeleken met Cl^- (Figuur 12).

De resultaten van de experimenten welke gedaan zijn om de effecten van elektrolyten op het Hb-O_2 -evenwicht na te gaan, kunnen als volgt samengevat worden:

1. Elektrolyten veroorzaken een afname van de p_{50} ; in het concentratie-gebied tot 0.5 molair is de invloed sterker dan in het concentratie-gebied van 0.5-3.0 molair.

De grootte van het zouteffect is een sommatie van de invloed van de ionsterkte en het effect van de specifieke aard van de in oplossing zijnde ionen. De coëfficiënt ξ , een maat voor het effect van de ionsterkte op de oxygenatie, wordt gemeten als de richtingscoëfficiënt van de raaklijn aan de "zouteffect-kurven" (Fig. 9 en 11), over een bepaald

Tabel IV

De waarden van de coëfficiënten δ en c voor de effecten van verschillende elektrolyten in oplossing op de oxygenatie van Arenicola-Hb.

		Proefseries							
concentr.		I		II		III			
gebied:									
Δi									
(gion/l)		Na^+Cl^-		K^+Cl^-		$\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2^-$			
		$-\delta$	c	$-\delta$	c	$-\delta$	c		
Uit Fig. 9:									
0-0.5		1.95	0.92	1.93	0.97	2.88	0.85		
0.5-1.0		0.41	0.73	0.50	0.81	1.08	0.73		
1.0-2.0		0.33	0.68	0.35	0.73	0.88	0.66		
2.0-3.0		0.24	0.60	0.25	0.64	-	-		
		IV		V		VI		VII	
		$\text{K}_2^+\text{SO}_4^{2-}$		$\text{Mg}^{2+}\text{SO}_4^{2-}$		K^+Cl^-		$\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2^-$	
		$-\delta$	c	$-\delta$	c	$-\delta$	c	$-\delta$	c
Uit Fig. 11:									
0-0.1		1.87	1.10	2.10	0.81	2.09	1.05	2.07	0.79
0.1-0.2		1.08	1.00	0.78	0.68	0.83	0.93	0.81	0.66
0.2-0.3		0.54	0.87	0.43	0.60	0.47	0.84	0.50	0.59
0.3-0.4		0.38	0.82	0.30	0.55	-	-	-	-
0.4-0.5		0.26	0.76	0.24	0.52	-	-	-	-

concentratie-gebied (Δi).

De coëfficiënt c, een relatieve maat om het effect van de specifieke aard van de ionen te kwantificeren, is het Y-intercept van deze raaklijn.

In Tabel IV zijn de coëfficiënten δ en c voor de effecten van verschillende elektrolyten in oplossing weergegeven.

Dus de zuurstofaffiniteit van het haemoglobine neemt toe bij toenemende zoutconcentraties; tweewaardige kationen verhogen de affiniteit meer dan éénwaardige kationen en of het anion nu Cl^- of SO_4^{2-} is, lijkt geen verschil in O_2 -affiniteit te veroorzaken.

2. Toename van de zoutconcentratie veroorzaakt een toename in de n_1 - en n_2 -waarden. Bij lagere concentraties (tot 0.5 M voor de chloorzouten en tot 0.2 M voor de sulfaten; zie Figs. 10 en 12) is de toename in de n -waarden groter dan bij hogere concentraties. Eénwaardige kationen hebben een geringere invloed op de haem-haem interactie dan tweewaardige kationen (vgl. Fig. 11). Van 0 tot 0.2 M NaCl, KCl en K_2SO_4 nemen de n_2 -waarden toe van 2.2 tot 3.2 en voor CaCl_2 en MgSO_4 van 2.6 tot 4.1. Het sulfaat-ion heeft een dempend effect op de haem-haem interactie. Bij toenemende concentratie tot 0,5 M NaCl en KCl neemt de n_2 -waarde toe van 2.2 tot 3.8, voor K_2SO_4 van 2.2 tot 3.2, voor CaCl_2 van 2.8 tot 4.8 en voor MgSO_4 van 2.6 tot 3.8 (vgl. Figs. 10 en 12).

Bij concentraties groter dan 0.5 M nemen de n -waarden nog weinig toe; voor NaCl en KCl tot 4.0 bij 3.0 molair. Het is echter opvallend dat, bij

hogere concentraties, CaCl_2 een sterk remmend effect op de haem-haem interactie heeft (afname van n_2 van 4.8 bij 0.5 M tot 2.9 bij 2.0 M).

Deze resultaten leiden tot een aantal algemene conclusies:

- = Een toename van de ionsterkte veroorzaakt een facilitatie van de zuurstofbinding aan het haemoglobine, wat leidt tot verhoging van de zuurstofaffiniteit.
- = De mate waarin de zuurstofbinding gefaciliteerd wordt is niet alleen afhankelijk van de ionsterkte, maar ook van de aard van de elektrolyten (kationen!).
- = Een toename van elektronen-aktiviteit, bij toenemende ionsterkte, verhoogt de intensiteit van de haem-haem interactie.
- = De haem-haem interacties worden zowel door de ionsterkte als de aard van de ionen beïnvloed (kationen en anionen!).

Het zouteffect op de oxygenatie van Arenicola-Hb komt overeen met het zouteffect op de zuurstofbinding aan chlorocruorine van Spirographis (ANTONINI, 1962). Andere bloedpigmenten en haemoglobine van andere diersoorten vertonen een tegengestelde reactie op de aanwezigheid van zouten. Bij mens-Hb hebben zouten een inhiberend effect op de oxygenatie (SIDWELL, 1938). ROSSI-FANELLI en ANTONINI (1961) vonden voor mens-Hb, bij toenemende zoutconcentraties een toenemende sig-

moidale vorm van de dissociatie-kurve; voor een traject van hogere zoutconcentraties (0.3-4.0 M) neemt de zuurstofaffiniteit bij toenemende zoutconcentratie toe, terwijl in de concentratie-range van 0.0002-0.2 M een omgekeerd effect optreedt.

Wanneer natrium is toegevoegd aan mens-Hb vertoont de dissociatie-kurve een sterkere sigmoidale vorm dan bij toevoeging van kalium (vgl. WOLVEKAMP, 1961). Ook SIDWELL (1938) constateerde dat de aard van de in oplossing zijnde elektrolyten van invloed is op het oxygenatie-proces.

Voor haemocyanine van Crustaceae is een negatieve correlatie aangetoond tussen de zoutconcentratie en de zuurstofaffiniteit, behalve voor bivalente kationen (Mg^{2+} , Cr^{2+} en Sr^{2+}), waarbij de O_2 -affiniteit toeneemt bij toenemende concentratie (REDMOND, 1955).

Over het algemeen bestaat er een positieve correlatie tussen de zoutconcentratie en de zuurstofaffiniteit; een toename van zoutconcentratie veroorzaakt een toenemende O_2 -affiniteit (vgl. PROSSER en BROWN, 1962).

Het is niet mogelijk om uit deze verschillende onderzoeken tot een algemeen beeld te komen over de effecten van elektrolyten op het oxygenatie-proces. De zouteffecten op de zuurstofbinding van haemoglobine van verschillende diersoorten lopen sterk uiteen en kunnen afhankelijk zijn van de milieuomstandigheden waarin de diersoorten voorkomen.

Alvorens nader in te gaan op het werkingsmecha-

nisme van elektrolyten op zuurstofaffiniteit en haem-haem interactie, zullen eerst een aantal punten toegelicht worden.

Of bij de toename van de ionsterkte de zuurstofaffiniteit toeneemt als gevolg van toename in positieve of negatieve ionen, of beide, is uit de resultaten niet te concluderen. Hiervoor zouden experimenten gedaan moeten worden met stoffen die kunnen dissociëren in een vorm waarbij één van de ionen een "geladen-grootmolecuul" is (bv. zwitterionen van aminozuren, Na-zouten van eiwitten) en het andere een klein ion. WYMAN (1964) constateert dat het zouteffect op de zuurstofaffiniteit van mens-Hb afhankelijk is van de pH. Voor Arenicola-Hb blijkt dat de zuurgraad geen of nauwelijks invloed heeft op het effect van natriumchloride (Fig. 7) (richtingscoëfficiënten van de helling van de kurven bedragen bij pH=6.20, 6.60 en 7.50 resp. -0.51, -0.53 en -0.43 bij 0.2-0.6 molair). In hoeverre er een pH-beïnvloeding op de effecten van de andere gebruikte zouten optreedt is niet nagegaan. Maar het is niet waarschijnlijk dat er een interactie tussen protonen en ionen optreedt waardoor het zouteffect gemodificeerd zou worden, daar de zuurgraad ook geen invloed heeft op de effecten van natriumchloride, in het pH-gebied van 6.4-7.2. HILL's interactie constante, n , is niet alleen een maat voor het aantal elkaar beïnvloedende haem-groepen, maar ook voor de intensiteit van deze inter-

acties. Zo kan een n-waarde van 4.2 aangeven dat er een intensitieve interactie bestaat tussen 5 haem-groepen, maar ook dat er een minder sterke interactie bestaat tussen meer dan 5 haem-groepen.

Dus de n-waarde geeft het netto-effekt van alle faciliterende haem-haem interacties weer, zonder dat gezegd kan worden hoeveel haem-groepen of groepen van haem-groepen aan de interacties deelnemen; n geeft dus het minimale aantal haem-groepen dat bij de interacties betrokken is.

4.7 Over het werkingsmechanisme van de zouteffekten op het Hb-O₂-evenwicht.

Het effect van elektrolyten op de zuurstofaffiniteit wordt veroorzaakt door interacties tussen het proteïne en de in oplossing zijnde ionen. Deze interacties zijn reversibel en kunnen plaats vinden tussen specifieke plaatsen van de peptide ketens en de ionen. Hoewel dit mechanisme op moleculair niveau nog niet helemaal duidelijk is, worden de ionen door die specifieke groepen van de peptide ketens gebonden, waarvan de affiniteitsconstante afhankelijk zijn ("linked") van het oxygenatie-proces (ROSSI-FANELLI en ANTONINI, 1964). Een ander mechanisme, dat mede tot facilitatie of inhibitie van de zuurstofbinding kan leiden, zijn plaatselijke veranderingen van elektronen-

verdeling die de bindingssterkte van waterstofbruggen van de eiwit-ketens modificeren, waardoor een verandering in primaire structuur van het molecuul optreedt (versterking òf verzwakking van proton-binding in het proteïne (vgl. MANWELL, 1964)). Bij voldoende sterke verandering van de primaire structuur kan er een modificatie optreden in de secundaire en tertiaire structuur van het molecuul, mits deze conformatie-verandering energetisch mogelijk is (verbreken òf verzwakken van proton-bindingen en andere niet-covalente bindingen die de secundaire en tertiaire structuur bepalen) (MANWELL, 1964).

Uit de resultaten van het onderzoek tenslotte, kan, met betrekking tot het mechanisme van de zout-effecten, het volgende geconcludeerd worden:

- = Er bestaat interactie tussen ionen in oplossing en de haem-groepen, die facilitatie van de oxygenatie veroorzaakt.
- = De bindingsplaatsen aan de peptide ketens voor ionen zijn anders dan die voor protonen, gezien de tegengestelde effecten van toenemende protonconcentratie en elektrolytconcentratie op de zuurstofaffiniteit (resp. verlaging en verhoging!), en gezien het feit dat in aanwezigheid van verschillende ionen het Bohr-effekt nog normaal optreedt.
- = Dat ook elektrostatische verschijnselen een rol spelen bij het mechanisme van conformatie-veranderingen onder invloed van elektrolyten kan worden

afgeleid uit het feit dat de aard van de ionen mede de grootte van het zouteffect bepalen, zowel op de zuurstofaffiniteit als op de haem-haem interacties.

= De expressie van de haem-haem interactie, d.w.z. het sigmoidale karakter van de dissociatie-kromme, is afhankelijk van de moleculaire conformatie; deze wordt beïnvloed door elektrolyten, waarbij de kationen een faciliterend effect en de anionen een inhiberend effect uitoefenen.

4.8 Adaptatie-experimenten met *Arenicola marina* L.

Om de fysiologische betekenis van de zouteffecten te kunnen interpreteren is het nodig te weten of en hoe de concentratie van elektrolyten in het bloed van *Arenicola* varieert met de zoutconcentratie in het milieu. Hiervoor zijn vier series van adaptatie-proeven gedaan, waardoor enig inzicht verkregen kon worden over de verhouding tussen elektrolyt-concentraties in het bloed en die in het milieu.

De dieren die gebruikt werden voor deze adaptatie-experimenten werden 7 of 12 dagen in een aquarium gehouden, dat gevuld was met een laag van 10 cm schoon zand en water van verschillende saliniteit, om in vivo elektrolyt-concentraties te bepalen. Deze werden bepaald door geleidbaarheidmetingen; de geleidbaarheid werd omgerekend tot NaCl-concentraties (WOLF, 1968).

De temperatuur tijdens de adaptatie was 15°C ; de saliniteiten van het water waaraan de dieren geadapted werden, bedroegen ongeveer 10, 17, 25, 32 en $40^{\circ}/\text{oo}$. De resultaten van de proeven waarbij de dieren in een aquarium gevuld met zeewater werden gehouden, zijn als referentie gebruikt.

Bloed werd van de individuen afgetapt en de bloedmonsters ondergingen verder, behalve verdunning met aqua tridest, geen behandeling.

Figuur 13 geeft de correlatie weer tussen de saliniteit van het milieu en de elektrolyt-concentratie van het bloed, uitgedrukt in gmol NaCl/l . Bij toenemende saliniteit van het milieu neemt de elektrolyt-concentratie van het bloed toe. Er is echter duidelijk sprake van hypo-regulatie van elektrolyten in het bloed ten opzichte van het milieu. Bovendien treedt er bij hogere saliniteit een grotere afwijking op van de iso-conductieve correlatie dan bij lagere saliniteit. DUVAL (1925) constateert dat het bloed van Arenicola marina steeds iso-osmotisch is met het "milieu extérieur". De osmotische concentratie van diverse opgeloste stoffen in de lichaamsvloeistof (bloed) is dezelfde als die in zeewater (dus geen osmo-regulatie), terwijl Arenicola wel volume-regulatie vertoont (vgl. PROSSER en BROWN, 1962).

Geconcludeerd kan worden dat Arenicola elektrolyt-regulatie vertoont en aangezien volgens de literatuur geen osmo-regulatie optreedt, moeten er in het bloed

andere stoffen aanwezig zijn die bij toenemende saliniteit van het milieu in concentratie toenemen en die bijdragen tot de osmotische concentratie van het bloed. Gezien de geringe elektrolyt-regulatie is duidelijk dat het haemoglobine in het dier, ook onder natuurlijke omstandigheden, aan grote variaties in zoutconcentratie bloot gesteld wordt.

4.9 Over de biologische betekenis van de zouteffekten.

Elk eiwit reageert op de aanwezige elektrolyten. Voor Arenicola marina reageert het Hb op de aanwezigheid van elektrolyten door een verhoging van de zuurstofaffiniteit. Bij verdunning van zeewater neemt de O_2 -affiniteit van Arenicola-Hb af, maar deze afname is betrekkelijk weinig in het saliniteit-bereik waarin de dieren normaal voorkomen. De saliniteit van het zeewater op het wad varieert maximaal van 22-32⁰/oo (REINECK, 1970); dit komt overeen met een variatie van 0.4-0.6 g/mol NaCl/l. LINKE (1939; vgl. REINECK, 1970) voerde zoutmetingen uit in de bodemlaag van het wad; in de saliniteitschommelingen van 22-32⁰/oo treden geen afwijkingen op zolang het water het wad bedekt. Bij het droogvallen van het wad treden in de bodem, onder invloed van weersomstandigheden (wind, luchtvochtigheid, zonnestraling), veranderingen op van het zoutgehalte; deze veranderingen variëren van 3-5⁰/oo onder normale omstandigheden.

Bij extreme omstandigheden (zware regenval, intensieve zonnestraling, strenge vorst) zijn saliniteit-afwijkingen tot 25⁰/oo mogelijk. De meeste variatie in saliniteit van de wadbodem treedt op tijdens het droogvallen van het wad en onder normale omstandigheden is er een variatie van maximaal 0.3-0.7 g/mol NaCl/l. *)

De reactie van Hb op de aanwezigheid van elektrolyten zou een adaptatie in eigenschappen van het eiwit kunnen zijn, waardoor een hogere O₂-affiniteit wordt gewaarborgd bij hogere zoutconcentraties. Of de afname van O₂-affiniteit van het Hb, bij lage zoutconcentraties, de verspreiding van de individuen en de diersoort kan begrenzen, kan uit de bij dit onderzoek verkregen gegevens niet afgeleid worden.

Dat de effecten van elektrolyten een direct adaptieve betekenis kunnen hebben wordt aannemelijk wanneer men bedenkt dat de saliniteit van het water op het wad vrij snel en sterk wisselt. Dit verschijnsel waaraan Arenicola regelmatig bloot staat en waaraan het zich snel moet kunnen aanpassen, en waardoor het zouteffect biologische betekenis zou krijgen, zou een

*) De saliniteit van het zeewater is uitgedrukt in g/mol NaCl/l. De belangrijkste ionen in het zeewater zijn Na⁺ (0.46 gion/l), K⁺ (0.01 gion/l), Ca²⁺ (0.01 gion/l), Mg²⁺ (0.06 gion/l), Cl⁻ (0.54 gion/l) en SO₄²⁻ (0.01 gion/l) (In: Chemical Oceanography van J.P. RILEY en G. SKIRROW, 1965).

direkt verlopend fysisch-chemisch proces kunnen zijn (bv. "salting-out effect" - de hoeveelheid zuurstof in oplossing neemt af bij toenemende elektrolyt-concentratie).

Een andere biologische betekenis zou de volgende kunnen zijn.

Het water in de U-vormige buis waarin Arenicola leeft, stagneert bij het droogvallen van het wad. De zoutconcentratie neemt toe en die van zuurstof af (verdamping!). Voor het dier is het nuttig dat ook onder deze extreme omstandigheden makkelijk zuurstof gebonden kan worden. Bovendien neemt het aantal en de intensiteit van de ademhalingsbewegingen af bij afnemend zuurstofgehalte (VAN DAM, 1938). Ook hier moet een zo effectief mogelijke zuurstofbinding door het haemoglobine tegenover staan.

Deze mogelijke biologische betekenis van het zouteffect is vrij speculatief en berust op vrij zwakke gronden. Vooral ook omdat er bijzonder weinig bekend is over de fysisch-chemische factoren van de levensomstandigheden van Arenicola, is weinig te zeggen over de functionele betekenis van de zouteffecten.

5. Referenties

- ALLEN, D.W. & J. WYMAN Jr., 1952. The oxygen equilibrium of hemerythrin of Arenicola cristata. J. cell. comp. Physiol. 39:383-389.
- ALLEN, D.W., J. WYMAN Jr. & C.A. SMITH, 1953. The oxygen equilibrium of fetal and adult human haemoglobin. J. Biol. Chem. 203 (1):81-87.
- ANTONINI, E., 1964. Structure and function of haemoglobin and myoglobin. Proc. symp. 'Oxygen in the animal Organism':121-140.
- ANTONINI, E., 1967. Hemoglobin and its Reaction with Ligands. Science 158:1417-1425.
- ANTONINI, E., A. ROSSI-FANELLI & A. CAPUTO, 1962. Studies on Chlorocruorin, I. The oxygen equilibrium of Spirographis chlorocruorin. J. Biochem. and Biophys. 97: 336-342.
- ANTONINI, E., J. WYMAN Jr., A. ROSSI-FANELLI & A. CAPUTO, 1962. Study on the relation between Molecular and Functional Properties of Haemoglobin, III. The influence of salts on the Bohr-effect in human haemoglobin. J. Biol. Chem. 237 (9):2773-2777.
- BENESCH, R. & R.E. BENESCH, 1961. The chemistry of the Bohr-effect, I. The reaction of N-ethyl maleimide with the oxygen linked acid groups of haemoglobin. J. Biol. Chem. 236 (2):405-410.
- BENESCH, R.E. & R. BENESCH, 1962. The influence of oxygenation on the reactivity of the -SH groups of haemoglobin. Biochemistry 1:735-738.
- BENESCH, R.E., R. BENESCH & G. MACDUFF, 1964. The Dissociation of Haemoglobin A and H in concentrated sodium

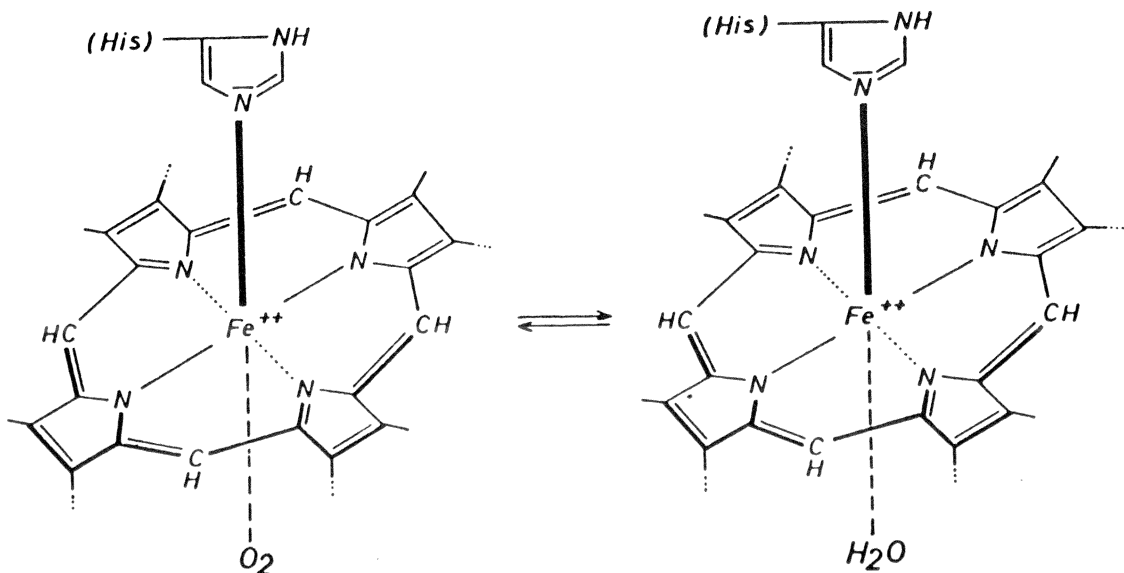
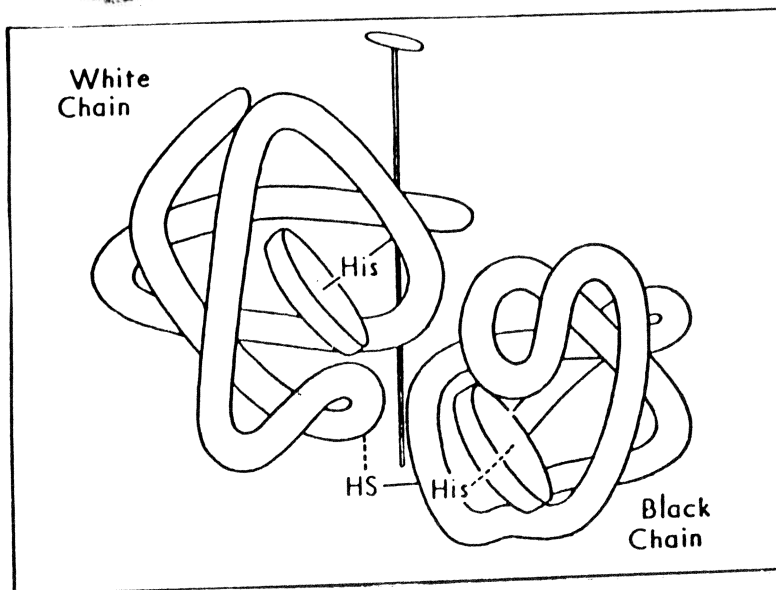
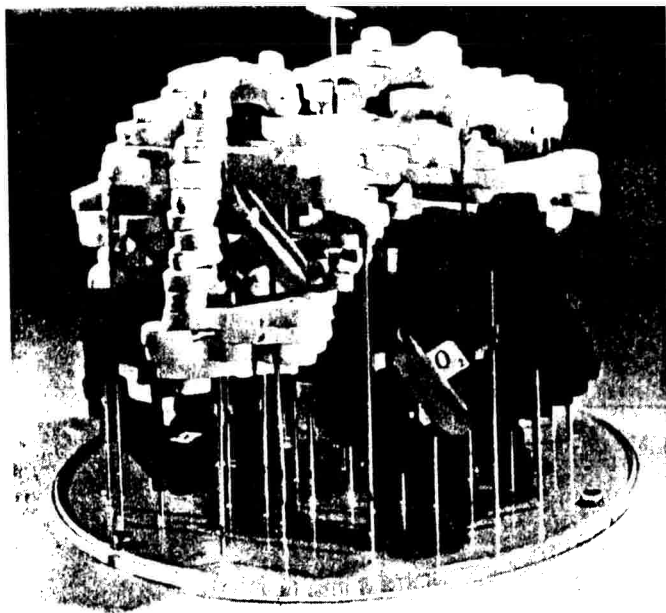
- chloride. Biochem. 3:1132-1134.
- DAM, L. van, 1938. On the utilisation of oxygen and regulation of breathing in some aquatic animals. Thesis, Groningen University:96-97.
- DILL, D.B., H.F. EDWARDS & A. FÖLLING, 1931. Adaptations of the Organism to changes in Oxygen Pressure. J. Physiol. LXXI (1):47.
- DUVAL, H., 1925. Modification sur l'influence du milieu extérieur. Annales de l'Institut Océanographique (Monaco) 8:232-407.
- KARLSON, P., 1964. Kurzes Lehrbuch der Biochemie. Georg Thieme Verlag. Stuttgart. Hfst. IX:151-159.
- LEVIN, Ö., 1963. Electron microscope observations on some 60s. erythrocrucorins and their split products. J. Mol. Biol. 6:95-101.
- MANWELL, C., 1960. Comparative Physiology: Blood Pigments. Ann. Rev. Physiol. 22:191-244.
- MANWELL, C., 1964. Chemistry, Genetics and Function of Invertebrate Respiratory Pigments - Configurational changes and allosteric effects. Proc. symp. 'Oxygen in the Animal Organism':49-119.
- NIESEL, W. & G. THEWS, 1961. Ein neues Verfahren zur schnellen und genauen Aufnahme der Sauerstoffbindungskurve des blutes und konzentrierten Hämoproteidlösungen. Pflügers Arch. ges. Physiol. 273 (4):380-395.
- PATEL, S. & C.P. SPENCER, 1963. Studies on the haemoglobin of Arenicola marina. Comp. Biochem. Physiol. 8:65-82.

- PERUTZ, H.F., 1970. Stereochemistry of Cooperative Effect in Haemoglobin. *Nature*, Lond. 228:726-739.
- PROSSER, C.L. & F.A. BROWN, 1962. Comparative Animal Physiology. W.B. Saunders Company, Philadelphia-London.
- REDMOND, J.R., 1955. The respiratory function of hemocyanin in Crustacea. *J. cell. comp. Physiol.* 46: 209-247.
- REINECK, H.E., 1970. Das Watt: Ablagerungs und Lebensraum. Verlag von Waldemar Kramer, Frankfurt am Main.
- RIGGS, A.F., 1952. Sulfhydrylgroups and the interaction between hemes in the hemoglobin. *J. gen. Physiol.* 36:1-16.
- ROSSI-FANELLI, A., E. ANTONINI & A. CAPUTO, 1959. Oxygen equilibrium of human haemoglobin in strong salt solutions. *Nature*, Lond. 183 (4664):827-828.
- ROSSI-FANELLI, A., E. ANTONINI & A. CAPUTO, 1961. Studies on the relation between Molecular and Functional Properties of Haemoglobin, I. The effects of salts on the molecular weight of human haemoglobin. II. The effects of salts on the oxygen equilibrium of human haemoglobin. *J. Biol. Chem.* 236 (2):391-400.
- ROSSI-FANELLI, A., E. ANTONINI & A. CAPUTO, 1964. Hemoglobin and Myoglobin. In 'Advances in Protein Chemistry' 19:74-222.
- SALOMON, K., 1941. Studies on invertebrate hemoglobins (erythrocrucorins). *J. gen. Physiol.* 24:367-375.
- SICK, H. & K. GLERSONDE, 1968. Die O₂-Bindungseigenschaften einiger Larvalhämoblobinen von Chironomus th. thummi.

- European J. Biochem. 7:273-279.
- SIDWELL, A.E., R.H. MUNCH Jr. et al., 1938. The salt effect on the hemoglobin-oxygen equilibrium. J. Biol. Chem. 123 (2): 335-350.
- WEBER, R.E., 1965. On the haemoglobin and respiration of Chironomus larvae with special references to C. plumosus plumosus L. Doctorate thesis, Leiden University.
- WEBER, R.E., 1969. Interaction between haems in the haemoglobin of Arenicola marina L. Lecture Society of Experimental Biology, York Conference, July 1969.
- WEBER, R.E., 1970. Relations between functional and molecular properties of Annelid haemoglobins, I. Interaction between haems in the haemoglobin of Arenicola marina L. Comp. Biochem. Physiol. 35:179-189.
- WEBER, R.E., 1971. Oxygenational properties of vascular and coelomic haemoglobins from Nephtys hombergii (Polychaeta) and their functional significance. Neth. J. Sea Res. 5 (2):240-251.
- WOLF, A.V., 1968. Aqueous solutions and body fluids: their concentrative properties and conversion tables. Harper & Row, Publishers, New York/London.
- WOLVEKAMP, H.P., 1961. The Evolution of Oxygen Transport. In 'Functions of the Blood', MacFarlane & Robb-Smith, Academic Press, New York/London.
- WOLVEKAMP, H.P. & M.C. VRIJDE, 1941. On the gasbinding properties of the blood of the lugworm (Arenicola marina L.). Arch. Néerl. Physiol. 25:265-276.

WYMAN Jr, J., 1948. Heme proteins. In 'Advances in Protein Chemistry' IV:410-531.

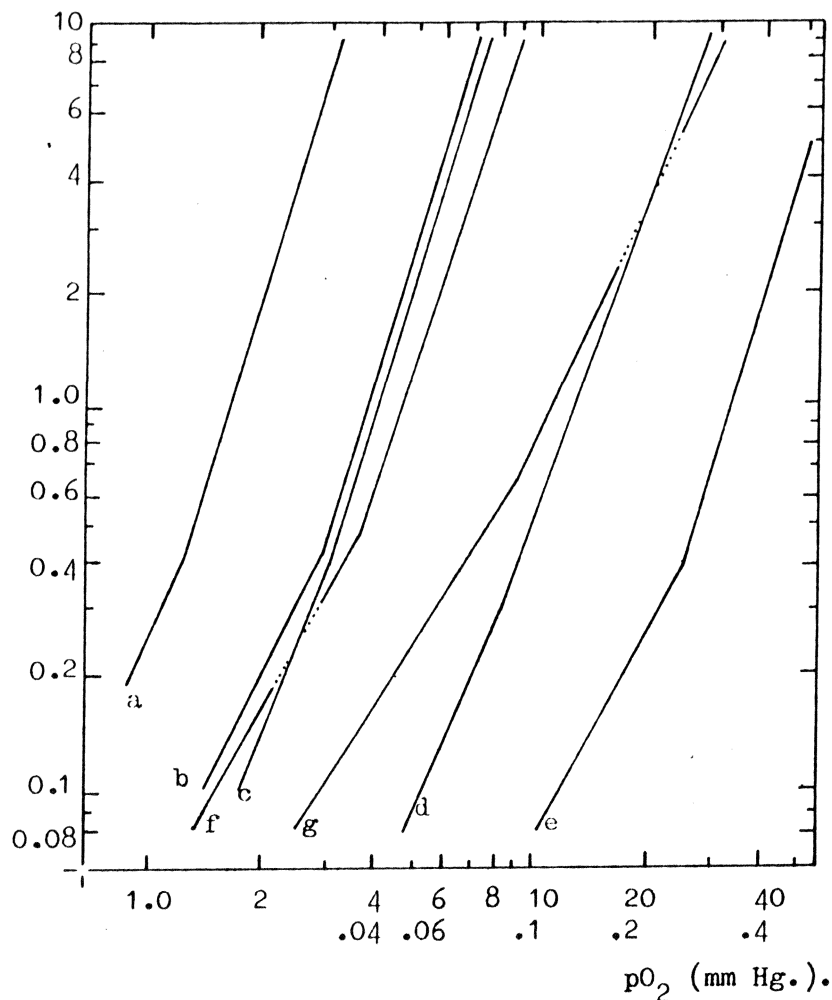
WYMAN Jr., J., 1964. Linked functions and reciprocal effects in hemoglobin: a second look. In 'Advances in Protein Chemistry' 19:238-251; 264-277; 284-286.



Figuur 1.

- boven: een model van het haemoglobine-molecuul van de mens; twee haem-groepen zijn zichtbaar (grijze schijven).
- midden: diagram van het Hb-molecuul van de mens; configuratie van twee subeenheden; haem-groepen door histidine (His) aan de peptide-keten verbonden. (PERUTZ, M.F. et al., 1960, Nature, Lond. 185: 416 - 422).
- onder: structuurformule van de haem-groep; een ijzerporphyrine ring door His aan het proteïne verbonden. O₂ wordt gebonden aan de 6^e coordinatie-plaats; bij afgifte van O₂ wordt H₂O gebonden. (KARLSON, 1964).

$(\text{OxyHb})/(\text{Hb})$.



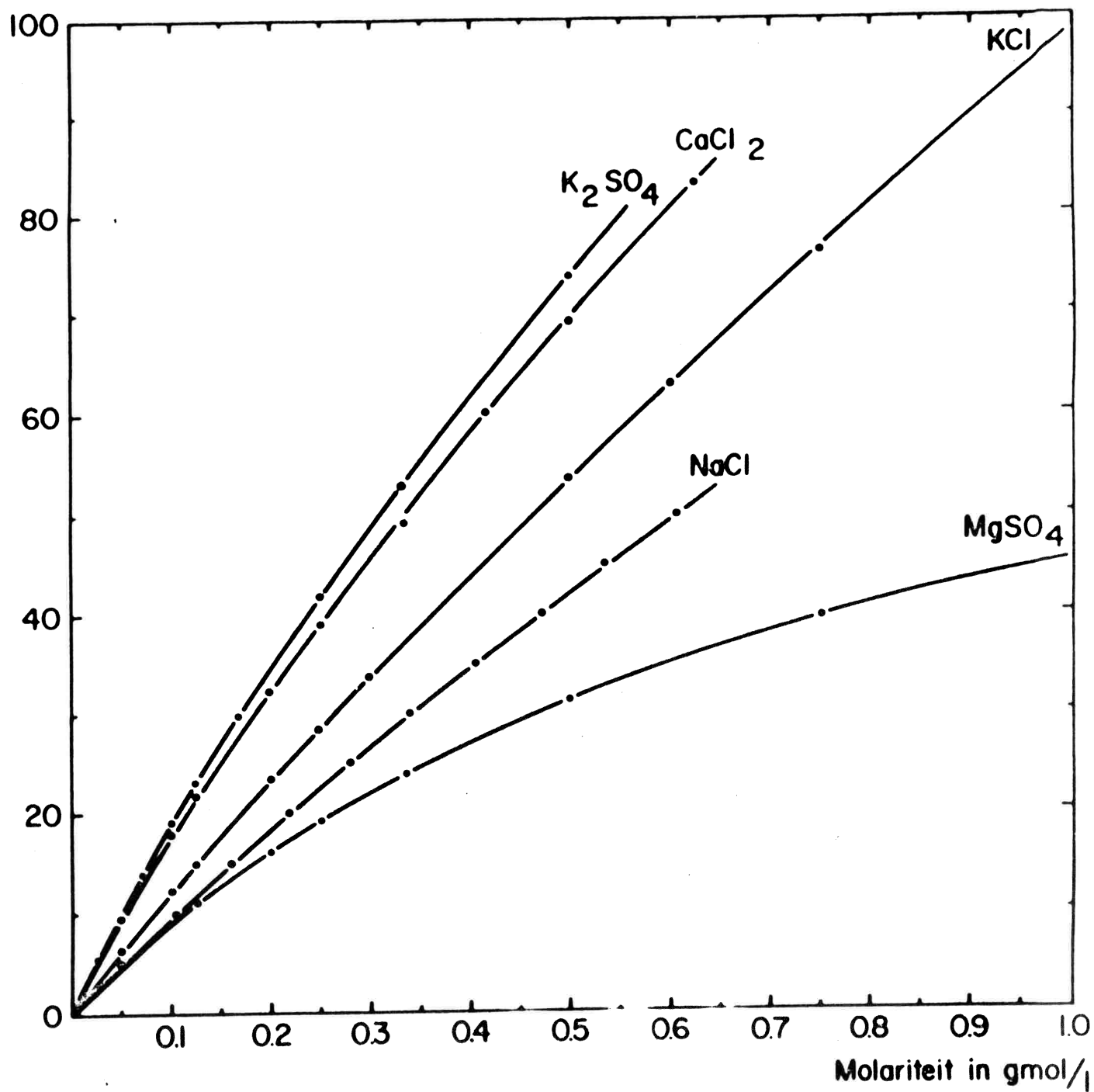
Figuur 2.

Hb - O₂ - evenwichtskurves van verschillende bloedmonsters van *Arenicola marina* L., logaritmisch uitgezet. De twee lineaire correlaties tussen de zuurstofspanning en het oxygenatiepercentage demonstreren het difasische karakter van de haem-haem interacties.

Tabel I. (bij figuur 2.).

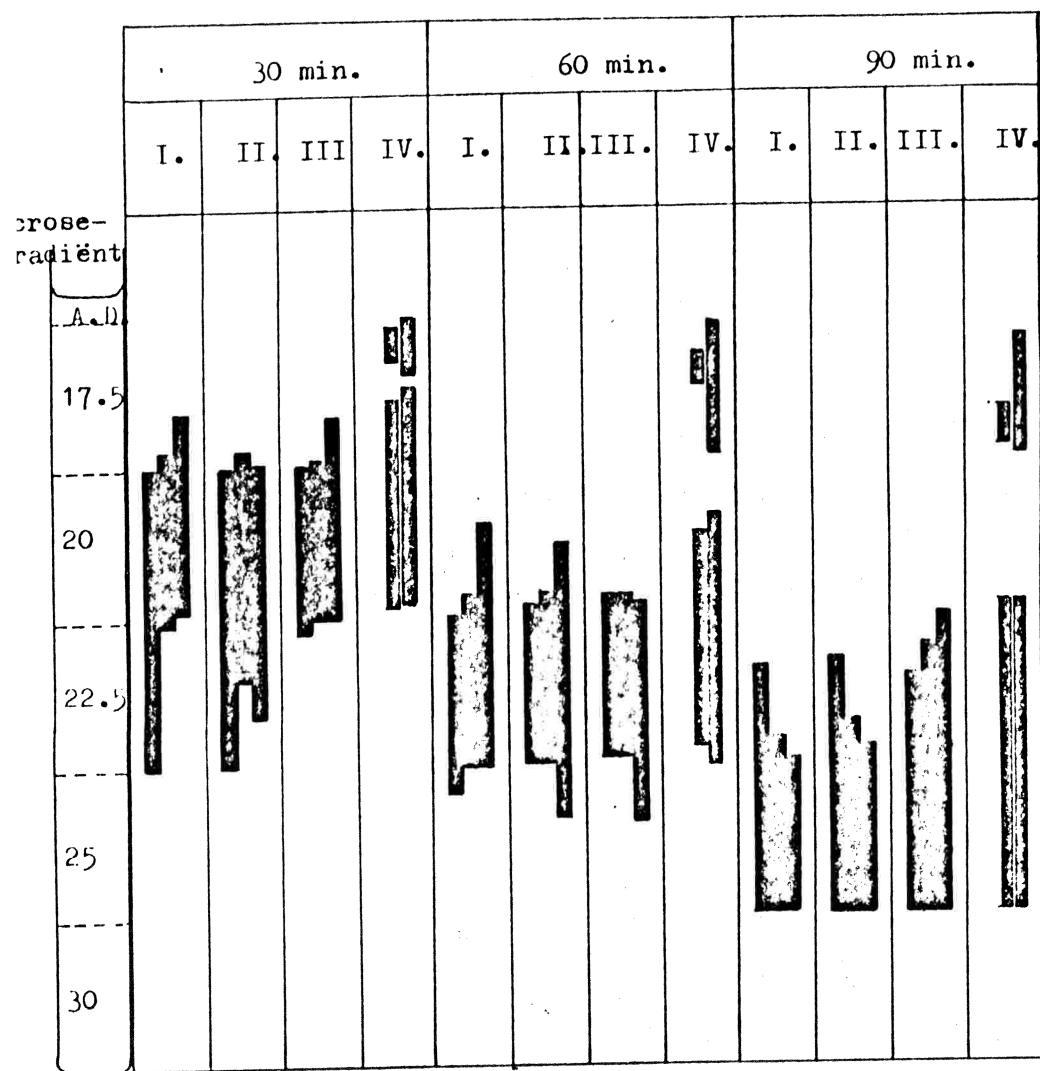
monster elektrolyt/buffer:		molariteit/ ionsterkte:	pH:	n ₁ :	n ₂ :
a.	NaCl	3.1	7.02	2.26	3.35
b.	NaCl	0.2	7.18	2.16	3.38
c.	KCl	0.2	7.18	2.60	3.52
d.	trishCl	0.2	8.11	2.28	3.02
e.	trishCl	0.2	7.30	2.11	3.62
f.	fosfaat	0.2	7.34	1.75	3.18
g.	fosfaat	0.2	6.32	1.62	2.15

geleidbaarheid mmho/cm



Figuur 3.

IJkkurven voor vijf zouten, waaruit de concentratie van elektrolyten, bij geleidbaarheidmetingen, direkt afgelezen kan worden.



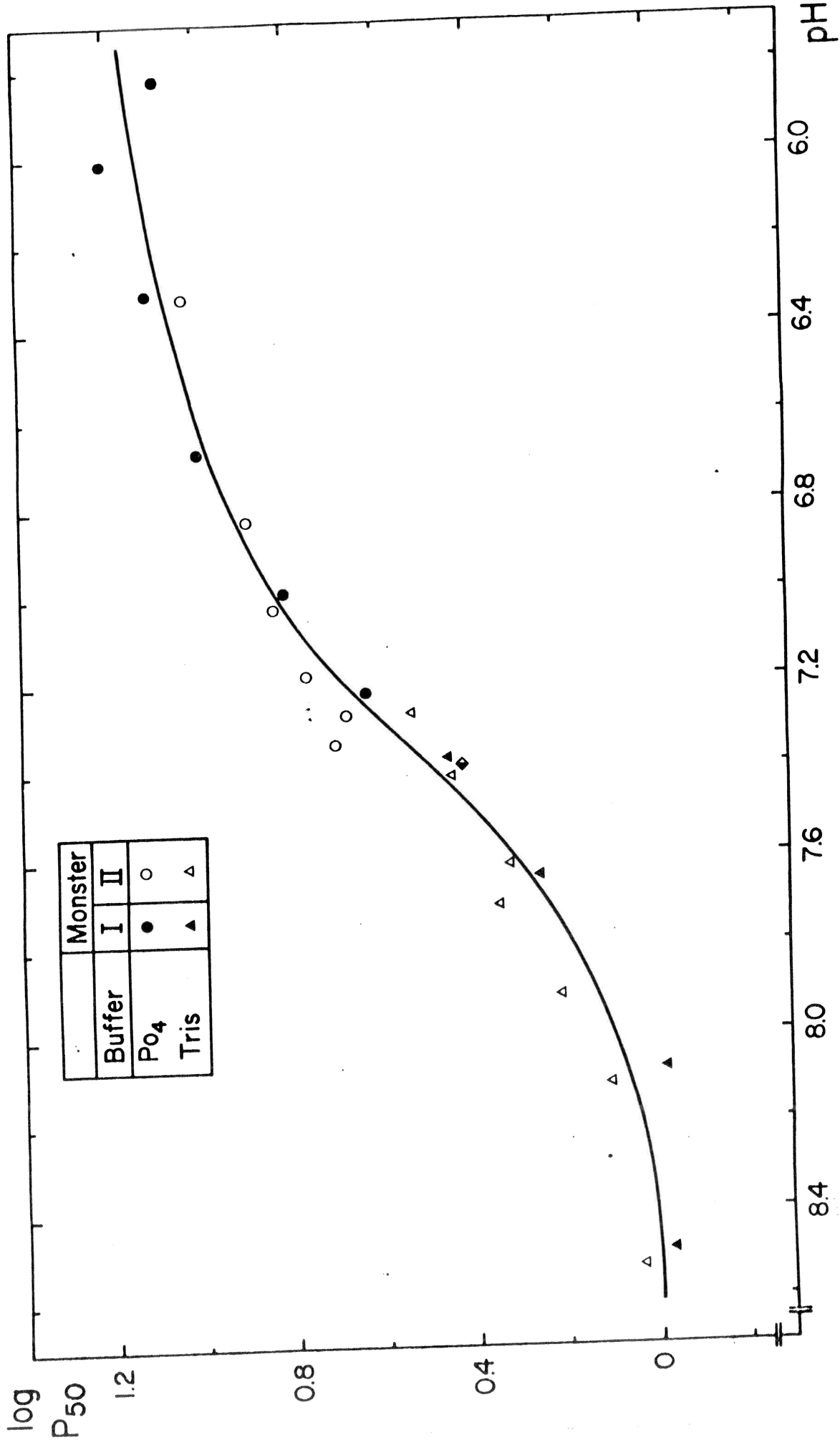
Figuur 4. Hb - dissociatie bij Arenicola marina L.

Sedimentatie - patroon na resp. 30, 60 en 90 minuten

gradient-centrifugatie (gradient van 17.5, 20, 22.5, 25 en 30 %

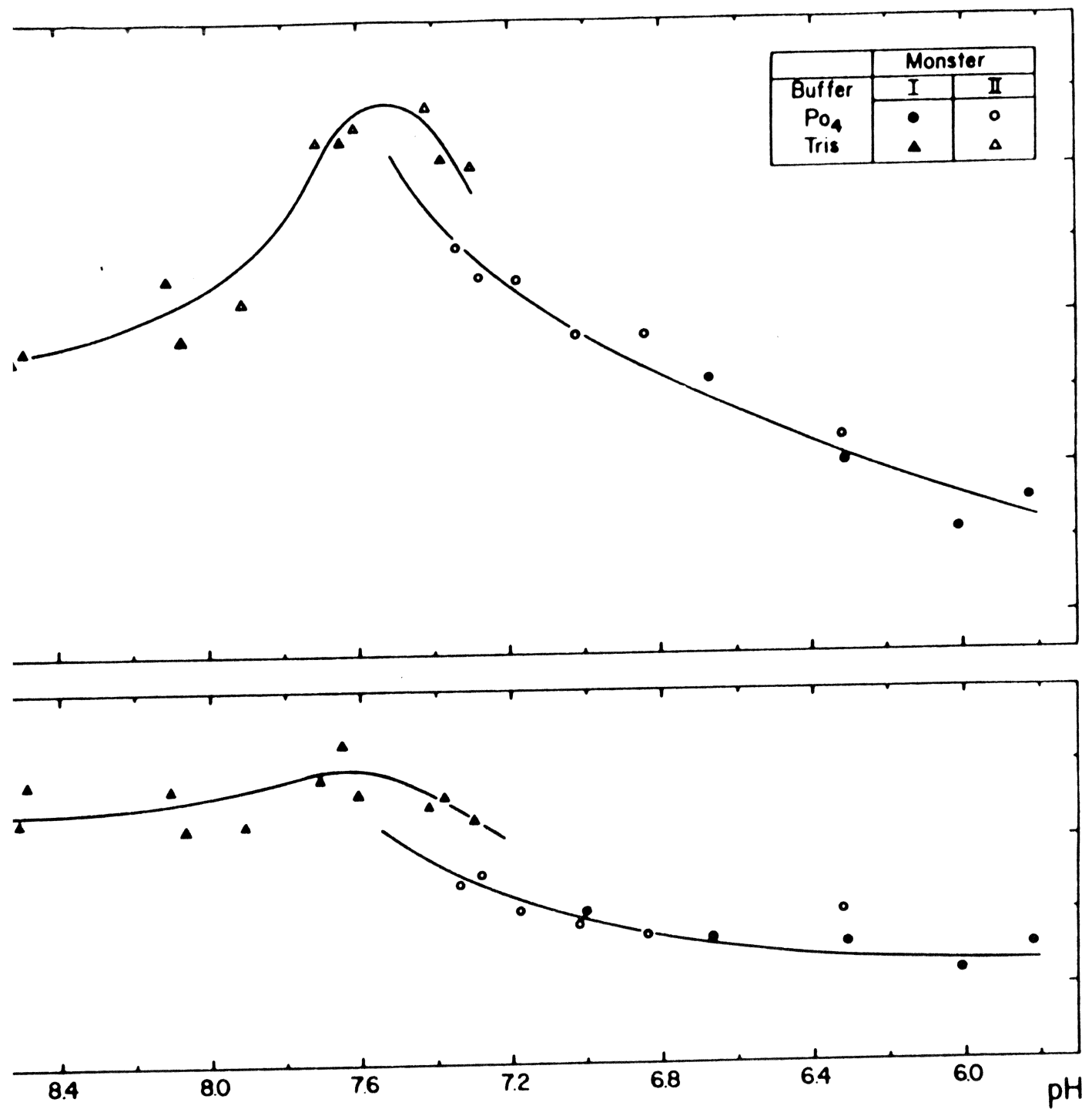
sucrose-oplossing) in de ultracentrifuge bij 50.000 r.p.m., van:

- I. ongedialyseerd-Hb , in een verdunning van 1 : 2 met gedestilleerd water.
- II. gedialyseerd-Hb , gedestilleerd water en een oplossing van 5 molair NaCl, in gelijke volumina bijeengevoegd.
- III. gedialyseerd-Hb , in een verdunning van 1 : 2 met gedestilleerd water.
- IV. ongedialyseerd-Hb , in een verdunning van 1 : 2 met fosfaatbuffer (pH = 10.5).



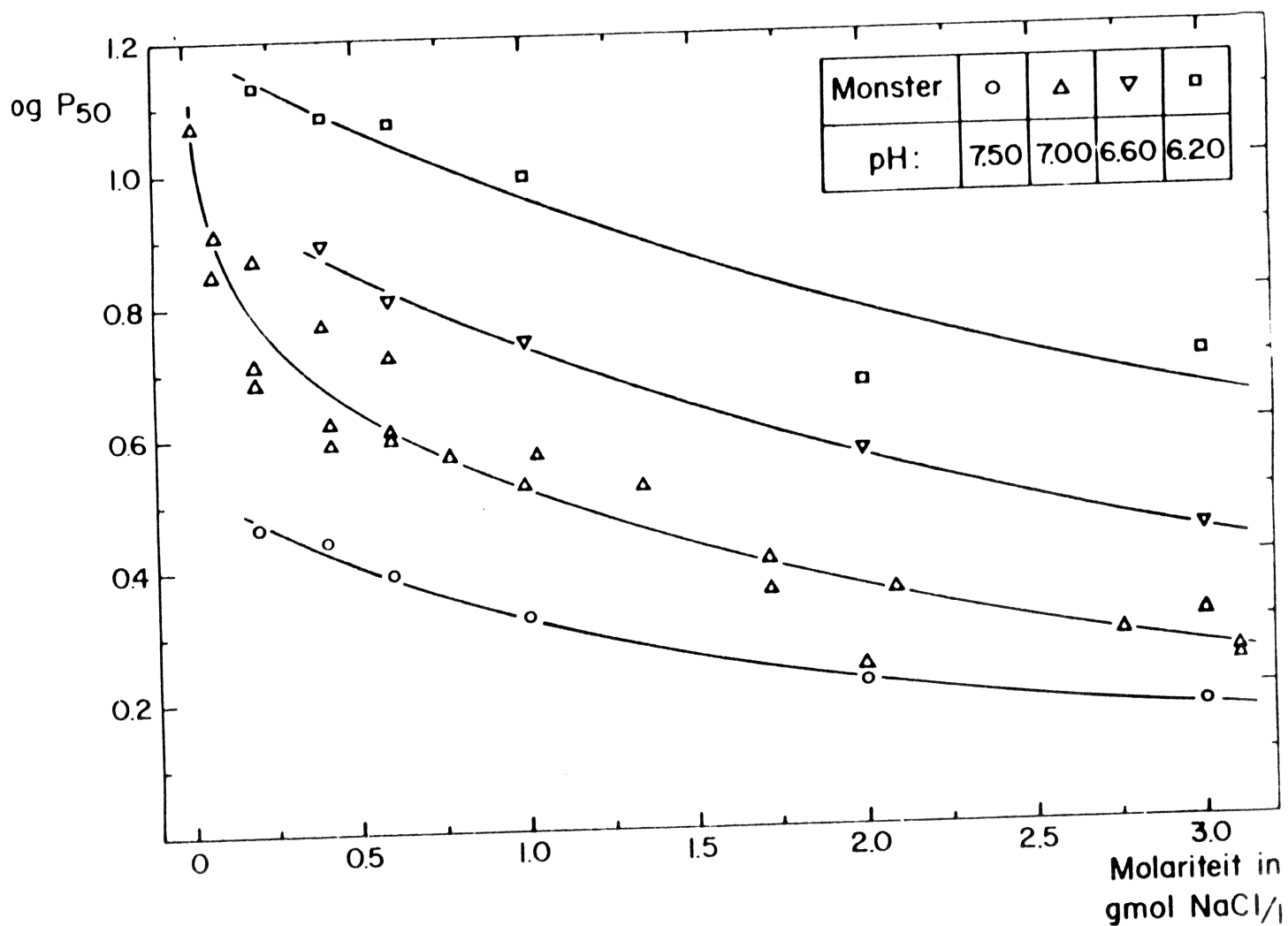
Figuur 2.

pH-effect op de zuurstofaffiniteit (P_{50}) van haemoglobine bij *Arenicola marina*, in het pH-gebied van 5.8 tot 8.5



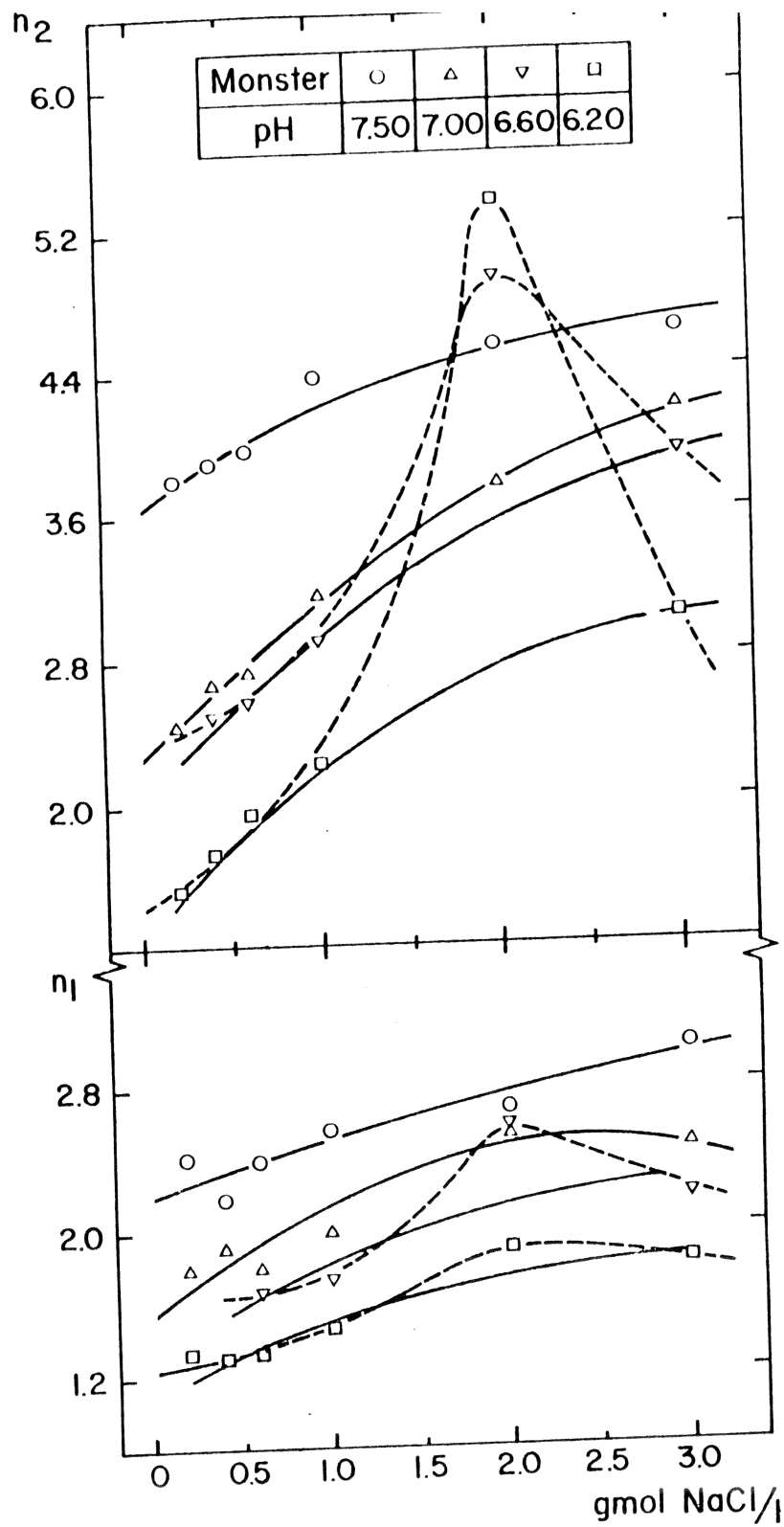
Figuur 6.

pH - effect op de haem-haem interactie (n_1 en n_2 waarden) bij haemoglobine van Arenicola marina, in het pH-gebied van 5.8 tot 8.5.



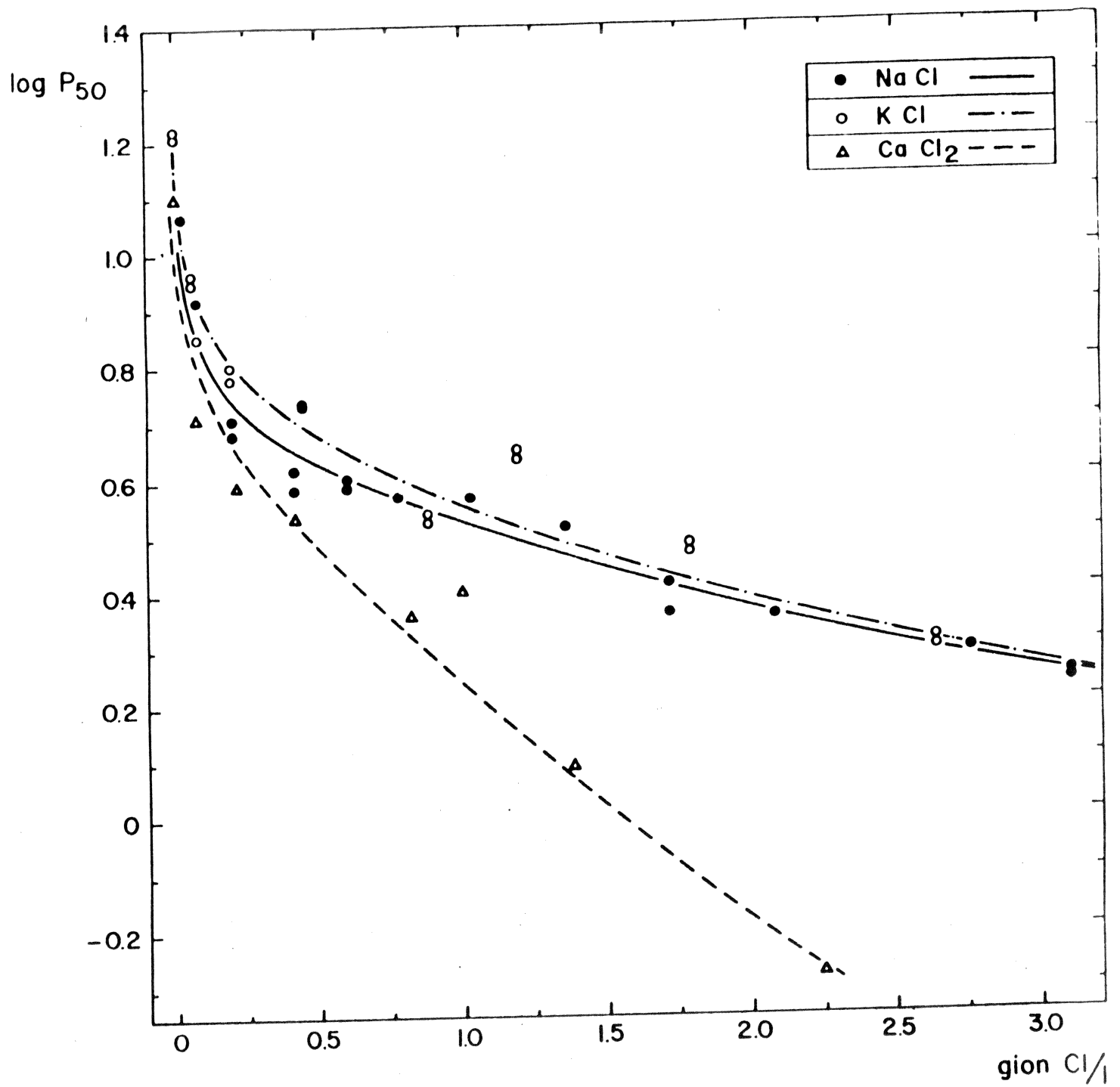
Figuur 7.

Invloed van natriumchloride in oplossing op de zuurstofaffiniteit van haemoglobine van Arenicola marina, bij verschillende pH's.



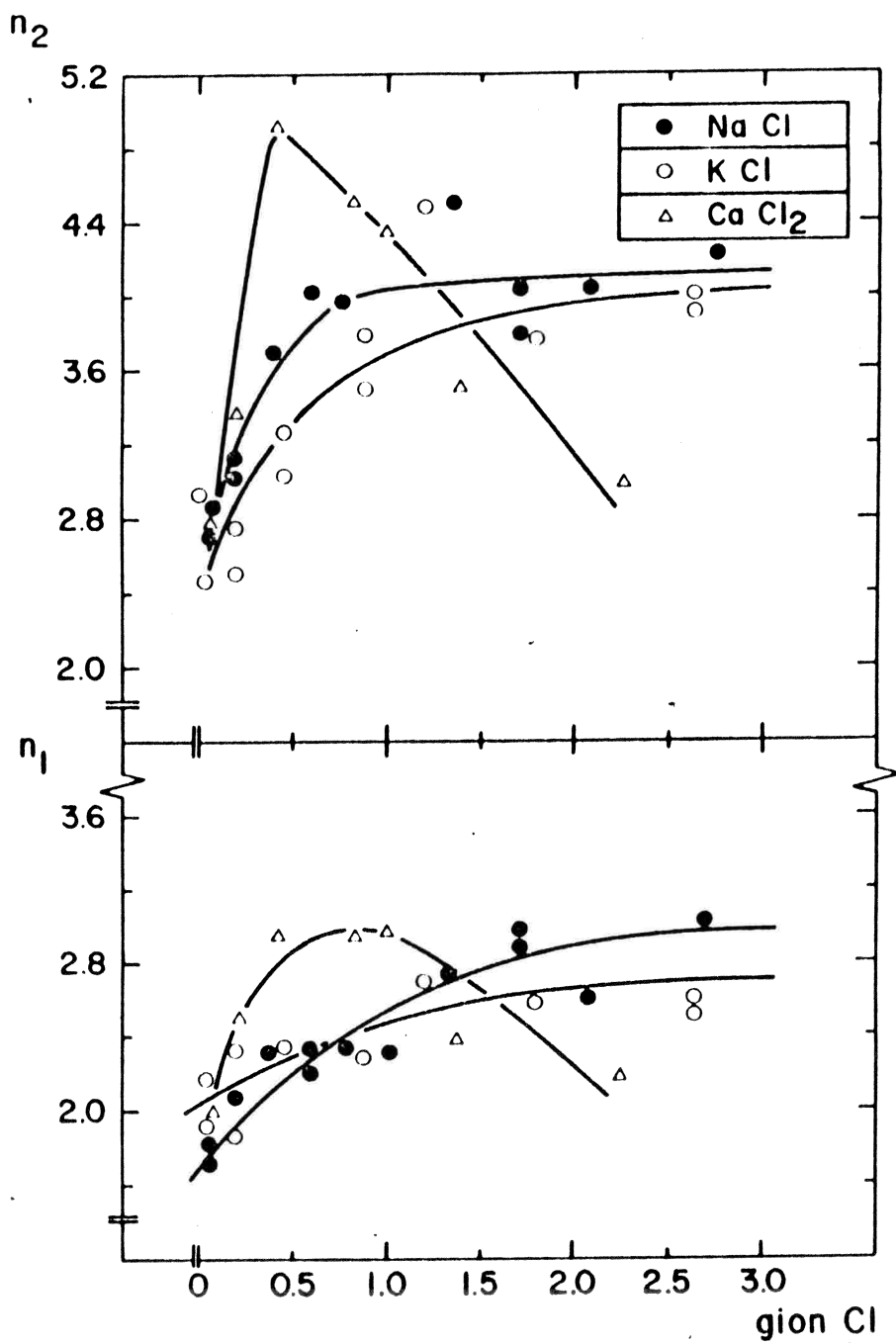
Figuur 8.

Invloed van natriumchloride in oplossing op de haem-haem interactie van Arenicola-Hb, bij verschillende pH's.



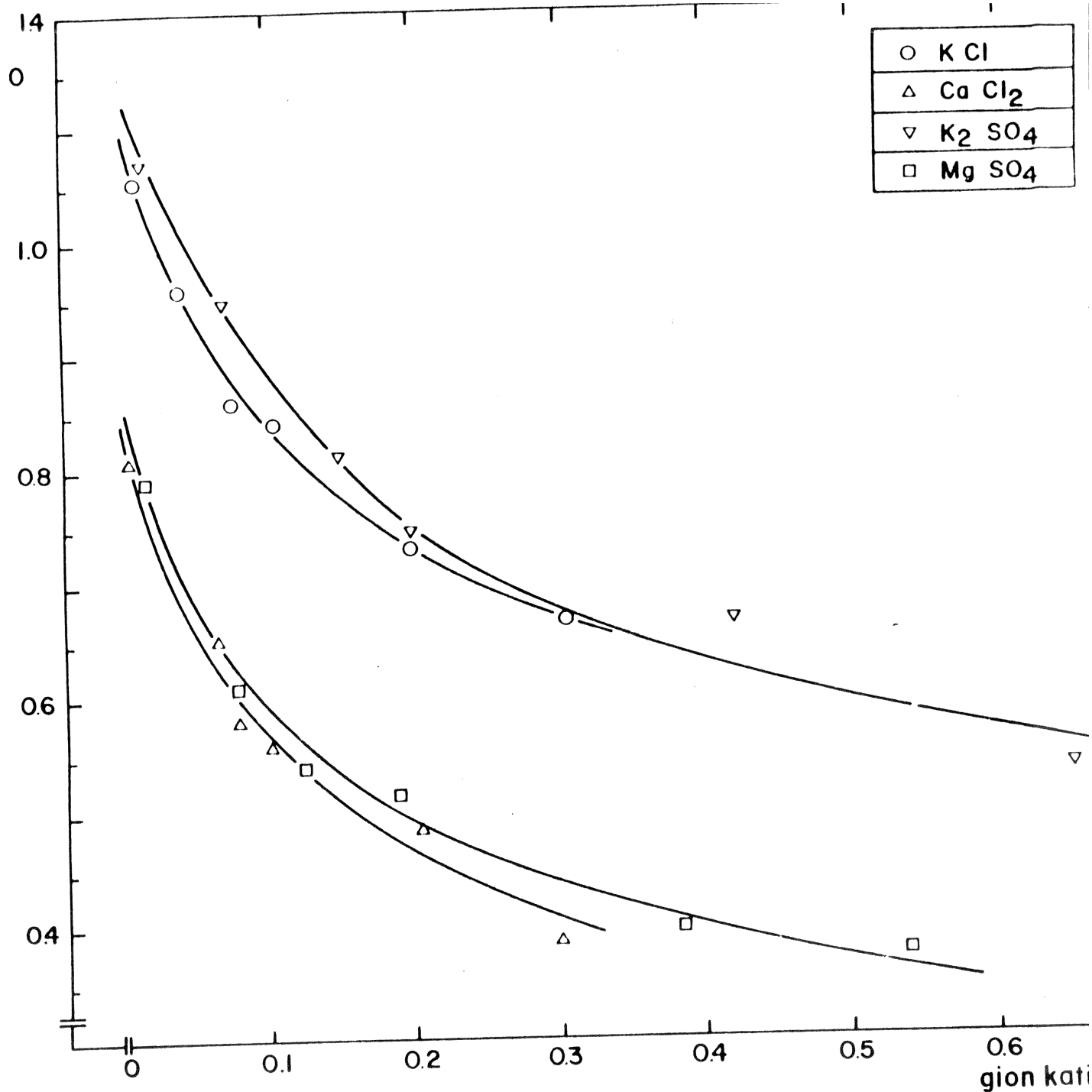
Figuur 2.

De effecten van natrium-, kalium- en calciumchloride in oplossing op de zuurstofaffiniteit van haemoglobine van *Arenicola marina*, in het concentratie-gebied tot 3.1 gion. Cl⁻/l.



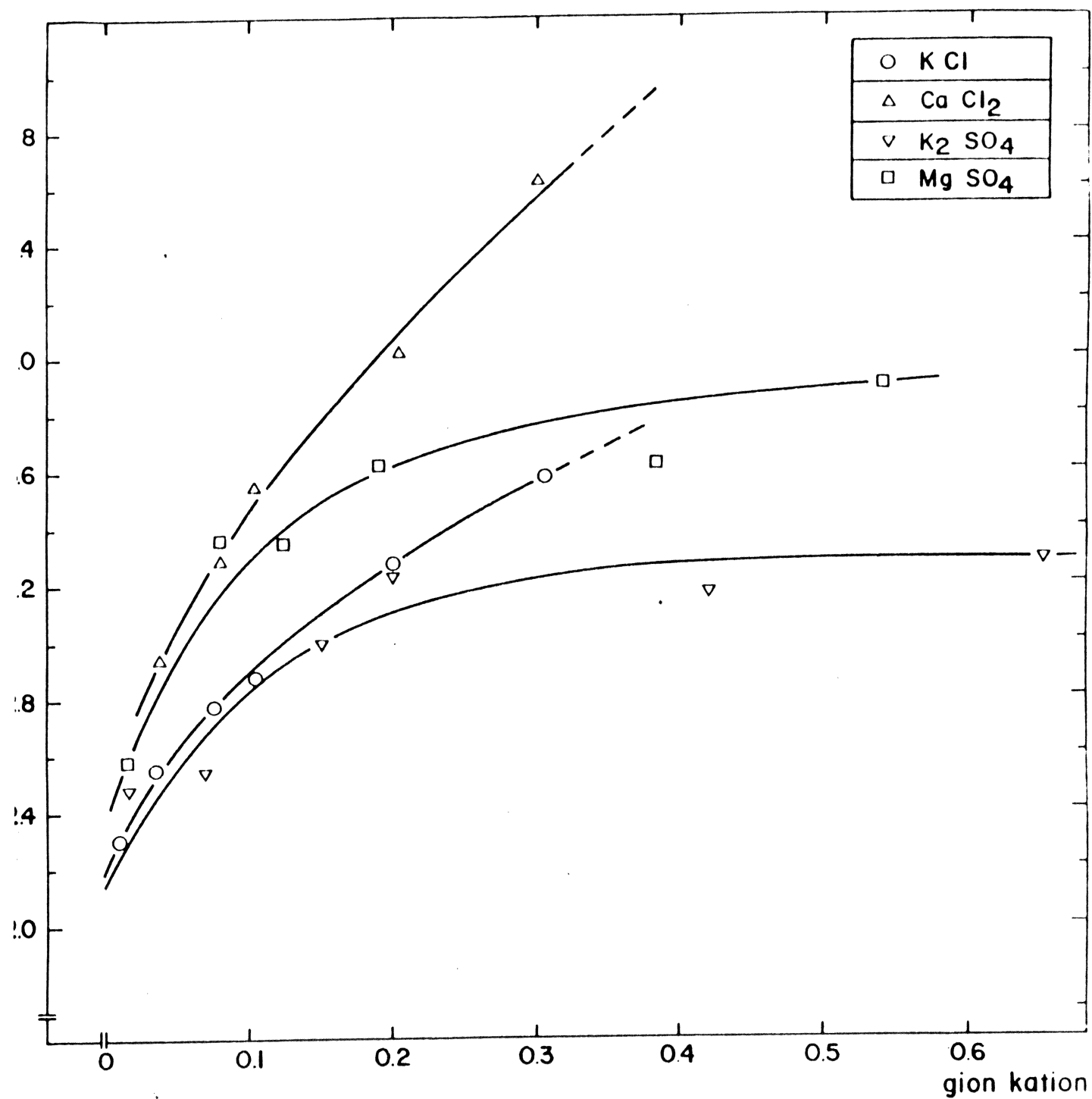
Figuur 10.

De effecten van natrium-, kalium- en calciumchloride in oplossing op de haem-haem interactie bij haemoglobine van Arenicola marina, in het concentratie-gebied tot 3.1 gion. Cl/l.



Figuur 11.

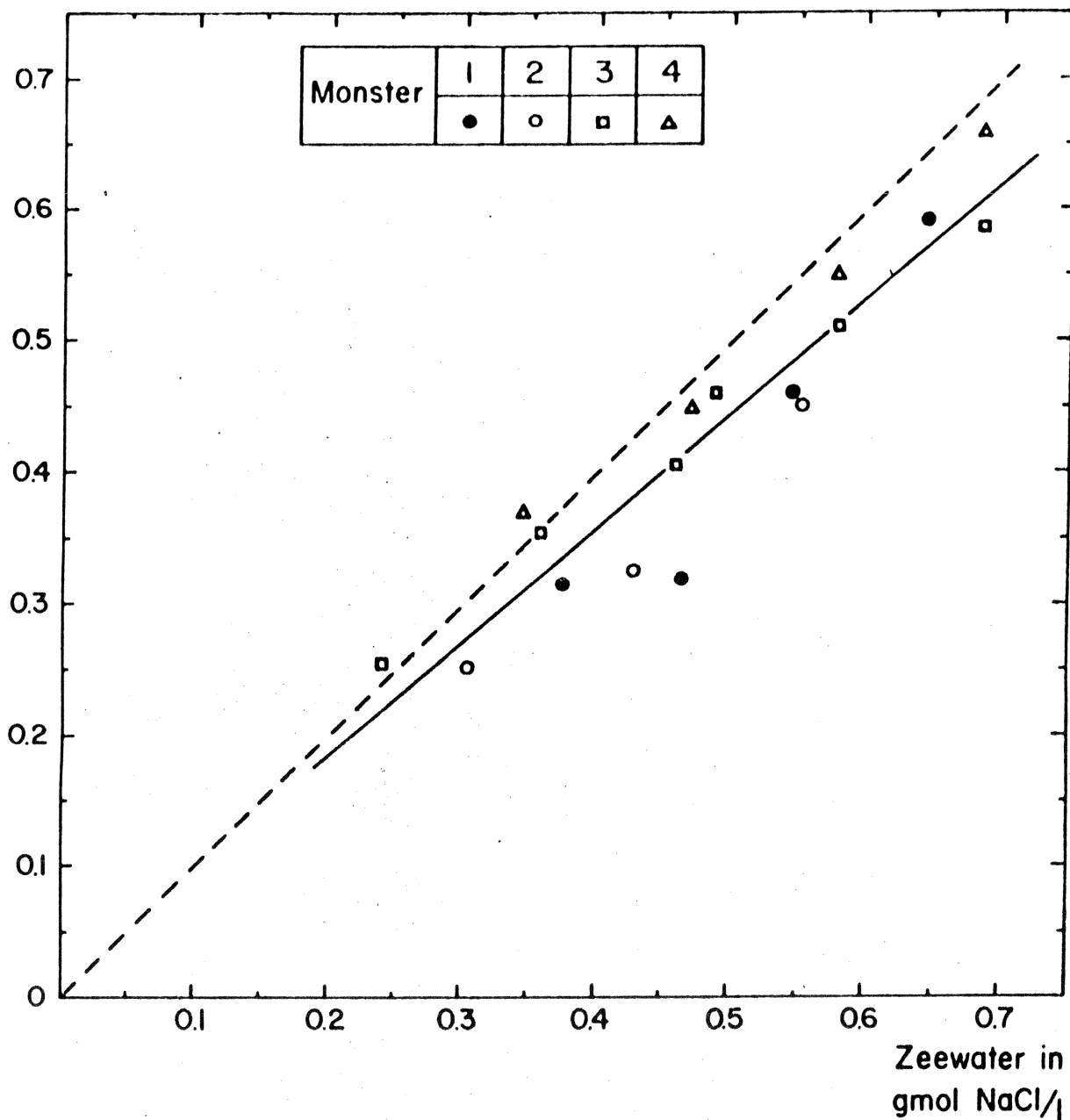
De effecten van kalium- en calciumchloride en kalium- en magnesiumsulfaat in oplossing op de zuurstofaffiniteit van haemoglobine van Arenicola marina, bij lage concentraties (tot 0.6 gion. kation/l.).



Figuur 12.

De effecten van kalium- en calciumchloride en kalium- en magnesiumsulfaat in oplossing op de haem-haem interactie bij haemoglobine van Arenicola marina, bij lage concentraties (tot 0.6 gion.kation/l.).

Bloed
gmol NaCl/l



Figuur 13.

Correlatie tussen de elektrolyt-concentratie in het bloed van Arenicola marina L. en de saliniteit van het milieu, bij een temperatuur van 20° C.

De onderbroken lijn geeft het theoretische verband weer tussen de elektrolyt-concentratie in het milieu en het bloed, wanneer het dier geen elektrolyt-regulatie vertoont.

De getrokken lijn is de regressie-lijn, berekend uit de resultaten van vier proefseries.