

PRO EXPERIMENTIS

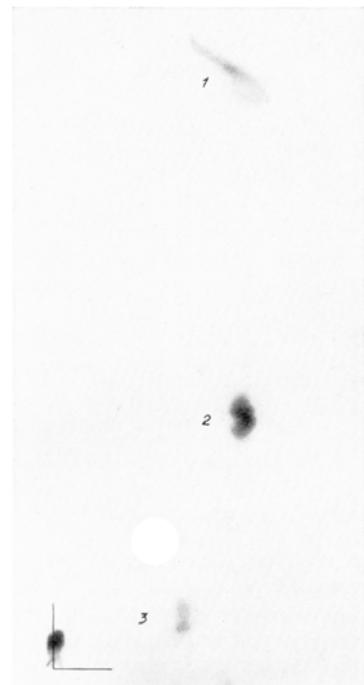
Identificazione chromatografica della fosforil-colina, -etanolamina, -serina, della α -gliceril-fosforil-colina, -etanolamina e della citidindifosfatocolina nell'encefalo di ratti in accrescimento

Dal sistema nervoso centrale sono stati estratti alcuni corpi fosforati liberi, partecipanti verosimilmente al metabolismo dei fosfatidi in qualità di precursori dei medesimi od a vicenda di prodotti di loro degradazione. Essi sono: la fosforiletanalamina¹ e la glicerilfosforiletanalamina²; è stata anche segnalata la presenza della fosforilcolina³ e della glicerilfosforilcolina⁴. In questi ultimi tempi inoltre sono state individuate nel fegato di ratto piccole quantità di citidindifosfatocolina e citidindifosfatoetanolamina⁵; secondo gli autori questi citidin-composti partecipano alla sintesi dei fosfatidi, contenenti colina ed etanolamina, quali immediati precursori. Infine è stato possibile separare dal sistema nervoso centrale mediante chromatografia su carta singoli fosfatidi alcali-labili (fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina⁶) e studiare *in vivo* in quel apparato la loro velocità di «turnover» durante i primi giorni di vita del ratto e nelle sue età corrispondenti a 100 g di peso⁷.

Lo scopo della presente ricerca è stato quello di separare da uno stesso piccolo campione di tessuto nervoso il maggiore numero di composti citati sopra e di studiare *in vivo* la velocità di «turnover» di ciascuno di essi. Con ciò fu possibile precisare la posizione da loro occupata nel ciclo metabolico di alcuni fosfatidi.

Un encefalo di ratto di 3 oppure di 13 giorni di vita (340–610 mg) veniva frammentato per 2 min in un piccolo omogenizzatore ($4000 \times g$), contenente 6 ml di H_2O bollente. La frammentazione era continuata per altri 5 min sostituendo il bagno-maria bollente con acqua ghiacciata. L'omogenato e l'acqua di lavaggio dell'omogenizzatore erano raccolte in una provetta e centrifugate per 15 min a $4000 \times g$. Il soprannatante di colore citrino e leggermente opaco veniva filtrato attraverso carta da filtro S.S. 589/2 Ø 7 cm e raccolto in una provetta, contenente 600 mg di Norit A precedentemente lavata con $NHCl$. Alla fine della filtrazione la carta da filtro e l'esiguo precipitato della centrifugazione venivano accuratamente lavati con H_2O , la quale era poi aggiunta al filtrato. 10 ml di metanolo-cloroformio, 1/2, erano versati nella provetta contenente il precipitato, previa aggiunta della carta da filtro (su di essa infatti si è stratificata durante la filtrazione una pellicola di frammenti contenenti lipidi). In tale modo fu possibile estrarre una quantità di fosfatidi alcali-labili sempre sufficiente per la loro successiva individualizzazione (frazione A).

Il filtrato veniva di tanto in tanto agitato affinché la Norit restasse in sospensione e l'operazione era continuata per 7–8 ore. Durante questo periodo il filtrato diventa limpido; alla fine esso veniva centrifugato ed il soprannatante raccolto in un palloncino. La Norit veniva lavata a sua volta con H_2O e centrifugata. Il soprannatante di quest'ultima era riunito al primo e l'insieme veniva liofilizzato (frazione B).



Autoradiogramma di composti contenenti ^{32}P (frazione B), estratti da un encefalo di ratto di 88 ore di vita e separati mediante chromatografia su carta; l'animale è stato sacrificato dopo 16 ore dalla somministrazione di $NaH_2^{32}PO_4$. Composti: 1) fosforilcolina; 2) fosforiletanalamina; 3) fosfatidilserina. Tempo di esposizione: 21 giorni.

10 ml di piridina al 10% venivano aggiunte alla Norit e la provetta era agitata di tanto in tanto per 20 min. Dopo centrifugazione il soprannatante veniva raccolto in un separatore, previa filtrazione attraverso carta S.S. 589/1 Ø 7 cm. La Norit era nuovamente trattata con 5 ml di piridina al 5% per 10 min, poi centrifugata ed il soprannatante raccolto per filtrazione nello stesso separatore. Per eliminare la piridina il filtrato veniva sbattuto energicamente con 25 ml di cloroformio e ciò per tre volte, rimuovendo ogni volta la fase contenente cloroformio. Alla fine la fase acquosa e l'acqua di lavaggio del separatore erano centrifugate ed il soprannatante limpido era raccolto in un palloncino assieme all'acqua di lavaggio del precipitato; il tutto alla fine era liofilizzato (frazione C).

Dalla frazione A, previa blanda idrolisi alcalina dei fosfatidi⁸, erano separati mediante chromatografia su carta i frammenti fosfodiesterici della fosfatidicolina, fosfatidiletanolamina e fosfatidilserina⁷.

La frazione B era ridisciolta in 0,3–0,4 ml di H_2O ; da essa erano prelevati 0,01 ml mediante microsiringa micrometrica Agla e depositati su carta per chromatografia Whatman n° 1 precedentemente lavata con 2N ac. acetico. Per la prima corsa (18 h) è stato usato il solvente

¹ W. E. STONE, J. biol. Chem. 149, 29 (1943). – J. AWAPARA, A. J. LANDUA e R. FUERST, J. biol. Chem. 183, 545 (1950). – G. B. ANSELL e R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 50, 241 (1951).

² G. B. ANSELL e J. M. NORMAN, Biochem. J. 55, 768 (1953).

³ R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 60, 325 (1955).

⁴ R. M. C. DAWSON, *Biochemistry of the developing nervous system* (Acad. Press, New York 1955), p. 268.

⁵ E. P. KENNEDY e S. B. WEISS, J. biol. Chem. 222, 193 (1956).

⁶ R. M. C. DAWSON, Biochim. biophys. Acta 14, 374 (1954). – N. MIANI, Boll. Soc. ital. Biol. sper. 31, 1008 (1955).

⁷ N. MIANI, Biochim. biophys. Acta (in stampa).

⁸ R. M. C. DAWSON, Biochim. biophys. Acta 14, 374 (1954).

fatto di fenolo/acqua, 80/20, (*p/v*), e per la seconda corsa (10 h) etanolo/ $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}^9$, 60/20/10, o più raramente collidina/lutidina/acqua, 100/100/100. Sulla carta sono state individuate: la fosforilcolina, la fosforiletanolamina, la fosforilserina, la L- α -glicerilfosforilcolina, e la L- α -glicerilfosforiletanolamina.

La frazione C era ridisciolta in 0,2–0,3 ml di H_2O ; da essa erano prelevati 0,005–0,008 ml e depositati su carta per cromatografia S. S. 2045/a precedentemente lavata con 2N ac. acetico. Per la prima corsa (10 h) è stato usato il solvente fatto di acetone/0,005 N ac. acetico, 50/50, e per la seconda corsa (20 h) il solvente di KREBS e HEMS¹⁰ senza versene (ac. isobutirrico/N NH_3 , 100/60). Sulla carta è stata finora identificata, fra gli altri nucleotidi, la citidindifosfatocolina.

I dati ottenuti possono essere così riassunti:

1° È stato possibile separare contemporaneamente da piccole quantità di tessuto nervoso (340–610 mg) un notevole numero di corpi fosforati liberi (alcuni già conosciuti, altri poco o non conosciuti), i quali partecipano verosimilmente al metabolismo di alcuni fosfatidi in qualità di precursori dei medesimi od a vicenda di prodotti di loro degradazione.

2° Essi sono: la fosforiletanolamina e la L- α -glicerilfosforiletanolamina (già conosciuti)¹¹, la fosforilcolina e la L- α -glicerilfosforilcolina (poco conosciuti)¹², la fosforilserina e la citidindifosfatocolina (non conosciuti). Inoltre sono state separate dallo stesso campione di tessuto la fosfatidil-colina, -etanolamina e -serina.

3° Tutto lascia supporre che altri corpi fosforati, specificatamente la glicerilfosforilserina, la citidindifosfato-etanolamina e -serina ancora non identificati siano presenti sui cromatogrammi.

4° Sulla base di prove collaterali sembra che il metodo di estrazione e di frazionamento dell'estratto acquoso (frazioni B e C) non alteri, nei limiti dell'errore sperimentale, qualitativamente e quantitativamente i composti fosforati ricercati.

5° La concentrazione media (76 animali) di alcuni composti fosforati nell'encefalo di ratti compresi fra il 3° ed il 13° giorno di vita è così risultata: fosforilcolina $76 \pm 13 \mu\text{g P/g}$ di tessuto fresco; fosforiletanolamina $91 \pm 7 \mu\text{g P/g}$; fosforilserina $29 \pm 8 \mu\text{g P/g}$; L- α -glicerilfosforilcolina $42 \pm 14 \mu\text{g P/g}$; L- α -glicerilfosforiletanolamina $32,4 \pm 11 \mu\text{g P/g}$. Nel calcolo non è stato tenuto conto delle perdite che ciascun composto subisce durante la separazione cromatografica su carta.

N. MIANI

Istituto di Anatomia, Università di Padova, il 16 Settembre 1957.

Summary

A method is described whereby the phosphoryl-choline, -ethanolamine, -serine, the L- α -glycerylphosphoryl-choline, -ethanolamine, the phosphatidyl-choline, -ethanolamine, -serine and also the cytidinediphosphatecholine may be separated in the brain of a rat a few days old (340–610 mg).

⁹ R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 62, 693 (1956).

¹⁰ H. A. KREBS e R. HEMS, Biochim. biophys. Acta 12, 172 (1953).

¹¹ W. E. STONE, J. biol. Chem. 149, 29 (1943). — J. AWAPARA, A. J. LANDUA e R. FUERST, J. biol. Chem. 183, 545 (1950). — G. B. ANSELL e J. M. NORMAN, Biochem. J. 55, 768 (1953).

¹² R. M. C. DAWSON, Biochem. J. 60, 325 (1955); *Biochemistry of the developing nervous system* (Acad. Press, New York 1955), p. 268.

PRO EXPERIMENTIS

Electrophoretic Analysis of Clinical Dextrans

The clinical value of dextran depends on its molecular weight. The mean molecular weight, however, is a very unreliable index of the therapeutic properties unless supplemented by the analysis of the polydispersity of the dextran preparation.

We have recently shown that dextran dissolved in a borate buffer exhibits electrophoretic mobility and that a mixture of two homogeneous dextran fractions of different molecular weight can be partitioned in the electric field with a good recovery of each component¹.

It appears that electrophoresis of dextran may afford means of estimating both the mean molecular weight and the polydispersity of a dextran preparation.

Materials and Methods.—*Electrophoresis* was carried out in a Fokal-B apparatus (Strübin & Co., Basle) at +2.5°C, using white light and a standard 85 mm Tiselius type cuvette². The percentage composition of a mixture was evaluated by fitting Gaussian curves to the enlarged patterns.

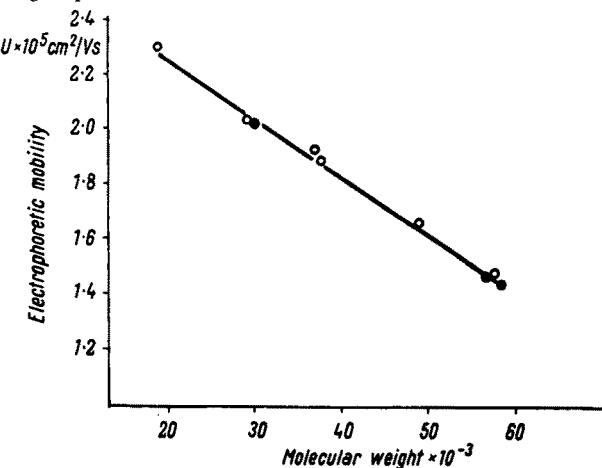


Fig. 1.

Borate buffer was prepared by adjusting a boric acid solution to pH 10.0 (glass electrode) with sodium hydroxide; the final concentration of borate ion was 0.05 M in all experiments.

Molecular weights were calculated from the combined diffusion constant, intrinsic viscosity and partial specific volume determinations³.

Purified dextran fractions were obtained from acid-hydrolysed native dextran by repeated ethanol fractionation. The final lyophilised preparations were dissolved in the borate buffer and exhaustively dialysed against the same buffer.

Results.—Electrophoretic mobilities of purified dextran fractions were determined; the mean values, calculated from ascending and descending boundaries, are plotted against molecular weights of the fractions as shown in Figure 1. The data on 'Macrodex'-fractions, kindly donated by Pharmacia A.G., Uppsala, Sweden, are included in this graph and marked with crosses. It is evident that electrophoretic mobility is linearly de-

¹ K. ZAKRZEWSKI, Z. MAY, and K. MURAWSKI, Biokhimija USSR. 21, 596 (1956).

² E. WIEDEMANN, Exper. 3, 341 (1947).

³ K. ZAKRZEWSKI, J. KRYSIAK, K. MURAWSKI, Z. MAY, and J. MALEC, Bull. Acad. Polonaise Sci. Cl. II 2, 67 (1954).