

Istituto di Chimica Biologica  
dell'Università di Perugia, Italia

## Presenza di precursori fosforici dei fosfolipidi nella placenta umana (\*)

G. Porcellati, B. Curti e S. Luciani (\*\*)

Secondo alcune ricerche di WATANABE (1), la placenta umana contiene discrete quantità di lipidi, in più alte concentrazioni negli stadi iniziali di sviluppo che non a termine. Di questi il 30 % circa sarebbe rappresentato da fosfolipidi (prevalentemente lecitine). Non è noto finora se la placenta possieda la capacità di metabolizzare i fosfolipidi, potendo in effetti essa funzionare solo da organo di trasporto dei fosfolipidi dal plasma materno al feto.

Siccome invece è stato dimostrato che alcuni organi fetali (fra di essi certamente il fegato), riescono a sintetizzare *in situ* le molecole dei fosfolipidi dagli opportuni precursori (2,3) e siccome recentemente è stato notato da POPJÁK (l.c.2) che l'attività specifica del P<sup>32</sup>-fosfolipidico estratto dalle placente di ratti, conigli e cavie dopo 2-6 ore dalla somministrazione di Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> marcato, era più alta nella placenta che non nel plasma materno, abbiamo ritenuto opportuno iniziare uno studio sulla possibilità della biosintesi di queste sostanze nel tessuto placentare.

Naturalmente il concetto di biosintesi dei fosfolipidi non

---

(\*) Lavoro eseguito con un contributo del Consiglio Nazionale delle Ricerche, Roma.

(\*\*) Comunicación 7-1 a las V Jornadas Bioquímicas Latinas. Barcelona, mayo 1959.

può prescindere dallo studio dei suoi precursori, ed a questo proposito si deve osservare che soltanto gli acidi grassi sono stati finora sommariamente presi in esame: sembra infatti che essi possano formarsi direttamente nelle cellule epiteliali dell'organo per poi versarsi in circolo (da DEUEL, 4).

Non esistono invece notizie sulla presenza nella placenta degli esteri fosforici dei fosfolipidi, quali la PS (\*\*\*\*), PE, PC, il GPA e quali la GPS, GPE e GPC intercalati i primi nella via della biosintesi, ed i secondi in quella della demolizione dei fosfolipidi, in accordo con le ultime moderne ricerche circa il metabolismo di questi composti. Per questa ragione ci è sembrato che la loro dimostrazione e determinazione quantitativa nella placenta potesse costituire un necessario ed utile dato sperimentale per poter ammettere, seppure in via ovviamente ipotetica, la possibile biosintesi *in situ* dei fosfolipidi.

A tale scopo abbiamo usato un metodo di separazione e di dosaggio delle suddette sostanze, ad eccezione del GPA, basato sulla cromatografia su colonne di resine a scambio ionico, già sperimentato con buoni risultati in altra occasione (5). Sono stati utilizzati vari criteri di identificazione, basati su diverse tecniche, sì da caratterizzare in modo esauriente i vari composti separati, prima di poterli dosare.

### Parte sperimentale

La resina a scambio ionico adoperata era la Zeo-Karb 225, 4,5 % di *cross linkage* (*water regain* di 1,8 g/g), 200-400 mesh (The Permutit, Co). Il diametro medio delle sferette della resina era di 25  $\mu$ . Le modalità di trattamento di essa, nonché i diversi tipi di buffer adoperati erano essenzialmente quelli descritti in precedenza (l.c.5). Come detergente è stato adoperato un polietilene-lauril-alcool (BRIJ 35) della Watford Chemical Co., Ltd., 22 Copperfield Rd., Londra, E.3.e, come antiossidante, il tiodiglicole (B.D.H.), rindistillato a pressione ridotta, e che però non era utilizzato quando si determinavano PC e GPC. I solventi usati per la cromatografia su carta, nonché i reattivi per le varie soluzioni tampone erano tutti prodotti puri della B.D.H. od HOPKIN e WILLIAMS.

La PS, come sale di bario era stata sintetizzata secondo PLIMMER (6), la PE, sale di bario, secondo OUTHOUSE (7), la

(\*\*\*\*) Sono state usate le seguenti abbreviazioni: PS=fosforilserina; PE=fosforiletanolamina; PC=fosforilcolina; GPA=glicerofosfato; P<sub>i</sub>=fosforo inorganico; GPS=glicerilfosforilserina; GPE=glicerilfosforiletanolamina; GPC=glicerilfosforilcolina; TCA=ac. tricloroacetico.

PC, come  $\text{CaCl}_2$ , secondo RILEY (8) e PLIMMER e BURCH (9), la GPC era stata ottenuta da ovolectina preparata secondo il procedimento di HANAHAN (10) su colonne di allumina attivata; altra GPC era preparata anche col metodo di TATTRIE e McARTHUR (11) sotto forma di complesso con il  $\text{CdCl}_2$ . La purezza dei vari esteri era determinata per analisi del relativo rapporto P/N, del contenuto in colina, serina od etanolamina, e per cromatografia su carta o su colonna, con resina identica a quella descritta in precedenza, seguendo tecniche e procedimenti cromatografici già esposti in altra sede (12,13). Sodio GPA era della Light & Co., così come l'etanolamina, mentre colina cloruro era della Roche. Gli esteri fosforici utilizzati come sostanza traccia erano tutti convertiti in forma di sale sodico, trattandoli con resina Zerolit 225 forma  $\text{Na}^+$ , in acqua, prima di applicare le soluzioni su carta cromatografica o su colonna.

Gli estratti deproteinizzati usati per la cromatografia a scambio ionico erano preparati da placente umane a termine esenti da forme morbose. Dopo aver eliminato con ripetuti lavaggi il sangue, e dopo aver liberato il tessuto da formazioni vasali e connettivali in genere, l'organo era trattato secondo la tecnica descritta altrove (1.c.5), ed il relativo estratto, portato a pH 2.2-2.5 con HCl 0.5 N, era posto sulla sommità della resina in volumi pari in genere a 4-5 grammi di tessuto fresco iniziale.

La colonna cromatografica era lunga 168.5 cm ed aveva un diametro di 12.5 mm. Il letto della resina era di un volume di circa 213 ml., dopo che quest'ultima si era ben depositata lungo la colonna di vetro alla pressione di azoto corrispondente a circa 20 cm Hg. Il frazionamento dell'estratto era condotto a 23 °C con buffer citrato pH 3.1 0.2 M alla pressione su indicata. In genere l'eluente era raccolto in frazioni di 2 ml fino ad un volume totale di circa 250 ml, poiché soltanto i composti relativamente acidi erano da noi presi in esame; a volte l'analisi delle frazioni era continuata fino ad un volume di circa 500 ml (frazione n. 250), onde prendere in considerazione anche la presenza di altri composti, per i quali sono state condotte anche le relative determinazioni. Sulle varie frazioni raccolte venivano eseguite le seguenti analisi: (1) di fosforo inorganico secondo il metodo di ERNSTER et al (14), modificato da STRICKLAND et al (15); (2) di colina, dopo idrolisi delle frazioni contenenti la PC e la GPC, rispettivamente per 48 ed 1 ora in HCl 6 N (1.c.5), dosata nell'idrolizzato, liberato dell'HCl, con il metodo al periodato modificato secondo WEBSTER (16); (3) di azoto aminico con la reazione alla ninidrina-idrantina (1.c.5). Nel

caso di dosaggi contemporanei di fosforo, colina ed azoto aminico su di una stessa frazione dell'estratto, si eseguiva la determinazione della colina su 1 dei 2 ml della frazione, e dell'azoto aminico sull'altro, dopo di che su questa stessa ultima prova colorata, opportunamente incenerita con acido perclorico, veniva determinato il fosforo inorganico.

Per l'identificazione delle relative frazioni separate sono state adottate le seguenti tecniche ed i seguenti procedimenti:

(1) esame della posizione delle relative frazioni separate, in paragone con il comportamento delle corrispondenti sostanze sintetiche; (2) studio della natura dei prodotti d'idrolisi delle frazioni, e contemporanei dosaggi di P, colina ed N aminico, eseguiti su di esse, come su specificato, onde stabilire i relativi rapporti tra essi e paragonarli con quelli ottenuti con la relativa sostanza allo stato puro; (3) ri-cromatografia su carta dei vari picchi, dopo loro opportuna desalificazione, che veniva condotta su colonnine di resina Dowex-50, 4 % di *cross linkage* 200-400 mesh, in forma H<sup>+</sup>, come più estesamente descritto altrove (1.c.5); la tecnica cromatografica su carta era essenzialmente la bi-dimensionale, con l'uso di opportuni solventi (1.c.13), oppure occasionalmente anche la tecnica mono-dimensionale con solvente propanolo/TCA 100 %/H<sub>2</sub>O/NH<sub>4</sub>OH: 75/10/20/1; (4) incubazione enzimatica con: (a) una monofosfoesterasi purificata da mucosa intestinale di vitello secondo MORTON (17), che é stata incubata sulle frazioni contenenti i monoesteri fosforici, opportunamente desalificate e concentrate a bassa temperatura (35 °C). La monofosfoesterasi é stata purificata fino al 5° stadio, con una attività specifica di 12.300 unità/mg N' il K<sub>m</sub> trovato per la PE sintetica é stato di  $4.075 \times 10^{-3}$  M a 38 °C e per la PC, ugualmente preparata, di  $1.185 \times 10^{-2}$  M alla stessa temperatura; (b) una GPC-fosfodiesterasi parzialmente purificata secondo il procedimento di DAWSON (18), che é stata incubata con frazioni contenenti i fosfodiesteri. L'enzima era praticamente privo di attività fosfomonoesterasica ed il K<sub>m</sub> epr la GPC sintetica é risultato di  $1 \times 10^{-3}$  M a 37 °C. Prima di istituire qualsiasi prova enzimatica, veniva fatta attenzione a che le frazioni concentrate fossero ben desalificate ed a pH neutro. Su aliquote di esse, prima dell'incubazione, veniva determinata la concentrazione delle sostanze di cui si presumeva la presenza. Tale analisi risultava necessaria per il calcolo del relativo K<sub>m</sub>, allo scopo di confermare ulteriormente l'identità della sostanza isolata.

## Risultati

Nella figura 1 riportiamo i risultati di una separazione cromatografica su colonna di resina Zeo-Karb 225 di un estratto placentare. I valori sono riportati come  $\mu\text{M}$  equivalenti di leucina o come  $\mu\text{M}$  di colina liberata dai composti che la contengono. Come si nota dal grafico, le frazioni sono state esaminate fino ad un volume totale di eluato di circa 500 ml, scartando l'analisi ulteriore di alcune frazioni, a causa della scarsa concentrazione e della incostanza dei costituenti ivi presenti.

Esponiamo ora i risultati delle varie prove di identificazione eseguite sulle diverse frazioni ottenute, adottando i criteri da noi esposti nella parte sperimentale:

(1) POSIZIONE SULLA COLONNA DEI VARI COMPONENTI. In base al comportamento su colonna delle sostanze pure preparate sinteticamente, fu fatta inizialmente una provvisoria identificazione delle varie frazioni separate; per molte di esse fu però necessaria un'analisi più rigorosa. Ci riferiamo essenzialmente alle frazioni 43-48, 63-70, 66-74, 85-92, 90-94 e 138-142, tutte contenenti fosforo.

(2) DOSAGGI DI FOSFORO, COLINA ED AZOTO AMINICO NELLE VARIE FRAZIONI SEPARATE. Appare evidente della figura 1 che le analisi eseguite sul contenuto in colina delle frazioni idrolizzate hanno posto in evidenza soltanto due picchi, ambedue contenenti fosforo, mentre tutte le altre frazioni sono state poste in evidenza con reazione alla ninidrina. Le analisi, infatti, di fosforo, colina ed azoto aminico hanno fornito i seguenti risultati: frazione 43-48; P<sub>i</sub> ed N aminico; 63-70: P<sub>i</sub> ed N aminico; 66-74: P<sub>i</sub> e colina; 85-92: P<sub>i</sub> ed N aminico; 90-94: P<sub>i</sub> e colina; 138-142: P<sub>i</sub> ed N aminico. Le frazioni 63-70 ed 85-92 contenevano d'altronde piccole quantità di colina, mentre quelle 66-74 e 90-94 di N aminico.

Dei due picchi contenenti colina, quello corrispondente alle frazioni 66-74 veniva rapidamente idrolizzato da HCl 6 N (1 ora a 100 °C), mentre l'altro (90-94) richiedeva 48 ore a 123 °C. Ciò, in accordo con quanto noto in letteratura (1.c.5, 19), ci faceva provvisoriamente identificare il primo picco con la GPC ed il secondo con la PC. Ambedue sono stati costantemente osservati in tutti gli esperimenti.

A questo punto bisogna notare, come appare della figura 1, che esiste una sovrapposizione di alcuni picchi nel tracciato; ma, come più diffusamente illustrato in altra sede (1.c.5), è da osservarsi che la colina, come è noto, non dà alcuna reazione con la ninidrina, né d'altra parte sostanze sensibili a quest'ultimo reattivo e presenti nell'estratto placentare erano svelate

con il metodo al periodato per la colina. Ciò naturalmente ha reso perfettamente possibile la determinazione separata dei due esteri fosforici contenenti colina, nonostante che essi parzialmente coincidessero, per la loro posizione, con altre due frazioni.

Per quanto riguarda l'esame dei rapporti tra fosforo, azoto aminico e colina, le frazioni 43-48 non potevano essere bene esaminate, poiché erano spesso incostanti e di scarsa concentrazione. Esse contenevano fosforo  $\mu\text{e}$ , probabilmente, anche per la loro posizione, potrebbero contenere PS. Il picco 66-74 presentava un rapporto  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M colina}$  sempre maggiore di 1, così come il picco 63-70 aveva un rapporto  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M di N aminico}$  anch'esso spesse volte superiore all'unità: ciò indicava per ambedue i picchi la presenza, oltre che del proprio estere, anche di tracce di un altro. Aggiungendo, infatti, il fosforo delle frazioni 66-74 a quello delle 63-70, nonché dosando l'azoto aminico e la colina, si ottenevano sempre rapporti  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M colina} + \mu\text{M di N aminico}$  molto vicini all'unità. Il picco 90-94, anch'esso contenente colina, aveva un rapporto  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M colina}$  non molto costante nelle varie prove eseguite, ma sempre più alto dell'unità, indicando che, oltre all'estere contenente colina, fosse parzialmente presente nelle stesse frazioni, un altro estere fosforico. Ugualmente si comportava il picco 85-92, in quanto presentava un rapporto  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M di N aminico}$  superiore all'unità. Dosando, infatti, il  $\text{P}_i$  di ambedue questi ultimi picchi, nonché la colina e l'N aminico, si ottenevano rapporti  $\mu\text{M P}_i/\mu\text{M colina} + \mu\text{M di N aminico}$  prossimi ad 1. Per quanto riguarda il picco 138-142, analisi preliminari mostrarono che esso conteneva fosforo e che il rapporto  $\mu\text{M eq. leucina}/\mu\text{M P}_i$  era tra 3 e 4.

(3) RICONOSCIMENTO CROMATOGRAFICO SU CARTA. Le frazioni costituenti i singoli picchi sono state separatamente riunite, desalificate, concentrate e poste su carta cromatografica, che, dopo scorrimento, era esaminata con il metodo di Bandurski ed Axelrod (20) per gli esteri fosforici. I risultati mostravano la presenza nei picchi 66-74 di GPC, 63-70 di GPE, 90-94 di PC ed 85-92 di PE, tutte confermate dal comportamento sullo stesso cromatogramma delle relative sostanze sintetiche. I picchi della GPE, GPC, PE e PC contenevano rispettivamente sul cromatogramma tracce di GPC, GPE, PC e PE. Queste ultime dovevano costituire verosimilmente quella parte del picco che parzialmente coincideva con il picco principale (vedi figura 1). Le analisi del picco 138-142, prima e dopo idrolisi, mostravano che probabilmente doveva trattarsi di un peptide contenente fosforo, d'altra parte già in precedenza notato in altri organi in ben più elevate concentrazioni

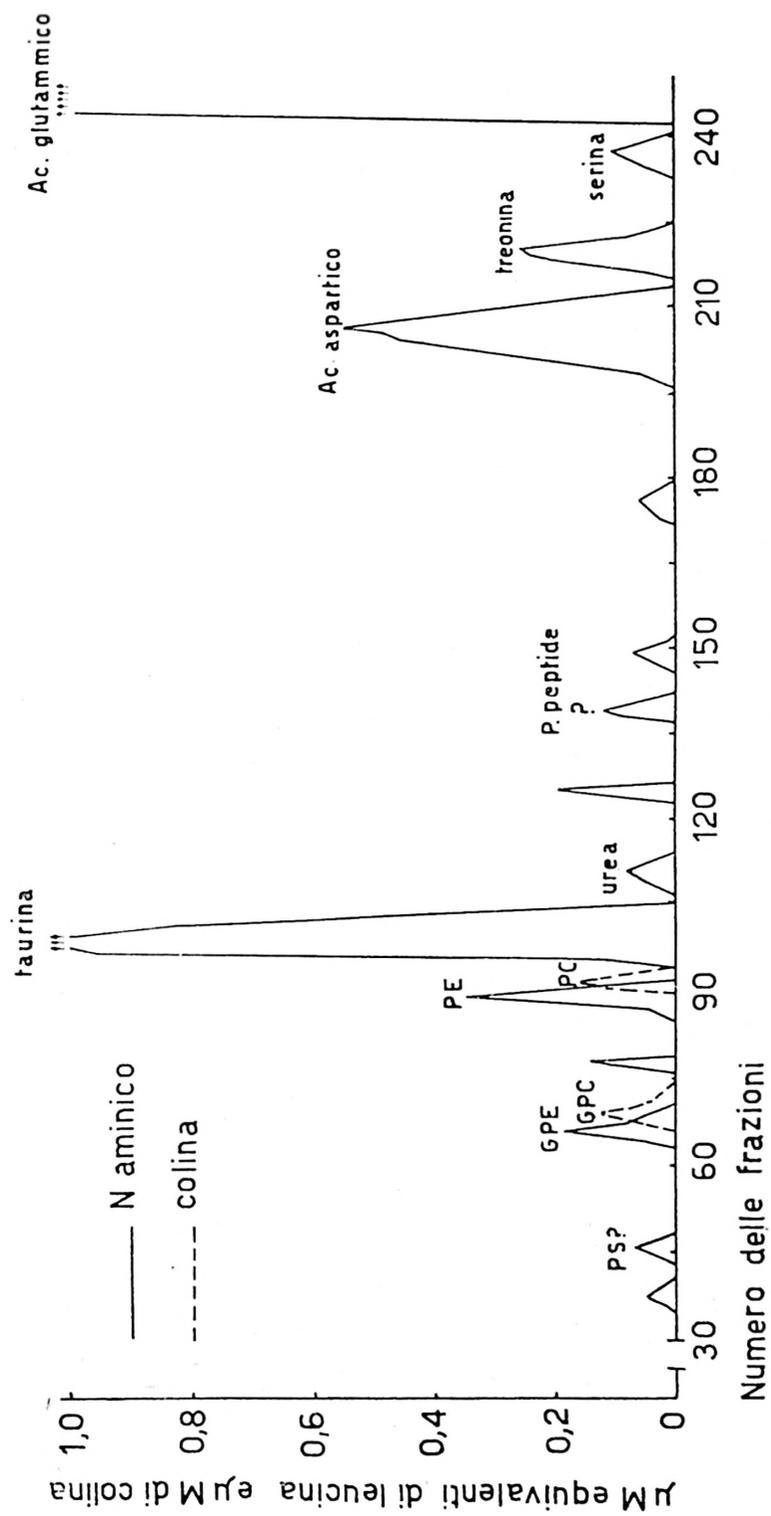


Fig.1

Cromatogramma su resina a scambio ionico di un estratto placentare corrispondente a 4.8 grammi di tessuto fresco.

(1.c.5). Tale picco é stato comunque costantemente ritrovato, a differenza del 123-126, molto incostante e non contenente fosforo

(4) ANALISI ENZIMATICHE SULLE VARIE FRAZIONI. I picchi 66-74 e 63-70 sono stati opportunamente incubati con GPC-diesterasi, istituendo in parallelo altre prove con GPC e GPE pure : i risultati sono riportati nella Tabella I. In altre prove enzimatiche i picchi 90-94 ed 85-92 sono stati incubati con monofosfoesterasi purificata, istituendo in parallelo prove con PC e PE sintetiche : i relativi risultati sono riportati nella Tabella II.

TABELLA I

*Incubazione delle frazioni 66-74 e 63-70 e di substrati sintetici con GPC-fosfodiesterasi*

*Condizioni sperimentali:* Enzima: 0.25 ml (12.5 mg proteine); Buffer Na-glicil-glicina 0,1 M pH 7.8 (20° C): 0,45 ml; Mg<sup>++</sup> 0.0013 M. Volume finale: 1.5 ml. Temperatura: 37° C. Tempo: 45 min'.

I risultati sono espressi in  $\mu$ mol per il volume totale

Substrato	$\mu$ mol nella prova	Fosfodiesterasi			
		P <sub>i</sub>	GPA	Colina	GPA/colina
GPC	1.12	0	0.33	0.31	1.06
66-74	0.28 (*)	0	0.38	0.27	1.40
GPE	1.00	0.02	0.31	0	—
63-70	1.86 (*)	0	0.22	tracce	—

(\*) Calcolate con analisi chimiche dei singoli costituenti del picco, prima dell'incubazione.

I risultati delle Tabelle I e II mostrano per il picco in cui si riteneva la presenza di GPC (66-74), formazione di colina e GPA, dopo incubazione. Ciò dimostra la presenza nel composto in esame del legame diesterasico, come nella GPC pura. Il rapporto GPA/colina era tuttavia più alto dell'unità, per il fatto che un po' di GPA derivava anche dalla GPE scissa dalla diesterasi ed anch'essa parzialmente contenuta nel picco della GPC. È interessante infatti menzionare che il K<sub>m</sub> per il picco 66-74 é risultato diverso da quello osservato su GPC pura, probabilmente per l'azione competitiva presentata dalla GPE. L'incubazione poi delle frazioni 63-70 con la GPC-diesterasi (attiva su GPC come su GPE) (18) poneva in evidenza la formazione di GPA, separato cromatograficamente ed identificato in paragone con la sostanza traccia.

Per quanto riguarda le frazioni 90-94 i risultati esposti nella Tabella II mostrano formazione di colina e  $P_i$  dal substrato presente nel picco; il rapporto  $P_i$ /colina non era equimolecolare, presumibilmente perché il fosforo era liberato anche dalla PE scissa enzimaticamente e presente parzialmente nel picco della PC. L'incubazione con monofosfoesterasi delle frazioni 85-92 indicava ugualmente liberazione di  $P_i$  con tracce di colina derivante evidentemente dalla PC parzialmente sovrapposta. A causa di queste parziali sovrapposizioni, i  $K_m$  sia per la PC che per la PE calcolati sui picchi relativi sono risultati

TABELLA II

*Incubazione delle frazioni 90-94 ed 85-92 e di PC e PE con monofosfoesterasi purificata*

Condizioni sperimentali: Enzima (5.° stadio): 0.114 mg proteine; Buffer carbonato/bicarbonato 0.04 M pH 9.5: 1.05 ml;  $Mg^{++}$  0.002 M. Volume finale: 2 ml. Temperatura: 38° C. Tempo: 60 min'.

I risultati sono espressi in  $\mu$ mol per il volume totale

Substrato	$\mu$ mol nella prova	Fosfomonoesterasi			
		$P_i$	GPA	Colina	$P_i$ /colina
PC	2.00	0.68	0	0.64	1.06
90-94	1.21 (*)	0.96	0	0.75	1.28
PE	2.00	1.04	0	1.04	1.00
85-92	2.61 (*)	0.21	0	tracce	—

(\*) Calcolate con analisi chimiche dei singoli costituenti del picco, prima dell'incubazione.

diversi da quelli ottenuti sulle rispettive sostanze sintetiche. Il  $K_m$ , ad esempio, del picco 85-92 (PE) è risultato di  $7.80 \times 10^{-2}$ . Ciò è, naturalmente, da porsi in relazione a fattori competitivi dovuti alla presenza dell'altro estere sovrapposto nel picco al composto principale.

Da tutte le prove di identificazione sulle varie frazioni, si concludeva per la presenza di GPE, GPC, PE, PC e di un fosfopeptide, rispettivamente per le frazioni 63-70, 66-74, 85-92, 90-94 e 138-142.

Degli altri picchi minori, incostanti nei vari esperimenti eseguiti, non è stata tentata alcuna identificazione, come prima accennato. Probabilmente si tratta di sostanze di natura peptidica e presenti in scarse concentrazioni. Gli altri componenti del tracciato, quali taurina, urea, acido aspartico, treonina,

TABELLA III

Concentrazione in  $\mu\text{moli } \%$  di esteri fosforici fosfolipidici e di vari amino - composti nella placenta umana (\*)

Exp. n.	PS?	GPE	GPC	PE	PC	Taurina	Urea	$^{13}\text{C} - 14\text{z}$	Acido aspartico	Treonina
1	0	10.03	24.58	30.24	7.54	168.61	121.20	8.00	114.47	48.92
2	+	11.01	28.23	45.78	6.80	217.84	312.92	5.82	109.53	61.64
3	0	25.64	8.64	49.82	5.25	183.19	149.29	9.00	69.27	41.53
4	0	21.35	33.64	81.62	7.32	205.12	262.52	8.96	117.06	34.48
5	0	61.00	10.46	39.69	7.92	256.10	262.40	7.37	+	—
6	+	27.92	13.00	51.80	9.77	265.32	317.16	3.56	+	—
7	0	55.68	10.34	53.31	8.82	308.84	277.46	4.86	—	—
8	+	27.80	+	30.37	9.54	274.67	193.16	+	—	—
9	+	26.64	+	64.55	+	168.87	156.67	+	—	—
10	0	15.24	+	+	+	140.41	127.71	+	—	—
11	0	13.89	—	+	+	+	+	+	—	—
12	—	+	—	—	+	+	+	+	—	—
13	+	+	—	—	—	+	—	—	—	—
14	0	+	—	—	—	+	—	—	—	—
15	0	+	—	—	—	+	—	—	—	—
Media . . . . .		26.93	18.41	49.69	7.87	218.89	207.14	6.79	102.58	46.64

(\*) Il segno + indica la presenza della sostanza che non è stata però determinata; il segno — indica che la ricerca non è stata eseguita.

Le concentrazioni della serina e dell'acido glutammico determinate in un solo esperimento sono state rispettivamente: 10.85 e 574.60  $\mu\text{moli } \%$ .

serina ed acido glutammico sono stati identificati in base alla loro posizione reciproca ed in paragone alle sostanze sintetiche.

Per quanto riguarda la riproducibilità dei dati, tutte le frazioni separate per colonna hanno presentato sempre un proprio ordine di ripartizione nell'eluato, con scarti per tutti gli esperimenti di  $\pm 2$  tubi.

Riportiamo nella Tabella III, le concentrazioni in  $\mu\text{moli}/100$  g di tessuto fresco dei vari componenti esaminati. Ogni sostanza è indicata nelle sue concentrazioni effettive in  $\mu\text{moli}$ , in quanto è stata calcolata per ognuna di esse la *resa di colore* dopo reazione con la ninidrina in rapporto con quella ottenuta con quantità equimolecolari di leucina. Solo per le frazioni 138-142, di natura non ben conosciuta, le  $\mu\text{moli}$  sono  $\mu\text{moli}$  leucina-equivalenti.

Come si osserva dai risultati della Tabella III gli esteri fosforici dei fosfolipidi da noi trovati nel tessuto placentare sono presenti in discrete concentrazioni, sebbene la PC e la GPC in più scarse quantità che non la PE e la GPE, il rapporto  $\mu\text{M PC} + \mu\text{M GPC} / \mu\text{M PE} + \mu\text{M GPE}$  essendo di solo 0.34. Anche la concentrazione degli esteri fosforici varia alquanto da quella degli esteri glicerofosforici, come può notarsi dal fatto che il rapporto  $\mu\text{M GPC} / \mu\text{M PC}$  è di 2.34, mentre il rapporto  $\mu\text{M GPE} / \mu\text{M PE}$  di 0.54 varia in maniera inversa.

Alte si presentano le concentrazioni di urea e taurina, così come alquanto elevata è la concentrazione di acido glutammico.

### Discussione

Dai risultati ottenuti si può affermare che nella placenta umana a termine esistono esteri fosforici dei fosfolipidi, identificati con varie tecniche e procedimenti. Paragonando le loro concentrazioni con quelle riscontrate nel tessuto nervoso (1.c.5), risulta che esse sono più basse di quelle presenti nel cervello, eccezion fatta per la GPC, che è presente in quantità più o meno identiche. Le concentrazioni della PE e GPE sono circa 1/3 di quelle presenti nel cervello, mentre per la PC il rapporto è di circa 1/9.

Nella placenta gli esteri fosforici non sono presenti tra loro in eguali concentrazioni: sembra infatti che gli esteri fosforici della fosfatidiletanolamina (cefaline) siano presenti in più elevate concentrazioni di quelli della fosfatidilcolina (lecitina). Inoltre, la concentrazione degli esteri fosforici differisce da quella degli esteri glicerofosforici ed in maniera inversa per gli esteri contenenti colina rispetto a quelli a contenuto etanol-

aminico. Ciò potrebbe indicare una più marcata demolizione nel tessuto placentare delle lecitine ed una più marcata sintesi della fosfatidiletanolamina, essendo noto che la GPE e la GPC sono composti intermedi intercalati nella via della demolizione dei fosfolipidi, mentre la PC e la PE lo sono in quella della biosintesi.

Pertanto i risultati ottenuti sembrano indicare la possibilità della sintesi *in loco* di questi esteri fosforici, e, di conseguenza, dei fosfolipidi, il cui meccanismo potrà in seguito essere preso in considerazioni. Sarà anche interessante osservare tali fenomeni in placente di più precoce sviluppo.

E' infine da notare l'importanza del risultato riguardante l'identificazione del fosfopeptide trovato nelle frazioni 138-142 dei nostri cromatogrammi, perché una sostanza simile, sebbene in più alte concentrazioni, è stata recentemente ritrovata in altri organi e tessuti (1.c.5), senza che finora se ne conosca la funzione.

### Summary

#### Phosphoric esters of phospholipides in the human placenta

1. Deproteinized aqueous extracts of human placenta have been examined by column chromatography with Zeo-Karb 225,4.5 % cross linked, Na<sup>+</sup> form. The more acidic components have been studied.

2. Glycerolphosphorylethanolamine, glycerolphosphorylcholine, phosphorylethanolamine and phosphorylcholine were isolated and determined. The presence of phosphorylserine is uncertain. Other amino-compounds were also identified and determined. Minor peaks were also found, but not identified. A peptide-like substance, containing phosphorous, has also been found.

3. The results are related to the problem of phospholipid-phosphoric esters and phospholipid biosynthesis in the placenta.

### Bibliografía

- (1) H. WATANABE: *J. Biochem. (Japan)*, **2**, 369, 1923.
- (2) G. POPJÁK: *Nature*, **160**, 841, 1947.
- (3) G. POPJÁK: *Biochem. J.* **42**, 11, 1948.
- (4) H. J. DEUEL: *The Lipids, Interscience*, Vol. **II**, 775.
- (5) R. W. R. BAKER e G. PORCELLATI: in stampa.
- (6) J. PLIMMER: *Biochem. J.*, **35**, 461, 1941.

- (7) OUTHOUSE : *Biochem. J.*, **31**, 1459, 1937.
- (8) RILEY : *J. Am. Chem. Soc.*, **66**, 512, 1944.
- (9) PLIMMER e BURCH : *Biochem. J.*, **31**, 398, 1937.
- (10) D. J. HANAHAN : *J. Biol. Chem.*, **211**, 321, 1954.
- (11) N. H. TATTRIE e C. S. MCARTHUR : *Canad. J. Biochem. Physiol.*, **33**, 761, 1955.
- (12) G. PORCELLATI e R. H. S. THOMPSON : *J. Neurochem.*, **1**, 340, 1957.
- (13) G. PORCELLATI : *J. Neurochem.*, **2**, 128, 1958.
- (14) L. ERNSTER et al. : *Acta Chem. Scand.*, **4**, 942, 1950.
- (15) K. P. STRICKLAND, et al. : *J. Neurol. Psychiatr.*, **19**, 12, 1956.
- (16) G. R. WEBSTER : *Biochim. Biophys. Acta.*, **20**, 432, 1956.
- (17) R. K. MORTON : *Biochem. J.*, **57**, 595, 1954.
- (18) R. M. C. DAWSON : *Biochem. J.*, **62**, 689, 1956.
- (19) R. M. C. DAWSON : *Biochem. J.*, **60**, 325, 1955.
- (20) R. S. BANDURSKI e B. AXELROD : *J. Biol. Chem.*, **193**, 405, 1951.

