

145989

WALLEN  
Bolis

T. M. MARINO

D. MARINO

M. CUZZOCREA

A. CAVALIERE

L. BOLIS

ISTITUTO DI FISIOLOGIA GENERALE DELL'UNIVERSITÀ DI MESSINA

ISTITUTO SPERIMENTALE TALASSOGRAFICO DI MESSINA

**Instituut voor Zeewetenschappelijk onderzoek**

**Institute for Marine Scientific Research**

Prinses Elisabethlaan 69

IL TRASPORTO DI (D+) GLUCOSIO ATTRAVERSO LE  
8401 Bredene, Belgium - Tel. 059/80 37 15

MEMBRANE DI ERITROCITI DI

*SCYLIORHINUS STELLARIS* L. E *BOOPS BOOPS* L.

**RIASSUNTO** — In questo lavoro si mette in evidenza che conformemente a quanto già visto in precedenti lavori i globuli rossi di *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L. non trasportano il (D+) glucosio.

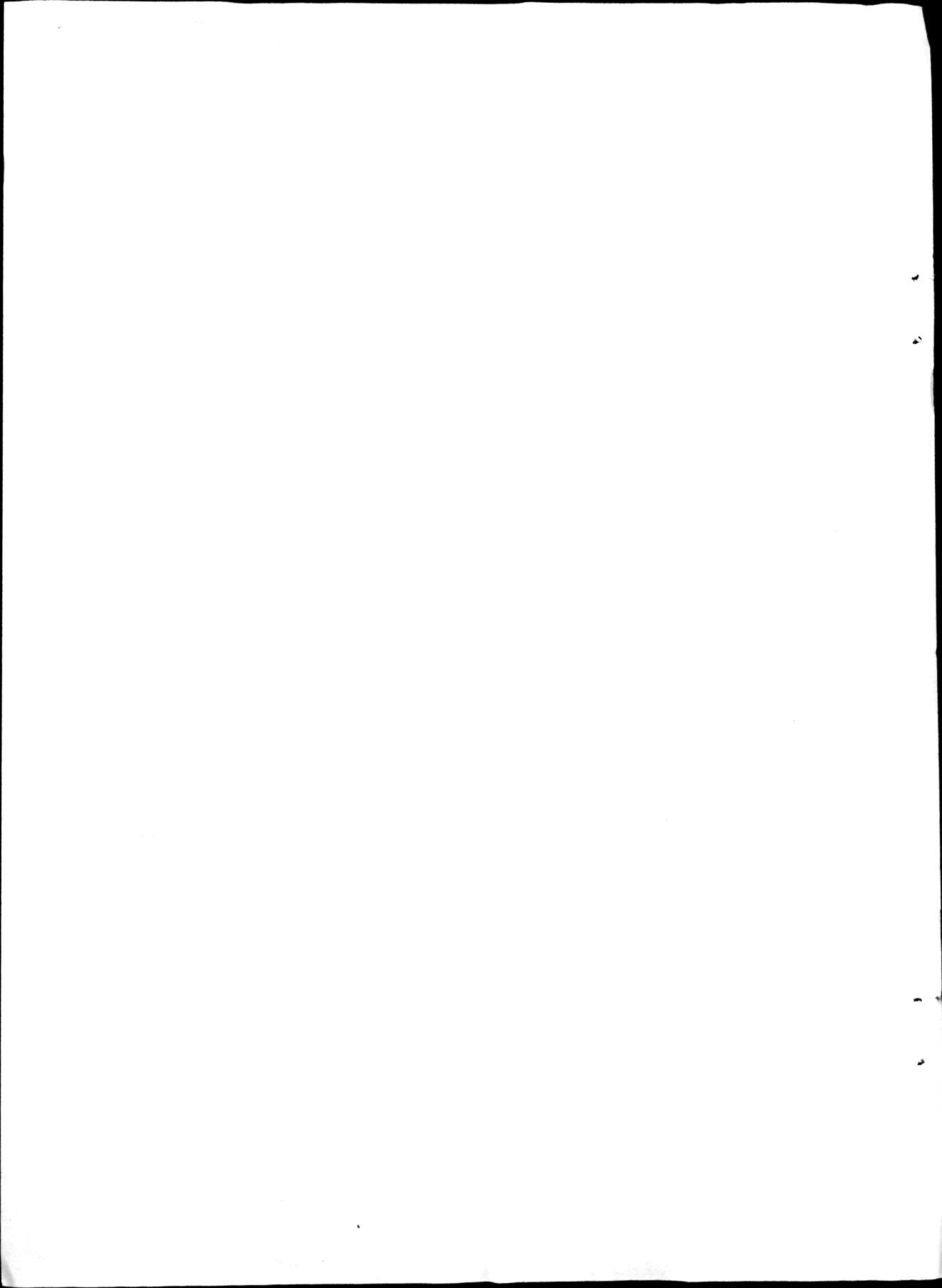
I possibili meccanismi a livello della organizzazione molecolare delle membrana dei globuli rossi vengono discussi.

**SUMMARY** — Hexoses penetration in marine vertebrates *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L., was studied with osmotic direct and indirect methods.

Results give no evidence of hexose penetration as previously found in fresh water vertebrates. Possible mechanism involved at membrane level molecular organization is discussed.

Il trasporto di monosaccaridi in eritrociti è stato studiato fin dall'inizio di questo secolo (KOZAWA S. e Coll. 1914, MASING E. 1914). I globuli rossi sono cellule che per la loro natura, la facilità di reperimento, la similitudine di funzione nelle varie specie animali, sono particolarmente adatte a studi di cinetica di trasporto.

Il trasporto di monosaccaridi attraverso la membrana dei globuli rossi umani di solito avviene con le modalità del trasporto facilitato e pertanto mostra le caratteristiche di trasporto mediato da un trasportatore: saturazione, competizione, stereospecificità. Per il trasporto facilitato non è necessario un apporto energetico, ed il trasporto avviene secondo un gradiente di concentrazione.



145990

L. ROMANO

A. SCUTERI

M. CUZZOCREA

A. CAVALIERE

L. BOLIS

ISTITUTO DI FISILOGIA GENERALE DELL'UNIVERSITÀ DI MESSINA

ISTITUTO SPERIMENTALE TALASSOGRAFICO DI MESSINA

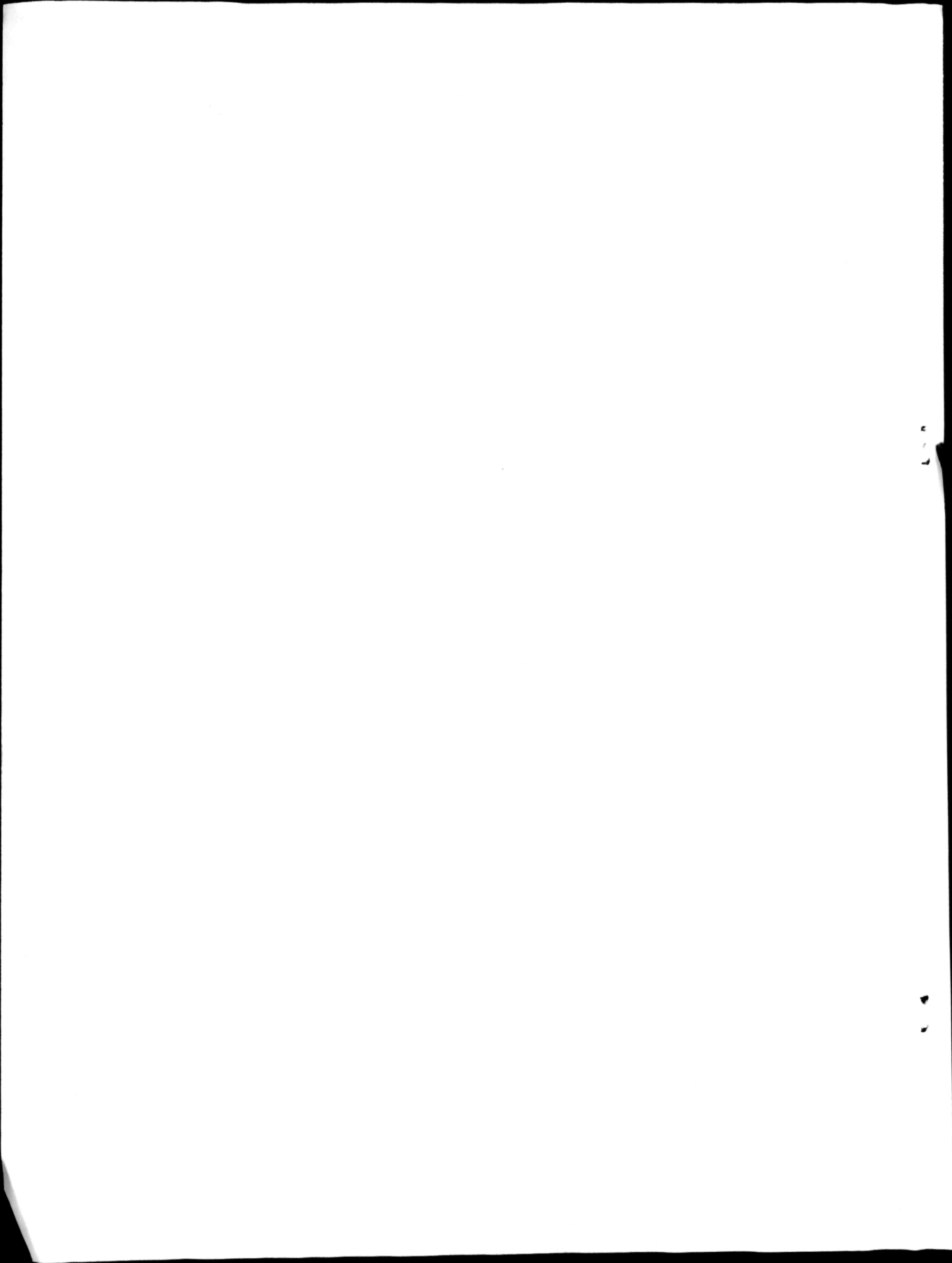
COMPOSIZIONE LIPIDICA E DISTRIBUZIONE DI  
FOSFOLIPIDI DELLA MEMBRANA DEI GLOBULI ROSSI  
DI *SCYLIORHINUS STELLARIS* L. E *BOOPS BOOPS* L.

**Instituut voor Zeewetenschappelijk onderzoek**  
**Institute for Marine Scientific Research**  
Prinses Elisabethlaan 69  
8401 Bredene - Belgium - Tel. 059/80 37 15

**Estratto da:**

**ATTI SOC. PELORITANA DI SCIENZE FISICHE MATEM. E NATURALI**

**Vol. XXIII/1977**





L. ROMANO

A. SCUTERI

M. CUZZOCREA

A. CAVALIERE

L. BOLIS

ISTITUTO DI FISILOGIA GENERALE DELL'UNIVERSITÀ DI MESSINA

ISTITUTO SPERIMENTALE TALASSOGRAFICO DI MESSINA

COMPOSIZIONE LIPIDICA E DISTRIBUZIONE DI  
FOSFOLIPIDI DELLA MEMBRANA DEI GLOBULI ROSSI  
DI *SCYLIORHINUS STELLARIS* L. E *BOOPS BOOPS* L.

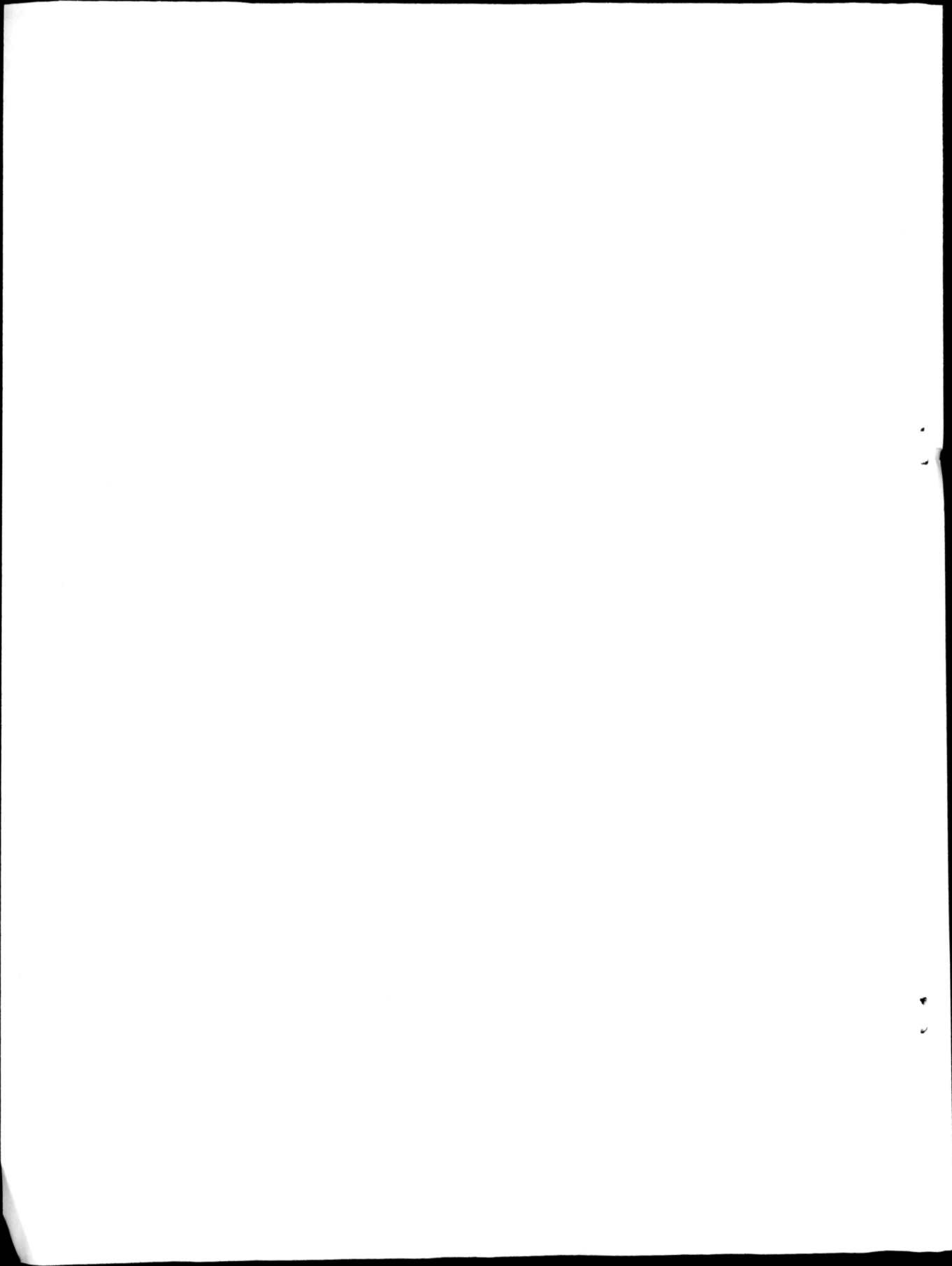
SUMMARY — Lipid composition and phospholipids distribution was studied in RBC of marine vertebrates *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L. in comparison to fresh water vertebrates. It appears evident a marked increase of fatty acid chain length and degree of insaturation with some difference in iso 16:0, 16:1, and 20:4 in comparison to fresh water vertebrates.

Also and increase of the content of sphingomyeline in comparison to fresh water vertebrates was found.

RIASSUNTO — Sono state studiate le membrane dei globuli rossi di *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L. per quanto riguarda il contenuto in acidi grassi e il contenuto di fosfolipidi.

I risultati suggeriscono che esiste una modesta differenza rispetto a quelli ottenuti con teleostei d'acqua dolce per quanto riguarda acidi grassi iso 16:0, 16:1 e 20:4, ed un aumento del contenuto in sfingomielina.

Nell'intento di studiare le possibili differenze, di composizione in lipidi e distribuzione in fosfolipidi della membrana dei globuli rossi di vertebrati marini in confronto a vertebrati di acqua dolce (BOLIS L. e Coll. 1972, MARINO D. e Coll. 1977) sono stati esaminati globuli rossi di *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L. catturati nella Stretto di Messina.



Esiste tuttavia una diversa cinetica di penetrazione di monosaccaridi nei globuli rossi in differenti specie zoologiche. Nei globuli rossi umani l'affinità e la velocità di penetrazione è molto elevata, in *Macacus rhesus* (KOZAWA S. 1914) le modalità di penetrazione sono molto simili a quelle dell'uomo. Mentre la penetrazione nel gatto e nel cane (WILBRANDT W. 1938) è molto lenta.

D'altra parte la penetrazione in *Marmota monax* (FAUST R. G. e Coll. 1961) è stata attribuita ad un processo di diffusione semplice.

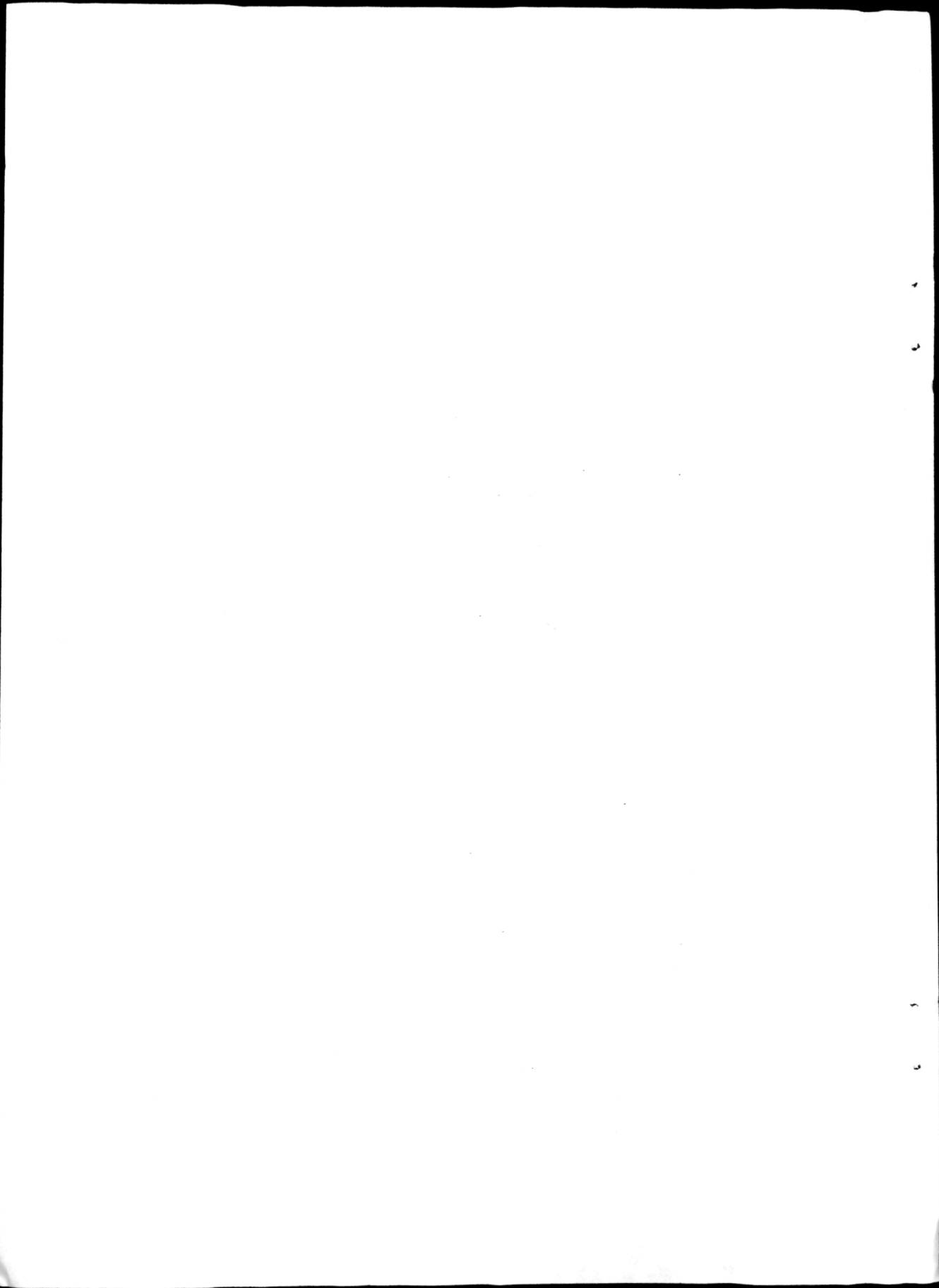
BOLIS L. e Coll. (1971) hanno studiato la penetrazione di monosaccaridi in globuli rossi di un vertebrato d'acqua dolce *Salmo trutta* L. ed hanno messo in evidenza che i globuli rossi di tale specie sono impermeabili al D(+) glucosio, D(—) mannosio e D(+) galattosio. La penetrazione è tuttavia differente per i pentosi: D(—) ribosio, L(—) arabinosio e D(+) xylosio i quali penetrano in globuli rossi con differenti velocità, ma tuttavia il D(—) ribosio penetra più rapidamente degli altri.

Questo referto è stato messo in rapporto alla peculiare composizione delle membrane dei globuli rossi di trota in lipidi (BOLIS L. 1972). Poichè anche vertebrati marini presentano una particolare costituzione della membrana dei globuli rossi in lipidi (ROMANO L. 1977) ci è sembrato utile ed interessante studiare anche in *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L. la penetrazione di esosi.

#### MATERIALI E METODI

I campioni di sangue sono stati prelevati dalla vena caudale di *Scyliorhinus stellaris* L. (gr. 2000-2500) e *Boops boops* L. (gr. 200) con aggiunta di 5 UI/ml. di eparina. I globuli rossi sono stati lavati con soluzione fisiologica salina Na/Na<sup>2</sup> fosfati tampone (pH 7,4) con una molarità finale di 340 mOsm.

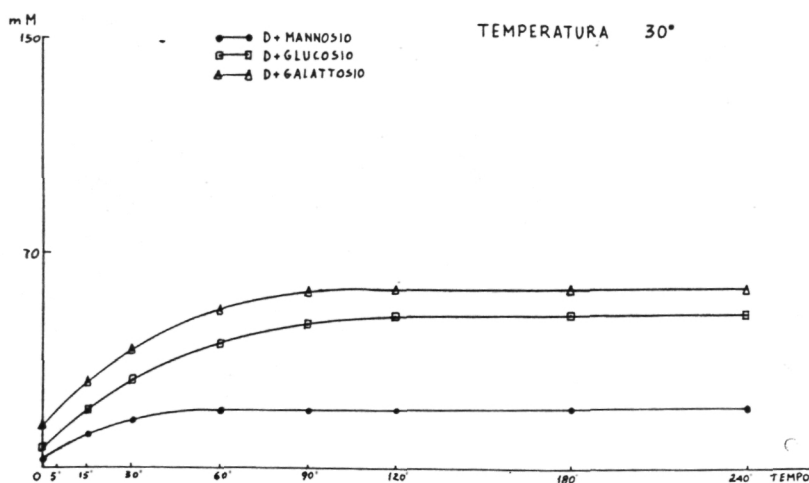
I monosaccaridi usati sono D(+) mannosio, D(+) galattosio e D(+) glucosio. Le cellule lavate venivano sospese in soluzioni tampone contenenti 150 mM o 300 mM di monosaccaridi e l'esperimento è stato condotto a 30° e a 18° C. Lo studio della penetrazione è stato effettuato con il metodo osmotico diretto ed indiretto WILBRANDT (1955).



## RISULTATI E DISCUSSIONE

Come indicato nei grafici 1, 2, 3, 4 il D(+) mannosio, il D(+) galattosio ed il D(+) glucosio si comportano nello stesso modo e pertanto non c'è penetrazione di essi.

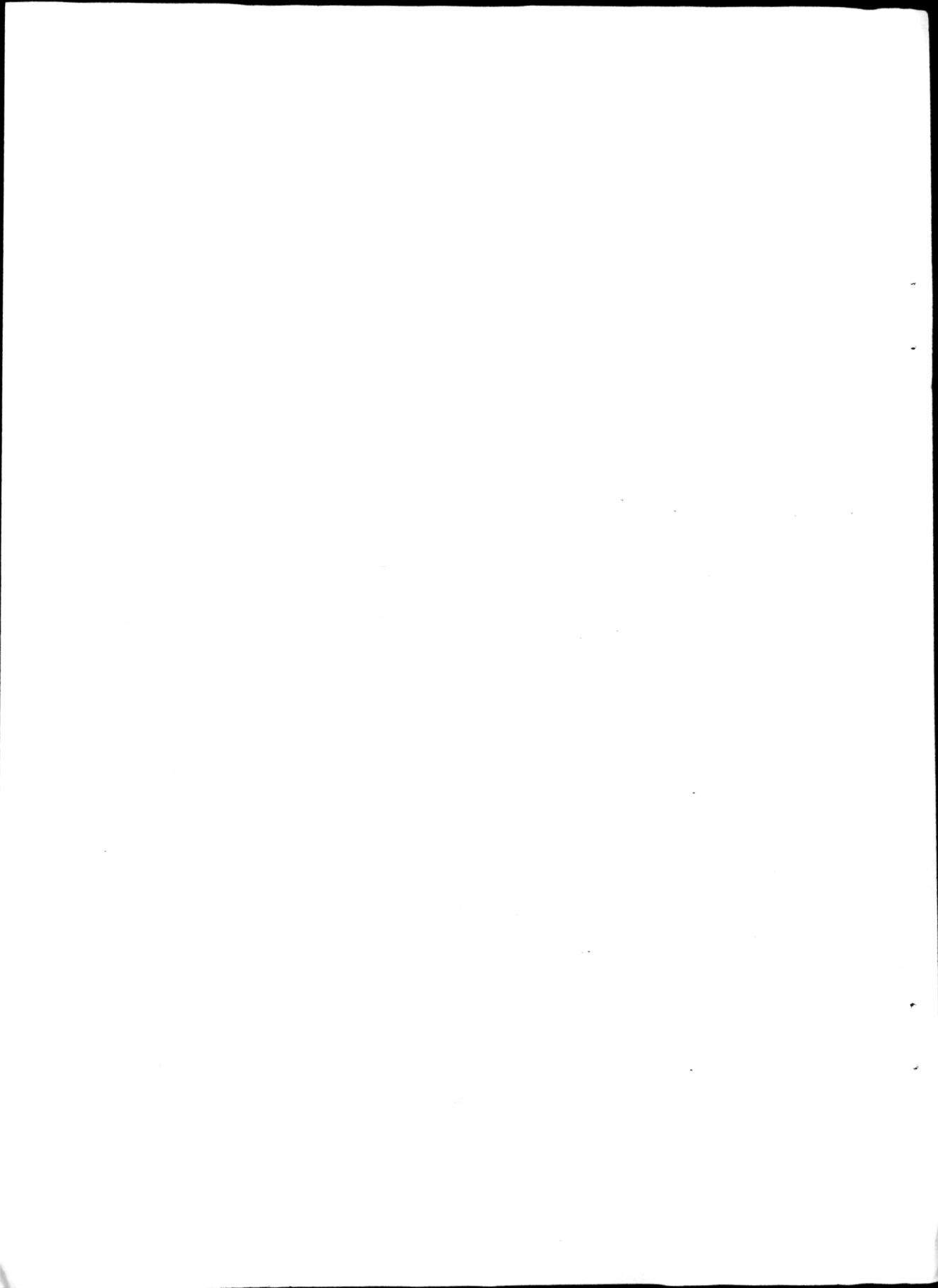
TAVOLA 1<sup>a</sup>



Anche dopo 4 ore di esperimento non si raggiunge l'equilibrio, e la modestissima penetrazione può essere messa in rapporto ad un'augmentata permeabilità dovuta al tempo di operazione o di penetrazione di Na.

Anche nel caso delle specie studiate, è probabile che la composizione della membrana dei globuli rossi che mostra una evidente differenza in composizione dei lipidi (+ del 50% in acidi grassi a lunga catena) e aumento del contenuto in lecitina in rapporto ai globuli rossi dell'uomo possa influire sulla impermeabilità agli esosi.

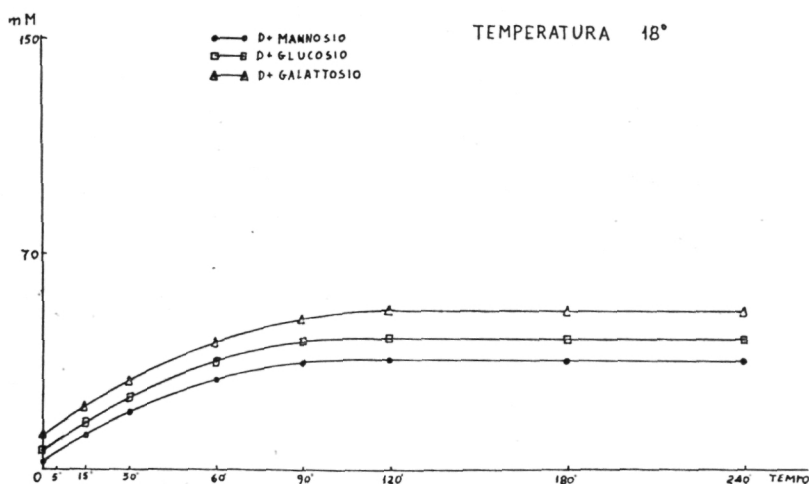
La così evidente modificazione della distribuzione dei fosfo-



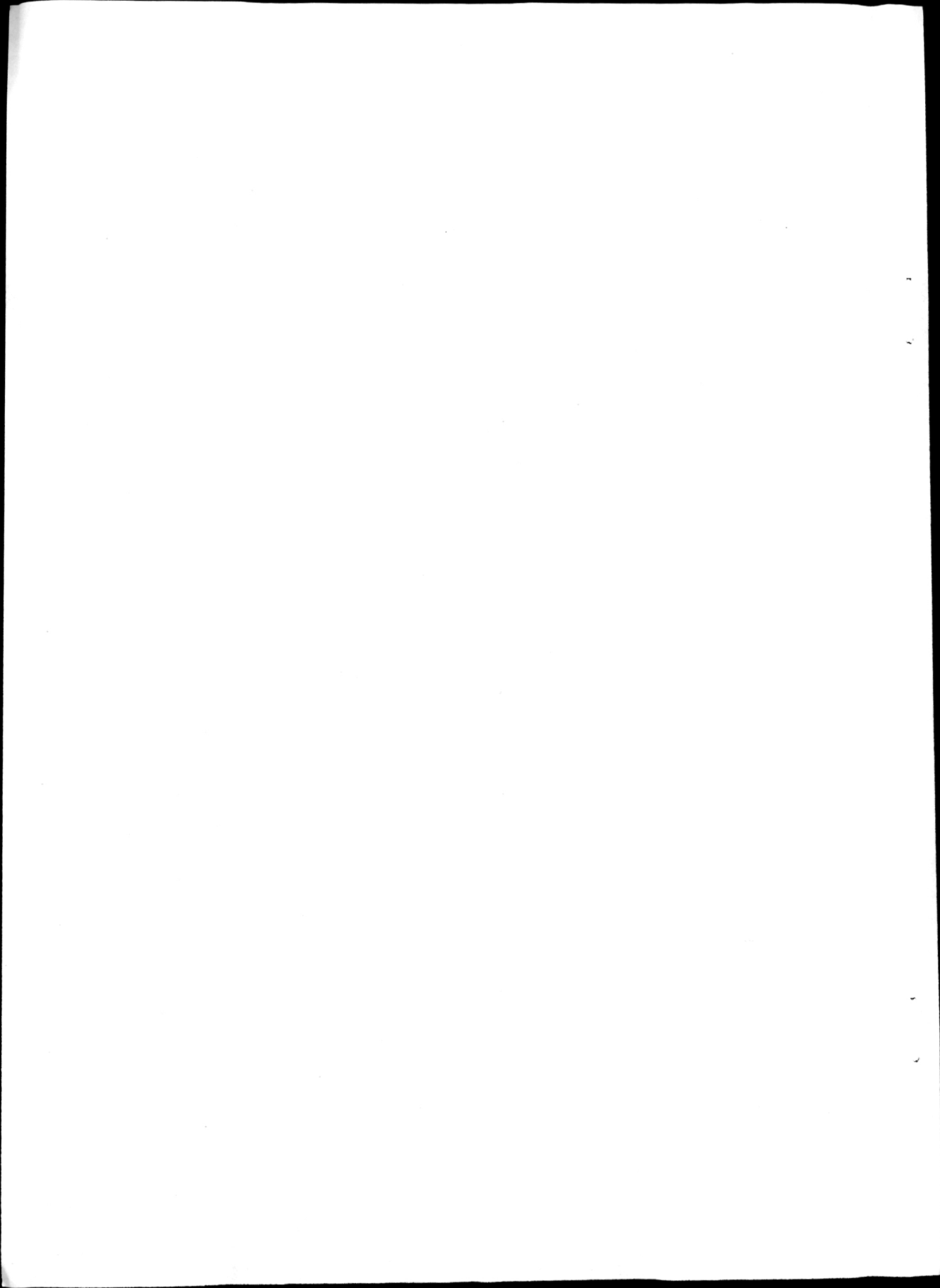
lipidi può infatti, senza dubbio interferire con la organizzazione molecolare della membrana dei globuli rossi.

Infatti vari autori (RATHMAN, 1977) avevano proposto che la fosfatidiletanolamina e la fosfatidilserina fossero prevalentemente disposte nella parte citoplasmatica del doppio strato lipidico mentre, i fosfolipidi colinderivati come la fosfatidilcolina e la sfingomieline fossero disposti verso lo strato esterno del doppio strato lipidico. E' probabile quindi che la notevole differenza nella distribuzione dei fosfolipidi colino ed ammino derivati

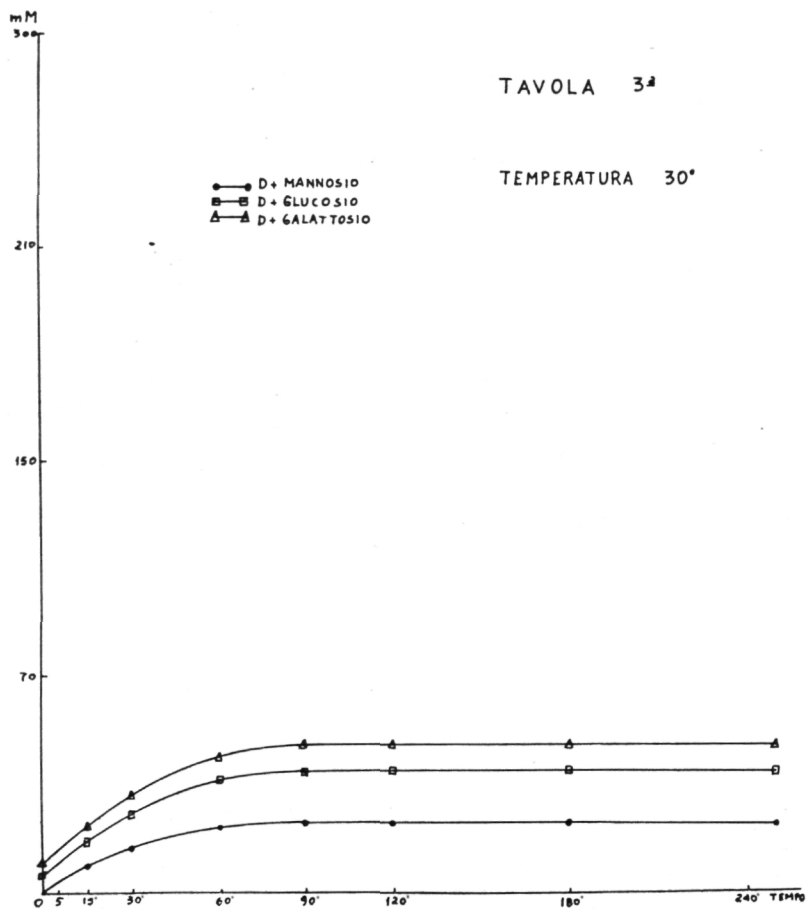
TAVOLA 2<sup>a</sup>

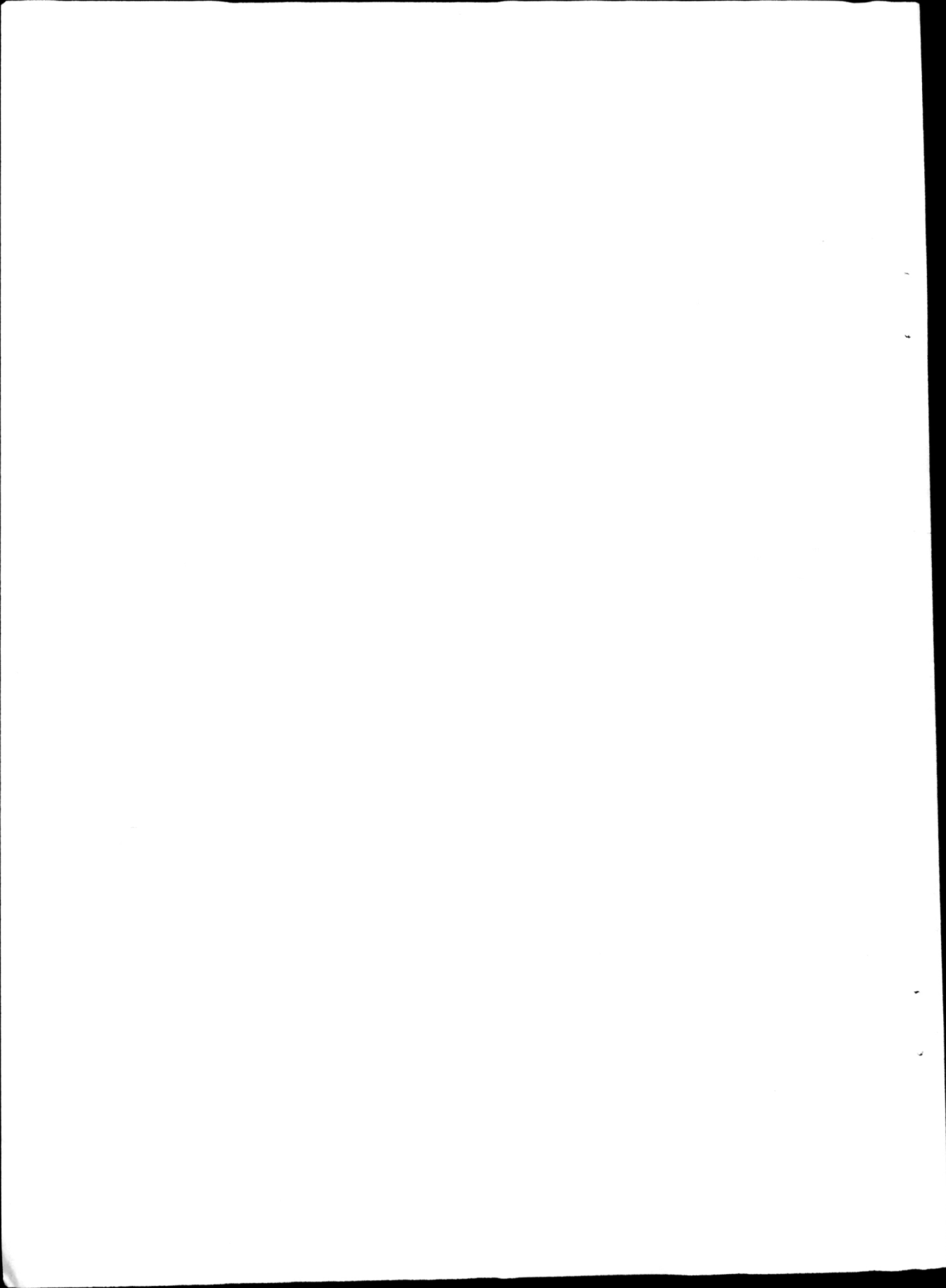


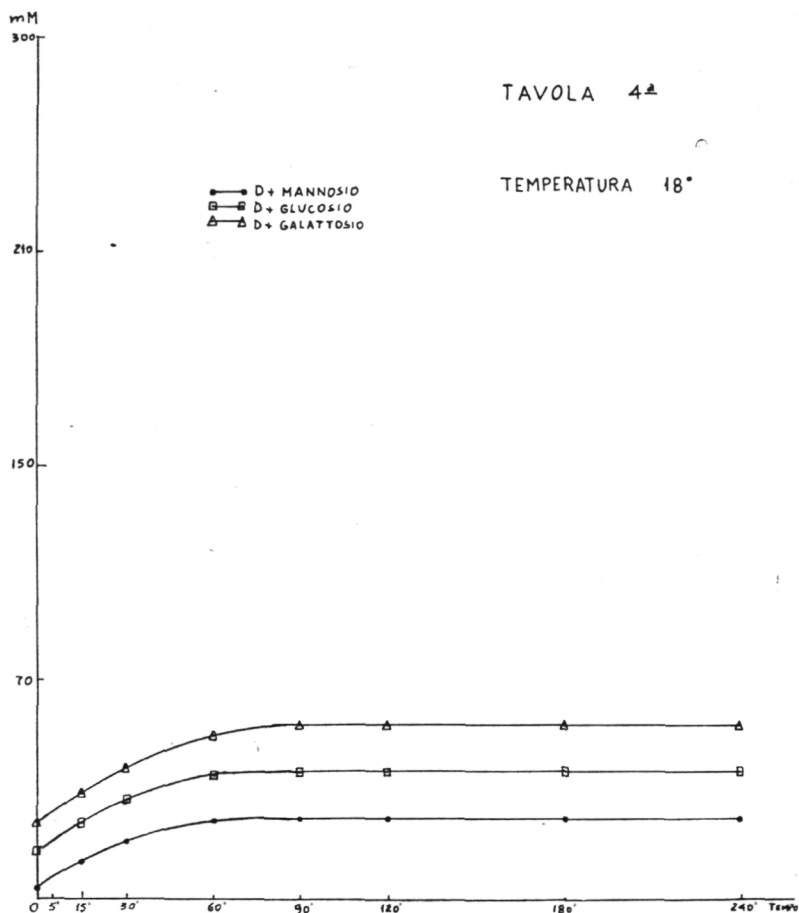
contribuisca a creare le condizioni di impermeabilità al glucosio. Infatti LIEB e STEIN (1970) hanno proposto che il trasporto facilitato dei monosaccaridi avvenga proprio grazie ad una serie di interazioni intermolecolari a livello dei componenti della membrana dei globuli rossi e quindi una così evidente modificazione della parte lipidica può senza dubbio contribuire a nuove interazioni che possono condizionare il trasporto degli esosi.

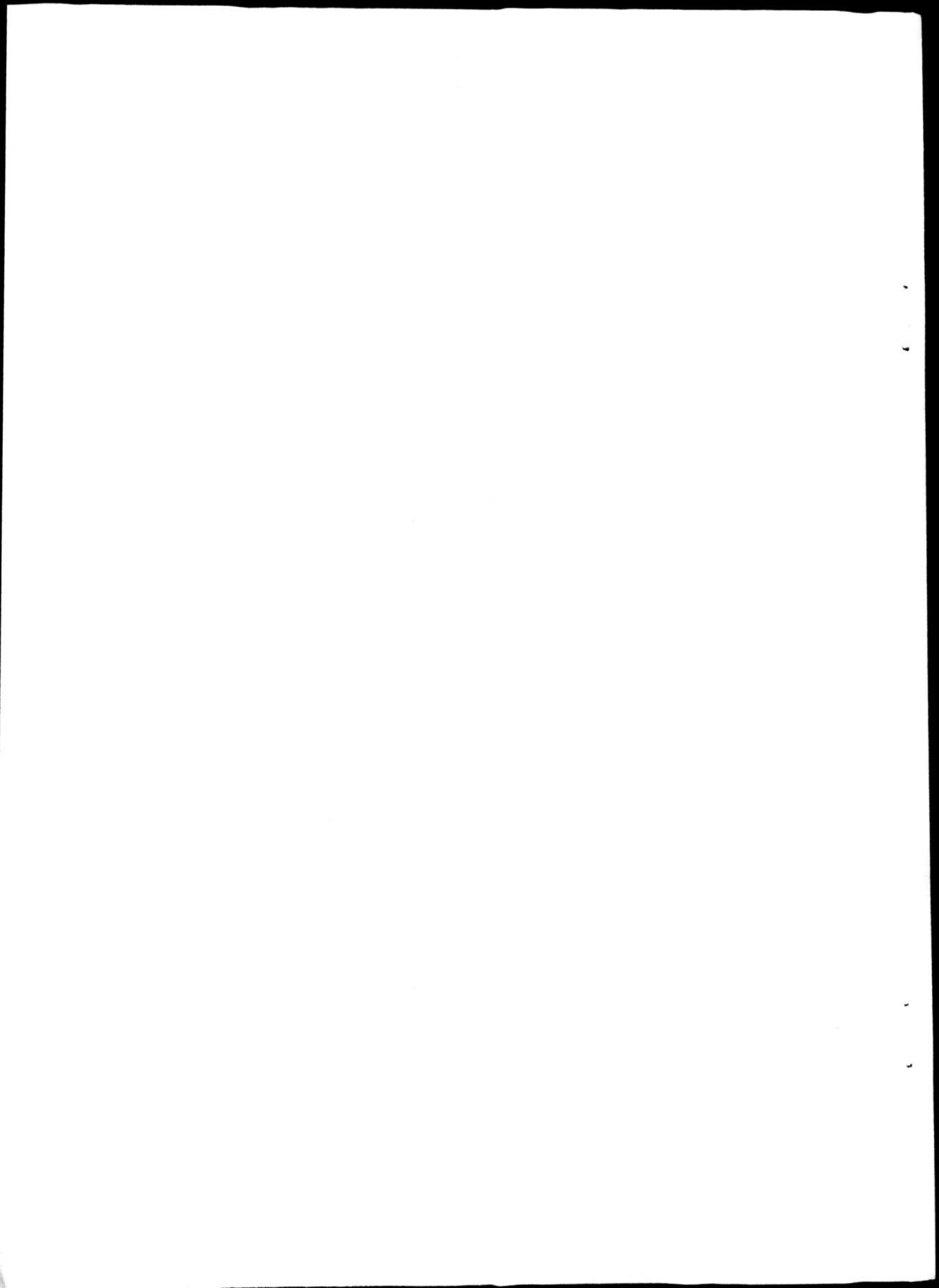






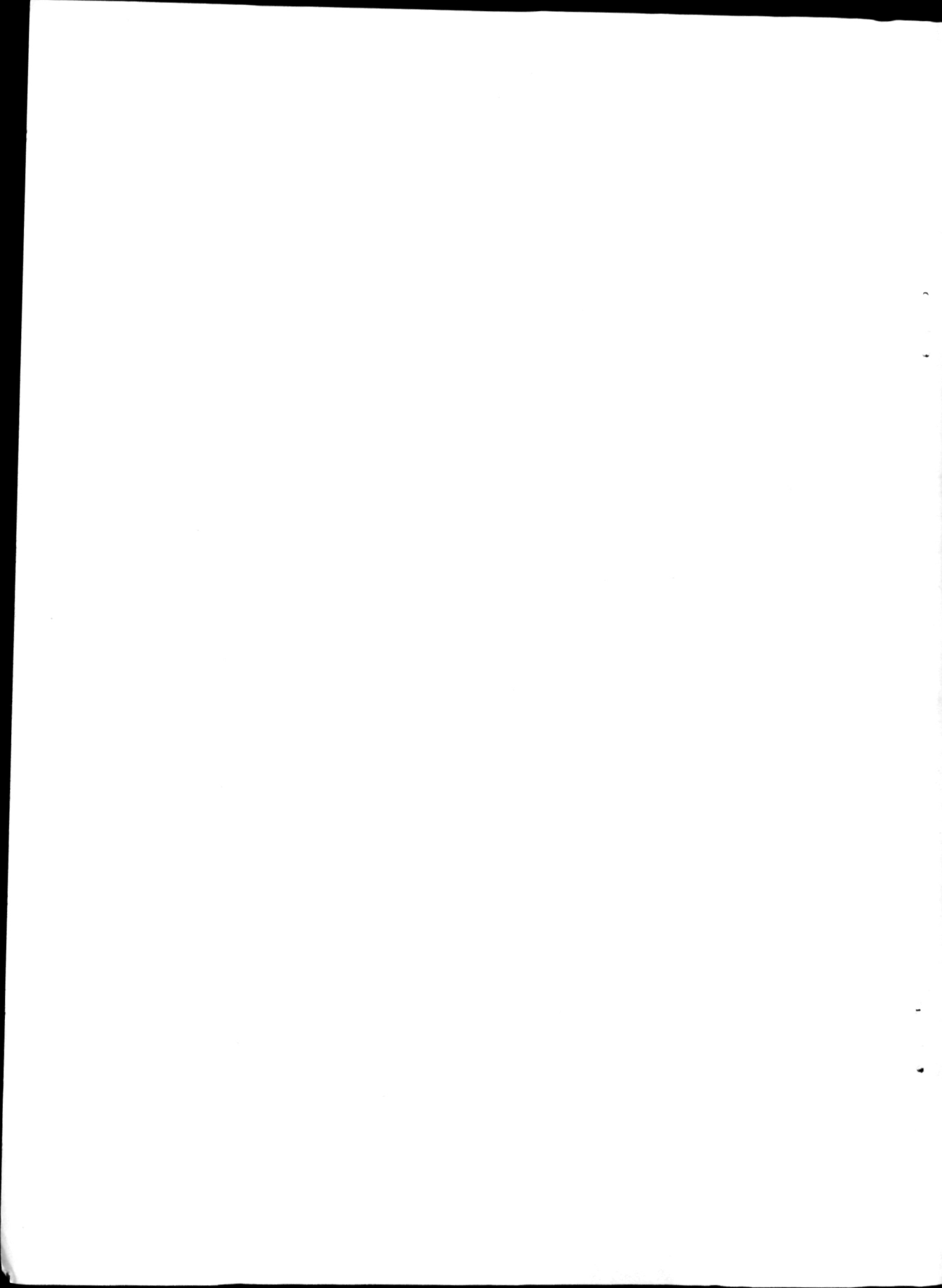






BIBLIOGRAFIA

- 1) BOLIS L., LULY P., BARONCELLI V. (1971) - D(+) glucose permeability in brown trout *Salmo trutta* L. erythrocytes. *J. Fish Biol.*, 3, 273-275.
- 2) BOLIS L., LULY P. (1972) - Monosaccharide permeability in brown trout *Salmo trutta* L. erythrocytes. In Role of Membranes in Secretory Processes. Ed. L. Bolis, R. D. Keynes and W. Wilbrandt, pp. 215-221. Amsterdam, N. H. P. C.
- 3) BOLIS L., LULY P. (1972) - Membrane lipid pattern and non-electrolytes permeability in *Salmo trutta* L.. In Passive Permeability of Cell Membranes. Ed. Kreuzer F. and Slegers J. F. G., pp. 357-362. Plenum Press., N. Y. and London.
- 4) BOWYER F. (1957) - The kinetic of the penetration of non-electrolytes into the mammalian erythrocytes. *Int. Rev. Cytol.*, 6, 469-511.
- 5) BOWYER F., WIDDAS W. F. (1958) - The action of inhibitors on the facilitated hexose transfer system in erythrocytes. *J. Physiol.*, 141, 219-232.
- 7) DAVSON H., DANIELLI J. F. (1943) - Permeability of natural membranes. Cambridge, Cambridge University Press.
- 8) DAWSON A. C., WIDDAS W. F. (1964) - Variations with temperature and pH of the parameters of glucose transfer across the erythrocyte membrane in the foetal guinea pig. *J. Physiol.*, 172, 107-122.
- 9) FAUST R. G., PARPART A. K. (1961) - Permeability studies on the red blood cell of the ground-hog (*Marmota monax*). *J. Cell. Comp. Physiol.*, 57, 1-3.
- 10) HOOS R. T., TARPLEY H. L., REGEN D. M. (1972) - Sugar transport in beef erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta*, 266, 174-181.
- 11) KOZAWA S. (1914) - Beiträge zum arteigenen Verhalten der roten Blutkörperchen. *Biochem. Z.*, 60, 231-256.
- 12) LIEB W. R., STEIN W. D. (1970) - Quantitative prediction of a non carrier model for glucose transport across the human red cell membrane. *Biophys. J.*, 10, 585-609.
- 13) MASING E. (1914) - Über die Verteilung von Traubenzucker in Menschenblut und ihre Abhängigkeit von der Temperatur. *Pflügers Arch. ges. Physiol.*, 156, 401-425.
- 14) MILLER D. M. (1969) - Monosaccharide transport in erythrocytes. In red cell membrane structure and function. Ed. Jamieson G. A. and Greenwalt J. pp. 240-290, Philadelphia, Lippincott Co.
- 15) WIDDAS W. F. (1972) - Aspects of competitive inhibition. In Passive Permeability of cell membrane, ed. Kreuzer F. and Slegers J. F. G. pp. 101-105, New York and London, Plenum Press.



- 16) WILBRANDT W. (1938) - Die Permeabilität der roten Blutkörperchen für einfache Zucker. *Pflugers Archiv.*, 241, 302, 309.
- 17) WILBRANDT W. - Handbuch der Physiologisch und Pathologisch-chemischen Analyse (Springer-Verlag, Berlin, 1955) 10 Aufl. b. 11, 49-70.
- 18) WILBRANDT W. (1972) - Carrier diffusion. In Passive Permeability of Cell Membranes. Ed. Kreuzer, F. and Slegers J. F. G., pp. 79-99, N. Y. and London, Plenum Press.

B1752.



## MATERIALI E METODI

Il sangue è stato prelevato dalla vena caudale di *Scyliorhinus stellaris* L. (circa gr. 2000-2500) e di *Boops boops* L. (circa gr. 200) con aggiunta di eparina (5 UI/ml).

La preparazione della membrana è stata effettuata lavando i globuli rossi con soluzione salina isotonica tamponata (pH 7,4); sospensione di eritrociti: ematocrito 50%. Le cellule quindi sono state emolizzate con 10 ml di TRIS 20 mOsm (pH 7,65)/ml di cellule e lavate in centrifugate finchè tutta l'emoglobina è stata allontanata (circa 4 lavaggi per 30 min.-13.000/g).

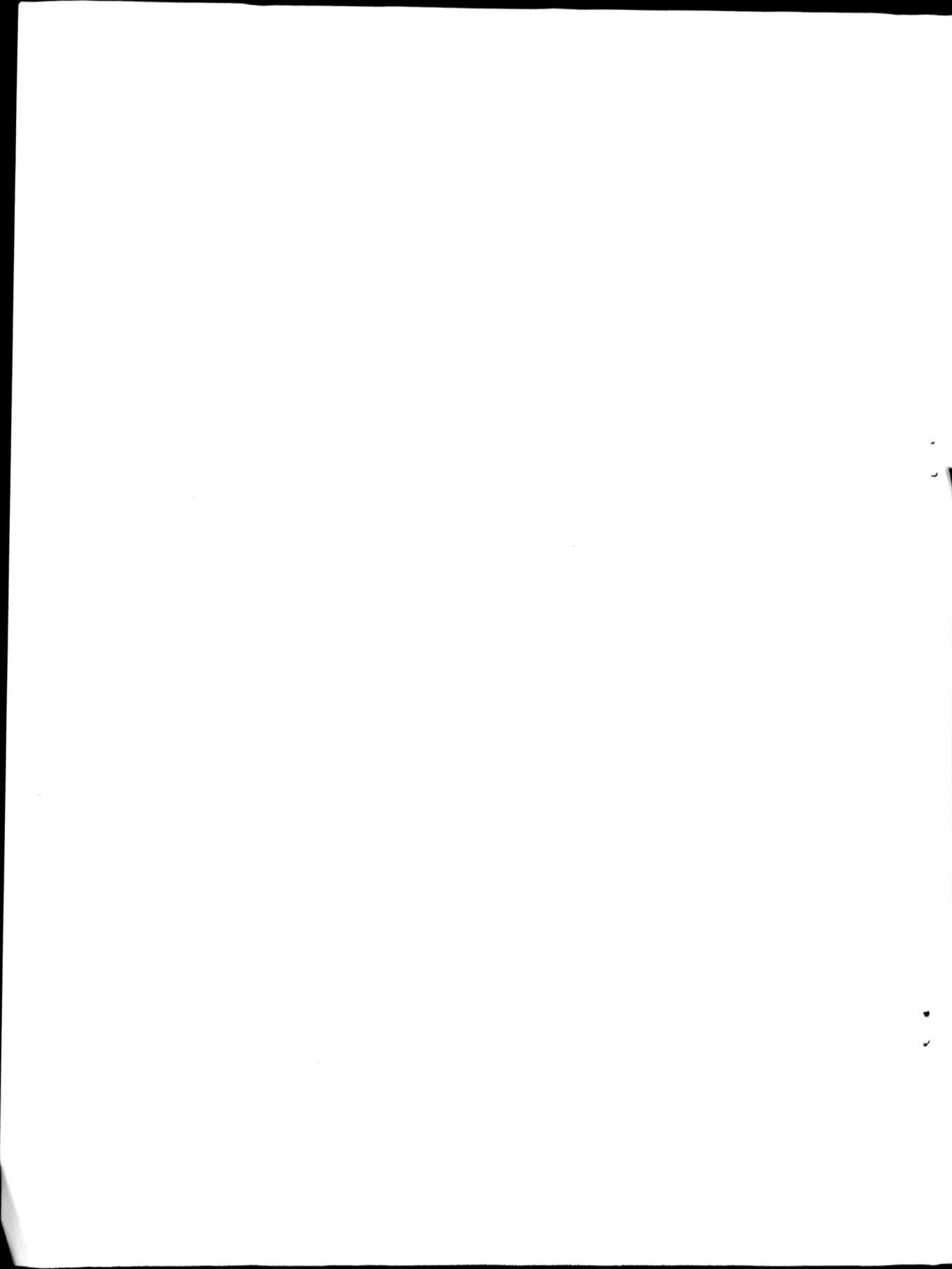
Alla fine di questo procedimento per ottenere l'emolisi totale, è stato aggiunto EDTA 0,001 M per un ulteriore lavaggio (7 ml TRIS + 3 ml EDTA). Questo procedimento è stato eseguito per almeno 30 volte (centrifugazione 5.000/g), fino ad ottenere una preparazione completamente bianca. Si è quindi proceduto alla estrazione dei lipidi ed alla preparazione degli esteri metilici seguendo la tecnica descritta da BOLIS L. (1972) e MARINO D. e Coll. (1977).

L'introduzione della nuova metodica per ottenere le membrane, come qui descritte, permette di ottenere una preparazione che può essere anche liofilizzata ed analizzata in tempi successivi. Tale metodica non ha comportato nessuna modificazione ai risultati ottenuti in lavori precedenti come dimostrato dai nostri risultati ottenuti con globuli rossi di vertebrati d'acqua dolce, non pubblicati.

Per l'analisi dei fosfolipidi si è usato il metodo di BROEKHUYSE (1969), per quelle del fosforo il metodo di ALLEN (1940) e per il colesterolo il metodo di ABELL (1952).

## RISULTATI E CONCLUSIONI

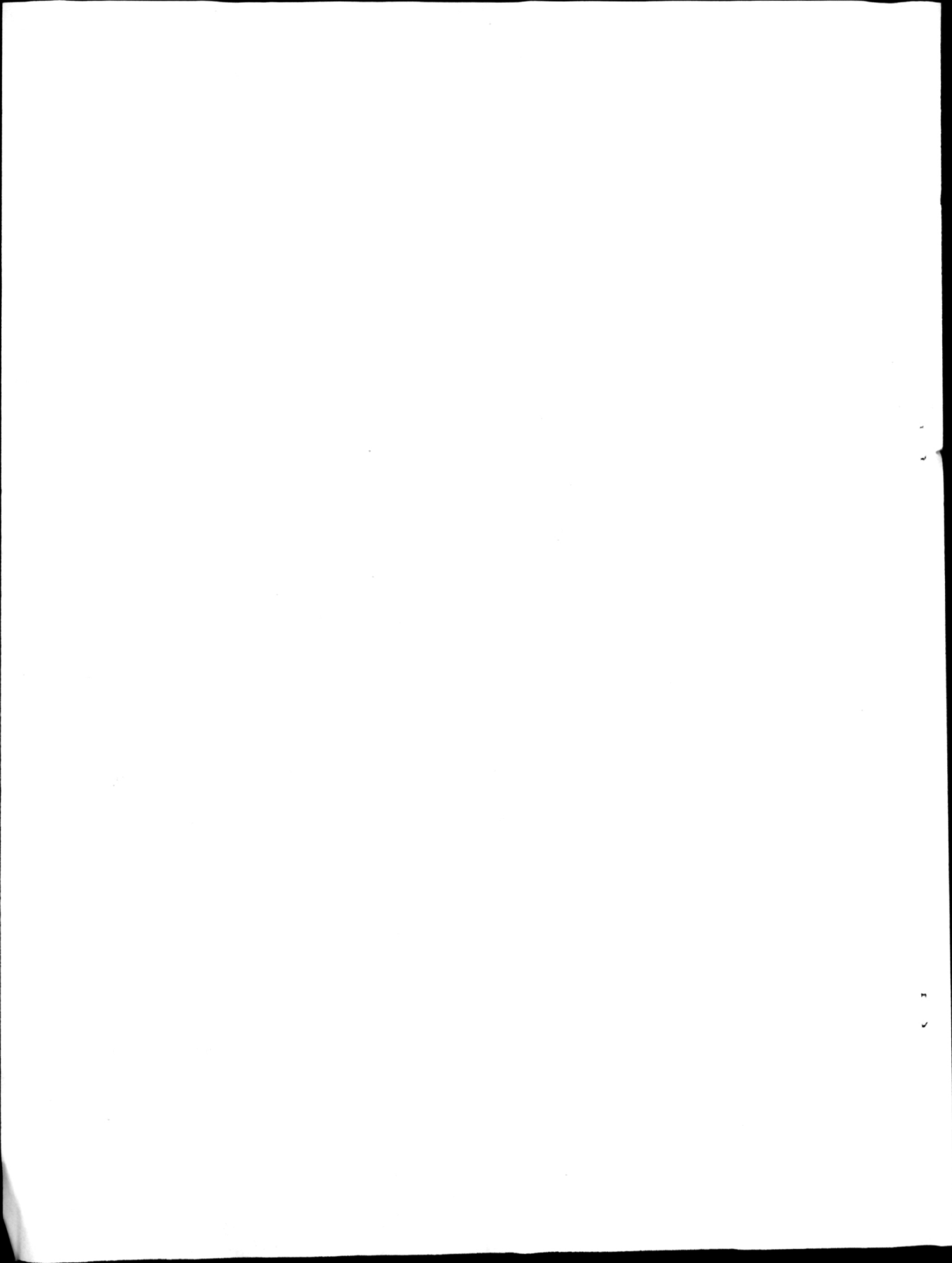
Come si può vedere dalle tabelle allegate, le differenze maggiori in confronto ai vertebrati d'acqua dolce nella distribuzione in acidi grassi si rilevano maggiormente a carico di iso 16:0, 16:1 e 20:4 (Tab. 1).



TAB. 1

Acidi grassi %	<i>Scyliorhinus</i> <i>stellaris</i> L.	<i>Boops boops</i> L.	<i>Salmo trutta</i> L. (Bolis 1972)
	1	2	3
12:0	tracce	tracce	tracce
14:0	2,0	1,9	2,1
15:0	0,4	0,5	0,3
iso 16:0	22,1	25,1	19,2
16:1	5,8	7,3	3,2
17:0	0,6	0,8	0,6
17:1	0,2	tracce	tracce
18:0	3,8	3,6	4,8
18:1	5,1	6,3	12,3
	3,6	2,9	3,8
18:3	tracce	tracce	tracce
20:0	0,41	0,31	0,25
20:1	0,61	0,8	0,4
20:2	0,38	0,2	0,1
20:3	2,2	1,9	2,8
20:4	0,9	0,8	1,5
20:5	6,8	7,1	1,1
22:4	0,9	0,8	0,4
22:5	18	19	18,6
22:6	26,6	25,3	26,8

Media di 10 determinazioni.



TAB. 2

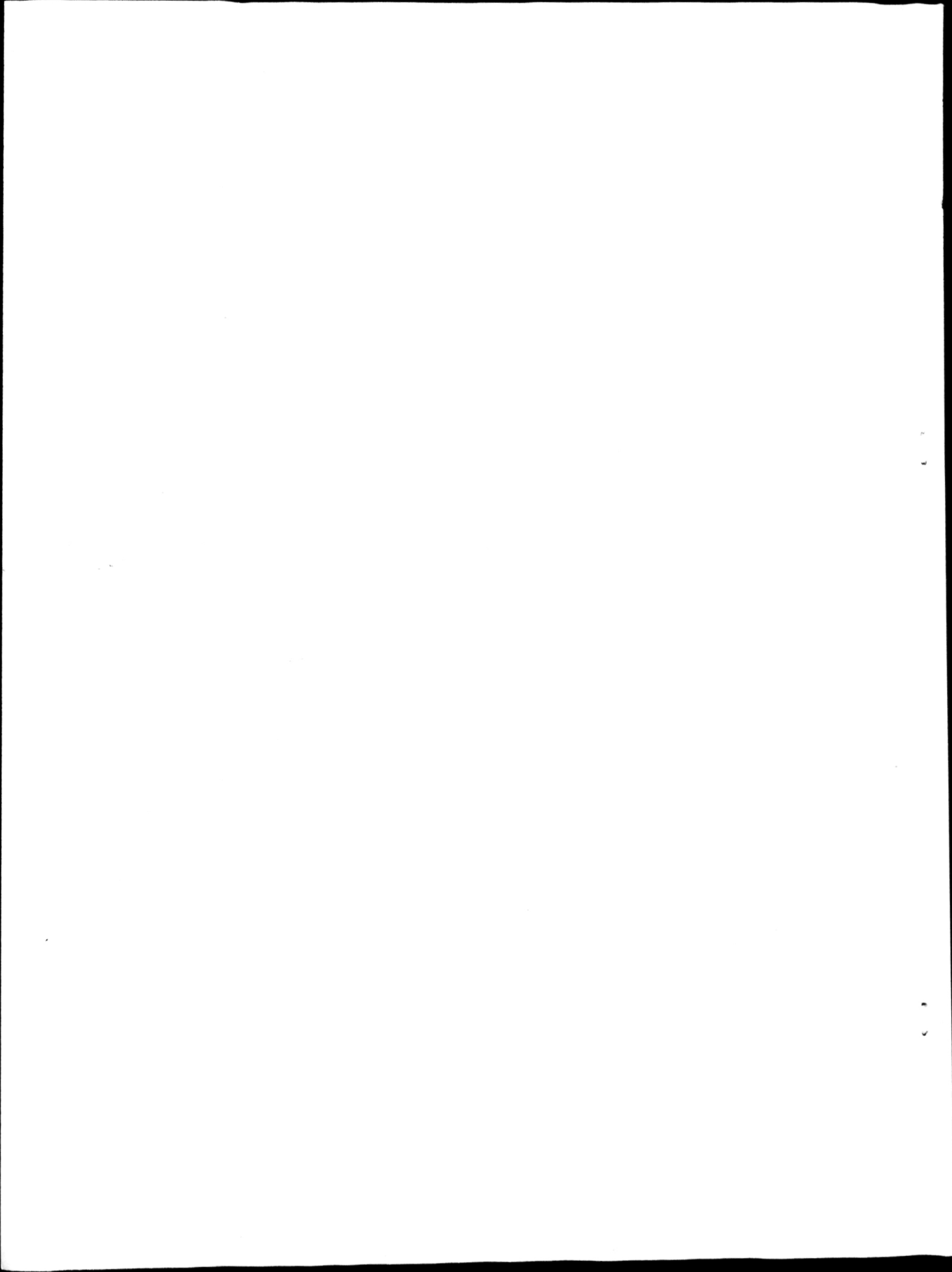
Distribuzione di fosfolipidi in eritrociti di *Scyliorhinus stellaris* L. e *Boops boops* L.

	<i>Scyliorhinus</i> L. <i>stellaris</i>	<i>Boops</i> <i>boops</i> L.	<i>Salmo</i> <i>trutta</i> L.
fosfatidiletanolamina %	21,4	20,3	19,7
fosfatidilcolina	58,3	57,1	61,5
sfingomieline	5,6	5,4	2,8
fosfatidilinositolo	2,1	1,9	1,7
fosfatidilserina	12,6	10,3	11,5
lisofosfatidilcolina	2,6	2,2	2,8

TAB. 3

lipidi totali mg/ml eritrociti	2,3	2,1	2,02
fosfolipidi (% lipidi totali)	82,3	81,8	80,9
lipidi neutri, colesterolo ed altri (%)	19,3	18,3	20,0

Per quanto riguarda la differenza in distribuzione di fosfolipidi si può notare (Tab. 2) che il contenuto di sfingomieline è quasi raddoppiato rispetto al contenuto trovato in precedenti lavori (MARINO D.) in vertebrati d'acqua dolce. Questi dati suggeriscono di studiare ulteriormente se possano esistere modificazioni di permeabilità ai non elettroliti attraverso le membrane di globuli rossi dei vertebrati marini.



BIBLIOGRAFIA

- 1) ABELL L. L., LEVY B. B., BRODIE B. B. and KENDALL F. E. (1952) - A simplified method for the estimation of total cholesterol in serum and demonstration of its specificity. *Biol. Chem.*, 195, 357.
- 2) ADDISON R. F. and ACKMAN R. G. (1971) - Erythrocyte lipids of Atlantic Cod, *Gadus morhua*. *Canadian J. of Biochem.*, 49, 873-876.
- 3) ALLEN R. J. L. (1940) - The estimation of phosphorus. *Biochem. J.*, 34, 858.
- 4) BOLIS L., LULY P. (1972) - Membrane lipid pattern and non-electrolytes permeability in *Salmo trutta* L. In « Passive Permeability of Cell Membranes. Ed. Kreuzer, F. and Slegers, J. F. G., pp. 357-362, Plenum Press, New York and London.
- 5) BOLIS L. (1973) - Comparative transport of sugars across red blood cells. In: Comparative Physiology. Ed. I. Bolis, K. Schmidt Nielsen J. H. Maddrell. N. H. P. C.
- 6) BROEKHUYSE R. M. (1969) - Quantitative two-dimensional thinlayer chromatography of blood phospholipids. *Clin. Chim. Acta*, 23, 457-461.
- 7) JACOBS M. H. (1931) - Osmotic hemolysis and zoological classification. *Proc. Am. Phil. Soc.*, 70, 363.
- 8) MARINO D. e Coll. (1977) - Composizione lipidica della membrana dei globuli rossi di teleostei d'acqua dolce: *Salmo gairdnerii* Rich, *Anguilla anguilla* L., *Ciprinus carpio*.
- 9) NELSON G. J. (1967) - Composition of neural lipids from erythrocytes of common mammals. *J. Lipid Res.*, 8, 374-379.
- 10) REED C. E., SWISHER N. S., MARINETTI G. V. and EDEN E. G. (1960). Studies on the lipids of the erythrocytes. I. Quantitative analysis of the lipids of normal human red blood cells. *J. Lab. Clin. Med.*, 59, 281.
- 11) VAN DEENEN L. L. M. and DE GLER J. (1964) - Chemical composition and metabolism of lipids in red cells of various animal species. In: The Red Blood Cell. Eds. C. Bishop and D. M. Surgenor, Academic Press, New York and London.
- 12) WILBRANDT W. (1969) - Specific transport mechanisms in the erythrocyte membrane. *Experientia*, 25, 673-684.

B1753