

УДК 577.1:591.147.5) – 074.543.54

МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ МЕТАБОЛИТОВ ГИДРОКСИЛАЗНОГО ПУТИ ОБМЕНА ТРИПТОФАНА В ЭПИФИЗЕ КРЫСЫ С ПОМОЩЬЮ ИОН-ПАРНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ С ДЕТЕКТИРОВАНИЕМ ПО ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

М.М. Золотухин, Е.М. Дорошенко

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

Разработан чувствительный и селективный метод количественного определения: L-триптофана и метаболитов его гидроксилазного пути (серотонин, мелатонин, 5-гидроксииндолуксусная кислота, N-ацетилсеротонин и 5-метоксииндолуксусная кислота) с помощью ион-парной обращенно-фазной хроматографии с детектированием по природной флуоресценции в хлорнокислых экстрактах эпифизов крыс.

Ключевые слова: крыса, эпифиз, метаболиты триптофана, ВЭЖХ.

A sensitive and selective method for simultaneous determination of tryptophan and metabolites of its hydroxylase pathway (serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, N-acetylserotonin, 5-methoxyindoleacetic acid, and melatonin) by ion-pair reversed-phase chromatography and detection by natural fluorescence was elaborated. Good resolution of all compounds listed in the perchloric extracts of rat pineal gland was achieved.

Key words: rat, pineal gland, tryptophan metabolites, HPLC.

Гидроксилазный путь обмена триптофана является источником синтеза индоламинов, обладающих широким спектром биологического действия. Известно, что уровни этих метаболитов изменяются в зависимости от фазы циркадианного ритма [1]. Метаболизм триптофана в эпифизе крыс изучен детально и включает четыре основных этапа. На первом этапе происходит захват триптофана из кровеносного русла путем активного транспорта в пинеалоциты. Триптофан преобразуется в 5-гидроксириптофан митохондриальной триптофангидроксилазой. Этот этап является скоростью-лимитирующим. Активность этого фермента возрастает в темную фазу в 2 раза. На втором этапе цитоплазматическая декарбоксилаза L-ароматических аминокислот катализирует декарбоксилирование 5-гидроксириптофана в серотонин (5-гидроксириптамин). Содержание серотонина в эпифизе крысы достигает в дневное время максимального значения, снижается в ночное время за счет превращения его в N-ацетилсеротонин на третьем этапе. Возможно альтернативное превращение 5-гидроксириптамина по окислительному пути в 5-гидроксииндолуксусную кислоту с последующим метилированием до 5-метоксииндолуксусной кислоты, или по восстановительному до 5-гидроксириптофола с последующим его метилированием до 5-метоксириптофола. Не исключается прямое метилирование серотонина с образованием 5-метоксириптамина. Третий этап является также важным в регуляции синтеза мелатонина через активность N-ацетилтрансферазы, которая ацетирует аминогруппу серотонина до N-ацетил-5-гидроксириптамина, используя ацетил-КоА как кофактор. Для этого фермента показана циркадианная ритмичность с возрастанием активности в 20-100 раз

в ночное время. На четвертом этапе N-ацетилсеротонин превращается в мелатонин (рис.1) при участии цитозольного фермента гидроксииндол-О-метилтрансферазы, использующий в качестве донора метильную группу S-аденозилметионина. Активность этого фермента не подчиняется циркадианным изменениям и продукция мелатонина зависит от доступности его предшественника N-ацетилсеротонина. После синтеза мелатонина (N-ацетил-5-метоксириптамин) путем пассивной диффузии поступает в кровяное русло. Благодаря своей липофильной структуре он проникает через биологические мембраны, где реализует свой эффект [2-7].

Активное изучение интермедиатов обмена триптофана в эпифизе крыс методом ВЭЖХ с использованием флуоресцентного детектирования проводилось в 80-90-х годах [6-11]. Позже, появились работы, посвященные определению только мелатонина в эпифизах млекопитающих [12-14].

Целью данной работы была отработка метода определения уровней метаболитов гидроксилазного пути обмена триптофана в эпифизе крысы.

Материалы и методы

В работе использовалось семь белых беспородных крыс-самцов массой 150-250 г, которые содержались в течение двух недель при искусственном световом режиме (12/12 ч). Декапитацию проводили спустя два часа после начала темной фазы. Извлеченные эпифизы помещали в жидкий азот. Гомогенизацию производили тефлоновым пестиком в 100 мкл среды, содержащей 0,1 М хлорную кислоту, 25 мг/л ЭДТА и 1 мМ ванилиновую кислоту (VA) (внутренний стандарт). Центрифугировали 15 мин при 13000 g. Супернатанты замораживали и хранили при -40 °С.

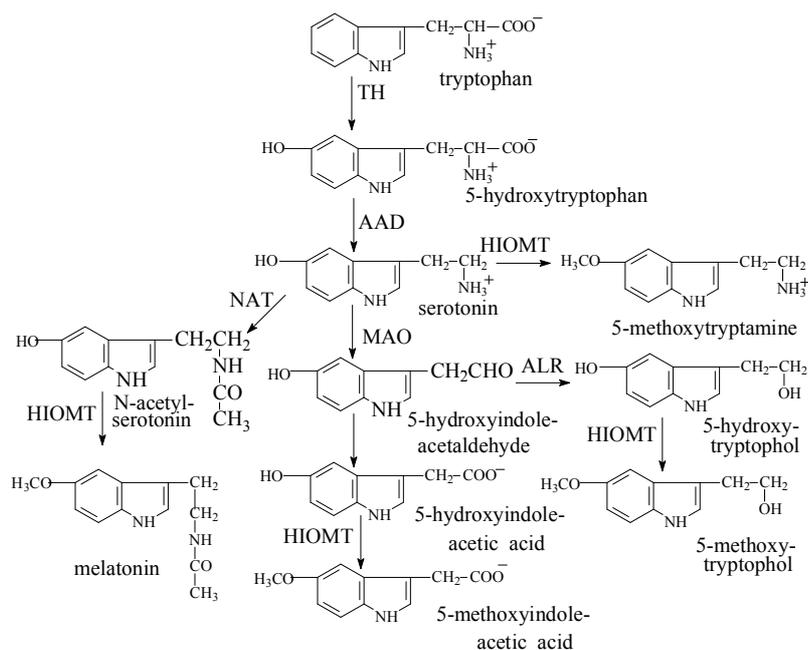


Рис. 1. Схема катаболизма триптофана в эпифизе крысы [2-7].

TH – триптофангидроксилаза, AAD – декарбоксилаза L-ароматических аминокислот, MAO – моноаминоксидаза, NAT – N-ацетилтрансфераза, HIOMT – гидроксиндол-O-метилтрансфераза, ALR – альдегидредуктаза.

Для приготовления подвижных фаз использовали химически чистый ацетонитрил (Merck, Германия), KH_2PO_4 , ЭДТА (Reanal, Венгрия), октилсульфонат натрия (Элсико, Россия). В качестве эталонных соединений применяли L-триптофан (Trp), N-ацетил-L-триптофан (NAT), триптамина гидрохлорид (TRN), серотонин креатинин-сульфат (5-НТ) (Reanal, Венгрия), мелатонин (Mel), 5-гидроксииндолуксусная кислота (5-НИАА), N-ацетил-серотонин (NAS) и 5-метоксииндолуксусная кислота (5-МИАА), ванилиновая кислота (VA), триптолин (Trp) (Sigma, США).

Воду для подвижных фаз подвергали тройной дистилляции в стеклянном аппарате с последующим удалением следов органических соединений пропусканием через патрон («Norganic», Millipore, США). Кроме того, для дополнительной очистки буферов, их пропускали через мембранный фильтр с размером пор 0,22 μm . Концентрации эталонных растворов Trp, 5-НТ, 5-НИАА, NAS, NAT, TRN, 5-МИАА, Trp и Mel составили 10 мМ. Растворы хранили при -40°C . Методом последовательных разбавлений из эталонных растворов соединений готовили рабочие растворы с концентрацией 10 мкМ для Trp, 5-НТ, 5-НИАА, NAS и 1 мкМ для NAT, VA, TRN, 5-МИАА, Trp и Mel, которые хранили при -20°C .

Хроматографический анализ проводился методом обращено-фазовой ВЭЖХ на жидкостном хроматографе Agilent 1100 с детектором флуоресценции (G1321A, Германия). Для определения была использована колонка диаметром 3 мм и длиной 250 мм с наполнителем Separon SGX C_{18} , 8 мкм (Элсико, Россия). Разделение проводили при 30°C в термостате для хроматографических колонок

(G1316A). Скорость потока элюента 0,5 мл/мин. Введение образцов осуществлялось автосамплером (ALS G1313A), объем 20 мкл. Детектирование при длине волны возбуждения 280 нм и испускания 340 нм. Использовали подвижные фазы, содержащие ацетонитрил (16,65-18,67% об.), октилсульфонат натрия (1,67-2,59 мМ), уксусную кислоту (17-85,0 мМ), ЭДТА (25 мг/л) и дигидрофосфат калия (0,1 М).

Интегрирование, расчет содержания изучаемых компонентов и спектральный анализ метаболитов триптофана проводили с помощью программы ChemStation версии A.10.01 и ее спектрального модуля.

Уровни 5-гидрокситриптофана определяли, используя подвижную фазу, содержащую 0,1 М дигидрофосфат калия, 17 мМ уксусной кислоты, 25 мг/л ЭДТА, 1 мМ гептилсульфоната натрия, 0,8 мМ октилсульфоната натрия и 11% метанола (об.).

Результаты

При изменении состава элюента коэффициенты емкости триптамина и 5-гидрокситриптамина менялись в большей степени, чем остальных метаболитов. На параметры удерживания наиболее сильно влияли концентрации ион-парного реагента и уксусной кислоты, менее содержание органического модификатора. При изменении pH подвижной фазы наблюдалось изменение в очередности элюирования 5-НТ и 5-МИАА (рис. 2-5). Наилучшее разделение исследуемых веществ было получено с использованием подвижной фазы следующего состава: 0,1 М KH_2PO_4 , 17 мМ CH_3COOH , 25 мг/л ЭДТА, 1,67 мМ октилсульфонат натрия (pH 3,67) и 18,68% CH_3CN (об.).

В этой хроматографической системе мы тестировали разделение метаболитов гидроксилазного пути катаболизма триптофана и альтернативной метаболической ветви серотонина с некоторыми минорными метаболитами, такими как триптамин

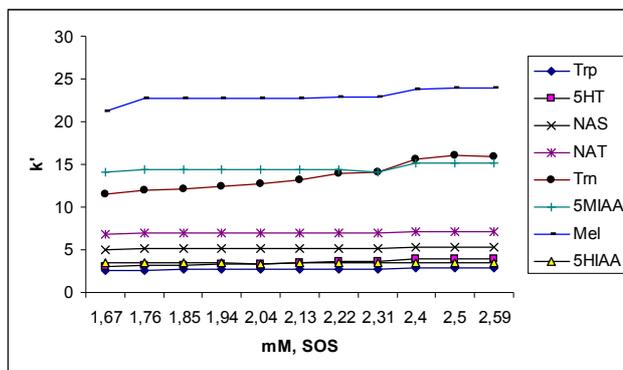


Рис. 2. Зависимость коэффициента емкости (k') от содержания ион-парного реагента (SOS) для 0,1 М дигидрофосфата калия, 17 мМ CH_3COOH и 18,67% (об.) ацетонитрила

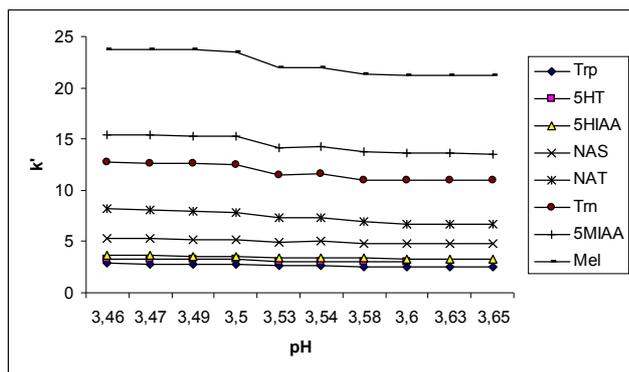


Рис. 3. Зависимость k' от pH для 0,1 М дигидрофосфата калия, 1,67 мМ SOS и 18,67 % (об.) ацетонитрила

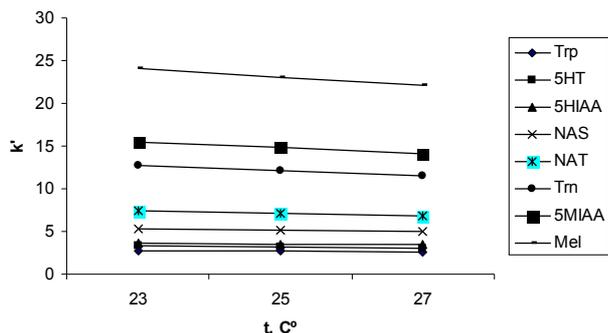


Рис. 4. Зависимость коэффициента емкости от температуры для 0,1 М дигидрофосфата калия, 17 мМ CH_3COOH , 1,67 мМ SOS и 18,67 % (об.) ацетонитрила

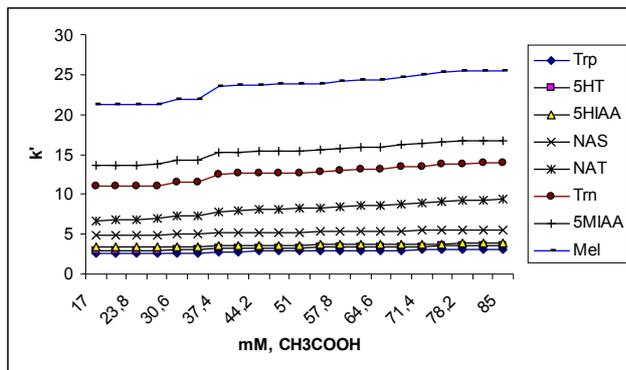


Рис. 5. Зависимость k' от содержания уксусной кислоты для 0,1 М дигидрофосфата калия, 1,67 мМ SOS и 18,67 % (об.) ацетонитрила

и N-ацетилсеротонин. Полученные данные свидетельствуют, что Tm и NAT не мешают определению основных интермедиатов, хотя и обнаруживаются в малых количествах в эпифизе крысы.

Разработанный метод был применен для количественной оценки уровней Trp, 5-HT, NAS, 5-HIAA, 5MIAA и Mel в шишковидных железах крысы. Полученные нами цифры были сопоставимы с результатами, полученными другими авторами [8-11]. Результаты, полученные автором [6], отличны от наших по уровням Mel, NAS. Значения этих соединений завышены вследствие возможной интерференции пиков.

На рисунке 6А, Б представлены хроматограммы смеси стандартов и экстрактах эпифизов крысы. Результаты количественного анализа представлены в таблице 1.

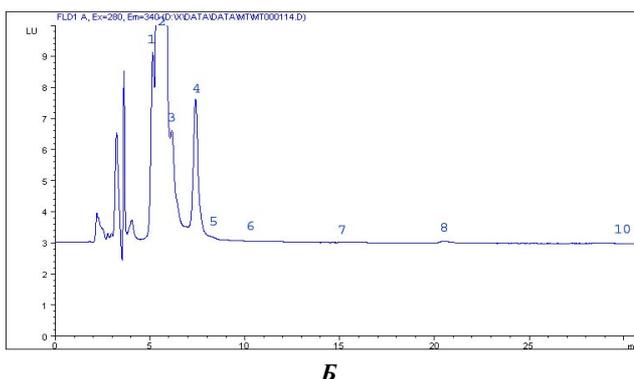
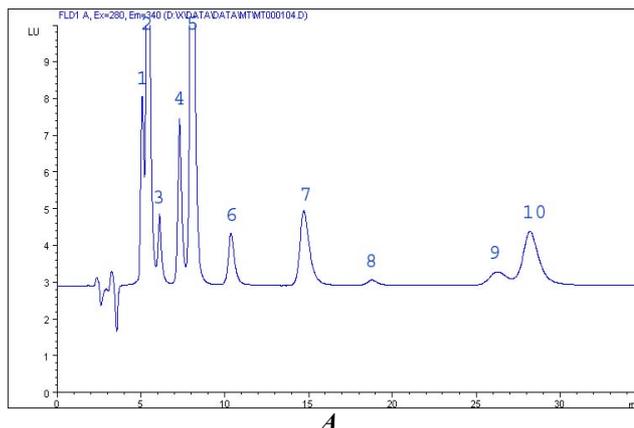


Рис. 6. Хроматограммы: (А) смеси стандартов: 1- Trp, 2- 5-HT, 3- 5-HIAA, 4-VA, 5- NAS, 6- NAT, 7- TRN, 8- 5-MIAA, 9- Trp, 10- Mel; (Б-Б') экстракта эпифиза крысы (одна и та же хроматограмма в различном масштабе)

Таблица 1. Содержание триптофана и его метаболитов в эпифизах крысы (нмоль/г ткани)

Trp	2,558 ± 0,257
5-HTP	0,082 ± 0,007
5-HT	55,243 ± 14,274
5-HIAA	16,096 ± 1,959
NAS	0,053 ± 0,003
NAT	0,1 ± 0,018
TRN	0,013 ± 0,001
5-MIAA	0,455 ± 0,049
Mel	0,047 ± 0,006

Предел детектирования для мелатонина при соотношении сигнал/шум = 2 составлял 0,65 пмоль на 1 г ткани, что значительно ниже физиологических концентраций индоламинов в эпифизе крысы [6-7].

Разработанный вариант количественного определения метаболитов триптофана в биологическом материале позволяет проводить анализ в изократическом режиме, что значительно повышает вос-

производительность параметров удерживания, кроме этого, обладает достаточной селективностью и чувствительностью методом определения индоламинов, что существенно увеличивает надежность результатов.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о пригодности метода для качественной и количественной оценки состояния гидроксилазного пути обмена L-триптофана в биологическом материале при различных экспериментальных условиях.

Литература

1. Boguszewska A., Pasternak K. Melatonin and its biological significance / A. Boguszewska // Pol. Merkuriusz. Lek. – 2004. – № 101. – P. 523–527.
2. Cardinali D.P. Melatonin. A mammalian pineal hormone / D.P. Cardinali // Endocr. Rev. – 1981. – Vol. 2. – P. 327–346.
3. Reiter R.J. Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions / R.J. Reiter // Endocr. Rev. – 1991. – Vol. 12. – P. 151–180.
4. Reiter R.J. Melatonin: the chemical expression of darkness / R.J. Reiter // Mol. Cell Endocrinol. – 1991. – Vol. 79. – P. 153–158.
5. Sugden D. Melatonin biosynthesis in the mammalian pineal gland / D. Sugden // Experientia. – 1989. – Vol. 45. – P. 922–932.
6. Lee Chin J.R. Determination of six indolic compounds, including melatonin, in rat pineal using high-performance liquid chromatography with serial fluorimetric – electrochemical detection / J.R. Lee Chin // J. Chromatogr. – 1990. – Vol. 528. – P. 111–121.
7. Malcolm H., Finlay M., Finlay D. Determination of melatonin and monoamines in rat pineal using, reversed-phase ion-interaction chromatography with fluorescence detection / H. Malcolm // J. Chromatogr. – 1991. – Vol. 554. – P. 93–102.
8. Determination of indoles in human and rat pineal / G.M. Anderson [et al] // J. Chromatogr. – 1982. – Vol. 228. – P. 155–163.
9. Wakabayashi H., Shimada K., Aizawa Y. Determination of serotonin and melatonin in rat pineal gland by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorometric dual detection / H. Wakabayashi // Chem Pharm Bull. – 1985. – Vol. 33, №9. – P. 3875–3880.
10. Wakabayashi H., Shimada K., Aizawa Y. Variation of melatonin and serotonin content in rat pineal gland with sex and oestrous phase difference determined by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection / H. Wakabayashi [et al] // J. Chromatogr. – 1986. – Vol. 381, №1. – P. 21–28.
11. Highly sensitive method for the determination of melatonin by normal-phase high-performance liquid chromatography with fluorometric detection / A.A. Vitale [et al] // J. Chromatogr B Biomed Appl. – 1996. – Vol. 681, №2. – P. 381–384.
12. Sensitive determination of melatonin by precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography / . Iinuma [et al] // J. Chromatogr A. – 1999. – Vol. 835, №1-2. – P. 67–72
13. Determination of pineal melatonin by precolumn derivatization reversed-phase high-performance liquid chromatography and its application to the study of circadian rhythm in rats and mice / K. Hamase [et al] // Anal Biochem. – 2000. – Vol. 279, №1. – P. 106–110.
14. A sensitive internal standard method for the determination of melatonin in mammals using precolumn oxidation reversed-phase high-performance liquid chromatography / K. Hamase [et al] // J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. – 2004. – Vol. 811, №2. – P. 237–241.

Resume

THE METHOD OF DETERMINATION OF METABOLITES OF TRYPTOPHAN HYDROXYLASE PATHWAY IN RAT PINEAL GLANDS BY ION-PAIR HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY WITH FLUORESCENCE DETECTION

M.M. Zolotukhin, Ya.M. Darashenka
Grodno State Medical University

The method for simultaneous determination of tryptophan, serotonin, 5-hydroxyindoleacetic acid, N-acetylserotonin, 5-methoxyindoleacetic acid, and melatonin by ion-pair reversed-phase separation and detection by natural fluorescence was elaborated. A good resolution of all the above compounds in the pineal gland extracts was achieved. The mobile phase consisted of a 18.67 % (v/v) mixture of acetonitrile and aqueous buffer containing 0.1 M potassium dihydrophosphate, 17 mM acetic acid, 25 mg/l EDTA, 1.67 mM sodium octanesulphonate with pH 3.67. Detection was done by fluorescence ($\lambda_{ex} = 280$ nm, $\lambda_{em} = 340$ nm). The method is applicable for the determination of tryptophan and principal indoleamines in individual rat pineals.

Поступила 23.02.07