

А. Ф. МАКАРЧИКОВ¹, Л. БЕТТЕНДОРФФ²

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛИЧЕСТВЕННОГО СОДЕРЖАНИЯ ТИАМИНТРИФОСФАТА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ОБЪЕКТАХ МЕТОДОМ ВЫСОКОЭФФЕКТИВНОЙ ЖИДКОСТНОЙ ХРОМАТОГРАФИИ

¹Институт биохимии НАН Беларуси, Гродно²Центр клеточной и молекулярной нейробиологии льежского университета, Льеж

В 1952 г. Rossi-Fanelli с соавт. [21] впервые обнаружили, что в печени крысы наряду с тиаминди- (ТДФ) и монофосфатом (ТМФ) содержится тиаминтрифосфат (ТТФ). В последующее десятилетие появились свидетельства присутствия ТТФ в различных биологических объектах – органах и тканях крысы [7], дрожжах [11], бактериях [20] и растениях [26]. Все опубликованные до конца 1970-х годов данные по распространению и содержанию тиамина (Т) и Т-фосфатов в различных видах организмов были получены с использованием бумажной хроматографии [7, 11, 21], электрофореза на ацетате целлюлозы [17] и ионообменной хроматографии [12, 16, 19]. Ввиду недостаточной по современным понятиям разрешающей способности использовавшихся методов, а также ограничений, накладываемых такими факторами, как низкие концентрации ТТФ и наличие в большинстве биологических источников флуоресцирующих компонентов, которые мешают определению тиохромных производных тиамина, результаты этих исследований не могут рассматриваться в качестве достаточно надежных. Действительно, по данным высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) – одного из наиболее мощных методов микроанализа сложных смесей химических соединений – в органах крысы содержится 0.04–0.68 нмоль ТТФ в расчете на 1 г влажной ткани, или 0.6–1.5% от общего Т [2, 5, 8, 9, 22], что в 5–10 раз ниже по сравнению со значениями, полученными другими методами [10, 12, 16, 17, 19]. Первое успешное использование ВЭЖХ для оценки количеств Т-фосфатов в тканях крысы относится к 1979 г., когда Ishii с соавт. [8] предложили систему с прямой фазой и преколоночной дериватизацией. Позднее были описаны другие варианты ВЭЖХ, включая обращенно-фазную [22] и ион-парную обращенно-фазную хроматографию [3]. Поскольку в элюате наблюдался 77–100% выход экзогенно добавляемого к депротеинизированным экстрактам тканей ТТФ [8], трудно предположить, что столь низкие концентрации данного соединения, регистрируемые методом ВЭЖХ в биологических образцах, обусловлены каким-то артефактом определения. По этой причине результаты ранних работ представляются значительно завышенными. Использование ВЭЖХ подтвердило факт присутствия ТТФ в бактериях [15] и тканях других видов животных (морская свинка, свинья, электрический угорь [2, 5]). При этом за исключением электрического органа *E. electricus*, скелетной мышцы свиньи и белой мышцы цыпленка [14], количество ТТФ в которых составляло 3.9 (86.5% от общего Т), 18.2 (69.1%) и 1.5 нмоль · г⁻¹ ткани (81.2%) соответственно, его содержание незначительно отличалось от величин, характерных для органов крысы. В литературе, однако, нет сведений о распространении ТТФ в других объектах живой природы. Кроме того, нуждаются в перепроверке данные, полученные ранее для дрожжей [11] и растительного материала [26]. В связи с этим цель настоящей работы состояла в определении содержания тиаминфосфатов у представителей различных групп организмов методом ион-парной обращенно-фазной ВЭЖХ с преколоночной дериватизацией [3].

Материалы и методы исследований. В работе использованы тетра-*n*-бутиламмонийгидрогенсульфат, Na₂HPO₄, NaOH, MgCl₂, K₃[Fe(CN)₆] “Merck”, тетрагидрофуран, диэтиловый эфир “Vel”, трихлоруксусная кислота (ТХУ), Бис-Трис-пропан “Sigma”, ионообменная смола AG 50W-X8 “BioRad”.

Объектами исследования служили головной мозг, сердце и летательная мышца перепелки (*Coturnix coturnix japonica*), головной мозг, печень и скелетная мышца мыши (*Mus musculus*), ки-

кишечная палочка (*E. coli*), пивные дрожжи (*Saccharomyces carlbergensis*), плодовое тело рядовки (*Tricholoma gambosa*), проростки фасоли (*Phaseolus vulgaris*) и листья гулявника (*Arabidopsis thaliana*). После извлечения органы животных замораживали на сухом льду и хранили при -70°C . *E. coli*, штамм BL-21, выращивали 12 ч при 37°C в 100 мл LB-среды, культуру центрифугировали 15 мин при 4 600 g и трижды промывали осадки 80 мл физиологического раствора. Дрожжевые клетки осаждали центрифугированием в течение 15 мин при 5 500 g и 6 раз промывали дистиллированной водой. Образцы гомогенизировали в охлажденной до $+4^{\circ}\text{C}$ 12%-ной ТХУ в гомогенизаторе со стеклянным пестиком и центрифугировали 5 мин при 15 000 g. Для удаления ТХУ супернатант обрабатывали трехкратным объемом водонасыщенного эфира, повторяя экстракцию 3 раза.

Разделение тиаминфосфатов осуществляли на хроматографе System 522 (Kontron Instruments) при скорости потока $0.5 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ на аналитической колонке PRP-1 ($\varnothing 4.1 \times 150 \text{ мм}$; неподвижная фаза – поли(стирол-дивинилбензол), размер частиц 5 мкм; Hamilton Co, Reno, Nevada) с протекторным колоночным картриджем ($\varnothing 2.3 \times 25 \text{ мм}$). Мобильная фаза состояла из 50 мМ Na-фосфатного буфера, pH 8.5, содержащего 25 мМ тетра-*n*-бутиламмонийгидрогенсульфат и 4%-ный тетрагидрофуран. Для детекции использовали флуоресцентный спектрометр LS-4 (Perkin-Elmer) с объемом проточной ячейки 3 мкл; длина волны возбуждения – 365 нм, эмиссии – 433 нм. Компьютерную обработку данных проводили при помощи программного обеспечения KromaSystem 2000 (Kontron Instruments). Перед инъекцией в хроматограф тиаминфосфаты окисляли в соответствующие производные тиохрома, добавляя к 80 мкл образца 50 мкл 4,3 мМ феррицианида калия в 15%-ном NaOH. В большинстве экспериментов объем инжекторной петли составлял 20 мкл; в некоторых случаях для повышения чувствительности использовалась петля объемом 100 мкл.

Результаты и обсуждение. На рис 1. представлена хроматограмма, полученная при разделении стандартной смеси Т и Т-фосфатов.

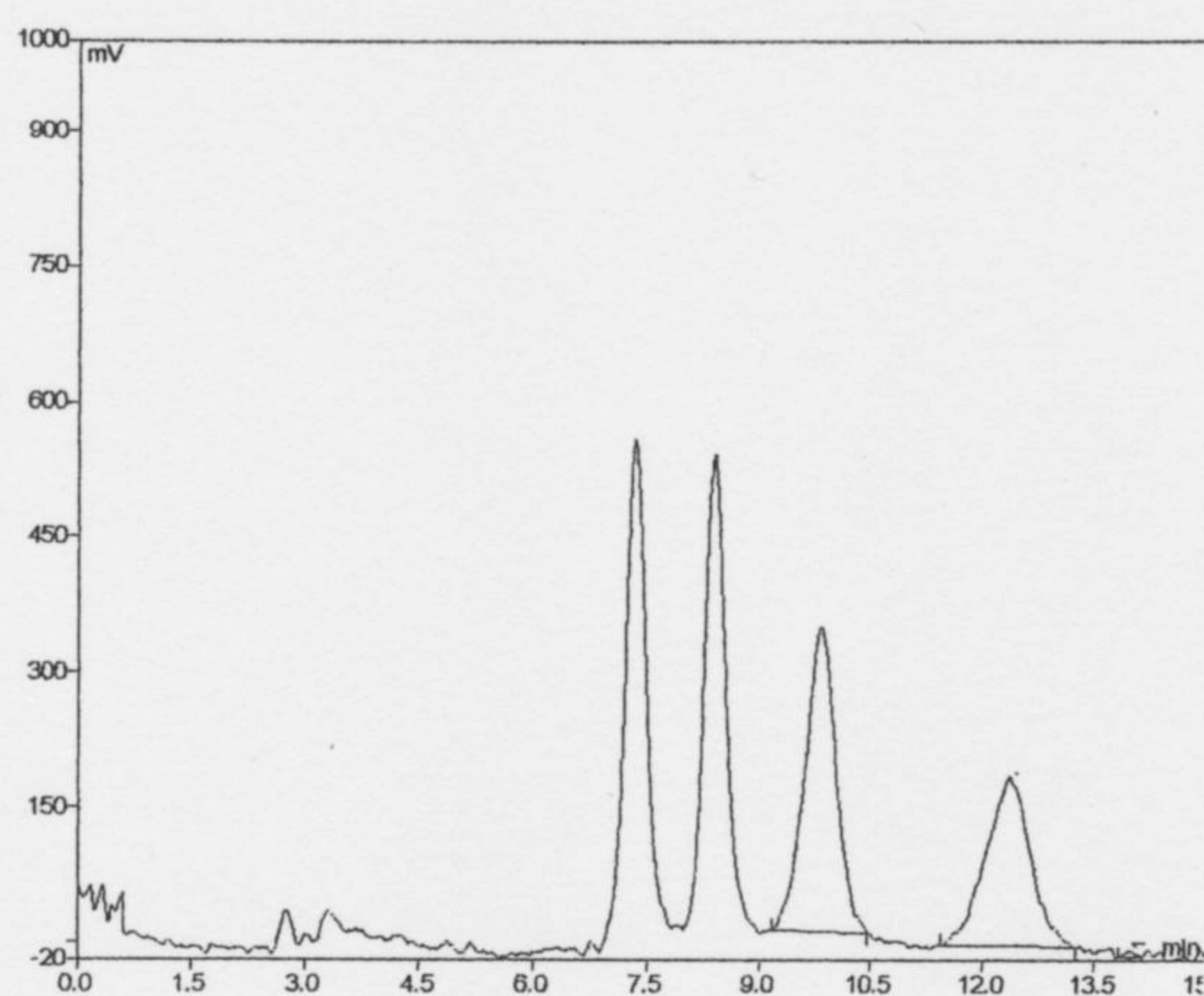


Рис. 1. Анализ стандартной смеси тиамина и его фосфорных эфиров методом ион-парной обращенно-фазной ВЭЖХ: 1 – ТМФ; 2 – Т; 3 – ТДФ; 4 – ТТФ

Среднее время удерживания в колонке (R_t) для ТМФ, Т, ТДФ и ТТФ составляло 7.2, 7.8, 9.7 и 12.4 мин соответственно ($n = 29$). Значения R_t могли несколько варьировать в зависимости от температуры окружающей среды и, в особенности, от концентрации тетрагидрофурана в подвижной фазе, поэтому разделение стандартов осуществляли для каждой серии экспериментов.

ТТФ обнаружен во всех исследованных объектах (рис. 2, таблица).

Т а б л и ц а. Содержание тиамина и тиаминфосфатов в биологических объектах (нмоль · г⁻¹ ткани).

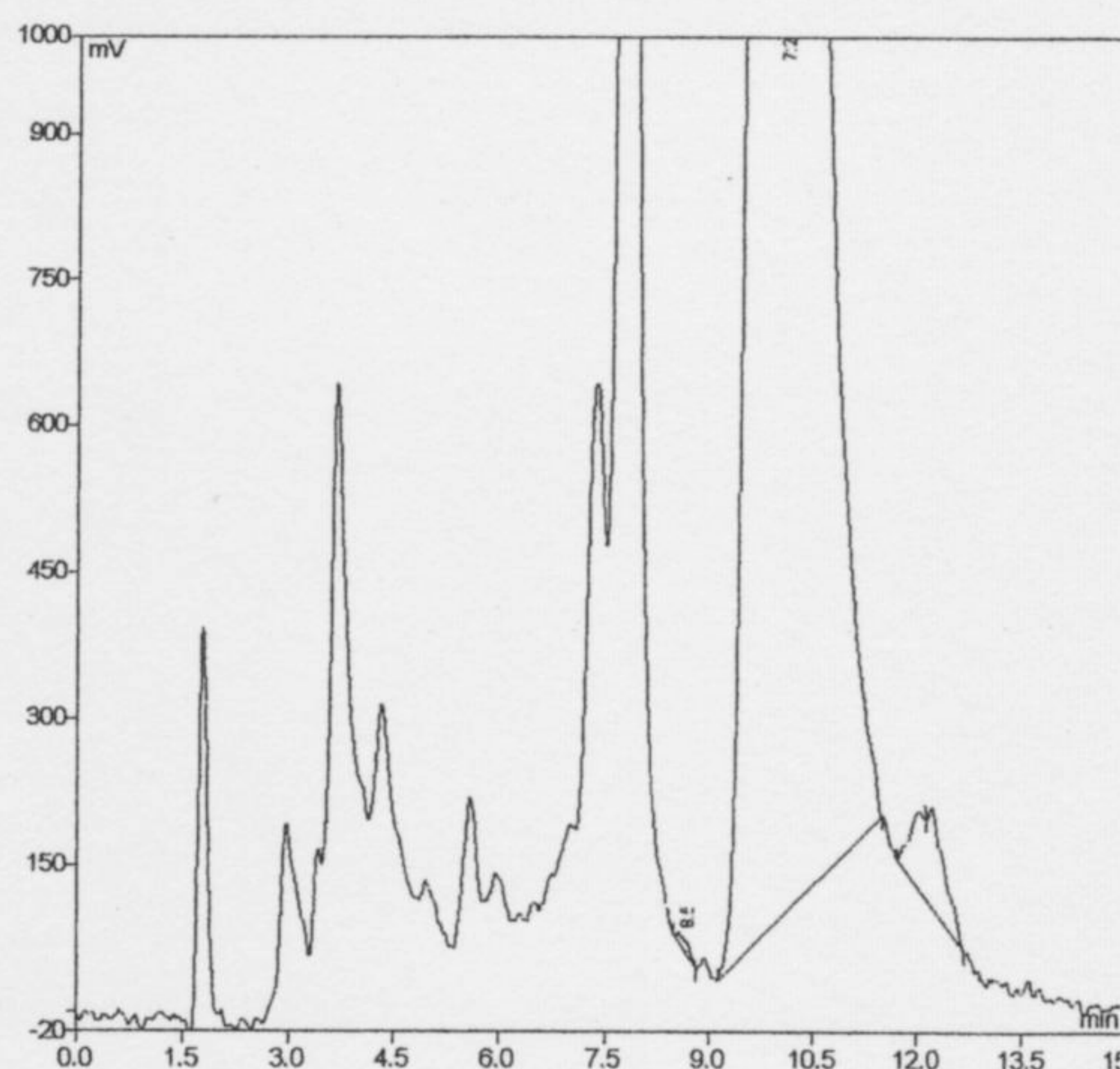
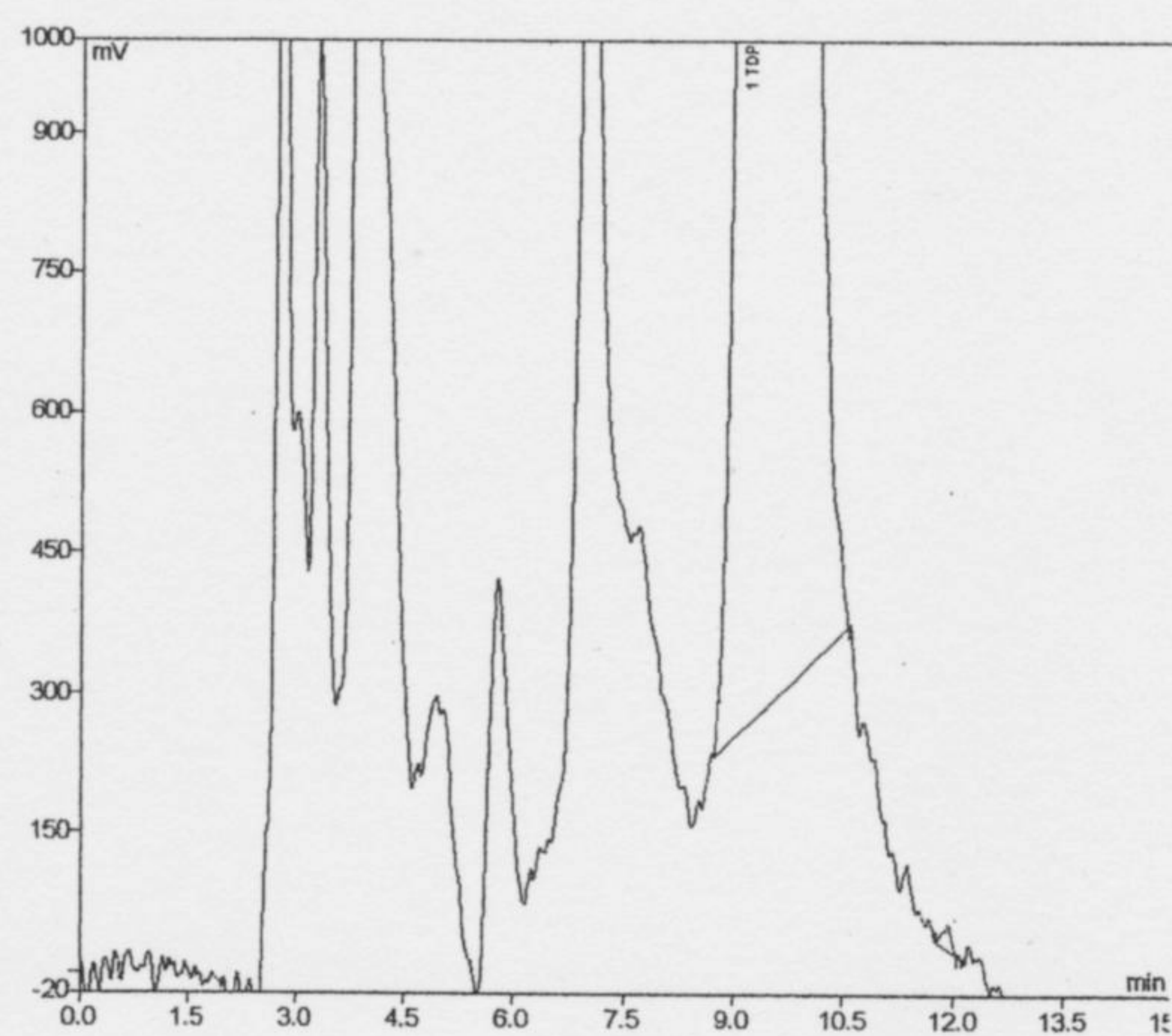
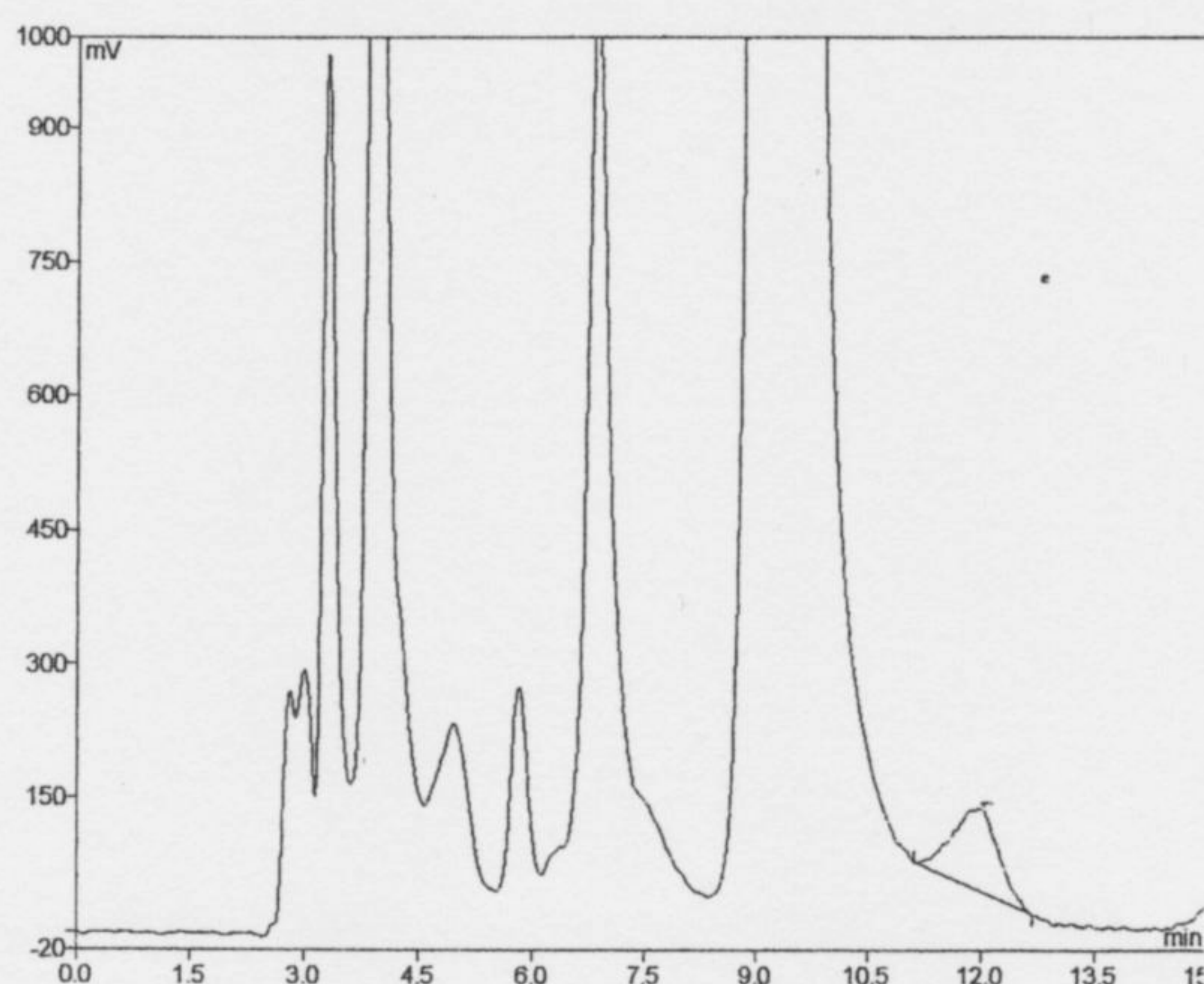
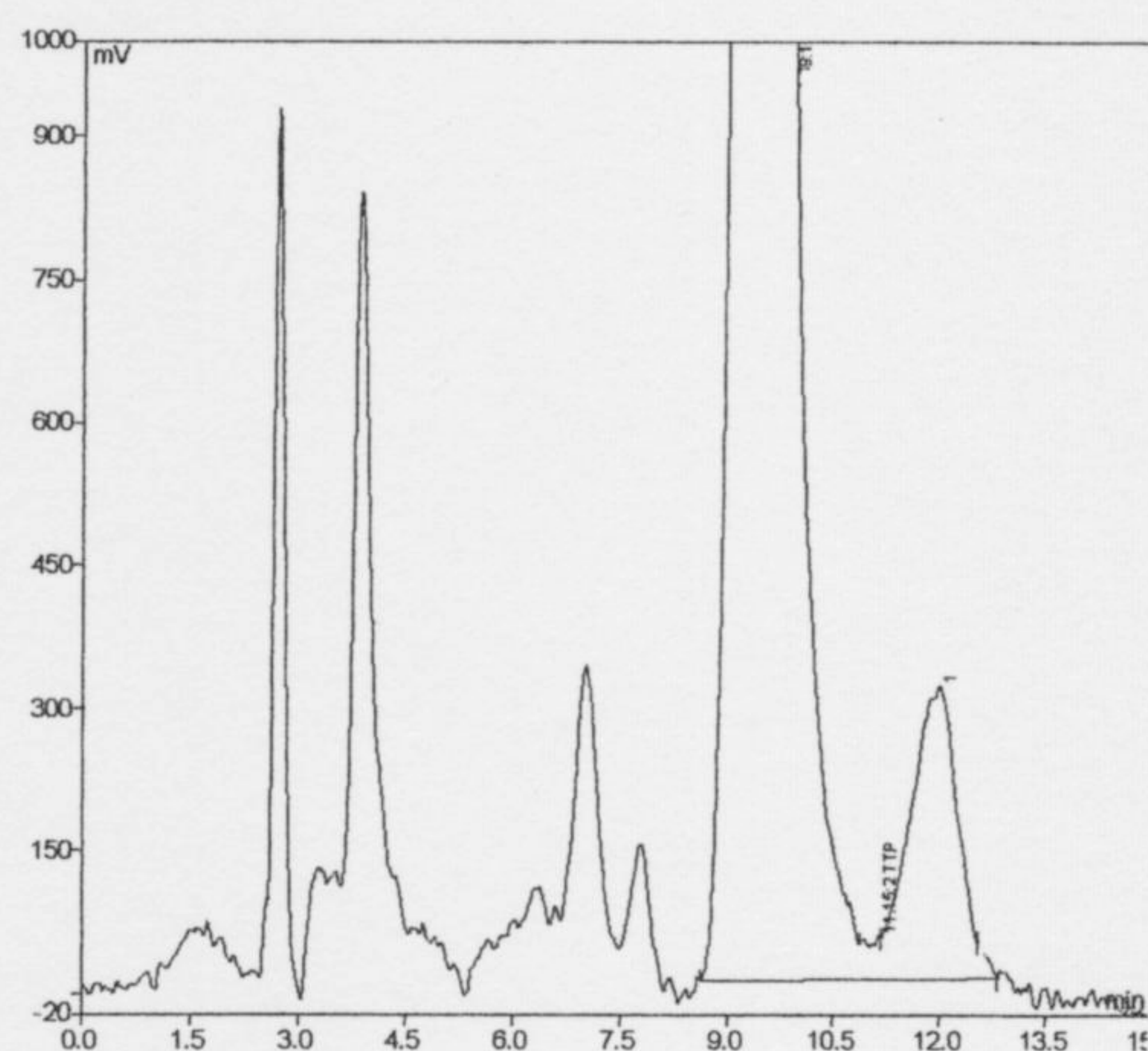
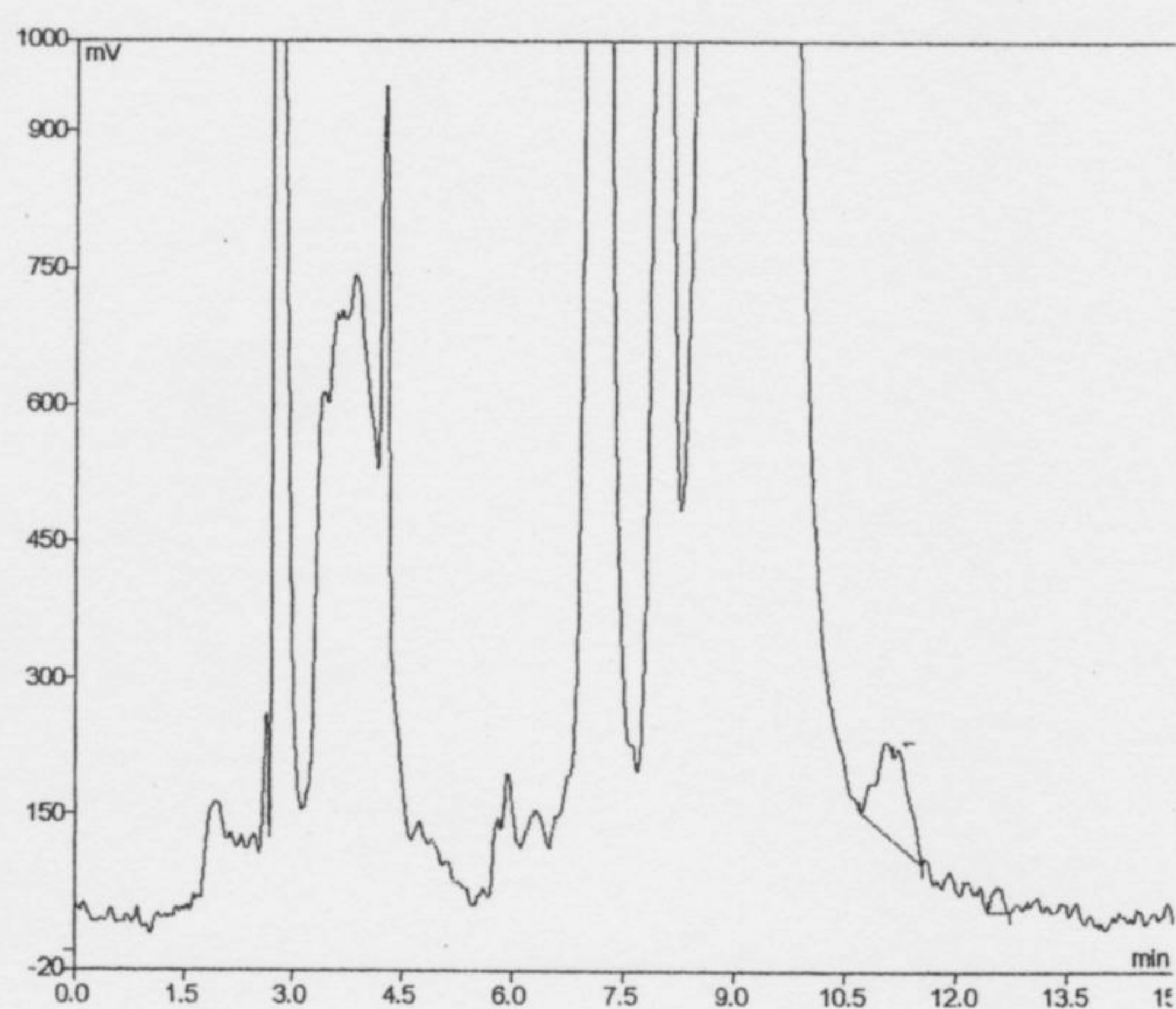
Исследуемый объект	Общий Т	Т	ТМФ	ТДФ	ТТФ
<u>Мышь</u>					
Мозг	10.47 ± 1.38	0.44 ± 0.16(4.2)	2.18 ± 0.29(20.8)	7.84 ± 1.65 (74.9)	0.010 ± 0.003 (0.1)
Печень	32.71 ± 1.89	2.19 ± 0.46(6.7)	17.24 ± 1.18(52.7)	13.14 ± 1.35 (40.2)	0.14 ± 0.027 (0.4)
Мышца	7.36 ± 0,65	0.16 ± 0.02(2.2)	0.49 ± 0.05(6.7)	6.68 ± 0.67 (90.7)	0.026 ± 0.006 (0.4)
<u>Перепелка</u>					
Мозг	7.43 ± 0,15	0.08 ± 0.01(1.1)	0.20 ± 0.02(2.7)	6.81 ± 0.18 (91.7)	0.335 ± 0.012 (4.5)
Сердце	17.17 ± 0,42	0.05 ± 0.01(0.3)	0.23 ± 0.03(1.3)	16.85 ± 0.42 (98.1)	0.037 ± 0.005 (0.2)
Мышца	18.38 ± 0.21	Нет	1.30 ± 0.03(7.1)	16.74 ± 0.04 (91.1)	0.341 ± 0.022 (1.9)
Кишечная палочка	153.85 ± 1,65	0.94 ± 0.05(0.6)	9.08 ± 0.14(5.9)	141.93 ± 1.53 (92.3)	1.887 ± 0.210 (1.2)
Пивные дрожжи	22.03 ± 1,67	1.65 ± 0,10(7.5)	0.55 ± 0.03(2.5)	19.59 ± 1.55 (88.9)	0.243 ± 0.006 (1.1)
Рядовка	1.36 ± 0.03	0.16 ± 0.01(11.8)	0.09 ± 0.01(6.6)	1.09 ± 0.02 (80.1)	0.025 ± 0.001 (1.8)
Листья гулявника	1.19 ± 0.04	0.13 ± 0.02(10.9)	0.05 ± 0.01(4.2)	0.85 ± 0.03 (71.4)	0.082 ± 0.002 (6.9)
Проростки фасоли	4.71 ± 0.24	2.76 ± 0.13(58.6)	0.13 ± 0.01(2.8)	1.821 ± 0.106 (38.7)	0.02 ± 0.01 (0.4)

(В скобках в процентах по отношению к общему тиамину)

В 1 г влажной ткани мозга, мышцы (рис. 2 А) и печени мыши количество трифосфата составляло 0.01 ± 0.003 , 0.026 ± 0.006 и 0.14 ± 0.03 нмоль, соответственно. Полученные значения несколько ниже, но в целом хорошо согласуются с литературными данными для органов крысы и морской свинки [2, 5, 8, 9, 22]. Необходимо, однако, отметить, что результаты, приводимые разными авторами для тканей крысы, различаются в 3–5 раз, несмотря на то, что во всех цитированных работах использовался метод ВЭЖХ. Как видно из таблицы, содержание ТТФ в мышцах и головном мозге (рис. 2 Б) перепелки в 13–33 раза выше, чем в тканях мыши, и в 2–10 раз превышает опубликованные в литературе данные для соответствующих органов крысы и морской свинки [2, 5, 8, 9, 22]. Таким образом, мышцы и мозг перепелки характеризуются относительно высоким содержанием ТТФ по сравнению с тканями мелких грызунов. Обращает на себя внимание широкая вариабельность концентраций ТТФ в тканях одного и того же вида организмов. Так, в экстрактах сердца перепелки ТТФ в 9 раз меньше, чем в мышцах и мозге, тогда как для печени мыши наблюдается противоположная картина. В данный момент, когда биологическая функция ТТФ неизвестна, остается лишь догадываться о причинах столь заметных межвидовых и межорганных различий. Можно полагать, что немаловажным, если не главным, фактором, определяющим и регулирующим концентрацию ТТФ в клетках животных, выступает активность растворимых фосфатаз. Так, в экстракте из мышечной ткани свиньи регистрируется очень низкая активность специфичной ТТФазы (КФ 3.6.1.28), а в мышце цыпленка нам вообще не удалось выявить этот фермент [13]; практически полностью лишена ТТФазной активности и цитозольная фракция клеток электрического органа *E. electricus* [2]. Выше упоминалось, что именно эти объекты относятся к числу наиболее богатых источников ТТФ [2, 5, 14], и, по крайней мере, здесь очевидна реципрокная взаимосвязь между содержанием ТТФ и активностью ферментов его гидролиза.

При хроматографии экстракта из *E. coli* элюировался пик со временем удерживания, соответствовавшим ТТФ (рис 2 В). Для его окончательной идентификации мы использовали критерий, предложенный Iwata с соавт. [9], которые наблюдали исчезновение флуоресцирующего пика после обработки экстрактов из тканей крысы специфичной ТТФазой, что и послужило

неоспоримым доказательством наличия ГТФ в клетках млекопитающих. В нашем случае 10-минутная инкубация экстракта из *E. coli* при 37 °С в смеси, содержащей 50 мМ бис-трис-пропан, рН 8.9, 5 мМ MgCl₂ и препарат ГТФазы из мозга телянка, также приводила к исчезновению анализируемого пика (рис. 2 Г).



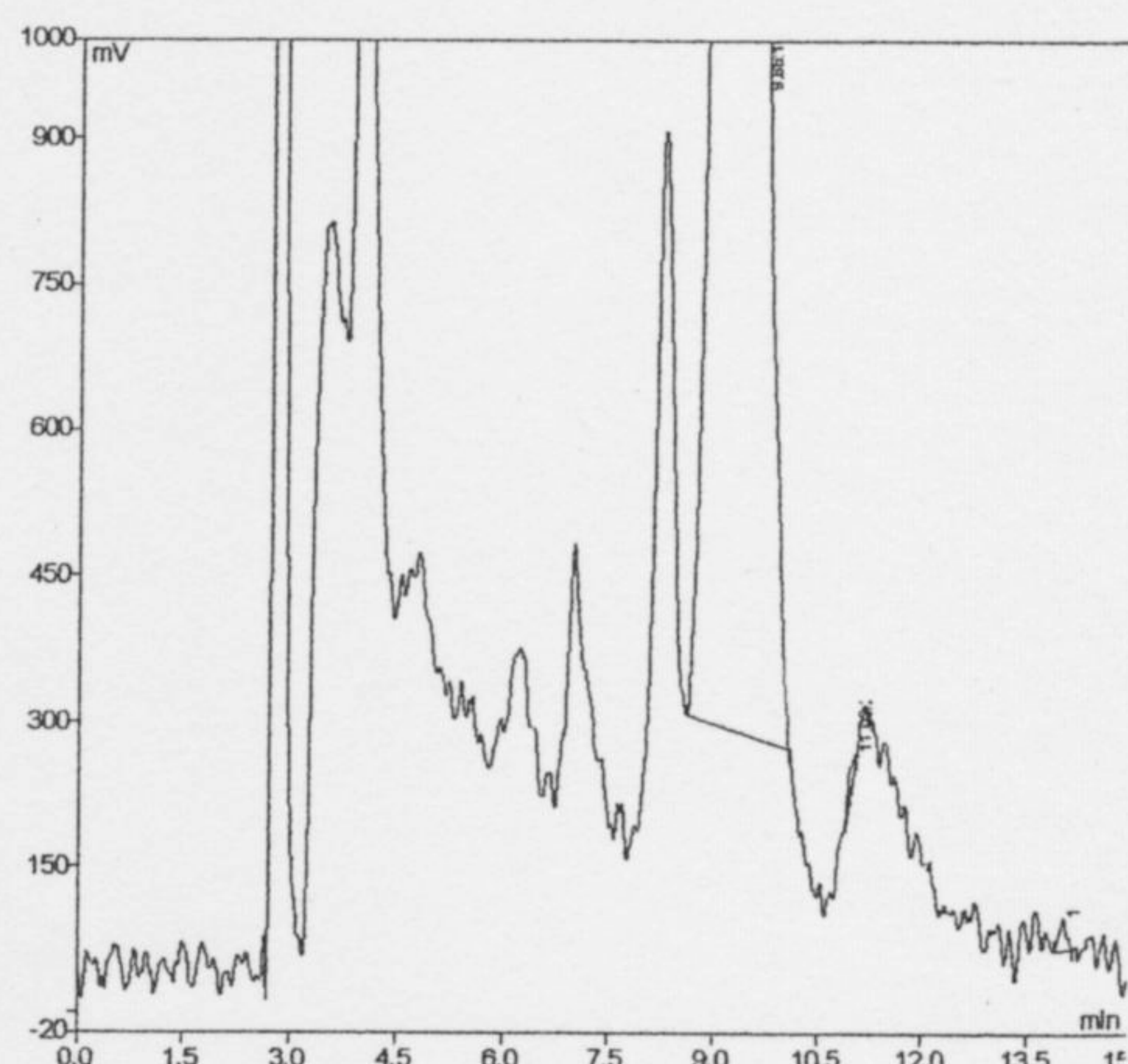
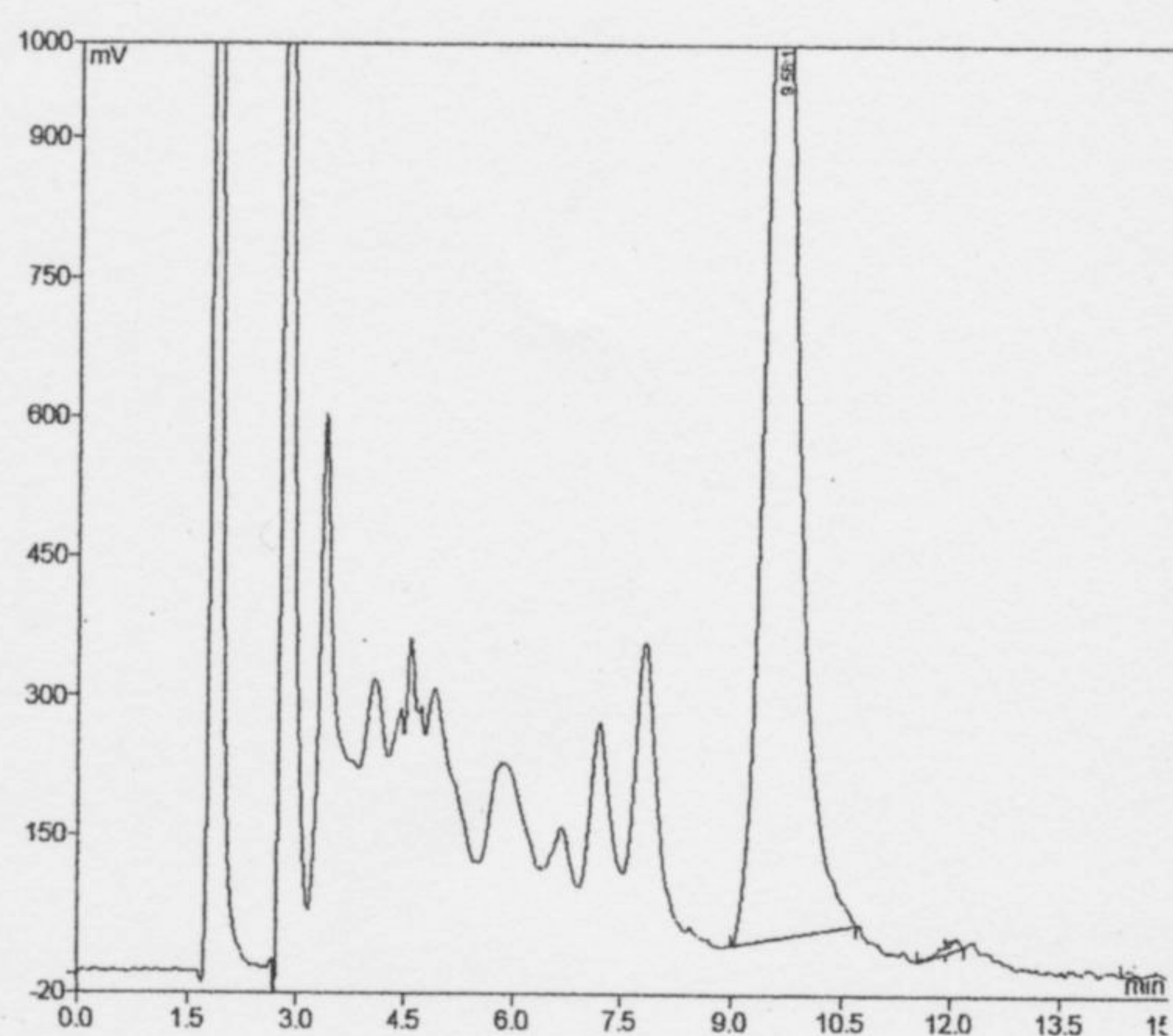


Рис. 2. Определение тиамина и его фосфорных эфиров в экстрактах из биологических объектов: А – скелетная мышца мшии; Б – головной мозг перепелки; В, Г – экстракт из *E. coli* до и после обработки ТТФазой; Д – дрожжи; Е – плодовое тело рядовки; Ж – листья гулявника; 1 – пик ТТФ

Это позволяет с уверенностью говорить, что в данном пике на самом деле локализован ТТФ. Присутствие ТТФ у прокариот, как уже отмечалось, было продемонстрировано в 1961 г. Rossi-Fanelli с соавт. [20] в клетках *Mycobacterium lacticola* с помощью ионообменной хроматографии. Позднее Nishimune & Hayashi [15] показали, что в культуре *E. coli* (штамм W 1485) содержание ТТФ составляет $3-7 \text{ нмоль} \cdot \text{г}^{-1}$ клеток. Аутентичность пика ТТФ, наблюдаемого при разделении бактериального экстракта обращенно-фазной ВЭЖХ с преколонной дериватизацией, была подтверждена на основании времени удерживания, спектров возбуждения и эмиссии и исчезновения пика в результате щелочного гидролиза образца перед добавлением окислителя. Практически такие же количества ТТФ были обнаружены в штамме КА30 *Bacillus aneurinoliticus*. Следует отметить, что концентрация Т-фосфатов в *E. coli* зависела от нескольких факторов, среди которых наиболее существенную роль играли состав питательной среды и фаза роста [15]. Так, при культивировании на минимальной синтетической среде, пик ТТФ не детектировался, тогда как добавление 1 мМ Т приводило к 5–10-кратному возрастанию количества ТТФ в клетках поздней экспоненциальной фазы по сравнению с культурой, выращенной на среде с 0.1%-ным дрожжевым экстрактом. Принимая во внимание это обстоятельство, можно сказать, что полученные нами результаты хорошо согласуются с данными литературы.

Как и в случае *E. coli*, при хроматографии экстрактов из грибов выявлялись пики, соответствовавшие по подвижности аутентичному ТТФ (рис. 2 Д, Е). С целью идентификации дрожжевого пика 1 мл ТХУ-экстракта наносили на колонку ($0.9 \times 3.5 \text{ см}$) с ионообменной смолой AG 50W-X8, уравновешенную 5 объемами воды, pH 4.5. Элюцию осуществляли 9 мл воды, pH 4.5, собирая фракции по 1 мл. В данных условиях ТТФ вымывался из колонки, тогда как Т, ТМФ и ТДФ оставались связанными с носителем. Затем элюат анализировали ВЭЖХ и одну из фракций тестировали в реакции с ТТФазой из мозга телят, как описано выше. Площадь пика при этом уменьшалась с 258 мВ · мин в контрольной пробе без фермента до 56 мВ · мин в опытной пробе, что свидетельствует о присутствии ТТФ в анализируемом пике. Таким образом, подтверждаются результаты ранее опубликованных работ, предполагавшие наличие ТТФ в дрожжах [11, 26]. Гораздо более бедным по общему содержанию Т и его фосфорных эфиров оказалось плодовое тело рядовки, где соответствующие показатели были в 6–18 раз ниже по сравнению с дрожжами. Столь существенные различия между представителями двух родов грибов в первую очередь, вероятно, связаны с интенсивностью и особенностями энергетического обмена у данных организмов и, как следствие, содержанием ТДФ-зависимых ферментов. Известно, что в дрожжах особенно высока концентрация пируватдекарбоксилазы, которая обеспечивает их способность к спиртовому брожению.

В растительном материале обнаружены относительно небольшие количества производных Т как по сравнению с дрожжами, так и с тканями животных (таблица). При этом содержание ТТФ в листьях гулявника (рис. 2 Ж) было заметно выше, чем в проростках фасоли, где детектируются лишь следовые количества данного вещества (не показано). Последние отличались самой высокой из всех исследованных организмов концентрацией и процентным отношением нефосфорилированного Т, что, по-видимому, может объясняться исключительной насыщенностью семян растений Т-связывающими белками. Биологическая роль таких белков, как полагают, состоит в сохранении витамина В₁ для процесса прорастания [23]. Необходимо также отметить, что эксперименты с листьями проводились через 1-2 часа после срезания растения.

Все полученные нами данные о количественном содержании Т-фосфатов в биологических объектах суммированы в таблице.

Более 30 лет назад Соопер с соавт. [4], основываясь на том, что В₁-авитаминоз у человека и экспериментальных животных особенно ярко проявляется в нарушении нервной деятельности, выдвинули гипотезу о специфической функции ТТФ в нервной системе. Эта гипотеза обсуждается в научной литературе и в настоящее время [6], хотя никаких убедительных экспериментальных данных, подтверждающих ее справедливость, до сих пор не получено. Более того, доказательство факта широкого распространения ТТФ у млекопитающих [9] должно было бы скорее свидетельствовать об обратном – не об уникальности для какой-либо ткани, а об общности функции ТТФ в клетках различной специализации. Как показывают результаты настоящей работы, ТТФ синтезируется не только в животных клетках, но и в клетках других типов организмов – бактерий, грибов и растений. В соответствии с широко используемой классификацией, предложенной в 1959 г. Whittaker [24], все многообразие форм жизни на Земле на высшем таксономическом уровне делится на пять царств: монеры, протисты, грибы, животные и растения. В современной систематике, однако, существует тенденция разделять прокариот на два отдельных царства – эубактерии и архебактерии, – поскольку последние филогенетически столь же далеки от истинных бактерий, как и от эукариотических организмов, о чем свидетельствуют результаты анализа белковых и нуклеотидных последовательностей [25]. К основным “макроскопическим” признакам, которые используются для обобщенной характеристики различных царств, и, естественно, в той или иной степени отражают дивергенцию в организации на молекулярном уровне, обычно относятся тип клеток (про- или эукариотический) и их количество (одноклеточное или многоклеточное строение), способ питания, подвижность, наличие клеточной стенки и способ размножения [1, 18]. Рассматриваемые в совокупности, эти признаки позволяют классифицировать любой из известных организмов в пределах принятой таксономии. В настоящей работе не анализировались представители всех шести царств жизни, поскольку мы не располагали объектами для исследований среди архебактерий и простейших. Тем не менее полученные данные позволяют сделать вывод о том, что наличие ТТФ в биологических объектах не связано ни с типом питания, ни с особенностями клеточной организации, так же как и ни с каким-либо другим из перечисленных выше признаков, т. е. способность к биосинтезу ТТФ не является атрибутом определенной группы организмов или специализированной ткани. Иными словами ТТФ представляет собой филогенетически древнюю молекулу. Такое заключение, на наш взгляд, отражает фундаментальную, пока еще непознанную роль, которую играет ТТФ в жизнедеятельности клетки как элементарной структурно-функциональной единицы живой материи.

Литература

7. Audesirk T., Audesirk G. // *Life on Earth*. Upper Saddle River: Prentice-Hall, 1997. P. 370–380.
8. Bettendorff L., Michel – Cahay C., Grandfils C., De Rycker C., Schoffeniels E. // *J. Neurochem.* 1987. Vol. 49. P. 495–502.
9. Bettendorff L., Peeters M., Jouan C., Wins P., Schoffeniels E. // *Anal. Biochem.* 1991. Vol. 198. P. 52–59.
10. Cooper J. R., Itokawa Y., Pincus J. H. // *Science*. 1969. Vol. 164. P. 74–75.
11. Egi Y., Koyama S., Shikata H., Yamada K., Kawasaki T. // *Biochem. Int.* 1986. Vol. 12. P. 385–390.
12. Gibson G. E., Zhang H. // *Neurochem. Int.* 2002. Vol. 40. P. 493–504.

7. Greiling H., Kiesow L. // *Z. Naturforsch.* 1958. B. 13b. S. 251–252.
8. Ishii K., Sarai K., Sanemori H., Kawasaki T. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1979. Vol. 25. P. 517–523.
9. Iwata H., Matsuda T., Tonomura H. // *J. Chromatogr.* 1988. Vol. 450. P. 317–323.
10. Kawasaki T., Sanemori H. // *Modern chromatographic analysis of the vitamins.* Marcel Dekker, Inc. 1985. P. 385–411.
11. Kiessling K.-H. // *Nature.* 1953. Vol. 172. P. 1187–1188.
12. Koike H., Wada T., Minakami H. // *J. Biochem.* 1967. Vol. 62. P. 494–494.
13. Makarchikov A. F., Wins P., Janssen E., Wieringa B., Grisar T., Bettendorff L. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2002. Vol. 1592. P. 117–121.
14. Miyoshi K., Egi Y., Shioda T., Kawasaki T. // *J. Biochem.* 1990. Vol. 108. P. 267–270.
15. Nishimune T., Hayashi R. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1987. Vol. 33. P. 113–127.
16. Parkhomenko J. M., Rybina A. A., Khalmuradov A. G. // *Methods Enzymol.* 1979. Vol. 62. P. 59–63.
17. Patrini C., Rindi G. // *Int. J. Vit. Nutr. Res.* 1980. Vol. 50. P. 10–18.
18. Raven P. H., Johnson G. B. // *Understanding Biology.* Dubuque: Wm. C. Brown. Publishers, 1995. P. 476–490.
19. Rindi G., Giuseppe L. // *Biochem J.* 1961. Vol. 78. P. 602–606.
20. Rossi – Fanelli A., Ipata P. L., Fasella P. // *Biochim. Biophys. Res. Commun* 1961. Vol. 4. P. 23–27.
21. Rossi – Fanelli A., Siliprandi N., Fasella P. // *Science.* 1952. Vol. 116. P. 711–713.
22. Sanemori H., Ueki H., Kawasaki T. // *Anal. Biochem.* 1980. Vol. 107. P. 451–455.
23. Watanabe K., Shimizu M., Adachi T., Yoshida T., Mitsunaga T. // *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 1998. Vol. 44. P. 323–328.
24. Whittaker R. H. // *Q. Rev. Biol.* 1959. Vol. 34. P. 210–226.
25. Woese C. R., Kandler O., Wheelis M. L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. Vol. 87. P. 4576–4579.
26. Yusa T. // *Plant Cell Physiol.* 1961. Vol. 2. P. 471–474.

¹A.F. MAKARCHIKOV, ²L. BETTENDORFF

A STUDY OF THE QUANTITATIVE CONTENT OF THIAMINE TRIPHOSPHATE IN DIFFERENT BIOLOGICAL OBJECTS BY HIGH-PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY

¹*Institute of Biochemistry, National Academy of Sciences, Grodno, Belarus,* ²*University of Liege, Belgium*

Summary

A comparative study of thiamine and its phosphate esters content in biological objects by high-performance liquid chromatography method revealed thiamine triphosphate (ThTP) to be present in various groups of organisms – from bacteria to mammals. The ThTP occurrence is not restricted to a particular living form viewing the cell organization or nutrition mode, as well as any other characters that are used commonly to classify the diversity of life on Earth. Unlike an early concept ascribing to ThTP a specific function in excitable tissues, our results favor the hypothesis that ThTP is an ancient compound which plays a fundamental, not yet recognized, role in living cells.