

Detekcija nukleozida i purinskih baza u različitim telesnim tečnostima ovce metodom tankoslojne hromatografije

Ispitivanje sadržaja nukleozida i purinskih baza u telesnim tečnostima ovce – cerebrospinalnoj tečnosti, očnoj vodici i plazmi – rađeno je metodom dvodimenzionalne tankoslojne hromatografije. Identifikacija detektovanih nukleozida i nukleobaza na hromatogramima telesnih tečnosti vršena je pomoću ultra-violetne svetlosti poređenjem sa hromatogramom standardnog rastvora. Standardni rastvor je sadržao sve ispitivane molekule – nukleozide adenozin i inozin i baze adenin, hipoksantin i ksantin. Dobijeni rezultati hromatografije pokazali su da se u različitim telesnim tečnostima nalaze različiti nukleozidi i purinske baze: adenin i adenozin u plazmi, adenin u likvoru, i ksantin u očnoj vodici.

Uvod

Sve žive ćelije sadrže purinske i pirimidinske baze, nukleozide i nukleotide (Cory 1993). Purinske i pirimidinske baze su prekursori u sintezi nukleotida, a istovremeno nukleozidi i baze su produkti metaboličke degradacije nukleotida (Voet 1995). Količina slobodnih baza i nukleozida u ćeliji varira i zavisi od metaboličkog statusa ćelije. Prevažno je određena (ibid.):

- brzinom degradacije nukleotida u nukleozide i baze
- brzinom izbacivanja ovako stvorenih molekula iz ćelije u ekstracelijski prostor
- brzinom ponovne inkorporacije ovih molekula u nukleotide (tzv. spasonosni putevi sinteze nukleotida).

Žive ćelije imaju veoma malu koncentraciju slobodnih nukleozida i baza, jer se oni veoma brzo ugrađuju u nukleotide (Cory 1993). Mozak je delimično deficitaran u kapacitetima za *de novo* sintezu nukleotida, te obično koristi purinske baze adenin i hipoksantin za ovu sintezu adeninskih nukleotida (Berlin 1975). S obzirom da je mozak odvojen od ostatka organizma sistemom barijera koja onemogućava slobodnu razmenu između

*Jasna Grmuša
(1981), Beograd,
Dušana Petrovića
Šaneta 7, učenica 3.
razreda XIV
beogradske gimnazije*

*MENTOR:
doc. dr Zoran Redžić,
Institut za biohemiju
Medicinskog fakulteta
u Beogradu*

mozga i ostatka organizma, može se pretpostaviti da se baze i nukleozidi u mozgu nalaze u različitim koncentracijama u odnosu na druga tkiva. Budući da mozak nema limfni sistem produkti metabolizma izlučuju se u cerebrospinalnu tečnost (likvor). Telesna tečnost koja je po mnogo čemu analogna likvoru je očna vodica – ona takođe skuplja produkte metabolizma iz tkiva koje je od ostatka organizma takđe odvojeno sistemom barijera. Zato bi analiza sadržaja purina i pirimidina u ovim telesnim tečnostima doprinela da se definiše put metaboličke degradacije nukleotida.

Detekcija purinskih i pirimidinskih baza i njihovih nukleozida moguća je upotrebom više analitičkih tehnika. Jedna od najčešće primenjivanih, posebno ukoliko se želi samo kvalitativna analiza, je tankoslojna hromatografija. Posebno je za ovu svrhu osetljiva tankoslojna hromatografija na plastičnim pločama PEI koje su presvučene silikatnim gelom. Hromatografija samo u jednoj dimenziji nije u mogućnosti da potpuno razdvoji sve purine, ali se to može postići dvodimenzionalnom hromatografijom. Postoje i osetljivije tehnike za detekciju prekursora nukleinskih kiselina, kao što su HPLC i kapilarna elektroforeza (Redžić 1998), ali su one mnogo komplikovanije i skuplje i primenjuju se samo za kvantitativnu analizu.

Cilj rada je da se kvalitativno odredi sadržaj nukleozida i purinskih baza u likvoru, očnoj vodici i plazmi ovce i to metodom hromatografije na tankom sloju poređenjem sa hromatogramom standardnog rastvora.

Materijal i metode

U eksperimentu su korišćeni uzorci plazme, likvora i očne vodice anestetizirane ovce, koji su obezbeđeni na Institutu za biohemiju Medicinskog fakulteta u Beogradu. Analizirano je po tri uzorka od svake telesne tečnosti. Kvalitativna analiza nukleozida i nukleobaza rađena je metodom dvodimenzionalne tankoslojne hromatografije na tzv. PEI pločama. Ploče su aktivirane potapanjem u 10% rastvor natrijum hlorida, a potom ispirane u destilovanoj vodi, dva puta po 10 minuta. Na ploču je naneto 20 μ L uzorka u mikropipetama, uz stalno sušenje, čime je postignuto da se veća količina uzorka nanese na manju površinu. Ploče su zatim stavljane u kadicu za hromatografiju u kojoj se nalazio rastvarač 1 – rastvor amonijum hlorida koncentracije 1 mol/L i acetonitrila u odnosu 9:1 (prva dimenzija). Posle završene prve hromatografije ploče su sušene i stavljane u kadicu sa rastvaračem 2, okrenute za 90° u odnosu na prethodnu hromatografiju (dimenzija 2). Rastvarač 2 je sadržao destilovanu vodu i acetonitril u odnosu 9:1, uz dodatak 1 mL glacijalne sirćetne kiseline na 100 mL rastvora. Posle završene druge dimenzije ploče su ponovo sušene. Obzirom da su baze i nukleozidi vidljivi samo pod UV svetlošću, njihove mrlje na pločama detektovane su UV lampom, a identifikacija vršena u odnosu na hromato-

gram standardnog rastvora. Standardni rastvor sadržao je nukleozide i baze za koje je pretpostavljeno da će biti detektovane u uzorcima telesnih tečnosti, tj. inozin i adenzin (nukleozidi) i adenin, ksantin i hipoksantin (purinske baze). Hromatogrami su markirani grafitom i skenirani. Potom su na njima identifikovani nukleozidi i purinske baze.

Rezultati

Hromatogram standardnog rastvora prikazan je na slici 1A. Dva nukleozida (adenozin i inozin) i tri purinske baze (adenin hipoksantin i ksantin) rastvorene su u fiziološkom rastvoru. Detekcija je vršena na osnovu ranije urađenih hromatograma pojedinih nukleozida ili baza. Sa leve strane vidi se trag fronta rastvarača 2. Vidi se pet mrlja i svaka odgovara jednom nukleozidu ili bazi iz standardnog rastvora.

Hromatogram plazme prikazan je na slici 1B. Plazma je deproteinisana dodavanjem trihlorsirćetne kiseline i centrifugirana 5 minuta na 3000 obrtaja. Deproteinisan uzorak nanet je na hromatogramsku ploču. Poređenjem sa hromatogramom standardnog rastvora može se zaključiti da su u plazmi detektovani purinska baza adenin i njen nukleozid adenzin.

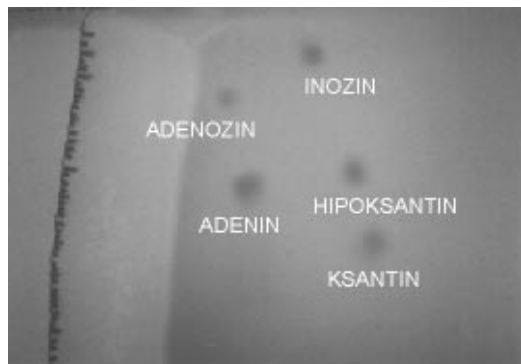
Slika 1.

A. Hromatogram standardnog rastvora. Vidi se pet mrlja, od kojih svaka odgovara jednom nukleozidu ili bazi iz standardnog rastvora. (Sa leve strane se vidi trag fronta rastvarača 2.)

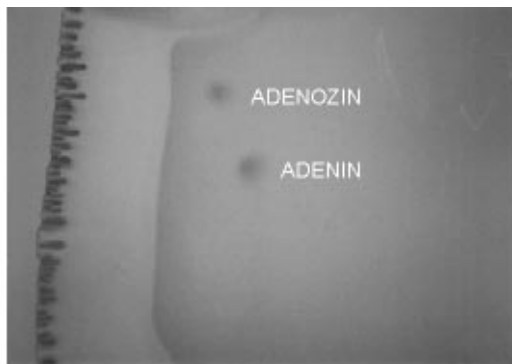
B. Hromatogram deproteinisane plazme. Detektovani su baza adenin i nukleozid adenzin.

C. Hromatogram cerebrospiralne tečnosti. Vidi se jedna mrlja, a poređenjem sa standardom jasno je da se radi o bazi adeninu.

(nastavak na naspravnoj strani)



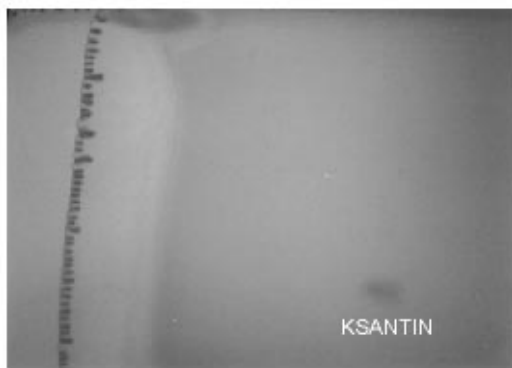
A



B



C



D

Hromatogram cerebrospinalne tečnosti ovce (CST) prikazan je na slici 1C. CST je deproteinisana i uzorak je nanet na ploču za hromatografiju. Poređenjem sa hromatogramom standardnog rastvora dolazi se do zaključka da detektovana mrlja pripada purinskoj bazi adeninu.

Hromatogram očne vodice prikazan je na slici 1D. Detektovana je jedna mrlja, a poređenjem sa hromatogramom standarda zaključili smo da se radi o purinskoj bazi ksantinu.

Diskusija i zaključak

Količina slobodnih nukleozida i nukleobaza u telesnim tečnostima je mala. Stoga je neophodno koristiti metodu koja omogućava detekciju tako malih koncentracija supstanci. Osnovna prednost upotrebe PEI ploča za razdvajanje molekula u odnosu na standardne staklene ploče za tankoslojnu hromatografiju je upravo mogućnost detekcije male količine nukleozida i baza.

Na osnovu poređenja mrlja nukleozida i baza detektovanih hromatografijom standardnog rastvora i različitih telesnih tečnosti ovce pokazano je da se u plazmi, likvoru i očnoj vodici nalaze različiti nukleozidi i purinske baze. S obzirom da su cerebrospinalna tečnost i očna vodica metabolički odvođeni mozga i oka može se pretpostaviti da su baze detektovane u njima krajnji produkti metaboličke degradacije nukleotida u ovim organima. U likvoru je utvrđeno prisustvo purinske baze adenina, a u očnoj vodici purinske baze ksantina, što dovodi do zaključka da su te baze krajnji produkti razgradnje nukleotida u mozgu i oku. Ni u jednoj od ovih telesnih tečnosti nije detektovan urat, koji je krajnji produkt metaboličke degradacije purina u većini tkiva. Iz ovog se može zaključiti da se purini u nervnom tkivu i oku razgrađuju do adenina, odnosno ksantina, a ne do urata (Redžić, usmeno saopštenje). U plazmi su detektovani adenzin i adenin.

Poznato je da je krajnji produkt metaboličke degradacije nukleotida urat. Za njega je karakteristično da i pri malim koncentracijama taloži u vodenim rastvorima. Imajući u vidu da su mozak i oko odvojeni od ostatka organizma sistemom barijera taloženje urata u likvoru i očnoj vodici vremenom bi značajno oštetilo ova tkiva. Može se pretpostaviti da se krajnji produkti razgradnje nukleotida mozga (adenin) i oka (ksantin) transportuju u krv. Nije jasno da li se ovi molekuli metabolišu do urata u drugim tkivima (pre svega u jetri). Ovakav zaključak zahtevao bi dodatno istraživanje sadržaja metabolita purina u telesnim tečnostima određenog organa. Moguće objašnjenje činjenice da se purini ne metabolišu do urata je ta što se zahvaljujući tome ostvaruje zaštita cerebrospinalne tečnosti i očne vodice od taloženja kristala urata, što omogućuje normalno funkcionisanje mozga i oka.

*Slika 1
(nastavak sa
naspramne strane).*

*D. Hromatogram
očne vodice.
Detektovana je jedna
mrlja. Poređenjem sa
hromatogramom
standarda može se
zaključiti da ona
pripada purinskoj
bazi ksantinu.*

*Figure 1
(opposite page).*

*A. Chromatogram of
standard solution.
Five spots were
detected and each
points to one
nucleoside or base
from standard
solution.*

*B. Chromatogram of
plasma. Base adenine
and nucleoside
adenosine were
detected.*

*C. Chromatogram of
cerebrospinal fluid.
One spot was
detected and
comparing with
standard solution it
can be assumed that
it is base adenine.*

*D. Chromatogram of
aqueous humour. One
spot was detected
and comparing with
standard solution it
can be assumed that
it is base xanthine.*

Literatura

- Cory J.G. 1993. Purine and pyrimidine nucleotide metabolism. In *Text-book of Biochemistry*, (ed. T.M. Devlin). New York: Wiley, pp. 529-72.
- Berlin R.D., Oliver J.M. 1975. Membrane transport of purine and pyrimidine bases and nucleosides in animal cells. *International Review of Cytology*, **42**: 287-336.
- Belt J.A., Marina N.M., Pheleps D.A., Crawford C.R. 1993. Nucleoside transport in normal and neoplastic cells. *Advances in Enzyme Regulation*, **33**: 235-52.
- Voet D., Voet J.G. 1995. *Biochemistry*. Wiley, pp. 816-21.
- Redžić Z.B., Marković I.D., Vidović V.P., Vranić V.P., Gašić J.G., Duričić B.M., *et al.* 1998. Endogenous nucleosides in the guinea pig eye: analysis of transport and metabolites. *Experimental Eye Research*, **66**: 315-25.

Jasna Grmuša

Detection of nucleosides and purine bases in some body fluids of the sheep using the thin-layer chromatography

The cell contains purine and pyrimidine bases, nucleosides and nucleotides. Purine and pyrimidine bases are precursors in synthesis of nucleotides and they are also the products of nucleotide degradation. In this study, the contents of nucleosides and purine bases were determined in the plasma, cerebrospinal fluid and aqueous humour of the anaesthetised sheep. Aqueous humour and cerebrospinal fluid were chosen as the fluids separated from the rest of organism by a system of barriers. Therefore the difference in their concentrations comparing to other body fluids may presents some specific fate of nucleic acid precursors in those tissues.

Samples of sheep's plasma, cerebrospinal fluid and aqueous humour (n = 3) were provided from anaesthetised sheep at the Institute of Biochemistry, Belgrade School of Medicine.

Two-dimensional thin-layer chromatography method on PEI-plates was used for qualitative analysis of samples. PEI-plates were activated in a solution of NaCl (1 × 10 min in 10% solution + washing in distilled water) and dried. A sample of sheep's plasma, cerebrospinal fluid or aqueous humour (20 µL) had been placed on plate in micro-drops using micro-syringe and a plate was dried. Then plates were placed in chromatography tub 1 with the solvent 1 [NH₄Cl (1 mol/L) : acetonitrile = 9:1]. After the front of liquid solvent reached near the end of the plate, the plate was dried. This was the first dimension of chromatography. After that the plate was placed in chromatography tub 2 with the solvent 2

[water and acetonitrile (9:1) with 1 mL/L of acetic acid] and the second dimension of chromatography performed. As after first, plates were dried after second dimension as well. Nucleobases and nucleosides strongly absorbed UV-light. Therefore they can be easily detected in the UV cabinet. Spots were identified comparing the position on each PEI plate with the positions of spots from standard solution. Standard solution contained adenine, adenosine, inosine, hypoxanthine and xanthine and the conditions for the separation were the same as in other samples. Finally, chromatograms were scanned and printed.

Body fluids contain small concentrations of nucleosides and nucleobases. That is the reason why it is necessary to use method, which can detect small concentrations of substance. PEI-plates can provide detection of small concentrations of nucleosides and bases, which standard glass plates for thin-layer chromatography cannot.

Chromatograms indicate that plasma, cerebrospinal fluid and aqueous humour contain various nucleosides and purine bases. Considering the fact that cerebrospinal fluid and aqueous humour are metabolic drains of brain and eye, it can be assumed that detected bases in this fluids, point to final products of nucleotide degradation in this organs. Purine base adenine was detected in cerebrospinal fluid and base xanthine was detected in aqueous humour. In neither one of this body fluids is detected urate, which is final product of nucleotide degradation of purines for the most tissues. So, it can be assumed that purines in nerve tissue and eye are not degraded to urate, but to adenine and xanthine. Possible explanation of the fact that urate is not the final product of nucleotide degradation in the brain and eye is that this is a protective mechanism against precipitation of urate crystals in the ventricular system of the brain and in the anterior eye chamber. Such a precipitation could seriously damage tissues of the brain and the eye.

Nucleoside adenosine and purine base adenine were detected in sheep's plasma, which probably reflects the most important role of adenilate pool in most of the cells.

