

# A METHOD OF COMPLEX INVESTIGATION OF THE PHYSICAL PROPERTIES OF THE SHORT TUBULAR BONES

*I.G.Savka*

**Abstract.** The proposed method makes it possible to assess the physical properties of the osseous tissue (26 parameters in a complex), whose analysis gives a comprehensive notion about its structural peculiarities that are quite necessary for establishing the mechanisms of bone fractures.

**Key words:** osseous tissue, osteoporosis, mineralization.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

Надійшла до редакції 18.02.2002 року

УДК 577.1

*І.Ф.Мешишен, Н.П.Григор'єва*

## МЕТОД КІЛЬКІСНОГО ВИЗНАЧЕННЯ HS-ГРУП У КРОВІ

Кафедра медичної хімії (зав. – проф. І.Ф.Мешишен)  
Буковинської державної медичної академії

**Резюме.** Адапована для клініки методика спектрофотометричного визначення HS-груп у цільній крові, еритроцитах і плазмі крові. Метод базується на взаємодії вільних HS-груп у крові при рН 8,0 з 5,5'-дитіобіс (2-нітробензойною кислотою) (реактив Еллмана) з утворенням тіонітрофенільного аніона, що має максимум поглинання при 412 нм. Розрахунки проводять за коефіцієнтом молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона.

**Ключові слова:** HS-групи, цільна кров, еритроцити, плазма крові.

**Вступ.** Сульфгідрильні групи (HS-групи) входять до складу багатьох біологічних сполук: білків, пептидів, відновленого глутатіону, цистеїну, ліпоєвої кислоти, гомоцистеїну тощо. Вони важливі для прояву функціональної активності білків: каталітичної, зокрема аденілатциклазної, рецепторної, функціонування мембранних структур, взаємодії із зовнішнім середовищем клітин (ефекти гормонів, токсинів), різноманітних видів активного транспорту, діяльності цитоскелету, поділу клітин [4,5]. Важливим компонентом сполук, що містять вільні HS-групи, є відновлений глутатіон з його різноманітними функціями [2].

Існуючі методи кількісного визначення вільних HS-груп [1] належать до індивідуальних білків і можуть бути використані при роботі з біологічними тканинами тільки після обробки їх детергентами (наприклад, тритоном X-100). Це певною мірою обмежує їх використання в клініці.

Нами розроблено простий і високочутливий спектрофотометричний метод кількісного визначення вільних HS-груп у цільній крові, еритроцитах і плазмі крові, який може бути використаний у клінічних біохімічних лабораторіях.

**Принцип методу.** При взаємодії сполук з вільними HS-групами з 5,5'-дитіобіс (2-нітробензойною) кислотою (реактив Еллмана) при рН 8,0 проходить утворення тіонітрофенільного аніона, вміст якого прямопропорційний кількості HS-груп [6]. Розрахунок концентрації HS-груп проводиться з врахуванням коефіцієнта молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона, який при 412 нм рівний  $1,14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$  [7].

**Матеріали та реактиви.** Цільна кров, плазма або сироватка, еритроцити, тричі відмиті охолодженням 0,9%-ним розчином NaCl; 0,2 М калій-натрій-фосфатний буфер (рН 8,0); реактив Еллмана; 0,04%-ний розчин 5,5'-дитіобіс (2-нітробензойної) кислоти на 0,01 М фосфатному буфері (рН 7,0); 0,1 М розчин NaOH.

**Визначення HS-груп у цільній крові.** У центрифужні пробірки вносять 1,8 мл дистильованої води і 0,2 мл цільної крові, старанно перемішують скляною паличкою і ставлять в киплячу водяну баню на 10 хв. Проби охолоджують і цент-

рифугують (10 хв при 3 тис об/хв). У хімічні пробірки вносять по 0,5 мл центрифугату, 3,3 мл 0,2 М фосфатного буфера рН 8,0, 0,1 мл 0,1 М розчину NaOH і 0,1 мл реактиву Еллмана.

Через 10 хв проби спектрофотометрують при 412 нм проти контролю, в який замість центрифугату вносять 0,5 мл дистильованої води. Одночасно визначають концентрацію гемоглобіну в крові гемоглобінціанідним методом. Вміст HS-груп розраховують, виходячи із коефіцієнта молярної екстинкції тіонітрофенільного аніона ( $1,14 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \times \text{см}^{-1}$ ) і результати виражають в мкмоль/мл цільної крові або на 1 г гемоглобіну.

Розрахунки проводять за формулою:  $X \text{ (мкмоль/мл)} = 7,02 \times D$ ; або

$X \text{ (мкмоль/ г Hb)} = 7,02 \times D : C_{\text{Hb}}$ ,

де  $D$  – оптична густина досліджуваної проби,  $7,02$  – коефіцієнт перерахунку в мкмоль на 1 мл цільної кові,  $C_{\text{Hb}}$  – концентрація гемоглобіну в грамах на 1 мл цільної крові.

**Визначення HS-груп в еритроцитах.** У центрифужні пробірки вноситься 1,9 мл дистильованої води, 0,1 мл еритроцитарної маси (еритроцити тричі відмивають охолодженим фізіологічним розчином натрію хлориду) і старанно перемішують скляною паличкою. Далі проводять такі ж процедури, що із цільною кров'ю. Вміст HS-груп розраховують за формулою:

$X \text{ (мкмоль/мл еритроцитарної маси)} = 14,035 \times D$ ; або

$X \text{ (мкмоль/ г Hb)} = 14,035 \times D : C_{\text{Hb}}$ ,

де  $D$  – оптична густина досліджуваної проби,  $14,035$  – коефіцієнт перерахунку в мкмоль на 1 мл цільної кові,  $C_{\text{Hb}}$  – вміст гемоглобіну в грамах у 1 мл еритроцитарної маси.

**Визначення HS-груп в плазмі (сироватці) крові.** У хімічну пробірку вносять 0,1 мл плазми (сироватки) крові, 0,1 мл 0,1 М розчину NaOH, старанно перемішують скляною паличкою і додають 3,7 мл фосфатного буфера (рН=8,0) та 0,1 мл реактиву Еллмана. Через 10 хв проби спектрофотометрують при 412 нм проти контролю, в який замість плазми крові додають 0,1 мл дистильованої води. Водночас у плазмі крові визначають концентрацію білка. Вміст HS-груп розраховують за формулою:  $X \text{ (мкмоль/мл)} = 3,508 \times D$ ; або

$X \text{ (мкмоль/г білка)} = 3,508 \times D : C_{\text{б}}$ ,

де  $D$  – оптична густина досліджуваної проби,  $3,508$  – коефіцієнт перерахунку в мкмоль на 1 мл плазми (сироватки),  $C_{\text{б}}$  – концентрація білка в грамах на 1 мл плазми (сироватки).

**Результати дослідження та їх обговорення.** За даним методом проведено визначення вмісту сполук з вільними HS-групами в цільній крові, еритроцитарній масі та плазмі. Як впливає з даних таблиці вміст сполук з вільними HS-групами в еритроцитах у 2 рази вищий, ніж у цільній крові. Під час визначення вмісту вільних HS-груп в цільній крові та еритроцитарній масі білки були денатуровані кип'ятінням та осаджені центрифугуванням. Тому вільні HS-групи в досліджуваних пробах представлені низькомолекулярними пептидами тощо [5]. Основним компонентом HS-груп в еритроцитах є відновлений глутатіон, інші небілкові речовини знаходяться в крові в наномолярних концентраціях. Якщо розрахувати вміст HS-груп на грам гемоглобіну, то не спостерігається різниці між цими показниками (число еритроцитів в еритроцитарній масі вдвічі більше, ніж у крові).

Таблиця

**Вміст вільних HS-груп в цільній крові, еритроцитах і плазмі крові донорів ( $M \pm m$ ;  $n=25$ )**

Об'єкт дослідження	Вміст вільних HS-груп	
	мкмоль/мл	Мкмоль/ г Hb
Цільна кров	$1,27 \pm 0,21$	$9,6 \pm 0,44$
Еритроцити	$2,45 \pm 0,32$	$9,8 \pm 0,38$
Плазма крові	$2,13 \pm 0,27$	$28 \pm 0,86^*$

**Примітка.** \* – вміст вільних HS-груп, виражений у мкмоль/г білка

Вміст відновленого глутатіону в плазмі крові людини становить в середньому  $20 \pm 1,2$  нмоль/мл [3]. Отже, визначені нами HS-групи плазми – це, переважно, HS-групи білків. Не виключена можливість утворення сульфгідрильних груп з -S-S-груп білків та пептидів у лужному середовищі.

**Література.** 1. *Веревкина И.В., Точилкин А.И., Попова Н.А.* Колориметрический метод определения HS-групп и -S-S-связей в белках при помощи 5,5'-дитиобис (2-нитробензойной) кислоты // Современные методы в биохимии. – М.: Медицина, 1977. – С.223-231. 2. *Мецишеш І.Ф.* Глутатіонова система організму за умов норми та патології. – Чернівці: Медакадемія, 1999. – 26 с. 3. *Мецишеш І.Ф., Пішак В.П.* Обмін речовин у людини. – Чернівці: Медінститут, 1995. – 193 с. 4. *Шпаков А.О.* Роль сульфгидрильних груп в функціонуванні аденилатциклазної сигнальної системи // Ж. евол. биохим. и физиол. – 2002. – Т.38, №1. – С.97-107. 5. *Biochemistry (third edition) /Ed.Q.Zubay.* – Wm.C.Brown Publishers: England, 1993. – 1024p. 6. *Ellman Q.L.* Tissue sulfhydryl group //Arch. Biochem. – 1959. – Vol.82, N 1. – P.70-77. 7. *Robyt J.F., Ackerman R.J., Chittenden C.G.* Reaction of protein disulfide groups with Ellman's reagent: a case study of the number of sulfhydryl and disulfide groups in *Aspergillus oryzae*  $\alpha$ -amylase, papain and lysozyme //Arch. Biochem. – 1971. – Vol.147, №2. – P.262-269.

## A METHOD OF QUALITATIVE DETERMINATION IN BLOOD HS-GROUPS

*I.F.Meshchyshen, N.P.Grygorieva*

**Abstract.** A technique of spectrophotometric determination of the SH-groups in the whole blood, erythrocytes and blood plasma has been adopted for clinical investigations. The technique is based on the interaction of free HS-groups with pH 8.0 with 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) (Ellman's reagent) with the formation of thionitrophenylic anion that possesses maximum absorption at 412 nm. Calculations are carried out according to the molar extinction coefficient of the thionitrophenylic anion.

**Key words:** HS-groups, whole blood, erythrocytes, blood plasma.

Bukovinian State Medical Academy (Chernivtsi)

*Надійшла до редакції 16.04.2002 року*