Биомедицинская химия, 2005, том 51, вып. 2, с.220-223

УДК 543.42, 543.865
©Моренкова, Наглер

ФЛУОРИМЕТРИЧЕСКИЙ МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ SH-ГРУПП КЕРАТИНА ЭПИДЕРМИСА ЧЕЛОВЕКА.

С.А. Моренкова, Л.Г. Наглер

НИИ физико-химической медицины МЗ и СР РФ, 119992 Москва,
ул Малая Пироговская, 1а

Разработан простой и высокочувствительный флуориметрический метод определения SH-групп кератина, позволяющий при помощи флуоресцеинмеркуриацетата определять их количество в экстракте рогового слоя эпидермиса человека до 0,1 нмоля/мг белка

Ключевые слова: SH- группы, кератин, эпидермис

ВВЕДЕНИЕ. Исследование структуры кератина представляет особый интерес, поскольку кератин является основным белком эпидермиса и осуществляет барьерную функцию кожи, способствуя защите от внешних воздействий. Изменение физико-химических свойств кератина может приводить к существенным нарушениям защитных свойств эпидермиса, особенно при патологических состояниях организма, таких, как диабет, псориаз и др.

Было обнаружено, что на фоне экспериментального диабета в прекератине эпидермиса мышей количество SH–групп снижается в 10 раз по сравнению с таковым здоровых животных, а количество –S-S–групп - соответственно увеличивается [1]. Такое изменение соотношения SH/SS давало основание полагать, что образующийся при диабете кератин имеет более жесткую структуру, чем в норме. Ранее разработанный спектрофотометрический микрометод определения SH–групп кератина человека [2], хотя и позволяет проводить определение SH–групп в экстракте кератина, однако, является трудоемким и представляется недостаточно чувствительным.

С целью упрощения метода определения SH–групп кератина и повышения его чувствительности нами разработан флуориметрический метод с использованием флуоресцеинмеркуриацетата (ФМА). Последний, как известно, является высоко флуоресцентным соединением, реагирующим с низкомолекулярными тиолами [3] и SH-группами белков [4-6]. Метод основан на тушении флуоресценции ФМА при его взаимодействии с SH-группами белков при pH 8,0.

МЕТОДИКА. ФМА ("Serva", ФРГ) использовали после очистки от монортутного производного на колонке (1,5 x 35 см) с гелем сефадекса G-50 (сверхтонкий) в растворе 0,01 М NaOH. Рабочий раствор ФМА с концентрацией $5x10^{-4}$М готовили в растворе 0,01 М NaOH и хранили при комнатной температуре в течение 2 недель Концентрацию ФМА определяли спектрофотометрически при длине волны 499 нм в 0,01 М NaOH, используя молярный коэффициент экстинкции $\varepsilon_м=7,8x10^4$ $М^{-1}\cdot см^{-1}$. Зависимость флуоресценции от концентрации ФМА была линейной в интервале концентраций - 10^{-5}-10^{-8} М.

Спектры флуоресценции регистрировали на спектрофлуориметре Aminco Bowman (США). Флуоресценцию ФМА измеряли при длине волны возбуждения 496 нм и длине волны испускания 520 нм.

Реакцию SH-групп с ФМА проводили в 0,1 М фосфатном буфере при pH 8,0 в темноте. В пробирки, содержащие 100 мкл ФМА, добавляли аликвоты исследуемого образца (5-200 мкл) и буфер до общего объема 2 мл. Конечная концентрация ФМА в пробе составляла $3{,}2 \times 10^{-8}$ М. Интенсивность флуоресценции измеряли через 15 мин после добавления исследуемого образца к раствору ФМА и строили график зависимости относительной флуоресценции от количества добавленного SH-содержащего образца. Относительную флуоресценцию выражали как I/I_0, где I_0 - интенсивность флуоресценции исходного раствора ФМА, I- интенсивность флуоресценции ФМА после добавления SH-содержащего образца. Количество SH-групп определяли по графику, исходя из концентрации ФМА в реакционной смеси и количества образца, необходимого для максимального тушения флуоресценции (точка эквивалентности). В качестве контроля использовали восстановленный глутатион. Сульфгидрильные группы глутатиона определяли также с помощью *п*-хлормеркурибензоата (*п*-ХМБ) по методу [7].

Кератин рогового слоя эпидермиса человека получали с помощью специальных пленок с последующей экстракцией кератина и определением количества экстрагируемого белка [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. На рисунке 1 представлена кривая флуориметрического титрования ФМА глутатионом. Концентрация глутатиона в исходном растворе составляла $3{,}4 \times 10^{-6}$ М. Как видно из этих данных, кривая имеет четкую точку перегиба для данной концентрации глутатиона: точка эквивалентности достигается при добавлении 20 мкл раствора глутатиона. Из расчета следует, что концентрация глутатиона равна $3{,}2 \times 10^{-6}$ М ([SH] = $3{,}2 \times 10^{-8}$ М x 2/0,02). Таким образом, очевидно, что концентрация глутатиона, измеренная с помощью ФМА соответствует концентрации глутатиона в исходном растворе. Определение концентрации глутатиона с помощью *п*-ХМБ показало, что при использовании этого флуоресцентного агента требуются количества глутатиона на три порядка выше, чем при использовании ФМА. Исходя из этих данных, определение SH-групп в кератине проводили с использованием ФМА.

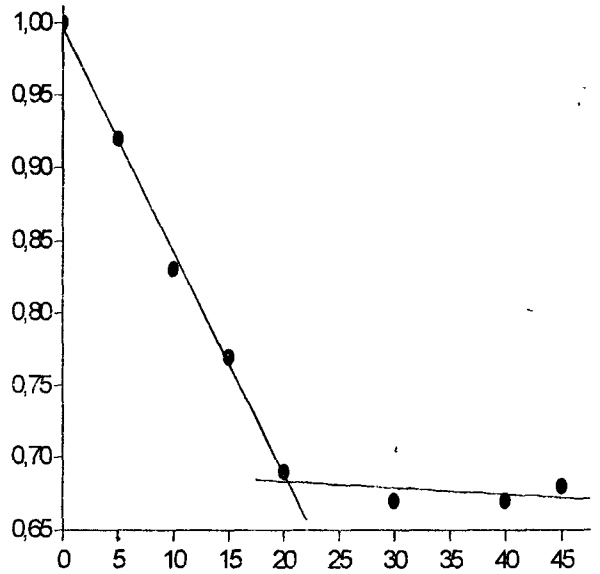

Рисунок 1

Флуориметрическое титрование SH-групп восстановленного глутатиона. ([ФМА] = $3{,}2 \times 10^{-8}$ М). По оси абцисс количество добавленного глутатиона (мкл), по оси ординат - относительная флуоресценция I/I_0

Было проведено определение SH-групп в экстракте кератина, выделенном из роговых клеток эпидермиса двух здоровых добровольцев ("А" и "В") Результаты флуориметрического титрования ФМА SH-группами кератина представлены на рисунке 2 Из рисунка следует, что точка эквивалентности для образца "А" (кривая 1) достигается при добавлении к реакционной смеси 117,8 мкл раствора кератина Концентрация белка в образце "А" составляла 4,76 мг/мл Таким образом, количество SH–групп в пробе равно 5,42 x 10^{7} ммоля ([SH] = 3,2x10^{8} M x 2/0,118), что в расчете на 1 мг белка составляет 1,14 x 10^{7} ммоля или 0,1 нмоля/мг белка У добровольца "В" концентрация белка в образце составляла 6,77 мг/мл, а точка эквивалентности достигалась при добавлении к реакционной смеси 30,0 мкл образца, количество SH–групп составляло 2,10 x 10^{6} ммоля, что в расчете на 1 мг белка составляет 0,3 нмоля Следует отметить, что при определении SH-групп

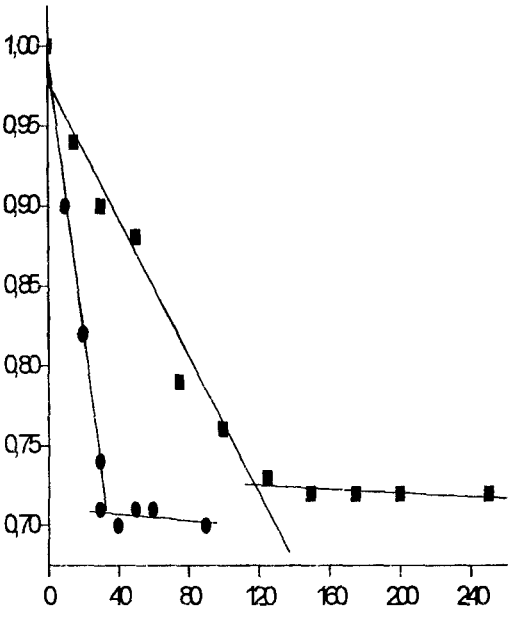

Рисунок 2
Флуориметрическое титрование SH-групп кератина ([ФМА] = 3,2x10^{8} M) По оси абсцисс: количество добавленного кератина (мкл), 1- образец "А", 2- образец "В"
По оси ординат - относительная флуоресценция I/I_0

кератина спектрофотометрическим методом удавалось определять SH-группы кератина у здоровых добровольцев до 0,1 мкмоля/мг белка [2]

Таким образом, предлагаемый новый флуориметрический метод определения SH-групп существенно чувствительнее и много проще спектрофотометрического Высокая чувствительность флуориметрического метода позволяет резко снизить количество биопсийного материала, необходимого для исследования Большим преимуществом разработанного метода является также то обстоятельство, что этот метод позволяет определять количество –S-S-групп, поскольку ФМА, как это следует из данных литературы [3], при pH 14,0 реагирует также с –S-S- группами Одновременное определение -SH- и – S-S-групп даст тем самым возможность оценивать структурные изменения кератина человека при различных видах патологии

ЛИТЕРАТУРА

1. *Моренкова С.А. Рабовский А.Б.* (1992) Бюлл. экспер. биол. мед., №8, 155-157
2. *Моренкова С.А., Байрамов Д.Ф., Халилов Э.М.* (1993) Бюлл. экспер. биол. мед., №5, 556-557
3. *Karush F., Klinman N.R., Marks R.* (1964) Anal. Biochem., **9**, 100-102
4. *Takeuchi S., Maeda A.*(1977) J. Biochem., **81**, 971-976
5. *Heitz J.R., Anderson B.M.* (1968) Arch. Biochem. Biophys., **127**, 637-644
6. *Козаченко А.И., Наглер Л.Г., Лепендина О.Л. и др.*(1987) Биохимия, **52**, 1948-1957
7. *Boyer P.D.* (1954) J. Amer. Chem. Soc., **76**, 33-37
8. *Eichner R., Kahn M.* (1990) J. Cell. Biol., **110**, 1149-1159

Поступила 13.06.2003

FLUOROMETRIC METHOD FOR DETERMINATION OF KERATIN SH-GROUPS IN HUMAN EPIDERMIS

S.A. Morenkova, L.G. Nagler

Institute of Physico-Chemical Medicine of Ministry of Health of RF
1a Malaya Pirogovskaya st., Moscow 119992, Russia

Simple and highly sensitive fluorometric method for determination of keratin SH-groups using fluorescein mercuric acetate has been developed. It allows to determine amount of SH-groups up to 0,1 nmole/mg of protein in extracts of corneal layer of human epidermis.

Key words: SH-groups, keratin, epidermis