

RAT KARACİĞER VE BÖBREĞİNDEN FERRİTİNİN KISMÎ İZOLASYONU İLE ELDE EDİLEN SONUÇLARIN DEĞERLENDİRİLMESİ

The evaluation of results obtained from the partial purification of ferritin in liver and kidney of rats

Turan Karaylıanoğlu¹, Muzaffer Kuş¹, Üçler Kısa², Türker Kutluay³, Levent Karaca³

Özet: Ratların karaciğer ve böbreklerinden demir depo proteini olan ferritini izole etmek amacıyla homojenizasyon, ısı denatürasyonu, amonyum sülfat presipitasyonu ve dializ işlemleri yapıldı. Karaciğerden % 22 verim ve 1.86 oranında bir saflaştırma ile 39.4 ng/mg protein ferritin izole edildi. Böbrekten ise % 24 verim ile 1.96 oranında ve 6.25 ng/mg protein ferritin saflaştırıldı. Ferritin ölçümü için ELISA yöntem kullanıldı. Sonuç olarak rat karaciğerinde ferritinin böbreğe göre 6.3 kat daha fazla konsantrasyonda olduğu saptandı.

Anahtar Kelimeler: Ferritin, Karaciğer, Böbrek

Summary: Ferritin in liver and kidney of rats was partially purified, using homogenization, heat denaturation, amonium sulphate precipitation and dialysis. 39.4 ng ferritin per mg protein in liver was obtained with 22 % recovery. 6.25 ng ferritin per mg protein in kidney was obtained with 24 % recovery. The degree of purification was 1.86 and 1.94, respectively. The measurement of ferritin was used the method of ELISA. Our results showed that ferritin consantration in rat liver was 6.3 times higher than that in rat kidney.

Key Words: Ferritin, Liver, Kidney

Ferritin molekül ağırlığı 450.000 dalton olan bir depo proteindir. Her bir molekülü 4000 kadar demir atomu ihtiva eder (6,11). Normal şartlarda tüm vücut demirinin % 25'ini kapsar ve başlıca karaciğer, kemik iliği ve dalakta hücre sitoplazmasında yoğunlaşmıştır (4,15). 1956 yılında Reissmann ve Dietrich akut karaciğer harabiyeti saptanan hasta serumlarında ferritini saptayıp, dolaşımında mevcut ferritinin boya alan karaciğer hücrelerinden salıverildiğini gösterdiler. 1972 yılında Addison ve arkadaşları ise serum ferritininin ölçümü için immunoradiometrik yöntemi kullanarak, serum ferritini ile vücut depo demiri arasındaki ilişkiyi açıkladılar (5,10). 1975 ve 1978'lerde Worwood, Linder ve Konijn ferritinin memeli karaciğer, kalp ve böbreklerinden izolasyonunu başardılar (13,14).

GATA. Etik-ANKARA.
Biyokimya ve Klinik Biyokimya. Y.Doç.Dr.¹, Bil.Uzm.2,
Prof.Dr.³

Biz yaptığımız çalışmada ferritinin rat karaciğer ve böbreklerindeki konsantrasyonunu saptamak amacıyla bu dokulardan ferritinin kısmî izolasyonunu sağladık ve Enzim Immunoassay yöntemi ile konsantrasyonunu belirledik.

METODLAR

Rat karaciğer ve böbreğinden kısmî ferritin izolasyonunu sağlamak amacıyla, çıkarılan karaciğer ve böbrek saf su ile yıkanıp kanlarından arıtıldıktan sonra ağırlıkları belirlendi ve ayrı olarak saflaştırma safhalarından geçirildi. Çalışmamızda ferritinin dokulardan kısmen saflaştırılması için Penders yöntemi modifiye edilerek uygulandı (8).

Homojenizasyon: Karaciğer (24.18 g) ve böbrek (5.819 g) ağırlığının 5 katı su ile sulandırılarak "Thermovac Industres" homojenizatörü ile 10 000 devir/dakika hızda 5 dakika homojenize edildi.

Isı Denatürasyonu: Homojenat 70-75 °C'de benmaride 10 dakika ısıtıldı ve buz içerisinde soğutulup 30 dakika süre 25 000 xg'de santrifüj (IEC Model 2K Centrifuge) edildi. Elde edilen süpernatant 4 °C'de 24 saat bekletildi.

Tuz Fraksiyonasyonu: Süpernatantın pH'ı 5.5'a katı sodyum asetat ile ayarlandıktan sonra, % 55 satürasyon sağlayacak miktarda amonyum sülfat (2.35 mol/L) eklendi. 4 °C'de 14 saat beklettikten sonra, 2 saat 40 000 xg'de santrifüj edilerek ferritinin presipitasyonu sağlandı.

Dializ: 15 mmol/L fosfat solüsyonunda çözünmesi sağlanan presipitat PEG ile dializ edildi.

Saflaştırmanın her safhasında alınan numunelerde protein ve ferritin miktar tayini yapıldı. Protein miktar tayini için Bradford yöntemi (9), ferritin için ise ELİSA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) yöntemi (10) (Eurogenetics-Diagnostic kit) uygulandı. Bu ölçümler için Shimadzu (UV-120-01) spektrofotometresi ve El 312'e bio-kinetics reader (Bio-Tek Ins.) cihazı kullanıldı.

BULGULAR

Ratlardan usulüne uygun olarak alınan karaciğer ve böbrekten ferritin saflaştırılması işleminde elde edilen homojenat, 25 000 xg süpernatantı amonyum sülfat kesiti ve dializatta total protein ve ferritin miktarları Tablo 1 ve Tablo 2'de gösterilmiştir. Bu bulgular esas alınarak verim ve saflaştırma oranı belirlendi.

Tablo 1. Rat karaciğerinden ferritin saflaştırılması basamaklarında ele geçen fonksiyonlardaki ferritin ve protein değerleri

	Hacim ml	T. Protein mg/ml	Ferritin mg/ml	Ferritin ng/ml Protein	Verim %	Saflaştırma (kat)
Homojenat	98	32.50	15.3	46.1	100	1.00
25 000 xg süpernatantı	90	30.30	*1499.4	41.8	85	1.90
(NH ₄) ₂ SO ₄ süpernatantı	65	7.16	*1269.0	27.2	13	1.59
Dializat	27	8.63	*195.0	39.4	22	1.86
			*340.2			

*Total ferritin miktarı

Dokulardan ferritini izole etme basamaklarında elde edilen fraksiyonlardaki verim ve saflaştırma oranlarını hesaplamak için ferritin ve total protein miktar tayinleri yapıldı. Verim, herhangi bir fraksiyondaki total ferritin miktarı ile ilk fraksiyondaki ferritin konsantrasyonu arasındaki yüzde oran ile saflaştırma katsayısı ile miligram protein başına düşen ferritin konsantrasyonları arasındaki oran hesabı ile elde edildi (4).

TARTIŞMA

Rat karaciğer ve böbreğinden ferritin izolasyonu amacıyla alınan organlar homojenize edildikten sonra ısı denatürasyonu amonyum sülfat presipitasyonu ve dializ safhalarından geçirildi. Bu saflaştırma da Penders yöntemi santrifügasyon zamanı, hızı ve amonyum sülfat konsantrasyonunda bazı değişiklikler yapılarak aynen uygulandı (8). Whittaker tavuk karaciğerinden ferritini tuz fraksiyonasyonu sonucunda başlangıç konsantrasyonunun 3.7 katı olarak izole etmişti (12). Bizim çalışmamızda ise karaciğerde 0.86, böbrekte ise 0.94 kat değerinde ferritin izole edildi. Alınan verim ise karaciğerde % 22, böbrekte ise % 24 civarındaydı. Worwood, Powell ve Massower yaptıkları çalışmada ferritin karaciğerde daha fazla yoğunlaştığını göstermişlerdi (7,9,13). Çalışmamızda rat karaciğerinde ferritin 46.1 ng/mg protein konsantrasyonunda, böbrekte ise 6.59 ng/mg protein olarak saptandı. Bu Worwood ve Powell'in bulgularıyla uyum gösterdi. Penders'in yönteminde ferritin presipitasyonu için amonyum sülfat belirli bir satürasyon sağlayacak miktarda 2 kez kullanılmıştı. Biz aynı satürasyonu bir defada sağladık.

Tablo 2. Rat böbreğinden tuz fraksiyonasyonu sonucu elde edilen ferritin saflaştırılma oranları

	Hacim ml	T.Protein mg/ml	Ferritin mg/ml	Ferritin ng/ml Protein	Verim %	Saflaşma (kat)
Homojenat	24	30.5	8.4	6.59	100	1.00
25 000 xg süpernatanı	21	30.1	*201.6 9.2	6.41	95	1.97
(NH ₄) ₂ SO ₄ süpernatanı	20	5.8	*193.2 2.4	8.27	25	2.25
Dializat	12	7.86	*48 4.1	6.25	24	1.94
			*49.2			

*Total ferritin miktarı

Sonuç olarak;

- Ratlarda ferritin karaciğerde, böbreğe göre daha fazla konsantrasyonda olduğu,
- Ferritin presipitasyonu için amonyum sülfat yerine daha etkili olacak başka bir maddenin kullanılması gerektiği,
- Ferritin purifikasyonu için kullandığımız Pen-

- ders yönteminin zaman alıcı olduğu, ölçümü için kullanılan ELISA yönteminin ise Anderson'un ileri sürdüğü gibi (1), basit ve kısa zamanda sonuçlanan bir ölçüm olduğu,
- Bu çalışma ile saptanan doku ferritin düzeylerinin serum ve doku demir (Fe) konsantrasyonları ile ilişkisinin araştırılması gerektiği kanısına varıldı.

KAYNAKLAR

- Anderson MG, Kelly AM: Serum ferritin by a rapid and inexpensive ELISA method. *Clin Chem Acta* 116:405-8,1982.
- Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of milligram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254,1976.
- Conradie JD, Mohele BEL: Quantitation of Serum ferritin by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Med J* 57:282-7,1980.
- Giannoulis E, Arvanitakis C, Nikopoulos A: diagnostic value of serum ferritin in primary hepatocellular carcinoma. *Digestion* 30:236-241,1984.
- Halliday JW, Gera KL, Powell LW: Solid phase radio-immunoassay for serum ferritin. *Clinica Chimica Acta* 58:207-214,1975.
- Mejia LA, Viteri FE: ferritin concentrations in plasma form capillary blood and venous blood compared. *Clin Chim* 29/5:871-873,1983.
- Massover WH: Molecular size heterogeneity of ferritin in mouse liver. *Biochem Biophys Acta* 829: 377-386,1985.
- Penders TJ, Rooij HH, Leijnse B: Rapid isolation of ferritin. *Biochem Biophys Acta* 168:588-590, 1968.
- Powell LW, Halliday JW, Cowlshaw JL: Relationship between serum ferritin and total body iron stores in idiopathic haemochromatosis. *Gut* 19:538-542,1978.
- Saab GA, Green R, Crosby WH: Rapid assay for measurement of serum ferritin. *Am J Clin Pathol* 70:275-9,1978.
- Von Oost BA, Beld BV, Cloin LG: Measurement of ferritin in serum: Application in Diagnostic Use. *Clin Biochem* 17:263-269,1984.
- Whittaker D, Torrance JD, Kew MC: Isolation of ferritin from human hepatocellular carcinoma. *Scand J Haematol* 33:432-439,1984.
- Worwood M, Aherne W, Dawkins S, Jacobs A: The characteristics of ferritin from human tissues, serum and blood cells. *Clin Sci Mol Med* 48:441-451,1975.
- Worwood M, Dawkins S, Wagstaff M: The purification and properties of ferritin from human serum. *Biochem J* 157:97-103,1976.
- Zuyderhoudt FM, Linthorst C: The microheterogeneity of human liver and serum ferritins measured on minute amounts of ferritin in crude samples. *Ann Clin Biochem* 21:471-476,1984.