Kedi ve köpek plazma albümin saflaştırılmasında iyon değişim kromatografisi ve etanol çöktürme tekniğinin birlikte kullanımı

Öğünç MERAL*, Mert PEKCAN Hamdi UYSAL*** Hilal KARAGÜL*****

Öz: Plazma proteinlerinin büyük bir bölümünü oluşturan albüminin hastalıkta ve sağlıkta bilinen birçok görevi mevcuttur. Bu görevler arasında kan onkotik basıncının sağlanması yanında serbest yağ asitleri, bilirubin, çeşitli ağır metaller, hormonlar, vitaminler ile önemli biyolojik fonksiyona sahip çok sayıda madde ve molekülün taşınması vardır. Albüminin çeşitli sebepler ile meydana gelen eksikliği önemli fonksiyon bozukluklarına neden olmaktadır. Bu nedenle beşeri hekimlikte tedaviye yönelik saflaştırılmış plazma albümini sıklıkla kullanılmaktadır. Bununla beraber albümin farklı türlerde benzer fonksiyonlar göstermesine rağmen antijenik farklılıklar insan albümininin veteriner hekimlikte kullanımını büyük oranda kısıtlamaktadır. Yaptığımız çalışmada, kedi ile köpek EDTA'lı plazmalardan oluşturulan farklı havuz örneklerinde albümin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Kullanılan örnekler fakülte kliniklerine rutin kontrol için gelen ve klinik inceleme sonuçlarına göre sağlıklı olduğu tespit edilen hayvanlardan elde edilmiştir. Saflaştırma aşaması iyon değişim kromatografisi ve etanolde çöktürme tekniğinin kombine olarak kullanılması ile gerçekleştirilmiş ve her iki tür için en az %95 saflıkta albümin elde edilmiştir. Yapılan bu çalışma ile elde edilen albüminin veteriner hekimlik alanında tedavide kullanılabileceği ve insan albümin kullanımının yarattığı olumsuzlukların giderileceği düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: Albümin, saflaştırma, iyon değişim kromatografisi

Combined use of ion-exchange chromatography and ethanol fractionation in purification of canine and feline plasma albumin

Abstract: Albumin is the most abundant protein in a plasma having numerous roles in both health and disease. Along with regulating the oncotic pressure, albumin transports free fatty acids, bilirubin, heavy metal ions, hormones, vitamins and many organic molecules having a biological function. Any level of deficiency in albumin levels ultimately leads to serious disturbances in metabolism. Thus, purified human albumin solutions frequently used in human medicine. Even the function of the albumin is similar across the species, the antigenic diversity comes as a limiting factor for its possible use in veterinary medicine. In our study, we purified albumin from the plasma pool of cat and dogs.

* Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara.
** Doç. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara.
*** Prof. Dr., Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, 06110, Dışkapı, Ankara.

The individual samples are taken from the animals that are admitted to the faculty clinics and found to be healthy according to the clinical investigation. The ion chromatography followed by ethanol precipitation technique was utilized for the purification process. The combined procedure allowed to purify albumin in each species greater than 95%. It is thought that this approach can also be used for therapeutic purposes in veterinary medicine to overcome the limitations of using purified human albumin.

Keywords: Albumin, ion-exchange chromatography, purification

Giriş

Albümin insan ve diğer memeli hayvanların kan plazmasının en hakim proteini olup karaciğerde sentezlenmektedir. Hayvanlarda plazma protein havuzunun yaklaşık % 50'sini oluşturmakla birlikte köpeklerde albüminin serumdaki yarı ömrü 8.2 gündür. Vücutta bulunan toplam albüminin %40'ı intravasküler alanda, % 60'ı ise interstisyumda yer alır ve normal koşullarda intravasküler alandan interstisyuma geçerek lenfatik sistem içerisinde dolaşır (11, 13).

Albüminin sağlıkta ve hastalıkta birçok fonksiyonu mevcuttur. Albüminin en önemli rolü kolloid osmotik basıncın devamlılığını ve endotel bütünlüğünü sağlamaktır. Albümin molekülleri normal kolloid osmotik basıncı sağlarlar, mikrovasküler geçirgenliği azaltırlar ve endotelyal hücre apoptozisini inhibe ederler (14). Albümin ayrıca serbest yağ asitlerinin, bilirubin ve birçok ilacın taşınmasında önemli rol oynar. Normal koşullarda insanlarda plazma albümin konsantrasyonunu (~4 g/100 ml) sabit tutmak için karaciğer hepatosit hücrelerinden yaklaşık 15 g albümin sentezlenir. Bunun yanı sıra, düşük albümin sentezi kan serumunun kapiller duvardan sızarak ekstravasküler alana sızması ile sonuçlanan hipoalbüminemiye sebep olur. Hipoalbüminemi; kanser, AIDS ve inflamatuar hastalıklar gibi kronik olgularda sık görülmektedir (3). Bununla beraber albümin serebrospinal sıvı, interstisyel sıvı ve lenf gibi ekstraselüler sıvıların esas bileşenidir. Glikozile olmayan ve negatif yüklü, yüksek bağlanma ve taşıma kapasitesine sahip bir proteindir. Kolloid osmotik basıncın sürdürülmesinde, hormonların, yağ asitlerinin, ilaçların ve metabolitlerin taşınmasında, mikrovasküler geçirgenliğin düzenlenmesinde görev aldığı gibi antioksidan, antiinflamatuvar ve antitrombotik etkileri mevcuttur (19).

Kolloid osmotik basınç daha çok albümin varlığıyla membranlar üzerine uygulanan basıncı ifade eder. Normal plazma kolloid osmotik basınç köpeklerde 16,7 – 28,9 mm Hg arası, kedilerde ise 21 - 34 mm Hg arası olarak bildirilmiştir. Kolloid çözeltiler kolloid osmotik basıncı yükselterek kanın intravasküler alanda kalmasını sağlarlar. Bunu içerisinde bulunan yüksek molekül ağırlıklı partiküllerle sağlarlar. Kolloid çözeltiler dekstran gibi sentetik olabilmekle birlikte konsantre albümin çözeltisi gibi doğalda olabilmektedirler (1, 18).

Hipoalbüminemik kedi ve köpeklerde insan serum albümininin kullanımıyla ilgili çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalar göstermiştir ki hipoalbüminemik kedi ve köpeklerde insan albümini kullanımı aşırı duyarlılık reaksiyonları, ürtiker, vaskülit, letarji ve ödem gibi istenmeyen durumlara sebep olabilmektedir (15).

Beşeri hekimlikte saflaştırılmış plazma albümini sıklıkla tedavi amacıyla kullanılmaktadır.

Özellikle yanık tedavisinde kan hacminin yerine konması amacıyla kullanılmaktadır. Bunun yanı sıra travma durumlarında, perioperatif dönemde, beslenme yetersizliklerinde, kronik enfeksiyonlarda ve karaciğer, böbrek bozuklukları durumlarında da tedaviye yönelik kullanılmaktadır (2, 9).

Albümin açığı, düşük albümin üretimi veya hızlı gelişen albümin kayıplarından kaynaklanmaktadır. Albümin üretim düşüşü; karaciğer bozukluklarından kaynaklanırken kayıplar genellikle böbrek bozuklukları ile ilişkilidir. Albümin yetersizliği sonucu damar içi sıvı dokular arası kompartımana geçerek ödeme sebep olmaktadır (17).

Yapılan çalışma ile kedi ve köpek plazmasından iyon değişim kromatografisi ve etanolde çöktürme tekniğinin kombine kullanımı ile albümin saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Gerçekleştirilen bu saflaştırma yöntemi ile elde edilen kedi ve köpek albümininin veteriner hekimlik alanında tedaviye yönelik olarak güvenle uygulanabileceği düşünülmektedir.

Gereç ve Yöntem

Örneklerin oluşturulması: Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi kliniklerine rutin kontrol için gelen ve klinik inceleme ve kan sayımı sonuçlarına göre sağlıklı olduğu tespit edilen kedi ve köpeklerin EDTA'lı plazmalarından iki farklı havuz oluşturuldu. Elde edilen plazma örnekleri çalışma gerçekleştirilinceye kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

Plazma albümininin saflaştırılması: Plazma albümininin saflaştırılması amacıyla iyon değişim kromatografisi ve etanol çöktürme tekniği beraber kullanıldı. İlk olarak elde edilen plazma örnekleri 5000xg'de 15 dakika santrifüj edildi. Elde edilen supernatant eşit miktarda 0.1 M asetat tamponu (pH 5,6) ile karıştırıldı.

İyon değişim kromatografisi: İyon değişim kromatografisi Dietilaminoetil Sefaroz (DEAE Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) kolonu kullanılarak, 0.25-0.35 mPa basınçta, 1 ml/dk akış hızında ve oda sıcaklığında gerçekleştirildi. Tampon A olarak 0.05 M sodium asetat (pH 5,6) tampon B olarak 0.1 M sodium asetat-0.5 M NaCl (pH 5,6) kullanıldı.

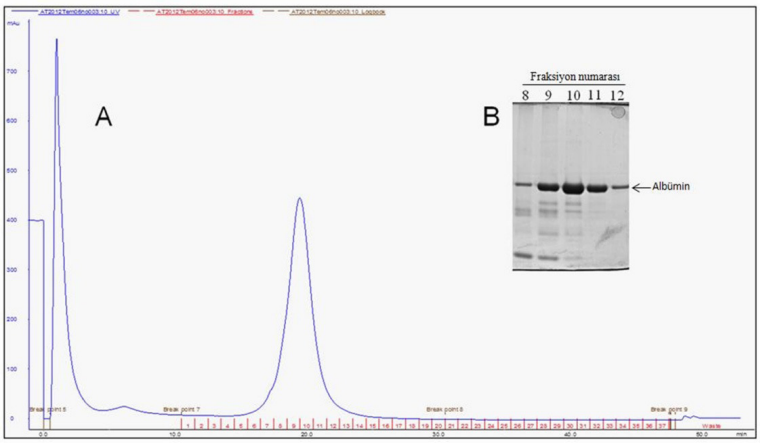
Kolon 1 M NaCl çözeltisini takiben %20'lik etanol çözeltisi ile temizlendi. Daha sonra Tampon A ile kolonun dengelenmesi gerçekleştirildi. Albümin saflaştırılması için 30 dakika boyunca %0'dan %100'e kadar tampon B olacak şekilde lineer gradient işlem uygulandı. Her 60 saniyede bir fraksiyonlar toplandı. Her fraksiyona toplam hacimleri %40 olacak şekilde etanol eklendi ve bir gece 4°C' de bekletildi. Bütün fraksiyonlar santrifüj edilerek süpernatanta tuz ve etanolun uzaklaştırılması için asetik asit eklendi. Bu işlemi takiben 5000xg'de 30 dakika santrifüj sonrası supernatant uzaklaştırılarak çöken albümin PBS' de çözülerek saflığın tesbiti için elektroforez işlemine geçildi.

Örneklerin elektroforezi: Elde edilen fraksiyonların protein miktar tayinleri Bradford yöntemine göre gerçekleştirildi. Elde edilen örneklerden eşit miktarda protein (10 µg) içeren miktarları %10'luk sodyum dodesil sülfat poliakrilamid jel elektroforezinde (SDS-PAGE) ayrıldı. Elektroforez sonrası jeller coomassie boya ile boyanarak Bio-Rad GS-800 dansitometre

kullanılarak görüntülendi ve BioRad-Quantity One 4.6 programı kullanılarak dansite ölçümleri gerçekleştirildi.

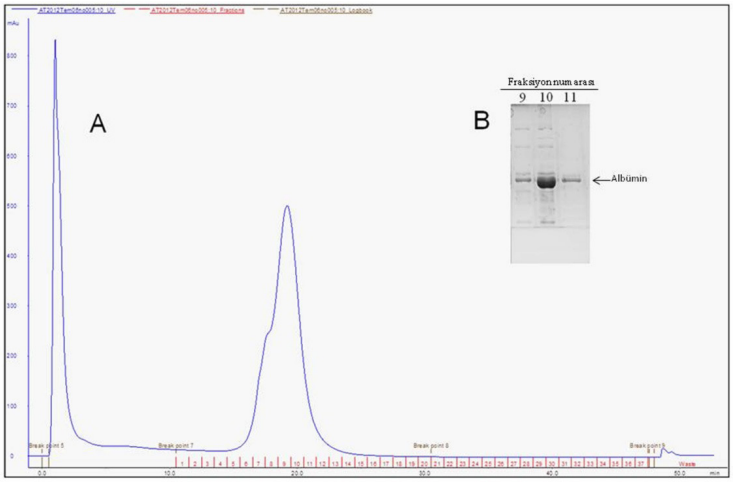
Bulgular

Albümin saflaştırılması amacıyla, kedi ile köpek EDTA'lı plazmalardan oluşturulan farklı havuz örneklerinde; iyon değişim kromatografisi ve etanolde çöktürme tekniğinin kombine olarak kullanılması sonucunda her iki tür için en az %95 saflıkta albümin elde edildi. Değerlendirme yapılırken verim göz önünde bulundurularak hem kedi hem de köpek plazması için 10 numaralı fraksiyon kullanıldı (Şekil 1 ve Şekil 2). Elektroforetik görünüme göre köpekle karşılaştırıldığında kedide elde edilen albümin saflaştırılmasının daha yüksek verimde olduğu anlaşılmıştır.



Şekil 1: Köpek plazmasının iyon değişim kromatografisi ile fraksiyonlanması (A) ve albuminden zengin fraksiyonların elektroforetik görünümü (B).

Figure 1: *Fractionation of dog plasma by ion exchange chromatography (A) and electrophoretic pattern of albumin rich fractions (B).*



Şekil 2: Kedi plazmasının iyon değişim kromatografisi ile fraksiyonlanması (A) ve albuminden zengin fraksiyonların elektroforetik görünümü (B).

Figure 2: *Fractionation of cat plasma by ion exchange chromatography (A) and electrophoretic pattern of albumin rich fractions (B).*

Tartışma ve Sonuç

Beşeri hekimlikte tedaviye yönelik olarak saflaştırılmış plazma albümini sıklıkla kullanılmaktadır. Bunun ilk örneği Edwin Joseph Cohn tarafından ortaya konan ve kendi adıyla anılan Cohn Fraksiyonlama tekniğidir. Albümin, bu teknik sayesinde türlere göre değişmekle beraber %95-99 oranında saflaştırılabilmektedir. Bu sayede İkinci Dünya Savaşı sırasında pek çok askerin hayatı kurtarılabilmiştir (5, 12, 22).

Beşeri hekimlikte, bazı cerrahi girişimler sonrası albümin takviyesine ihtiyaç duyulabilmektedir. Bunun yanında akut nefroz, karaciğer yetmezliği belirtilerinin hafifletilmesi ve ilgili hastalıklarda genel sağlık durumunun düzeltilmesine yönelikte kullanılmaktadır (10, 16, 20).

Hidroksietil-nişasta ve benzeri sentetik kolloidler damar içi onkotik basıncı artırmada kullanılsa da albüminin sağladığı diğer pek çok vital faydadan yoksundur. Köpek ve kedi plazması albümin düzeyi ortalama 25-30 g/L civarındadır. Bu nedenle ciddi yetersizlikte yüksek miktarda canlı hayvandan elde edilmiş plazmaya gereksinim duyulmaktadır. Bu şartlar hem maliyet ve bulundurma hem de uygulanan hayvanda damar içi sıvı hacminin çok artması gibi sorunları beraberinde getirmektedir. Ticari olarak hazırlanmış yüksek konsantrasyonlu veteriner albümin preparatlarının bulunmayışı ve insan albümin çözeltilerinin hayvanlarda kullanımının aşırı duyarlılık reaksiyonları başta olmak üzere pek çok komplikasyona neden olması hekimliğimiz alanında tedaviyi kısıtlayıcı önemli bir faktör olarak karşımıza çıkmaktadır (7).

Serum veya plazmadan albümin saflaştırılması amacıyla değişik yöntemler mevcuttur. Bunlardan ilki proteinlerin farklı konsantrasyondaki etil alkol çözeltilerindeki çözünürlükleri prensibine dayanan etil alkol fraksiyonlamasıdır. Cohn fraksiyonlama tekniğinin ana omurgasını oluşturan etil alkol fraksiyonlama basit ve ucuz olması gibi olumlu yanları dışında protein denatürasyonu ve protein kaybı gibi olumsuz yönleri de mevcuttur (4, 6). Bir diğer yöntem albüminin diğer birçok proteine göre ısı stabilitesinin yüksek olması dolayısıyla ısı yoluyla albümin saflaştırılmasıdır. Bu yöntem ile yüksek oranlarda saf albümin elde edilebilmektedir (8). Albümin saflaştırılması için birçok çeşitte kromatografik yöntem olmakla birlikte bu yöntemler tüm yöntemler düşünüldüğünde en iyi aday olarak görülmektedir (21).

İnsan hekimliğinde albümin saflaştırılması amacıyla etanolde çöktürme ile kombine iyon değişim kromatografisi tekniği gibi iki veya daha fazla kombinasyon içeren teknikler bu iş için oluşturulmuş çeşitli merkezlerde kullanılmaktadır. Kullanılan bu yöntemlerin ürün verimi ve kalitesi açısından tatmin edici sonuçlar verdiği bildirilmiştir (21, 22).

Etanolde çöktürme ile kombine iyon değişim kromatografisi tekniği kullanılan bilimsel çalışmaya veteriner hekimlik alanında henüz rastlanılamamıştır. Çalışmada önerilen teknikte işlem basamak sayısının az olmasına rağmen saflığın yüksekliği ve etanol kullanımı ile hem enfeksiyon riskinin hem de maliyetin azaltılmasıyla kedi-köpek albümin çözeltilerinin Veteriner Hekimlik alanında güvenle uygulanabileceği düşünülmektedir.

Kaynaklar

1.Brown SA, Dusza K, Boehmer J (1994): *Comparison of measured and calculated values for colloid osmotic pressure in hospitalized animals*. Am J Vet Res, **55**, 910-915.

2.Cartotto R, Callum J (2012): *A review of the use of human albumin in burn patients*. J Burn Care Res, **33**, 702-717.

3.Chojkier M (2005): *Inhibition of albumin synthesis in chronic diseases: molecular mechanisms.* J Clin Gastroenterol, **39**, 143-146.

4.Cohn EJ, Gurd FRN, Surgenor DM, Barnes BA, Brown RK, Derouaux G, Gillespie JM, Kahnt FW, Lever WF, Liu CH, Mittelman D, Mouton RF, Schmid K, Uroma E (1950): *A system for the separation of the components of human blood: Quantitive procedures for the separation of the protein components of human plasma*. J Am Chem Soc, **72**, 465-474.

5.Cohn EJ, Oncley JL, Strong LE, Hughes WL, Armstrong SH (1944): *Chemical, clinical, and immunological studies on the products of human plasma fractionation. I. The characterization of the protein fractions of human plasma.* J Clin Invest, **23**, 417-432.

6.Cohn EJ, Strong LE, Hughes WL, Mulford DJ, Ashworth JN, Melin M, Taylor HL (1946): *Preparation and properties of serum and plasma proteins; a system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids.* J Am Chem Soc, **68**, 459-475.

7.Cohn LA, Kerl ME, Lenox CE, Livingston RS, Dodam JR (2007): *Response of healthy dogs to infusions of human serum albumin*. Am J Vet Res, **68**, 657-663.

8.Denizli A (2011): *Plasma fractionation: conventional and chromatographic methods for albumin purification*. Hacettepe J Biol & Chem, **39**, 315-341.

9.Don BR, Kaysen G (2004): *Serum albumin: relationship to inflammation and nutrition*. Semin Dial, **17**, 432-437.

10.Donadio C, Tognotti D, Donadio E (2012): *Albumin modification and fragmentation in renal disease*. Clin Chim Acta, **413**, 391-395.

11.Doweiko JP, Nompleggi DJ (1991): *Role of albumin in human physiology and pathophysiology*. J Parenter Enteral Nutr, **15**, 207-211.

12.Farrugia A, Robert P (2006): *Plasma protein therapies: current and future perspectives*. Best Pract Res Clin Haematol, **19**, 243-258.

13.Georgieva TM, Andonova MJ, Slavov EP, Dzhelebov PV, Zapryanova DS, Georgiev IP (2011): *Blood serum protein profiles and lysozyme activity in dogs during experimental infection with Staphylococcus intermedius*. Revue med vet, **162**, 580-585.

14.Mathews KA (2008): *The therapeutic use of 25% human serum albumin in critically ill dogs and cats.* Vet Clin North Am Small Anim Pract, **38**, 595-605.

15.Mazzaferro E, Powell LL (2013): *Fluid therapy for the emergent small animal patient: crystalloids, colloids, and albumin products.* Vet Clin North Am Small Anim Pract, **43**, 721-734.

16.Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Aakre KM, McQueen MJ, Itoh Y, Lieske JC, Seccombe DW, Jones G, Bunk DM, Curhan GC, Narva AS (2009): *Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion*. Clin Chem, **55**, 24-38.

17.Nicholson JP, Wolmarans MR, Park GR (2000): *The role of albumin in critical illness.* Br J Anaesth, **85**, 599-610.

18.Odunayo A, Kerl ME (2011): *Comparison of whole blood and plasma colloid osmotic pressure in healthy dogs*. J Vet Emerg Crit Care, **21**,236-241.

19.Prajapati KD, Sharma SS, Roy N (2011): *Current perspectives on potential role of albumin in neuroprotection*. Rev Neurosci, **22**, 355-363.

20.Rippe B (2004): *What is the role of albumin in proteinuric glomerulopathies*? Nephrol Dial Transplant, **19**, 1-5.

21.Tanaka K, Sawatani E, Nakao HC, Dias GA, Arashiro F (1996): *An alternative column chromatographic process for the production of human albumin*. Braz J Med Biol Res, **29**, 185-191.

22.Tanaka K, Shigueoka EM, Sawatani E, Dias GA, Arashiro F, Campos TC, Nakao HC (1998): *Purification of human albumin by the combination of the method of Cohn with liquid chromatography*. Braz J Med Biol Res, **31**, 1383-1388.

Geliş Tarihi: 03.8.2017/Kabul Tarihi: 11.9.2017

Sorumlu Yazar:
Doç.Dr. Mert PEKCAN
Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi,
Biyokimya Anabilim Dalı,
06110 Dışkapı/Ankara
pekcan@ankara.edu.tr