

A FIELD-FLOW FRACTIONATION (FFF) ÉS ALKALMAZÁSA VÉRSEZÉRUM FEHÉRJEKOMPONENSEINEK ELVÁLASZTÁSÁRA

Posta Niké¹, Barbara Roda², Pierluigi Reschiglian², Balla József¹, Posta József^{3*}

¹*Debreceni Egyetem, Orvos- és Egészségtudományi Centrum, 1. számú Belgyógyászati Klinika, Nephrológiai Tanszék, H-4032 Debrecen, Nagyerdei körút 98.*

²*„Giacomo Ciamician” Department of Chemistry, University of Bologna, Via Selmi 2. Bologna, Italy*

³*Debreceni Egyetem, TTK, Tájvédelmi és Környezetföldrajzi Tanszék
H- 4032 Debrecen, Egyetem tér 1.
posta.jozsef@science.unideb.hu*

Az FFF módszer elve

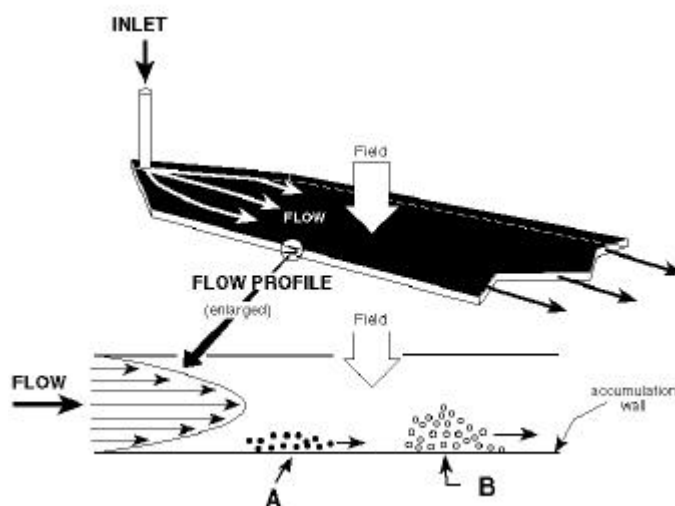
A field-flow fractionation (FFF) egy olyan módszer-család, amely makromolekulák, kolloidok és szemcsés anyagok elválasztására és jellemzésére használható, elsősorban a méretükön, bizonyos esetekben összetételük alapján. Az FFF sok tekintetben hasonlít a kromatográfiához, de számos egyedi eltérést is mutat. A folyadékkromatográfiához hasonlóan kis mennyiségű anyagot úgy választ el, hogy azt egy csatornán (oszlopon) vezet keresztül adott folyadékáram mellett. Bizonyos anyagok lassabban haladnak, mint mások, és adott térfogatú vivofolyadék szükséges ahhoz, hogy a belépéstől a kilépésig az anyag komponensei egymástól szétváljanak [1].

Az FFF és a kromatográfia különbsége abban áll, hogy az elegy különböző komponenseinek eltérő áramlási sebességét milyen módszerrel idézzük elő. A kromatográfiában a vizsgált komponens vándorlását az álló (stacionárius) fázissal való kölcsönhatás lassítja le; ha ugyanis a komponens kölcsönhatásba lép az álló fázissal, akkor már nem tud a vivo-folyadékkal azonos sebességgel vándorolni. Az FFF-nél a stacionárius (álló) fázis helyett térerot alkalmazunk. A térerovel való kölcsönhatás csökkenti a komponens áramlási sebességét a vivofolyadék áramához képest.

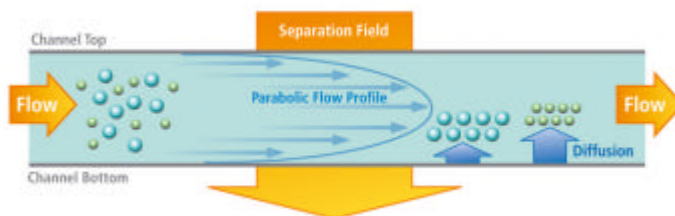
A térero alkalmazása egy (álló fázist, töltetet nem tartalmazó) üres csatornában az elválasztások eloidézására bizonyos elonyt jelent a kromatográfiához képest, főleg nagy molekula tömegű részecskék esetén. Például, a nyitott (üres) csatorna nem tartalmaz nyírófelületet, amely szétszakíthatja, degradálhatja az olyan törékeny molekulákat, mint a polimerek, biomolekulák, aggregátumok. A retenció (a visszatartás) könnyen szabályozható a térero nagyságának szabályozásával. Ezáltal a módszer (az elválasztás) gyorsan hangolható (optimálható, beállítható) széles tartományon belül, hogy a legmegfelelőbb elválasztási hatásfokot érjük el. Végül pedig, az elválasztás dinamikája általában jól érthető és könnyen modellezhető, figyelembe véve a komponensek olyan alapvető paramétereit, mint a méret és suruság, amelyek közvetlenül határozzák meg a komponensek visszatartásának (retenciójának) nagyságát az FFF csatornában.

Az FFF elválasztás alapelvét az 1. és 2. ábrán mutatjuk be. Az FFF csatorna (elválasztó kapilláris) méretarányai szerint inkább szalagszerű; a csatorna hossza jellemzően 40 – 50 cm, szélessége 1 – 2 cm, a magassága viszont 50 – 250 μm , az egyes technikai megoldások függvényében. A csatorna általában műanyag vagy fém távtartóból van kivágva, amely szendvicsként helyezkedik el két olyan fal között, amelyek közvetítik a térerot. A vivofolyadékot a csatorna egyik végén vezetik be, és a másik végén távozik. A csatorna speciális méretarányainak következtében a folyadék áramlás sebességprofilja parabola-szerű, azaz a sebesség a középpontban a legnagyobb és a falak felé nulláig csökken. Ahogy a kromatográfiában is, a vizsgálandó mintát a folyadékáramba injektáljuk. **A csatornában a vizsgált mintát a térero az egyik falhoz kényszeríti.** Ennél az úgynevezett akkumulációs

falnál a koncentrációs réteg kialakításának ellenáll a diffúzió. A térerovel ellentétes irányú mozgások a mintából egy anyagködöt idéznek elő, ami az akkumulációs faltól indul ki a közepén nagy sebességgel áramló folyadékáram irányába. A vizsgált mintaelegy egyes mintakomponensei különböző vastagságú ködöt képeznek; amely vastagság a komponensnek a térerovel kialakult kölcsönhatása nagyságától függ. Amíg a köd vastagsága állandó, addig az egyedi részecskék mozgása is állandó. Következésképpen az egész köd vándorol a csatorna hossza mentén olyan sebességgel, amelyet a vívfolyadék sebessége határoz meg a köd súlypontjában. Így, azok a komponensek, amelyek különbözőképpen mozdulnak el a csatorna rétegen keresztül a térero hatására, azok elválnak egymástól.



1. ábra Az FFF elválasztás alapelveinek illusztrálása. Az A komponens sorosabban kényszerül az akkumulációs falhoz, ennek következtében lassabban áramlik a csatornában



2. ábra A field-flow elválasztás (FFF) elvi ábrája

Az FFF módszerek típusai

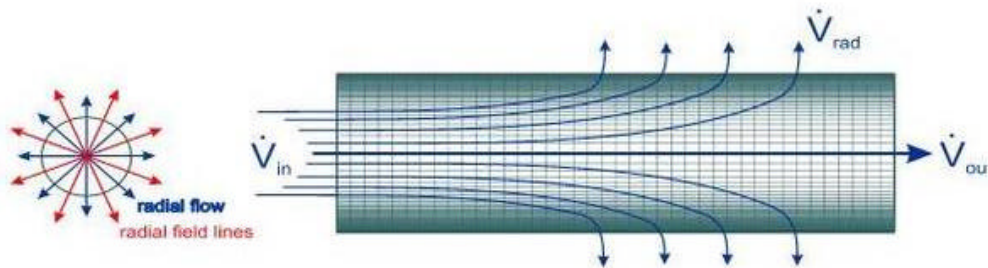
Az FFF módszer-család tagjai abban különböznek egymástól, hogy milyen típusú térerőt alkalmaznak. Az a módszer, amelyet **termikus FFF**-nek neveznek, hogradienst alkalmaz. Ebben az esetben a csatorna távtartója két fémblokk között van, amelyek egyikét futjuk, a másikat pedig hutjük. A h_0 -lépcső (h_0 -gradiens) elérheti a $40,000 \text{ K cm}^{-1}$ értéket. A termikus FFF különösen szabálytalanul csavarodó (random-coil) makromolekulák elválasztására alkalmas, mert az ilyen molekulák szabadenergiájának nagy az entrópia komponense, ami a h_0 -gradiensben való speciális mozgását okozza.

Az **ülepítéses FFF** (sedimentation FFF)-nél a csatorna alakja úgy van kiképezve, körbehajlítva, hogy illeszkedjen egy centrifuga kosarába. A részecskéket a centrifugális erő kényszeríti az akkumulációs falhoz, amely erőhatás nagyságát a centrifuga fordulatszámával és a vizsgált anyag mérete és sűrűsége szabályozza.

Az **elektromos FFF**-nél az elektromos térerőt használják fel az anyagok elválasztására, azok elektroforetikus mozgékonyságának különbsége alapján.

A **flow FFF** (F4) esetén az anyagot félig áteresztő falak között vezetik. Ebben az esetben a két fal, amely szendvicsként közrefogja a távtartót, porózus, hogy átengedje a vivofolyadékot a csatornán keresztirányban. A vizsgált komponenst nem engedi át a porózus fal, csak a vivofolyadékot. A mintakomponenseket ez a keresztirányú folyadékáram kényszeríti az akkumulációs falhoz. A flow FFF a rendelkezésre álló legsokoldalúbb elválasztó rendszer. Ezt alkalmazhatjuk a makromolekulák jellemzésére, le egészen 1000 g mol^{-1} moltömegig és egészen $100 \mu\text{m}$ nagyságú részecskékig.

A proteinek hatékony elválasztására az F4 továbbfejlesztésével a ma legmodernebb módszernek a **hollow fiber flow field-flow fractionation** (HF5) módszer tekinthető [2].



3. ábra A HF5 elválasztás elvi ábrája

A hem transzportfolyamatai a szérumban

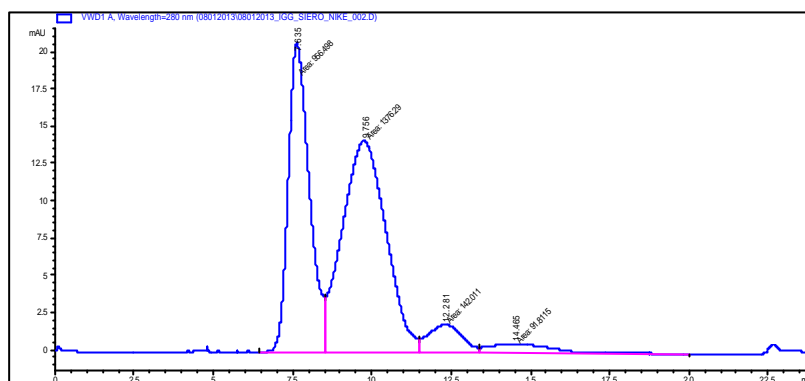
Az érbetegségek, többek között az érlemezés és vaszkuláris kalcifikációk kórlefordulásában a hem-stressznek meghatározó szerepe van. A hemoglobinnal felszabaduló hem károsító hatást fejt ki az érfalra. A haptoglobin hemoglobint képes kötni és neutralizálni, a hemopexin a felszabaduló hem megkötését és biztonságos metabolizmusát teszi lehetővé [3]. A jelen munka célja volt megvizsgálni, hogy az ismert kötőfehérjékön kívül a vérsérumban mely komponensei rendelkeznek előbbiekhez hasonló hem-kötő képességgel.

Ezekhez a vizsgálatokhoz a természetes humán sérumban mintákat Trisacryl® DEAE anioncserélő gyantán szétválasztva 4 fehérjefrakciót kaptunk, amelyeket UV spektrofotometriás detektálással azonosítottunk. Az I. csúcs 99,5%-ban immunglobulin G, a II. 70%-ban transferrin, 20%-ban β -globulin, a III. 78%-ban albumin, 15%-ban α -globulin, a IV. pedig főleg ceruloplazmin. A kidolgozott módszerrel azt vizsgáltuk, hogy a vérsérumban különböző koncentrációban adott hem mely sérumban frakciókhoz kötődik. A frissen vett vérsérumban a hemet 0, 1, 2, 3, 4, 5 μM koncentrációban adva, és inkubálva elvégeztük az ionkromatográfiás elválasztást. Ezután meghatároztuk a fentebb ismertetett fehérjefrakciók vastartalmát grafitkemencés atomabszorpciós spektrofotometriás módszerrel. A fenti módszerrel 1 μM hem koncentrációnál természetes vastartalmat találtunk, azaz a hem nem kötődött az immunglobulin G-hez. Ezzel szemben, ennél nagyobb koncentrációk alkalmazása mellett dózistól függően jelentős mértékű hem-kötődést detektáltunk az IgG csúcs tartományában [4], amit eddig az irodalomban nem írtak le.

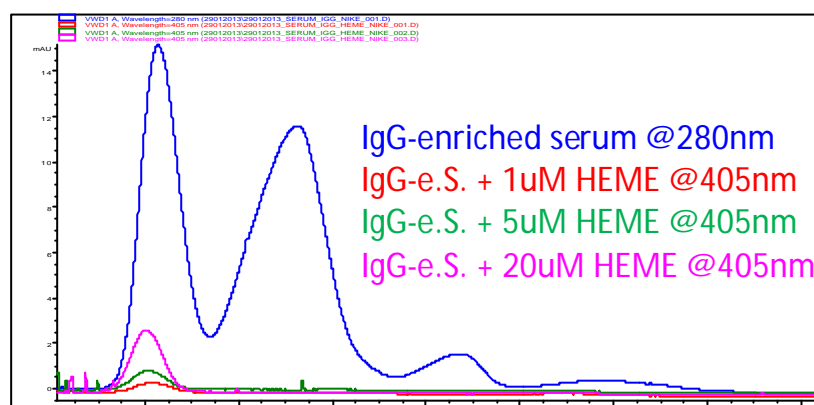
Az IgG hem kölcsönhatás vizsgálata HF5 módszerrel

A további célunk az volt, hogy más független módszerrel ellenőrizzük a hem kötődését az immunglobulin G-hez. Erre a célra a fentebb említett HF5 típusú FFF módszert alkalmaztuk. E vizsgálatokhoz kedvező volt számunkra, hogy a Trisacryl gyantával az immunglobulin G gyakorlatilag tisztán (99,5%-ban) elválasztható a sérumban összes többi alkotójától. Ezt felhasználva különválasztottuk a természetes sérumban IgG frakcióját, amihez növekvő koncentrációban hemet adagoltunk. A különböző (0 – 20 μM) koncentrációjú hemet tartalmazó IgG mintákat Wyatt gyártmányú FFF készüléken HF5

módszerrel tanulmányoztuk. A tiszta IgG és a növekvő hemet tartalmazó IgG fraktogramjait a 4. és 5. ábrán mutatjuk be.



4. ábra Az immunglobulin G HF5 fraktogramja UV detektálással ($\lambda = 280$ nm)



5. ábra Az immunglobulin G fraktogramja növekvő hem jelenlétében.

A 4. ábra szerint az immunglobulin G négy jól elváló frakcióra bomlott. A csúcsok azonosítása további vizsgálatokat igényel, de a csúcsok nagy a valószínűséggel a fehérje asszociátumai (dimer, trimer stb.). Az FFF módszer külön előnye a töltetes kromatográfiás oszlopokkal szemben éppen az, hogy az asszociátumok az elválasztás során nem sérülnek, nem töredeznek szét. Az 5. ábra alapján az állapítható meg, hogy a hem az immunglobulin G-nek tulajdonított első csúcsához kötődik. Ez vélhetően a molekula monomerje, aminek ezek szerint van olyan kötohelye, amihez a hem kapcsolódni képes.

További vizsgálatokra van szükség, hogy egyértelműen megállapíthassuk, hogy az IgG hem-kötő képességgel rendelkezik és hozzájárul a szérum védekező mechanizmusaihoz. Az immunglobulin ezen új funkciója jelentősen bírhat az érbetegségek etiopathogenezisében.

Irodalom

- [1] Schimpf M.E., Caldwell, K. D., Giddings, J. C. (Eds.), Field-Flow fractionation handbook, Wiley-Interscience, New York, 2000.
- [2] Rambaldi, D. C., Reschiglian, P., Zattoni, A., Anal. Bioanal. Chem., 399, 1439-1447 2011.
- [3] Nagy E, Eaton JW, Jeney V, Soares MP, Varga Z, Galajda Z, Szentmiklósi J, Méhes G, Csonka T, Smith A, Vercellotti GM, Balla G, Balla J., Red cells, hemoglobin, heme, iron, and atherosclerosis, Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2010 Jul;30(7):1347-53.
- [4] Posta N. : A hem és a met-hem vérszérumban végbemenő transzportfolyamatainak követése kromatográfiás és atomspektrometriás módszerrel, Pályamunka, Debrecen, 2013.