

Natif ve Denatüre Fibrinojenin Renk Reaksiyonları

Colour Reactions of Native and Denatured Fibrinogen

Nevzat ÖNER ve İlgihan ÖNCEL *

Globüler protein moleküllerinin denatüre şekillerinin natiflerinden farklı özellikler gösterdikleri ve bilhassa bazı renk reaksiyonları tatbik edildiği zaman daha koyu renk verdikleri birçok araştırmacılar tarafından tespit edilmiştir. Denatüre proteinlerin daha fazla reaksiyon kabiliyetini haiz oldukları ilk defa sisteinin sülfhidril gruplarının nitrosoprussiatla pembe renk vermesi ile gösterilmiştir⁽¹⁾. Daha sonra, ferrisiyanür ile titrasyonla⁽²⁾, iyot oksidasyonu veya merkürü p-klorbenzoat ile titrasyonla⁽³⁾ ve polarografi⁽⁴⁾ ile de denatüre proteinlerde daha çok sülfhidril ve disülfür gruplarının bulunduğu meydana çıkarılmıştır. Bundan başka, denatüre proteinlerin, hidroksifenil grupları için karakteristik olan, Folin'in fenol reaktifi ile⁽⁵⁾ ve hem hidroksifenil hem de diazo reaksiyonu veren diğer gruplar için karakteristik olan diazobenzen sülfonat ile⁽⁶⁾ verdikleri renk reaksiyonlarının, natif proteinlerin verdiklerinden daha şiddetli olduğu da tespit edilmiştir.

Globüler protein moleküllerinin natif ve denatüre şekilleri arasında görülen bu farkların fibriler proteinlerde de mevcut olup olmadığını araştırmak bahis konusu olabilir. Bu çalışmada, fibriler bir protein olarak bilinen fibrinojenin⁽⁷⁻⁸⁾ natif ve denatüre şekillerinin Folin'in fenol reaktifi ve diazobenzen sülfonat ile verdikleri renk reaksiyonlarının farklı şiddette olup olmadıkları araştırıldı.

M A T E R Y E L ve M E T O T

Deneylerde sığır fibrinojeni kullanıldı. Bu fibrinojenin hazırlanması için, okzalath sığır plazmasından, Cohn metoduna göre⁽⁹⁾, düşük temperatürde, alkolle çöktürülerek, saf olmayan fibrinojeni havi Cohn fraksiyon I elde edildi. Sonra, bu fraksiyon⁽¹⁰⁾'a göre saflaş-

* Biyokimya Kürsüsü, Eczacılık Fakültesi, Üniversite, İstanbul.

tırıldı. Bunun için Cohn fraksiyon I fosfat tamponunda çözüldü, bu çözeltiye doymuş amonyum sülfat ilâvesiyle fibrinojen çöktürüldü. Santrifüjle ayrılan çökelti 0.3 M KCl de çözüldü ve aynı çözücüye karşı dializ edilerek amonyum sülfat uzaklaştırıldı. Bu suretle elde edilen saf fibrinojenin refraktometrik olarak ölçülen konsantrasyonu % 1 ve pH sı, elektrometrik olarak, 6.0 bulundu.

Folin'in fenol reaksiyonu için Folin - Ciocalteu reaktifi⁽¹¹⁾ ve diazo reaksiyonu için Koessler ve Hanke'nin⁽¹²⁾ diazo çözeltisi kullanıldı.

Kolorimetrik ölçmeler DB model Beckman spektrofotometresi ile yapıldı.

DENEL KISIM

Deneyler natif, ısı veya üre ile denatüre edilmiş fibrinojenlerle yapılmıştır.

I. Natif ve ısı ile denatüre edilmiş fibrinojen ile yapılan deneyler :

25 ml lik bir behere 1 ml % 1 lik fibrinojen çözeltisi ve 17 ml distile su kondu, çözeltinin pH sı 0.1 N NaOH ile 10.5 e ayarlandı ve hacmi distile su ile 20 ml ye tamamlandı. Bundan sonra sekiz adet, zımparalanmış cam kapaklı deney tüpü alındı. Bu tüplerden altısına 20 defa seyreltilmiş ve pH sı 10.5 e getirilmiş fibrinojen çözeltisinden 2 şer ml (1 mg fibrinojen) ve şahit deneyler için kullanılacak olan diğer iki tübe, pH sı 10.5 olan NaOH çözeltisinden 2 şer ml kondu.

Fibrinojen ihtiva eden tüplerden ikisi natif halde bırakıldı. Geri kalan dört tüpten ikisi, kaynar su banyosunda 10 dakika, diğer ikisi ise 30 dakika ısıtıldı. Bu müddetlerin sonunda tüpler akar su altında soğutuldu. Natif, 10 dakika ve 30 dakika ısıtılmış fibrinojenleri ihtiva eden tüplerin ve şahit deney için kullanılacak tüplerin birer tanesine 4 er ml distile su, 3 er ml % 20 lik Na_2CO_3 çözeltisi ve 1 er ml 1 : 3 oranında sulandırılmış Folin - Ciocalteu reaktifi ilâve edildi, karıştırıldı. Mavi renk alan çözeltilerin absorbansı, 30 dakika sonra 650 $\text{m}\mu$ da şahit deneye karşı, okundu.

Geri kalan natif 10 dakika ve 30 dakika ısıtılmış fibrinojenleri havi tüplere ve şahit deney için kullanılacak tübe 3 er ml distile su, 1.8 er ml % 1.1 lik Na_2CO_3 çözeltisi konduktan sonra tüpler buz ile biraz soğutuldu ve herbirine 0.75 er ml buzla soğutulmuş diazo çözeltisi^(9,12) ilâve edildi. Turuncu bir renk alan çözeltilerin absorbansı, 15 dakika sonra 530 $\text{m}\mu$ da şahit deneye karşı, okundu.

II. Natif ve üre ile denatüre edilmiş fibrinojen ile yapılan deneyler :

25 ml lik zımparalanmış cam kapaklı bir mezür içinde, 18 ml distile suda 9.6 g üre ihtiva eden çözeltiye 2 ml % 1 lik natif fibrinojen çözeltisi ilâve edildi, karıştırıldı. Bu suretle 8 M üre çözeltisi içinde çözülmüş olan fibrinojenin bu çözeltisinden, 50 ml lik, zımparalanmış cam kapaklı, iki ayrı mezüre 4 er ml kondu ve bu nümuneler oda temperaturünde 1 saat ve 24 saat bekletildi. 1 saatlik müddet tamamlanırken üç adet daha 50 ml lik mezür alındı; birincisine % 1 lik natif fibrinojen çözeltisinden 0.4 ml (4 mg fibrinojen) ve 3.6 ml distile su, ikincisine 4 ml distile su, üçüncüsüne 4 ml 8 M üre çözeltisi kondu. Bu son üç tübün ve 1 saat 8 M üre çözeltisinde denatüre edilmiş fibrinojeni havi tübün muhteviyatı 20 ml distile su ilâvesi ile 24 ml ye tamamlandı. Bundan sonra, deneylerin dördüne aynı anda Folinin fenol reaksiyonu tatbik edildi, mavi renkli çözeltilerin absoransı, 30 dakika sonra 650 m μ da, okundu.

Müddeti tamamlanınca, 8 M üre çözeltisi ile 24 saat denatüre edilen fibrinojene de aynı şekilde Folin'in fenol reaksiyonu tatbik edildi. Renklenen çözeltilerin absoransı da 30 dakika sonra 650 m μ da, okundu.

Natif ve üre ile denatüre edilmiş fibrinojenlere aynı şekilde diazo reaksiyonu da tatbik edilmiş fakat ortamdaki üre bu reaksiyonu bozduğundan netice alınamamıştır.

Ürenin Folin'in fenol reaksiyonu üzerinde bozucu tesiri olmadığı ayrıca yapılan kontrol deneylerle tespit edilmiştir.

BULGULAR

pH 10.5 de, kaynar su banyosunda, ısı ile denatüre edilmiş fibrinojenin Folin'in fenol reaktifi ve diazobenzen sülfonat ile verdiği renkler natif fibrinojeninkinden daha şiddetlidir (Cetvel 1). Bu renk şiddeti farkları gözle de tefrik edilmektedir.

Cetvel 1. Natif ve ısı ile denatüre edilmiş fibrinojenler ile yapılan renk reaksiyonlarındaki absoranslar.

Renk reaksiyonu	Natif fibrinojen	Denatüre fibrinojen
	A	A
Folin - fenol	0.30	0.35
Diazo	0.31	0.37

Bu fark proteinin kısmî hidrolizine atfedilemez, zira aynı renk şiddeti fazlalaşması üre ile, oda temperaturünde, denatüre edilmiş fibrinojende de müşahade edilmektedir (Cetvel 2).

Cetvel 2. Natif ve üre ile denatüre edilmiş fibrinojenler ile yapılan renk reaksiyonlarındaki absorbanlar.

Renk reaksiyonu	Natif fibrinojen	Denatüre fibrinojen
	A	A
Folin - fenol	0.28	0.36
Diazo	—	—

10 dakika ve 30 dakika ısı ile denatüre edilmiş fibrinojenlerin absorbanları birbirinin aynı olduğu gibi 1 saat ve 24 saat üre ile denatüre edilmiş fibrinojenlerin absorbanları da birbirinin aynıdır.

TARTIŞMA

Elektron mikroskobu ile yapılan araştırmalar fibrinojen molekülünün birbirine lineer, iki dar bağ ile bağlı globüler üç subüniteden ibaret olduğunu göstermiştir⁽¹³⁾. Proteinlerin ısı veya üre ile denatürasyonunda molekülüleriçi ve molekülölerarası hidrojen bağları açılır. Fibrinojen molekülündeki globüler subünitelerin denatürasyonda açılması ile, içeride saklı bulunan grupların açığa çıkması neticesinde bazı renk reaksiyonlarının şiddetlenmesi beklenebilir. Natif fibrinojen sülfhidril grupları için karakteristik olan nitrosoprussiat reaksiyonunu vermediği halde, denatüre fibrinojenin bu renk reaksiyonunu verdiği tespit edilmiştir⁽¹⁴⁾. Fakat, natif fibrinojende gizli veya serbest -SH grupları bulunmadığından⁽¹⁵⁾ denatüre fibrinojenin nitrosoprussiat reaksiyonu vermesi natif globüler subünitelerin içindeki saklı -SH gruplarının denatürasyonda meydana çıktığını değil, molekül içindeki veya yüzeyindeki S-S bağlarının açıldığını göstermektedir. Zira S-S köprüleri globüler subünitelerin içinde veya yüzeyinde bulunabileceği gibi subüniteleri birbirine bağlayan kısımlarda da bulunabilir. Denatürasyonda bütün bu S-S köprüleri açılabilceğinden denatüre fibrinojenin verdiği nitrosoprussiat reaksiyonu globüler bir yapının açıldığını göstermeğe kâfi değildir.

Deneilerimizde denatüre fibrinojenin Folin-fenol ve diazo reaksiyonları ile natifine nazaran daha şiddetli renk reaksiyonu vermesi ise, molekülün ancak globüler subnitelerinin içinde saklı bulunan grupların meydana çıkmasından ileri gelmiş olabilir. Bu netice elektron mikroskobunun ortaya çıkardığı fibrinojen molekülünün yapısı ile kimyasal yönden uygunluk gösteren niteliktedir.

Ö Z E T

Denatüre fibrinojenin Folin'in fenol reaktifi ve diazobenzen sülfonat ile verdiği renk reaksiyonları natif fibrinojeninkinden biraz daha şiddetlidir. Bu neticeler, natif fibrinojen molekülünde elektron mikroskobu ile varlığı gösterilen globüler subnitelerin içinde saklı bulunan bazı grupların denatürasyonda açığa çıkmasından ileri gelmiş olabilir. Bu bulgular fibrinojenin elektron mikroskobu ile tespit edilen molekül yapısı ile kimyasal bakımdan uygunluk gösteren niteliktedir.

S U M M A R Y

The colour reactions given by denatured fibrinogen with Folin's phenol reagent and diazobenzene sulfonate are more intensive than those of native fibrinogen. These results, may be due to some groups, of the globular subunits of native fibrinogen, becoming accessible during denaturation. It is suggested that these findings are, in the chemical standpoint, in accordance with the molecular structure of fibrinogen detected electronmicroscopically.

L İ T E R A T Ü R

1. Heffter, A., *Chem. Ztg.*, **11**, 822 (1907). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **2**, 363 (1945).
2. Mirsky, A. E., Anson, M. L., *J. Gen. Physiol.*, **19**, 45 (1936). - Ref. *J. Gen. Physiol.*, **23**, 247 (1940).
3. McDonell, L. R., *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 288 (1951).
4. Brdicka, R., Klumpar, J., *Casopis Českoslov. lékarnictva*, **17**, 243 (1937). - Ref. Haurowitz, F., *The Chemistry and Functions of Proteins*, 162, Academic Press, New York (1963).
5. Herriot, R. M., *J. Gen. Physiol.*, **19**, 283 (1935). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **2**, 364 (1941).
6. Haurowitz, F., Tekman, S., *Biochem. Biophys. Acta*, **1**, 484 (1947).
7. Astbury, W. T., *Compt. rend. trav. lab. Carlsberg*, **22**, 45 (1938). - Ref. *Advanc. Prot. Chem.*, **12**, 36 (1957).
8. Astbury, W. T., *Trans Faraday Soc.*, **34**, 378 (1938). - Ref. *ibid.*, **12**, 36 (1957).
9. Cohn, E. J. et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946).
10. Laki, K., *Arch. Biochem. Biophys.*, **32**, 317 (1951).

11. Folin, O., Ciocalteu, V., *J. Biol. Chem.*, **73**, 627 (1927).
12. Koessler, K., Hanke, M. T., *ibid.*, **39**, 497 (1919).
13. Hall, C. E., Slayter, H. S., *J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **5**, 11 (1959). - Ref. Federation Proc., **24**, 784 (1965).
14. Scheraga, H. A., Laskowsky, M. Jr., *Advanc. Prot. Chem.*, **12**, 46 (1957).
15. Bagdy, D. et al., *Hung. Acta Physiol.*, **1**, 6 (1948). - Ref. *Nature (London)*, **166**, 694 (1950).

(Redaksiyona verildiği tarih : 2 Aralık 1967)