

Thesis Title FERRITIN AND ISOFERRITIN LEVELS IN SERUM OF CANCER
PATIENTS

Author MISS KALAYA IAMSUPANIMIT

M.Sc. BIOCHEMISTRY

Examining Committee

Assoc. Prof. Dr. Maitree Suttajit,	Chairman
Dr. Sukanya Linpisarn	Member
Assist. Prof. Dr. Vichai Wongchai	Member
Dr. Pornngarm Limtrakul	Member
Prof. Dr. Kannika Phornphutkul	Member

ABSTRACT

Ferritin is a glycoprotein for iron storage and found mainly in cytoplasm of liver and spleen. This study was undertaken to determine ferritin and isoferritin in patients with lung cancer, liver cancer and other lung diseases by using the developed ELISA kit.

The splenic tissue was homogenised, heated at 70 - 75 C° for 10 min and its supernatant was purified by Sephadex G-200 gel filtration. The purified ferritin yield was about 1%. The antiserum to ferritin was raised in rabbits by subcutaneous injection of 1 mg/ml of purified ferritin. The titer tested by immunodiffusion was > 1:16. Then immunoglobulin G fraction (IgG) was precipitated from antiserum with saturated ammonium sulphate and purified by ferritin-Sepharose 4B column. The anti-ferritin (IgG) was conjugated with horseradish peroxidase. The ferritin assay system was developed and compared with

Amersham and Boehringer Mannheim kit. The results showed good correlation ($r = 0.9581$ and 0.9348 respectively) The cost per test was much economical cheaper than any commercially available reagent. Thus, the developed ELISA kit for ferritin is suitable to be used in routine laboratory.

Ferritin and iso ferritin were determined in sera obtained from lung cancer, liver cancer and other lung disease patients by microtiter-plate ELISA method. It was found that the average total ferritin in serum from patients with lung cancer ($N = 68$) was 494.70 ± 341.10 ng/ml, liver cancer ($N = 58$) was 529.00 ± 389.90 ng/ml and other lung diseases ($N = 26$) was 207.77 ± 206.43 ng/ml. Values determined in cancer patients were significantly higher than that in other lung disease patients and the values in these three groups were higher than that in normal healthy subjects ($p < 0.001$; normal ferritin values $10 - 365$ ng/ml)

Glycosylated and non-glycosylated iso ferritin in serum were also separated by con A-Sep 4B affinity chromatography, then determined by the ELISA method. The results showed that non-glycosylated iso ferritin in cancer and other lung disease patients were significantly higher than that in the normal. The glycosylated iso ferritin in cancer patients were higher than that in the normal but no significant difference was found between other lung disease patients and normal healthy subjects. The percentage of glycosylated iso ferritin separated by con A - Sep 4B in lung cancer ($N = 15$) and liver cancer ($N = 12$) were 15.13 ± 13.65 and 35.87 ± 11.55 respectively. The results were significantly lower than that in normal healthy subjects

(66.11 ± 14.58 , $p < 0.001$). When tachyplin-Sep 4B was used, the percentage of glycosylated isoferritin were 64.23 ± 19.46 and 71.68 ± 18.73 which were significantly higher than that in normal healthy subjects. (28.01 ± 17.18 , $p < 0.001$). This difference might be due to the higher sialylation of ferritin in the tumor cells.

Therefore, the determination of total ferritin and isoferritin in serum can be used as a tumor marker in diagnosis and effective follow-up of lung and liver cancers.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ระดับเพอร์วิตินและ ไอ โซเพอร์วิตินในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็ง

ชื่อผู้เขียน นางสาว กัลยา เอี่ยมศุภนิมิตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

รศ.ดร. ไมตรี สุทธจิตต์	ประธานกรรมการ
ดร. สุกัญญา ลินนิศาล	กรรมการ
ผศ.ดร. วิชัย วงศ์ไชย	กรรมการ
ดร. นรงาม ลัมตระกูล	กรรมการ
ศ.พญ. กรรณิการ์ พรพัฒน์กุล	กรรมการ

บทคัดย่อ

เพอร์วิตินเป็นไกลโคโปรตีนทำหน้าที่เก็บสะสมเหล็กในร่างกาย ส่วนมากพบในไซโทพลาสซึมของตับและม้าม การวิจัยนี้เพื่อศึกษาระดับเพอร์วิตินและ ไอ โซเพอร์วิติน ในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอดและตับ และโรคปกคอื่น ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพดีด้วยวิธีเอ็นไซม์อิมมูโนแอสเสย์โดยชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นเอง.

เพอร์วิตินสกัดได้จากม้ามของผู้ป่วยธาลัสซีเมีย โดยให้ความร้อนที่ 70-75 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที นำส่วนที่ละลายมาทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ Sephadex G-200 ได้ yield เท่ากับ 24.16 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำเพอร์วิตินที่สกัดได้ 1 มก./มล. ฉีดเข้าใต้ผิวหนังของกระต่ายเพื่อกระตุ้นให้สร้างแอนติบอดี ทดสอบไตเตอร์โดยวิธีอิมมูโนดิฟฟิวชัน ได้ค่า > 1:16 จากนั้นจึงสกัดส่วนที่เป็นอิมมูโนโกลบูลิน G ต่อเพอร์วิติน โดยตกตะกอน ด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่อิ่มตัวแล้ว ทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านคอลัมน์ ferritin - Sep 4B นำอิมมูโนโกลบูลิน G ไปคอนจูเกตกับเอ็นไซม์เปอร์ออกซิเดส เพื่อใช้สำหรับวัดปริมาณเพอร์วิติน เมื่อเปรียบเทียบชุดน้ำยาสำเร็จรูปที่พัฒนาขึ้นเอง กับชุดน้ำยาสำเร็จรูปของบริษัท Amersham และ Boehringer Mannheim พบว่าน้ำยาสำเร็จรูปที่เตรียมได้เองมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับของบริษัท ($r =$

0.9581 และ 0.9348 ตามลำดับ) ราคาไม่แพงและลดค่าใช้จ่ายได้มาก ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ประโยชน์ในการตรวจวัดปริมาณเพอร์ริตินในซีรัมในห้องปฏิบัติการ.

จากการศึกษาระดับเพอร์ริตินและไอโซเพอร์ริตินในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอด มะเร็งตับ และโรคปอดอื่นๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีสุขภาพดี โดยวิธีอิมมูโนแอสซายแบบไมโครไตเตอร์เพลต พบว่าระดับเพอร์ริตินในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งปอด (68 ราย) เท่ากับ 494.70 ± 341.10 นาโนกรัม/มล. และผู้ป่วยโรคมะเร็งตับ (58 ราย) 529.00 ± 389.90 นาโนกรัม/มล. และผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ (26 ราย) เท่ากับ 207.77 ± 206.43 นาโนกรัม/มล. ระดับเพอร์ริตินในผู้ป่วยมะเร็งทั้งสองชนิดสูงกว่าในผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ และระดับเพอร์ริตินในผู้ป่วยทั้งสามกลุ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) ค่าปกติของเพอร์ริติน 10-365 นาโนกรัม/มล.

นอกจากนี้ยังได้ทำการแยกเพอร์ริตินในซีรัมออกเป็น ไอโซเพอร์ริตินที่ประกอบด้วยน้ำตาลและไอโซเพอร์ริติน ที่ไม่ประกอบด้วยน้ำตาล ด้วยคอลัมน์ con A-Sep 4B แล้ววัดระดับไอโซเพอร์ริตินด้วยวิธีอิมมูโนแอสซาย พบว่า ระดับไอโซเพอร์ริตินที่ไม่ประกอบด้วยน้ำตาลในซีรัมของผู้ป่วยมะเร็งและผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับไอโซเพอร์ริตินที่ประกอบด้วยน้ำตาลในผู้ป่วยมะเร็งก็สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่าง ผู้ป่วยโรคปอดอื่นๆ และกลุ่มควบคุม เปอร์เซ็นต์ของไอโซเพอร์ริตินที่ประกอบด้วยน้ำตาลที่แยกโดยคอลัมน์ Con A - Sep 4B ในผู้ป่วยมะเร็งปอด (15 ราย) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 25.13 ± 13.65 และผู้ป่วยมะเร็งตับ (12 ราย) มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 35.87 ± 11.55 ค่าเปอร์เซ็นต์นี้ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (66.11 ± 14.58 , $p < 0.001$) แต่เมื่อแยกโดยคอลัมน์ tachylin-Sep 4B พบว่าค่าเปอร์เซ็นต์ของไอโซเพอร์ริตินที่ประกอบด้วยน้ำตาลในผู้ป่วยมะเร็งปอด เท่ากับ 64.23 ± 19.46 และผู้ป่วยมะเร็งตับเท่ากับ $71.68 \pm 18.73\%$ ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ (28.01 ± 17.18 , $p < 0.001$). ความแตกต่างนี้อาจเนื่องจากการเติมกรดไฮออลิกในเพอร์ริติน ในเซลล์มะเร็งมากกว่าในเซลล์ปกติ

สรุปว่า การวัดระดับเพอร์ริตินและไอโซเพอร์ริตินในซีรัม สามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นทูเมอร์มาร์กเกอร์ ของผู้ป่วยมะเร็งปอดและมะเร็งตับ เพื่อช่วยให้การติดตามผลการรักษาแม่นยำและมีประสิทธิภาพมากขึ้น