

Süzgeç Kâğıtlarına Emdirilen Kan ve Serum Örneklerinde, Raket Elektroforezi Yöntemiyle Apolipoprotein B Tayini

Asuman H. GÜLER*
Aynur KARAGÖZ**
Kemal ÖZKAN***

ÖZET

Çalışmamızda, süzgeç kağıdına emdirilen kan ve serum örneklerinde, Raket elektroforezi yöntemiyle Apolipoprotein B (Apo B) miktar belirlenimi yapıldı. Aynı olguların serumlarında Radyal İmmun Diffüzyon (RID) yöntemiyle saptanan Apo B değerleri ile, diğer 2 yöntemde saptanan değerler istatistiksel açıdan kıyaslandı.

Elde ettiğimiz sonuçlar kaynak verileriyle de uyumlu olup, kanda Raket elektroforezi yönteminin aynen serum gibi çalışılabileceğini ve güvenilir olduğunu gösterdi.

SUMMARY

Apolipoprotein B Measurement in the Samples of Blood and Serum Spotted on Filter Paper

In our investigation, Apolipoprotein B (Apo B) measurement has been done with the method of Rocket electrophoresis, using the samples of blood and serum which have been spotted on filter papers. In the serum of the same individuals, Apo B values found with the method of Radial Immun Diffusion (RID) and values found with the upper 2 methods have been compared statistically.

The results we had at last, were in harmony with the source data. It has showed us that the method of Rocket electrophoresis in blood, could work just like serum, and it also showed us that it is believable.

* Yard. Doç. Dr.; U. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

** Araş. Gör.; U. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

*** Prof. Dr.; U. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı.

Son yıllarda insan serum lipoproteinleri, içerdikleri apolipoproteinler sayesinde, immunokimyasal teknikler kullanılarak 3 gruba ayrılmaktadır. Bunlar çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL), düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) dir¹.

Apolipoproteinlerin ölçümünde yararlanılan immunokimyasal yöntemler immunolojik olmayan yöntemlere göre (kromatografi, izoelektrik foküsleme, poliakrilamid jel elektroforezi gibi) daha hassas, özgün ve tekrarlanabilir özelliktedir^{2,3}.

Immunokimyasal yöntemler arasında Radyal immünodiffüzyon (RID), immünonefelometri (INA), ELİSA (Enzyme-linked immunosorbent assay), Floresans immunodeneş (FIA), Radyo immün deneş (RIA) ve Elektro immün deneş (EIA) sayılabilir⁴⁻⁷.

EIA veya Raket yöntemi immunopresipitasyon tekniklerine göre daha hassas ve hızlıdır. Klasik yöntemde elektroforez, içinde antikor bulunan agar veya agoroz içinde yapılır. Antijen içeren numuneler, jelde açılmış belli çapta kuyulara tatbik edilir. Oluşan piklerin boyu kan veya serum numunesindeki antijen miktarı ile orantılıdır. EIA'da roketin oluşumu, elektroforez esnasında tamponun içeriğı, antikor miktarı ve agoroz jel içindeki iç değışmelere bağılıdır⁸.

Apolipoprotein B (Apo B), LDL'nin başlıca taşıyıcı proteindir. Familial hiperlipoproteinemi Tip II de (FH-II) büyük miktarlarda bulunur. Apo B nin aort intimasına yerleştiğı ve atherosklerozun oluşumunda etkili olduğı saptanmıştır^{9,10}.

İşte bu çalışmamızda, atheroskleroz açısından önemi düşünülerek, toplumda serum Apo B seviyesinin tayininde geniş taramalar yapılabilmesine olanak verecek, hem de uygulama kolaylığı ve düşük maliyete sahip bir yöntem kurmayı amaçladık. Bunun için Laurell'in Raket elektroforez yöntemini¹¹ bazı değışikliklerle uygulayarak elde ettiğimiz sonuçları hem referans yöntem olarak çalıştığımız RID yöntemi sonuçları ile hem de kaynak araştırmalarımız sonucu elde ettiğimiz verilerle kıyaslayarak yöntemimizin güvenilirliğini göstermek istedik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Laurell'in Raket elektroforez yöntemi bazı yönlerden modifiye edilerek, kurutma kağıdına emdirilmiş kan ve serum numunelerinde, Apo B miktar belirtimi yapılan bu çalışmada kullanılan başlıca araç ve araçlar şunlardı¹²⁻¹⁶:

Barbital tampon (0.1 M, pH: 8.2) için "5-5-Diethylbarbituric acid" (Barbital, Merck Art No: 500535) ve "5-5-Diethylbarbituric acid sodium" salt (Barbital sodium, Merck Art No: 500538) kullanıldı.

Agorose-L (Behringwerke K.- Lot No: 252011 A) den 2 değışik konsantrasyonda jel hazırlandı. Bunlardan % 0.5'lik agoroz jel (distile suda), cam plağı kaplamak içindi. % 1.5'luk agoroz jel ise aplikasyonların yapılacağı jel tabakası için kullanıldı.

Boyama çözeltisinde "Coomassie Brilliant Blue" (Merck Art No: 15444) kullanıldı (5 gr boya, 450 ml alkol, 100 ml asetik asit, 450 ml distile su).

Renk giderme çözeltisi ise % 5'lik asetik asitti (CH₃.COOH, Merck Art No: 56).

Olgulardan alınan kan ve serumlar 2 no'lu Whatman süzgeç kağıdına emdirildikten sonra, oda ısısında kurutulularak, + 4°C de buzdolabında saklandı. Maksimal

saklama süresi 4 hafta olarak belirlendi. Ayrıca RID yönteminde kullanılacak serum numuneleri de ufak akrilik tüplere konarak ağızları parafilmle kapatıldıktan sonra - 20°C de kullanım öncesine kadar saklandı.

İyice temizlenmiş cam plaklar (110x100x1.5 mm, Behringwerke) üzerine önce % 0.5'lik, sonra % 1.5'lük jel, tabaka halinde yayıldı. Hazırlama esnasında % 1.5 luk jel içine 60 µl antiserum (Human-Antilipoprotein B, Behringwerke Ch. - B/Lot No: 042232 D) ilave edildi.

4 V/cm de, 10 dakika preelektroforezden sonra süzgeç kağıdına emdirilmiş Apo B standardı, serum ve kan numunelerinden zımbayla 5 mm çapında diskler hazırlanarak jelin (-) kutbuna, kenardan 1 cm içerde olacak şekilde yerleştirildi. 4 V/cm de elektroforeze 16 saat, + 4°C da devam edildi.

Aynı koşullarda Apo B standartlarının (Apolipoprotein B-Standart Serum, Behringwerke, Ch.-B/Lot No. 104917 F) çeşitli konsantrasyonları ile elektroforez yapılarak standart kalibrasyon eğrisi elde edildi.

Ayrıca aynı olguların serum numunelerinde RID yöntemiyle⁵⁻⁸ Apo B tayini yapıldı. Bu amaçla, ticari Behringwerke NOR-Partigen Apo B immunodiffüzyon plağı (Ch.-B/Lot No. 054944) kullanıldı.

BULGULAR

Çalışmamızda, kan ve serumda modifiye Laurell'in elektroforez yöntemi ve serumda RID yöntemi ile Apo B miktar belirlimi yapıldı. Sonra 3 yöntemle saptanan Apo B değerlerinin dağılımı istatistiksel yöntemlerle incelendi.

20 olguda gerçekleştirdiğimiz bu yöntem çalışmamızda, kanla çalışılan Raket elektroforezinde Apo B ortalama değeri ($\bar{x} \pm SH$) % 85.8 ± 1.3 mg, serumla çalışılan Raket elektroforez yönteminde ise % 83.9 ± 1.5 mg olarak bulundu. İki yöntem arasında istatistiksel açıdan önemli bir fark saptanamadı (Tablo: I). Kan ve serumda çalışılan yöntemlerde hesapladığımız % CV değerleri de birbirine yakındı. Kanla çalışılan yöntemde CV değeri % 8.23 iken, serumla çalışılan yöntemde CV'nin % 7.82 olduğu görüldü.

Referans yöntem olarak çalıştığımız RID yöntemiyle aynı olguların serum numunelerinde saptadığımız Apo B ortalama değerleri ise ($\bar{x} \pm SH$) % 83.2 ± 1.6 mg idi. RID yönteminin değişim katsayısı (% CV) % 11.12 olarak saptandı.

Tablo: I
Kanda ve Serumda Laurell'in Raket Elektroforezi
Yöntemi İle Apo B Değerlerinin Dağılımı

Ölçülen Değerler	Yöntemler		
	Kanda n = 20 ($\bar{x} \pm SH$)	Serumda n = 20 ($\bar{x} \pm SH$)	P
Apo B (% mg)	85.8 ± 1.3	83.9 ± 1.5	A.D.

n = Olguların sayısı

A.D. = Yöntemlerin birbirine göre farkı anlamlı değil.

RID yönteminde bulunan serum Apo B ortalama değerleri ile kan ve serumda çalışılan Laurell'in Raket elektroforezi yöntemine göre saptanan ortalama Apo B değerleri, istatistiksel yöntemlerle kıyaslandığında, gruplar arasında gene önemli bir fark olmadığı görüldü (Tablo: II).

Tablo: II
Laurell Raket Elektroforezi Yöntemiyle Çalışılan Kan ve Serum Ortalama Apo B Değerlerinin RID Yöntemiyle Çalışılan Serum Ortalama Apo B Değerleriyle Karşılaştırılması

YÖNTEMLER	n	Ölçülen Parametreler		
		Apo B (% mg) $\bar{x} \pm SH$	t	P
RID	20	83.2 \pm 1.6	—	—
Kanda Raket Elektroforezi	20	85.8 \pm 1.3	1.729	A.D.
Serumda Raket Elektroforezi	20	83.9 \pm 1.5	0.688	A.D.

A.D.: RID yöntemine göre anlamlı değil.

TARTIŞMA

Familiyal hiperlipoproteinemi Tip II (FH-II) dominant geçişli, hem homozigot hem de heterozigotlarda hiperkolesterolemi, tendon ve derialtı ksantomları ve pre-matür kalp hastalığı ile karakterize bir hastalıktır¹⁷. Semptomlara sık rastlandığı için FH-II hakkındaki çalışmalar heterozigot kişiler üzerinde yoğunlaşmıştır. Apo B seviyesi yüksek olan bu olgularda myokard enfarktüsü erken görülüp genellikle ölümlü sonuçlanır. FH-II heterozigotların taranarak saptanması ile, atherosklerozdan korunma ve erken tedavi amaçlanmaktadır. İşte bu amaçla Apo B ölçümü, tarama programlarında FH-II'nin saptanması için en güvenilir bulgu olduğundan önem kazanmıştır.

İlk defa sıçan serumunda RIA ile Apo B tayini yapılmaya çalışılmıştır¹⁸. Daha sonra, 1977 yılında A.C. Onitiri ve B. Lewis Raket elektroforezi yöntemi ile Apo B ölçümü yaparak, erişkinlerde ortalama Apo B değerini 77 ± 18 mg/dl bulduklarını bildirmişlerdir¹.

1978 yılında Amerika'da yapılan bir araştırmada serum Apo B miktar belirleniminde EIA, RIA ve RID yöntemleri kullanıldığında, EIA ve RIA yöntemleriyle bulunan sonuçların aynı olmasına rağmen, RID yöntemi ile elde edilen sonuçların % 4-8 miktarında yüksek olduğu belirtilmektedir. Bu çalışmada EIA (Raket elektroforezi) ile normal erişkinlerde saptanan Apo B değeri 98 ± 2 mg/dl, bizim sonuçlarımızla uyumludur⁸.

1984 yılında Oswald B. ve arkadaşları¹⁹ Apo AI ve Apo B miktar belirtimi için Raket elektroforezini modifiye ederek çalışmalar yapmışlar. 1983 yılında Metel'skai ve arkadaşları²⁰ iskemik kalp hastalığı olan kişilerde Raket elektroforezi yöntemi ile Apo AI ve Apo B tayini yaparak hiperlipidemi Tip II a ve Tip II b'de HDL₂ ü oluşturan Apo AI'yi düşük, Apo B değerlerini ise yüksek bulduklarını belirtmektedirler. Bu da hiperlipidemi Tip II a ve Tip II b'de atheroskleroz riskinin yüksek olduğu görüşünü destekleyen önemli bir bulgudur.

1981 yılında Havekes ve arkadaşları²¹ plazmada Raket elektroforezi ve RİD ile Apo B tayini yaparak, iki yöntemle elde edilen sonuçların uyumlu olduğunu vurgulamaktadırlar.

1985 yılında Dudman P.B.N. ve arkadaşları⁹ erişkinde familial tip II hiperkolesterolemi tayini için filtre kağıdına alınmış kan numunelerini RİD yöntemi ile çalışarak ortalama Apo B konsantrasyonlarını 76.5 mg/dl saptadıklarını belirtmişlerdir.

Rifai N. ve arkadaşları²² 1986 da serum Apolipoproteinleri için immunoturbidimetrik bir yöntem geliştirerek, RİD yöntemiyle kıyaslayınca, RİD yöntemi ile elde edilen sonuçların daha düşük olduğunu belirtmektedirler. Bu araştırmacılar, immunoturbidimetrik yöntemle, sağlıklı erişkin insandaki Apo B değerini 115 mg/dl olarak saptamışlardır.

RİA yöntemini Apo B tayininde kullanan diğer bir grup araştırmacı ise 13-42 yaş grubunda bunun, ortalama 83 ± 16 mg/dl olduğunu belirtmektedir²³. Gene John J. Albers ve arkadaşları da¹⁸ normolipidemik ve hiperlipidemik olgularda plazma Apo B değerlerini RİA ile (Çift Antikorlu İmmunoassay) ölçtüklerinde, sağlıklı kişilerde total Apo B değerini % 81 mg bulurken, LDL Apo B'sini % 72 mg bulduklarını ve bu değerlerin RİD yöntemi ile kıyaslandığında uyumlu olduğunu belirtmektedirler.

Raket elektroforezi RİD yöntemine göre daha hassas, RİA, ELİSA, İNA yöntemlerinden daha az hassas bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Uzun zaman isteyen bir yöntemdir. Buna karşın ucuz, kolay yapılabilen, rutin çalışmalar için laboratuvarlarda uygulanmaya elverişli bir yöntemdir. Hem kanla hem de serumla çalışılabilir. Kan ve serum numuneleri istenirse kuyulara koyulur veya bizim modifiye ettiğimiz gibi süzgeç kağıtlarına emdirildikten sonra belli çapta diskler hazırlanır. Jel üzerine bu diskler yerleştirilerek çalışılabilir.

SONUÇ

Kanla Raket elektroforezi, serumla Raket elektroforezi ve RİD ile saptadığımız Apo B ortalama değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark gözlenmedi.

Çalışmamızda karşılaştığımız bir sorun elektroforez esnasında barbiturik asit kristallerinin belli bir süre sonra (+) kutup elektrodunu kaplayarak akım geçişini engellemesiydi. Bu problem 6 saatte bir tankla birlikte tampon değiştirilerek çözümlenmeye çalışıldı.

Serumda Raket elektroforez yöntemi ile bulunan ortalama değerlerin, kanda çalışılan yöntemle kıyasla kaynak verilerine daha uygun olduğu görüldü. İki yöntem arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark olmaması ve kanda Raket elektroforez yönteminin işlem açısından daha pratik ve kolay olması nedeniyle biz kanda Raket elektroforez yöntemini aynen serumla çalışılan Raket elektroforez yöntemi gibi çalışabileceğini ve güvenilir sonuçlar alınabileceğini savunuyoruz.

KAYNAKLAR

1. ONITIRI, A.C., LEWIS, B.: Measurement of the Apoproteins of Human Serum Lipoproteins by Rocket Immuno-electrophoresis. *Clin. Chem. Acta*, 79: 39-45, 1977.
2. TIETZ, N.W.: *Textbook of Clinical Chemistry*. W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1986, p. 853.
3. HENRY, R.J., CANNON, D.C., WINKELMAN, J.W.: *Clinical Chemistry Principles and Technics*. 2 nd ed., Harper and Row Publishers, New York, Evanston, San Francisco, London, 1974, p. 1496-1509.
4. CROWLE, A.J.: *Immunodiffusion*, Academic press, 2 nd ed., New York, 1971, p. 357-361.
5. ROSSENEU, M., VERCAEMST, R., STEINBERG, K.K.: Some considerations of methodology and standardization of apolipoprotein B immunoassays. *Clin. Chem.*, 29: 422-433, 1983.
6. HOLMQUIST, L.: Quantitation of human serum apolipoprotein B by enzyme immunoassay. *Clin. Chim. Acta*, 121: 327-336, 1982.
7. STEIN, E.A., PESCE, A.: Enzyme-linked immunoassays for apolipoproteins: Advantages, problems and prototype assay. In: *Proceedings of the workshop on Apolipoprotein Quantification*. K. Toppel, Ed. U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No: 83-1266, 1983, p. 319-331.
8. CURRY, M.D., GUSTAFFSAN, A., ALAUPOVIC, P., MC CONATHY, W.J.: Electroimmunoassay, Radioimmunoassay and Radial Immunodiffusion Assay Evaluated for Quantification of Human Apolipoprotein B. *Clin. Chem.* 24/2, 280-286, 1978.
9. DUDMAN, P.B.N., BLADES, L.B., WILEKEN, D.E.L., AITKEN, M.I.: Radial Immunodiffusion Assay of Apolipoprotein B in Blood Dried on Filter Paper a Potential Screening Method for Familial type II hipercholesterolemia. *Clin. Chem. Acta*. 149: 117-127, 1985.
10. AVOGARO, P., BITTOLO, B.G., CAZZOLATO, G.: Plasma levels of apolipoprotein AI and apolipoprotein B in human atherosclerosis. *Artery*, 4: 385-394, 1978.
11. LAURELL, C.B.: Electroimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, 29 (Suppl. 124): 21-37, 1972.
12. NERENBERG, S.T.: *Electrophoretic Screening Procedures*. (ed.: French, M.R., Eichman, M., Fiorella, B.J.) Lea and Febiger, Philadelphia, 1973, p. 59-60.
13. WILLIAMS, C.A., CHASE, M.W.: *Methods in Immunology and Immunochimistry*. Vol III. Academic Press. New York, 1971, p. 372-373.
14. WILLIAMS, C.A., CHASE, M.W.: *Methods in Immunology and Immunochimistry*. Vol II. Academic Press. New York, 1968, p. 251-254.
15. BECKER, W., SIEBER, A.: *Methods of Qualitative and Quantitative Immunoelectrophoresis*. Farbwerke, Hoechst A.G. 6230 Frankfurt (Main) 80. Behring Department. 1975, p. 12-15.

16. VLADUTIU, G. D., GLUECK, C. J., SCHULTZ, M. T., MC NEELY, S., GUTHRIE, R.: B-Lipoprotein Quantitation in Cord Blood Spotted on Filter Paper: A Screening Test. *Clin. Chem.*, 26/9: 1285-1290, 1980.
17. WILLIAMS, R.H. (ed): *Textbook of Endocrinology*. 5 th ed. W.B. Saunders Company, Philadelphia, London, Toronto, 1974, p. 916.
18. ALBERS, J.J., CABANA, G.V., HAZZARD, R.W.: Immunoassay of Human Plasma Apolipoprotein B. *Metabolism*, 24, 12: 1339-1350, 1975.
19. OSWALD, B., WINKLER, L., SCHLAG, B., DARGEL, R.: A Simple Procedure for the Simultaneous Determination of Apolipoproteins A, and B using Rocket Immunelectrophoresis. *Med. Lab. Diagn.*, 25/8: 411-416, 1984.
20. METEL'SKAI, V.A., PEROVA, N.V., CHERNYSHEVA, N.P.: Apolipoproteins A-1 and B of the Blood Plasma and Apolipoproteins A-1 of 2 High-Density Lipoprotein Subclasses in ischemic Heart Disease Patients with Various Lipoprotein, *Spektra Biull Vsesoiuznogo, Kardiol. Naudin Tsentra*, 6/1: 83-89, 1983.
21. HAVEKES, L., HEMMINK, J., WIT, E.: Low-Density Lipoprotein Apolipoprotein E in Plasma as Measured by Radial Immunodiffusion and Rocket Immunelectrophoresis. *Clin. Chem.*, 27/11: 1829-1833, 1981.
22. RIFAI, N., KING, M.E.: Immunoturbidimetric Assay of Apolipoproteins A, AI, AII and B in serum. *Clin. Chem.*, 32/6: 957-961, 1986.
23. SHONFELD, G., LEES, S.R., GEORGE, P.K., PLEGER, B.: Assay of Total Plasma Apolipoprotein B concentration in Human Subjects. *J. Clin Invest.*, 53: 1458-1467, 1974.

Yrd. Doç. Dr. Asuman H. GÜLER

U. Ü. Tıp Fakültesi

Biyokimya Anabilim Dalı

BURSA