

Gama Globulin Fraksiyonunun Radyal İmmüdifüzyon ve Elektroforez İle Değerlendirilmesi*

Pınar Tuncel**, Ayçe Müftüoğlu**

ÖZET. Çalışmamızda serum proteinlerinde gama globulin bölgesine göç eden immünglobulinlerin elektroforez ve radyal immüdifüzyon yöntemleri ile ölçüldüklerinde aynı değerleri verip vermediğini ve aralarındaki ilişkiyi araştırdık. Bunun için 45 hasta serumunda sellüloz asetat elektroforezi ve radyal immüdifüzyon çalıştık. Elektroforez ile elde ettiğimiz gama globulin değerlerini radyal immüdifüzyon ile elde ettiğimiz IgA, IgG ve IgM konsantrasyonlarının toplamı ile karşılaştırdık. Elektroforez ile elde ettiğimiz sonuçlar radyal immüdifüzyon ile elde ettiğimiz immünglobulinlerin toplamına göre 42 hastada (% 93) daha düşüktü. Sonuçları student t testine göre değerlendirdiğimizde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğunu saptadık ($p < 0.01$).

Anahtar Kelimeler .Gama globulin fraksiyonu .radyal immüdifüzyon .sellüloz asetat elektroforezi.

The Evaluation of Gamma Globulin Fraction by Electrophoresis and Radial Immunodiffusion

SUMMARY. In this study we planned to see if we will obtain the same results with electrophoresis and radial immunodiffusion in evaluating the gamma-migrating immunoglobulins and the relationship between the two methods. We performed cellulose acetate electrophoresis and radial immunodiffusion on 45 sera. We compared the gamma globulin values with the sum of IgA, IgG and IgM concentrations we got from radial immunodiffusion. Radial immunodiffusion results were consistently lower than the results we got with electrophoresis. When we evaluated the results according to student t test we found that the difference between them is statistically significant ($p < 0.01$).

Key Words .Gamma-migrating globulins .radial immunodiffusion .cellulose acetate electrophoresis.

Protein elektroforezi günümüzde Biyokimya laboratuvarlarında sık olarak uygulanan bir analizdir. Total protein, albumin, globulin ölçümlerinin yanısıra globulin fraksiyonunu daha alt gruplara ayırması ve bunlar hakkında tek tek bilgi sağlaması açısından önemlidir. Bazı hastalık durumlarında tanı koymada veya ayırıcı tanıya gitmede önemli yer tutmaktadır. Özellikle multipl myeloma, nefrotik sendrom, ağır karaciğer hastalıkları, akut faz reaksiyonu, alfa 1

antitripsin eksikliği ve bazı paraproteinemilerde spesifik örüntüleri nedeni ile klinik tanıda özel bir önemi vardır.

Fakat günümüzde immunolojinin gelişimi nedeni ile çeşitli spesifik antiserumların elde edilmesi sonucu serum proteinlerinin spesifik olarak ölçümlerinin yapılması yaygınlaşmıştır. Protein elektroforezinde gama bandını oluşturan immünglobulinlerin de spesifik antiserumlarını kullanarak tek tek konsantrasyonlarını saptamak mümkündür.

Biz de çalışmamızda farklı temele dayanan iki metod ile gama globulin fraksiyonunu değerlendirdik. Rutin olarak kullanılan farklı metodlar ile elde edilen sonuçların birbiri yerine kullanılıp kullanılmaya-

* Bu çalışma 1992 11. Ulusal Biyokimya Kongresinde poster olarak sunulmuştur.

** Dr.; Uludağ Ü. Tıp Fak. Merkez Laboratuvarı.

Geliş Tarihi: 10.2.1993

Kabul Tarihi: 7.6.1993

cağını, iki farklı metodun aynı sonucu verip vermediğini araştırdık.

Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda 18'i kadın, 27'si erkek toplam 45 olgu inceledik. Tümü fakültemiz laboratuvarına ayakta başvuran poliklinik hastaları idi. Yaşları 18-62 arasında ortalama 47 idi. Olguların tümünde total protein, albumin ve globulin analizleri yapıldı ve sonuçları referans değerleri içinde olanlar çalışmaya alındı. Yapılan protein elektroforezlerinin normal patternde olmasına dikkat edildi. Herhangi bir patolojik pattern saptanan olgu çalışma dışı bırakıldı.

Çalışmamızda total protein, albumin analizleri Technicon RA-1000 analizöründe çalışıldı. Protein elektroforezi Helena Laboratories sellüloz asetat plakları ile çalışıldı. Fraksiyonlar Panceous S boyası ile boyandı ve Helena Laboratories Jr. TLC dansitometresi ile 525 nm. de değerlendirildi. Spesifik immunglobulin ölçümleri ise radyal immundifüzyon metodu kullanılarak yapıldı. Bu yöntem ise Behring NOR-Partigen IgM, NOR-Partigen IgG ve NOR-Partigen IgA plakları ile çalışıldı.

Bulgular ve Sonuçlar

Elde ettiğimiz sonuçları değerlendirirken elektroforez ile saptadığımız gama globulin konsantrasyonunu (g/dl), radyal immundifüzyon (RID) ile saptadığımız IgG, IgM ve IgA konsantrasyonlarının (g/dl) toplamı ile karşılaştırdık (IgG + IgM + IgA).

RID ve elektroforezde kabul ettiğimiz referans değerler Tablo: 1'de gösterilmiştir.

Tablo: 1- Referans değerler

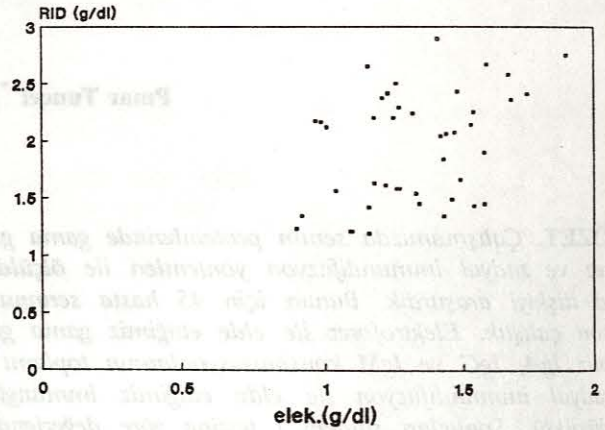
	g/dl
RID IgG	1.3 (0.8 - 1.8)
RID IgM	0.2 (0.1 - 0.3)
RID IgA	0.2 (0.1 - 0.5)
Elek. Gama glob.	1.2 (0.8 - 1.6)

45 olguda saptadığımız sonuçlar ortalama + SD olarak elektroforez için 1.32 + 0.2 g/dl, IgG + IgM + IgA toplamı için ise 1.96 + 0.5 g/dl idi. Çalışmamıza aldığımız 45 olgunun 42'sinde elektroforez ile elde ettiğimiz gama globulin konsantrasyonu, RID ile elde ettiğimiz IgG, IgM ve IgA konsantrasyonlarının toplamından düşüktü. 31 olguda ise sadece IgG konsantrasyonu dahi elektroforetik gama globulin konsantrasyonundan yüksekti.

Sonuçlar student t testine göre değerlendirildiğinde aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu görüldü ($p < 0.01$).

Sonuçlar toplu şekilde Şekil: 1'de gösterilmiştir. Şekilde sonuçlar X ekseninde elektroforezde bulunan gama globulin değerleri, Y ekseninde ise RID ile bulunan IgG + IgM + IgA toplamı olacak şekilde yerleştirilmiştir.

ELEKTROFOREZ VE RID SCATTERGRAM



Şekil: 1
Elektroforetik gama globulin fraksiyonu ile IgG + IgM + IgA toplam sonuçlarının karşılaştırılması

Tartışma

Günümüzde Klinik Biyokimya laboratuvarlarında sık olarak kullanılan elektroforez sistemleri sellüloz asetat ve agar jel elektroforezleridir. Protein elektroforezinde, gama globulin bölgesine göç eden immunglobulinler olduğundan, RID ile immunglobulinleri tek tek ölçerek IgG + IgM + IgA toplamını laboratuvarımızda rutin olarak çalıştığımız sellüloz asetat elektroforezindeki gama globulin fraksiyonu ile karşılaştırdık. Teorik olarak sonuçların aynı olması gerekmektedir. Ancak elektroforezde elde ettiğimiz sonuçların RID ile elde ettiklerimize göre daha düşük olduğunu gördük. Bu fark istatistiksel olarak anlamlı ve rutin çalışmalarda birbiri yerine kullanılamayacak kadar büyüktü.

Daha önce yapılan araştırmalarda, elektroforetik çalışmalarda kullanılan sellüloz asetat, agar jel gibi destek materyalinin, boyanın, kişisel tekniklerin ve grafiğinin çizilmesini sağlayan dansitometrenin niteliklerinin sonuçlarda farklılıklara yol açtığı bildirilmiştir¹. Bu çalışmalar arası fark özellikle alfa 1 gibi küçük fraksiyonlarda çok daha belirgin olmasına rağmen, gama globulin fraksiyonunda da % 15 gibi oldukça yüksek oranlardadır².

Böyle teknik nedenler yanı sıra, elektroforez serum proteinlerinin birbirlerine göre relatif olarak değerlendirildiği bir yöntem olduğu için fraksiyonlardan birinin konsantrasyonunun yüksek veya düşük olarak okunması diğer fraksiyonların konsantrasyonlarını da etkiler. Buna neden olabilecek faktörlerden biri, albuminin boyalarla bağlanma özelliğinin fazla olması nedeni ile elektroforezde kullanılan boyalarla da daha fazla boyanması ve bu nedenle diğer fraksiyonların relatif olarak daha düşük konsantrasyonda saptanması olabilir³. Ayrıca albumin serumda, ilaçlar ve bilirubin gibi bazı maddeler için taşıyıcı protein görevi yaptığından bu maddeler albuminin elektroforez plaklarında daha fazla boya tutmasına neden olabilir⁴.

Epstein ve ark. yaptıkları çalışmalarda yüksek konsantrasyonlardaki proteinlerin boyanmasında Pancoeus S boyasının linearitesini kaybettiğini göstermişlerdir. Boyanmış ve daha sonra şeffaflaştırılmış sellüloz asetat plaklarının mikroskopik incelenmesi boyanın şeffaflaştırıcı solüsyona geçmediğini, plak üzerinde süspansiyon halinde kaldığını göstermiştir⁵. Bu da yöntemden kaynaklanan ve destek materyalin homojen olarak boyanmaması sonucu dansitometrik tarama sırasında yüksek konsantrasyonda olan albuminin diğer fraksiyonlara oranla daha yüksek saptanmasına neden olabilmektedir.

Her ne kadar protein elektroforezinin bu yöntemsel hataları ortadan kaldırılamamışsa da, yine de elek-

troforez tüm protein fraksiyonları hakkında bir fikir sağlaması ve bazı hastalıklarda spesifik örüntüleri nedeni ile önemini devam ettirmektedir. Bazı durumlarda daha ileri ve spesifik tetkikler ile desteklenmesi koşulu ile rutinde ve klinik tanıda yerini korumalıdır.

Dr. Pınar TUNCEL
Uludağ Üniversitesi Tıp Fakültesi
Merkez Laboratuvarı
Tel: 4428400 / 1728
16059 Görükle / BURSA

Kaynaklar

1. Kahn SN, Strony LP: Imprecision of quantification of serum protein fractions by electrophoresis on cellulose acetate. Clin Chem, 32: 356-357, 1986.
2. Keren DF, Di Sante AC, Bordine SL: Densitometric scanning of high-resolution electrophoresis of serum: Methodology and clinical application. Am J Clin Pathol, 85: 348-352, 1986.
3. Schreiber WE, Chiang E, Tse SL: Electrophoresis underestimates the concentration of polyclonal immunoglobulins in serum. Am J Clin Pathol, 97: 610-613, 1992.
4. Howerton DA, Check IJ, Hunter RL: Densitometric quantitation of high-resolution agarose gel protein electrophoresis. Am J Clin Pathol, 85: 213-218, 1986.
5. Epstein DJ, Neeley WE: High-resolution densitometry: Analysis of stained albumin bands as a model for electrophoresis of serum proteins. Clin Chem, 30: 847-850, 1984.