

RADYOİMMÜNDENEY İLE İNSÜLİN MİKTAR BELİRTİMİNDE
KAĞIT KROMATOĞRAFI METODU

Dr. Kemal Özkan^(x)

ÖZET

Antiinsülin ve insülin bağlanmasıyla meydana gelen antikor-antijen kompleksinden radyoimmünolojik deneylerle faydalanılarak kanda insülin seviyesi tayini metotlarında serbest ve bağlı insülin fraksiyonlarının separasyonu son derece önemli bir konudur. Bu separasyon için zaman alıcı, kompleks ve masraflı metotlar ileri sürülmüştür. Bizim bu çalışmamızda oldukça kolay yapılabilen ve ufak bir kâğıt şeritle yükselen kromatografi tekniği uygulayarak bahis konusu separasyonun mümkün olduğu gösterilmiştir. Ayrıca bu metotla altı kişide ağız ve damar içi yollarıyla yapılan glüköz yükleme testleri esnasında kanda insülin seviyesinin, ağız yoluyla verilenlerde daha belirgin tarzda yükseldiği de saptanmıştır.

SUMMARY

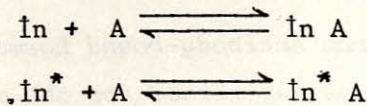
Separation of free from antibody-bound hormon is a major step in the radioimmunoassay method for the measurement of serum insulin level. Most of the methods require elaborate and expensive apparatus, and are very time-consuming. In this paper a simple modification of the chromatographic immuno-assay of insulin is described, using small, dry, vertical chromatographic paper wicks placed directly in the reac-

(x) Bursa Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsü Başkanı

tion mixture. Insulin secretion during the glucose tolerance is estimated on six different persons (seven sera during oral glucose tolerance test and seven sera during intravenous glucose tolerance test in every cases). The results are showing more insulin secretion in oral tests than intravenous ones. The rise in blood insulin levels following i.v. glucose is smaller than that found after oral administration

Antiinsülin antikoruyla insülin ve radyoaktif insülin birleşmesi reaksiyonunu temel olarak alan insülin miktar belirtimi metotları çok çeşitli modifikasyonlarla yayınlanmışlardır (1,2,3,4,5,6). Bunların hemen hemen tümü Yalow ve Berson (7) tarafından ortaya atılan prensibe dayanmaktadır: Radyoaktif (^{125}I ile işaretli) insülin (In^*) ve antiinsülin (A) antikorunun birleşme reaksiyonu, ortamdaki radyoaktif olmayan insülin (In) tarafından inhibisyona uğratılır. Her iki tür insülin, antikor molekülünün aynı bölgesine (aktif bölge, birleşme bölgesi, binding site) bağlandıkları için bu inhibisyon tarzı yarışmalıdır (Competitive).

İçinde In , In^* ve A bulunan bir radyoimmüdeney sisteminde, denge durumunda reaksiyon denklemi,



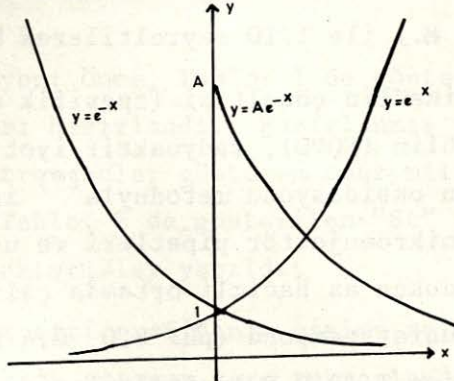
şeklinde gösterilebilir. Serum ya da standart çözeltilerden gelerek reaksiyon ortamına katılan ve radyoaktif olmayan insülin molekülleri, antikorun bir kısmını bağlayacağı için işaretli insülin-antikor kompleksi konsantrasyonunun azalmasına neden olurlar. Başka deyişle, işaretli insülin ve antikor konsantrasyonları belli ve sabit bir ortamda, işaretsiz

insülin konsantrasyonu arttıkça, bağılı radyoaktif insülin yüzdesi azalır. Deneysel olarak elde edilen bulgulara göre bu azalmanın grafiği kuramsal olarak üstel (exponential) bir fonksiyona, hiperbol eğrisine $y = A.e^{-x}$ denklemine⁽⁸⁾ uymaktadır (Şekil 1, Şekil 4). y eksenine $\frac{B}{S}$ veya "bağlanma yüzdesi" x eksenine "serbest/total insülin" yazılarak

$$\frac{B}{S} = A e^{-\frac{s}{s+b}} \quad \text{ve bundan matematik işlemle ve inkübasyon kaybı D değerlerini de dikkate alarak}$$

$$\frac{B}{S} = 1 - \frac{s}{(1-D)(s+b)} \quad \text{bulunur.}$$

- s = Serbest radyoaktif insülin S = Köre göre düzeltilmiş "s"
b = Bağılı " " B = " " " "b"
s + b = Total " " D = İnkübasyon kaybı



ŞEKİL : 1

Bu çalışmamızda $\frac{B}{S}$ değerleri, konsantrasyonu belirli (standart olan ve olmayan (serum) insülinli ortamlarda hesaplandıktan sonra konsantrasyonun bir göstergesi olarak kullanılacaktır. Amacımız metot geliştirilmesidir. Ancak, kullanılan serumlar, ağız ve damar yollarıyla ayrı ayrı glüköz yükleme testleri yapılan hastalardan elde edilmiştir.

Bu nedenle glüközün iki ayrı verilmiş yolunun insülin seviyesine etkisi konusuna da kısaca değinilecektir.

MATERYEL VE METOT

M a t e r y e l :

Dispebjerg Hospital (Kopenhag-Danimarka) kilinik biyokimya laboratuvarında, laboratuvarın araç ve gereçlerinden yararlanılarak yapılan bu çalışmada, önce intravenöz daha sonra oral yolla yapılan glüköz yükleme testleri esnasında altı hastadan toplam olarak alınan 84 kan nümunesi kullanılmıştır.

- Standart insülin çözeltisi (10 milünite/ml.): İnsülin (Human monocomponent İnsülin-NOVO) stok çözeltisinden (100 mU/ml.) % 0,9 gr. NaCl ve % 7 gr. albüminli fosfat tamponu (pH: 8,00 0,04 M.) ile 1/10 seyreltilerek hazırlandı.

- Radyoaktif insülin çözeltisi (spesifik aktivite: 50-100 mCi/mg.) İnsülin (NOVO), radyoaktif iyot (Na^{125}I , Hoechst) ile kloramin oksidasyonu metoduyla⁽⁹⁾ işaretlendi. Bunun için Hamilton mikroenjektör pipetleri ve ufak deney tüpü kullanılarak oldukça az hacimli ortamda çalışıldı. Na^{125}I (1-3 m Ci), fosfat tamponu (pH: 8,0 0,4 M), insülin (2-20 μg) ve chloramine T (B.D.H.) çözeltilerinin (her ikisi de pH: 8,00 0,04 M fosfat tamponu içinde) herbirinden 10 μl . alınarak deney tüpüne sırayla konup karıştırıldı. Oksidasyon için 40-50 saniyelik bekleyişten sonra 100 μl . sodyum metabisülfid (100 μg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$ fosfat tamponlu çözelti) konarak oksidasyon reaksiyonuna son verildi. Radyoaktifleşmiş insülin, reaksiyona girmeyen radyoaktif iyodür fazlasından jel filtrasyonla ayrıldı (10 xl cm. -sephadex G-50 kolonu,

% 0,2 gr. albumin içeren fosfat tampon çözeltisi pH: 8,0 0,04 M ile elüsyon yapıldı). 10 ml. lik fraksiyon -20°C de saklandı. Kullanılacağı zaman, gene aynı tarzda fosfat tamponuyla 60 ml. hacme kadar seyreltildi.

- Antiinsülin antikor çözeltisi: İnsan insülinine karşı kobaydan elde edilen antikor (anti-insülin serum dried, Wellcome Reagents Limited-England) kullanılarak albüminli fosfat tamponuyla (% 0,2 gr. albumin, pH: 8,0 , 0,04 M, 0,6 m.M. thiomersal) seyreltildi. Antikor titrasyonu yaklaşık % 50-70 kadar bağlanma gösteren dilüsyonun 1/88000 olduğu bulundu. Buna göre çalışma esnasında fosfat tamponuyla gereken (32 ml.) seyreltme yapıldı.

M e t o t :

İnkübasyon: Önce, Tablo: 1 de gösterildiği gibi insülin standartları hazırlandı. Hazırlanmış olan bu tüplerdeki değişik konsantrasyonlar gösteren onar mililitrelik insülin çözeltilerinden Tablo: 2 de gösterilen "St" tüplerine 75 er mikrolitrelik aktarmalar yapıldı:

Standart eğri grafiğinin çizimi için yapılan bu işlem her "St" tüpü için altışar kere tekrarlanarak standart sapsmalar hesaplandı. Bu yöntemle metodun isabet derecesi (precision) araştırıldı (Tablo 3, Şekil: 4). Herbir standart (St) ve serum numunesi (N), bunların inkübasyon kaybı "damage" (D_S ve D_N) ve kör deney "background" (K) için üçer (triplicate) olmak üzere Tablo: 2 deki çalışma şemasına göre ufak deney tüpleri (9 x 50 mm) içinde çalışılarak 4°C de 20 saat inkübasyon için bekletildi.

Tablo: 1

	K	St ₁	St ₂	St ₃	St ₄	St ₅	St ₆	
Standart insülin çözeltisi (10 mU/ml.)	-	10	30	60	100	200	500 μ l	
Albüminli tuzlu fosfat tamponu ^(x)	10	9,09	9,07	9,04	9,90	9,80	9,50ml	
İnsülin konsantrasyonu ^(xx)	μ U/ml	0	10	30	60	100	200	500
	pmol/l	0	69	207	414	690	1380	3450

(x) % 7 gr. albümin % 0,9 gr. NaCl içeren fosfat tamponu
pH: 8,0 0,04 M

(xx) İnsülin, Mw = 5804 ve 1 U = 0,04167 mg. alınarak hesaplanmıştır (10).

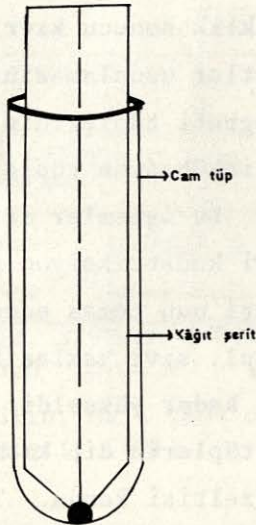
Tablo: 2

	D _s	St	N	D _n
Standart çözelti	75	75 μ l	-	-
Kan serumu numunesi	-	-	75	75 μ l
Albuminli fosfat tamponu ^(x)	100	-	-	100 μ l
Radyoaktif insülin çözeltisi	100	100	100	100 μ l
Antiinsülin çözeltisi	-	100	100 μ l	-

(x) İnkübasyondan önce ve inkübasyon esnasında ortama giren fosfat tamponuna katılan albumin (HSA) hem radyoaktif olan, hem de olmayan hormonun tüp cidarlarına yapışıp kalmasını önler (11).

Separasyon: İnkübasyona konan her tüpe karşılık birer tane dibi yuvarlak deney tüpü (25 x 100 mm) ve bunların içine girebilecek boyda kesilmiş ve alt ucu sivriltilmiş Whatman 3 MM kâğıt şeritleri (20 x 120 mm) hazırlandı (Şekil: 2). Kromatografik separasyon esnasında ıslaklık sonucu kıvrılma ve bükülmeyi önlemek için bu kâğıt şeritler uzunlamasına ortadan katlandılar (Şekil: 2). Kromatografi tüplerinin dip kısımlarına kendi karşılıkları olan inkübasyon tüplerinden alınan karışımlardan 75 er μ l kondu. Bu işlemler için Hamilton mikroenjektörleri ve Lang-Lewi konstriksiyon pipetleri kullanıldı. Sıvı damlasına sivri ucu temas edecek tarzda kâğıt şeritler yerleştirildi. 75 μ l. sıvı yaklaşık olarak 3 dakika içinde kağıt boyunca 25 mm. kadar yükseldi. Sıvının tamamı kağıda absorplandıktan sonra tüplerin dip kısmına 400 μ l % 0,2 gr. albüminli tampon çözeltisi kondu. Tüpteki sıvının kaybolmasından sonra bir kere daha albüminli tampon koyma işlemi tekrarlandı. Kör deney için boş kâğıt şerit kullanıldı. Kromatografi tüpleri içlerindeki kağıt şeritlerle birlikte etüve konarak 120°C de iyice kurutulduktan sonra şeritler tam ortalarından enlemesine kesilerek üst ve alt yarılıarı ayrı ayrı gama sintilasyon sayaç aletinin özel tüplerine yerleştirildiler. Alt yarım kısımda serbest, üst yarım kısımda ise bağlı radyoaktif insülin bulunmaktadır. Sintilasyon sayısında her tüp için iki dakika olmak üzere radyoaktivite ölçülerek (gamma scintillation Counter, Baird Atomic, Iso/matic, Model 707, Well sample charger) kaydedildi (Baird Atomic Model 620 Printer). Her ölçü serisinde boş kâğıtla yapılan kör deney (background) ölçümleri de yapıldı.

(Her bir standart veya serum için üçlü "triplicate" deney yapıldığına göre kâğıt şeritlerin ortadan kesilmesiyle her bir serum veya standart için altışar adet sintilasyon ölçümü yapılmış olmaktadır).



ŞEKİL : 2

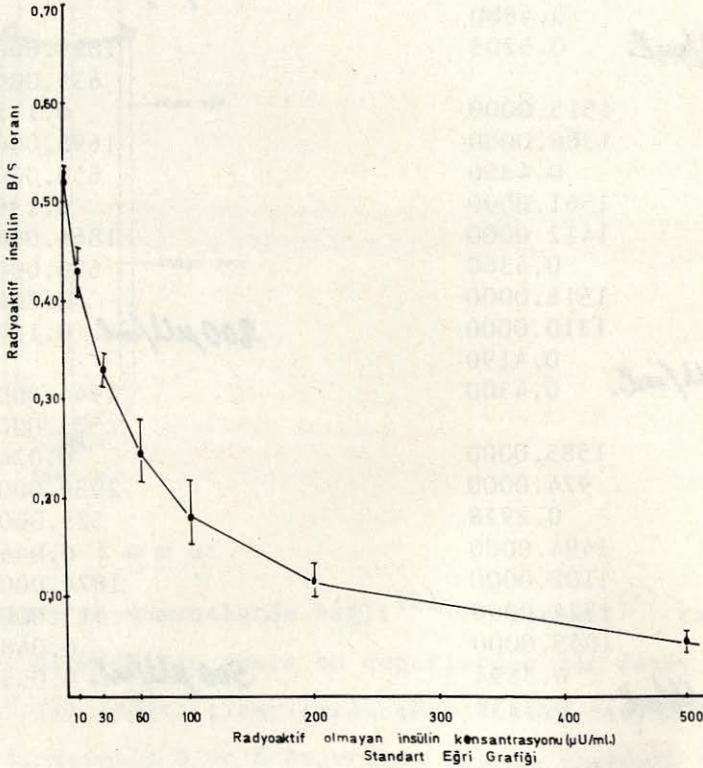
H e s a p l a m a :

Standart ve nünunelerde bağlı^(b) ve serbest^(s) radyoaktiviteleri ölçüldükten sonra bu değerlerden kör deney "background" (k) değeri çıkarılarak düzeltilmiş radyoaktivite değerleri, sırayla B ve S bulundu. Ayrıca standart serisi ve her hasta serisi için konan inkübasyon kaybı, (D) tüplerinin radyoaktiviteleri kaydedildi. Üçlü deneylerin ortalamalarını alan ve $\frac{B}{S} = 1 - \frac{s}{(1-D)(s+b)}$ formülüne göre programlanan masa bilgisayarı (table computer, Diehl Combitron S 10/10 programme) ile herbir serum ve standart için ayrı ayrı bağlı/serbest oran değerleri hesaplandı (Şekil: 3).

<i>St. Damage</i> :	0.9440	1605.0000
<i>Background</i> :	342.0000	721.0000
	1339.0000	0.1853
	1548.0000	1744.0000
	0.5207	709.0000
	1289.0000	0.1605
	1635.0000	1792.0000
	0.5523	784.0000
	1391.0000	0.1883
	1463.0000	<i>100 µl/ml.</i> 0.1780
	0.4880	
<i>0 µl/ml.</i>	0.5203	1891.0000
		639.0000
	1515.0000	0.1112
	1368.0000	1698.0000
	0.4350	650.0000
	1561.0000	0.1368
	1412.0000	1866.0000
	0.4360	620.0000
	1518.0000	0.1042
	1310.0000	<i>200 µl/ml.</i> 0.1174
	0.4190	
<i>10 µl/ml.</i>	0.4300	1944.0000
		573.0000
	1585.0000	0.0743
	974.0000	2056.0000
	0.2978	529.0000
	1494.0000	0.0450
	1102.0000	1874.0000
	1524.0000	515.0000
	1055.0000	0.0482
	0.3394	<i>500 µl/ml.</i> 0.0558
<i>30 µl/ml.</i>	0.3330	
	1603.0000	
	870.0000	
	0.2534	
	1451.0000	
	778.0000	
	0.2398	
	1626.0000	
	854.0000	
	0.2427	
<i>60 µl/ml.</i>	0.2453	

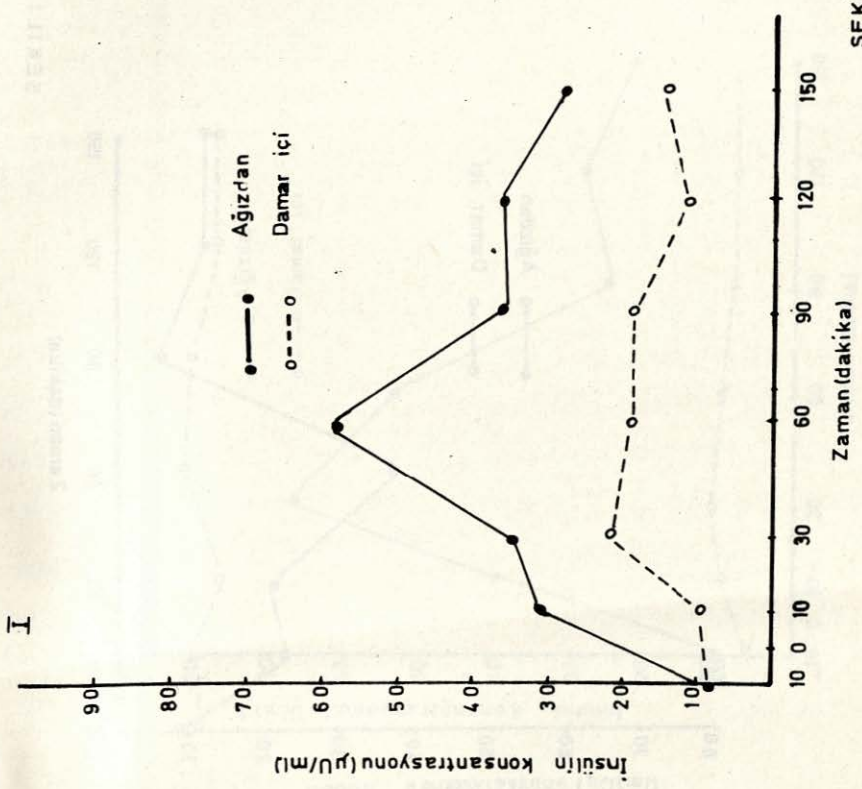
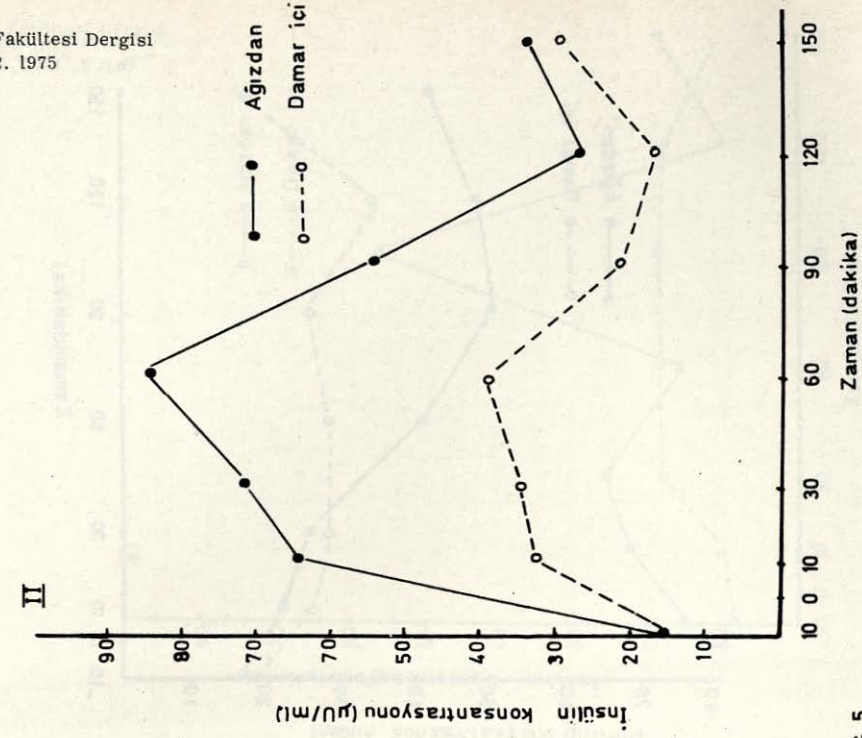
Şekil: 3

Tablo 1 de gösterilen standartlara karşılık olan B/S değerleri ordinata, insülin konsantrasyonları ise apsise işaretlenerek milimetrik kağıtta standart eğri grafiği (calibration curve) çizildi (Şekil: 4). Bu eğri yardımıyla serum nünunelerindeki insulin konsantrasyonları bulundu.

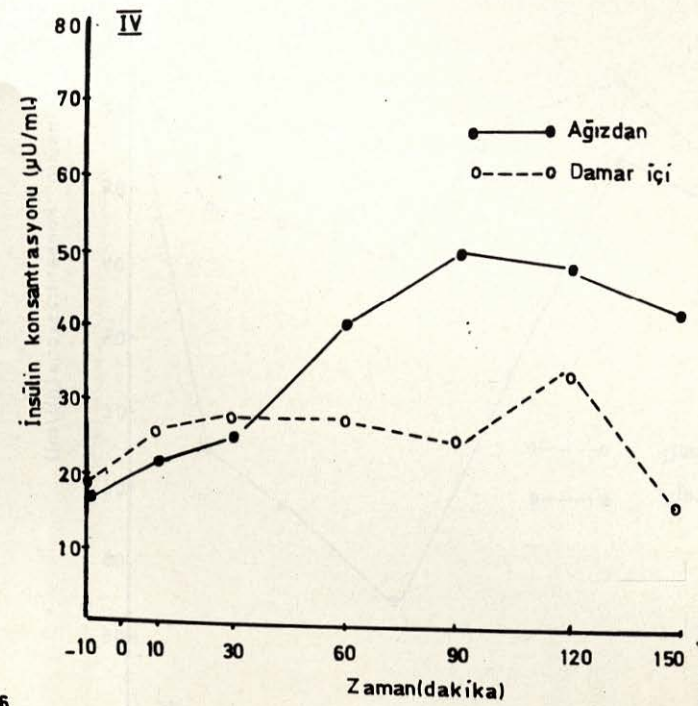
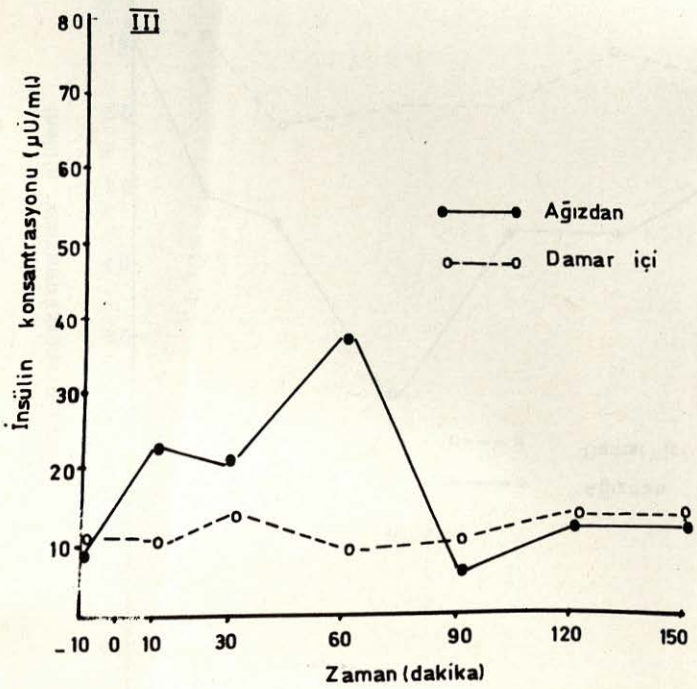


ŞEKİL : 4

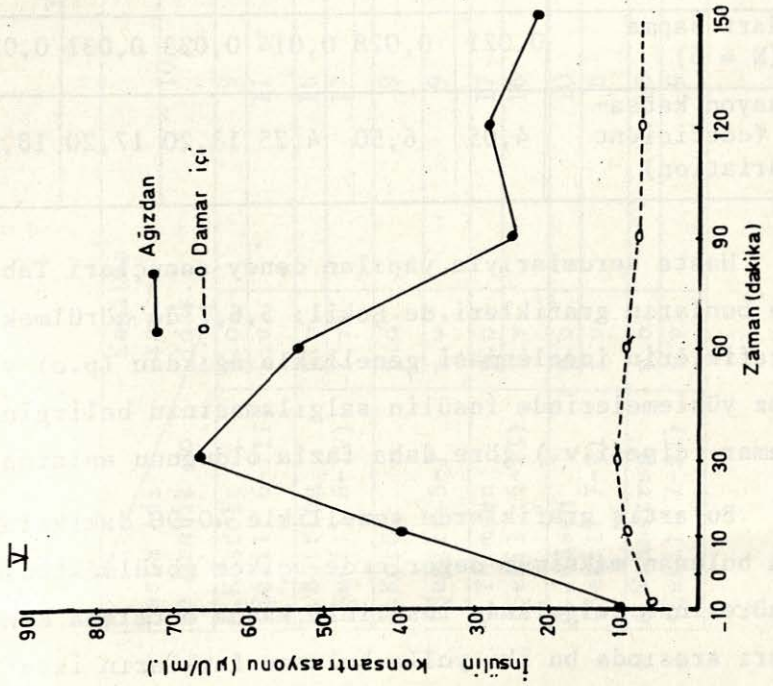
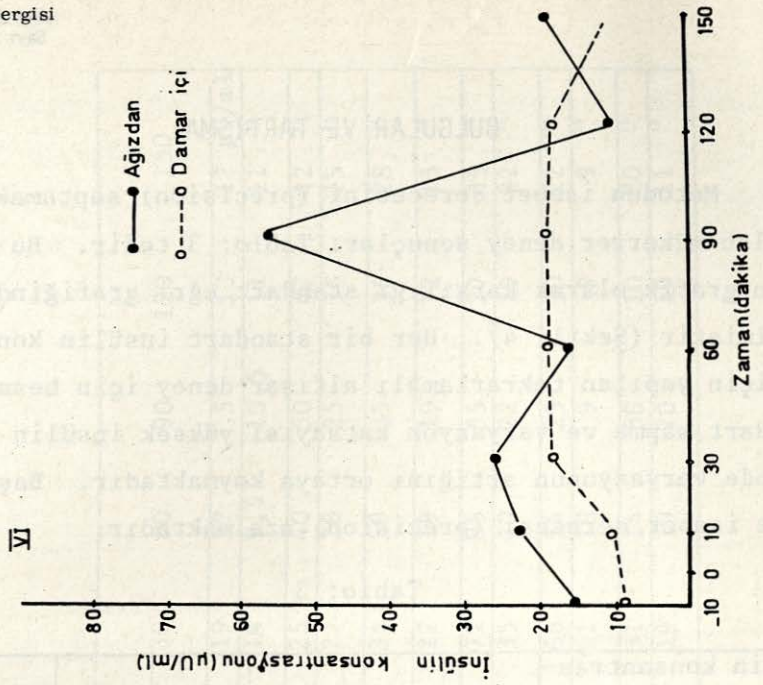
Intravenöz ve oral (sırayla 0,33 gr/kg. ve 50 gr. glukoz ile) yapılan yükleme süresinde hastalarda saptanan insülin salgılama durumları grafikler halinde gösterildi (Şekil: 5,6,7).



ŞEKİL : 5



ŞEKİL: 6



ŞEKİL : 7

BULGULAR VE TARTIŞMA

Metodun isabet derecesini (precision) saptamak için yapılan mükerrer deney sonuçları Tablo: 3 tedir. Bu değerlerin grafik olarak karşılığı standart eğri grafiğinde gösterilmiştir (Şekil: 4). Her bir standart insülin konsantrasyon için yapılan tekrarlamalı altışar deney için hesaplanan standart sapma ve varyasyon katsayısı yüksek insülin değerlerinde varyasyonun arttığını ortaya koymaktadır. Başka deyişle isabet derecesi (precision) azalmaktadır.

Tablo: 3

İnsülin konsantrasyonu (μ U/ml)	0	10	30	60	100	200	500
B/S (ortalama değer) (N = 6)	0,52	0,43	0,33	0,25	0,18	0,12	0,06
Standart sapma (N = 6)	0,021	0,028	0,014	0,033	0,031	0,022	0,010
Varyasyon katsayısı (coefficient of variation)	4,05	6,50	4,25	13,20	17,20	18,25	16,60

Hasta serumlarıyla yapılan deney sonuçları Tablo: 4 te ve bunların grafikleri de Şekil: 5,6,7 de görülmektedir. Bu grafiklerin incelenmesi genellikle ağızdan (p.o) yapılan glükoz yüklemelerinde insülin salgılamasının belirgin biçimde damar içine(i.v.) göre daha fazla olduğunu anlatmaktadır.

Bu artış grafiklerde genellikle 40-90 dakikalar arasında bulunan maksimum değerlerde açıkça görülmektedir. Deney süresince salgılanan insülinin kanda ortalama konsantrasyonları arasında bu iki yolla bulunan farkların istatistik

Tablo: 4

Hasta Adı ve Grafik No	Kanalma zamanı (dak.)	- 10	10	30	60	90	120	150	
		A.Kastoft (Şekil: 6-III)	p.o. i.v.	9 11	22 10,5	19 14	37 9,5	5 10,5	13 11
L.Borring (Şekil: 6-IV)	p.o.	16	21	25	40	50	47	42	"
	i.v.	17	25	27	28	25	35	15	"
A.Kofod (Şekil: 5-I)	p.o.	9	31	34	59	35	36	28	"
	i.v.	9	10	22	19	19	12	15	"
C.Thomsen (Şekil: 5-II)	p.o.	17	65	72	85	55	27	35	"
	i.v.	16	32	35	40	22	19	32	"
B.Jensen (Şekil: 7-V)	p.o.	10	40	66	54	25	30	22	"
	i.v.	6	10	11	10	9	9	9	"
A.Wramstrup (Şekil: 7-VI)	p.o.	15	23	31	14	58	10	20	"
	i.v.	9	10	19	19	20	19	11	"

bakımından anlamları (significance) varyans analizi metodu ve F testi^(12,13,14) ile araştırıldı (Tablo: 5 ve 6). Görüldüğü üzere I,II ve V ile işaretli şahıslarda (Şekil: 5 ve 7) ağız yoluyla glüköz verilmesinde insülin seviyesi anlamlı derecede artmaktadır. Ötekilerde ise maksimum değerdeki belirgin artışa karşın,ortalama artış istatistik bakımından önemsizdir. Glüközün ağız ya da damar yoluyla verilmesiyle insülin cevabının farklı oluşuna ilk dikkati çekenler Yalow ve Berson'dur⁽⁷⁾.

Tablo: 6

Deney No.	F ^(x) değeri	Anlam
I	18,90	Anlamlı
II	7,60	Anlamlı
III	2,34	Anlamsız
IV	4,31	Anlamsız
V	17,90	Anlamlı
VI	1,76	Anlamsız

$F_{0,05} = 4,96$ (1 ve 10 serbestlik derecesi)

(x) Gruplar arası varyansın gruplar içi varyansa oranı

Bu araştırmacılara göre ağız yolundan glüköz verilmesinde 30-60 dakika içinde maksimum insülin seviyesi görülmektedir. 2 saat sonra bu seviye normale düşmektedir. Hunter⁽¹⁵⁾ ise ağız yoluyla glüköz verilmesinden 60 dakika sonra maksimum seviyeye erişildiğini belirtmektedir. Bu araştırmacıya

Tablo: 5 Varyans Analizi Şeması

Varyasyon Cinsi	Sapma Kareleri Toplamı	Serbestlik Derecesi	Varyans (x)	
Gruplar arası	III	144	1	144
	IV	408	1	408
	I	1518	1	1518
	II	2106	1	2106
	V	2670	1	2670
	VI	280	1	280
Gruplar içi	III	616	10	61,6
	IV	944	10	94,4
	I	749	10	74,9
	II	2779	10	277,9
	V	1493	10	149,3
	VI	1598	10	159,8
Toplam	III	760	11	
	IV	1352	11	
	I	2267	11	
	II	4885	11	
	V	4163	11	
	VI	1878	11	

(x) Varyans = sapma kareleri ortalaması

göre 2-3 saat sonra kanda insülin konsantrasyonu başlangıç seviyesine inmektedir. İnsülin artışı, başka deyişle insülin cevabı muhtemelen pankreas beta hücrelerine ulaşan yüksek glükoz konsantrasyonunun bir yansımasından ibarettir⁽¹⁶⁾ Ağız veya damar yoluyla meydana getirilen bu yükselmelere farklı cevap verilmesinin nedeni tam anlamıyla aydınlanmış değildir. Sindirim yoluyla verilmesinde bu sistem organlarının (duodenum v.b) cidarından salgılanan bir maddenin özellikle insülin salgısını artırması olasılığı düşünülebilir. Böyle bir madde sekretin, pankreozimin veya glükagon gibi bu bölgede varolan bir madde olabilir^(16,17,18).

Bağlı (B) ve serbest (S) insülinin birbirinden ayrılması olayı, radyoimmün deneylerde en önemli konulardan biridir. Ayrılma (separasyon) sayesinde bunların ayrı ayrı radyoaktivitelerini ölçme olanağı elde edildi. Çeşitli peptid hormonlar için separasyon metodlarını başlıca üç gruba ayırmak mümkündür: 1 - İnkübasyon ortamından serbest hormonu ayıran metotlarda, destranlı kömür⁽¹⁹⁾, anyon değiştirici reçine^(1,20) talk veya silika⁽²¹⁾ v.b. maddeler kullanılmaktadır. 2 - İnkübasyon ortamından bağlı hormonu ayıran metotlardan çift antikor tekniğinde^(2,3,4,22) anti gama globülin yardımıyla önce antikor çöktürülür sonra antijen olan hormonla birleştirilerek kâğıt filtrasyonu ya da santrifüjle ayırma işlemi yapılır. 3 - İnkübasyon ortamından serbest ve bağlı insülin moleküllerini aynı zamanda ayıran metotlarda çeşitli elektroforez teknikleri (nişasta jeli, sellüloz asetat, poliakrilamid jeli)^(23,24), jel filtrasyon^(25,26) ileri sürülmektedir. Bundan başka, tuz presipitasyonu⁽²⁷⁾ veya organik solventlerle serbest hormonu bağlı olandan ayırma yollarını

ortaya atan metotlara da literatürde rastlanmaktadır^(28,29)
Bağlı ve serbest radyoaktif insülini ayırmak için uyguladığımız yükselen kağıt kromatografi (ascendent paper chromatography) tekniği ötekilerden daha kolay yapılabilen bir separasyon metodudur. Bağlı durumda olan insülin, fosfat tamponlu solvent ile hızla yürümektedir. Serbest durumda olan ise alt uçta, tatbik yerinde kalmaktadır.

Otoradyogramla saptandığına göre bağlı ve serbest radyoaktivite pikleri yatay kromatografiye nazaran dikâyde daha iyi bir tarzda birbirinden ayrılmaktadır⁽³⁰⁾. Kağıt şeridin alt başlangıç ucundan yarısına kadar olan kısım serbest insülini, yarısından yukarı kısım ise bağlı insülini kapsamaktadır. Bu nedenle kağıt şerit kromatografik separasyon ve kurutma işlemlerinden sonra tam orta yerinden kesilmekte bağlı ve serbest fraksiyonlar birbirinden ayrılmış olurlar. Bu iki fraksiyonu taşıyan kağıt parçalarında radyoaktivite ayrı ayrı ölçülüp değerlendirilebilir. Kağıt şeritler tüp içinden çıkarılmadan kurutulmak suretiyle, parçalanmalar ve temas sonucu olabilecek kirlenmeler (contamination) önlenmiş olmaktadır.

Deney ortamında radyoaktif olan ve olmayan insülin moleküllerinin bir kısmı inkübasyon süresince, gerek serumdan gelen proteolitik enzimler (plasmin vb.) gerekse başka etkenlerle (ısı, hava, vb.) parçalanabilirler. Bu harabolma veya denatürasyon olayını, başka söyleyişle, inkübasyon kaybını (damage) bilmek gereklidir. Her bir standart serisi ve her bir hasta serumu ile beraber aynı şartlarda deneye sokulan ve içlerine antiinsülin konmayan "D" işaretli tüpler,

işte bu inkübasyon kaybını belirtmektedir. D tüplerinde (Tablo: 2) bulunacak olan radyoaktivite değerleri B/S oranının bilgisayarla yukarda metot bölümünde gösterilen üstel fonksiyon denkleminde göre hesaplanmasında dikkate alınmıştır^(24,27,31).

Öteki insülin tayin metotları içinde literatürde çok sık rastlanan çift antikor tekniğinde^(1,2,3,4) antiinsülin-insülin kompleksi, ikinci bir antikorla (precipitating serum) kobay antigama globülünü ile presipitasyona uğratıldıktan sonra santrifüj ya da süzmeyle ayrılır. Bu tür metotlarda serumlardan gelebilen ve spesifik olmayan maddeler, antijen-antikor reaksiyonuna ve separasyona inhibitör olarak etki edebilirler. Bu metotların bir başka sakıncası da, inkübasyon süresinde olabilen radyoaktif iyotlu insülin denatürasyonunu dikkate alamayışlarıdır. Halbuki, kromatografik^(1,23,24,26,30) metotlarda bu denatürasyon (inkübasyon kaybı) kolayca dikkate alınıp belirlenebilmektedir. Uyguladığımız yükselen kağıt kromatografi metodunda bu sakıncalar önlenmiş olmaktadır. Çünkü bu metotta antiinsülinin önceden çökeltilmesi ve daha sonra çökeltinin filtrasyon, ya da santrifüjle ayrılması bahis konusu olmayıp serbest insülin ve bağla insülininden ibaret olan antijen-antikor kompleksinin kromatografik göçme özelliklerinin farklı olmasından yararlanılmaktadır. Radyoaktif iyotlu insülinde inkübasyon esnasında olabilen parçalanma da "D" tüplerindeki deneylerle saptanmakta ve nihai hesaplamada dikkate alınmaktadır.

Not: Bu çalışmanın yapılmasında laboratuvar olanaklarını sağlayan Kopenhag Bispebjerg hastanesi klinik biyokimya laboratuvarının başta sayın direktörü Prof.P.Lous olmak üzere teknik yardımlarını gördüğüm Dr.Jens Fr.Rehfeld ve Miss Lotte Kastoft'a teşekkürü bir borç bilirim.

KAYNAKLAR

1. Meade, R.C., Klitgaard, H.M.: A simplified method for immunoassay of human serum insulin *J.Nucl.Med.* 3: 407, (1962)
2. Morgan, C.R., Lazarow, A.: Immunoassay of insulin, Two antibody system *Diabetes* 12: 115, (1963)
3. Samols, E., Bilkus, D.: A comparison of insulin immunoassays *Proc. Soc. Exp. Biol (N.Y.)*. 115: 79, (1964)
4. Hales, C.N., Randle, P.J.: Immunoassay of insulin with insulin-antibody precipitate *Biochem. J.* 88: 137, (1963)
5. Soeldner, J.S., Slone, D.: Critical variables in the radioimmunoassay of serum insulin using the double antibody technique *Diabetes* 14: 771, (1965)
6. Brunfeldt, K., Jorgensen, K.R.: Some factors of significance in the double antibody immunoassay of insulin *Acta. Endocr.* 55: 347, (1967)
7. Yalow, R.S., Berson, S.A.: Immunoassay of endogenous plasma insulin in man *J. Clin. Invest.* 39: 1157, (1960)
8. Ayla, M.: Differansiyel ve integral hesap (P.Abbott'tan çeviri). p. 126-328, Arı Kitabevi, İstanbul (1960)
9. Greenwood, F.C., Hunter, W.M., Glover, J.S.: The preparation of ¹³¹I-labelled human growth hormone of high specific radioactivity *Biochem. J.* 89: 114, (1963)
10. Diem, K.: *Scientific Tables* Sixth edition, p: 739, J.R. Geigy S.A. Basle. (1962)

11. Curtius, H.C., Roth, M.: *Clinical Biochemistry, principles and methods Vol: 1, p. 341* Walter de Gruyter. Berlin, New York, (1974)
12. Schwartz, D.: *Methodes statistiques à l'usage des médecins et des biologistes Deuxième édition, p. 181* Editions Medicales Flammarion, Paris, (1963)
13. Legay, J.M., Chassé, J.İ., Mourgues, C.: *Exercices de Statistique pour Biologistes p. 190, Edition Medicales Flammarion, Paris, (1966)*
14. Croxton, F.E.: *Elementary Statistics p. 295, Dover Publications, New-York. (1959)*
15. Hunter, W.M.: *Growth and development of Mammals p. 77* Ed. Lodge G.A., Lamming G.E. Butterworth, London (1968)
16. Loraine, J.A., Bell, E.T.: *Hormone assays and their clinical application. Third edition p. 238, E.S. Livingstone, Edinburgh-London, (1971)*
17. Williams, H.R.: *Endocrinology Fourth edition p. 624, W. B. Saunders Company, London, (1968)*
18. Samols, E., Tyler, J., Marry, G.: *Stimulation of glucagon secretion by oral glucose Lancet 2: 1257, (1965)*
19. Herbert, V., Lau, K.S., Gottlieb, C.W., Bleicher, S.J.: *Coated charcoal immunoassay of insulin. J.Clin. Endocr. 25: 1375, (1965)*
20. Lazarus, L., Young, J.D.: *Radioimmunoassay of human growth hormona using ion exchange resin. J.Clin. Endocr. 26: 213, (1966)*

21. Yalow,R.S., Berson,S.A.: Labelling of proteins-problem and practices *Trans. N.Y. Acad. Sci.* 28:1033, (1966)
22. Morgan,C.R., Lazarow,A.: Immunoassay of insulin using a two antibody system *Proc. Soc.Exp.Biol.Med.* 110: 29, (1962)
23. Hunter,W.M., Greenwood,F.C.: A radioimmuno-electrophoretic assay for human growth hormone *Biochem, J.* 91: 43, (1964)
24. Berson,S.A.: Labelling and separation in protein and polypeptide hormones pt: 3, p. 616 Ed. M. Margoulies *Excerpta Medica Foundation, Amsterdam* (1968)
25. Work,T.S., Work,E.: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology* Vol: I pt: 3 p. 486 North-Holland Publishing Comp. Amsterdam, (1969)
26. Genuth,S., Frohman,L.A., Lebowitz,H.E.: A radioimmuno-logical assay method for insulin, using ^{125}I and gel filtration *J.Clin. Endocr.* 25: 1043, (1965)
27. Miles,L.E.M., Hales,C.N.: An immunoradiometric assay of insulin in protein and polipeptide hormone pt: 1 p. 61 Ed. Margoulies *Excerpta Medica Foundation, Amsterdam*, (1968)
28. Ruzicka,J., Stary,J.: Isotopic dilution analysis by solvent extraction pt: I principles and methods *Talanta*, 8: 228, (1961)
29. Odell,W.D., Wilber,J.F., Paul,W.E.: Radiomunoassay of thyrotropin in human serum *J. Clin. Endocr.* 25: 1179 (1965)

30. Orskow, H.: Wick-chromatography for the immunoassay of insulin *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 20: 297, (1967)
31. Berson, S.A., Yalow, R.S.: General principles of radioimmunoassay *Clin. Chim. Acta.* 22: 51, (1968)