

Yenidoğan Topuk Kanında Raket Elektroforezi Yöntemi ile Apolipoprotein B Tayini

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

ÖZET

Sağlıklı 48 saatlik 32 yenidoğanda süzgeç kağıdına alınan topuk kan ve serum örneklerinde Raket elektroforezi yöntemi ile Apolipoprotein B (Apo B) miktar belirlimi yapıldı. Ayrıca 32 olgudan rastgele seçilen 20 bebekte de serumda Radyal İmmün Diffüzyon (RID) yöntemi ile Apo B tayini yapılarak sonuçlar istatistiksel yöntemlerle kıyaslandı.

Sonuçta 3 değişik yöntemle saptadığımız ortalama Apo B değerleri arasında fark olmadığı ve kaynak verileri sonucu saptadığımız aynı yaş grubundaki bebeklerin Apo B ortalama değerleri ile uyumlu oldukları görüldü.

SUMMARY

Measurement of Apolipoprotein B in the Heel Blood of Newborns with the Method of Rocket Electrophoresis

With the method of Rocket electrophoresis, Apolipoprotein B (Apo B) measurement has been done with the samples of heel blood and serum which has been taken to filter paper in 32 healthy, 48 hours old newborn. In addition, in 20 babies who have been randomly chosen from the 32 cases, with the method of Radial Immun Diffusion (RID), in serum, Apo B has been measured. And then the results were compared with the statistical methods.

In the result, we saw that there was no difference in the average Apo B values which we had found with 3 different methods. And the babies, average Apo B values were in harmony with the average Apo B values of the babies of the same age, as we observed from the results of source data.

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

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

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

İnsan arteryel düz kas hücreleri ile özgün olarak ilişkisi gösterilen Apo B'nin atherosklerozun oluşumunda etkili olduğu artık kesinleşmiştir¹⁻⁵. Son yıllarda, Apo B'nin kolesterol sentezini özgün membran reseptörleri ile ilişkiye girerek, 3-hidroksi-3 metil glutaryl CoA redüktazın inhibisyonu ile düzenlediği gösterilmiştir. Bu enzim kolesterol sentezini kontrol eden enzimdir. Bu nedenle Apo B ölçümünün atheroskleroz için lipidlerden daha iyi bir genetik ölçüsü olduğu fikrine varılmıştır⁵⁻⁸.

Hem epidemiyolojik, hemde klinik çalışmalar koroner hastalıkların çocukluk-tan başlayan bir olay olduğunu göstermektedir. Serum lipid ve lipoproteinlerinin önemli kardiovasküler risk faktörü olduğu anlaşıldığından beri dikkatler çocukluk-taki lipid, lipoprotein ve apolipoproteinler üzerinde yoğunlaşmıştır. Çünkü doğumdan sonra ilk yıl içinde FH-II heterozigot bebeklere poliansatüre yağlardan zengin, kolesteroldan fakir bir diyet uygulanırsa plazma kolesterol seviyesinin normalleştiği, oysa benzer diyet daha büyük çocuklara uygulanırsa plazma kolesterol seviyesindeki azalmanın sadece % 12-24 arasında olduğu görülmüştür⁹.

İşte bu nedenleri gözönüne alarak yenidoğan bebeklerde Apo B miktar belirtimi yapmayı amaçladığımız bu çalışmamızda, süzgeç kağıdına emdirilmiş topuk kan ve serum numunelerinde Laurell'in Raket elektroforezi ve serumda RID yöntemiyle Apo B tayini yapmayı uygun gördük.

GEREÇ ve YÖNTEM

Olgular, Mayıs-Haziran 1987 tarihleri arasında, Ul. Ün. Tıp Fak. Kadın Hastalıkları ve Doğum Kliniğinde doğan Apgar değeri 7-10 olan sağlıklı bebeklerden seçildi. 32 olguda topuktan 2 tane hematokrit tüpüne ve birde 2 no'lu Whatman süzgeç kağıdına kan emdirildi. Hematokrit tüpüne alınan kanlar santrifüj edildi ve serumları ayrıldı. Ayrılan serum Whatman 2 no'lu süzgeç kağıdına emdirildi. Böylece aynı olguya ait bir kan, bir de serum numunemiz oldu.

Kan ve serum numunelerinde Modifiye Laurell'in Raket Elektroforezi Yöntemi¹⁰⁻¹² ile Apo B miktar belirtimi yapıldı. Ayrıca hematokrit tüpüne alınan kandan ayrılan serumun bir kısmıyla (5 µl'siyle) 32 olgumuzun rastgele seçilen 20 sinde RID yöntemiyle^{13,14} gene Apo B tayin edildi.

BULGULAR

Araştırmamızda 32 olgunun tümünde kanda ve serumda Laurell'in Raket elektroforezi yöntemi ile Apo B miktar belirtimi yapıldı. Kontrol amacıyla 32 bebek arasından rastgele seçilen 20 olguda da RID yöntemiyle serumda Apo B çalışıldı.

Kanda ve serumda hesapladığımız % CV değerleri birbirine yakındı. Kanla çalışılan yöntemde CV % 13.43 iken, serumla çalışılan yöntemde % 13.55'ti. RID yönteminin değişim katsayısı ise (% CV), % 22.48 olarak saptandı. RID yöntemiyle ve Laurell'in Raket elektroforezi yöntemiyle saptanan ortalama Apo B değerleri, istatistiksel yöntemlerle kıyaslandığından, gruplar arasında herhangi önemli bir farka rastlanmadı (Tablo I).

Tablo: I
RID ve Raket Elektroforezi (kanda, serumda) Yöntemleriyle Saptanan Apo B Ortalama Değerlerinin Karşılaştırılması

Yöntemler	Ölçülen Parametreler			
	n	Apo B (% mg) ($\bar{x} \pm SH$)	t	P
RID	20	55.6 \pm 2.8	—	—
Kanda Raket Elektroforezi	32	55.1 \pm 1.3	0.163	A.D.
Serumda Raket Elektroforezi	32	54.6 \pm 1.3	0.163	A.D.

n : Olguların sayısı

A.D.: RID yöntemine göre anlamlı değil

Olgular cinse göre iki gruba ayrıldıktan sonra serumda Laurell Raket elektroforezi yöntemi ile ölçülen Apo B ortalama değerleri yine serumdan RID yöntemi ile saptanan Apo B ortalama değerleriyle, kızlarda ve erkeklerde istatistiksel yöntemlerle kıyaslandı. Her 2 grupta da, 2 yöntemle saptanan Apo B değerleri arasında fark olmadığı görüldü (Tablo II). RID yönteminde kızlarda % CV % 13.32, erkeklerde % 24.1 iken, serumla Raket elektroforezi yapılan yöntemde kızlarda % 14.21, erkeklerde ise % 13.4 olarak saptandı.

Tablo: II
Kızlarda ve Erkeklerde Serumda Raket Elektroforezi ve RID Yöntemi ile Bulunan Serum Apo B ortalama değerlerinin kıyaslanması

Yöntemler	GRUPLAR					
	KIZLAR			ERKEKLER		
	n	Apo B (% mg) ($\bar{x} \pm SH$)	P	n	Apo B (% mg) ($\bar{x} \pm SH$)	P
RID	6	62.3 \pm 3.4	—	14	52.7 \pm 3.4	—
Serumda Raket	9	57.0 \pm 2.7	A.D.	23	53.7 \pm 1.5	A.D.

A.D.: RID'e göre anlamlı değil

Her üç yöntemle çalışılan tüm olgularda (kız-erkek), genel ortalama Apo B değeri kontrol grubu gibi kullanılarak, kız ve erkeklerde Apo B ortalama değerleri arasında fark olup olmadığı da araştırıldı. Genel ortalama ile sadece RID'le Apo B çalışılan yöntemde kızlar grubunda istatistiksel açıdan az önemli bir fark bulundu (Tablo III).

Kız ve erkek grupları arasında Apo B ortalama değerleri bakımından yapılan kıyaslamada, RID yönteminde istatistiksel açıdan önemli ($p < 0.01$), serumla raket elektroforezi yönteminde ise az anlamlı bir fark ($p < 0.05$) olduğu görüldü (Tablo IV).

Tablo: III
Erkek ve Kız Gruplarında RID ve Roket Elektroforezi (kanda, serumda)
Yöntemleriyle Saptanan Apo B Ortalama Değerlerinin Dağılımı

Gruplar	Y Ö N T E M L E R								
	RID			Serumda Roket Elektroforezi			Kanda Roket Elektroforezi		
	n	Apo B (% mg) x ± SH	P	n	Apo B (% mg) x ± SH	P	n	Apo B (% mg) x ± SH	P
Genel Ortalama	20	55.6 ± 2.8	—	32	54.6 ± 1.3	—	32	55.1 ± 1.3	—
Kız	6	62.3 ± 3.4	0.05	9	57.0 ± 2.7	A.D.	9	56.7 ± 2.7	A.D.
Erkek	14	52.7 ± 3.4	A.D.	23	53.7 ± 1.5	A.D.	23	54.5 ± 1.4	A.D.

A.D.: Genel ortalama göre anlamlı değil

Tablo: IV
Kız ve Erkek Gruplarında 3 Yöntemle Saptanan Apo B Ortalama
Değerlerinin Gruplar Arası Karşılaştırılması

Gruplar	Y Ö N T E M L E R								
	RID			Serumda Roket Elektroforezi			Kanda Roket Elektroforezi		
	n	Apo B (% mg) x ± SH	p	n	Apo B (% mg) x ± SH	p	n	Apo B (% mg) x ± SH	p
Kız	6	62.3 ± 3.4	—	9	57.0 ± 2.7	—	9	56.7 ± 2.7	—
Erkek	14	52.7 ± 3.4	0.001	23	53.7 ± 1.5	0.05	23	55.4 ± 1.4	A.D.

A.D.: Erkeklerdeki Apo B değerleri, kızlara göre anlamlı değil.

TARTIŞMA

12 yıldan beri neonatal tarama programlarında FH-II'nin saptanması için araştırmalar yapılmaktadır. Sadece topuk kanı kolesterol ölçümü, FH-II'nin bu yaş-takiler için kolesterol seviyesi ile zayıf korrelasyonu yüzünden başarısız olmuştur. Bunun üzerine FH-II'nin saptanmasında, yeni doğan topuk ve kordon kanında Apo B miktar belirtiminin daha uygun olacağı fikrine varılarak, bu amaçla Laurell Roket elektroforezi yöntemi bazı araştırmacılar tarafından kullanılmıştır¹⁵⁻¹⁸.

1980 yılında Vladutiu G.D. ve arkadaşları filtre kağıdına alınmış kordon kanında Laurell Roket elektroforezi yöntemiyle Apo B taraması yaparak (916 yenidoğanda) kordon kanında saptadıkları Apo B konsantrasyonunu 107 mg/dl olarak bildirmişlerdir⁹. 1982 yılında Srinivasan S.R. ve arkadaşları, doğumdan sonraki 6 ay içinde Apo B değerlerini ortalama 43 mg/dl bulmuşlardır¹⁶. Peter J. Dolphin ve arkadaşları ise Kanada'da yaptıkları araştırma sonucu, yenidoğanda Apo B değerlerini 25.4 ± 1.2 mg/dl olarak bildirmişlerdir¹⁸. Avusturya'da W. Strobl ve arkadaşları yaşamın ilk haftasında Apolipoprotein ve lipoprotein taraması yaparak, yenidoğan 44 olguda ilk 5 gün içinde Apo B değerini 50 mg/dl olarak saptamışlardır¹⁷.

İlk defa 1976 da bebeklerde familyal Tip II hiperlipoproteinemi taramasında, serumda Apo B ölçümü RID yöntemiyle gerçekleştirilmiştir¹⁹. Daha sonra 1985 yılında, familyal Tip II hiperkolesterolemi tayini için filtre kağıdına alınmış kan numunelerinde RID yöntemi ile Apo B çalışılmış ve Apo B konsantrasyonu, 3-5 günlük normal bebeklerde 28 ± 7 mg/dl olarak saptanmıştır²⁰. Biz çalışmamızda, 48 saatlik yenidoğan kan ve serumunda Apo B değerlerini inceledik. Referans yöntem olarak kabul ettiğimiz RID yöntemiyle, 20 olgu serumunda Apo B ortalama değerini 55.6 ± 2.8 mg/dl, 32 olguda ise, kan ve serumda Rokat Elektroforezi yöntemiyle Apo B ortalama değerlerini 55.1 ± 1.3 mg/dl ve $54.6 + 1.3$ mg/dl olarak saptadık.

Luisa Romavo 1985 yılında yenidoğanda yaptığı bir araştırma sonucu hem parenteral, hem de anne sütüyle beslenen çocuklarda Apo B değerlerinin doğumdan sonra giderek artış gösterdiğini, Apo A değerlerinde ise farklı sonuçlar bulunduğunu bildirmektedir²¹.

1980 yılında J.P. Van Bievliet ve arkadaşları yenidoğanda lipoproteinlerin gelişmesini İmmunonefelometri (INA) yöntemi ile incelemiş, bebeklerin doğduğu gün Apo B değerlerini ortalama 24 mg/dl, doğduğu günden 7. güne kadar ortalama 67 mg/dl ve 7. günden 30. güne kadar ortalama 70 mg/dl olarak saptamışlardır²². Değişik yöntemle çalışılmasına rağmen bu değerlerin bizim değerlerimizle uyumlu olduğunu söyleyebiliriz. Çünkü Apo B'nin kandaki miktarı yaş ve cinsiyete bağlı olarak 58-138 mg/dl arasında değişmektedir^{16,23}. Biz de çalışmamızda, yaşamın ilk haftası içinde Apo B konsantrasyonunun giderek arttığını gözledik.

Sonuç olarak, çalışmamızda elde ettiğimiz bulguları şöyle özetleyebiliriz:

Kanda, serumda Rokat Elektroforezi ve RID yöntemleri ile saptadığımız Apo B ortalama değerleri arasında istatistiksel açıdan anlamlı bir fark yoktu.

Cinsiyete göre Apo B ortalama değerleri kıyaslandığında, serumda Rokat Elektroforezi yönteminde, kızların Apo B ortalama değerlerinin erkeklerden biraz yüksek olduğu, RID yönteminde ise bu farkın arttığı gözlemlendi.

Değişik 3 yöntemle saptadığımız Apo B ortalama değerleri, kaynak verilerinde bulduğumuz aynı yaş grubundaki bebeklerin Apo B ortalama değerlerine kısmen uyuyordu.

Bebeklerden kan almanın zorluğu düşünülürse, direkt olarak topuktan kağıda emdirilen 1 damla kan (5 µl)'in yeterli olduğu Rokat elektroforez yönteminin hem bebek hem de çalışmayı yapan açısından büyük kolaylık sağladığı görülür. İşte, atheroskleroz risk grubuna giren bebeklerin daha doğar doğmaz tarama ile saptanarak, riskli olguların tedaviye alınabilmesine olanak sağlayan bu pratik yöntemin tüm yenidoğan servislerinde kullanılmasını öneriyoruz.

KAYNAKLAR

1. AVOGARO, P., BITTOLO, B.G., CAZZOLATO, G.: Plasma levels of apolipoprotein AI and apolipoprotein B in human atherosclerosis. Artery, 4: 385-394, 1978.
2. AVAGARO, P., CAZZOLATO, G., BITTOLOBON, G.: Are apolipoproteins better discriminators than lipids for atherosclerosis? Lancet, 1: 901-903, 1979.

3. JACKSON, R.L.: Lipid transport and atherosclerosis: Role of apolipoproteins in vascular smooth muscle. In: Topics in Physiology; Metabolic, Ionic and Contractile Mechanisms. (eds: Krass, M.F., Barnes, C.D.) New York, Academic Press, 1982, p. 163-196.
4. SCHAEFER, E.J., EISENBERG, S., LEVY, R.I.: Lipoprotein apoprotein metabolism. *J. Lipid Res.*, 19: 667-687, 1978.
5. SNIDERMAN, A., SHAPIRO, S., MARPOLE, D.: Association of coronary atherosclerosis with hyperapobetalipoproteinemia (increased protein but normal cholesterol levels in human plasma low density lipoproteins). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 604-608, 1980.
6. VAUGHAN, V.C., MC KAY: Nelson Çocuk Hastalıkları (Pediatri) (Çev. Gedikoğlu G.) Cilt 3, 10. Baskı, Güven Kitabevi Yayınları, Ankara, 1978, s. 1025.
7. GURR, M., M.I., JAMES, A.T.: Lipid Biochemistry: An Introduction. 2nd ed. Chapman and Hall, London, 1975, p. 171-180.
8. WOOTTON, I.D.P., FREEMAN, H.: Microanalysis in Medical Biochemistry. 6 th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, 1982, p. 167-169.
9. 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.
10. LAURELL, C.B.: Electroimmunoassay. *Scand. J. Clin. Lab. Invest*, 29: 21-37, 1972.
11. BECKER, W., SIEBER, A.: Methods of Qualitative and Quantitative Immuno-electrophoresis. Farbwerke, Hoechst A.G. 6230, Frankfurt (Main) 80. Behring Department. 1975, p. 12-15.
12. NERENBERG, S.T.: Electrophoretic Screening Procedures. (eds.: French, M. R., Eichman, M., Fiorella, B.) 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. CURRY, M.D., GUSTAFSAN, A., ALAPOVIC, 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.
15. ALBERS, J.J., CABANA, G.V., HAZZARD, R.W.: Immunoassay of human plasma apolipoprotein B. *Metabolism*, 24/12: 1339-1350, 1975.
16. SRINIVASAN, S.R., SHARMA, C., FOSTER, A.T., BERENSON, G.S.: Longitudinal Changes of serum lipid and apo B levels in a newborn infant cohort. *Metabolism*. 31: 2, 1982.
17. STROBL, W., WIDHALM, K., KOSTNER, G., POLLAK, A.: Serum apolipoproteins and lipoprotein (a) during the first week of life. *Acta. Pediat. Scand.* 72: 505-509, 1983.
18. DOLPHIN, P.J., BRECKENDRIDGE, W.V., TAN, M.H.: The lipoproteins of human umbilical cord blood, apolipoprotein and lipid levels. *Atherosclerosis*, 51: 109-122, 1984.

19. ANDERSEN, E.G., HANSEN, F.B.: Neonatal diagnosis of familial type II hyperlipoproteinemia. *Pediatrics*, 57/2: 214-220, 1976.
20. 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 hypercholesterolemia. *Clin. Chem. Acta.*, 149: 117-127, 1985.
21. ROMAVO, L.: Post heparin plasma lipases and carnitine in infants during parenteral nutrition. *Pediatr. Res.*, 19/3: 292-296, 1985.
22. VAN BIEVLIET, J.P., VERCAEMST, R., DE KEERGIETER, W., VINAI-MONT, N., CASTER, H., ROSSENEU, M.: Evolution of lipoprotein patterns in newborns. *Acta Paediatr. Scand.*, 69: 593-596, 1980.
23. TIETZ, N.W.: *Tewtbook of Clinical Chemistry*, W.B. Saunders Company. Philadelphia, 1986, p. 853.

Yrd. Doç. Dr. Asuman H. GÜLER
 U.Ü. Tıp Fakültesi
 Biyokimya Anabilim Dalı
 BURSA

SUMMARY

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

In our laboratory, apolipoprotein B type II measurement has been done with the method of radial immunodiffusion using the serum of blood and serum which has been spotted on filter paper. In the study of the new method, Apo B serum spots with the method of Radial Immunodiffusion (RID) and radial immunodiffusion (RID) method have been compared statistically.

The results we had in our study to compare with the serum spot if the method of radial immunodiffusion is used, we showed that the method of radial immunodiffusion is also suitable for the serum spot if also spotted on filter paper.

* Yrd. Doç. Dr. A. H. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
 U.Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı
 BURSA