

T. C.
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
FİZYOLOJİ ANA BİLİM DALI

80818

İMMÜNOLOJİK GEBELİK TESTİ
ÜRETİMİ

MASTER TEZİ

Ülkü ÇÖMELEKOĞLU
Fizyoloji Ana Bilim Dalı
Araştırma Görevlisi

ÜNİVERSİTE KÜTÜPHANESİ
ADANA

80918

ADANA - 1985

Bağış, Haziran 1985

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ ve YÖNTEMLER.....	20
BULGULAR.....	26
TARTIŞMA ve SONUÇ.....	30
ÖZET.....	37
KAYNAKLAR.....	38

G İ R İ Ő

Canlılığın özel evrelerinin belirlenmesi ve normalden sapmaların değerlendirilmesinde bulunulan an için özgün olarak üretilen bazı aktif maddelerin nitelik ve nicelik yönünden ölçümü, gerek klinik uygulama ve gerek araştırma disiplinlerinde sıklıkla kullanılan temel bir yöntemdir. Göreceli olarak kaba fiziksel yöntemlerle başlatılan nitelik ve nicelik ölçümü duyarlık, özgüllük ve yinelenebilirlik koşulları açısından daha sonra kimyasal yöntemlere el atmış ve günümüzde ise immünolojik yöntemlerin geliştirilmesiyle en üst verimliliğe ulaşmıştır. Serolojinin tarihinin yaklaşık yüz yıla ulaşmasına karşın immünolojik yöntemlerin genel tıp pratiğinde yaygın olarak uygulanması 1940 yıllarında başlamış ve yapılan başlangıç çalışmaları, yöntemin geniş kullanma alanına sahip olması ve çok büyük karlılık göstermesi nedeniyle giz halinde saklanıp patentlerle korunmaya alınmıştır.

Gerçekten de günümüz Türkiye'sinde bu testler çağdaş tıbbın uygulandığı bütün ülkelerde gözleendiği gibi geniş ölçüde kullanılmakta ancak bu testlerin üretimi için gerekli yoğunlaştırılmış bilgi elimizde bulunmadığından testlerin tüketimi bir kaç yabancı firma tarafından denetlenmektedir. Bir örnek olarak alınan immünolojik gebelik testlerinin pratiğe aktarılması 20 yıllık bir geçmişe sahip olup bu testler Türkiye'de çok yaygın bir şekilde tüketilmektedir.

Bu çalışmadaki amaç ayrı disiplinlere dağılmış bilgi mozaiğini birleştirmek ve ilk kaynaklardaki ip uçlarından yola çıkarak anılan testlerin yurt içinde üretimi için gerekli teknik bilgi üretimi ve

uygulamayı sağlamaktır. Bu çalışmada pratik olarak hemaglütinasyon inhi-
bisyon tepkimesine dayalı, biyolojik materyal içindeki insan koriyonik
gonadotropinin saptanmasına yönelik test ele alınmıştır.



GENEL BİLGİLER

İnsan koryonik gonadotropin (HCG)'in saptanmasında kullanılan immünolojik yöntemler günümüzde gebelik tanısı için çok geniş çapta kullanılmaktadır (25). Yapılmalarının çok kolay, sonuçlarının ise çok güvenilir olması nedeniyle özellikle hemagglütinasyon inhibisyon tepkimelerine baş vurulmaktadır (24). Bu araştırmalarda kullanılan antiserumlar tavşanların çok geniş özgül aktivite değişikliği gösteren HCG preparatları ile aşılansıyla elde edilmiştir (7).

İlk kez 1960 yılında Wide ve Gemzell (4) hemagglütinasyon inhibisyon temelinde dayanan ilk immünolojik gebelik testini yayınladılar. 1961 yılını ise kompleman fiksasyon temelinde dayanan bir başka test yayınlandı (2). 1962 yılında Robbins ve arkadaşları bir lateks partikül agglütinasyon testi bildirdiler. Testin duyarlılığının 0.7 IU/ml den daha fazla olması halinde LH ve FSH ile çapraz tepkime verdiğide gösterilmiştir (17).

HCG-özgül antiserum üretilmesinde iki yöntem yayınlanmıştır. Mc Kean (14) antiserum üretiminde antijen olarak saflaştırılmış bir HCG preparatı kullanmıştır. Bunun diğer bir seçeneği presipitinleri ve diğer antikoları uzaklaştırmak için HCG antiserumu idrar veya serum ekstraları ile adsorbsiyonudur (7).

Hemagglütinasyon inhibisyon yöntemi biyolojik veya HCG ile kaplı lateks partikül yöntemine oranla daha duyarlı ve daha doğrudur (14). Bununla beraber ticari kitler oldukça pahalıdır. Bu testlerde kullanılan gerecin hazırlanışına dair ayrıntılı bilgi mevcut olmayıp burada HCG ile kaplanan hücreler olarak formalinli ve tannenli eritrositler kullanılmıştır.

Yöntemler zaman alıcı olup bazen güvenilir sonuçlar vermektedir (14). Avrameas ve arkadaşları ile Onkelinx ve arkadaşları daha iyi bir yöntem yayınlamış olup burada daha basit ve hızlı bir pasif hemaglutinasyon testinde proteinler eritrositlere glutaraldehid ile bağlanmaktadır (14).

İmmünolojik gebelik testi temel olarak bir antijen-antikor tepkimesidir. Bu nedenle antijen ve antikorların yapıları ve özellikleri ile antijen-antikor tepkimesinin temel ilkelerini gözden geçirmek uygun olacaktır.

ANTİJEN

Antijen terimi kendine özgül antikor oluşturan maddeler olarak tanımlanır. Fakat bu terimi daha doğru olarak kendine özgül immün yanıt oluşturan maddeler diye tanımlamak gerekir. Çünkü immün yanıt sadece antikor şeklinde olmayıp antikorların rol oynamadığı hücre sel yanıt antijene özgül olan bir yanıttır (6).

Herhangi bir maddenin antijen etkisi gösterebilmesi için bazı özelliklere sahip olması gereklidir. Bu özellikleri şöylece özetleyebiliriz :

1. Antijen enjekte edildiği hayvana yapı bakımından yabancı olmalıdır. Bu yabancılık molekülün yapı taşları farklılığı bakımından olmayıp diziliş ve özellikle yüzeyde üç boyutlu yapı olarak duruşu ve elektron yükü bakımından olmalıdır (19).

2. Antijenitede molekül ağırlığı da rol oynamaktadır. İyi bir antijenin molekül ağırlığı genellikle 10.000 in üzerinde olmalıdır. Molekül ağırlığı 5.000 in üzerinde olan proteinler antikor üretimini kolaylıkla uyarabilirler. Molekül ağırlığı 5.000 in altında olan peptidler

daha az immünojendirler.(16).

3. İmmün yanıt oluşturmada enjekte edilen antijen miktarı da önemlidir. Vücuda giren çok az miktarda antijen immün yanıtı ya hiç oluşturmaz veya çok az oluşturabilir.

4. Antijenin bir özelliği de kullanılan antijenik maddenin çözülebilir olmasıdır. Ayrıca bunların organizmaya verilmiş yolları da önemlidir.

5. Antijenite antijenik maddenin verildiği organizmanın yaşı, cinsiyeti ve türü ile de ilgilidir.

6. Bir molekülün antijenitesini adjuvant etki gösteren maddelerin eklenmesi de etkiler. Genellikle adjuvant varlığı ile antijenite artar.

7. Bir makromolekülün yapısının kompleks olması o molekülün antijenik özelliğini arttırır.

Yukarıda sayılan bu özelliklere göre bilinen bazı kimyasal bileşiklerin antijen olma yeteneklerinin incelenmesi gerekir.

Proteinler

Proteinler antijenik özellikleri gösterilen ilk maddelerdir ve hatta yaygın biçimde antijen olarak kullanılmaktadırlar (21). Proteinlerin çoğu iyi antijendirler. Bunların antijenik özelliğini yapısındaki amino asitlerin ve peptidlerin sıralanmasındaki değişiklikler oluşturur. Protein antijenlerine örnek olarak memeli vücut proteinleri, albumin ve gamma globülün örnek olarak verilebilir.

Polisakkaritler

Polisakkaritlerin pek azı saf olarak antijenite gösterirler. Bunun nedeni polisakkaritlerin molekül yapısının kompleks olmamasıdır.

Lipidler

Saf lipidler immün yanıt oluşturmazlar. Bunlar organizmaya yabancı olan proteinlerle birleştiğinde antijenik özgüllük gösterirler. Bu özelliği ile lipidler haptendir. Haptenler küçük kimyasal maddelerdir. Haptenin antijenden farkı şudur : antijen hem antikor yapımını uyarır hem de oluşan antikorla birleşir; hapten ise antikor sentezini uyarmaz fakat oluşan antikorla birleşebilir. Hapten özelliğinde olan maddeler bir proteine molekülüne bağlanarak organizmaya enjekte edilirse antijenik özellik kazanırlar (18).

Nükleik Asitler

Nükleik asitlerin antijenik olmadığı bilinirdi. Fakat sistemik lupus erythematosus olarak bilinen hastalıklı kişilerin serumunda anti-DNA antikorlarının bulunmasından sonra bu maddelerin de proteine bağlanarak antijenite gösterebileceği anlaşılmıştır. (21).

Adjuvantlar

Adjuvant antijenle beraber enjekte edildiği zaman immün yanıtı arttıran maddelere verilen addır. Adjuvantların etki tarzı birkaç başlık altında incelenebilir (18).

Depo etkisi .- Serbest antijen enjeksiyon yerinden hızla yayılır. Depo adjuvantlarının en önemli görevi antijenin çabuk dağılmasını önleyerek uzun ömürlü bir antijen rezervuarı oluşturmaktır. Bu tür adjuvantların en çok kullanılanı alüminyum bileşikler ve Freund'un adjuvantıdır. Freund adjuvantı tam veya tam olmayan diye iki türlü hazırlanır. Tam olmayan Freund adjuvantı sadece lenolin ve parafin yağı karışımı olup suda erimiş özgül antijen ile iyice karıştırılarak deney hayvanına :

enjekte edilir. Tam Freund adjuvantı ise tam olmayan adjuvanta ölü tüberküloz basilinin eklenmesiyle hazırlanır.

Makrofaj aktivasyonu.- Depo edici adjuvantların etkisi altında makrofajlar, antikor yapan hücrelerin tepkileşme alanı görevini yapan granulları oluşturur. Hemen hemen bütün adjuvantlar makrofajları uyarır. Bazıları bu uyarıyı doğrudan yapar. Fakat Freund'un tam adjuvantı makrofajları T hücreleri aracılığıyla etkiler (18). Aktive makrofajların rolü yüzeylerindeki antijen yoğunluğunu arttırarak ve lenfositlere sunarak antijenin immünojenliğini arttırmak, yardımcı işaretlerle lenfositleri immün yanıtta yönelmek ve lenfosit aktive edici etkenler salgılayarak lenfosit çoğalmasını arttırmaktır.

Lenfositler üzerine özgül etkileri.- Freund'un tam adjuvantındaki mikobakteri bileşeninin immün ve diğer etkileri o kadar güçlüdür ki insanda kullanımı onaylanmaz. Bu T hücrelerinin yardımcı, gecikmiş aşırı duyarlılık ve otoimmün hastalıkların oluşumundaki faaliyetini arttırır.

Anti-tümör etkisi.- Başlıca etki, aktive makrofajların tümör üzerindeki sitotoksik faaliyeti sonucu ortaya çıkar.

Adjuvantlar karıştırılarak verildiği gibi ayrı ayrı da verilebilir. Bu durumda adjuvantı antijenden önce veya aynı zamanda vermek gerekir. Eğer adjuvant antijenden sonra enjekte edilirse humoral yanıtta artma olmasına rağmen hücresel yanıtta azalma veya baskılanma olur (6).

ANTİKOR

Antikor belirli antijen veya haptenlerin determinant gruplarına karşı oluşmuş protein molekülleridir.

1890 yılında Von Behring ve çalışma arkadaşları immünize edilmiş

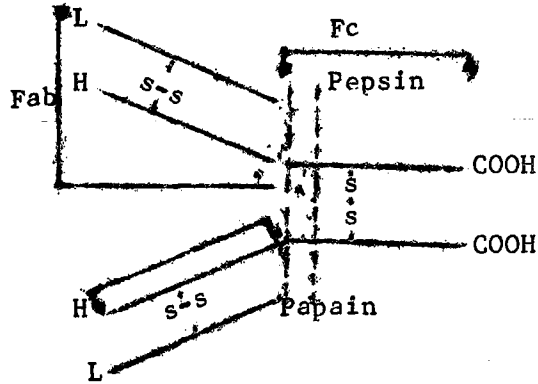
hayvanların serumunda antikorun varlığını göstermelerine rağmen 1938 yılına kadar antikorların kimyasal yapısı hakkında fazla bilgi edinilemedi. 1937 de Tiselius ve Kabat antikor aktivitesiyle serum gamma globulinleri arasındaki ilişkiyi göstermişlerdir. Kanda yüksek konsantrasyonda antikor elde etmek için tavşanları pnomokok polisakkariti ile aşırı duyarlaştırmışlar ve elde ettikleri immün serumu elektroforez üzerinde antijen ile absorbe etmeğe çalışmışlardır. Serumdan antikorun uzaklaştırılması sadece gamma globulin bölümünde anlamlı bir azalmaya neden olmuştur (18). Antikor görevi yapan bir çok değişik tip moleküle immün globulinler adı verilmiştir (20). İnsanda başlıca beş değişik yapıda immün globulin vardır; immünglobulin G (IgG), immünglobulin M (IgM), immünglobulin A (IgA), immünglobulin D (IgD) ve immünglobulin E (IgE) dir.

Serumun gamma globulin fraksiyonu kan dolaşımında bulunan ve antikor aktivitesi gösterebilen immünglobulinlerin başlıca oturduğu yerleridir (6). Plazma hücreleri ve lenfositlerin muhtelif gelişme evrelerinde yapılan immünglobulinler plazmadan başka idrar, süt, serebro spinal sıvı, tükürük ve gözyaşı gibi salgılar ile lenf düğümleri ve dalak gibi dokularda bulunurlar. Immünglobulinler fizikokimyasal ve biyolojik yapıları yönünden birbirinden çok farklıdır. Bunların molekül ağırlıkları 150.000 den 900.000'e kadar değişir. Önemli özellikleri özgül antijenle tepkimeye girmeleridir.

Immünglobulinler çok zincirli glikoprotein yapısında olan maddelerdir. 1959 da Porter serumu gamma globulin bölümünü ayırarak papain ve pepsin gibi proteolitik enzimlerle işlemiştir. IgG antikorları papain ile üç parçaya ayrılır (16, 21, 20). Bunlardan ikisi özdeştir ve çökeltilir.

yapmayan solubl bir kompleks oluşturur. Bu nedenle bunlar tek değerli antikor parçalarıdır ve Fab olarak adlandırılırlar. Üçüncü parça antijenle birleşemez ve Fc adını kristal şeklinde elde edilebildiği için almıştır. Bir başka sindirim enzimi olan pepsin Fc parçasına antikor molekülünden ayırır ve geriye 5S katsayısında antijenle çökelti yapabilen iki değerli Fab kalır (16, 21, 20).

Edelman antikor molekülünü mercaptoetanol gibi tiol bileşikleriyle üre varlığında redükte ettiğinde bu molekülden iki tür polipeptid zinciri açığa çıkmıştır: Ağır (H) zincirler (50.000 molekül ağırlığında olan uzun polipeptid zinciridir.), Hafif (L) zincirler (20.000 molekül ağırlığında kısa polipeptid zinciridir.) Bu deneyde H ve L zincirlerinin birbirinden ayrılması aralarındaki disülfid bağlarının kopmasıyla olmuştur. Bir antikor molekülünde bu zincirlerden en az ikişer tane vardır. Bu zincirler birbirlerine kovalan olarak disülfid (S-S) bağları ile bağlanmak suretiyle immünglobülün moleküllerini oluştururlar. Daha önce papain ile parçalanmış Fab ve Fc kısımlarının kendilerine karşı hazırlanmış antiserumlar ile işlenmesi sonucu Fab kısmının hem H hem de L zinciri, Fc kısmının ise sadece H zincirini kapsadığı anlaşılmıştır.



Şekil 1. Porter 'in ileri sürdüğü antikor modeli

İnsanda başlıca beş tip ağır zincirin varlığı ortaya konmuştur (6, 16, 21, 18). Bunların her biri ayrı tip immünglobülün sınıfını oluşturur. Her immünglobülün sınıfında kendine özgü bir tek ağır zincir bulunduğu halde hepsinde kappa ve lambda hafif zincirleri bulunur. Şimdiye kadar incelenen myeloma proteinlerinin hepsi hangi sınıftan olursa olsun ya kappa ya da lambda hafif zincirine sahiptir. Fakat hiçbir zaman iki tip hafif zincir bir arada bulunmaz (18).

Antikorların antijenle birleşme yüzleri .- Antikor molekülünün immünolojik olarak özgül antijenle birleşme özelliği vardır. Antikor molekülünün antijeni yakalama özelliği Fab bölümündedir (18). Antikorların H ve L zincirlerinin aminoasit dizilişleri incelendiğinde antijen bağlayan uçta aminoasit diziliş farklarının çok sık olduğu, buna karşılık Fc kısmındaki H zincirinde aminoasit dizilişinin daha az farklı olduğu görülmüştür. Bu nedenle gerek H ve gerek L zincirlerinin antijen bağlayan uç kısmına V veya değişken bölge, diğer kısmına ise C veya değişmez uç denir.

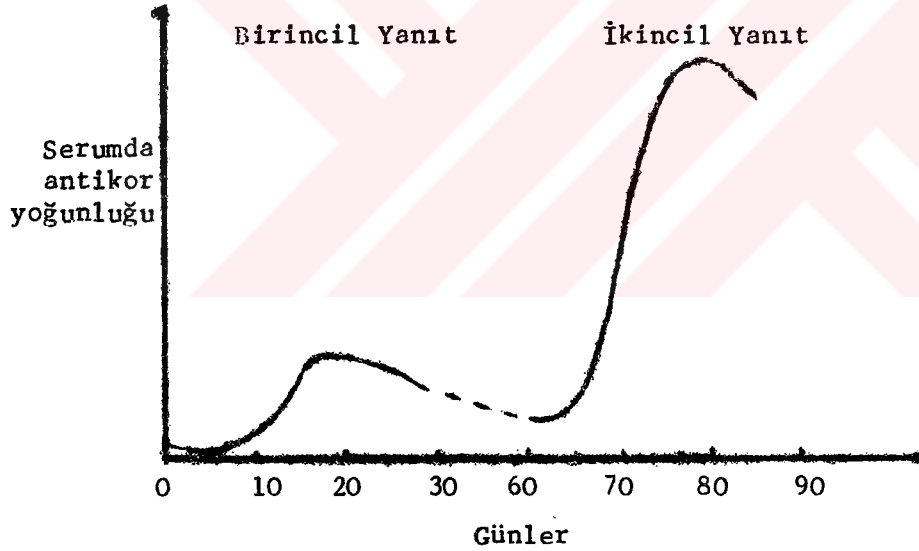
Herhangi bir antijenin vücuda ilk veya ikinci kez girmesine bağlı olarak immün yanıt iki tür olarak ortaya çıkar (6).

1. Birincil (primer) immün yanıt.- İmmün yanıt verme yeteneğinde olan bir organizmaya herhangi bir antijen ilk kez verildiğinde ortaya çıkan immün yanıt birincil yanıt denir. Antijen verildikten sonra 1-2 gün içerisinde hiçbir immün yanıt görülmez. Bir süre sonra önce bağışıklıkta önemli rol oynayan organlardaki lenfositlerde artma olur. 4 veya 5'inci günlerden itibaren plazmada antikorlar ortaya çıkmaya başlar (6).

2. İkincil (sekonder) immün yanıt.- Aynı antijen organizmaya ikinci kez verildiği zaman ikincil immün yanıt ortaya çıkar. İkincil ya-

nıta bekleme evresi olmadan özellikle IgG sınıfındaki antikorlarda çok hızlı ve yüksek artış görülür. Bu antikorların kanda kalış süresi daha uzundur. Burada önemli bir özellik vardır. İmmün yanıt sistemi birinci antijen uyarımını unutmamıştır, immünolojik bir bellek söz konusudur (6).

J.C. Antoin ve S. Avrameas'ın (6) 1976 yılında yaptıkları çalışmalarda organizmaya farklı ve tekrarlanan miktarda antijen verilmesinin antikor yapan hücrelerin oluşmasına olan etkisi incelendi. Birinci enjeksiyondan sonra antijen dozuna uygun olarak lenf düğümlerinin büyüdüğü fakat antikor yapan hücrelerin çok az arttığı gözlemlendi. Yapılan ikinci enjeksiyondan sonra ise antikor yapan hücrelerin arttığı saptandı. Bu deneyler birincil ve ikincil immün yanıtı aydınlatıcı niteliktedir.



Şekil 2. Birincil ve İkincil İmmün Yanıt.

Antijen-antikor birleşmesi ileri derecede özgül bir tepkime olup, bu tepkimenin özellikleri şu şekilde özetlenebilir:

1. Bu tepkime özgül bir tepkimedir.
2. Tepkime kimyasal olup birbirlerine karşı özgül grupları olan

iki molekülün birleşmesidir.

3. Antijen-antikor birleşmesi tersinir yani geri dönüşür. Birleşmeden sonra antijen veya antikorda moleküler bir parçalanma veya sindirim olmaz.

4. Antijen-antikor birleşmesinde antikor iki değerli, antijen ise birden fazla birleşme yerine sahip olduğu için tepkimeye giren antijen-antikor miktarı değişik oranlarda olabilir.

5. Antijen-antikor tepkimesi iki evrelidir,

Birinci evre.- Çok çabuk, saniyeler içinde oluşur ve özgüdür. Bu evrede ısı enerjisi açığa çıkar, kimyasal bir olaydır. Gözle görülmeyen bu evrede elektrolitlerin bulunması zorunlu değildir.

İkinci evre.- Yavaş seyirli olup dakika ve saatler içinde tamamlanır. Tepkimenin bu evresi için elektrolitlerin bulunması zorunludur. Çok az ısı enerjisi oluşur, presipitasyon veya aglütinasyon tepkimelerinde olduğu gibi gözle görülür. Isı ile tepkime hızı artar. Nötral pH da hız en fazladır.

Antijen-antikor birleşmesinde rol oynayan kuvvetler

Antijenlerin çok farklı olması nedeniyle antijen-antikor birleşmesinde tek tip kuvvet veya kimyasal tepkimenin rol oynaması beklenemez. Antijen-antikor birleşmesinde etkin olan kuvvetler şunlardır :

1. Kolombik kuvvetler.- Karşıt yüklü iyon grupları taşıyan iki proteinin yan zincirleri arasındaki çekime dayanır. Çekme kuvveti (F) yükler arasındaki uzaklığın (d) karesiyle ters orantılıdır.

$$F \propto 1/d^2$$

2. Hidrojen bağı.- .OH, .NH₂ ve . COOH gibi hidrofil grupları ara-

sında nisbeten zayıf ve tersinir hidrojen köprüleri oluşur.

3. Hidrofobik kuvvetler.- Valin, lösin, fenilalanin gibi amino asitlerin yan zincirleri hidrofobdur. Yani su moleküllerini iticidir. Çözelti halinde bu amino asitlerin karşı karşıya gelmesi durumunda su moleküllerinin itilmesi, dolayısı ile birbirlerine yaklaşmaları olası olur.

4. Van der Waals kuvvetleri.- Moleküller arasındaki bu kuvvetler dış elektron bulutları arasındaki tepkilere dayanır. Burada çekme kuvveti uzaklığın yedinci kuvvetiyle ters orantılıdır.

$$F \propto 1/d^7$$

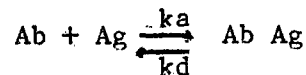
Sonuç olarak bunların hepsinde de kuvvetin anlamlı olarak artması için iki molekülün birbirine yaklaşması gerekir (18).

Antijen-antikor tepkimesinin kinetiği

Bir antikorun tek değerli hapten veya tek bir antijen determinantı ile bağlanma kuvvetine antikor afinitesi denir. Antikorun bütün antijen molekülü ile tepkisini ifade eden terim ise avidite olarak adlandırılır.

Afinite, antijen ve antikorun etkileşim gücünü termodinamik bir ölçümüdür. Bu terim ya denge sabiti K (lt/mol) yada serbest enerji değişimi ΔG (kalori/mol) olarak ifade edilir (21).

Antikorun bir antijenin yüzey determinantı veya tek değerli hapten molekülü ile birleşmesi tersinir bir olaydır ve birleşmenin gücüne göre kolaylıkla çözülebilir. Denge durumunda antijen-antikor tepkimesi aşağıdaki şekilde ifade edilebilir (22).



(Ab = serbest antikor, Ag = serbest antijen, AbAg = antijen-antikor komp-

leksis, k_a = assosiyasyon sabiti, k_d = dissosiyasyon sabiti)

Kütle etkileşim yasası antijen-antikor kompleksinin konsantrasyonunun (AbAg) serbest antijen ve antikor konsantrasyonlarına (Ab) (Ag) oranı olarak ifade edilir (21,22). Denge durumunda assosiyasyon ve dissosiyasyon oranları birbirine eşittir (21).

$$k_a (Ab) (Ag) = k_d (AbAg)$$

$$\frac{k_a}{k_d} = K = \frac{(AbAg)}{(Ab)(Ag)} \quad (1)$$

Burada K denge sabiti veya tepkimenin afinitesidir. Antijene kuvvetle bağlanan antikorlara yüksek afiniteli antikorlar denir. Antijen ile antikor birbirlerine sıkıca uyarlırsa denge sağa kayar.

$$K (Ab) (Ag) = (AbAg) \quad (2)$$

Antikor molekülünün total konsantrasyonu, antijene bağlanan antikor molekülünün konsantrasyonu ile serbest antikor molekülünün toplamına eşittir (15).

$$(Abt) = (Ab) + (AbAg) \quad (3)$$

$$(Ab) = (Abt) - (AbAg) \quad (4)$$

Bunu (2) eşitliğinde yerine koyacak olursak;

$$K (Ag) (Abt) - (AbAg) = (AbAg) \quad (5)$$

$$K (Ag) (Abt) - K (Ag)(AbAg) = (AbAg) \quad (6)$$

$$K (Ag) (Abt) = (AbAg) + K (Ag) (AbAg) \quad (7)$$

$$K (Ag) (Abt) = (AbAg) (1 + K (Ag)) \quad (8)$$

(8) eşitliğinin her iki tarafını $(Abt) (1 + K (Ag))$ ye bölecek olursak;

$$\frac{(AbAg)}{(Abt)} = \frac{K (Ag)}{(1 + K (Ag))} \quad \text{eşitliğini elde ederiz.}$$

$$\frac{(AbAg)}{(Abt)} = r = \frac{nk(Ag)}{(1+K(Ag))} \quad (9)$$

(r = var olan antikorun her molüne bağlanan haptenin mol sayısı, $(AbAg)$ = bağlı antikor konsantrasyonu, (Abt) = total antikor konsantrasyonu, (Ag) = serbest haptin konsantrasyonu, n =antikor valansı, K = denge sabiti).

(9) eşitliğinin her iki tarafını $1 + K (Ag)$ ile çarparsak

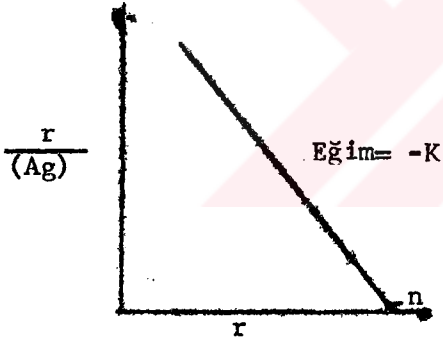
$$r (1 + K (Ag)) = nK (Ag) \text{ eşitliğini elde ederiz.}$$

Buradan da:

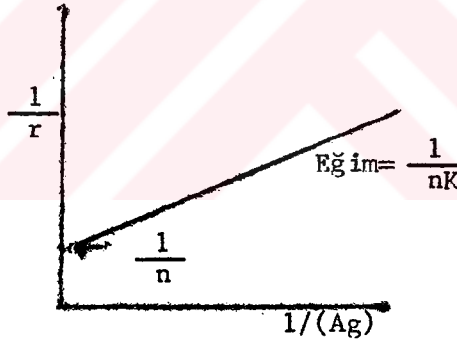
$$r = nK (Ag) - rK (Ag)$$

$$\frac{r}{Ag} = nK - rK \text{ bulunur.}$$

r/Ag 'nın r ye karşı grafiği (Scatchard grafiği) çizilecek olursa bu grafikten antikor valansı n ile denge sabiti K nin değerleri bulunabilir. Aynı şekilde $1/r$ nin $1/Ag$ ye karşı grafiği (Langmuir) çizilecek olursa antikor valansı ile afinite değerleri bu grafikten saptanabilir.



Şekil 3. İdeal antijen-antikor bağlanmasının Scatchard grafiği.



Şekil 4. İdeal antijen-antikor bağlanmasının Langmuir grafiği.

Scatchard ve Langmuir grafiklerinin her ikisinde lineerdir. Fakat pratikte antikorlar izole edilmiş ve saflaştırılmış olsalar bile lineerlikten sapma görülür (21). Bu sonuç temel olarak antikorun heterojenitesine uygundur.

Günümüzde kullanılan immünolojik gebelik testlerinin büyük çoğunluğu gebe kadınların idrarında ve serumunda HCG bulunmasına ve HCG'in anti-serum üretimini uyarma yeteneğine bağlıdır (13). Bu nedenle önce HCG konusundaki yayınları gözden geçirmek, daha sonra bu hormonun saptanması için kullanılan immünolojik yöntemleri irdellemek uygun olacaktır.

HCG'in kimyası

HCG döllenmeden yaklaşık on gün sonra trofoblastik hücreler tarafından salgılanmaya başlayan bir glikoproteindir (25). Bu hormon gebeliğin erken dönemlerinden başlayarak idrar, kan, plasenta, amnios sıvısı, kolostrom, süt ve fötüs dokularında bol miktarda bulunur. Bohl ve arkadaşları ile Morgan ve Confield'e göre HCG'in molekül ağırlığı yaklaşık 28.000 dir (13).

HCG alfa ve beta olarak adlandırılan iki alt birimden oluşmuştur. Bunlardan alfa alt birimi LH, FSH ve TSH için ortaktır (12). Aralarında çok büyük benzerlikler olmasına karşın beta alt birimi her hormon için özgüdür.

HCG sentezi ve sentez yeri

HCG'in plasenta kaynaklı olduğu kesinlikle kanıtlanmıştır. Bunu destekleyen en önemli bulgular gebe kadınların hipofizinde gonadotropin aktivitesinin bulunmaması, plasentanın çıkarılmasından sonra HCG titresinde hızlı bir düşüş olması ve hormonun plasenta dokusunda in vitro üretildiğinin gösterilmesidir (23). Daha sonra Jones ve Gey koriyonik villusların kültüründe HCG üretildiğini kanıtlamışlardır. Sellüler kaynağın araştırılması daha güç olup fluoressein ile işaretli antikor yöntemiyle HCG'in özellikle sinsisyotrafoblastlar tarafından üretildiği buna karşın diğer plasenta yapılarında da kısmi üretim aktivitesi bulunduğu ortaya çıkarılmıştır.

HCG' in metabolizması

HCG üretildikten sonra temel olarak anne kanına salınır. Bununla beraber az miktarda HCG halen bilinmeyen yollardan f3tal dolaşıma da geçmektedir. HCG amnios sıvısı ve tüm anne dokularında da bulunmakta olup temel olarak idrarla atılmaktadır. Az miktarda HCG sütte de bulunur ve doğumu takiben kan HCG düzeyi hızla düşerek idrardaki düzeyi doğum öncesinin % 10'undan daha az düzeye iner.

Fizyolojik etkisi

Bu hormonun en önemli görevi menstrüel siklusun sonunda normal olarak oluşan korpus luteum gerilemesini önleyerek progesteron ve östrojenin çok daha fazla miktarlarda salınmasını sağlamaktır (5). Bu aşırı miktarda salgılanan hormonlar endometriyumun gelişmeye devam etmesini ve menstrümda olandan daha fazla besleyici maddenin depolanmasını sağlar. Sonuç olarak normal cinsel siklus sırasında oluşan endometriuma ait decidua hücreleri aktif hale geçer ve blastositin yuvalanmasından hemen sonra besleyici decidual hücreler halini alır.

HCG sekresyonu

Mishell ve arkadaşları 24 saat içinde idrarla itrah edilen HCG miktarlarının serum HCG düzeyi ile paralel gittiğini göstermişlerdir. Daha sonra yapılan araştırmalar ise blastokistin implantasyonunu hemen takiben HCG sekresyonunun başladığını göstermiştir. Yani implantasyondan sonra gebeliğin aşağı yukarı 5. haftasında idrar HCG düzeyinde hızlı bir artış belirmekte ve yaklaşık 10. haftada en yüksek düzeye ulaşmaktadır.

Menstrüel periyoddan 36-38 gün sonra idrardaki HCG düzeyi 1000 IU/lt'yi aşar. 8-12 haftalar arasında 80.000 - 240.000 IU/lt'ye ulaşır.

13-17 haftalar arasında hormon titresi hızla ve aniden düşer ve gebeliğin daha sonraki dönemleri süresince 5.000 - 3.000 IU/lit arasında kalır (13).

İmmünolojik gebelik testi yöntemleri

1. Presipitasyon testi.- Presipitasyon testi bir hormonun kendisine ait bir antikor ile etkileşme sonucunda bir çökelek oluşturması esasına dayanır (3). Bu etkileşme agar jel gibi yarı katı bir ortamda görülebilir, veya bir sıvı içinde yer alır. İmmünoreaktif bir sistemin özgüllüğünü analiz etmek ve karakterize edebilmek için genellikle presipitasyon testlerinin kullanılmasına karşın duyarlılığının düşük olması nedeni ile deneylerde kullanılması sınırlıdır. Örneğin HCG için 16 IU/ml 'ye yakın bir konsantrasyona gerek vardır (13).

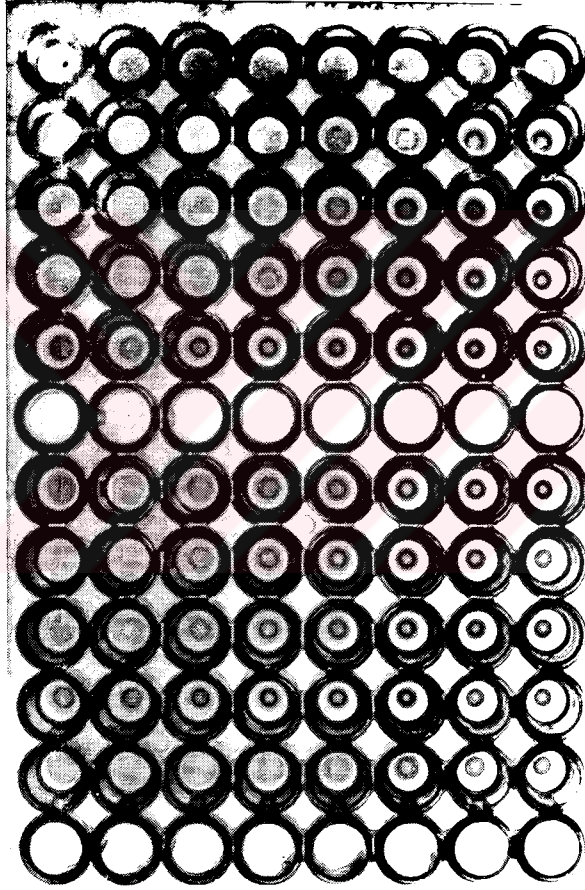
2. Kompleman-fiksasyon testi.- Bu testler komplemanın antijen-antikor kompleksleri tarafından bağlanmasına ve bu işlemin genellikle hemoliz gibi bir başka gösterge sistemi aracılığıyla ölçülmesine dayanır (3). Yöntemin çok geniş uygulanabilirliği ve orta derecede duyarlılığına karşın çok büyük özen istemesi ve çok sayıda kontrol gerektirmesi, testin sadece araştırma için kullanılmasına yol açmıştır.

3. Aglütinasyon inhibisyon testi.- Bu testin temel ilkesi hormonla kaplı partüküllerde antikorların yol açtığı aglütinasyonun serbest haldeki aynı hormon tarafından önlenmesi veya tersine çevrilmesidir (3). Bu partüküllerin tipine (taze veya formalinle tesbit edilmiş veya tanenle işlenmiş latex partükülleri veya eritrositler) veya testin yapılış ortamına göre (tüp veya lam) testler hemaglütinasyon inhibisyon testi veya tüp testi yada slide testi adını alırlar (13).

Mevcut slide testlerinin büyük çoğunlu latex partikül aglütinas-

yon inhibisyon yöntemine dayanır. Bu test genellikle iki basamaktadır.

Mevcut tüp testleri ise hemaglütinasyon inhibisyon ilkelerine dayanır. Testin temel ilkesi aglütinasyona uğrayan eritrositlerin tüpün dibine çökerek üniform bir tabaka oluşturması, aglütine olmayan eritrositlerin ise tüpün dibine çökerek düğmecik yapmasıdır.



Resim 1. HCG tayini için kullanılan mikrohemaglütinasyon inhibisyon yöntemine bir örnek.

G E R E Ğ v e Y Ö N T E M L E R

Antijen preparatları

İmmünizasyon için kullanılan antijen 1500 IU HCG'in (Pregnyl, NV, Organon, Holland) 1 ml tam Freund adjuvant'ında süspanse edilmesiyle hazırlanmıştır. Rapel zerkler için fizyolojik tuz solüsyonunda aynı yoğunlukta hazırlanmış HCG kullanılmıştır.

Deney hayvanları

Ortalama 2,5-3.0 kg ağırlığındaki genç erişkin erkek Yeni Zelanda tavşanları antiserum elde etmek için kullanılmıştır.

Aşılama işlemi

Tavşanlar 1 ml fizyolojik tuz solüsyonu içindeki 1500 IU HCG ve eşit hacimli Freund adjuvantı ile aşılanmıştır. İlk aşılamadan iki hafta sonra birer hafta aralıklarla 2 ml'lik 2 rapel zerk yapılmıştır. Aşılama işlemi pati içi ve deri içi zerklerle yapılmıştır. Üçüncü zerkten 9-10 gün sonra tavşanların kulak venasından kan alınmıştır. Alınan kanlar pıhtılaşmaları için 4 saat oda sıcaklığında bırakılmıştır. Antiserumlar sentrifüjle ayrılmış, 30 dakika 56 °C de inaktive edilmiş ve örnekler hemaglutinasyon inhibisyon testlerinde kullanılmak üzere buz dolabında saklanmıştır.

Eritrosit hazırlanması ve kaplanması

Eritrositler testte kullanılacağı zaman aşağıda anlatıldığı gibi taze olarak hazırlanmıştır.

25.000 IU/5 ml heparin çözeltisinden 0.5 ml bir enjektöre alınarak koyunun vena jugularisinden yeterli miktarda kan çekilmiştir. Böylece

pahtılaşması engellenen kan 3.000 devirde 30 dakika döndürülmüştür. Çöken eritrositlerin üzerine tüpün aldığı kadar fizyolojik tuz solüsyonu eklenmiş 3.000 devirde 10 dakika santrifüj edilmiştir. Daha sonra üstteki sıvı atılmış tekrar fizyolojik tuzlu su eklenerek eritrositler pipetle homojen hale getirilmiştir. Bu şekilde eritrositler fizyolojik tuz solüsyonuyla üç kez yıkanmıştır. Son yıkamadan sonra üst sıvı atılmıştır. Çöken eritrositlerden 4 ml alınmış ve buna 96 ml tuz solüsyonu eklenerek % 4 lük eritrosit süspansiyonu hazırlanmıştır.

Eritrositlerin tanık asitle işlenip antijenle kaplanması Hudson L. yöntemine göre yapılmıştır (10).

Ayırıcılar

1. Fosfat tamponlu salin, pH 7.2, 0.20 M

Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	0.02 M	2.72 gr
Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)	0.06 M	8.52 gr
Sodyum klorür ($NaCl$)	0.12 M	7.014 gr
Saf su		1000 ml

Çözeltinin pH sı tampon tuzlarından eklenerek 7.2'ye ayarlanmıştır.

Bu maddelerin tamamı 1000 ml saf suda çözülmüştür.

2. Borat süksinat tamponu, pH 7,5, 0.15 M

A. Sodyum tetraborat ($Na_2B_4O_7$)	0.05 M	19 gr
B. Süksinik asit	0.05 M	5.9 gr
Sodyum klorür	0.14 M	8.5 gr
Saf su		2000 ml

A solüsyonundan 1000 ml alınmış ve pH 7.5 oluncaya kadar B solüsyonundan eklenmiştir. Bu çözeltiye 0.14 M sodyum klorür çözeltisinden ve % 1

oranında at serumundan eklenmiştir.

At serumunun elde edilişi.- Attan alınan kan pıhtılaşması için 2 saat oda sıcaklığında bırakılmış, 30 dakika 3000 devirde santrifüj edilerek serum ayrılmış ve 56 °C de 45 dakika ısıtılarak inaktive edilmiştir.

3. Fosfat salin tamponu (PBS), pH 7.2, 0.15 M

Sodyum klorür (NaCl)	8 gr
Potasyum klorür (KCl)	0.20 gr
Disodyum hidrojen fosfat (Na ₂ HPO ₄)	1.15 gr
Potasyum dihidrojen fosfat (KH ₂ PO ₄)	0.20 gr
Saf su	1000 ml

Bu maddelerin tamamı 1000 ml saf suda çözülmüştür.

4. Fizyolojik salin veya normal salin (0.14 M)

Sodyum klorür (NaCl)	8.5 gr
Saf su	1000 ml

Sodyum klorür 1000 ml saf suda çözülmüştür.

Yöntem

1. 1 ml fosfat tamponlu saline 0.05 mg tannik asit eklenir ve bu 1 ml %4'lük koyun eritrositleri süspansiyonuyla karıştırılır.
2. 37 °C de 15 dakika inkübe edilir.
3. Hücreler 800 devirde 20 dakika santrifüj edilir.
4. Hücreler iki gruba bölünür ve her biri 1 ml fosfat tamponlu salinle 800 devirde 20 dak. santrifüj edilerek yıkanır. Hücrelerin bir grubu antijen kaplanması için diğer grubu ise kontrol amacıyla kullanılır.
5. Birinci grup hücreleri 1 ml fosfat tamponlu salin eklenir ve yeniden süspansiyon edilir. Üzerine 1 ml HCG solüsyonundan eklenir.

6. 37 °C de 30 dakika inkübe edilir.
7. Fosfat tamponlu salinle 20 dakika 800 devirde santrifüj edilerek yıkanır. 2 ml borat süksinat tamponuyla yeniden süspansiyon haline getirilir.
8. İkinci grup hücreler 2 ml borat süksinat tamponuyla süspansiyon edilir.
9. Her iki hücre süspansiyonuna 0.2 ml formalin eklenir.
10. 4 °C de bütün gece bırakılır ve daha sonra her iki süspansiyona 0.2 ml formalin eklenir.
11. Hücreler yerleşmeleri için 24 saat bırakılır ve süpernatant dökülür.
12. Çok miktarda borat süksinat tamponundan eklenir. Tüpler sallanarak hücreler süspansiyon haline getirilir.
13. Hücreler tekrar 24 saat bekletilir ve tekrar borat süksinat tamponuyla yıkanır.
14. Her iki hücre süspansiyonuna % 1 oranında koruyucu olarak %0.2 formalin eklenir.

Bu hücreler 4 °C de 2 yıl boyunca bozulmadan saklanabilir. .

Standardizasyon

Serumdaki anti HCG düzeyini tayin etmek için mikrohemaaglutinasyon inhibisyon yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntem HCG ile kaplı koyun eritrositleri ve anti HCG arasındaki tepkimeye dayanmaktadır. Yöntem şu şekilde uygulanmıştır.

Mikropleyitin ilk dizisine 0.1 ml fosfat tamponlu salin (PBS) konmuştur. Dizinin ilk deliğine 0.025 ml tavşandan elde edilen anti serum-

dan eklenmiş ve 1/5 lik seridülisyonu yapılmıştır. Daha sonra tüm deliklere 0.1 ml HCG ile duyarlı hale getirilmiş koyun eritrositleri eklenmiştir. Karışım pleytin kenarına hafif hafif vurmak suretiyle karıştırılmış ve 37 °C de 2 saat, oda sıcaklığında bir gece bırakılarak sonuçlar okunmuştur.

Pozitif tepkimede yani aglutinasyonun olduğu durumda hücreler kabin dibine halı gibi döşemiştir. Bu pleytlerin kesiti V biçimli olduğu için negatif tepkimelerde hücreler V nin dibinde küçük bir düğmecik yapmıştır. Bu yöntemle tavşandan elde edilen antiserumun titresini 1/160 olarak saptanmıştır.

Kontroller

Üretilen gereç ile idrardaki HCG' in saptanıp saptanamayacağını tayin etmek için gebe kadınlardan alınan idrarlarla kontroller yapılmıştır.

Gebelik testinin yapılışı.- Alınan idrarlar süzülür. Tam idrardan başlanıp 0.025 ml hacimlerde fosfat salin tamponu (PBS) ile ikişer misli seri dilüsyon yapılır ve mikropleytin her deliğine 1/10 dilüsyonda anti-HCG' in 0.025 ml' si eklenir. Tanik asitle işlenip antijenle kaplanmış hücreler eklenmeden önce pleyt oda sıcaklığında 30 dakika bekletilir. Daha sonra 0.025 ml antijenle kaplanmış hücre eklenir. Pleytin kenarına hafif hafif vurarak iyice karışması sağlanır. İki saat oda sıcaklığında bekletilir ve sonuçlar okunur.

İdrarda HCG varsa aglutinasyon görülmez, eritrositler pleytin dibinde düğmecik oluşturur. Eğer test edilen idrar HCG içermiyorsa aglutinasyon oluşur ve hücreler pleytin tabanını halı gibi döşer.

B U L G U L A R

Laboratuvarımızda üretilen kitin duyarlılığını ve güvenilirliğini saptamak amacıyla hastanemizin Merkez Laboratuvarına gebelik testi yaptırmak için başvuran 25 gebe kadının idrar örneği incelenmiştir.

Yönteme ait sonuçlar 25 idrar örneği için Ortho firmasına ait Gravindex hazır kiti ile yapılan testlerin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Testlerden elde edilen sonuçlar tablo 2 ve tablo 3 de verilmiştir.

Her iki yönteme ait sonuçlar şu şekilde okunmuştur: (+) Aglutinasyonun oluşmadığı, hücrelerin V-mikropleyitin dibinde düğmecik oluşturduğu kesin gebelik durumu, (+) kesin aglutinasyonun olmadığı fakat kaba bir görünümün bulunduğu durumu, (-) kesin aglutinasyonun bulunduğu yani bu dilüsyonlarda idrardaki HCG miktarının saptanamadığı durumu belirtir.

TABLO 2

Üretilen Kit ile Elde Edilen Gebelik Testi Sonuçları

Sıra No.	İsim	Tam	Dilüsyonlar						
			1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1	E.D.	+	+	+	+	-	-	-	-
2	M.Ç.	+	+	+	+	+	-	-	-
3	E.A.	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-
4	Ş.Ö.	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-
5	F.P.	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-
6	A.G.	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-
7	S.Ç.	+	+	+	+	-	-	-	-
8	F.S.	+	+	+	-	-	-	-	-

TABLO 2'NİN DEVAMI

9	D.C.	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-
10	Ş.K.	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-
11	E.T.	+	+	-	-	-	-	-	-
12	N.Ü.	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-
13	S.Y.	+	+	+	+	-	-	-	-
14	T.T	+	+	+	-	-	-	-	-
15	A.Ç.	+	+	+	+	-	-	-	-
16	F.B.	+	+	+	+	<u>+</u>	-	-	-
17	S.T.	+	+	+	-	-	-	-	-
18	F.D.	+	+	+	+	+	-	-	-
19	F.A.	+	+	+	-	-	-	-	-
20	A.A.	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-
21	Ü.C.	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-
22	H.G.	+	+	+	+	-	-	-	-
23	S.A.	+	+	+	+	-	-	-	-
24	B.T.	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-	-
25	T.D.	+	+	<u>+</u>	-	-	-	-	-

Pozitif Sonuç-
ların Toplamı

25

25

22

14

5

-

-

-

TABLO 3

Gravindex Kiti ile Elde Edilen Gebelik Testi Sonuçları

Sıra No.	İsim	Dilüsyonlar							
		Tam	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128
1	E.D.	+	+	+	+	-	-	-	-
2	M.Ç.	+	+	+	+	+	-	-	-
3	E.A.	+	+	+	+	-	-	-	-
4	Ş.I.	+	+	+	+	+	-	-	-
5	F.B.	+	+	+	+	+	-	-	-
6	A.G.	+	+	+	+	-	-	-	-
7	S.K.	+	+	+	+	+	-	-	-
8	F.S.	+	+	+	+	-	-	-	-
9	D.C.	+	+	+	+	-	-	-	-
10	Ş.K.	+	+	+	+	-	-	-	-
11	E.K.	+	+	+	-	-	-	-	-
12	N.Ü.	+	+	+	+	+	-	-	-
13	S.Y.	+	+	+	+	-	-	-	-
14	T.T.	+	+	+	-	-	-	-	-
15	A.C.	+	+	+	+	-	-	-	-
16	F.B.	+	+	+	+	+	+	-	-
17	S.S.	+	+	+	-	-	-	-	-
18	F.D.	+	+	+	+	+	-	-	-
19	F.A.	+	+	+	-	-	-	-	-
20	A.A.	+	+	+	+	-	-	-	-

TABLO 3'ÜN DEVAMI

21	Ü.C.	+	+	+	-	-	-	-	-
22	H.G.	+	+	+	+	-	-	-	-
23	S.A.	+	+	+	+	+	-	-	-
24	B.T.	+	+	+	-	-	-	-	-
25	T.D.	+	+	+	+	-	-	-	-
Pozitif Sonuç- ların Toplamı		25	25	25	19	8	1	-	-

Üretilen kite ait sonuçlarla Ortho firmasının hazırladığı ticari kitle elde edilen sonuçların istatistiksel oranlanması tablo 4'te verilmiştir.

Sonuçlar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmemiştir.

TABLO 4

Deney ve Kontrol Grupları Pozitif Sonuçların Karşılaştırılması

Kaynak	Kareler Toplamı	Serbestlik Derecesi	Toplanmış Varyans	F Oranı (Teorik)	F Oranı (Tablo)
Üretilen kit	1955	5	109	1.023 ^{xx}	5.05
Gravindex	2301	5	106,5		
Toplam	4256	10			

$$xx_p = 0.05$$

T A R T I Ő M A v e S O N U Ğ

Gebeliđin erken d6nemlerde saptanması bu d6nemde oluŐan fizyolojik ve biyolojik olayların sađlıklı bir biđimde y6r6mesine olanak sađlaması y6n6nden b6y6k 6nem taŐır. Bu d6nemde yapılacak hatalar en azından embriyonun sađlıklı geliŐimini engelliyecek veya yeni bir yaŐamın daha baŐından s6nd6r6lmesine yol aćacaktır. Bu nedenlerden dolayı uzun yıllardır gebeliđin erken tanısı ićin basit, g6venilir, ekonomik ve s6ratlı sonuć veren y6ntemler geliŐtirilmeye ćalıŐılmıŐtır. Bu ćalıŐmalar imm6nolojik y6ntemlerin kullanılmasıyla oldukća ileri bir d6zeye ulaŐmıŐtır.

6lkemizin imm6nolojik gebelik testlerini sađlama konusunda tamamen yabancı firmalara bađlı olması ve bunun b6y6k ekonomik kayıplara yol aćması, gebelik testlerini yurt ićinde 6retilmesini amaćlayan bu ćalıŐmanın y6nlenmesine neden olmuŐtur.

Gebelik tanısında kullanılan hemaglutinasyon inhibisyon y6nteminin her laboratuvarda kolayca ve baŐarıyla uygulanabileceği inancı taşınmaktadır.

AraŐtırmanın sonucunu etkileyecek en 6nemli fakt6rlerden biri duyarlı ve 6zg6l antikorun elde edilmesidir. Testte kullanılan antiserumlar tavgenlerin Organon firmasının farmakolojik olarak 6rettiği ticarete satılan saflaŐtırılmıŐ tam koriyonik gonadotropinle aŐlanmasıyla elde edilmiŐtir. Miyer olarak 6retilen hormonlar hakkında 6retici firma tarafından verilen bilgiler ćok sınırlı olduğundan, bunların niteliğinin am6ca uygun olup olmadığını saptamanın g6çl6đ6 nedeniyle kullanılmasından kaćınılmıŐtır.

HCG alfa ve beta olarak adlandırılan iki alt 6niteden yapılmıştır.

Bunlardan alfa alt ünitesi özgül değildir ve HCG, LH, FSH ve TSH için ortaktır. Beta alt ünitesi ise her hormon için özgüdür. Test edilen örnekte HCG düzeyi düşük olduğunda ön hipofiz hormonları olan LH ve FSH ile çapraz tepkime verebilir.

Şu anda ticari amaçla satılan preparatlar ya alfa ve beta alt ünitelerinin her ikisini yada sadece özgül beta alt ünitesini içermektedir. Bu çalışmada öncelikle HCG miktarının saptanması amaçlandığından sadece beta'ya duyarlı preparatlar kullanılmıştır. HCG için uygulanan yöntemle LH ve FSH miktarlarının saptanması araştırmanın daha sonraki evreleri için düşünülmektedir.

Anti HCG'in üretimi için kullanılan tavşanların ağırlıklarının ortalama 2,5-3 kg'yi aşmamasına özen gösterilmiştir. Çünkü belirli sınırlar içerisinde kalması koşuluyla hayvanın ağırlığındaki artışlar HCG'e olan duyarlılığı azaltırlar (9). Çevre sıcaklığının da deney hayvanlarının duyarlılığında önemli bir etken olduğu bilinmektedir. Sıcaklığın düştüğü oranda yanıt süresi uzar. Bu nedenle hayvanlar immünizasyon sırasında oda sıcaklığında bırakılmışlardır. Test için bildirilen ideal sıcaklık oda sıcaklığı olup bu da 25 °C'ye eşittir (9).

İmmünolojik gebelik testlerinin üretim çalışmalarında tavşanlara enjekte edilen HCG miktarı oldukça değişkenlik göstermektedir. Bu çalışmada 1500 IU'lık HCG preparatları (Pregnyl, N.V., Organon, Holland) kullanılmış ve bunun antikor üretimi için yeterli olduğu gözlenmiştir. Bu HCG preparatları 1 ml normal salinde eritilmiş ve eşdeğer hacimdeki Freund tam adjuvantı ile karıştırılarak tavşanlara enjekte edilmiştir. Adjuvantın kullanılmasındaki amaç hayvanda güçlü bir immün yanıtın oluşturulmak istenmesidir. Freund'

un tam adjuvantı lanolin ve parafin yağı karışımıyla, ölü tüberküloz besillerini içerir. Bu adjuvant hem hücresel hem de humoral yanıtta arttırıcı etki yapar. İçerdiği ölü tüberküloz besillerinin immün etkileri oldukça güçlüdür (6).

2 ml hacmindeki antijen ve adjuvant karışımı tavşanların pötilerine ve deri içine enjekte edilmiştir. Bu yollarla verilen antijen önce o bölgedeki lenf düğümleri tarafından, daha sonra da kan dolaşımına geçerek RES hücreleri tarafından tutulur ve güçlü bir immün yanıt oluşur.

İlk enjeksiyondan iki hafta sonra tavşanlara birer hafta aralıklarla 2 ml'lik iki rapel zerk yapılmıştır. Rapel zerklerin amacı tavşanda ikincil immün yanıtın oluşmasını sağlamaktır. Çünkü birincil immün yanıtta antikor çok yavaş oluşur ve titresi oldukça düşüktür. İkincil yanıtta ise antikor oluşumu hızlı ve şiddetlidir (6).

Rapel zerklerden 9-10 gün sonra tavşanların kulak venasından kan alınmıştır. Kan alınmasını takiben tavşanlar en az bir ay dinlendirilmişlerdir. Daha sonra aynı hayvandan HCG antiserumu elde etmek için iki rapel zerk ve kan alma yöntemi uygulanmıştır. Böylece tavşanlar üç kez immünize edilmiş ve deneyin her yinelenişinde güçlü bir immün yanıt göstermişlerdir.

Elde edilen antiserumlar buz dolabında saklanmıştır ve kullanılacağı zaman normal salinde 1/10'luk dilüsyonu yapılmıştır. Hemagglütinasyon inhibisyon çalışmalarında kullanılan tüm serumlar 30 dakika 56 °C de tutularak inaktive edilmiştir. İnaktivasyonun nedeni komplemanın etkisinin ortadan kaldırılmak istenmesidir. Kompleman antijen antikor kompleksleriyle birleşir, bu hücreleri ve eritrositleri öldürerek bir antijen an-

tikor tepkimesinin oluşumunu engeller.

Hemaglitünasyon inhibisyon yönteminde antijen-antikor tepkimesine gözle görülebilir hale getirmek için HCG antijeni uygun bir taşıyıcıya absorbe edilmiştir. Eritrositler antijenin pasif taşıyıcıları olarak yaygın bir biçimde kullanılır. Raporların çoğunda ya koyun eritrositinin yada O grubu insan eritrositinin kullanıldığı bildirilmiştir (8). Eritrositlerden başka polistren lateks partikülleri de çeşitli antijen-antikor sistemlerinde aglutine olabilen taşıyıcılar olarak kullanılmaktadır (17). Lateks partikülleri bir tek antijenik reseptör içerir ve özgül antikoriyle bağlanır. Eritrositlerin yüzeyinde ise birçok antijenik reseptör vardır ve bunlar serumdaki özgül olmayan antikorlarla da tepkimeye girerler. Bu nedenlerden dolayı lateks partiküllerinin eritrositlerin yerine kullanılması çok daha elverişli olmasına rağmen, bunların yurt içinde üretilmemesi ve çok pahalı olması nedeniyle kolay ve ucuz olarak elde edilebilen koyun eritrositlerinin kullanılması yeğlenmiştir.

Koyun eritrositlerinin oluşturabileceği komplikasyonları en aza indirmek için eritrositler tannik asitle işlenmiştir. Tannik asit ve gluteralehid gibi maddeler eritrosit yüzeyindeki non spesifik antijenik reseptörlerin etkilerini en aza indirgerler ve antijenin eritrosit yüzeyine bağlanarak özgül antikoriyle tepkimeye girmesini sağlarlar. Avrameas ve arkadaşları ile Onkelinx ve arkadaşları yayınladıkları yöntemde tannik asit yerine gluteralehid kullanılmasının daha basit ve daha hızlı bir hemaglitünasyon inhibisyon testi oluşturduğunu bildirmişlerdir (17). Fakat bu çalışmanın ekonomik olması ve yurt içinde üretilen gereç kullanılarak yürütülmesi amaçlandığından oldukça pahalı olan gluteralehid kullanılmamıştır.

Yöntem uygulanırken eritrositlere koruyucu olarak formalin eklenmiştir. Formalin proteinlerin solid hale geçmesini sağlar, böylece sıvı mozaik yapısında olan hücre zarlarının yapılarının bozulmasını önler. Formalin ile işlenmiş eritrositlerin bir yıl süre ile bozulmadan saklanabileceği bildirilmiştir (10). Hazırlanan formalinli ve tannenli eritrositlerde 4 °C de şekillerinde herhangi bir değişiklik olmadan altı ay kadar saklanabilmektedir.

Hemaglutinasyon inhibisyon yönteminde kullanılan eritrosit süspansiyonu için değişik dilüsyonlar önerilmiştir. Bunlardan %4'lük eritrosit süspansiyonu kullanılmış ve uygun olduğu görülmüştür (10). Bu çalışmada da %4'lük eritrosit süspansiyonu kullanılmıştır.

Üretilen gereç ile gebelik testi yapılırken mikrotitre yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin kolay uygulanabilir ve ekonomik olduğu düşünülmektedir. Kullanılan mikropleytlerin kesiti V- biçimli olduğu için aglutinasyon oluştuğunda hücreler kabın dibini halı gibi döşemişler, antijen antikör tepkimesi olmadığında ise hücreler kabın dibinde küçük bir düğme-cik yapmışlardır.

Bu yöntemi kullanarak 25 gebe kadın idrarı incelenmiş ve sonuçlar ticarete satılan Ortho firmasının ürettiği Gravindex hazır kitiyle eş zamanlı olarak yapılan deneylerin sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Üretilen kitin duyarlılığı ticari kite oranla biraz daha düşük çıkmıştır. Bunun sayısal değeri Ortho'nun Gravindex kiti için 1/32, üretilen kit için ise 1/16'dır. Yani testler ancak bu dilüsyonlara kadar pozitif sonuç vermişlerdir.

Her iki testin bulguları her olgu için birbiriyle tam olarak ça-

kıstığı gibi yalancı pozitiflik de gözlenmemiştir.

Testin yapılmasında kullanılan gereçlerin gayet iyi şekilde yıkanmış ve durulanmış olması gerekmektedir. Çünkü çok küçük miktarda bulunan deterjanların testi bozma olasılığı çok fazladır (13). Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçlara yol açabilir. Bu çalışmada kullanılan gerek idrarın konduğu, gerekse kullanılan diğer gereçlerde deterjan bulaşıkları kalmamasına dikkat edilmiş, gereçler iyice yıkanmış ve durulanmıştır.

İdrarın bekletilmesi içerdiği HCG'in tahribine yol açar. Bu yıkım sadece oda sıcaklığında olmayıp buz dolabında da görülür. -18 °C de saklanan idrarlarda HCG dört ay bozulmadan kalır. Oda veya buz dolabında 72 saat stabildir (1). Ayrıca cam kapların absorpsiyon yolu ile içlerindeki HCG düzeyini azaltması olasıdır. Test edilen idrar örnekleri bir süre bekledikten sonra kullanılmıştır. Fakat testler her iki yöntem için eş zamanlı uygulandığından tüm bunların duyarlılığın düşük çıkmasında bir etken olamayacağı düşünülmektedir.

Üretilen kitin duyarlılığını Ortho'nun ticari kitine oranla biraz daha düşük çıkmasının temel nedenlerinin elde edilen antikorun titresinin düşük olması, hayvanların tür özelliği, çevre koşulları, kullanılan anti-jen preparatlarının saflık derecesi, kullanılan antikor çözeltisinin sulandırılma oranı olabileceği düşünülmektedir.

Tüm bu engellerin hayvanların sağlık koşulları açısından iyi durumda bulundurulmalarıyla, testin sürekli olarak oda sıcaklığında yapılmasıyla, hayvanlara saf HCG preparatları enjekte edilerek üretilen antikorların, bir antikor havuzunda toplanması ve bunların bir standarda karşı titre edilmesi yani deney hayvanlarının standardizasyonunun yapılma-

sıyla ortadan kaldırılabileceği ve üretilen test kitinin daha duyarlı hale getirilebileceği inancı taşınmaktadır.

Testin dayanıklılık süresini saptamaya bulunulan an için gerek duyulmamıştır. Çünkü üretilen gerecin istenildiği anda elde edilebilecek nitelikte olduğu gözlenmiştir. En az iki yıl dayanabilecek gerecin üretilmesi ise çalışmaların daha sonraki evreleri için düşünülmektedir.

Bu çalışmanın sonucunda HCG preparatları dışında, immünolojik gebelik testi için gerekli tüm gerecin kendi laboratuvarımızda üretililebileceği inancı doğmuştur. HCG'in üretiminin daha sonra gerçekleştirilmesine çalışılacaktır.

Sonuç olarak gebelik tanısında kullanılan hemaglutinasyon inhibisyon testinin laboratuvarımızda üretilen gereç ile olumlu ve güvenilir sonuç verdiği ve oldukça ekonomik olduğu gözlenmiştir.

Üretilen kit ile elde edilen sonuçlarla Ortho firmasının ticari kitinin sonuçları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olmadığı % 95 güvenilirlikle saptanmıştır.

Ö Z E T

Bu araştırmada idrardaki HCG varlığını saptayan immünolojik gebelik testleri için gerekli olan gerecin üretilmesine çalışılmıştır.

Çalışmanın amacı pratik, kolay, ucuz ve güvenilir bir yöntem geliştirerek anılan testin yurt içinde üretilmesi ve ülkemize bu konuda bağımlılıktan kurtarmayı hedeflemesidir.

Antijen olarak ticarete satılan insan koryonik gonadotropin kullanılarak tavşanlarda anti-HCG antikorları üretilmiştir. Bu tavşan antikorları gebelik için immünolojik bir test olarak hemaglütinasyon inhibisyon yönteminde kullanılmıştır. Hemaglütinasyon inhibisyon yöntemi için ayrıca tannik asitle işlenmiş ve HCG ile duyarlı hale getirilmiş koyun eritrositleri hazırlanmıştır.

Üretilen gereç ve kontrol olarak Ortho firmasının ticari kiti olan Gravindex kiti kullanılarak 25 idrar örneğinde eş zamanlı immünolojik gebelik testi uygulanmıştır. Alınan sonuçlara göre her iki test arasında tam bir uyum olup, her iki testte yalancı pozitif sonuçlara rastlanmamıştır.

K A Y N A K L A R

1. BAUER, J.D., ACKERMANN, P.G., TORO, G.: Pregnancy tests, Gray's Clinical Laboratory Methods, ed. 7, Saint Louis, 1968.
2. BRODY, S., CARLSTROM, G.: Studies on the determination of human chorionic gonadotropin in urine, Acta Endocrinology, 50: 335, 1965.
3. DELAAT, A.N.C.: Primer of serology, Harper and Row, London, 1975.
4. GODTS, P., MIGHORST, J.C.A.: Comparative examination of a serologic pregnancy test and the frog test. Am J Obst. Gynec., 89: 590, 1964.
5. GUYTON, C. ARTHUR : Fizyoloji, Cilt 3, Güven Kitabevi, Ankara, s. 460-465, 1978.
6. GÜLMEZOĞLU, E.: Bağışıklığın temelleri, H.Ü. Yayınları, Ankara, s. 60-67, 1975.
7. HAMASHIGE, S., ARQUILLA, E.: Immünologic studies with a commercial preparation of HCG, J Clin Invest., 42: 546-555, 1963.
8. HERBERT, W.J.: Passive hemagglutination with special reference to tanned cell technique, Handbook of Experimental Immunology, third ed., Chap. 20, London, Blackwell, P. 1-9, 1978.
9. HON, E.H.: A manuel of pregnancy testing, Boston, Little Brown and Co., 1961.
10. HUDSON, L., HAY, F.C.: Practical immunology, chap. 5, London, Blackwell, P. 128-129, 1976.
11. HURN, B.A.L.: Practical problems in raising antisera, Br. Med. Bull. Vol. 30, No:1, 1974.

12. KRIEG, A.F., HENRY, J.B.: Pregnancy tests and chorionic gonadotropin assays, in Clinical Diagnosis, ed. Israel Davidsohn, John Barnard Henry, 15 th. ed., Saunders London, P. 1280, 1974.
13. ÖZGÜNEN, F. TUNCAY : Erken gebelik teşhis yöntemleri, Uzmanlık tezi, Ankara, 1976.
14. PETCHLAI, B., PONGDHERAPOL, U.: A new microhemagglutination inhibition pregnancy test., Am J Clin Path., 54: 810-812, 1970.
15. PINCKARD, R.N.: Equilibrium dialysis and preparation of hapten conjugates, Handbook of experimental immunology, Chap. 17, London, Blackwell, P. 1-4, 1976.
16. PLAYFAIR, J.H.L.: Production of anti bodies and binding reagents, Basic immunological principles, Br. Med. Bull., Vol. 30, No:1, 1974.
17. ROBBINS, S.L., HILL, G.A., CARLE, D.N., CARLQUIST, J.H., MARCUS, S.: Latex agglutination reactions between human chorionic gonadotropin and rabbit antibody. Prac. Soc. Exp. Biol. Med., 109: 321, 1962.
18. ROİTT İVAN, M.: Essential immunology, Third Ed., London, Blackwell Scientific Publications, 1977.
19. BELA, M.: Antigenicity, Some molecular aspets, Science, 166: 1365, 1969.
20. STANWORTH, D.R., TURNER, M.W.: Immunochemical analysis of immunoglobulins and their sub-units, Handbook of experimental immunology, chap. 16, London, Blackwell, P. 1-5, 1976.
21. STEWARD, M.W.: Immunochemistry, Chap. 4, P. 40-52, London, Chapman and Hall, 1974.

22. STEWARD, M.W.: Introduction to methods used to study antibody-antigen reactions, Handbook of experimental immunology, Chap. 6, London, Blackwell, P. 1-9, 1976.
23. STEWART, H.L., MONTGOMERY, T.L.: Hormone secretion by human placenta grown in tissue culture, J Clin Endocrinology, 8: 175, 1970.
24. WIDE, L., GEMZELL, C.A.: Acta endocrinology, Copenhag, 35: 261, 1960.
25. WIDE, L.: Early diagnosis of pregnancy, Lancet, 2: 863-864, 1969.