

283928

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

**SİNDİRİM SİSTEMİ ADENOCARCİNOMA' LARINDA  
SERUM İMMUNOGLOBULİNLERİNİN KANTİTATİF  
DEĞİŞMELERİ**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN  
Turgut İmir

ANKARA - 1973

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
MİKROBİYOLOJİ ENSTİTÜSÜ

**SİNDİRİM SİSTEMİ ADENOCARCİNOMA' LARINDA  
SERUM İMMUNOGLOBULİNLERİNİN KANTİTATİF  
DEĞİŞMELERİ**

DOKTORA TEZİ

HAZIRLAYAN  
Turgut İmir

ANKARA - 1973

## İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa</u>
GİRİŞ ve GENEL BİLGİ	1
GEREÇ ve YÖNTEM	7
İmmunoglobulin Ayırımı	7
İmmunoglobulin Türlerinin Ayırımı	9
Serumda Ig Türlerinin Miktar Tayini	16
BULGULAR	23
TARTIŞMA	34
ÖZET ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR	40

## ŞEKİLLER

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1 - Normal insan serum immunoelektroforezi	5
2 - Anti - IgG plağında, halkasal presipitasyon bantları	6
3 - Çöktürülmüş Ig'nin immunoelektroforezi	8
4 - Serum Ig'nin jel filtrasyonu ile ayırımı	10
5 - Jel filtrasyonundan sonra Ig tiplerinin agarda tesbiti	11
6 - Kolostral Ig'nin jel filtrasyonu ile ayırımı	12
7 - IgA - IgM'in iyon değiştirme kromatografisi ile ayırımı	14
8 - Ayrılan Ig türlerinin saflık kontrolü	15
9 - RID yönteminde kullanılan plak	16
10- Antiserumlu agarda presipitasyon bantlarının görünümü	19
11- Presipitasyon bantının özel cetvel ile ölçümü	20
12- Standart serum sulandırımının RID'da verdiği eğri	21
13- Kanserli ve normal kişilerde Ig dağılımının grafiği	32
14- Kanserli ve normal kişilerde Ig türlerinin dokulara göre değişiminin grafiği	33

## TABLÖLAR

<u>No</u>	<u>Sayfa</u>
1 - Kanserli ve normal kişilerde IgG'nin tümör hücre tiplerine göre dağılımı	26
2 - Kanserli ve normal kişilerde IgA'nın tümör hücre tiplerine göre dağılımı	27
3 - Kanserli ve normal kişilerde IgM'in tümör hücre tiplerine göre dağılımı	28
4 - Kanserli ve normal kişilerde IgG'nin tümörlü organlara göre dağılımı	29
5 - Kanserli ve normal kişilerde IgA'nın tümörlü organlara göre dağılımı	30
6 - Kanserli ve normal kişilerde IgM'nin tümörlü organlara göre dağılımı	31

## G İ R İ Ő V E G E N E L B İ L G İ

Kanser bugün tıbbın en önemli sorunlarından birisidir. Bu konudaki çalışmalar hemen tıp tarihi kadar eskidir. Kanserin yapısal özellikleri, teşhisi ve tedavisi araştırmacılar için daima ilginç bir konu olmuştur. Bu konuda bildiklerimiz, yapılan çalışmaların çokluğuna rağmen oldukça yetersizdir.

Tümör gelişmesi olan kişilerde, immun cevapta yetersizlik rastlanan bir bulgudur (1-3). İmmun cevap yetersizliği hücre sel ve hü moral olabilir. Her iki tipe ait immun cevaptan sorumlu hü crelerin, B ve T lenfositleri olduğunu biliyoruz. Bu her iki lenfosit köken olarak kemik iliğinden gelmektedir (4). T lenfositleri, kemik iliğinden sonra timusda veya timus etkisinde farklılaşarak meydana gelir. Geç tip aşırı duyarlılıkta, homografit atılım reaksiyonunda rol oynayan bir hü cre çeşididir (5). B lenfositleri ise kemik iliğinden gelir. Kuşlarda bu lenfositlerin farklılaşmasının Fabricius kesesi etkisiyle olduğu gösterilmesine rağmen insanda böyle bir organ tesbit edilememiştir (6). Fakat sindirim aygıtı mukoza altı lenf dokusunun insanda böyle bir görev yaptığı önerilmektedir. B lenfositleri, T lenfositlerinden yüzeyindeki zar reseptörleriyle ayrılabilir. B lenfositleri çeşitli sınıftan immunoglobulin reseptörleri taşırlar. T lenfositlerinin yüzeyinde ise "theta antijenleri" bulunur. Genellikle T lenfositleri küçük lenfositlerdir (7).

Kanserli hastalarda hü cre sel cevap bozuklukları, geç

tip aşırıduyarlılığın incelenmesine dayanmaktadır. Hughes ve arkadaşları, kanserli şahıslarda tüberkülin reaksiyonunun azaldığını göstermişlerdir (1). Solowey ve Rapaport ise, 91 kanserli hasta ve 46 sağlam kontrolde deri içi zerkleriyle "streptokinase", "PPD", "histoplasmin" ve "coccidioidin"e karşı geç tip aşırıduyarlılık cevabını incelemişlerdir (2). Bu çalışmalarda hücre sel cevap ile tümör yayılımının ilgili olduğu gösterilmiştir. Sınırlı yayılma gösteren hastalarda, PPD, bakteriyel antiijenler ve "dinitrofluorobenzene" ile geç tip aşırı duyarlılığın azalması, az da olsa tesbit edilmiştir (2,3).

Bazı araştırmacılar da, kanserlilerde deri yamalarının atılımını incelemişlerdir. İmmunolojik cevap mekanizmalarından biri olan, homograft atılım reaksiyonunun tümörlülerdeki seyri ni araştırmak için deri aktarımı yapılmıştır. Kanserli hastaların % 80 inde normal deri yaması daha hızlı atılmış, / 13 ünde kanserli deri yaması ile beraber atılmış, % 7 sinde ise kanserli yama normal deriden daha hızlı atılmıştır. Bu bize kanserli hastalardaki tümöre bağlı antiijenler arasında benzerlik olduğunu göstermektedir (8).

Kanserli hastalarda yapılan "phytohaemagglutinin" uyarımı, kanserli lenfositlerinde, "blast transformasyon"un azlığını göstermiştir. Normal ve kanserli hasta lenfositleri kıyaslandığında, kanserli lenfositlerin çok daha az miktarda blast transformasyonu yaptığı görülür (9,10).

Tümörlü kişilerde hücre sel cevap baskılanmasının gösterilmesine rağmen, humoral cevaptaki yetersizlik her olguda

tesbit edilememiştir. Fakat bazı araştırmacılar, immunoglobulin (Ig) türleri yetersizliği ile bazı tümör tipleri arasındaki ilişkiyi bildirmişlerdir.

IgA eksikliği olan bazı hastalarda, pulmoner ve gastrointestinal tümörler görülmüştür. Gastrointestinal tümörlülerde, intestinal lenfoid hiperplazi ile birlikte IgA ve IgM eksikliği tesbit edilmiştir (11).

Ataxia-telangiectasia bir tümöral hastalık olmamakla beraber immun cevapda gerek hüморal ve gerekse hücre sel yetersizlik tesbit edilmektedir. Aynı zamanda bu olgularda tümörlere sık rastlanır. 42 ataxia-telangiectasia olgusunda çeşitli tümör tesbit edilmiştir ki, bu hastalarda tümörlerin çoğunluğu lenfoid dokudadır (12). Bunlarda serum IgG miktarında bir değişme olmamasına karşın IgA ve IgM seviyelerinde azalma görülmüştür (13, 14). Yapılan otopsilerde, lenfoid doku morfolojileri incelenmiş, timus aplazi veya hipoplazisi bulunmuştur. Bu gözlem ilk defa Peterson ve arkadaşları tarafından, hastalığın en önemli immunolojik bozukluğu olarak ispat edilmiştir. Çevresel lenfoid dokularda da, kortikal ve parakortikal sahalarda önemli lenfosit tüketimi görülür. kortikal sahalarda B hücre sahaları, parakortikal sahalarda ise T hücre sahaları olarak, bu hastalarda hem B, hem de T lenfosit gelişiminde bozukluk olduğunu gösterir (15).

Tavşanlarda neonatal timektominin, IgG ve IgM cevaplarını etkilemeden IgA cevabını etkilemesi, IgA yetersizliklerinin timus bozukluğu ile ilişkisini düşündürmektedir (16).



Lenfoid tümörlü kişilerde tetanoz toksoid zerkleri ile yapılan araştırmada, antikor titresinin normallere nazaran daha düşük olduğu gösterilmiştir (17). Fakat bu farklılık hücre-sel cevapdaki kadar belirgin değildir.

Bazı araştırmacılar lenfangiektazi olgularında her üç türde Ig yetersizliği tesbit etmişlerdir (18).

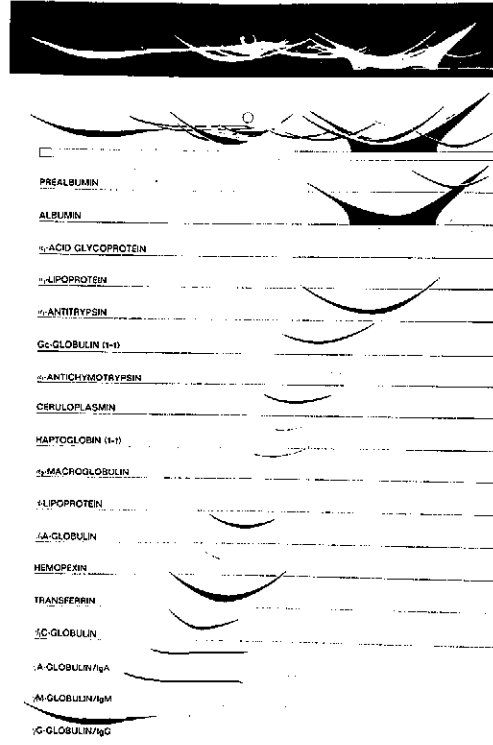
Tümörlü kişilerdeki hücre-sel cevap bozukluğu gösteren bulgular oldukça kesin olmasına rağmen, hü-moral cevapda bozukluk bazı lenfoma ve lösemi olguları hariç kesin gösterilememiştir. Biz bu çalışmamızda çeşitli tümörlerde IgG, IgA ve IgM seviyelerini inceledik.

Serumda Ig'lerin ölçümü çeşitli yöntemlerle yapılmaktadır. Bu yöntemler; serum elektroforezi, immuno-elektroforez, elektroimmünodifüzyon ve rağyalimmünodifüzyondur.

Bu yöntemlerden serum elektroforezi, serumun jelde elektrik akımı geçirilerek göç etmesine dayanır. Serum proteinlerini altı gruba ayırarak, grupların (albumin,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta_1$ ,  $\beta_2$  ve  $\gamma$ ) miktarlarını yüzde olarak vermektedir (19-22). Bu gruplar içinde bizi,  $\gamma$  globulinler ilgilendirir. Bu teknikte IgG, IgA, IgM tek bir band halinde görülmekte, miktar değişimleri ayrı ayrı incelenememektedir.

İmmuno-elektroforezde ise, bu üç Ig yine jelde elektrik akımı ile yayılan serumun, anti-insan serumuna karşı reaksiyonu incelenmektedir. Ayrıca kontrol olarak da standard insan serumu, aynı lam üzerinde ve aynı anti-seruma karşı kullanılmaktadır. Serum proteinlerindeki miktarların artması veya azalması kesin

olmamakla beraber bize az çok bir fikir vermektedir (23-26).  
Şekil 1 de, immunoelektroforezde insan serumunun çeşitli tür-  
den proteinlerinin meydana getirdiği presipitasyon bandları,  
toplu ve ayrı ayrı görülmektedir.

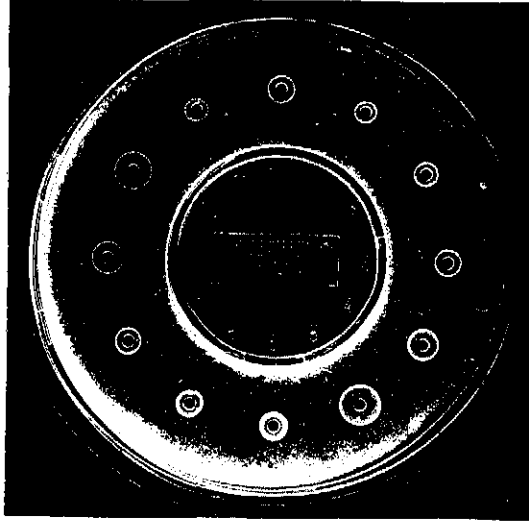


Şekil 1. Normal insan serumunun immunoelektroforetik görünümü.

(Kaynak 26; sayfa 4 den alınmıştır.)

Immunoelektroforezde tesbit edilebilen 20 kadar serum proteininin değişimleri incelenmekte ise de, miktar değişiklikleri kesinlikle ölçülememektedir. Bu özel serum proteinlerindeki değişikliği mg olarak, bize "electroimmunodiffusion" (EID) veya "radialimmunodiffusion" (RID) yöntemleri bildirebilir. EID ve RID'da özel antijeni (serum proteinlerinden birine) karşı hazırlanmış anti-serumla çalışılmakta ve yalnız bir proteine karşı

presipitasyon bandı elde edilmektedir (27-31). Bu bantların uzunluk (EID'da) veya genişlikleri (RID'da), standart protein sulandırımının presipitasyonlarına göre kıyaslanarak, oldukça kesin ölçüm yapılabilmektedir (Şekil 2). Her iki tekniği aynı amaçla kullanılmakta ise de, RID daha kolay ve daha kesin sonuçlar vermektedir. Bu yüzden biz çalışmamızda, Ig seviyelerinin ölçümünde RID yöntemini uyguladık.



Şekil 2. Agar içine karıştırılan anti-IgG plağında çeşitli normal insan serumlarının verdiği presipitasyon bantları. 1-5 No.lu deliklerde standart serum sulandırımları, 6-12 No.lu deliklerde ise hasta serumları vardır. (Kaynak 26; sayfa: 64 den alınmıştır.)

## G E R E Ç V E Y Ö N T E M

Bu çalışmamızda önce insan serumundan IgG, IgM ve insan kolostrumundan da IgA elde edildi. Her globuline özgü anti-serum hazırlandıktan sonra, elimizdeki kontrol ve kanserli hasta serumlarındaki Ig seviyelerini RID yöntemi ile tesbit ettik.

## IMMUNOGLOBULİNLERİN AYIRIMI

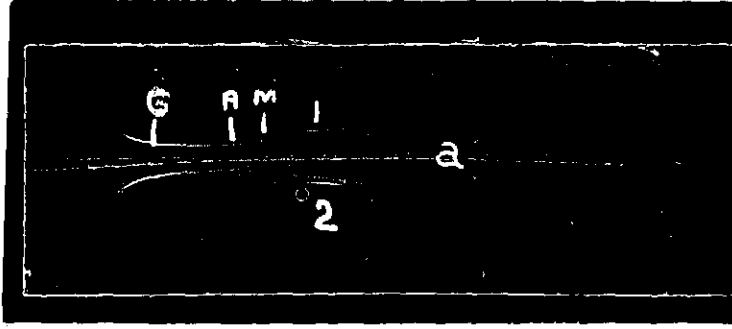
Ig lerin ayırımı için pek çok yöntem geliştirilmiştir. (32-36). Bizim kullandığımız yöntemde, önce serum globulinleri çöktürülmüştür.

## Gamma Globulin Çöktürümü:

Kan bankasından alınan bir şişe sitratlı kan üzerine, son yoğunluk 1/40 olacak şekilde  $\text{CaCl}_2$  ün yoğun çözeltisi katılarak  $37^\circ\text{C}$  de 45 dakika bekletildi ve 2100 G de 2 saat santrifüj edildi ( $10^\circ\text{C}$  de). Üstde kalan berrak serum ayrıldı (37). 50 ml kan serumu pH sı 7,8 olan 25 ml doymuş amonyum sülfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) ile oda ısısında manyetik karıştırıcı ile devamlı karıştırarak çöktürüldü.

Manyetik karıştırıcı serum içindeki çubuğu devamlı çevirirken amonyum sülfat, bir büret yardımıyla üstten damla damla katıldı. Tuz solüsyonu bittikten sonra 2 saat daha karıştırma devam etti. Süspansiyon oda ısısında, 1400 G de 30 dakika santrifüj edildi ve üst sıvı atıldı. Çökelti 50 ml serum fizyolojikle çözüldükten sonra çöktürme işlemi iki defa daha tekrar edildi. Üçüncü santrifüjden sonra çökelti 10 ml fosfat tamponunda ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ : 2,19 gr.,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ : 4,275 gr.,  $\text{NaCl}$ : 60,75 gr., distile

su: 7,5 litre, pH: 7,2) çözüldü ve aynı tamponda 4°C de üç gün diyaliz edildi. Diyaliz sıvısında amonyum sülfat ortamdaki uzaklaştırılincaya kadar tampon değiştirildi. Tampondaki sülfat iyonları varlığı Nessler ayıracağı ile kontrol edildi. Diyaliz tüpünden alınan materyal 1400 G de otuz dakika santrifüj edildi. Elde edilen toplam Ig nin diğer serum proteinlerinden ayrılıp ayrılmadığı, İE ile kontrol edildi (25) (Şekil 3). Bu işlemde standard anti-insan serumu (Behringwerke AG, Marburg/Lahn) kullanıldı.



Şekil 3. Amonyum sülfat çöktürümü ile elde edilen  $\gamma$  globulinin İE'i. a- Standard anti-insan serumu  
1- Standard immunoglobulin  
2- Çöktürmeden sonra elde edilen globulin.

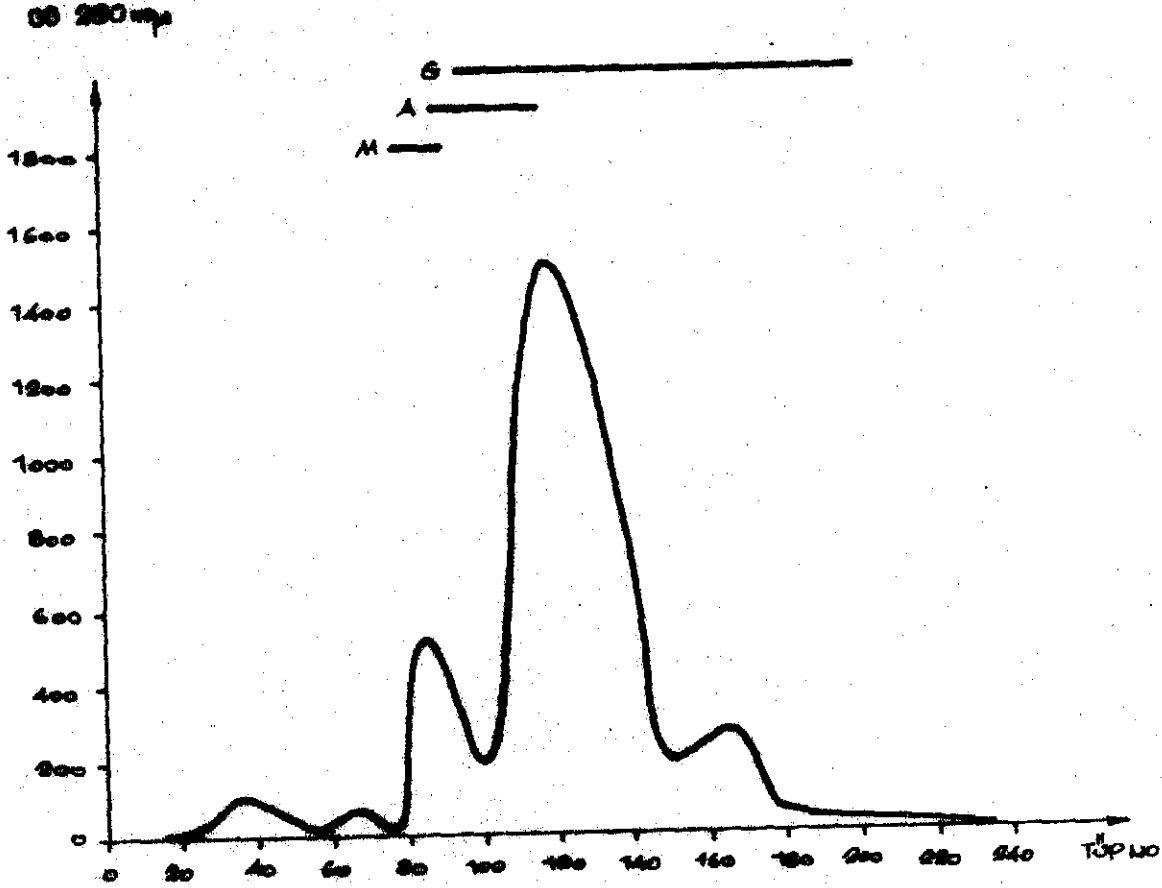
Kolostrumdan Ig ayırımı da aynı yöntemle yapıldı. 56 kadından alınan 200 ml kolostrum bir araya getirildi ve eşit miktarda serum fizyolojik ile karıştırıldı. 4°C de 20.000 G de iki saat santrifüj edilerek yağ ve tortusundan ayrıldı (38). Berrak görünümlü süt serumuna, kan serumu gibi çöktürme işlemi uygulandı.

## IMMUNOGLOBULİN TÜRLERİNİN AYIRIMI

Sefadex jel filtrasyonu (Sephadex Gel Filtration):

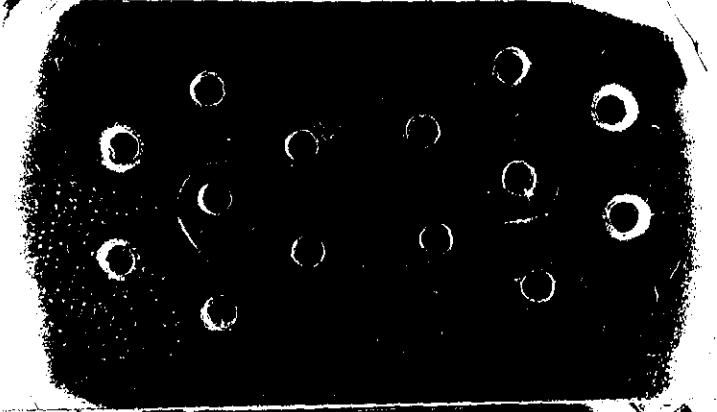
Sefadex jel filtrasyonu bir çok araştırmada kullanılmıştır (34,36,39,40). Biz de bu çalışmada bu yöntemi kullandık. Bu yöntemin kullanılmasında, araştırmamızın özelliklerine göre kullanılan kolon ve tamponlarda bazı değişiklikler yapılmıştır. Sefadex ayırımı için 25 gr kuru Sephadex G-200 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), pH sı 7,2 olan %0,85 NaCl'li 0,1 M tris-HCl tamponu içinde üç gün bekletildi ve hergün tampon değiştirilerek iyice şişmesi sağlandı (25). Soğuk odada (4°C) 2,5 x 100 cm.lik kolonun yarısına kadar tampon dolduruldu. Bu tampon üzerine şişirilmiş ve karıştırılıp homojen hale getirilmiş jelin bir kısmı döküldü. Jel, kolonun alt kısmındaki filtre üzerine yavaş yavaş çöktükten sonra alt musluk açılıp üstteki fazla tampon seviyesi, kolonun yarısına gelecek şekilde indirildi. Sonra geri kalan jel kolona ilave edildi ve bir önceki işlem tekrar edilerek jelin yüksekliği 90 cm. ye çıkarıldı. Jelin üzerindeki fazla tampon tamamen alındıktan sonra alt musluk kapatıldı ve çapı 2,5 cm. olan Whatman No 2 filtre kâğıdı jel yüzeyine oturtuldu. Bu kâğıt üzerine de, bir pipetle dairesel hareketler yaptırarak 10 ml Ig çözeltisi yavaşca kondu (Ig çözeltisinde 30 mg/ml protein vardı). Altdaki musluk açılarak jel üzerinde 2 cm kadar yüksekliği olan Ig çözeltisinin tamamen emilmesi sağlandı. Hemen kolon üzerine bir ayırma hunisi ile bağlantısı olan üst kapak takıldı. Ayırma hunisindeki tris tamponu kapak altındaki ince bir boruyla kolonun iç duvarına akmaya başladı. Tampon seviyesi filtre kâğıdından 3 cm yüksel-

dikten sonra altındaki çıkış hortumuna takılan sıkıştırıcı ile akış hızı (18 ml/saate) ayarlandı. Ayırma hunisindeki tampon yüzey seviyesi ile kolondaki tampon yüzey seviyesi arasında 30 cm fark vardı. Kısım toplayıcı (Fraction Collector) aletine dizilmiş tüplerin tam üzerine gelecek şekilde çıkış hortumunun ucu tesbit edildi. Her beş dakikada bir tüp değişimi sağlandı. Böylece her tüpe 1,5 ml süzüntü toplandı. Tüplerdeki süzüntülerin optik yoğunlukları, U.V. spektrofotometre ile 280 m $\mu$  dalga boyunda okundu ve Şekil 4 de görülen grafik elde edildi.



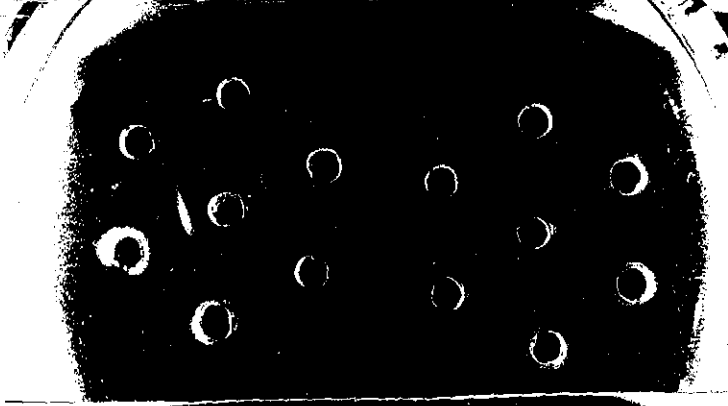
Şekil 4. Serum  $\gamma$  globulinlerinin jel filtrasyonu ile (Sephadex G-200) ayırım grafiği

220 nci tüpten sonra çıkış musluğu kapatıldı ve 4°C de saklanan  $\gamma$  globulin süzüntüleri, agarda çift yönlü yayılım yöntemi ile (Kaynak 26, Sayfa 3-10) standard anti-IgG, anti-IgA ve anti-IgM (Institut Pasteur, Paris) kullanarak IgG, IgA ve IgM ihtiva edip etmedikleri incelendi (Şekil 5).



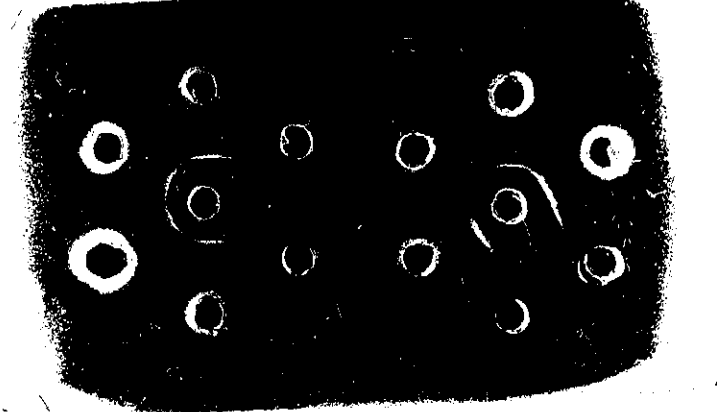
( a )

G - Standard anti-IgG.  
(95-200 no.lu tüplerde  
IgG bulunmaktadır.)



( b )

A - Standard anti-IgA.  
(88-117 no.lu tüplerde  
IgA bulunmaktadır.)



( c )

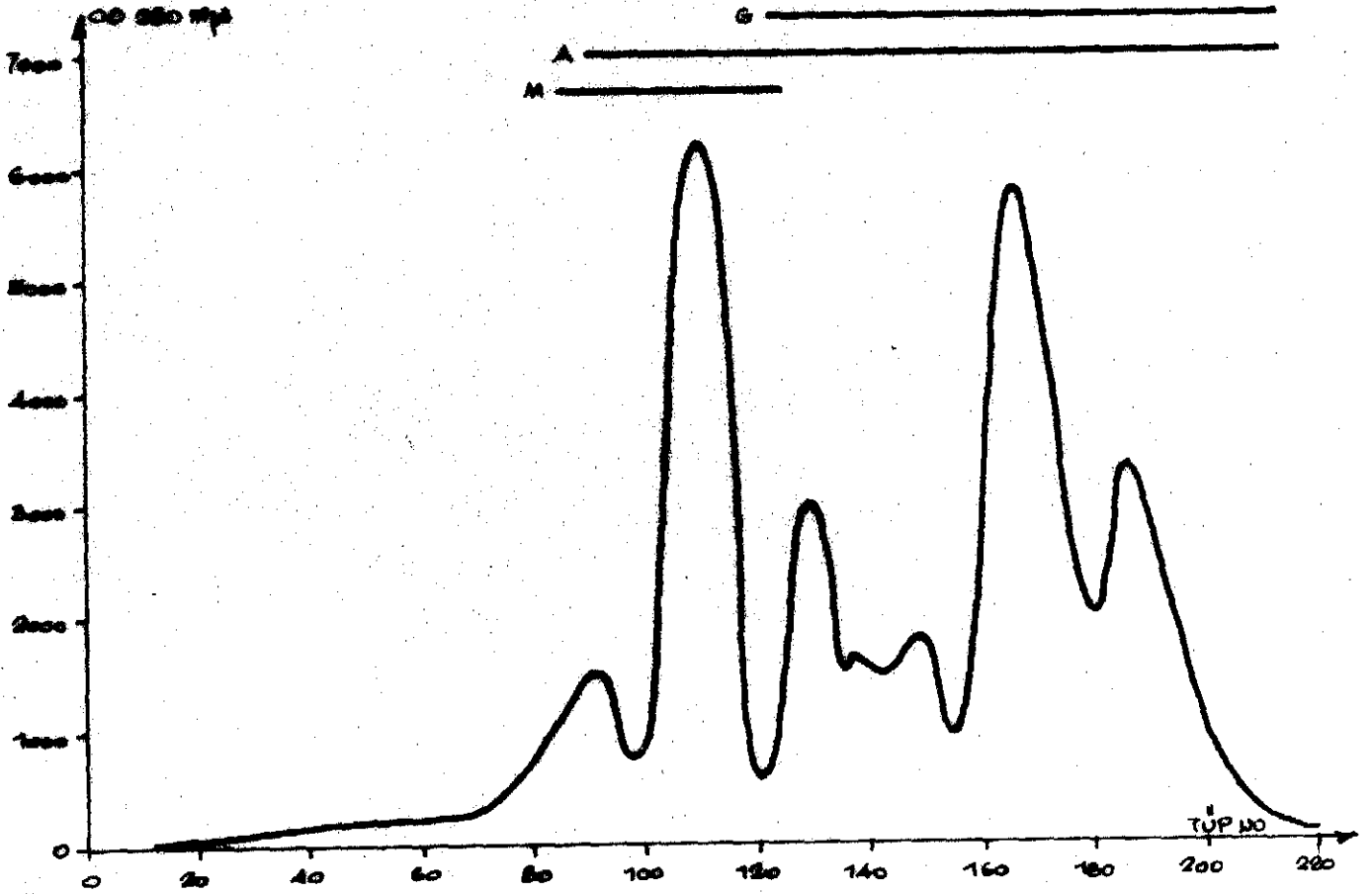
M - Standard anti-IgM.  
(78-91 no.lu tüplerde  
IgM bulunmaktadır.)

Şekil 5. Jel filtrasyonundan sonra çeşitli tüplerde (a) IgG, (b) IgA, (c) IgM'in agarda çift yönlü yayılım yöntemiyle tesbiti.



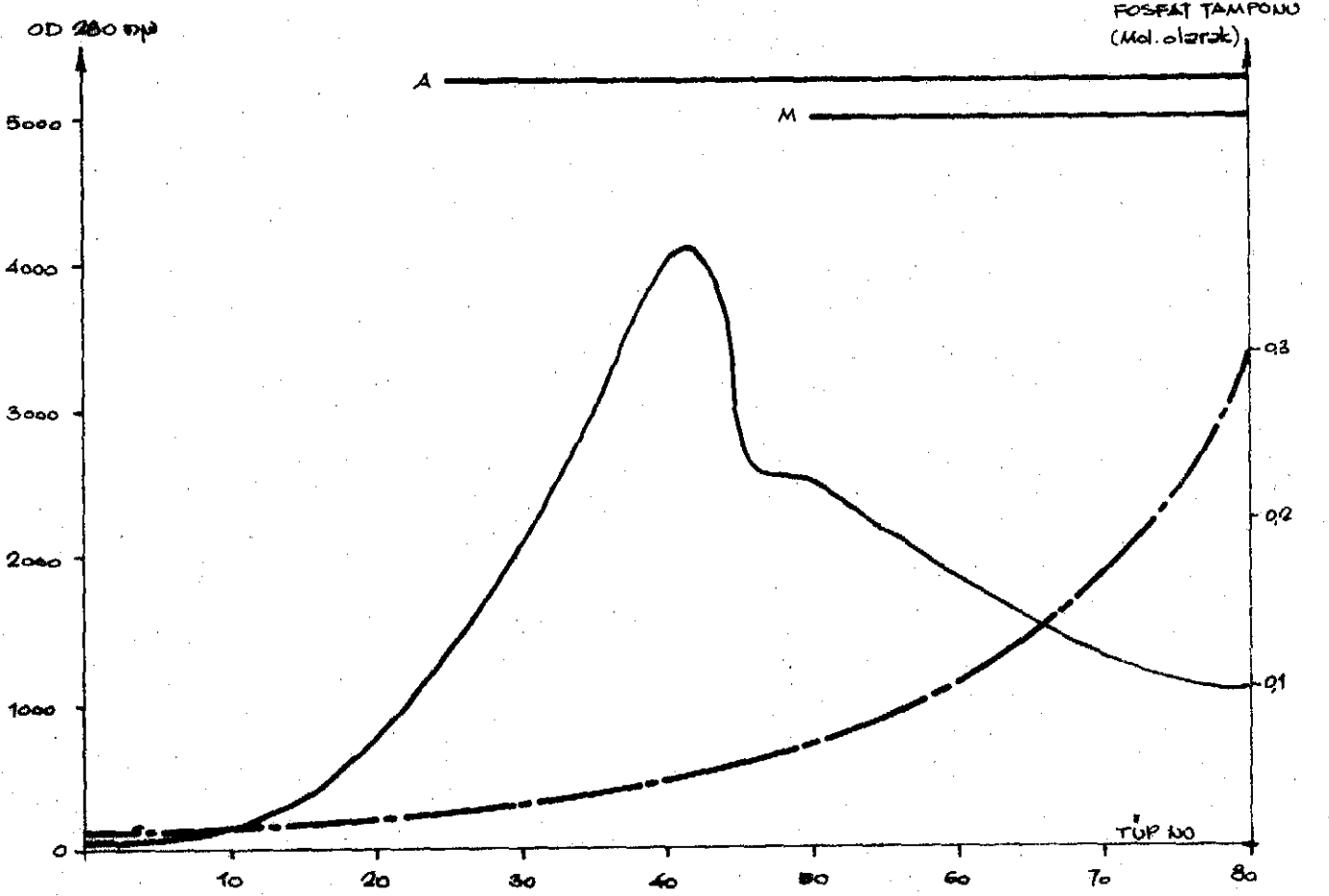
Şekil 5 - a,b,c de görüldüğü gibi 95-200 No.lu tüplerde IgG, 88-117 No.lu tüplerde IgA ve 78-91 No.lu tüplerde ise IgM tesbit edildi. 78-87 No.lu tüpler yalnız IgM, 88-91 No.lu tüpler IgM.-IgA karışımı, 95-117 No.lu tüplerde ise IgA-IgG karışımı bulundu. 78-87 No.lu tüpler ve 118-200 No.lu tüpler içindeki globulinler ayrı ayrı toplanıp protein miktarı tayin edildi.ve 4°C de saklandı.

Jel filtrasyon yöntemi, kolostrumdan elde edilen globulin çözeltilisine de uygulandı (38) (Şekil 6).



Şekil 6. Kolostral  $\gamma$  globulinin jel filtrasyonu (Sephadex G - 200) ile ayırım grafiği.

DEAE - İyon Değişirme Kromatografisi (İon-Exchange Chromatography) : Kolostrumun jel filtrasyonundan elde ettiğimiz IgA-IgM karışımından IgA yı saf olarak ayırmak için yukarıdaki yöntemi uyguladık (39-44). Jel filtrasyonundan sonra elde ettiğimiz karışımı 1000 ml 0,015 M fosfat tamponu ile (pH 7,6) 24 saat 4°C de dialize koyduk. Dializ torbasından alınan materyal, 25 dakika 2000 G de santrifüj edilip çökeltiden ayrıldı. Protein yoğunluğu 30 mg/ml olacak şekilde yoğunlaştırıldı. 15 ml protein çözeltisi için toz halindeki 15 gr DEAE Sephadex A-50 (Sigma Chemical comp., U.S.A.), önce 0,5 N HCl ve daha sonra 0,5 N NaOH ile yıkandı. (30 mg protein için 1 gr toz halindeki DEAE Sephadex alınmaktadır.) Distile su ile alkaliliğini iyice azalttıktan sonra, 0,015 M fosfat tamponu ile de iyice yıkanarak pH 7,6 ya getirildi. 2 x 50 cm lik kolona paketlenen DEAE Sephadex üzerine 2 cm çaplı Whatman No 2 filtre kağıdından yerleştirildi ve elimizdeki çözelti bu kağıt üzerine kondu. Solüsyon tamamen emildikten sonra üst taraftaki kapağa biri çok yoğun (0,3 M), diğeri az yoğun (0,01 M) tampon kaplarınının birleşmesiyle meydana gelen "Density Gradient" aygıtının borusu bağlandı. Kolonun alt ucundaki çıkış borusu ile değişik kesim toplayıcıya (Fraction Collector'a) dizilen 100 tüpe 3 er ml olmak üzere süzüntü inmeye başladı. U.V. Spektrofotometrede tüplerin ayrı ayrı optik yoğunlukları (OD) ölçüldü (Şekil 7).

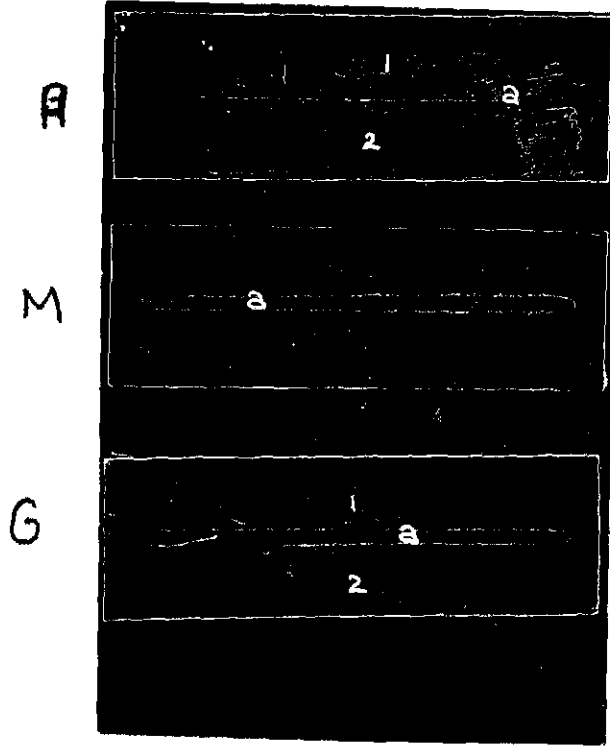


Şekil 7. Kolostral IgA-IgM karışımının DEAE iyon değiştirme kromatografisinden sonraki grafiği.

Jel filtrasyonu ve selüloz kromatografisinden sonra elde edilen IgG, IgA ve IgM in saflıkları İE de, standart insan anti-serumu ile tesbit edildi (Şekil 8).

Antiserum Hazırlanması: Saflıkları tesbit edilen Ig türlerinin her biri için iki adet ergin tavşan alındı. İçinde 2 mg Ig bulunan solusyon serum fizyolojikle 1 ml ye tamamlandı. Aynı miktar tam (Complete) "Freund Adjuvant" (Difco Lab., Detroit) ile iyice karıştırılarak tavşanlara verildi. Antijen tav-

şanların ayak tabanına 0,25 er ml ve her iki arka bacak kasla-  
rı içine 0,5 er ml olmak üzere toplam 2 ml verildi. İki hafta  
sonra tavşanlara aynı miktar antijen tam olmayan (Incomplete)  
"Freund Adjuvant" (Difco) içinde sırt derisi altına, dört ayrı  
noktaya verildi (45,46). 15 gün sonra antijen miktarı aynı ol-  
mak şartıyla, serum fizyolojikle karıştırılan antijen her iki  
kulak venasından 1 er ml verildi. On gün sonra tavşanların kal-  
binden kan alınarak serumları ayrıldı. % 0,01 oranında  $\text{NaN}_3$   
(Sodyum Azide) katılarak  $4^\circ\text{C}$  de saklandı.



Şekil 8. Kolostrumdan ve serumdan elde edilen Ig türlerinin saflıklarınının İE yöntemiyle tesbiti.

a-Standard anti-serum,

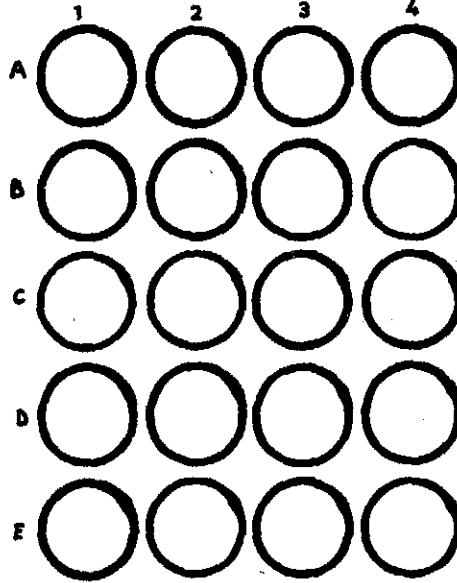
1-Standard Ig,

2-Elde edilen saf Ig türleri.

## İNSAN SERUMLARINDA Ig TÜRLERİNİN MİKTAR TAYİNİ

Radyal İmmunodifüzyon (RİD): Hasta serumlarındaki Ig lerin miktarını (kantitatif olarak) ölçmek için bu yöntemi uyguladık. Ig lerin miktar tayinlerini açıklayan yayınlar (28 - 31) içinde biz, pratik yönden Mancini, Carbonara ve Heremans'ın yöntemini değiştirerek uyguladık (28).

RİD'u, laboratuvarlarımızda kullandığımız VDRL aglütinasyon plakları üzerinde (Arthur Thomas Comp., Philadelphia, U.S.A.) yaptık (Şekil 9).



Şekil 9. RİD yöntemi için kullandığımız plâğın resmi.

Standard RİD yöntemi, daha önce belittiğimiz gibi (Sayfa 6) özel petri kutularına anti-serum ve agar karıştırılarak dondurulduktan sonra, iki mm çapında delikler açılarak hazırlan-

maktadır. Standard (ticari) uygulamada petri kutusuna dökülen 7 ml agar ve agara % 1-15 oranında katılan anti-serum miktarı oldukça fazladır. Bir petri kutusundaki 7 ml anti-serumlu agar-da 12 ölçüm yapılabilir. Bu çalışmada kullanılan VDRL plağında, 7 ml antiserumlu agar ile 35 ölçüm yapılabilir. Tipe özgü anti-serumların kıymeti dolayısıyla, burada değişiklik yapmayı uygun bulduk.

VDRL plağı üzerindeki bölmelere dökülecek agar için, önce 0,1 M/lt sodyumdietilbarbitüratdan (20,6 gr, 1000 ml distile suda) 100 ml alındı. 0,1 N HCl ile pH 8,6 ya getirildi. "Special Agar Noble" (Difco), aynı tampona % 1 oranında katılıp eritildi. Sıcak agar, 56°C lık su banyosuna konarak 56°C ye kadar soğuması beklendi. Her grup Ig için ayrı ayrı tüplere alınan agara daha önce yapılan test sonuçlarına göre belli oranlarda anti-serum katıldı. (Tavşanlardan elde edilen anti-serumlar çeşitli yoğunluklarda agara konarak, meydana getirdiği dairesel presipitin bantları tetkik edildi. Miktar tayininde bu halkaların çapı ve koyuluğu önemli olduğu için, en belirgin halkasal bant veren anti-serum yoğunluğu seçildi.) IgG için % 10, IgM ve IgA için % 4 oranında anti-serum katılarak ayrı ayrı çalışıldı. Yatay bir yüzeye konan plaktaki her bölmeye 0,2 ml (birlik pipetle) antiserumlu agar kondu. Agar oda ısısında 10 dakika bekledikten sonra katılaştı. Bir lastik puar ucuna takılan 30 cm lik kauçuk hortumun diğer ucuna da 1,5 mm çapındaki yuvarlak delikli boru takıldı. İnce boru ve puar ile her bölmedeki agarın tam ortasından bir delik açıldı. ve bu delikle-

re mikro enjektör ile insan serumu kondu. Deliklere konan hasta serumu IgG için 2 , IgM ve IgA için 3 idi. Plaklar alt kısmında bolca ıslatılmış pamuk olan bir desikatöre yatay olarak yerleştirildi. 48 saat sonra dışarı alınarak, özel cetvel yardımıyla halkasal presipitasyon bölgelerinin çapları ölçüldü.

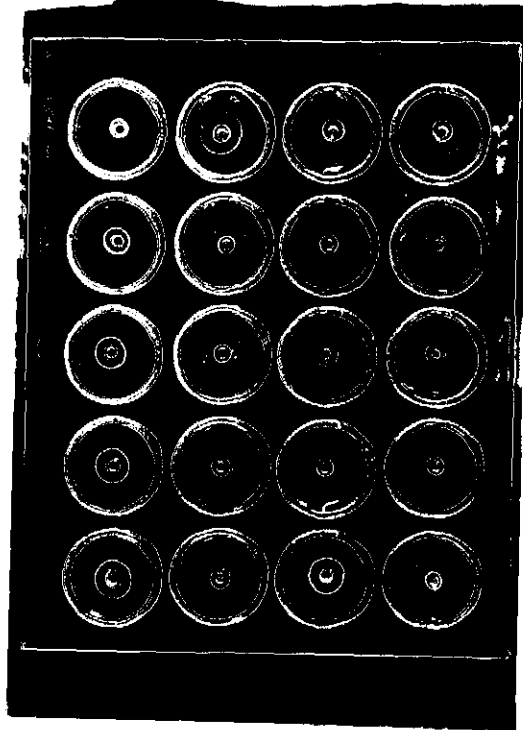
#### Ig Miktar Tayini İçin Ölçülerin Standartlaştırılması:

Ig miktarlarını ölçmek için standart insan serumu (Behringwerke AG) kontrol olarak kullanıldı. Bu serum içinde IgG 1050, IgA 200, IgM 80 mg/100 ml oranında vardı. Serumun 1/10, 2/10, 3/10, 4/10, 5/10, 6/10, 7/10, 8/10 ve 9/10 luk sulandırılmaları yapıldı. Bu sulandırılmalar, normal ve kanserli şahıs serumlarındaki Ig miktarlarının ölçümü için gerekli grafiği hazırlamak üzere kullanıldı.

Tavşanlardan elde edilen antiserumların saflıkları İE de kontrol edildikten sonra serumlar üç ana grup (IgG, IgA, IgM) halinde toplandı ve küçük şişelerde %0,01 oranında  $\text{NaN}_3$  katılarak  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandı. Antiserumların agardaki oranı ve antijenlerin uygulama miktarları ayrı ayrı hesaplandı. Bu amaçla her globulin için, 15 adet ağzında vidalı kapağı olan tüpe ikişer ml erimiş agar kondu.  $56^{\circ}\text{C}$  lik su banyosunda bir müddet bekletilen agarlar üzerine % 1, 2, 3, .... 15 oranında antiserum katıldı. Kapakları iyice sıkıldıktan sonra tüpler sağa sola eğilerek karışması sağlandı. Her tüpteki antiserumlu agardan plakdaki halkalar içine üçer adet kondu (0,2 ml). Agarın donmasından sonra açılan deliklere sırayla 1, 2, 3 mikrolitre standart serum kondu. Böylece antiserum sulandırılmalarından her biriyle üç değişik miktarda antijen denenmiş oldu. 48 saat sonra halka

şeklindeki bantlar incelendi. Bu bantların plaklardaki yuvarlaklar içinde en uygun büyüklük ve koyulukta olanları tesbit edildi. Her antiserumun agara katılma oranı ve bu antiserumlu agara uygulanacak serum miktarı bulundu. Bizim stok antiserumlarımızın agar içine anti-IgG % 10, anti-IgA % 4 ve anti-IgM % 4, antijen olarak da insan serumlarının IgG ölçümü için 2, IgA ve IgM için de 3 er mikrolitre bulunduğu zaman en iyi neticenin alındığı tesbit edildi.

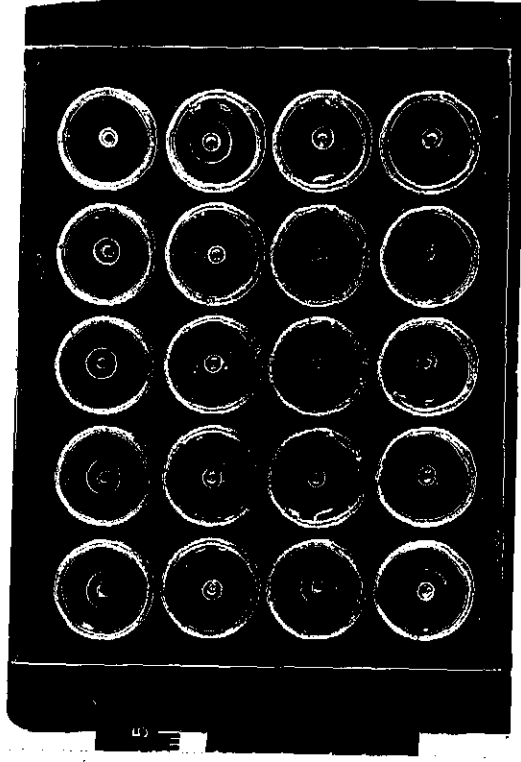
Hasta ve kontrol gruplarındaki serum Ig seviyelerini ölçmek için her grup globulin ile ayrı ayrı çalışıldı. Anti - serumlu agar, plaklara dökülüp delikleri açıldıktan sonra sırasıyla standart serum sulandırılmaları (1/10 - 10/10) Şekil 9daki birinci ve ikinci sıradaki halkalara kondu. 48 saat 37°C lik etüvde bekletildikten sonra bantlar meydana çıktı (Şekil 10).



Şekil 10. Plaktaki antiserumlu agarda, standart serum sulandırılmalarının ve kontrol serumlarının görünümü. (1 ve 2 nci sıralarda standart sulandırılmalar bulunmaktadır.)



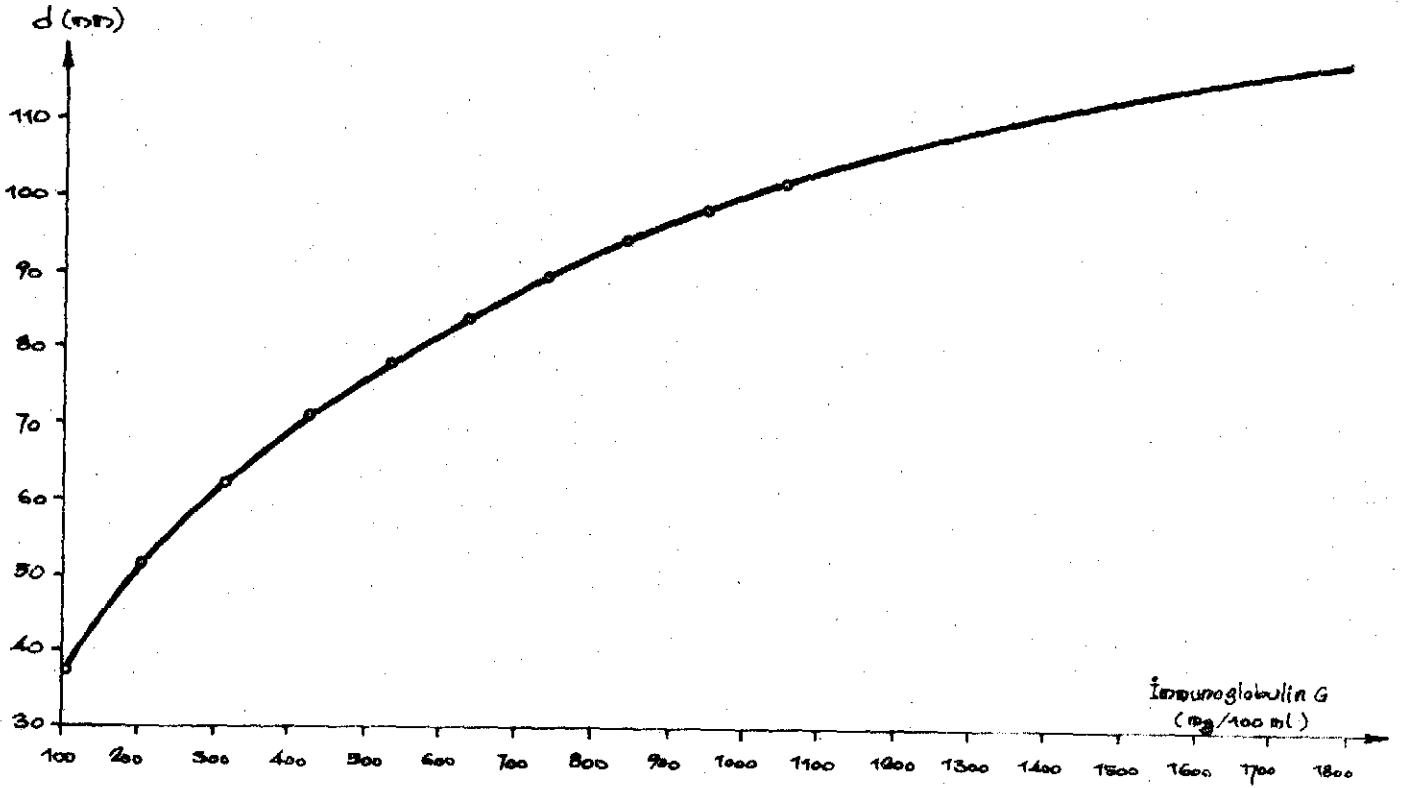
Özel cetvel yardımı ile presipitasyon bantlarının çapları mm. olarak ölçüldü (Şekil 11).



Şekil 11. 2D presipitasyon bantının özel cetvel ile ölçümü.

Ig Ölçümü İçin Standart Eğrinin Hazırlanması: Standart serum sulandırımından elde edilen ölçüler milimetrik kâğıtlara işlendi. Her numunedeki Ig miktarı mg/100 ml olarak apsise ve her numunenin verdiği çap mm olarak ordinata işaretlenerek standart eğri çizildi. IgG sulandırımından elde edilen presipitasyon halkalarının çapları 3,8 - 5,1 - 6,2 - 7,2 - 7,8 - 8,3 - 8,8 - 9,3 - 9,7 ve 10,0 mm idi. Bu sulandırımlardaki IgG miktarları da 105, 210, 315, 420, 525, 630, 735, 840, 945, 1050 mg/100 ml idi. IgA sulandırımlarında 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 ve 200 mg/100 ml IgA vardı. Bu miktarlardaki IgA sulandırımları 3,6 - 4,0 - 4,4 - 4,8 - 5,2 - 5,6 - 6,0 - 6,3 - 6,6 - ve 6,8 mm çapında presipitasyon halkaları verdi. IgM su-

landırımlarında ise 4,5 - 5,0 - 5,5 - 5,9 - 6,2 - 6,5 - 6,8 - 7,0 - 7,2 mm çap ve 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80 mg/100 ml IgM vardı. Bu değerler de IgG de olduğu gibi grafiklere aktarıldı.(Şekil 12).



Şekil 12. Standart serum sulandırımının anti-IgG katılmış agarda verdiği eğri.

Daha sonra hasta ve kontrol serumlarıyla elde edilen presipitasyon halkalarının çapları ölçülüp, standart eğriye uygulanarak Ig miktar tayini yapılmıştır. Bulunan miktarlar o serumun 100 ml'deki mg değerlerini vermektedir.

Hasta ve kontrol serumlarından toplanan 50 adet serumda miktar tayinleri, sulandırılmamış ve 1/2 sulandırımları yapıla-

rak denenmiştir. Bulunan değerler arasındaki fark % 5 dolaylarında olduğundan geriye kalan serumlar sulandırılmadan kullanılmışlardır. Hasta ve kontrol serumlarında Ig miktar tayini yapılırken her deneyde standart eğri yeniden ayrı ayrı çizilmiştir.

Serumlar ve Kolostrum: Ig türlerinin ayırımı için kullanılan serumlar H.Ü. Kan Bankasından alınmıştır. IgA ayırımında kullanılan kolostrum Ankara Doğum Evi'nden temin edilmiştir. Araştırmada kullanılan kanserli hasta serumları Ankara Onkolojisi Hastahanesi'nde yatan, hastalığı klinik ve patoloji raporları ile tesbit edilmiş ve genellikle 40 yaş üstündeki hastalardan alınmıştır. Kontrol serumları da Hacettepe Tıp Fakültesi Poliklinikleri'nde hiçbir rahatsızlığı tesbit edilemeyen 40 yaşından yukarı kişilerden temin edilmiştir.

## B U L G U L A R

Bu çalışmamızda çeşitli organ veya sistemlerde kanser teşhisi konmuş 136 hasta serumu ve 36 normal serum IgG, IgA ve IgM miktarları yönünden incelendi.

Hasta serumları iki şekilde gruplandırıldı. Birinci gruplandırmada tümör dokusunun yerleştiği organ, ikinci gruplandırmada ise tümör dokusunun oluştuğu hücre türü dikkate alındı. Organlara göre yapılan gruplandırmada hastalar deri, solunum sistemi, sindirim sistemi, meme, karışık (mixoid), kemik, lenfoid, dudak kanserleri ve metastaz alt grupları olarak ayrıldı. Dokulara göre yapılan gruplandırmada ise karsinom, sarkom, karışık, lenfoid ve malign melanom alt gruplarına ayrıldı. Her alt grubun normale göre standart sapma, standart hata, normal gruptan % farklılık miktarı, P değeri bulundu. Ortalamalar talebe "t" testi ile tesbit edildi.

Tablo 1 de çeşitli tipten kanserli hasta serumlarında IgG miktarları gösterilmiştir. Tabloda görüldüğü gibi, ortalama değerler yönünden kontrol grubu ile yapılan karşılaştırmada, sarkomlu hasta serumlarında IgG % 14,2 oranında fazla bulunmuştur. Diğer kanser tiplerinde ise % + 7,9 ile % - 4,8 oranları arasında değerler bulunmuştur.

Tablo 2 de, IgA değerleri kanserli gruplarında, normal gruba karşı incelenmektedir. Sarkom grubunda, normalden % 27,9 artma bulunmuştur. Bu değerler istatistiksel yönden de önemli

bir artmadır. Karışık tümörlerdeki % 20,4 ve malign melanomlu hastalardaki % 1,8 azalmaya karşın, diğer gruplarda % 0,4.- 3 arasında artma tesbit edilmiştir.

Tablo 3 deki IgM miktarlarını incelediğimizde, (IgA ve IgG de olduğu gibi) sarkom grubunda artma görülmektedir (% 14). Diğer grupların IgM seviyeleri % - 13,4 ile % 14,3 arasında yer almaktadır. Lenfomalı hastalardaki % 14,3 artma ile, malign melanomlu hastalardaki % 13,4 azalma pratik yönden fikir vermekte, fakat istatistiksel bir değer taşımamaktadır.

Kanserlileri hastalığın yerleştiği organlara göre sınıflandırdığımızda; IgG seviyelerinin gruplarda % 15,3 artma ile % 11,6 azalma gösterdiğini buluruz (Tablo 4). IgG artması, kemik tümörlerinde % 15,3 dolayındadır.

Tablo 5 ise IgA seviyelerini normal ve kanserlilerde karşılaştırmaktadır. Kemik tümörlerindeki artma % 20,9 olması- na karşılık, karışık tümörlülerde % 20,4 azalma bulunmuştur.

Tablo 6 da IgM seviyelerinin yalnız metastatik karsinomlarda önemli miktarda (% 27,1) arttığı görülmektedir. Lenfomalı hastalarda % 14,3 ve kemik tümörlülerde % 12,3 artma dikkati çekmektedir. Diğer gruplardaki artma ve azalmalar düşük değerlerdedir.

Şekil 13 ve Şekil 14 de iki ayrı gruplandırma sisteminin topluca grafikleri verilmektedir. Bu grafiklerde, normal (kontrol) şahıs serum Ig'lerinin ortalamalarına standart hata ilave edilerek üst sınır, aynı ortalama dan aynı hatayı çıkararak bulduğumuz alt sınırı yatay bir hat halinde gösterdik. Has-

ta gruplarının standart hataları da, grup kolonlarında gösterildi.

Şekil 13 de grafikler incelendiğinde, kemik tümörlülerde her üç Ig (G, A, M) da artma görülür. Karışık tümörlülerde ise IgG ve IgM normal hudutlar vermiş olmasına rağmen, IgA miktarının az olduğu görülmektedir.

Şekil 14 de gruplar, tümör dokusunun oluştukları hücrelere göre grafikte gösterilmiştir. Görüldüğü gibi sarkomlular da her üç Ig artmıştır. Karışık tümörlülerdeki IgA ve malign melanomlulardaki IgM eksikliği dışında diğer tümörlülerde, normal değerler bulunmuştur.

## T A B L O L A R

TABLO 1 : KANSERLİ VE NORMAL ŞAHISLARDA IgG SEVİYELERİ

NO	GRUP †	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA	SS	% FARKLILIK		++	+++
				(mg/100 ml)		-	P		
1	Normal Kontrol	34	910-1510	1127,05±25,58	149,21	-	0	-	-
2	Karsinom	113	810-1600	1161,63±15,33	163,02	+	3	-	-
3	Sarkom	6	1084-1410	1288,33±50,08	122,21	+	14,2	0,02	<P<0,05
4	Karışık Tümör	4	1000-1240	1102,50±50,06	100,12	-	2,2	-	-
5	Lenfoma	10	790-1430	1072,00±60,61	191,53	-	4,8	-	-
6	Malign Melanom	3	1050-1350	1216,66±88,29	152,75	+	7,9	-	-
7	Toplam Kanserli	136	790-1600	1160,11±14,11	164,6	+	2,9	-	-

† Grup No. 2 içinde ; 25 yassı hücreli, 9 cilt, 12 bazal hücreli, 1 mesane, 1 papiller adeno, 1 karaciğer, 1 nazal, 1 endometrial, 6 akciğer, 6 larinx, 3 özafagus, 9 mide, 2 kolon, 7 rektum, 16 meme, 2 dil, 3 epidermoid, 1 kulak, 4 metastatik, 3 dudak karsinomu,  
Grup No. 3 içinde ; 1 fibrosarkom, 5 osteosarkom,  
Grup No. 5 içinde ; 5 malign lenfoma, 2 hodgin vardır.

++ Kontrol grubu ile kanserli hasta grupları arasındaki fark

+++ P değerleri kanserli hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olup olmadığını belirtmektedir.

TABLO 2 : KANSERLİ VE NORMAL ŞAHISLARDA IgA SEVİYELERİ

NO	GRUP *	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA (mg/100 ml)	SS	% FARKLILIK **	P ***
1	Normal Kontrol	34	110-335	215,73 $\pm$ 8,3	48,40	$\bar{}$ 0	-
2	Karsinom	113	65-330	222,12 $\pm$ 5,54	58,96	+ 2,9	-
3	Sarkom	6	180-350	275,00 $\pm$ 25,33	62,04	+ 27,9	0,01 < P < 0,02
4	Karışık Tümör	4	160-185	171,25 $\pm$ 5,54	11,08	- 20,4	-
5	Lenfoma	10	160-285	216,50 $\pm$ 15,33	48,48	+ 0,4	-
6	Malign Melanom	3	120-320	211,66 $\pm$ 58,33	101,03	- 1,8	-
7	Toplam Kanserli	136	65-350	222,31 $\pm$ 5,11	59,65	+ 3	-

\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.

\*\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.

\*\*\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.



TABLO 3 : KANSEPLİ VE NORMAL ŞAHISLARDA İgM SEVİYELERİ

NO	GRUP *	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA (mg/100 ml)	SS	% FARKLILIK **	P ***
1	Normal Kontrol	34	61-113	89,32±2,43	14,19	7 0	-
2	Karsinom	113	33-143	92,66±1,65	17,62	+ 3,7	-
3	Sarkom	6	85-115	101,83±4,79	11,70	+ 14	P < 0,05
4	Karışık Tümör	4	65-140	95,25±16,12	32,25	+ 6,7	-
5	Lenfoma	10	81-138	102,10±6,93	21,94	+ 14,3	-
6	Malign Melanom	3	70-83	77,33±3,84	6,65	- 13,4	-
7	Toplam Kanserli	136	33-143	93,42±1,56	18,21	+ 4,59	-

\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.

\*\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.

\*\*\* Tablo 1'de açıklandığı gibi.

TABLO 4 : KANSERLİ VE NORMAL ŞAHISLARDA IgG SEVİYELERİ

NO	GRUP †	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA (mg/100 ml)	SS	% FARKLILIK	++ P	+++
1	Normal Kontrol	34	910-1510	1127,05	149,21	0	-	-
2	Deri	48	810-1600	1153,33	150,66	+ 2,3	-	-
3	Solunum Sistemi	16	850-1400	1179,68	161,45	+ 4,6	-	-
4	Sindirim Sistemi	14	1000-1430	1205,00	121,95	+ 6,9	-	-
5	Meme	12	890-1300	1139,16	123,17	+ 1	-	-
6	Karışık Tümör	4	1000-1240	1102,50	100,12	- 2,2	-	-
7	Kemik	5	1080-1410	1300,00	132,85	+ 15,3	0,02	0,05
8	Lenfoma	10	790-1430	1072,00	191,53	- 4,8	-	-
9	Dudak	5	920-1040	996,00	50,29	- 11,6	-	-
10	Metastaz	5	1010-1520	1248,00	205,59	+ 10,7	-	-
11	Toplam Kanserli	119	790-1600	1159,61	151,74	+ 2,8	-	-

† Grup No. 2 içinde; 3 malign melanom, 3 epidermoid, 21 yassı hücreli, 9 cilt, 12 bazal hücreli karsinom vardır.

Grup No. 3 içinde; 1 larinx papilloma, 1 nazal, 5 akciğer, 1 bronkojenik, 8 larinx karsinomu vardır.

Grup No. 4 içinde; 1 karaciğer, 2 özafagus, 3 mide, 1 kolon, 5 rectum, 2 dil karsinomu vardır.

++ Kontrol grubu ile kanserli hasta grupları arasındaki fark.

+++ P değerleri kanserli hasta grupları ile kontrol grubu arasındaki farkın önemli olup olmadığını belirtmektedir.

TABLO 5 : KANSERLİ VE NORMAL SAHISLARDA IGA SEVIYELERİ

NO	GRUP †	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA (mg/100 ml)	SS	NORMALDEN % FARKLILIK ††	P †††
1	Normal Kontrol	34	110-335	215,73±8,30	48,40	± 0	
2	Deri	48	80-370	229,06±16,22	112,38	+ 6,1	
3	Solunum Sistemi	16	155-305	218,43±10,15	40,60	+ 1,3	
4	Sindirim Sistemi	14	85-330	232,85±15,97	59,76	+ 7,9	
5	Meme	12	135-330	227,50±17,51	60,65	+ 5,5	
6	Karışık Tümör	4	160-185	171,25±5,54	11,08	- 20,4	
7	Kemik	5	180-335	260,00±25,00	55,90	+ 20,9	
8	Lenfoma	10	160-285	216,50±15,33	48,48	+ 0,4	
9	Dudak	5	200-270	236,00±11,55	25,83	+ 9,7	
10	Metastaz	5	155-275	219,00±25,36	56,72	+ 1,8	
11	Toplam Kanserli	119	80-370	221,09±5,19	56,64	+ 2,9	

† Tablo 4'de açıklandığı gibi.

†† Tablo 4'de açıklandığı gibi.

††† Tablo 4'de açıklandığı gibi.

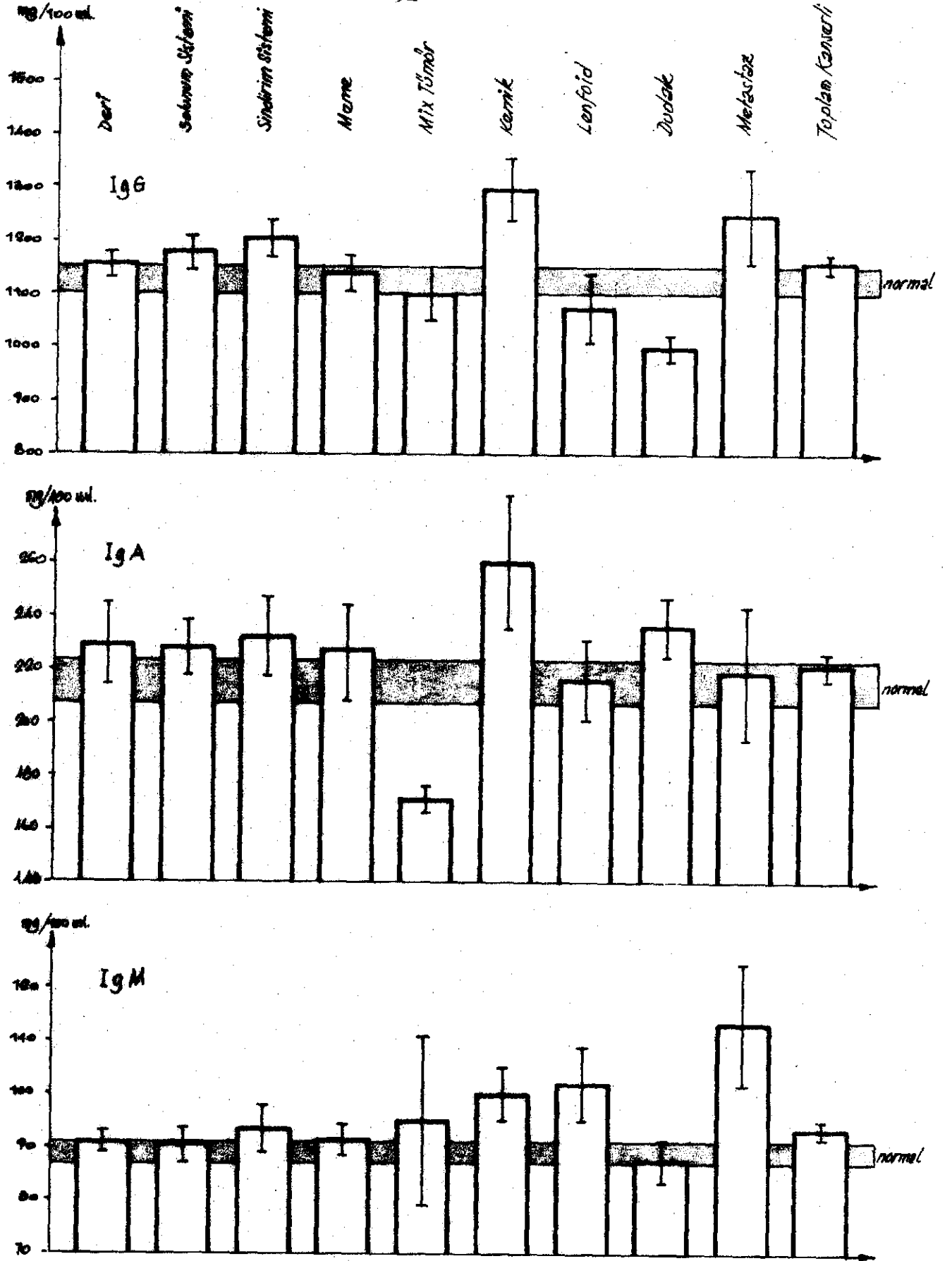
TABLO 6 : KANSERLİ VE NORMAL SAHİSLARDA IgM SEVİYELERİ

NO	GRUP †	MİKTAR	DEĞİŞİM	ORTALAMA (mg/100 ml)	SS	% FARKLILIK ††	P †††
1	Normal Kontrol	34	61-113	89,32 $\bar{7}$ 2,43	14,19	$\bar{7}$ 0	-
2	Deri	48	66-124	90,81 $\bar{+}$ 2,21	15,33	+ 1,6	-
3	Solunum Sistemi	16	68-110	90,56 $\bar{+}$ 3,53	14,13	+ 1,1	-
4	Sindirim Sistemi	14	61-124	93,42 $\bar{+}$ 4,59	17,18	+ 4,5	-
5	Meme	12	79-106	91,33 $\bar{+}$ 2,82	9,77	+ 3,3	-
6	Karışık Tümör	4	65-140	95,25 $\bar{+}$ 16,12	32,25	+ 6,7	-
7	Kenik	5	85-115	100,60 $\bar{+}$ 5,38	12,03	+ 12,3	-
8	Lenfoma	10	81-138	102,10 $\bar{+}$ 6,93	21,94	+ 14,3	-
9	Dudak	5	73-95	87,40 $\bar{+}$ 3,97	3,87	- 2,1	-
10	Metastaz	5	79-143	113,60 $\bar{+}$ 11,79	26,37	+ 27,1	P<0,001
11	Toplam Kanserli	119	61-143	93,43 $\bar{+}$ 1,55	16,94	+ 4,6	-

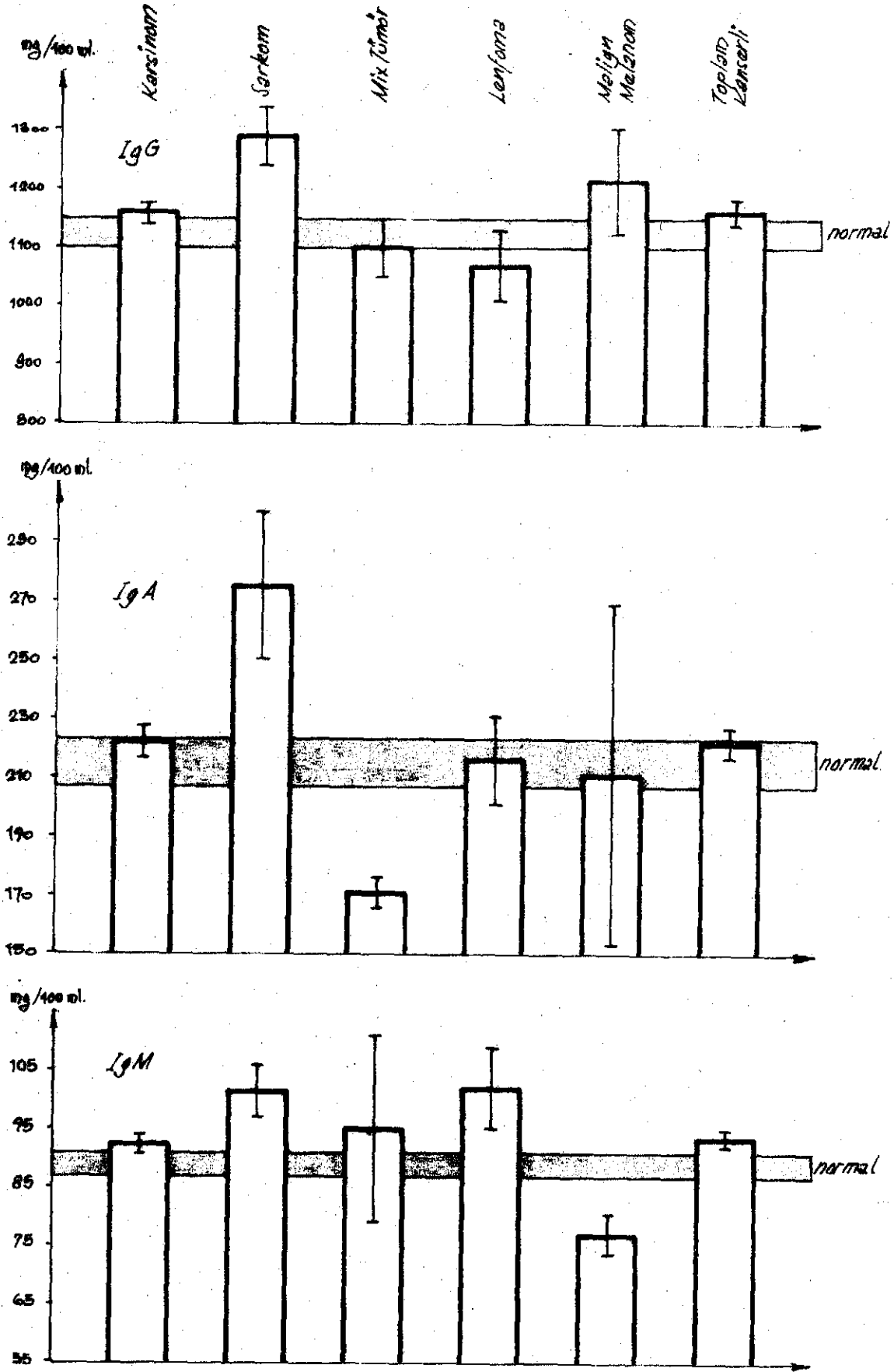
† Tablo 4'de açıklandığı gibi.

†† Tablo 4'de açıklandığı gibi.

††† Tablo 4'de açıklandığı gibi.



Şekil 13. Kanserli ve normal kişilerde Ig seviyelerinin organlara göre değişimi. (Yatay bant normal sınırları vermektedir.)



Şekil 14. Kanserli ve normal kişilerde Ig seviyelerinin tümör dokularına göre değişimi. (Yatay bant normal sınırları vermektedir.)

## T A R T I Ő M A

İmmunoglobulinlerin kantitatif tayinleri normal şahıslarda (47-53) ve çeşitli hastalıklarda (54-65) yapılmıştır. Normal şahıslarda, hemen her araştırmacı oldukça farklı değerler bulmuştur. Butterworth 279 kişide yaptığı ölçümlerde IgG için 1040 ve 1065 (erkek ve kadınlarda), IgA için 173 ve 179, IgM için 86 ve 104 mg/100 ml gibi değerler tesbit etmiştir (53). Allansmith, 315 serumda ortalama IgG 1045, IgA 170, IgM erkeklerde 90, kadınlarda IgM ise 104 mg/100 ml bulmuştur (50). İmmunen ve arkadaşları, 90 serumda IgG miktarını 1207, IgA 104, IgM için 116 mg/100 ml bulmuştur (55). Frankel ise 30 serumda IgG 1160, IgA 200 ve IgM miktarını da 100 mg/100 ml bulmuştur (52). Ölçümlerin hepsi de yetişkinlerden alınan serum numunelerinde yapılmıştır. Bizim çalışmamızda 34 kişilik normal grubun ortalamaları ise şöyle bulundu; IgG 1127, IgA 215 ve IgM 89 mg/100 ml. Görülüyorki çeşitli araştırmacılar tarafından yapılan ölçümlerde Ig seviyeleri farklı bulunmaktadır. Bu farklılığa, yöntem, ırk ve beslenme gibi koşullar etki yapabilir kanısındayız.

Hastaların yaş ortalaması 45 in üstünde olduğundan bizim kontrol grubu da bu yaştakilerden seçildi.

Elimizdeki kanserli serum verilerini kontrollerle karşılaştırırsak, IgG, IgA ve IgM miktarlarında beklenilene aksine, artış görmekteyiz.

	Sayı	IgG		IgA		IgM	
		mg/100ml	% Fark	mg/100ml	% Fark	mg/100ml	% Fark
Normal Kontrol	34	1127	$\bar{f}$ 0	215	$\bar{f}$ 0	89	$\bar{f}$ 0
Kanserli	136	1160	+ 2,9	222	+ 3,2	93	+ 4,4

Ancak hasta şahıs serumlarıyla normal serumların ortalamaları arasındaki farkın istatistiksel önemi yoktur.

Elimizdeki hastaları, gruplar halinde incelersek, aralarında farklılıklar olduğu görülür. Örneğin, kanseri organlara göre gruplandığımızda (Şekil 13) IgG miktarı, kemik tümörlerinde, dudak tümörlerinde ve metastatik tümörlerde normale göre oldukça değişmeler göstermiştir. Kemik tümörlerindeki % 15,3 artım, istatistiksel olarak da önemli ve kesin bir bulgudur. Dudak tümörlerindeki % 11,6 IgG azalmasını ve metastatik kanserlerdeki % 10,7 IgG artımını, numune sayısının azlığı nedeniyle istatistiksel yönden değerlendiremedik.

Aynı sınıflandırmada IgA seviyelerini incelersek karışık tümörlerde % 20,4 azalma, kemik tümörlerinde % 20,9 artma görülür. Bu grupların da numune sayıları az olduğundan normal gruba göre istatistiksel bir farklılık göstermemektedir.

IgM seviyeleri lenf, kemik tümörlerinde ve metastazlarda artmaktadır. Bu gruplardan yalnız metastazlardaki IgM artımı önemlidir ve kesin bilgi vermektedir.



Diğer gruplandırma şekline göre (Şekil 14) IgG miktarları, sarkomda normalden % 14,2 artım gösterir ve bu artım da önemlidir. Karışık tümörde IgA miktarı % 20,4 azalması, numunelerin azlığından dolayı istatistiksel değer taşımamaktadır.

IgM normale göre lenfomada % 14,3, sarkomda ise % 14 artmış, malign melanomda ise % 13,4 azalmıştır. Bu bulgular önemliyse de, yalnız sarkomlardaki artmayı kesin olarak kabul edebiliriz.

Çalışmamızda kullandığımız sarkomlu hastaların 5 tanesi osteosarkomlu hasta idi. Böylece sarkomdaki artma ile kemik tümörlerindeki artma eşdeğer görülmektedir.

Ig seviyelerinin pek çok hastalıkta incelenmesine karşılık, kanserlilerdeki değişimleri konusunda yapılan çalışmalar çok azdır. Bu çalışmalar hümorale antikor miktar tayinlerinden çok, tümürlü organlardaki Ig taşıyan hücrelerin (plazma hücrelerinin) artması veya eksilmesini floresan antikor yöntemi ile tesbit etmeğe dayanmaktadır.(66,67). Vasudevan (68) ve arkadaşlarının serviks kanserlilerinde yaptığı araştırmada IgG ortalama 2500, IgA 760 ve IgM 112 mg/100 ml bulunmuştur. Kendi kontrolleri ile yaptığı karşılaştırmada IgG de yaklaşık % 100 ve IgA da % 200 artma, IgM de yaklaşık % 25 azalma tesbit etmiştir. Aynı araştırmada bu kanserlilerin tedavileri sonunda Ig miktarlarının normal değerlere düştüğü belirtilmektedir. Bu araştırmadaki IgA artımının çok fazla olması beklenen bir bulgudur. Çünkü IgA gözyaşında (69,70), tükürükte (71), kolostrumda (72), mide sekresyonunda (48,73), nazal sekresyonda (74),

serviks, akciğer (75) ve bağırsak salgılarında (76) (bilhassa salgısal IgA olarak) bolca bulunmaktadır. Parotis bezinde ve bağırsak mukozalarında, plazma hücreleri lokal IgA sentez ederler. Bağırsaktaki bu hücreler normalde IgG ve IgM salgılamazlar (48). Tümörün lokal antijenik uyarımı ile bağırsak sekresyonundaki IgA artması, sistemik uyarımdan daha çok olmaktadır (49,77). Sistemik antijenik uyarımı kabul edersek, akciğer, ağız ve sindirim sistem kanserlilerinde IgA sentezinin artması doğaldır. İntestinal mukozadaki plazma hücreleri miktarı kabaca bağırsak hastalıkları ile orantılıdır. Çalışmamızda da sindirim sistemi kanserlilerde IgA artımını tesbit ettik. Fakat bu artış ancak % 7,9 kadardı.

Strober ve arkadaşları, bağırsak lenfangiektazisi olan 25 şahısta üç ana Ig çeşidinde azalma tesbit etmiştir (18). McFarlin'da, lenfoid doku tümörlülerde IgA ve IgM azaldığı, IgG seviyesini normal bulduğunu bildirmektedir (12). Lenfoma olgularında biz de IgG azalması tesbit ettik. Ancak, IgA seviyesi normal değerlerde, IgM seviyesi ise biraz yüksekti.

Heremans ve arkadaşları, gastrointestinal tümörlü hastalarda nodüler (düğümüsü) hiperplazi ile beraber IgA ve IgM eksikliğini bildirmişlerdir (78). Sindirim sistemi kanserlilerde bu eksikliği bulmadık.

Lischner ve DiGeorge'un çalışmalarında, tümörlü şahıslarda yalnız T lenfosit fonksiyonları bozulduğu, B lenfositlerinin görev ve yapısının değişmediği bildirilmektedir. Ig sentez eden hücrelerden başka diğer hücrelerdeki tümör olguların-

da Ig eksikliği, yani Ig sentezinde bir eksiklik kabul edilme-  
mektedir (79). Bizim ölçülerimizde de Ig seviyelerinde genel  
olarak normal miktarlar tesbit edilmiştir.

## Ö Z E T V E S O N U Ğ

Bu çalışmada IgG ve IgM insan kan serumundan ayrıldı, IgA ise insan kolostrumundan elde edildi. Bu globulinlerle tavşanlarda anti serumlar hazırlandı. Hazırlanan anti serumlarla, radyalimmüdifüzyon yöntemi uygulanarak hasta ve normal şahıs serumlarındaki IgG, IgA ve IgM seviyeleri tayin edildi.

136 kanserli hastanın Ig'leri, 34 normal şahıs serumlarındaki Ig'lerle kıyaslandı ve kanserli hastalarda ortalama % 2,9 - 4,4 oranında bir artma görüldü. Hastalar malign hücrelerin kökenlerine göre gruplandırıldığında en belirgin fark sarkomda bulundu. Sarkomlu hastalarda Ig'lerin hepsinin de önemli derecede arttığı görüldü. (IgG % 14, IgA % 27, IgM % 14.) Karışık tümörlerde IgG ve IgM nin normal değerlerine karşılık IgA % 20 azalma göstermiştir. Fakat bu azalmanın istatistiksel önemi yoktur.

Hasta gruplandırmasını, hastalığın yerleştiği organlara göre yaptığımızda, kemik tümörlülerinde üç Ig'nin arttığı tespit edildi. Kemik tümörlülerinde IgG % 15, IgA % 20 ve IgM % 12 ve metastatik tümörlülerde IgG % 10, IgM % 27 artış görüldü. Bu gruptaki IgM artımı önemli bulundu. Lenfomalardaki IgM'nin % 14 artışı ve karışık tümörlülerdeki % 20 IgA azalması pratik bir değer ifade eder kanısındayız.

## K A Y N A K L A R

- 1 - Hughes L.E. and McKay W.D.: Suppression of the tuberculin response in malignant disease. *British Medical Journal*, 5474 : 1346-1348, 1965.
- 2 - Solowey A.C. and Rapaport F.T.: Immunologic responses in cancer patients. *Surgical Gynecology Obstetrics*, 121 : 756-760, 1965.
- 3 - Southam C.M.: The immunologic status of patients with non-lymphomatous cancer. *Cancer Research*, 28 : 1433-1440, 1968.
- 4 - McGregor D.D.: Bone marrow origin of immunologically competent lymphocytes in the rat. *Journal of Experimental Medicine*, 127 : 953-966, 1968.
- 5 - Roitt I.M. and et al: The cellular basis of immunological responses. A synthesis of some current views. *Lancet*, 2 : 367-370, 1969.
- 6 - Cooper M.D., Peterson R.D.A., South M.A. and et al: The functions of the thymus system and the bursa system in the chicken. *Journal of Experimental Medicine*, 123 : 75-102, 1966.
- 7 - Rabellino E., Colon S., and Grey H.M.: Immunoglobulins on the surface of lymphocytes. I. Distribution and quantitation. *Journal of Experimental Medicine*, 133 : 156-167, 1971.
- 8 - Robinson E., Ben-Hur N., Shulman J., et al: Comparative study of skin homografts of normal donors and donors with malignant neoplasia in a host with malignant disease. A preliminary report. *Journal of the National Cancer Institute*, 34 : 185-190, 1965.
- 9 - Garrioch D.B., Good R.A., Gatti R.A.: Lymphocyte response to PHA in patients with non-lymphoid tumours. *Lancet*, 1 : 618, 1970.

- 10 - Ducos J., Miqueres J., Colombies P., et al: Lymphocyte response to PHA in patients with lung cancer. *Lancet*, 1 : 1111, 1970.
- 11 - Hermans P.E., Huizenga K.A., Hoffman H.N., et al: Dysgammaglobulinemia associated with nodular lymphoid hyperplasia of the small intestine. *American Journal of Medicine*, 40 : 78-89, 1966.
- 12 - McFarlin D.E., Strober W. and Waldmann T.A.: Ataxia-telangiectasia. *Medicine (Baltimore)*, 51 : 281-314, 1972.
- 13 - Vyas G.N., Perkins H.A. and Fudenberg H.H.: Anapylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *Lancet*, 2 : 312-315, 1968.
- 14 - Miller W.V., Holland P.V., Sugarbaker E., et al: Anaphylactic reactions to IgA: a difficult transfusion problem. *American Journal of Clinical Pathology*, 54 : 618-621, 1970.
- 15 - Peterson R., Kelly W.D., and Good R.A.: Ataxia-telangiectasia, its association with a defective thymus, immunological-deficiency disease, and malignancy. *Lancet*, 1 : 1189-1193, 1964.
- 16 - Clough J.D., Mims L.H. and Strober W.: Deficiency IgA antibody responses to arsanilic acid bovine serum albumin (BSA) in neonatally thymectomized rabbits. *Journal of Immunology*, 106 : 1624-1629, 1971.
- 17 - Lytton B., Hughes L.E. and Fulthrop A.J.: Circulating antibody response in malignant disease. *Lancet*, 1 : 69-71, 1964.
- 18 - Strober W., Wochner R.D., Carbone P.P., et al: Intestinal lymphangiectasia: a protein-losing enteropathy with hypogammaglobulinemia, lymphocytopenia and impaired homo-graft rejection. *Journal of Clinical Investigation*, 46 : 1643-1656, 1967.
- 19 - Cavley L.P.: Electrophoresis and immunoelectrophoresis. Little Brown, Boston, p. 88, 1969.
- 20 - Williams C.A. and Chase M.W.: Methods in immunology and immuno-chemistry. Vol. 1, Academic Press, New York and London, pp. 1-56, 1967.

- 21 - Putnam F.W.: The plasma proteins. Vol. 1, Academic Press, New York and London, pp. 52-72, 1960.
- 22 - Aras K.: Klinik Biokimya. A.Ü. Tıp Fakültesi yayınları, Sayı: 126, sayfa 1080-1119, 1964.
- 23 - Ouchterlony Ö.: Handbook of immunodiffusion and immunoelectrophoresis. Ann Arbor Science Publishers, Ann Arbor, Michigan, pp. 47-59, 1968.
- 24 - Williams C.A.: Immuno-electrophoresis. Scientific American, 202 : 130-140, 1960.
- 25 - Campbell D.H., Garvey J.S., Cremer N.E. and Sussdorf D.H.: Methods in immunology. W.A. Benjamin inc., New York, pp. 260-267, 1970.
- 26 - Haaf E.: Laboratory notes for medical diagnostics. Behringwerke AG, Marburg/Lahn, Germany, pp. 10-38, 1969.
- 27 - Fahey J.L. and McKelvey E.M.: Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody agar plates. Journal of Immunology, 94 : 84-90, 1965.
- 28 - Mancini G., Carbonara A.O. and Heremans J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. Immunochemistry, 2 : 235-254, 1965.
- 29 - Laurell C.B.: Quantitative estimation of proteins by electrophoresis in agarose gel containing antibodies. Analytical Biochemistry, 15 : 45-52, 1966.
- 30 - Chazot G., Poucet J. and Creyssel R.: Quantitation of canine immunoglobulins in biological fluids by electroimmunodiffusion. Review European Etudes Clinical et Biology, 16 : 943 -945, 1971.
- 31 - Reynolds H.Y. and Johnson J.S.: Quantitation of canine immunoglobulins. Journal of Immunology, 105 : 698-703, 1970.
- 32 - Franklin E.C.: The immunoglobulins. Their structure and some techniques for their isolation. Progress in Allergy, 8 : 58-148, 1964.
- 33 - Vaerman J.P., Heramans J.F. and Vaerman C.: Studies of the immunoglobulins of human serum. Journal of Immunology, 91 : 7-10, 1962.

- 34 - Tan M. and Epstein W.V.: Purification of gamma globulin fragments by gel filtration. *Science*, 139 : 53-54, 1963.
- 35 - Simmons P., Penny R. and Goller I.: Plasma proteins (A review). *The Medical Journal of Australia*, 2 : 494-506, 1969.
- 36 - Skvaril F., Brummelova V. and Franek F.: Isolation of K and  $\lambda$  chains from normal human  $\gamma$ G-immunoglobulin by ion-exchange chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, 140 : 371-374, 1967.
- 37 - Strauss A.J.L., Kemp R.G., Vannier W.E. and Goodman H.C.: Purification of human serum globulin fragmentation after sulphate precipitation and prolonged dialysis. *The Journal of Immunology*, 93 : 24-34, 1964.
- 38 - İmir T. ve Gülmezoğlu E.: İnsan kolostrumundan salgısal immunoglobulin A'nın (IgA) ayırımı. *Mikrobiyoloji Bülteni*, 7 : 33-36, 1973.
- 39 - Weir D.: *Handbook of experimental immunology*. Oxford, Blackwell, pp.3-43, 1967.
- 40 - Porter P. and Noakes D.E.: Immunoglobulin IgA in bovine serum and external secretions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 214 : 107-116, 1970.
- 41 - Zschoche R.H., Griebble H.G. and Bach G.L.: Studies on IgA. *Journal of Immunology*, 102 : 625-637, 1969.
- 42 - Newcomb R.W., Normansell D. and Stanworth D.R.: A structural study of human exocrine IgA globulin. *Journal of Immunology*, 101 : 905-914, 1968.
- 43 - Litman G.W. and Good R.A.: Rapid purification of IgA from normal human serum. *Biochimica et Biophysica Acta*, 263 : 89-93, 1972.
- 44 - Sober H.A., Gutter F.J., Wyckoff M.M., et al: Chromatography of proteins. *Journal of the American Chemical Society*, 78 : 756-763, 1956.
- 45 - Fahey J.L. and McLaughlin C.: Preparation of antisera. *Journal of Immunology*, 91 : 484-497, 1963.
- 46 - Leskowitz S. and Waksman B.H.: Studies in immunization. *Journal of Immunology*, 84 : 58-72, 1960.



- 47 - Stiehm L.R. and Fudenberg H.H.: Serum levels of immunoglobulins in health and disease. *Pediatrics*, 37 : 715, 1966.
- 48 - Plant A.G. and Keoml P.: Immunoglobulins in human small intestinal fluid. *Gastroenterology*, 56 : 522-530, 1969.
- 49 - Hughes N.R.: Immunoglobulins and alimentary disease. *Lancet*, 1 : 1357, 1968.
- 50 - Allansmith M., McClellan B.H., Butterworth M. and Maloney J.R.: The development of immunoglobulin levels in man. *The Journal of Pediatrics*, 72 : 276-290, 1968.
- 51 - Palma A.G. and Palma L.M.: Immunoglobulin IgG, IgA and IgM in allergic diseases. *Acta Allergologica*, 26 : 161-180, 1971.
- 52 - Frankel S.G. and Reitman S.: Clinical laboratory methods and diagnosis; a textbook on laboratory procedures and their interpretation. 6 th. ed. St Louis, Mosby, p.265, 1963.
- 53 - Butterworth M., McClellan B. and Allansmith M.: Influence of sex on immunoglobulin levels. *Nature*, 214 : 1224-1225, 1967.
- 54 - Soothill J.F., Hayes K. and Dudgeon J.A.: The immunoglobulins in congenital rubella. *Lancet*, i : 1335, 1966.
- 55 - Immonen P.: Levels of the serum immunoglobulins  $\gamma$ A,  $\gamma$ G and  $\gamma$ M in the malabsorption syndrome in children. *Annales Paediatricae*, 13 : 115-153, 1967.
- 56 - Gelzayd E.A., Kreft S.C., Fitch F.W. and Kirsner J.B.: The distribution of immunoglobulins in the rectal mucosa in ulcerative colitis. *Gastroenterology*, 52 : 1087, 1967.
- 57 - Rottini G., Favento R., Mauro F.: Dynamics of IgM, IgA and IgG antibody response in case of human ophthalmic toxoplasmosis. *Zentralblatt für Bacteriologie Parasitenkunde*, 218 : 507-516, 1971.
- 58 - Weeke B. and Jarnum S.: Serum concentration of 19 serum patients in Crohn's disease and ulcerative colitis. *Gut*, 12 : 297-302, 1971.

- 59 - Tobbie J.L., Abele D.C., et al: Serum immunoglobulin levels in human malaria and relationship to antibody production. *Journal of Immunology*, 97 : 492-505, 1966.
- 60 - Schwartz R.H.: Serum immunoglobulin levels in cystic fibrosis. *American Journal of Diseases of Children*, 111 : 408-411, 1966.
- 61 - Macolongo R., et al: Levels of serum immunoglobulins in patients with rheumatoid arthritis. *Annals of the Rheumatoid arthritis. Annals of the Rheumatic Diseases*, 26 : 412-418, 1967.
- 62 - Welles J.V.: Serum immunoglobulin levels in tropical splenomegaly syndrome in New Guinea. *Clinical and Experimental Immunology*, 3 : 943-951, 1968.
- 63 - Lynch W.J., and Joske R.A.: The occurrence of abnormal serum proteins in patients with epithelial neoplasms. *Journal of Clinical Pathology*, 19 : 461-463, 1966.
- 64 - Schoenfeld A.E., Rubinstein A. and Raviv U.: Immunoglobulins in rheumatic fever. *Israel Journal of Medical Sciences*, 4 : 815-819, 1968.
- 65 - Levin A.G., et al: Production of 19 S and 7 S antibodies by cancer patients. *Clinical and Experimental Immunology*, 7 : 839-849, 1970.
- 66 - Savilahti E.: IgA deficiency in children. *Clinical and Experimental Immunology*, 13 : 395-406, 1973.
- 67 - Crabbe P.A. and Heremans J.F.: The distribution of immunoglobulin-containing cells along the human gastrointestinal tract. *Gastroenterology*, 54: 822-825, 1968.
- 68 - Vasudevan D.M., Balakrishnan K. and Talivar G.P.: Immunoglobulins in carcinoma cervix. *Indian Journal of Medical Research*, 59 : 1653-1659, 1971.
- 69 - Allansmith M. and Hutchison D.: Immunoglobulins in the conjunctiva. *Immunology*, 12 : 225-229, 1967.
- 70 - Josephson A.S. and Weiner R.S.: Studies of the proteins of lacrimal secretions. *The Journal of Immunology*, 100 : 1080-1092, 1968.

- 71 - Claman H.N. and Merrill D.A.: Salivary immunoglobulins. *Journal of Allergy*, 40 : 151-159, 1967.
- 72 - Reynolds H.Y. and Johnson J.S.: Canine immunoglobulins. *Journal of Immunology*, 104 : 1000-1008, 1970.
- 73 - Goldberg L.S., Shuster J., Stuckey M., and Fudenberg H.H.: Secretory Immunoglobulin A, auto antibody activity in gastric juice. *Science*, 160 : 1240-1241, 1968.
- 74 - Choules L.G. and Singer S.J.: On the heterogeneity of the light chains of rabbit antibodies. *Immunochemistry*, 3: 21-28, 1966.
- 75 - Masson P.L. and Heremans J.F.: Molecular size of  $\gamma$ A-Immunoglobulin from bronchial secretions. *Biochimica et Biophysica Acta*, 120 : 172-173, 1966.
- 76 - Tomasi T.B., Tan E.M., Solomon A., et al: Characteristics of an immune system common to certain external secretions. *Journal of Experimental Medicine*, 121 : 101-124, 1965.
- 77 - Genco R.J. and Taubman M.A.: Secretory gamma A antibodies induced by local immunization. *Nature (London)*, 221 : 679-681, 1969.
- 78 - Schrub J., Bocquet J.P. and Forthomme J.: Association de maladie de Hodgkin cryptococcose et déficit en immunoglobulines. *Archives Anat. Pathol.*, 15 : 14-24, 1967.
- 79 - Lishner H.W. and DiGeorge A.M.: Role of the thymus in humoral immunity. *Lancet*, 2 : 1044-1049, 1969.

## T E Ő E K K Ū R

Bu çalışmada bana yol gösteren sayın hocam Prof.Dr. Ekrem Gülmezođlu'na, çalışmada kullandığım deney hayvanlarını temin eden H.Ū. Deney Hayvanları Bölümü idarecilerine, kanserli hasta serumlarını almamda yardımcı olan Ankara Etismesgut Onkoloji Hastahanesi Doktorlarına ve insan kolostrumunu toplayan Ankara Dođumevi Hastahanesi personeline teŐekkürlerimi sunarım.