



# KLİNİK LABORATUVARDA ELEKTROFOREZ UYGULAMALARI

PINAR AKAR  
FİLİZ AKBİYİK  
İNCİLAY SİNİCİ LAY  
ASLI PINAR  
MEHMET ŞENEŞ  
DOĞAN YÜCEL

3 EYLÜL 2013  
İZMİR



# KLİNİK LABORATUVARDA ELEKTROFOREZ UYGULAMALARI

PINAR AKAR  
FİLİZ AKBİYİK  
İNCİLAY SİNİCİ LAY  
ASLI PINAR  
MEHMET ŞENEŞ  
DOĞAN YÜCEL

3 EYLÜL 2013  
İZMİR

**KLİNİK LABORATUVARDA  
ELEKTROFOREZ UYGULAMALARI KURSU  
3 EYLÜL 2013**

Elektroforez, kökleri 1937'ye Tiselius'un çalışmalarına kadar giden eski bir ayırma tekniğidir. Klinik laboratuvarlarda elektroforez tekniklerinin kullanımı bir ara azalmış gibi olsa da, otomatik sistemlerin, bilgi teknolojisinin ve kapiller elektroforez gibi nispeten yeni tekniklerin laboratuvar ortamına girişi ve senteziyle büyük bir sıçrama yapmıştır.

Klinik Laboratuvarında Elektroforez Uygulamaları Kursu ile amaçlanan elektroforez tekniklerine ilgi duyan ama herhangi bir şekilde uzak kalmış veya uygulama yapsa da kendisini geliştirmek isteyen meslektaşlarımıza güncel bilgiyi aktarmaktır. Kursta hem manuel jel elektroforezi gibi konvansiyonel, hem otomatik jel elektroforezi, hem de kapiller elektroforezi gibi yeni tekniklerin uygulamaları yer alacaktır. En sık yapılan protein elektroforezi (serum ve idrar) yanı sıra, ülkemiz için çok önemli olan hemoglobin elektroforezi, immünfiksasyon elektroforezi (immüntiplendirme, serum ve idrar), izoelektrik odaklama tekniği ile BOS'ta oligoklonal bant ve  $\beta$ -2 Transferrin analizi, izoenzim elektroforezi ile glikozaminoglikan elektroforezine de değinilecektir.

Kursta teorik bilgi mümkün olduğunca kısa tutulmuş olup esas olarak uygulamaya ağırlık verilmiştir.

Saygılarımızla,

Doç. Dr. Doğan Yücel

Saat	Konu	Eğitici
	Açılış ve Giriş	<i>Doğan Yücel</i>
08:30-09:00	Elektroforezde temel prensipler	<i>Aslı Pınar</i>
09:00-09:20	Serum protein ve lipoprotein elektroforezi	<i>Filiz Akbıyık</i>
09:20-09:40	İdrar protein elektroforezi	<i>Pınar Akan</i>
09:40-10:00	Serum ve İdrar immüntiplendirme	<i>Mehmet Şeneş</i>
10:00-10:30	Kahve arası/Uygulama hazırlıkları	
10:30-10:50	Hemoglobin elektroforezi	<i>Doğan Yücel</i>
10:50-11:10	İzoelektrik odaklama elektroforezinin klinik kullanımları (Oligoklonal bant, $\beta$ -2 Transferrin)	<i>Aslı Pınar</i>
11:10-11:30	İzoenzim analizleri	<i>Doğan Yücel</i>
11:30-11:50	Glikozaminoglikan (GAG) elektroforezi	<i>İncilay Lay</i>
11:50-13:00	Yemek arası	
13:00-16:45	Uygulama	
16:45-17:00	Değerlendirme ve Kapanış	

**Not: Kurs Biz Medikal tarafından desteklenmiştir.**

## ELEKTROFOREZDE TEMEL PRENSİPLER

Doç. Dr. Aslı Pınar ([aapinar@hacettepe.edu.tr](mailto:aapinar@hacettepe.edu.tr))

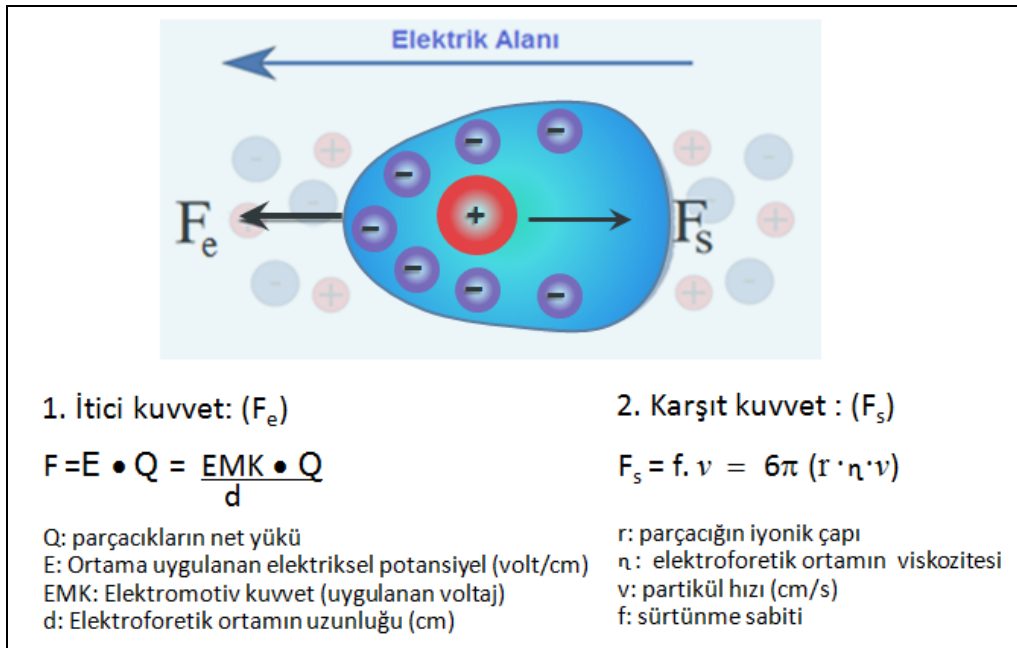
Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve  
Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Merkez ve Acil Laboratuvarları, Ankara-Türkiye

Elektroforez, yüklü moleküllerin elektriksel bir alanda göç etmesi olarak tanımlanmaktadır. Sıvı veya katı bir ortama elektrik akımı uygulanması ile yüklü moleküllerin ayrımı ve analizi için kullanılan bir tekniktir. Klinik laboratuvarlarda, vücut sıvı ve dokularında bulunan protein, peptit, amino asit, nükleik asit, organik asit ve basit iyonlar için elektroforetik teknikler kullanılabilir.

### Elektroforetik ayrımı etkileyen faktörler

Elektroforez sisteminde ayrım birçok faktörün etkileşimi sonucu gerçekleşir:

1. Yüklü partikülün mobilitesini etkileyen faktörler
  - a) Partiküle etki eden kuvvetler
  - b) Elektroforetik mobilite
  - c) pH
  - d) Elektrolitler
  - e) Akım ve iletkenlik
2. Makromolekülün mobilitesini etkileyen faktörler
  - a) Yük ve konformasyon
  - b) İyonik atmosfer ve Zeta potansiyel
  - c) Relaksasyon etkisi
  - d) Elektroforetik etki
  - e) Elektroendozmoz



**Şekil 1.** Elektroforezde birbirine zıt iki kuvvet rol alır: İtici kuvvet: ( $F_e$ ) ve karşıt kuvvet ( $F_s$ ).

### Partiküle etki eden kuvvetler

Yüklü bir molekül, elektriksel alanda itici kuvvet ( $F_e$ ) ve zıt yönlü karşıt kuvvet ( $F_s$ ) arasında kalır (Şekil 1).  $F_e$ , partikülü elektrik alanda harekete zorlayan kuvvettir. Elektrik alanının gücü ve partikül yükü bu kuvvetin büyüklüğünü belirler. Partikül ortamda hareket etmeğe başlayınca karşıt sürtünme kuvveti ( $F_s$ ) ile engellenir. Bu karşıt kuvvet hız ile orantılı olup, orantı sabiti sürtünme katsayısıdır. Sürtünme katsayısı elektroforez ortamının viskozitesine ve partikülün büyüklük ve biçimine bağlıdır. Viskozite artarsa partikül hareketi yavaşlar. Protein gibi büyük moleküller için sürtünme katsayısı karakteristik bir özelliktir.

### Elektroforetik mobilite

Elektroforetik mobilite ( $\mu$ ) ( $\text{cm}^2/\text{V}\cdot\text{s}$ ) yüklü partikülün hareket edebilme kapasitesidir. Molekülün net yükü ile doğru, molekül büyüklüğü ve elektroforez ortamının viskozitesi ile ters orantılıdır.

$$\mu = \frac{v}{E} = \frac{Q}{6\pi r \eta}$$

$\mu = \text{cm}^2/(\text{V}\cdot\text{s})$  olarak elektroforetik mobilite  
 $Q = \text{İyonun net yükü}$   
 $r = \text{Kati maddenin iyonik çapı}$   
 $\eta = \text{Göçün gerçekleştiği tampon çözeltisinin viskozitesi}$

### pH

Molekül net yükü, ortam pH'sı ile değişir. Proteinler amfoterik moleküller olup asidik ve bazik grupları bulunur. Düşük pH'da genel olarak pozitif yüklü, izoelektrik noktada yüksüz, yüksek pH'da ise negatif yüklüdür. Mobilite net yük ortalaması ile doğru orantılı olduğu için efektif mobilite pH'nın bir fonksiyonudur.

### Elektrolitler

Elektroforez sisteminde elektrik akımının iletilmesi, sürekliliği için iyonlar gereklidir. Tampon ve elektrolitlerle sabit bir elektriksel alan ve proteinlerin hareketlerinin birbirinden bağımsız olması sağlanır. Elektrolit çözeltisi içindeki zıt iyonlar, solventi kendileri ile birlikte zıt yöne çekerler. Bu nedenle elektroforetik alan içinde makromolekül, solventin bu hareketine de karşı koymak zorundadır.

### Akım ve iletkenlik

Bir elektriksel sistemde uygulanan voltaj ile orantılı olarak akım oluşur:

$$\text{Voltaj} = \text{Akım} \times \text{Direnç} \quad (\text{Eşitlik 1})$$

veya

$$\text{Voltaj} = \text{Akım} / \text{İletkenlik} \quad (\text{Eşitlik 2})$$

Elektroforezde akım iyonların akışıdır. İletkenlik, mevcut tüm iyonların efektif mobiliteleri ile orantılıdır. Voltaj, akım ve iletkenlik birbiri ile ilişkilidir (Eşitlik 2).

İletkenliğin arttığı durumda, akım sabit tutulur ise, voltaj azalır,  $F_e$  azalır, makromolekülün hızı azalır. İletkenliğin arttığı durumda, voltaj sabit tutulur ise, akım artar, ısı üretilir. Isı artışı, solüsyonda konvektif bozulmaya, elektroforetik paternlerin kaymasına, makromoleküllerin denatüre olmasına neden olur.

## Yük ve konformasyon

Proteinler polielektrolitler olup net yükleri bu grupların yüklerinin toplamına ve molekülün konformasyonuna bağlıdır. Protein konformasyonu makromolekülün net yükünü ve elektroforetik mobilitesini etkiler.

## İyonik atmosfer

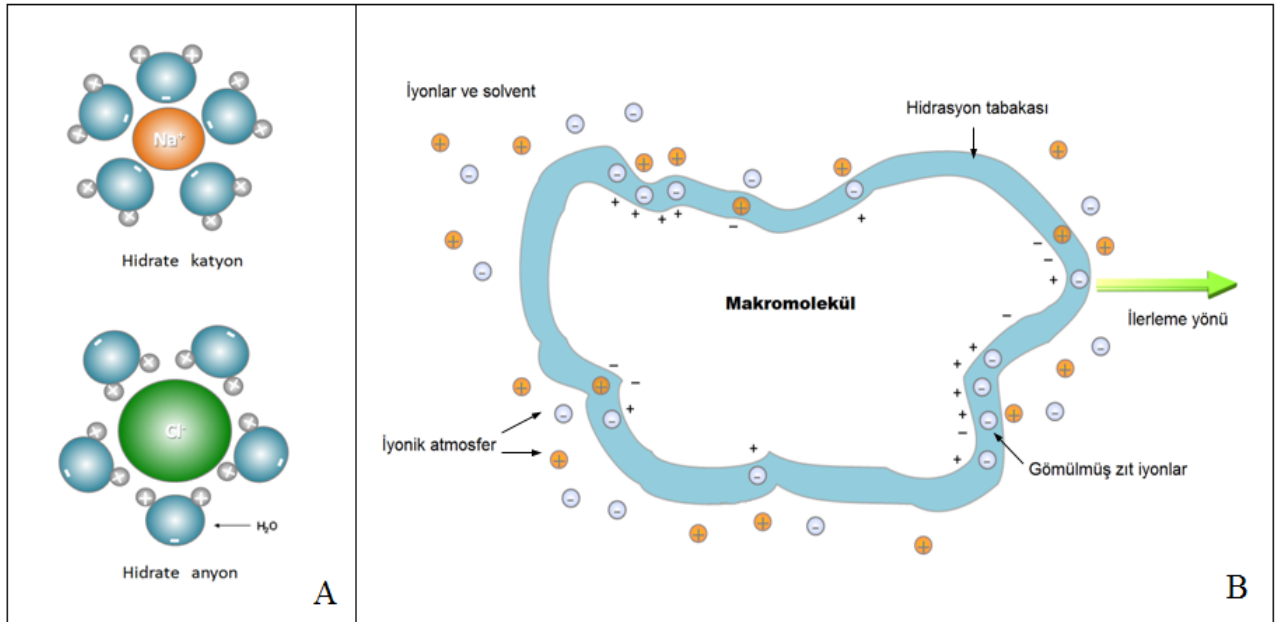
Sulu bir ortamda tüm polar maddeler su molekülleri ile etkileşir. İyonlar da hidrasyon tabakası içinde bulunurlar. İyonlar bu nedenle makromoleküllerin üzerindeki yüklü gruplarla doğrudan etkileşmez. Yüklü gruplarının üzerinde iyonik atmosfer olarak adlandırılan bir tabaka oluştururlar. Makromolekül yüzeyi bir hidrasyon katmanı ve hidrate zıt yüklü iyonlarla hareket eder (Şekil-2). Makromolekülün hidrasyon katmanı ve bunun içinde yer alan zıt iyonlardan oluşan kompleks katman ile bunun dışında kalan solüsyon arasında oluşan potansiyele "Zeta potansiyel" denir. Makromolekülün hidrasyon tabakası içinde bulunan adsorbe olmuş iyonlar nedeni ile molekülün yükü azalır. Makromolekülün efektif yükü zeta potansiyel düzeyine kadar düşer.

## Relaksasyon etkisi

Elektrolit solüsyonuna bir elektrik potansiyel uygulanırsa, pozitif iyon negatif elektroda giderken, çevresini saran iyonları da beraberinde sürükler. Ancak, random termal hareket nedeni ile makromoleküller düzensiz hareket eder, düz çizgide gitmektense atlarlar. Bu atlamalar sırasında zıt iyonik atmosfer geride kalır. Kısa bir zaman aralığından sonra, yeniden iyonik atmosfer oluşur. Buna relaksasyon etkisi denir. Relaksasyon etkisi molekülün mobilitesini azaltmaktadır.

## Elektroforetik etki

İyonlar sulu ortamda hidratedir, zıt yüklü iyonlar solventi kendileri ile beraber zıt yönde sürüklerler. Makromolekül bu ters akımdaki solvente karşı da hareket etmek zorundadır, mobilitesini bu faktör de azaltır.



**Şekil 2.** Sulu bir ortamda yüklü moleküllerin hidrasyonu. **A:** Küçük iyonların hidrasyonu. **B:** Su içinde bir makromolekül üzerindeki polar ve yüklü gruplarla etkileşen hidrasyon tabakası içindeki iyonlarla birlikte hareket eder.

### Elektroendozmoz

Destek materyalinin taşıdığı yüklü gruplar nedeni ile su moleküllerinin oluşturduğu harekettir. (Şekil 3). Kağıt, selüloz, agaroz gibi yüzeylerde anyonik gruplar sabit yüzey yüklerini oluştururlar. Bu yüzey tampondaki pozitif iyonlarla kaplanarak hareketsiz iyon tabakası oluşur. Üzerinde ise giderek azalan oranda pozitif yük içeren hareketli tabaka vardır. Solüsyondaki pozitif iyonların oluşturduğu, hareketli pozitif bir iyon bulutu olup Zeta potansiyeli oluşturur. Böyle bir sisteme akım uygulandığında, solüsyondaki zıt yüklü mobil iyon katmanı katoda doğru göç eder. Solüsyondaki iyonlar hidrate olduğu için, solvent de aynı yönde mobilize olur. Makromoleküller yüklerine göre bu harekete karşı koyabilir veya yüksüz ise katoda doğru sürüklenirler.

### Elektroforez sisteminin temel bileşenleri

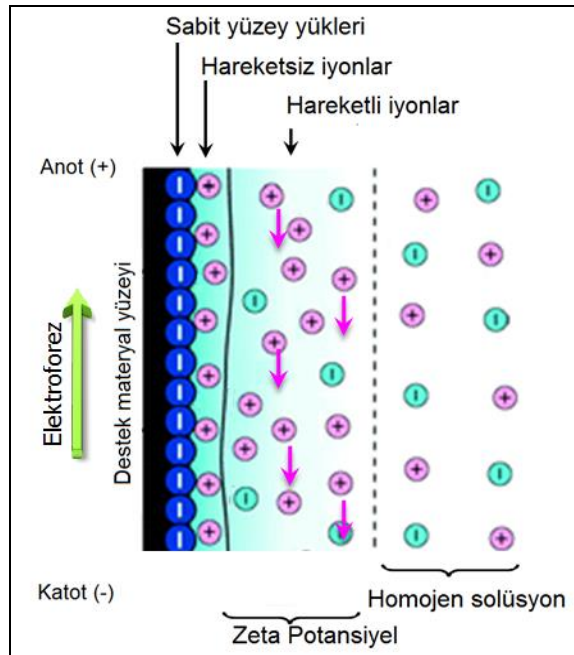
Klasik bir elektroforez sistemi temel bileşenleri güç kaynağı, elektroforez ünitesidir. Elektromotiv kuvvet, güç kaynağı tarafından sağlanır. Elektroforez ünitesi ise tampon ve destek materyalini kapsamaktadır.

**Güç kaynağı**, elektroforez için gereken temel komponentlerden biridir. Solütleri yüklü hale getiren elektromotor kuvvetin kaynağıdır. Akım ve voltajın ayarlanmasını sağlar.

**Tampon**, elektroforezde partiküllerin yüklerinin belirlenmesi ve iyonizasyonunun devam etmesini sağlar. Tamponun iyonik gücü, yüklü moleküllerin etrafını saran iyonik bulutun kalınlığını, bu molekülün hızını, elektrofretik zonların keskinliğini belirler. İyon konsantrasyonu artırılarak iyonik bulut büyüklüğü artırılırsa, molekülün hareketi zorlaşır. Serum proteinleri için barbital ve EDTA tamponları en çok kullanılanlardır. Joule yasasına göre dirençli bir ortamdan akım geçirildiğinde oluşan güç ısı olarak kaybedilir:

$$\text{Güç} = (\text{Akım})^2 \times \text{Direnç}$$

Eşitlik 3



Şekil 3. Elektro-endozmoza neden olan destek yüzey üzerindeki yük dağılımı.

Yüksek iyonik güçlü tampon nedeni ile dirençte azalma olması durumunda akım artar, aşırı ısı oluşur. Bu tip tamponlarla keskin bantlar elde edilir. Ancak ısıya dayanıksız proteinlerin denatüre olması, diğer bileşenlerin yıkılması söz konusu olur.

Bir tamponun iyonik gücü şu formüle göre hesaplanır:

$$\text{İyonik güç} = 0.5 \sum c_i z_i^2$$

Eşitlik 4

$c_i$  = iyon konsantrasyonu (mol/L)

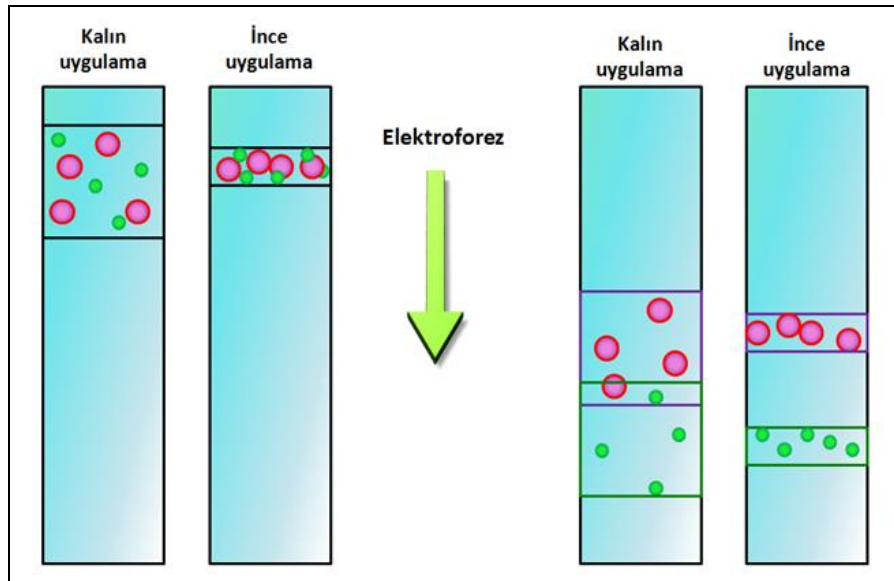
$z_i$  = iyon yükü

### Destek ortamın özellikleri

Kapiller elektroforez veya free flow sistemlerinde olduğu gibi destek ortam olmadan veya ince-tabaka, kağıt, jel (agaroz, poliakrilamid gibi) destekleyici ortamlar üzerinde elektroforez uygulamaları gerçekleştirilebilir. Yaygın olarak katı, suda çözünmeyen destek ortamlar kullanılır. Bu materyallerin bir kısmında mekanik destek gerekir. Tabaka, tüp, kolon formlarında hazırlanabilir. Nişasta, agar, poliakrilamid, kağıt, selüloz asetat membranlar kullanılmaktadır.

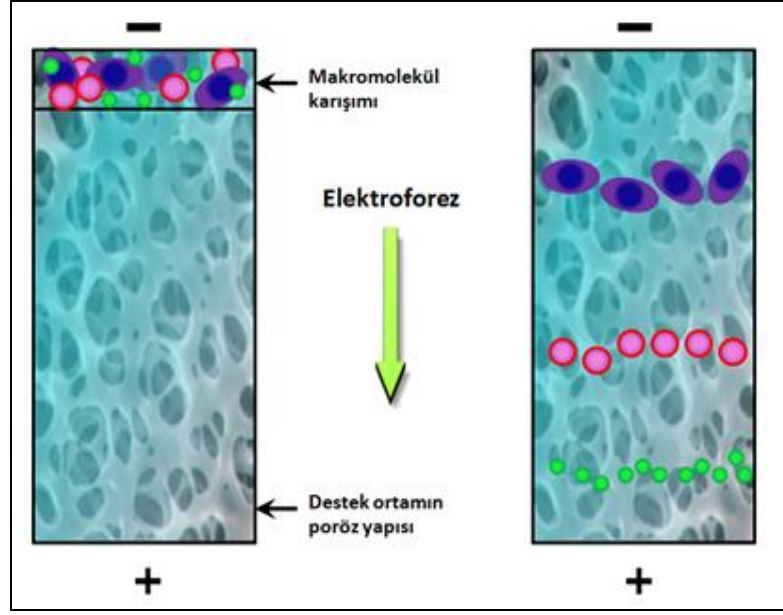
Elektroforezde karışım halindeki örneklerde bulunan makromoleküllerin birbirlerinden tamamen ayrılması, ayrı bantlar haline getirilmesi amaçlanır. Ama destek ortam olamaması durumunda ısı nedeni ile bantların difüzyonu ve konveksiyon olur. Bantlar birbirinden iyi ayrılamaz (Şekil-4). İyi bir ayırım için en önemli konu örneğin başlangıç noktasında ince bir şekilde uygulanmasıdır. Ayrıca, makromoleküller elektroforez sırasında ayrılırsa bile konveksiyon nedeni ile tekrar birbirine karışacaktır. Bunu önlemek için destek ortam gereklidir.

Nişasta veya agar gibi matrislerin konsantrasyonu değiştirilerek ortalama por genişliği ayarlanabilmektedir. Ortalama por genişliği makromolekülün ortalama çapına yakın olur ise moleküler eleme yapılabilir (Şekil-5). Ancak proteinlerin ayrımı için yük/kütle oranı da önemlidir.



Şekil 4. Elektroforezde başlangıç uygulama kalınlığının bant rezolüsyonuna etkisi.





**Şekil 5.** Jel matrisin uygun por büyüklüğündeki gözenekli yapısı makromoleküllerin elektroforetik ortamda moleküler büyüklüğe göre ayırmasını da sağlayabilmektedir.

Elektroforezde kullanılan destek ortamlar temel olarak 2 gruba ayrılır (Tablo-1). Grup 1’de bulunan kağıt, selüloz asetat ve agaroz temel olarak moleküler yük temeline göre ayırım sağlar. Grup 2’de yer alan nişasta ve poliakrilamid ise moleküler yük ve büyüklüğe göre ayırım yapabilmektedir.

Kullanılan ilk jel materyali nişasta olmuştur. Yük kütle oranına ve moleküler büyüklüğe göre ayırım sağlar. Kağıt ve selüloz asetat ince ama mekanik olarak dayanıklı materyallerdir. Kağıt düşük molekül ağırlıklı maddeler için uygundur.

Selüloz asetat, selülozun asetik anhidrid ile işlem görmesi sonucu elde edilir. Dansitometrik inceleme öncesinde transparan hale getirilmesi gerekir. Avantajları, hızlı ayırım sağlaması, uzun süre saklanabilmesi ve dayanıklı olmasıdır.

**Tablo 1.** Elektroforezde kullanılan destek ortamların özellikleri.

	Destek ortam	Yorum
1. Grup	Kağıt	Denatüre edici özelliği var, kuyruklanma yapabilir, dansitometrik analiz zor, rutin kullanılmıyor
	Selüloz asetat	Hızlı ayırım sağlar, dansitometrik analiz kolaydır, uzun süre saklanabilir, dayanıklıdır, rutin/yaygın kullanılmıyor
	Agaroz	Rutin uygulamalarda en yaygın kullanım, dansitometrik analiz kolaydır, endozmozis görülebilir
2. Grup	Nişasta	Nadir kullanılır, moleküler eleme yapılabilir, moleküler büyüklük ve yük özelliklerine göre ayırım sağlar, opak olması nedeni ile dansitometrik analiz zordur
	Poliakrilamid	Rutin kullanımı yaygın değildir, moleküler eleme yapılabilir, moleküler büyüklük ve yük özelliklerine göre ayırım sağlar, dansitometrik analiz zordur, izoelektrik odaklamada tercih edilir

Agaroz, agardan elde edilen doğal bir polisakkarittir. Agarda iyonize olabilen gruplar bulunmadığı için belirgin elektroendozmoz veya adsorpsiyon görülmez. Doğal olarak şeffaf olması nedeni ile tercih edilir.

Poliakrilamid, monomerik akrilamidin N-N'-metilenbisakrilamid ile çapraz bağ yapması ile oluşur. Çapraz bağ miktarı por büyüklüğünü belirler. Por genişliğinin değiştirilebilir olması, ısıya dayanıklılığı, kimyasal olarak inert olması avantajlarıdır. Karsinogenik olması dezavantajıdır.

### Görüntüleme

Klasik elektroforez uygulamasında temel basamaklar; örneğin uygulanması, voltaj veya akıma göre ayırımın yapılması, tespit etme, boyama ve değerlendirmedir. Elektroforez tamamlanınca destek ortamının yıkanması, tampon ve boyamayı etkileyen diğer bileşiklerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Boyama öncesi değerlendirilecek analitin destek yüzeyine sabitlenmesi gerekir. Bazı destek materyallerinin transparan hale gelmesi gerekir. Bantların boyanma veya işaretlemesi için kullanım amacıyla göre çok farklı seçenek bulunmaktadır (Tablo-2). Destek ortam içinde ayrılan analitler, boyandıktan sonra gerekiyor ise dansitometrik olarak değerlendirilir.

### Elektroforetik Tekniklerin Sınıflandırılması

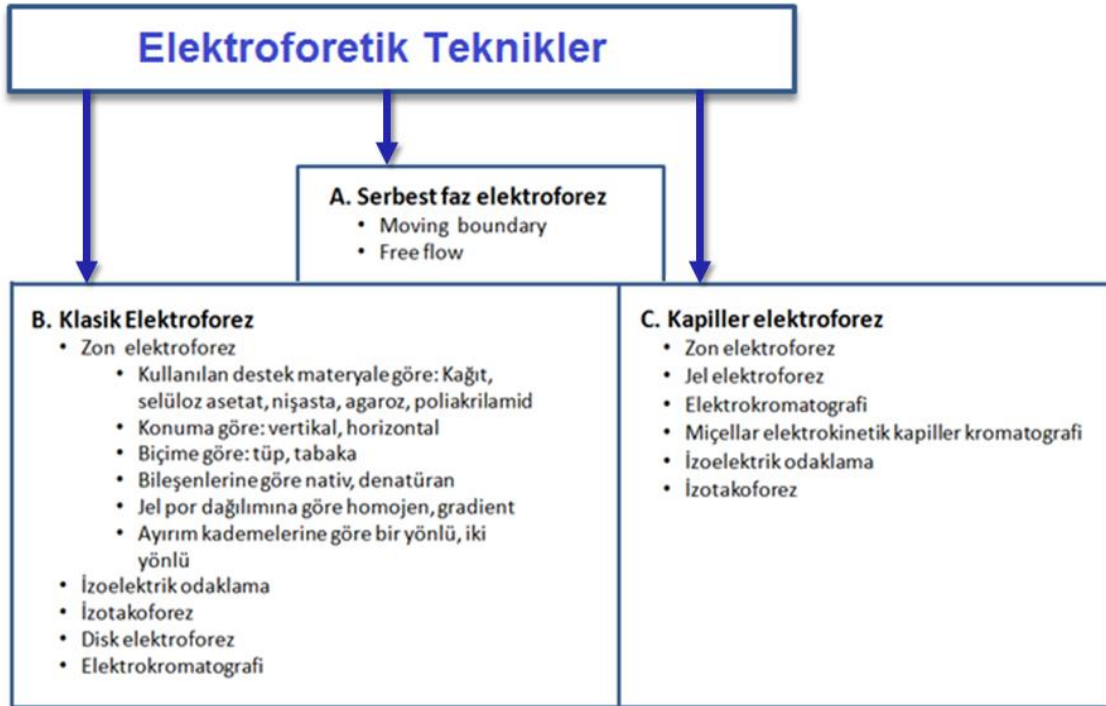
Elektroforetik teknikler birçok yönden gruplandırılabilirse de temel olarak sıvı ve solid destek içeren klasik elektroforez olarak ikiye ayrılabilir. Kapiller elektroforez ise genel olarak ayrı bir elektroforetik grup olarak değerlendirilir (Tablo-3).

### Kapiller Elektroforez

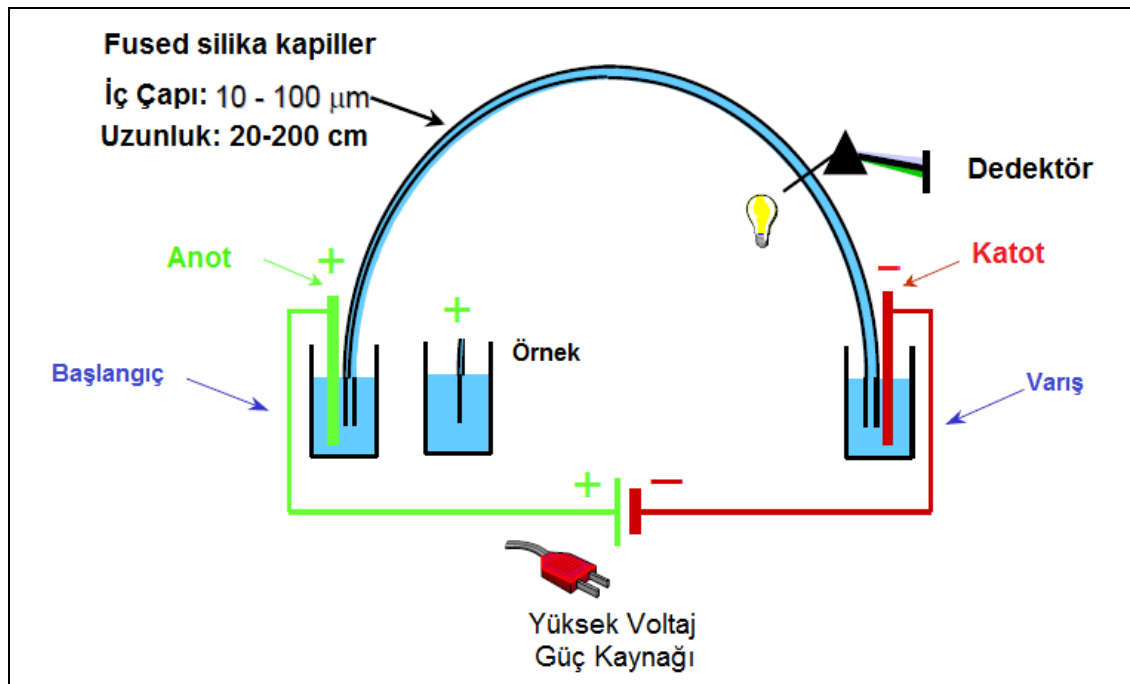
Kapiller elektroforez 1960'lı yıllarda geliştirilmiştir. Genellikle 10-100 mikrometre arasında iç çapı olan, 20-200 cm uzunluklarda olabilen fused silika kapiller borular ile klasik elektroforetik uygulamalar gerçekleştirilebilmektedir (Şekil-6).

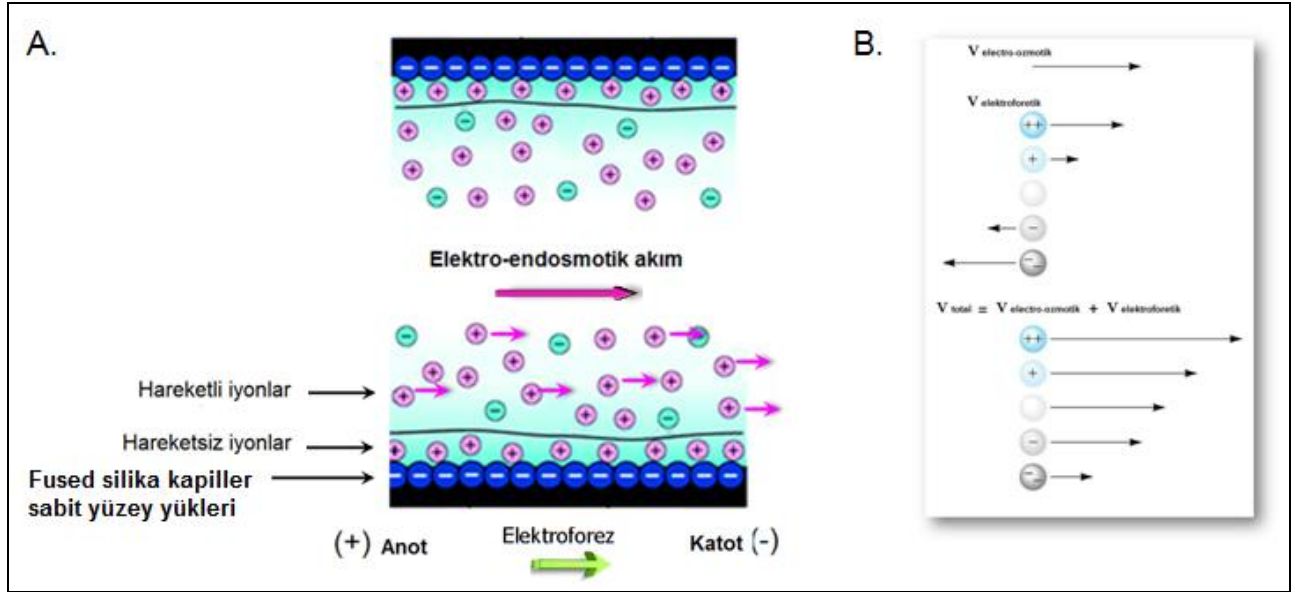
**Tablo-2** Farklı elektroforez uygulamalarında yaygın kullanılan boyalar

Analit	Boyama	Destek ortamı	Yorum
Aminoasitler	Ninhidrin	Selüloz asetat, kağıt	Amino grupları ile etkileşir
Proteinler	Ponceau S	Selüloz asetat, Poliakrilamid	Coomassie'nin onda biri kadar duyarlı ama proteinler için daha spesifik, yaygın kullanılır, proteini geri elde mümkün
	Amido Black 10B	Agaroz	Yaygın olarak kullanılır, 1 µg /bant saptayabilir
	Bromfenol mavisi	Selüloz asetat, Poliakrilamid	Coomassie'nin beşte biri kadar duyarlı, amfolit jellerde kullanılabilir
	Coomassie Blue R250	Agaroz, Poliakrilamid	0.2 µg protein saptayabilir, amfolit jellerde kullanılabilir
	Gümüş boyama	Poliakrilamid	Coomassie'den 50-100 kez duyarlı Farklı proteinler farklı renk verir
Fosfoprotein	Stains-All	Poliakrilamid	Proteinler kırmızı, fosfoproteinler mavi renk boyanır
Hemoglobin	Orto-dianisidin	Poliakrilamid	Hem spesifik
	Ponceau S	Selüloz asetat	Protein spesifik
Lipoprotein	Oil Red O Sudan Black B	Agaroz	
Glikoprotein	Periodic - Schiff	Agaroz	Saptama sınırı 2-3 µg karbonhidrat

**Tablo 3.** Elektroforetik tekniklerin sınıflandırılması.

Kapiller elektroforezde iki kuvvet rol oynar; solütlerin elektroforetik mobilitesi ve elektroendozmoz. Kapillerler büyük bir yüzey oranı nedeni ile endozmoz klasik elektroforeze göre etkin kuvvet olmaktadır. Ayırımında net yük, kütle ve daha az oranda moleküler biçim rol alır. Toplam elektroforetik ilerleme, elektroforetik mobilite ve elektroendozmotik hareketin vektörel toplamıdır (Şekil-7).

**Şekil 6.** Kapiller elektroforez sisteminin şematik gösterimi.



**Şekil 7.** Kapiller elektroforezde elektroforetik mobilite. **A**, Fused silika kapiller yüzey üzerinde elektro-endozmotik ve elektroforetik akım; **B**, yüklü partiküllerin elektroforetik, endozmotik ve toplam hızları.

Kapiller elektroforezin klasik elektroforeze göre en belirgin avantajları:

- Yüksek voltaj uygulanabilmesi
- Hızlı ayırım süresi
- Otomasyona uygun olması,
- Nanolitre düzeylerinde örnek hacimleri ile çalışılabilmesi
- Mikrolitre düzeylerinde tampon kullanımı
- Boyama gerekmeden doğrudan saptama yapılabilmesi
- Tekrarlanabilirliğinin yüksek olması

Bu avantajları nedeni ile klinik laboratuvarlarda rutin analitik uygulamaları hızla gelişmektedir.

## Kaynaklar

1. Papadea CN. Chapter 8: Electrophoresis. Clinical Diagnostic Technology - The Total Testing Process, Volume 2: The Analytical Phase. Ward-Cook KM, Lehmann CA, Larry E. Schoeff LE, and Williams RH, editors. Washington, DC: AACC Press (2005).
2. Karcher RE, Landers JP. Chapter 12: Electrophoresis. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th edition. Burtis CA, Ashwood ER, and Bruns DE, editors (2005).
3. Brewer JM. Chapter 6: Electrophoresis. Clinical Chemistry: Theory, analysis, correlation. 3th ed. Kaplan LA, Pesce AJ editors, Mosby Elsevier (2010).
4. Andrews AT. Electrophoresis, theory techniques and biochemical and clinical applications. Clarendon Press, Oxford (1986).
5. Keren DE. Protein electrophoresis in clinical diagnosis. Oxford University Press Inc, New York (2003).

## SERUM PROTEİN VE LİPOPROTEİN ELEKTROFOREZİ

Prof. Dr. Filiz Akbıyık

HÜ Tıp Fakültesi, Merkez ve Acil Laboratuvarları Direktörü

### SERUM PROTEİN ELEKTROFOREZİ

Serum protein elektroforezi (SPE), serumda yer alan proteinlerin elektroforez ortamında ayrıştırılması yoluyla çeşitli hastalıkların tanı ve tedavi izleminde kullanılan bir yöntemdir. Özellikle monoklonal gamopatiye neden olan protein bozukluklarının taranmasında ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılmaktadır. Halsizlik, açıklanamayan anemi, periferik nöropati, patolojik kırık veya litik lezyonların görülmesi, hipergamaglobulinemi, hipogamaglobulinemi, ağır proteinüri, tekrarlayan enfeksiyonlar gibi birçok nedenden dolayı istenen bir tetkiktir.

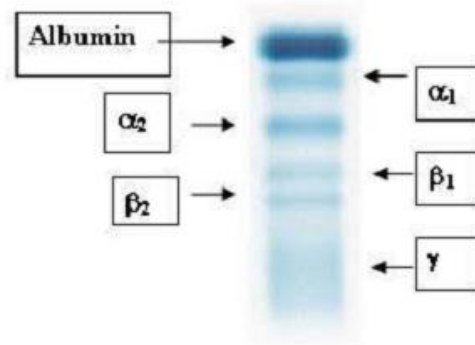
Serum protein elektroforezinin bileşenleri plazma proteinlerinden meydana gelmektedir.

Plazma Proteinleri	MA (kD)	Fonksiyonu
<b>Albumin</b>	67	Ozmotik basıncın korunması ve kanda taşıma
<b>α1- globulinler</b>		
Antitripsin	51	Tripsin ve diğer proteazların inhibitörü
Antikimotripsin	56-68	Kimotripsin inhibitörü
Lipoprotein (HDL)	200-400	Kolesterol taşıyıcı
Protrombin	72	Faktör II, trombin öncülü
Transkortin	51	Kortizol, kortikosteron taşıyıcı
Asit glikoprotein	44	Progesteron taşıyıcı
Tiroksin bağlayıcı globulin	54	İyodotronin taşıyıcı
<b>α2- globulinler</b>		
Seruloplazmin	135	Bakır iyonları taşıyıcı
Antitrombin III	58	Pıhtılaşma inhibitörü
Haptoglobin	100	Hemoglobin bağlayıcı
Kolinesteraz	350	Kolin esterleri parçalayıcı
Plasminojen	90	Plazmin öncülü
β2-Makroglobulin	725	Proteinaz inhibitörü
Retinol-bağlayıcı protein	21	Vitamin A taşıyıcı
Vitamin D-bağlayıcı protein	52	Kalsitriol taşıyıcı
<b>β-globulinler</b>	2.000-4.500	
Lipoprotein (LDL)	80	Lipit taşıyıcı
Transferrin	340	Demir iyonları taşıyıcı
Fibrinojen	65	Koagülasyon faktör-I
Seks hormon bağlayan globulin	38	Testosteron ve estradiol taşıyıcı
Transkobalamin	110	Vitamin B12 taşıyıcı
C-reaktif protein		Kompleman aktivatörü
<b>γ-globulinler</b>		
IgG	150	Geç antikor
IgA	162	Mukoza koruyucu antikor
IgM	900	Erken antikor
IgD	172	B-lenfosit reseptörü
IgE	196	Allerjik reaksiyonlarda etkili antikor

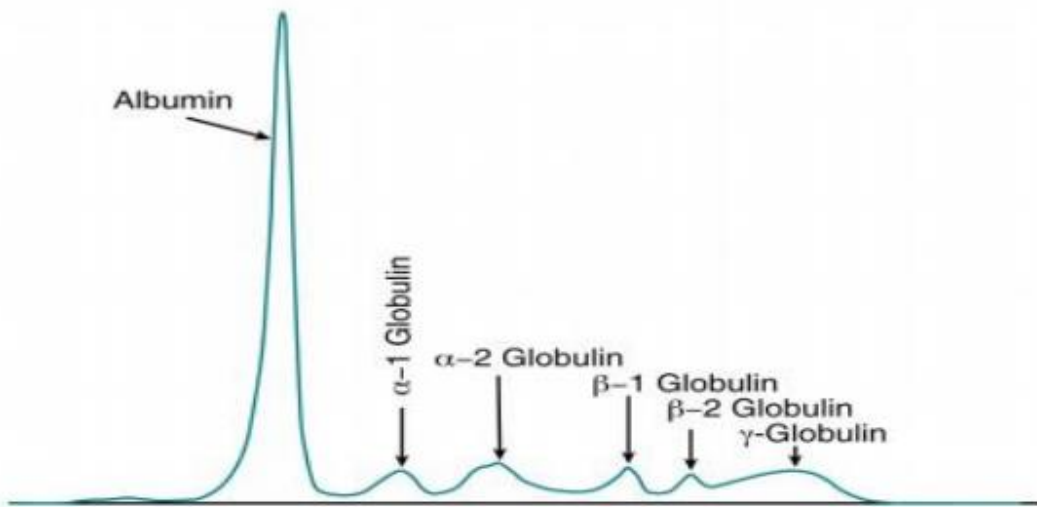
SPE için hemoliz olmamış kandan elde edilen serum örnekleri kullanılır. Serumda yer alan proteinlerin elektroforetik analizi selüloz asetat, agaroz jel, poliakrilamid jel gibi spesifik bir destek ortamında veya kapiller elektroforezde yer alan ince kapiller sistemde yapılabilir. Normal serumdan elde edilen yüksek rezolüsyonlu elektroforez grafiğinde 6 bant görülür. Bunlar albümin, alfa-1, alfa-2, beta-1, beta-2 ve gama globülin bantlarıdır (Şekil 1 ve 2).

SPE'de görülen piklerde, spesifik bölgelerde artma veya azalmanın tespit edilmesi; akut ve kronik inflamasyon, alfa-1 antitripsin eksikliği, nefrotik sendrom, enfeksiyon hastalıkları, hepatik siroz gibi birçok hastalığın tanısına yardımcı olmaktadır. Bununla birlikte günümüzde SPE'i en çok monoklonal gamopatilerin taranması, tanısı ve tedavisinin izlenmesinde kullanılmaktadır.

B lenfosit ve plazma hücreleri tarafından sentezlenen gama globülinler, SPE'de gama bandı üzerinde görülürler. Bu proteinlerin üretimi çok arttığında, gama bandında oluşan ve normal olmayan piklerin analiz edilmesi, paraproteinemi ile giden hastalıklarda tanı koydurucu olmaktadır.

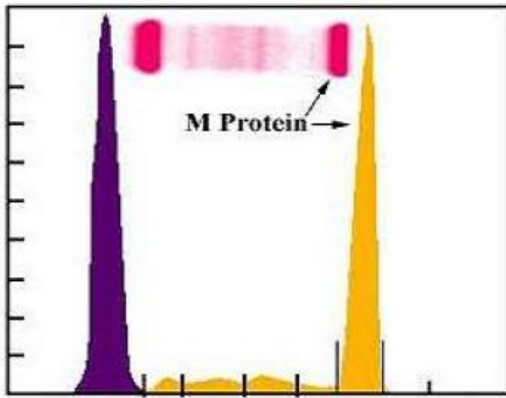


**Şekil 1.** Agaroz jelde elde edilen normal serum protein bantları.

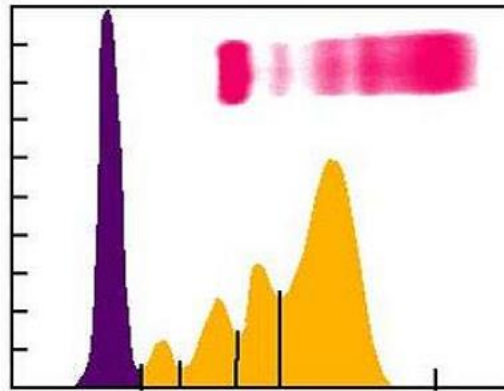


**Şekil 2.** Kapiller elektroforezde görülen serum protein fraksiyonları.

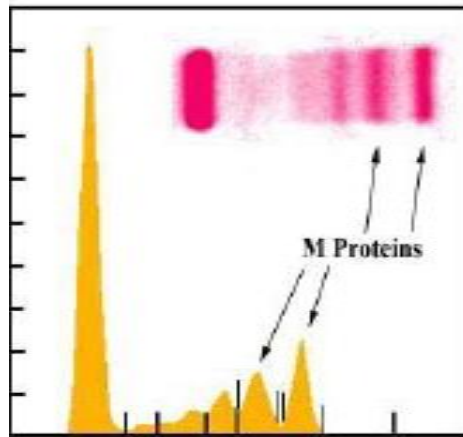
Plazma hücreleri vücudu savunma amaçlı antikor üretmektedirler ve bu hücrelerin tek bir klonu aynı yapıda immünglobulinlerin oluşmasına neden olmaktadır. Multiple miyelom plazma hücrelerinin tümörüdür ve monoklonal immünglobulin (paraprotein, M protein, monoklonal antikor) artışına neden olmaktadır. Bunlardan en sık Ig G, Ig A ve hafif zincirli miyelom tipleri görülmektedir. Multiple miyelomdan başka Waldenstrom makroglobulinemisi, lenfoid tümörler, amiloidozis, MGUS (monoclonal gammopathy of undetermined significance) gibi diğer monoklonal gamopatilerde de hastalığa özel paraproteinlerin serum düzeyleri artar ve  $\gamma$  globulin bandında keskin ve dar bir pik oluşur (Şekil 3). Bu monoklonal immünglobulinler; polimerler, monomerler ve immünglobulin parçacıkları oluşturarak hafif zincirler (idrarda Bence-Jones proteinleri) veya nadiren ağır zincirler şeklinde görülebilirler. M proteinlerinin yaklaşık % 50'si multiple miyelom, % 25'i B lenfosit kaynaklı neoplazmlar, Waldenstrom makroglobulinemisi, lenfoma ve kronik lenfositik lösemi ve diğer % 25'ise MGUS veya nedeni bulunamamış benign kaynaklı olabilmektedir.  $\gamma$  globulin bandında yaygın ve genel bir artışa neden olan, antikorların diffüz karışımından meydana gelen poliklonal gamopatiler; kronik inflamasyon, enfeksiyon hastalıkları, karaciğer hastalıkları ve otoimmün hastalıklardan kaynaklanabilir (Şekil 4). Çok nadir olmakla beraber birden fazla klondan köken alan biklonal veya triklonal gamopatiler de görülebilmekte ve bu durumda gama bandında birden fazla pik tespit edilebilmektedir (Şekil 5).



Şekil 3. Monoklonal Gamopati.



Şekil 4. Poliklonal Gamopati.

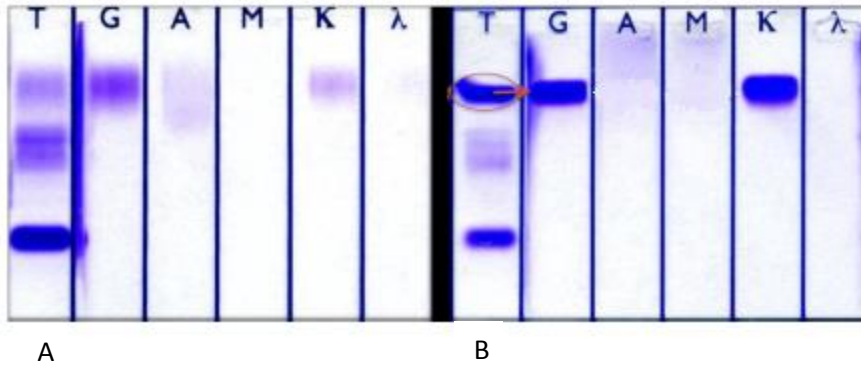


Şekil 5. Biklonal Gamopati.

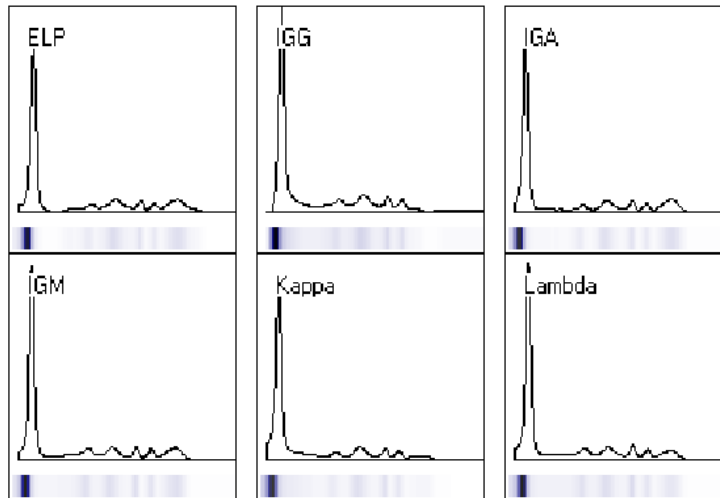
Monoklonal gamopatilerde pikler her zaman gama bandı üzerinde yer almayabilir. Beta-gama bantları arasında, beta ve alfa bantları üzerinde görülen M protein piklerine de sık rastlanmaktadır. Bu nedenle SPE'de görülen anormal pikler mutlaka immüfiksasyon elektroforezi (IFE) ile incelenmelidir. SPE'de görülen monoklonal proteinlerin türünü tanımlamak (immüntiplendirme) için IFE yapılır. Protein elektroforezi ve immünprespitasyon tekniklerini bir araya getiren IFE, normal SPE olduğu halde şüphelenilen olgularda da patolojik protein varlığını irdelemek için kullanılır.

IFE uygulamaları agaroz jel veya kapiller elektroforez sistemleri ile yapılabilir. Hasta serumu dilüe edildikten sonra IFE jeline altı farklı pozisyonda uygulanır ve elektroforez yapılır. Farklı immünglobülinlerin antiserumları (IgG, IgA, IgM, kappa ve lambda) her bir pozisyona eklenerek, antijen-antikor kompleksinin oluşması ve çökmesi sağlanır. IgG, A, M, kappa ve lambda bölgelerinde sınırları belirgin bir bandın varlığı ile monoklonal proteinlerin türü belirlenmiş olur (Şekil 6). IFE duyarlılığı yüksek ve hızlı sonuç veren bir uygulamadır. 50-150 mg/dL gibi düşük miktarlarda monoklonal proteinleri kolayca karakterize edebilmektedir.

IFE uygulamaları kapiller elektroforez ile çalışıldığında monoklonal protein tanımlanması 'Immunosubtraction (immünçıkarma)' ile yapılmaktadır. Azalan veya yok olan anormal piklerin hangi antiserum ile ilişkili olduğu tespit edilerek monoklonal komponent tanımlanmaktadır (Şekil 7 ve 8).

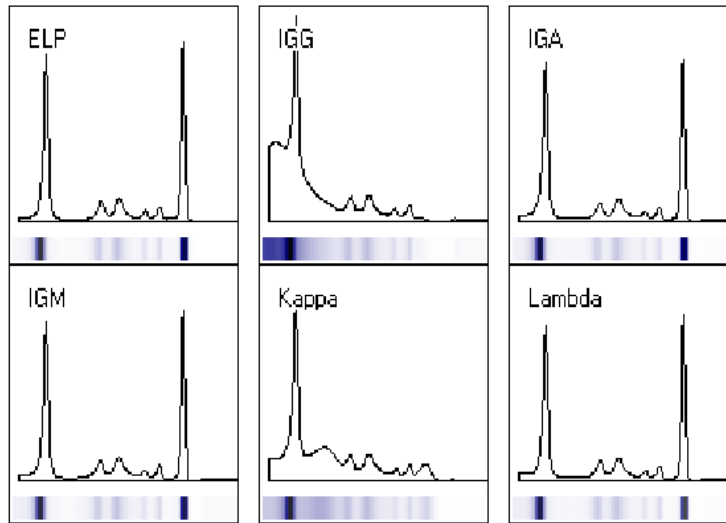


**Şekil 6.** A) Agaroz jel, normal serum IFE. B) Agaroz jel, serum IFE, monoklonal IgG-Kappa,



**Şekil 7.** Kapiller Elektroforez, normal serum IFE.





**Şekil 8.** Kapiller Elektroforez, serum IFE, monoklonal IgG-Kappa.

SPE sonuçlarının laboratuvar uzmanları tarafından yorumlanması ve rapor edilmesi gerekmektedir. SPE’de normal olmayan veya ön tanıya uymayan piklerin varlığında ayrıca normal SPE bulguları olduğu halde şüphe duyulan vakalarda IFE ve diğer incelemeler için klinisyenlere önerilerde bulunulması, gamopatilerin tanısında ve tiplendirilmesinde büyük önem taşımaktadır.

### LİPOPROTEİN ELEKTROFOREZİ

Lipoproteinler, lipitlerin kanda taşınmasını sağlayan, yapısal olarak protein (apolipoprotein veya apoprotein) ve lipit bileşenleri olan moleküllerdir. Ayrıca yağda eriyen vitaminler, çeşitli ilaçlar ve bazı enzimlerin taşınmasında da rol oynamaktadırlar. Lipoproteinler büyüklük, yoğunluk, protein ve lipid içeriklerine göre aşağıdaki gibi sınıflandırılmaktadırlar.

Lipoprotein	Yoğunluk (g/mL)	Çap (nm)	Lipid/Lipopr oranı	Elektroforez Bandı
HDL	1.063-1.210	4-10	50:50	$\alpha$
Lp(a)	1.040-1.130	27-30	75:27-64:36	$\alpha$ , Pre- $\beta$ arası
LDL	1.019 – 1.063	19-23	80:20	$\beta$
IDL	1.006-1.019	22-24	85:15	$\beta$ , Pre- $\beta$ arası
VLDL	0.95 – 1.006	27-70	90:10	Pre- $\beta$
Şilomikron	< 0.95	>70	99:1	Orijin

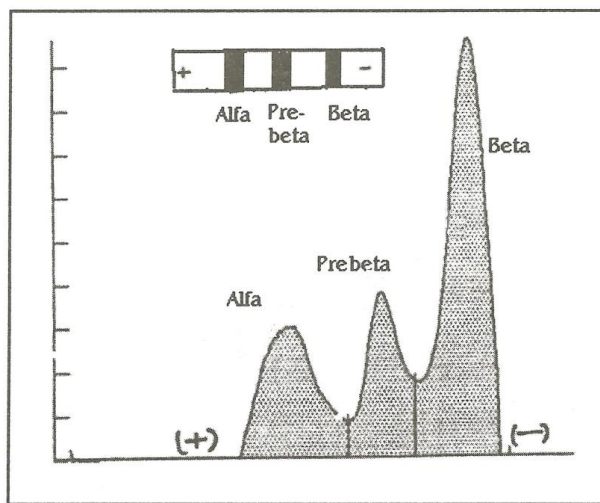
Lipoprotein elektroforezi plazma veya serumda yapılabilir. Kan örnekleri en az 12 saatlik açlığın ardından alınmalıdır. Plazma kullanılacaksa tercih edilen antikoagülan EDTA’dır. Lipoproteinler agaroz jel veya diğer (kağıt, selüloz asetat, poliakrilamid) taşıyıcı ortamlar üzerinde elektroforezle ayrıştırılabilmektedirler. Lipoprotein elektroforezi temel çalışma prensipleri ile protein elektroforezine çok benzer ancak burada bantların görüntülenmesinde lipide spesifik boyalar (Sudan black gibi) kullanılmaktadır. Lipoproteinlerin yapısında yer alan proteinlerin yükleri,

molekül ağırlıkları, uygulanan akımın şiddeti jel üzerindeki mobilitelerini değiştirmektedir. Lipoprotein elektroforezi, serum lipit ve lipoprotein düzeyinde bozukluk olan hiperlipoproteinemili (dislipoproteinemi) hastaların değerlendirilmesinde kullanılmaktadır. Hiperlipoproteinemiler aşağıdaki tabloda yer alan Friederickson sınıflaması ile tanımlanmaktadır.

Hiperlipoproteinemilerin Fredrickson Sınıflandırması:

Tip	Adlandırma	Artan Lipoprotein
I	Ailesel Şilomikronemi	Şilomikron
IIa	Ailesel Hiperkolesterolemi	LDL
IIb	Ailesel Kombine Hiperkolesterolemi	LDL, VLDL
III	Ailesel Disbetalipoproteinemi	IDL
IV	Ailesel Hiperlipemi	VLDL
V	Endojen Hipertrigliseridemi	Şilomikron ve VLDL

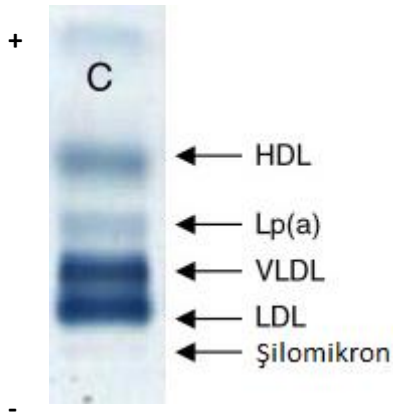
Bu tanımlamaya uyan hiperlipoproteinemili hastaların tanısı lipit ve lipoprotein profillerinin incelenmesi ile yapılabilir. Günümüzde lipit ve lipoprotein parametrelerinin her birinin kantitatif ölçümlerinin otomatize sistemlerde çok daha hızlı ve düşük maliyetlerde yapılabilmesi lipoprotein elektroforezinin kullanımını azaltmıştır. Son yıllarda yarı otomatize yeni sistemlerde, agaroz jel üzerinde daha kolay ve hızlı sonuç vermek mümkün olmuştur. Lipit değerleri normal olan serum örneklerinde elektroforez sonrası jel üzerinde  $\beta$  lipoprotein (LDL), pre  $\beta$  lipoprotein (VLDL),  $\alpha$  lipoprotein (HDL) bantları görülmektedir (Şekil 9).



Şekil 9. Lipoprotein elektroforezi.

IDL pre  $\beta$  ile  $\beta$  bandı arasında (*floating  $\beta$* ) yer alır. Şilomikronlar, serum trigliserit düzeyi çok yüksek olanlarda veya tok alınan örneklerde uygulama noktasında (orijin) görülebilir. Normal paternde görülmeyen Lp(a) fraksiyonu yeterince yüksek konsantrasyonlarda alfa ve pre-beta bantları arasında (*fast pre  $\beta$* ) yer alır (Şekil 10).

Lp(a) yapı olarak LDL'ye çok benzemesi ve reseptör düzeyinde LDL ile yarışması nedeniyle ateroskleroz gelişiminde rol oynamaktadır. Lp(a) üzerinde yer alan apo(a)'nın ise yapısal benzerliği nedeniyle plazminojenle yarıştığı ve fibrinolizisi inhibe ederek tromboza neden olduğu bilinmektedir. Hasta profilinde diğer lipoproteinler normal olmasına rağmen herediter geçiş gösteren Lp(a) yüksek düzeylerde olabilir. Bu durumun lipoprotein elektroforezi ile tespit edilebiliyor olması, olası bir ateroskleroz ve tromboz gelişiminden önce tedaviyi mümkün kılmaktadır. Kontrol edilebilir risk faktörleri içinde yer alan lipoprotein bozukluklarının gösterilmesi ve Lp(a) taraması koroner arter hastalıklarının önlenmesinde ve tedavisinde önemlidir.



**Şekil 10.** Plazma lipoproteinlerinin agaroz jel elektroforezi.

## İDRAR PROTEİN ELEKTROFOREZİ

Doç.Dr. Pınar Akan

Dokuz Eylül Ü. Tıp F. T. Biyokimya AD, İnciraltı, İZMİR ; pinar.akan@deu.edu.tr

Proteinlerin elektroforetik incelemesi 1950'li yıllardan beri tıbbi laboratuvarlarda hastalıkların tanısına yardımcı bir test olarak kullanılmaktadır. Elektroforetik analizler protein artışı ya da azalışı yanı sıra proteinlerin yapılarındaki değişimi değerlendirmeye olanak tanır. Ancak elektroforetik testlerin proteinlerin kantitatif analizine göre ek işlemler gerektirmesi nedeni ile nispeten zor olarak algılanması, yorum gerektirmesi, tıbbi laboratuvarlarda kullanımını olumsuz yönde etkilemiştir. Özellikle idrar protein elektroforezi hasta sonuç raporlarındaki sonuç yorumlama ve değerlendirme eksiklikleri nedeni ile serum protein elektroforezi kadar yaygın kullanım alanı bulamamıştır. İdrar protein elektroforez sonucunun uygun yorumlanması ile patolojik ve fizyolojik proteinürileri birbirinden ayırmak, protein atılım kaynakları hakkında fikir edinmek mümkündür. Genel olarak tıbbi laboratuvarlarda idrar protein elektroforezi sonucu iki ana başlıkta değerlendirilebilir;

- Semi-kantitatif olarak protein atılımının değerlendirilmesi
- Kalitatif olarak patolojik protein atılımının ve monoklonitenin değerlendirilmesi \*

Kullanılan destek materyallerine göre (sodyum dodesil sulfat-poliakrilamid jel (SDS-PAGE), selüloz asetat ya da agaroz jel vb) idrar protein elektroforez paternleri farklılıklar gösterebilir. Farklı tipteki protein atılım düzeyinin kantitatif olarak tespiti için nefelometrik ve immünolojik metotlar ile daha kesin sonuçlar alınabilirken, patolojik proteinüri tiplerinin belirlenmesi ve monoklonal atılımın tespiti için idrar protein elektroforezi kantitatif analiz metotları ve invaziv patolojik tanı metotlarına göre çok daha uygun bir seçenektir.

### Proteinüri

İdrarda protein atılımı ile karakterize böbrek fonksiyon bozuklukları sıklıkla glomerüler filtrasyon bariyerinin bozulması ya da tübüler disfonksiyon gibi nedenlerle karşımıza çıkar. Glomerüler filtrasyonu glomerüler yapının bütünlüğü ve hemodinamik faktörler yanı sıra proteinlerin molekül ağırlığı, boyutu / şekli, mevcut elektriksel yükü ve plazma konsantrasyonu etkiler. Fizyolojik koşullarda idrarda eser miktarda albumin ve tübüllerden sekrete edilen üromukoidler, kan grubu glikoproteinleri, eser miktarda enzim, immünglobulin, hormon vb protein/protein artıkları bulunur. Glomerüllerden geçebilen molekül ağırlığı 20 kDa altındaki mikro proteinlerin çoğunluğu tübüler reabsorbsiyona uğrar. İdrar ile protein kaybı sağlıklı bir yetişkinde günde tipik olarak 40-80 mg'dır ve fizyolojik koşullarda 150 mg'ı geçmemelidir. Bu eser miktarda atılan üriner proteinlerin ~%30-40'ı albumin iken, IgG, immünglobulin hafif zincirleri ve Ig A'nın total protein kaybının ancak sırası ile % 5-10, %5 ve %3'ünü oluşturduğu görülür.

### Patolojik proteinüriler ve elektroforez profilleri

Patolojik proteinüriler glomerüler, tübüler, pre-renal, miiks, ya da postrenal olarak sınıflanabilir. Proteinürinin kökenini değerlendiren Boylan sınıflamasına göre ise plazma kaynaklı, böbrek dokusundan köken alan (nefrojenik proteinüri) ve postrenal dokulardan köken alanlar şeklinde sınıflanabilir. Boylan sınıflamasına göre glomerüler, tübüler ve pre-renal proteinüriler plazma kaynaklı proteinüri sınıfına girmektedir. Proteinüri en sık glomerüler tipte görülür ve bu tip proteinüri de günde 2 gramın üstünde olan protein atılımının temel içeriği % 70 oranında albumin iken, diğer yüksek molekül ağırlıklı proteinler, transferin ve Ig G yaklaşık % 30 oranında bulunur. İdrar protein elektroforezinde albumin ve beta-2 globulin (transferin) bandı belirgindir.

Tubuler proteinüri ise alfa-1-mikroglobulin, retinol binding globulin gibi düşük molekül ağırlıklı proteinlerin atılımı ile karakterizedir. Alfa-1-mikroglobulin ve retinol binding globulin düzeylerinin tespiti tübülo intersitisiel hasarın şiddeti ile korelasyon gösterir. Tübüler böbrek hastalıklarında üriner total proteinin yaklaşık % 30'u albumin olup, kantitasyonu için klasik kimyasal metotların ölçüm limiti genellikle yetersiz kalmakta ve mevcut proteinüri tespit edilememektedir. Antibiyotikler ya da diğer tübülo-toksik etkenlere bağlı da görülebilen bu renal tübüler hastalıklar kolaylıkla tedavi edilebilir olması nedeni ile ayırıcı tanısı önemlidir. Elektroforez ile idrarda eser miktarda albumin ile klasik serum protein bantlarına karşılık gelmeyen çoklu bantlar görülür.

Miiks proteinüride ise yüksek ve düşük molekül ağırlıklı proteinler bir arada görülür. Postrenal proteinüri ,glomerüler proteinüri ile çok benzer özelliklere sahiptir. Sadece alfa-2-makroglobulin varlığı ile birbirinden ayırt edilebilir (Şekil 1-2 ve Tablo 1).

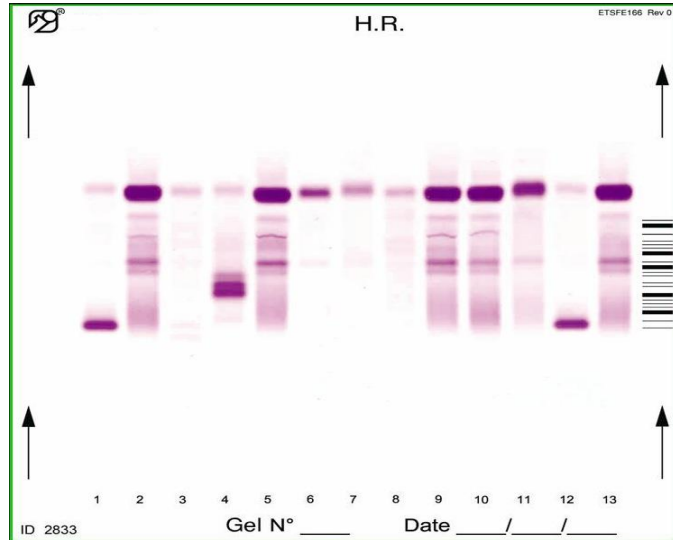
Böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda selektif proteinüri varlığının değerlendirilmesi, glomerüler seçicilik indeksinin hesaplanması ve glomerüler proteinürinin şiddetinin tespiti ile böbrek hastalığının geriye dönebilme olasılığı hakkında fikir edinilebilir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda eş zamanlı ölçüm yapılan örnekler için idrar albumin/protein oranının proteinüri ayırıcı tanısında iyi bir belirteç olduğu ve idrar protein elektroforezi ve immünfiksasyon sonuçlarının renal biyopsi sonuçları ile iyi bir korelasyon gösterdiği belirtilmektedir. Böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde idrar protein elektroforezinin daha etkin kullanılması için sonuç yorumlama ve standardizasyon konusunda daha çok çaba gösterilmelidir.

### Bence-Jones proteinürisi ve lizozimüri

Bence-jones proteinürisi (Prerenal proteinüri, *overflow/taşma*) monoklonal hastalıklarda immünglobulinlerin hafif zincirlerinin aşırı üretimi ve tübülo-intersitisiel geri emilim kapasitesinin aşılmasına sekonder böbrek hasarı sonucu görülür. Dirençli ağır proteinüri olgularında monoklonal gamopati benzeri hematolojik malignitelerin araştırılması gerektiği önerilmektedir. Bu ayırıcı tanı için serum/idrar protein elektroforezinde M protein bandı araştırılması yanı sıra immünfiksasyon elektroforezi tekniğinin kullanılması gerekir. Klinik laboratuvarlarda immünfiksasyon elektroforezi incelemesi ile monoklonal üretilen immünglobulinleri ve immünglobulin hafif/ağır zincirlerini kolaylıkla ve düşük protein atılımında bile belirlemek mümkündür. İdrar immünfiksasyon elektroforezi ile monoklonal hafif zincir atılımının tespiti Bence-Jones proteinürisi için en güvenilir ve duyarlı metotlardan biridir.

Lösemili hastalarda görülen lizozimüri Bence-Jones proteinürisi ile benzer mekanizma ile oluşur. Tespiti alışılmış idrar immunfiksasyon elektroforezi koşullarında migrasyon süresinin kısaltılması, jelle kim yapılan örnek miktarının değiştirilmesi gibi bazı modifikasyonlar gerektirir.

## İDRAR PROTEİN ELEKTROFOREZİ ÖRNEKLERİ



### Agaroz Jel Protein Elektroforezi

(Yüksek Çözünürlük )

Örnek 1 , 4 ve 12 : İdrar

Plazmatik (taşma) ve selektif glomerüler proteinüri

Örnek 2, 5,9,10,13 : Serum (referans)

Örnek 6: İdrar

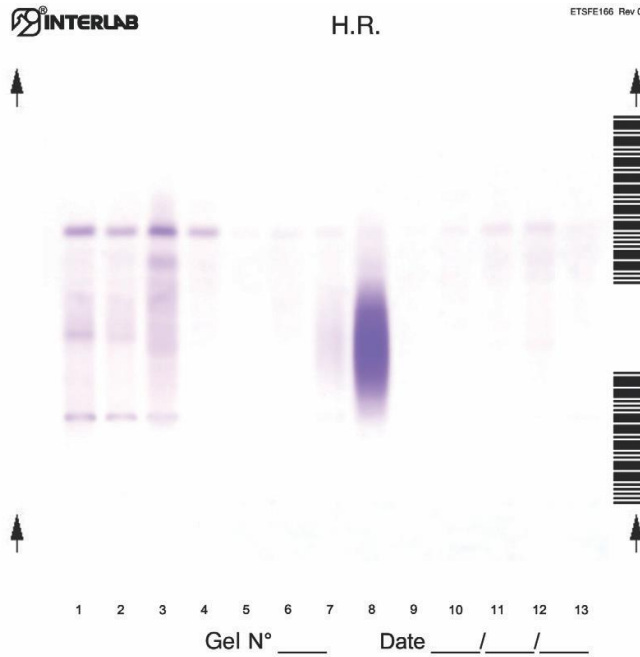
Selektif glomeruler proteinüri

Örnek 3 ve 7: İdrar

Fizyolojik proteinüri

Örnek 11: İdrar

Non-selektif glomerüler proteinüri



### Agaroz jel İdrar Protein Elektroforezi

(Yüksek Çözünürlük )

Örnek 1: Non-selektif glomeruler proteinüri

Örnek 3: Non-selektif glomerular ve (in-complete) tubular proteinüri

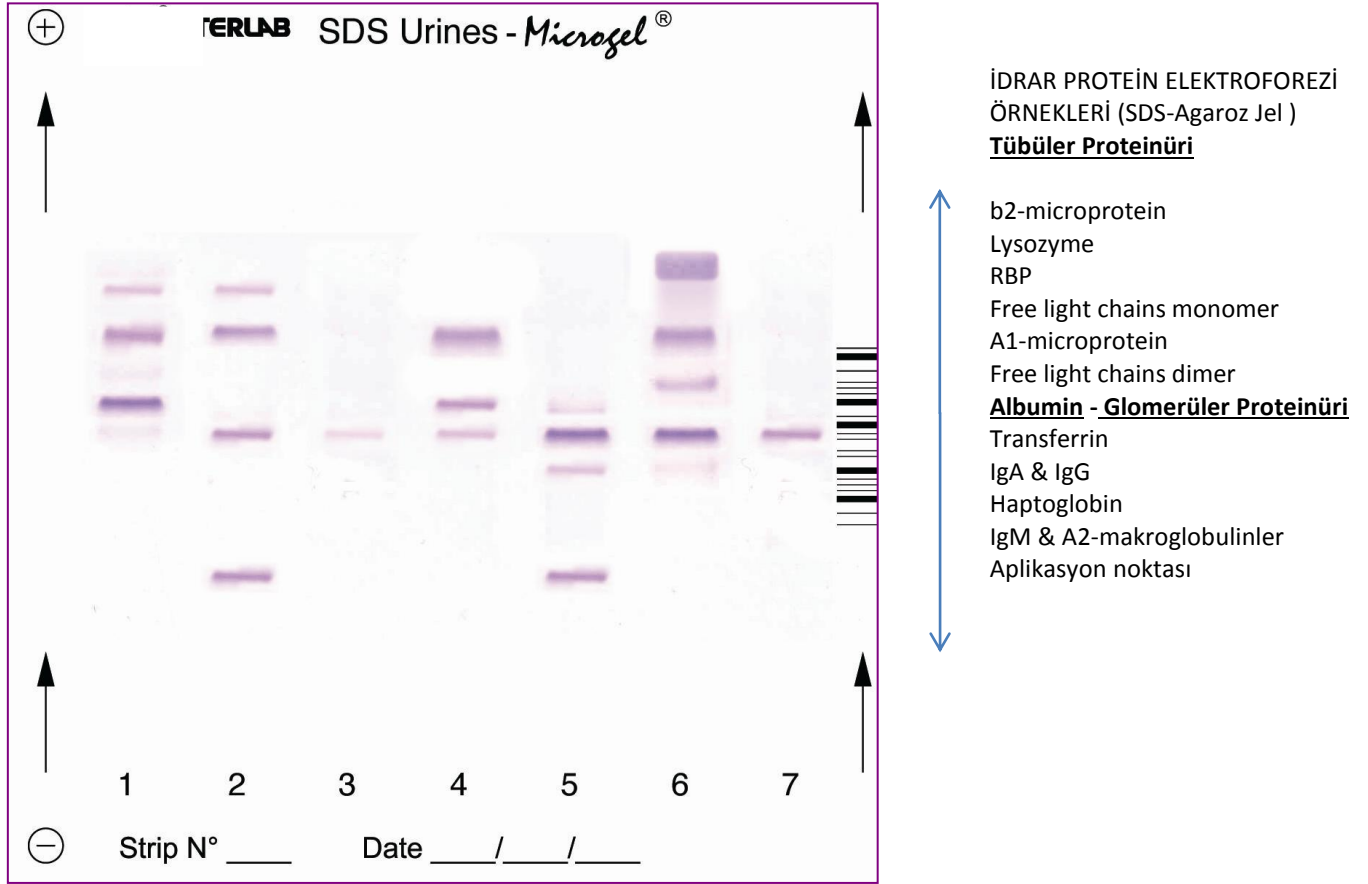
Örnek 4 : Selektif glomerüler proteinüri

Örnek 5-6: Fizyolojik proteinüri

Örnek 8: Uromukoid varlığı ile birlikte nefrojenetik proteinüri

Örnek 9 -10: Fizyolojik proteinüri

Şekil 1. Agaroz jel idrar protein elektroforezi ile gözlenen proteinüri tipleri



**Şekil 3.** SDS-Agaroz jel idrar protein elektroforezi ile gözlenen proteinüri tipleri. Örnek 1: Tübüler proteinuria; Örnek 2: Mikst proteinuria; Örnek 3: Fizyolojik proteinuria.

**Tablo 1.** Proteinürilerinin kaynağına göre sıklıkla gözlenen protein bantları

Normal Profil	Glomerüler Hastalık	Tubuler Hastalık	Miks Proteinüri
Albumin	Albumin	Albumin	Albumin
Transferrin	Transferrin	Mikroproteinler • α1-mikroprotein • α2-mikroprotein • β2-mikroprotein • RBP • Bence-Jones proteini ...vb	Transferrin ve Mikroproteinler
	İmmunglobulinler		İmmunglobulinler

**Kaynaklar**

1. Smith RE. et al. The value of simultaneous measurements of urinary albumin and total protein in proteinuric patients. *Nephrol Dial Transplant* 2012, 27: 1534–1541.
2. Maachi M. et al. Patterns of Proteinuria: Urinary sodium dodecyl sulfate electrophoresis versus immunonephelometric protein marker measurement followed by interpretation with the knowledge-based system MDI-LabLink, *Clin Chem* 2004, 50; 10 : 1834-1837.
3. Vavricka SR. et al. Serum protein electrophoresis: an underused but very useful test. *Digestion* 2009; 79:203–210.
4. McPherson: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd ed. 2011 Saunders, An Imprint of Elsevier , Chapter 19.
5. Inman Z. et al. Reporting of quantitative protein electrophoresis in Australia and New Zealand: a Call for standardisation. *Clin Biochem Rev* 2009; 30: 141.
6. Electrophoresis Atlas of Serum proteins, Serum Immunofixation, Urine Proteins and Cryoglobulins, A. Ciapini, Interlab Italy.



## MONOKLONAL PROTEİNLERİN TANIMLANMASI

### (İMMÜNTİPLENDİRME)

Doç. Dr. Mehmet Şeneş

senesmehmet@yahoo.com

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü

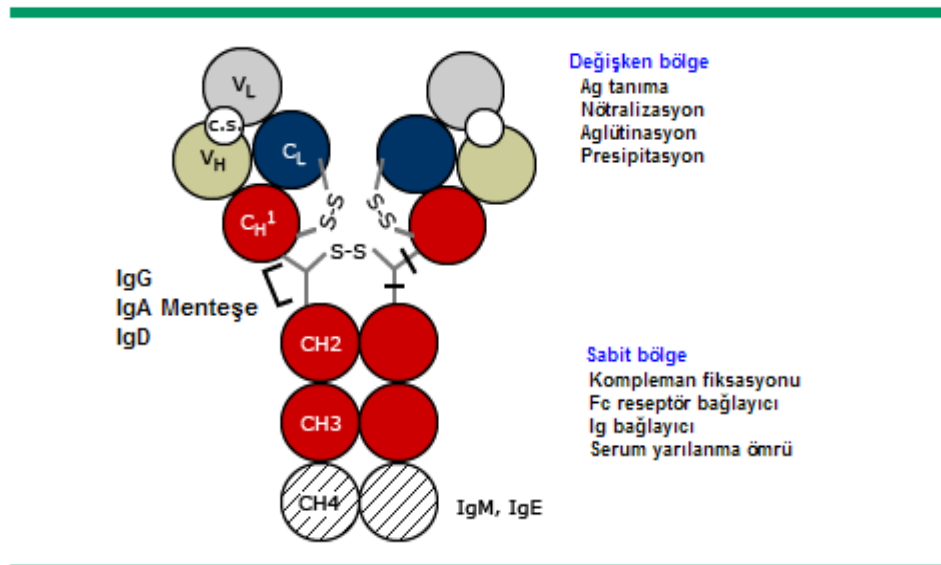
### GİRİŞ

İmmünglobülinler (Ig) antijeni tanıyarak ortadan kaldıracak mekanizmayı başlatan proteinlerdir. Kemik iliğinde B serisi hücrelerin son şekli olan plazma hücreleri tarafından sentezlenirler ve salgılanırlar. Gelişmiş B lenfositleri özellikle kanda ve lenf nodüllerinde bulunurlar.

Ig'ler iki ağır polipeptid zincirinden oluşur. Bir çift ağır zincir, özdeş iki hafif zincirle [kapa ( $\kappa$ ) veya lambda ( $\lambda$ )] birleşerek tam (intact) Ig molekülünü oluşturur (Şekil 1. İmmünglobulin yapısı).

Hafif zincirler (Light chains) molekül ağırlığı düşük olan zincirlerdir. Kapa ( $\kappa$ ) veya lambda ( $\lambda$ ) olmak üzere iki tipi vardır. Bir Ig molekülündeki iki hafif zincir birbirine özdeştir, biri diğerinden farklı olamaz. Ağır zincirler (Heavy chains) molekül ağırlığı yüksek olan, uzun zincirlerdir. Beş Ig çeşidinde (IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE) ağır zincirler birbirinden farklı yapıdadır.

### İMMÜNGLOBULİN YAPISI



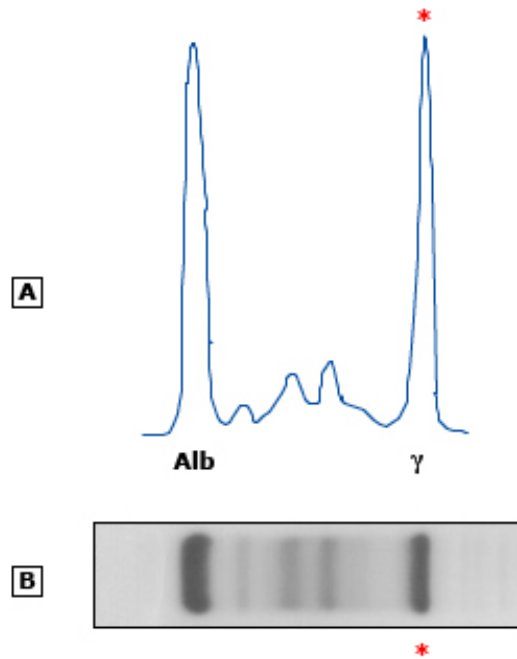
Şekil 1. İmmünglobulin yapısı.

Klinik olarak Ig artışı monoklonal veya poliklonal olabilir. Monoklonal Ig'ler yapısal olarak benzerdir ve artışları Ig üreten lenfoid hücrelerin tek bir klonunun çoğalmasıyla meydana gelir. Poliklonal Ig'ler ise aynı bireyde farklı Ig üreten lenfoid hücrelerinin birkaçının çoğalmasıyla ortaya çıkarlar ve yapısal olarak birbirinden farklılık gösterirler.

Monoklonal gamopatiler (paraproteinemiler veya disproteinemiler), kontrolsüz olarak çoğalan plazma hücresinin ürettiği Ig artışı ile karakterize hastalıklardır. Bu hastalık grubunda plazma hücrelerinin bir klonu yapısal olarak aynı tip Ig sentezler. Plazma hücrelerinin bir klonunun herhangi bir sebeple kontrolsüz olarak çoğalması sonucu üretilen bu proteinin (M-proteini, monoklonal protein, M-komponent) serum konsantrasyonu artar ve serum protein elektroforezinde dansitometrik olarak dar ve dik pikin ortaya çıkmasına neden olur (Şekil 2).

M-proteini tam (intact) Ig (yani hem ağır hem de hafif zincirleri içeren) olabileceği gibi, sadece hafif zincirlerden [hafif zincir miyelomasi, hafif zincir depo hastalığı, AL (hafif zincir) amiloidozu] veya nadiren sadece ağır zincirlerden de (yani ağır zincir hastalığı, ağır zincir depo hastalığı) oluşabilmektedir.

### Serum Protein Elektroforezinde (SPE) Monoklonal Örüntü



**Şekil 2.** A. Serum elektroforez örüntüsünün dansitometreden elde edilen görüntüsünde gama bölgesinde, albümin piki kadar yüksek, uzun, dar monoklonal bant (\*) görülmektedir. B. Dansitometrik görüntünün alındığı agaroz jelde, gama bölgesinde görülen yoğun bant (\*) monoklonal protein varlığına işaret etmektedir.

## M-PROTEİN ARTIŞI İLE İLİŞKİLİ KLİNİK DURUMLAR

Serum veya idrarda M-protein varlığı öncelikle klonal plazma hücre bozuklukları veya lenfoproliferatif hastalıkların (Tablo 1.) varlığını düşündürür. Bazı vakalarda M-proteini oluşturan klonal süreç maligndir ve kemik, lenf nodları, karaciğer, dalak ve diğer organlara infiltre olan neoplastik hastalık (ör; multiple miyeloma, soliter plazmasitoma, Waldenström makroglobülinemisi gibi) bulguları ile ilişkilidir. Diğer vakalarda M-proteini, premalign klonal gelişmeden üretilir ve herhangi bir semptomu neden olmaz [ör; önemi belirlenmemiş monoklonal gamopati (monoclonal gammopathy of undetermined significance, MGUS)].

**Tablo 1. Monoklonal gamopati varlığı ile ilişkili hastalıklar.**

<b>Plazma hücre hastalıkları</b>
Önemi Belirlenmemiş Monoklonal Gamopati (MGUS)
Önemi Belirlenmemiş Biklonal Gamopati
İdiyopatik Bence Jones proteinürisi
POEM sendromu, Osteosklerotik miyeloma
Castelman hastalığı
AL (hafif zincir) amiloidozu, hafifi zincir ve ağır zincir depo hastalıkları
Multiple miyeloma, alevlenmiş multiple miyeloma
<b>B-hücre limfoproliferatif hastalıklar</b>
Non-Hodgkin lenfoma
Kronik lenfositik lösemi
Lenfoplazmatik lenfoma (Waldenström makroglobülinemisi)
Post-transplant monoklonal gamopatileri
Ağır zincir hastalıkları
<b>Konnektif doku hastalıkları</b>
SLE
Romatoid artrit
Sjögren sendromu
Skleroderma
Psöriyatik artrit
(Polimiyalji romatika)
<b>Enfeksiyonlar</b>
Hepatit C enfeksiyonu
HIV/AIDS
<b>Dermatolojik hastalıklar</b>
Sklerödem (skleromiksödem), Lichen miksödemi
Difüz plane xanthomatosis

Ürtiker ve IgM (Schnitzler sendromu)
Subkorneal pustular dermatoz
Nekrobiyotik ksantogranüloma
Piyoderma gangrenosum
<b>Diğer hastalıklar</b>
Kazanılmış von Willebrand hastalığı
Kazanılmış C1 esteraz inhibitör eksikliği (anjioödem)
Eozinofilik fasilit
Kriyoglobülinemi, kriyofibrinojenemi
Miyeloblastik sendrom
Kronik nötrofilik lösemi
Sensörimotor nöropati, MGUS ile
Kapiller leak sendromu
T-hücre büyük granüllü lenfositik lösemi
Soğuk aglütinin hastalığı

### PLAZMA HÜCRE BOZUKLUKLARINDA TANI

Multidisipliner bir yaklaşım gerektirir. Bunlar Tablo 2’de detaylandırılmıştır.

**Tablo 2. Plazma hücre bozukluklarının tanısında kullanılan multidisipliner teknikler.**

Disiplin	Prosedür
Klinik değerlendirme	Aktif veya asemptomatik miyeloma MGUS
Biyopsi	Miyeloma için kemik iliği Amiloidoz için doku Soliter plazmasitoma
Radyoloji	Kemik incilmesi veya miyelomada litik lezyonlar Amiloidozda kardiyak USG
<b>Klinik Laboratuvar</b>	Hücre sayımı ve anemi için hematolojik değerlendirme Hiperkalsemi, hiperproteinemi ve böbrek fonksiyonları için klinik kimya Proteinüri ve böbrek fonksiyonları için idrar analizi <b>Tanıyı doğrulamak, M-protein tipini sınıflandırmak, tümör yükünü belirlemek, hastalık progresyonun ve tedavinin takibi için elektroforez (SPE, İPE, SİFE ve İİFE).</b> İmmüno-kimyasal ölçümler. Kriyoglobülineminin değerlendirilmesi

### M-PROTEİN VARLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİNDE YARDIMCI OLAN BİYOKİMYASAL TESTLER

Serum ve idrarda M-protein varlığının değerlendirilmesi ve tanısında etkin olan biyokimyasal testler Tablo 3'te gösterilmiştir.

**Tablo 3. M-protein varlığının değerlendirilmesi ve tanısında katkı sağlayan serum ve idrar biyokimya testleri.**

<b>Serum testleri</b>	
Total serum proteini	Artmış serum total protein düzeyleri ile artan protein tipi (yani; albümin mi, immünglobülin ve diğerleri) ayırt edilemediği gibi monoklonal artışlar da poliklonal artışlardan ayırt edilemez.
Serum protein elektroforezi (SPE)	SPE, serum proteinlerini ayırmak ve kanda monoklonal protein varlığını tespit etmek için kullanılır. Monoklonal protein varlığı SPE ile tespit edildikten sonra serum immünfiksasyon, serum immünelektroforez veya serum immünçakarım kullanılarak doğrulanmalıdır.
Serum immünfiksasyonu	Bu yöntemde monoklonal immünglobülin artışını poliklonalden ayırt etmek için hafif ve ağır zincirlere karşı antikorlar kullanılırken ilgili immünglobülin tipini belirlemek için de özgül antikorlar kullanılır. Bu test ile M-proteini kuantifiye edilmez.
Serum serbest hafif zincir (FLC) ölçümü	Serum FLC ölçümü serumdaki monoklonal serbest hafif zincirlerin (kapa veya lambda) düşük konsantrasyonlarının ölçülebildiği antikor-dayalı sistemdir. Bu ölçüm hafif zincirlerin tespitinde idrar immünfiksasyondan daha duyarlıdır; bununla birlikte sonuçlar renal yetmezlik varlığında etkilenir.
İmmünglobulinlerin ölçümü	Bu teknikle hipogamaglobülinemi veya hipergamaglobülinemi tespit edilebilir ancak monoklonallikleri hakkında bilgi vermez. Artmış düzeyler poliklonal veya monoklonal olabilir; klon özelliklerinin SPE veya immünfiksasyon ile değerlendirilmesine ihtiyaç duyulur.
<b>İdrar testleri</b>	
Şeritlerle analiz	İdrarın şeritlerle analizi, idrar proteininin değerlendirilmesinde pek çok hastalıkta tarama testi olarak kullanılmasına rağmen, bu testler Bence Jones proteinlerin (serbest kapa veya lambda hafif zincirler) varlığını belirleyemezler.
İdrar protein elektroforezi (İPE)	İPE idrar proteinlerini ayırmakta kullanılır. M-proteinlerini idrarda tespit etmek için 24 saatlik idrar örneği gereklidir.
İdrar immünfiksasyon (İİFE)	İdrar immünfiksasyon elektroforezinde poliklonal ve monoklonal immünglobülin artışlarını ayırt etmek için hafif zincir komponentlerine karşı spesifik antikorlar kullanılır. İdrar immünfiksasyonu, İPE'den daha duyarlı olmasına rağmen monoklonal protein konsantrasyonunu belirlemede faydalı değildir.

## Serum İmmüfiksasyon Elektroforezi (SİFE)

M-protein varlığının taranmasında SPE'yi kullanışlı bir başlangıç prosedürüdür. Ancak iki sakıncası vardır.

- Birincisi düşük M-protein konsantrasyonlarında yeterince duyarlı değildir. Böyle durumlarda M-protein varlığı gözden kaçabilir veya bariz bulunan bir M-proteini immünglobülinlerle veya diğer proteinlerle poliklonal bir artış varmış gibi bir görüntüye neden olabilir.
- İkincisi eğer bir M-proteini varsa, SPE ile immünglobülinin hafif ve ağır zincir sınıfı tanımlanamaz.

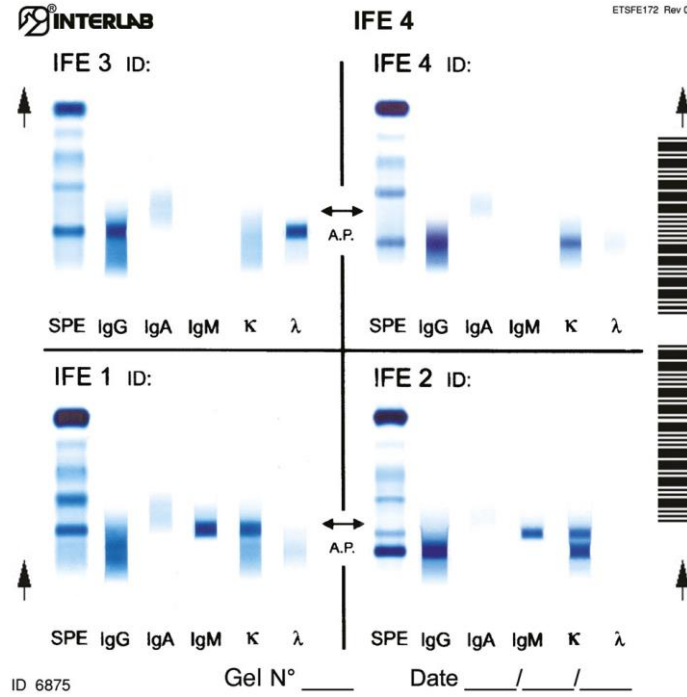
Bu nedenlerle laboratuvarlar M-protein varlığını göstermek ve tipini sınıflandırmak için İFE yapmalıdırlar. İFE hızlı ve kolay yorumlanabilen bir yöntemdir. Bu nedenle M-proteinlerinin gösterilmesinde ve tanımlanmasında yaygın olarak kullanılan bir teknik haline gelmiştir. Bu yöntemde protein elektroforezi ve immünpresipitasyon teknikleri bir araya getirilmiştir. İlk olarak 1964 yılında Alfonso tarafından tanımlanmıştır. İFE için birkaç ticari kit olmasına rağmen bunların metodolojilerindeki detaylarda farklılık görülmektedir. Prensipleri aynıdır.

IFE serumdaki proteinlerin separasyonunu ve ardından IgG, IgA, IgM, IgD ve IgE ile  $\kappa$  ve  $\lambda$  hafif zincir proteinlerine karşı spesifik antiserum kullanılarak tespit edilmelerine dayanan tekniktir. Eğer örnekte M-protein varsa net bir bant şeklinde çökecektir.

Geleneksel immüfiksasyonda hasta serumu en az 5 farklı bölümde elektroforeze tabi tutulur. Serum proteinlerinin elektroforetik ayrılma işleminden sonra bölümlerin her biri farklı monospesifik antikor ile örtülür. Genellikle üç tanesi ağır zincirler için iki tanesi de hafif zincir komponentleri içindir (yani; sırasıyla anti gamma, anti mu, anti alfa, anti  $\kappa$  ve  $\lambda$ ). Proteinlerin presipitasyonu yani antijen-antikor bağlanması gerçekleşir, bağlanmayan fraksiyonların uzaklaştırılması için yapılan yıkamayı takiben geriye kalan immünpresipitatların boyanması sağlanır (Şekil 3.). Anti-M proteini immüfiksasyonda keskin, iyi tanımlanabilen tek bir ağır zincir sınıfı ile bu immünglobülinle benzer mobilite özellikleri gösteren keskin, iyi tanımlanabilen  $\kappa$  veya  $\lambda$  hafif zincirlerinden sadece birinin anti-serumu ile reaksiyon veren hafif zincirle karakterize edilir.

### *İFE analizinde temel basamaklar*

- İFE analizini gerçekleştirmek için hasta serum veya konsantre edilmiş idrar örnekleri agaroz jel üzerinde bulunan, 6 farklı bölmedeki uygulama noktalarına uygulanır. Bazı prosedürlerde hasta serumları jele direkt uygulanırken bazılarında serumlar jele uygulanmadan önce dilüe edilmelidir (çoğunlukla dilüsyonda IgG için 1:10, IgA ve IgM için 1:2 veya 1:3, kapa hafif zincirler için 1:8, lambda hafif zincir için 1:4 oranları kullanılmaktadır). Konsantre edilen idrar örnekleri için her prosedürde farklı bir protein konsantrasyonu istenmektedir (son protein konsantrasyonu 5 g/L olmalıdır gibi).



**Şekil 3.** Geleneksel serum İFE 5 farklı bölümden oluşur. SPE, IgG, IgA, IgM, κ ve λ.

- Daha sonra majör protein gruplarının ayrılması için elektroforeze tabii tutulurlar.
- Elektroforez sonrasında bu bölümlerden bir tanesi tüm proteinleri jele fiske etmek için kullanılan kimyasal fiksatif solüsyonu ile muamele edilerek, örnekteki referans elektroforez örüntüsünü oluşturacak görüntü elde edilir.
- Diğer bölümler ise immünglobülinlerin spesifik ağır (IgG, IgA ve IgM ve hafif zincir (κ ve λ) anti-serumları ile işleme tabii tutularak bunların agaroz jelde presipite olmaları (immünolojik olarak fikse olmaları) sağlanır.
- Presipite olmayan diğer proteinler yıkanarak uzaklaştırılır.
- Daha sonra jel, görünür fikse olmuş bantlar elde etmek için boyanır.
- Referans örüntü ile karşılık gelen bölgede fikse olmuş bantların karşılaştırılması ile spesifik protein tanımlanır.

#### *İFE'nin Yorumlanması*

1. Agaroz jelin ilk sütununda yer alan SPE'inde α<sub>2</sub>, β, ve γ- globülün bölgelerinde monoklonal yapıda bir bant olup olmadığı değerlendirilmelidir.
2. IgG, IgA ve IgM bölgelerinde sınırları belirgin bir bandın olup olmadığı kontrol edilir. Eğer bant varsa, ilk sütunda yer alan protein elektroforez örüntüsü ile aynı bölgede olup olmadığı değerlendirilir.

3. Bazen aynı immünglobülün bölgesinde farklı yerlerde göç eden birden fazla bant olabilir. Bu durumda bu örüntünün biklonal bir gamopatiye ait olup olmadığı değerlendirilir. Bu görüntünün eğer immünglobülinlerin polimerizasyonundan kaynaklandığı düşünülürse, örnek ditiotritol veya  $\beta$ -merkaptotanol gibi indirgeyici ajanlarla muamele edilir. Böylece poimerizasyonda var olan disülfid bağları yıkılır. Örnek tekrar İFE'ine tabii tutulduğunda eğer elde edilen bantlar monoklonal ise, net olarak tek bir bant şeklinde görülür.
4. Benzer şekilde  $\kappa$  ve  $\lambda$  hafifi zincir bölgeleri de, sınırları belirgin bandın varlığı yönünden değerlendirilir. Bu bandın da ilk sütunda ve ağır zincir bölgelerinde var olan sınırları belirgin bant ile aynı bölgede olup olmadığı değerlendirilir.  
Bazen sadece IgG, IgA ve IgM bölgelerinde sınırları belirgin bantlar elde edilebilir. Böyle bir durumda ağır ve hafif zincir hastalıkları yönünde karar vermeden önce olabilecek hata kaynaklarını değerlendirmek gerekir.

#### *IFE'DE dikkat edilmesi gereken hususlar*

**Yanlış negatif sonuçlar.** Örnek dilüsyonu en sık karşılaşılan problemdir. Dikkat edilmesi gereken düşük düzeyde M-protein varlığını veya immünglobülinlerde çok büyük bir artışı (monoklonal veya poliklonal) tespit edebilen optimal dilüsyonu belirleyebilmektir. Eğer hastanın serumu fazla dilüe edilmiş ise, küçük M-protein bantları yanlışlıkla atlanabilir.

Eğer immünglobülinlerin herhangi birinde aşırı bir artış varsa bir "antijen fazlası" etkisi oluşabilir. Bu durumda meydana gelecek immünkompleksler yıkama ile uzaklaştırılacağından beklenenden daha düşük Ig bandı elde edilecektir. Serumdaki Ig konsantrasyonu yaklaşık 100 mg/dL olacak şekilde dilüsyon yapıldığı zaman antiserumlar ile optimal immünpresipitasyon sağlanabileceği belirtilmektedir. Yapılacak dilüsyon oranını belirlemenin en kolay ve en ekonomik yolu hasta örneğinde önce SPE' ini değerlendirmektir. Bu durum İFE'den önce SPE'nin yapılması gerektiğinin de bir sonucudur. SPE' de elde edilen gama bölgesi IgG dilüsyonu için olası oranın ne olacağı konusunda fikir verici olur. Lenfoproliferatif hastalıkla birlikte hipogamaglobulinemisi olan bir hastanın örneğinde, SPE'inde gama bandında küçük bir M-protein örüntüsü görülürse, serumu sıklıkla kullanılan 1:10 oranı yerine sadece 1:2 dilüe etmek yeterli olacaktır.

**Küçük (bellibelsiz, ince) monoklonal protein bantlarının rapor edilmesi.** İFE'ni değerlendirirken karşılaşılabileceğimiz diğer bir problem çok küçük (bellibelsiz, ince) monoklonal protein bantlarının nasıl yorumlanması gerektiğidir. Bu bantlar genellikle 50 mg/dL'den düşük konsantrasyonlara sahiptirler ve klinisyene de küçük (bellibelsiz veya ince) bir bant olarak rapor edilmelidirler. Bu gibi durumlarda monoklonal serbest hafif zincirlerin değerlendirilmesi için İİFE değerlendirilmesi veya serum veya idrarda serbest hafif zincir çalışması önerilebilir.

**Kontrol serumunun olmaması.** İFE' de karşılaştığımız problemlerden bir diğeri ise, örnekteki immünglobülinlerin presipitasyonunu karşılaştıracak aynı jel üzerinde çalışılan bir kontrol serumunun olmamasıdır. Bu durum, uygun dilüsyonun seçilmesinde karşılaşılabileceğimiz bir diğer problemdir. Bununla birlikte SPE için kullanılan bölümde yer alan immünglobülinlerin pozisyonunu kalite kontrol amaçlı kullanabiliriz. Normal bir SPE örüntüsünde IgA genellikle beta bölgesinde; IgM orijine yakın; IgG ise gama bölgesinde presipite olur.

**Yalancı-pozitif sonuçlar.** Hasta serumunda bulunan diğer proteinler ile kullanılan antiserumun etkileşmesi yalancı pozitif sonuçların alınmasına neden olabilir. Örneğin IgM' e karşı kullanılan



antikor, C3 proteini ile reaktiviteye sahip olabilir. Böyle bir durumda  $\beta$ -2 bölgesinde, M-proteini varmış gibi yanlış pozitif sonucun alınmasına neden olacaktır.

**Sadece  $\kappa$  ve  $\lambda$  bantlarının görülmesi.** İFE'de ağır zincirlerde bant görülmeksizin sadece hafif zincir  $\kappa$  ve  $\lambda$  monoklonal gamopatisi, ender görülen IgD veya IgE monoklonal gamopatisi ile ilişkili olabilir. Yapılacak IgD ve IgE antiserumlarını içeren İFE ile eğer hastada herhangi bir ağır zincir bandı elde edilmezse o zaman hafif zincir hastalığından söz edilebilir.

### **İdrar İmmüfiksasyon Elektforezi (İİFE)**

Monoklonal gamopatilerin çoğu serum analizleri ile saptanıp, karakterize edilip, izlenebilirken, bazı proliferatif plazma hücre hastalıklarında sadece serbest hafif zincir fragmanları sentezler ve salgılar. Klonal plazma hücrelerinin bu ürünleri çok küçük moleküler ağırlığa sahip olduğundan kandan süratle temizlenirler ve idrarla atılırlar (Bence-Jones proteinürisi). Bu hastalıkların tanısının konulması ve/veya izlenmesi için idrar örneklerinin zorunlu olarak çalışılması gerekir. Primer amiloidoz gibi hastalıklarda monoklonal hafif zincirler serum İFE ile %80-85 duyarlılıkla tespit edilebilir. İdrar örneğinde İFE çalışılması bu duyarlılığı %90-95'e yükseltir.

Serum ile karşılaştırılacak olursa idrar total protein içeriği dilüe olduğundan idrarın çalışılmadan önce filtre edilmesine ihtiyaç duyulur. Çok düşük konsantrasyonlarda bulunabilen BJP için idrar örneklerinin, idrarda bulunan protein konsantrasyonu göz önünde bulundurularak, 10-250 katı kadar konsantre edilmesi gerekebilir.

### **İdrar İFE ile İlişkili Problemler**

24 saatlik idrar örnekleri İİFE için tercih edilmelidir. Sabah ilk idrar da yeterli olabilir, ancak rastgele idrar örnekleri kullanılmamalıdır.

İdrar örneklerinin mekanik konsantrasyonu sırasında çok geniş aralıkta (0.1 ve 20 g/L gibi) protein konsantrasyonları elde edilebileceğinden İFE'de yüksek konsantrasyondaki BJP'leri üst üste gelebilir ve yorumu zorlaştırabilir. Böyle bir durumda örneğin dilüe edilerek İFE'nin tekrarlanmasıyla daha tanımlayıcı örüntüler elde edilebilir.

BJP'leri antiserum ile kendine özgü bağlanma özelliğiyle etkileşir. Sonuç olarak çok yüksek konsantrasyonda olsa bile çok zayıf reaksiyon sonucu İİFE' de belli belirsiz veya hiç bant tespit edilmeyebilir. Böyle bir durumda eğer İPE'inde bir bant tespit edilmişse, negatif sonuç vermeden önce, örneğin, farklı kaynaktan sağlanacak ikinci bir antiserum ile çalışılması uygundur.

İİFE' indeki bir diğer zorluk BJP'lerinin tesadüfi olarak tam (intact) M-komponentleri ile göç etmesidir. Bu durumda serbest ve bağlı olan BJP bantları ayırt edilemeyebilirler. Böyle bir durumda da dilüsyon çalışmaları ile net ayırım sağlanabilir.

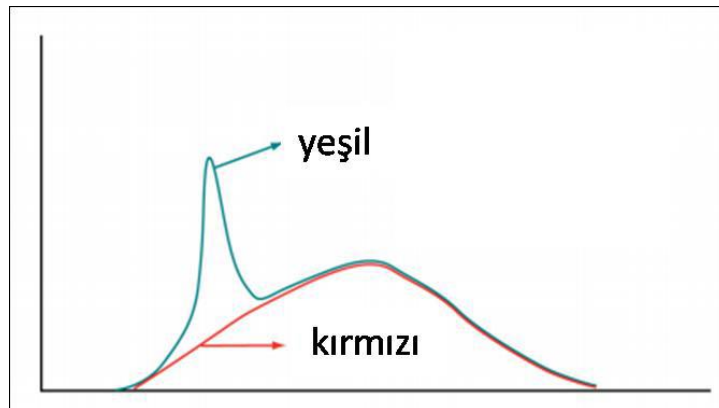
## İmmün-çıkartma (Immunosubstraction) Yöntemi ile Monoklonal Gamopatilerin Kapiller Elektroforez ile Tespiti

Kapiller elektroforez proteinlerin agaroz jelsiz ortamda ayrılmasını sağlayan güçlü bir tekniktir. Ayırma işlemi erimiş silikadan (fused silica'dan) oluşan dar çaplı kapillerler içinden geçen sıvı tampon sistemi ile gerçekleştirilir. Örnekler dar kapillerler içinden geçerken 200 nm'de yapılan ölçümler nedeniyle, herhangi bir boyama işlemi yapmaksızın direkt protein ölçümü gerçekleştirilir. Bu teknik yüksek etkinliği, kısa analiz süresi, ucuz olması, az numune hacmi ile çalışılması, az miktarda çözelti hacmine ihtiyaç duyması ve düşük tekrarlanabilirliği nedeniyle klinik laboratuvarlarda yaygın kullanım alanı bulmaktadır. Monoklonal gamopatilerin tanısında da kapiller elektroforez kullanılabilir. Bu amaçla gerçekleştirilen çalışmalarda immün-çıkartma yönteminden faydalanılır.

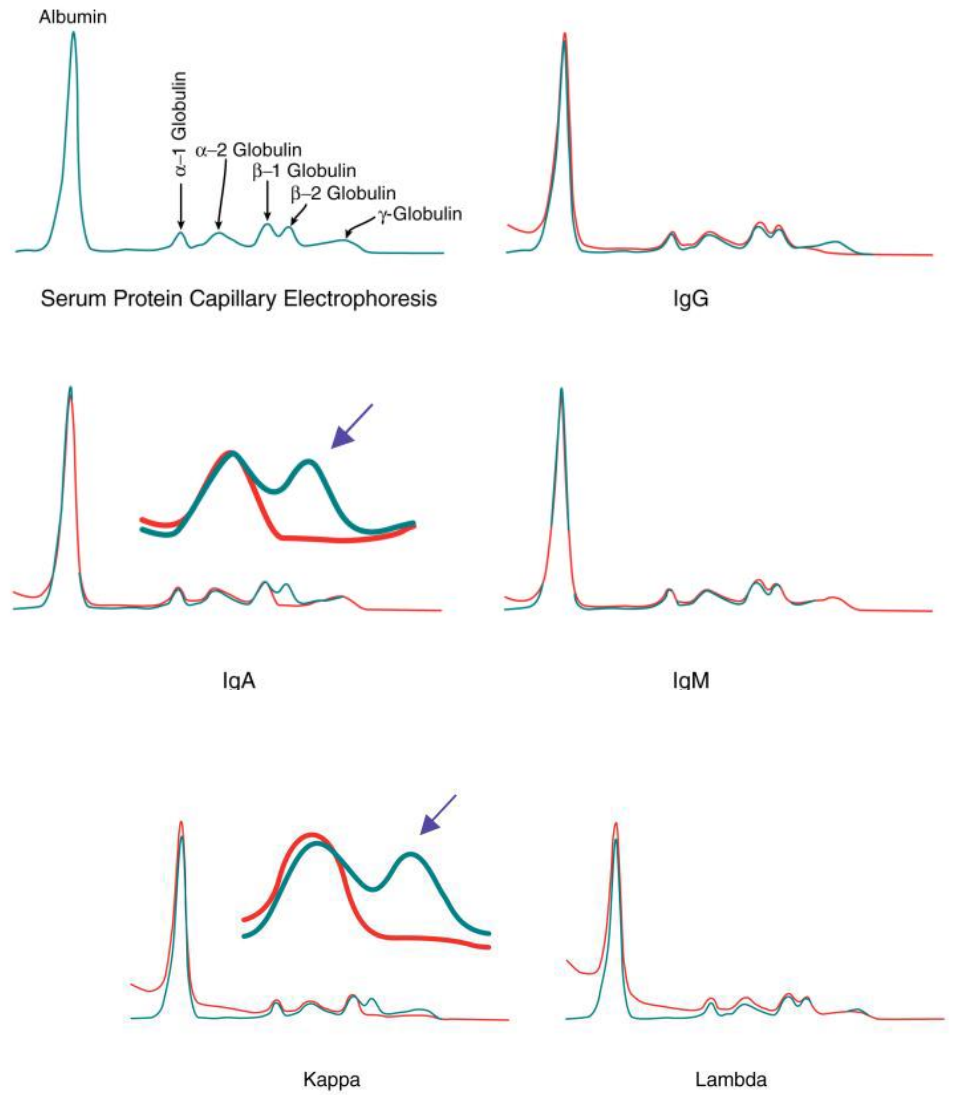
Kapiller elektroforez, immün-çıkartma tekniğiyle birleştirilerek monoklonal immünglobülinlerin tanısında kullanılmaktadır. Bu yöntemde serum örnekleri öncelikle spesifik antikorlarla (spesifik antiserumlarla çöktürülerek veya antikor kaplı sefaroz boncuklar ile) inkübe edilerek araştırılacak olan immünglobülin veya hafif zincirin ortamdan uzaklaştırılması sağlanır. Her bir zincir grubu için ayrı işlem yapılması gerekir. Daha sonra işlem görmüş serum örneği kapiller elektroforez ile çalışılır. Elde edilen örüntü işlem görmemiş serum örneği örüntüsü ile karşılaştırılır.

Monoklonal komponentlerin tanımlanması işlem görmemiş serum örneğinde tespit edilen anormal pik örüntülerinin, işlem görmüş örnekte kaybolması ile gerçekleştirilir. Referans örüntü hastanın işlem görmemiş örneğinden elde edilen kapiller elektroforez örüntüsüdür .

**Örnek:** Aşağıdaki örnekte IgA- monoklonal protein içeren bir serum örneği anti-κ antikorları ile inkübe edildikten sonra serum örneği kapiller elektroforeze tabii tutulduğunda monoklonal pikin kaybolduğu görülür (Şekil 4 ve 5).



**Şekil 4.** Kapiller elektroforez ile immün çıkarma. Yeşil renkli grafik kapiller elektroforez taramasını, kırmızı renk ise kapiller immün tiplmeyi gösterir.



**Şekil 5.** Kapiller elektroforezde çalışılan immün-çıkarma tekniğiyle tespit edilmiş IgA κ monoklonal gamopati.

#### KAYNAKLAR

1. McPherson RA, Pincus MR: Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Saunders Elsevier, 21. Edition. 2007
2. Katzmann JA, Clark R, Wiegert E, et al. Identification of monoclonal proteins in serum: a quantitative comparison of acetate, agarose gel, and capillary electrophoresis. Electrophoresis 1997; 18:1775
3. International Myeloma Working Group. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. Br J Haematol 2003; 121:749.
4. Kyle RA, Robinson RA, Katzmann JA. The clinical aspects of biconal gammopathies. Review of 57 cases. Am J Med 1981; 71:999.

5. Keren DF, Alexanian R, Goeken JA, Gorevic PD, Kyle RA, Tomar RH. Guidelines for clinical and laboratory evaluation of patients with monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med* 1999;123:106-107.
6. Attaelmannan M, Levinson SS. Understanding and identifying monoclonal gammopathies. *Clin Chem* 2000;46: 1230-38.
7. Katzmann JA, Clark R, Wiegert E, et al. Identification of monoclonal proteins in serum: a quantitative comparison of acetate, agarose gel, and capillary electrophoresis. *Electrophoresis* 1997; 18:1775.
8. Kyle RA: Sequence of testing for monoclonal gammopathies. *Arch Pathol Lab Med.* 123:114–8, 1999
9. Alfonso E. Quantitation immunoelectrophoresis of serum proteins. *Clin Chem Acta.* 10:114-122, 1964.
10. Sinclair D, Ballantyne F, Shanley S, et al. Estimation of paraproteins by immunoturbidimetry and electrophoresis followed by scanning densitometry. *Ann Clin Biochem* 1990; 27 ( Pt 4):335.
11. Katzmann JA, Clark R, Sanders E, et al. Prospective study of serum protein capillary zone electrophoresis and immunotyping of monoclonal proteins by immunosubtraction. *Am J Clin Pathol* 1998; 110:503.
12. Register LJ, Keren DF: Hazard of commercial antiserum cross-reactivity in monoclonal gammopathy evaluation. *Clin Chem.* 35:2016–2017, 1989.
13. Roden AJ, Lockington KS, Tostrud LJ, Katzmann JA. Urine protein electrophoresis and immunoelectrophoresis using unconcentrated or minimally concentrated urine samples. *Am J Clin Pathol* 2008;130:141-145
14. Levinson SS. Urine immunofixation electrophoresis remains important and is complementary to serum free light chain. *Clin Chem Lab Med* 2011;49(11):1801–1804
15. Katzmann JA, Dispenzieri A, Kyle RA, et al. Elimination of the need for urine studies in the screening algorithm for monoclonal gammopathies by using serum immunofixation and free light chain assays. *Mayo Clin Proc* 2006; 81:1575.
16. Yang Z, Harrison K, Park YA, Chaffin CH, Thigpen B, Easley PL, Smith JA, Robinson CA, Lorenz RG, Hardy RW. Performance of the Sebia CAPILLARYS 2 for detection and immunotyping of serum monoclonal paraproteins. *Am J Clin Pathol.* 2007;128(2):293-9.
17. Litwin CM, Anderson SK, Philipps G, Martins TB, Jaskowski TD, Hill HR. Comparison of capillary zone and immunosubtraction with agarose gel and immunofixation electrophoresis for detecting and identifying monoclonal gammopathies. *Am J Clin Pathol.* 1999;112(3):411-7.

## KLİNİK LABORATUVARDA HEMOGLOBİN ELEKTROFOREZİ

Doç. Dr. Doğan Yücel

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü

### Terminoloji

Hemoglobin (Hb), çapı 6.4 nm, molekül ağırlığı 64 500 Da olan tetramer yapıda globüler bir proteindir. Dört globin zincirinden oluşmuştur: 2  $\alpha$  ve 2 de  $\alpha$  dışı zincir  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  gibi. Her bir globin zincirinde bir hem grubu ve her hem grubunda da oksijenin bağlandığı bir adet, Hb molekülü başına toplam dört adet 2 değerli demir ( $Fe^{++}$ ) bulunur. Hb, tetramerde yer alan globin zinciri tipine göre farklı adlar alır.

Normal erişkin insanda bulunan başlıca Hb, 2 $\alpha$  ve 2 $\beta$  zincirinden oluşan **Hb A**'dir:  $\alpha_2\beta_2$  olarak gösterilir. Toplam Hb'in %96'sını Hb A oluşturur. **Hb A<sub>2</sub>** ise normal insanda %2.5 - %3.0 oranında bulunur ve 2 $\alpha$  ile 2 $\delta$  globin zincirinden oluşur:  $\alpha_2\delta_2$ . Fetal yaşamda baskın olan, doğumdan sonra normal bireylerde genellikle bir yıl içinde erişkin değeri olan %1'e düşen **Fetal Hb**'in (**Hb F**) yapısında 2 $\alpha$  ve 2 $\gamma$  globin zinciri yer alır:  $\alpha_2\gamma_2$ . Embriyonik yaşamın başlangıç dönemlerinde zeta ( $\zeta$ ) ve epsilon ( $\epsilon$ ) globin zincirleri de sentezlenir. Bunların yerini daha sonra  $\alpha$ ,  $\beta$  ve  $\gamma$  zincirleri alır. Doğumda HbA %15 düzeyindedir, geri kalan esas olarak Hb F ve çok az miktardaki HbA<sub>2</sub>'den oluşur.

Hb patofizyolojisiyle ilgili bozukluklar **hemoglobinopatiler ve talasemilerdir**. Hemoglobinopatiler dünyada en sık görülen tek gen bozukularındandır. Hb'in bir ya da daha fazla globin zincirinin amino asit diziliminde mutasyonlardan kaynaklanan yapısal Hb varyantları hemoglobinopatileri oluşturur. Hemoglobinopatiler kalitatif değişikliklerdir. Talasemiler ise kantitatif bozukluklardır. Hb yapısında bir bozukluk yoktur. Globin zinciri üretiminde gen delesyonu, anlamsız mutasyonlar, transkripsiyonu ya da mRNA stabilizasyonunu etkileyen mutasyonlardan kaynaklanan azalma söz konusudur. "**Thalassa**" sözü Yunanca "**deniz**" anlamına gelir. Denizden kastedilen Akdeniz'dir. Bu yüzden gerek talasemiler, gerekse hemoglobinopatiler ülkemiz açısından son derece önemlidir.

### Talasemiler

Talasemiler, üretimi etkilenen globin zincirine göre  $\alpha$  ve  $\beta$  talasemiler olarak adlandırılırlar. Otozomal dominant olarak kalıtılırlar.

## $\alpha$ Talasemiler

Dört  $\alpha$  globin zincirinden biri veya daha fazlasında delesyon veya nokta mutasyonlarından kaynaklanırlar.  $\alpha^0$  talasemi, aynı gen kümesinde  $\alpha$  zincirlerinin genlerinde delesyon vardır. Buna cis delesyon da denir ve bu tip  $\alpha$  talasemi  $--/\alpha\alpha$  olarak gösterilir. Trans durumunda farklı gen kümelerinde delesyon vardır ve  $-\alpha/-\alpha$  olarak gösterilir. Tek bir  $\alpha$  gen delesyonu durumunda **sessiz  $\alpha$  talasemi taşıyıcılığı** söz konusudur:  $\alpha\alpha/-\alpha$  olarak gösterilir ( **$\alpha$  talasemi silent**). Nokta mutasyonuna bağlı  $\alpha$  talasemiler daha seyrek görülür. Etkilenen  $\alpha$  globin gen lokuslarındaki defekte göre dört temel  $\alpha$  talasemi tipi vardır. Başlıca  **$\alpha$  talasemi tipleri** şunlardır:

**Hb Bart.** Dört  $\alpha$  globin zincirinin tümünde de delesyon vardır ( $--/--$ ). Hb A, Hb F ve Hb A2 sentezlenemez. Fetusta dört  $\gamma$  globin zinciri birleşerek Hb Bart'ı oluşturur ( $\gamma^4$ ). **Hidrops fetalis** ile sonuçlanır ve fataldir. Hb F yoktur.

**Hb H.** Üç  $\alpha$  globin zincirinde delesyon vardır,  $--/-\alpha$  olarak gösterilir. Bu durumda  $\alpha$  globin azlığı nedeniyle serbest  $\beta$  globin zincirleri birbirleriyle birleşerek çözünmeyen Hb H'ı oluştururlar ( $\beta^4$ ).

**$\alpha$  Talasemi Minör.** İki  $\alpha$  gen zincirinde delesyon vardır:  $-\alpha/-\alpha$  (trans) veya  $--/\alpha\alpha$  (cis) şeklinde tanımlanır.

**$\alpha$  Talasemi Silent.** Tek bir  $\alpha$  gen zincirinde delesyon vardır:  $-\alpha/\alpha\alpha$ .

## $\beta$ Talasemiler

$\beta$  globin zincirindeki sentez eksikliklerinden kaynaklanırlar. Başlıca  $\beta$  talasemi tipleri şöyledir:

**$\beta$  Talasemi Majör ( $\beta^0$  Talasemi).** Cooley Anemisi (bizde **Akdeniz Anemisi**) olarak da bilinir. Hiç  $\beta$  globin zinciri sentezlenemez. Bu yüzden  $\beta^0$  olarak sembolize edilir. Hb A oluşamaz, Hb F artmıştır.

**$\beta$  Talasemi İntermedia ( $\beta^+$  Talasemi).** Bir veya iki  $\beta$  globin geninde değişiklik vardır.  $\beta$  globin zinciri üretimi azalır. Hb A azalmış, Hb F artmıştır.

**$\beta$  Talasemi Minör ( $\beta$  Talasemi Trait).** Kişi asemptomatiktir. Hb A<sub>2</sub> >%3.5'tur.

**$\delta\beta$  Talasemi.** Hem  $\delta$ , hem  $\beta$  geninde delesyon vardır. Hb Lepore ile karıştırılabilir. Homozigotlarda Hb F %100'dür. Heterozigotlarda Hb A %93, Hb A<sub>2</sub> %2-%3, Hb F %3-%10'dur.

**Fetal Hb'in Kalıtsal Persistansı.**  $\beta$  globin zinciri sentezinde azalma vardır, bu boşluk  $\delta$

globin sentezinde artışla doldurulur. Hb F yüksekliği görülür. Homozigotlarda Hb F %100'dür, hiç Hb A ve Hb A<sub>2</sub> sentezi yoktur. Heterozigotlarda Hb F %15 - %25 arasındadır.

## Hemoglobinopatiler

Eğer sadece tek nokta mutasyonları düşünülürse potansiyel olarak 1695 olası Hb varyantı vardır. Bugün 1000'in üzerinde Hb varyantı olduğu kanıtlanmıştır. **Ancak sadece 9'u klinik olarak önemlidir.**

Hemoglobinopatilerin konvansiyonel ve sistematik adlandırması yapılmıştır. **Konvansiyonel adlandırmada** harfler (Hb S, Hb C gibi), aile isimleri (örneğin, Hb Lepore) ve yerleşim yeri (örneğin Hb İzmir) veya yerleşim bölgesinde akan nehir adları (örneğin Hb Saale) kullanılabilir. Heterozigot durumlar "**trait**" olarak adlandırılır: Örneğin Hb AS trait: Bu durumda  $\beta$  globin zincirlerinden birisi S, diğeri A'dır. **Sistematik adlandırmada** etkilenen Hb zinciri, etkilenme yeri ve amino asit değişikliği açıkça belirtilir. Örneğin Hb S,  $[\beta 6(A3)^{Glu \rightarrow Val}]$  şeklinde gösterilir. Klinik açıdan önemli hemoglobinopatiler şöyle sıralanabilir:

**Homozigot Hb S (Hb SS).** Her iki  $\beta$  globin zincirinin A heliksinde **Glu** yerine **Val** girer.  $\beta^S\beta^S$  olarak da gösterilir. Kriz sırasında eritrositlerde oraklaşma olduğunda **orak hücreli anemi** ya da **orak hücre hastalığı** adı verilir. Hb A yoktur, Hb A<sub>2</sub> ise düşüktür. Toplam Hb'in %85-%90'ını Hb S oluşturur. Hb F yüksektir, bölgeye göre %5 ile %25 arasında değişir.

**Heterozigot Hb S (Hb S Trait).** Toplam Hb'in %40'ını Hb S oluşturur (genel olarak <%50). Hb F değişkendir.

**Hb SC, Hb SD, Hb SO Arab ve HbS/G Philadelphia.** İlk üçü, Hb S'in Hb C, Hb D ve Hb O Arab ile birlikte kalıtılması sonucu oluşan varyantlardır. Hb S/G Philadelphia ise Hb S'in bir veya daha fazla  $\alpha$  globin zinciriyle birleşmesinden oluşur. En sık görülen Hb SC'dir. Elektroforezde eşit miktarda Hb S ve Hb C bantları görülür. Hb S alkali elektroforezde Hb D ve Hb G ile çakıştığından doğrulamak için asit Hb elektroforezi gerekir.

**Hemoglobin C  $[\beta 6(A3)^{Glu \rightarrow Lys}]$ .**  $\beta$  globin zincirinin A heliksinde Glu yerine Lys girer. Homozigot (**Hb C hastalığı**) veya heterozigot (**Hb C trait**). Hb C hastalığında toplam Hb'in %90-%95'ini Hb C oluşturur. Hb F miktarı değişkendir. Heterozigot Hb C taşıyıcılarında Hb C, toplam Hb'in %38 - %45'ini oluşturur.

**Hemoglobin D Punjab  $[\beta 121(GH4)^{Glu \rightarrow Gln}]$ .** Diğer adı **Hb D Los Angeles**'dir. Toplam Hb'in %90'ından fazlasını Hb D oluşturur. Hb D Iran'da amino asit değişikliğinin yeri farklıdır:  $[\beta 22(B4)^{Glu \rightarrow Gln}]$ .

**Hemoglobin E  $[\beta 26(B8)^{Glu \rightarrow Lys}]$ .** Homozigot ve heterozigotları vardır.  $\beta$  talasemi ile kombine olabilir. Homozigotlarda Hb E, toplam Hb'in %90'ından fazlasını oluşturur.

**Hemoglobin O Arab  $[\beta 121(GH4)^{Glu \rightarrow Lys}]$ .** Toplam Hb'in %90'ından fazlasını Hb O Arab oluşturur.

**Hibrit Hb'ler.** Globin zincirlerinden birisi, diğer iki globin zincirinin amino asit dizisi ile hibritleşmiştir. "**Crossover Hb'ler**" de denir. **Hb Lepore**,  $\delta$  ve  $\beta$  zincirlerinin hibritleşmesiyle oluşan bir hibrit Hb'dir.

**Uzun Hb'ler.** Globin zincirlerinin C veya N terminalleri uzamıştır. En iyi bilinen uzun Hb, **Hb Constant Spring**'dir. Bu Hb'in stabilitesi düşüktür. Bu yüzden kan örneği 24 saat içinde analiz edilmelidir.

## Hemoglobinopatiler ve Talasemilere Laboratuvar Yaklaşım

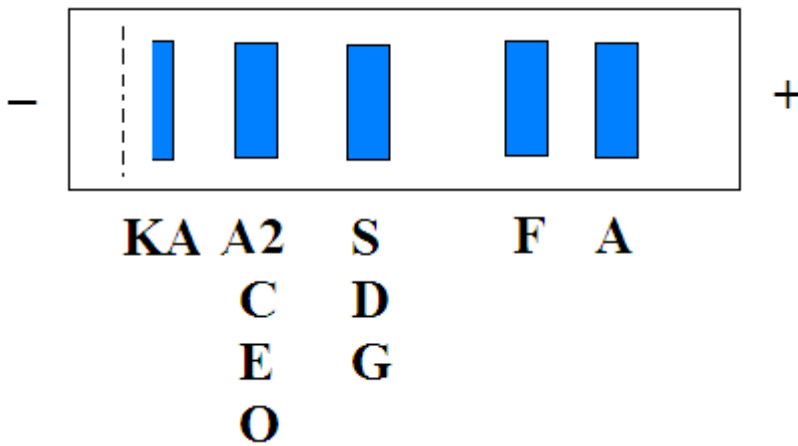
Hemoglobinopati ve talasemilerin tarama ve tanısında genel olarak klinik laboratuvarın, özel olarak ilk basamak testi olarak elektroforetik yöntemlerin önemli yeri vardır. Elektroforez hala en çok kullanılan tekniklerden biridir. Elektroforez tekniklerinin dışında basitten karmaşığa şu testler uygulanır: (1) **Tam kan sayımı**; (2) **Çözünürlük ve oraklaşma testi**; (3) **Hb A<sub>2</sub> ve Hb F ölçümü**; (4) **HPLC ile varyant analizi**; (5) **Kütle spektrometri**; (6) **Moleküler teknikler (amino asit/DNA sekans analizi)**. Çoğu zaman birden fazla teknik gerekir.

### Elektroforetik Teknikler

#### Alkali Elektroforez

**Selüloz Asetat Elektroforezi.** Alkali elektroforez olarak da adlandırılır. Çünkü elektroforez **pH 8.6'**da yapılır. Bu pH'da Hb molekülü negatif yüklüdür. Dolayısıyla elektroforez sırasında anoda doğru göçerler. Hb varyantları, moleküllerindeki yük değişiklikleri nedeniyle Hb A'dan farklı göç gösterir. Boya olarak genellikle **Ponceau S** kullanılır. Hb bantları kırmızı boyanır.

**Agaroz Jel Elektroforezi.** Bugün en yaygın kullanılan alkali elektroforez yöntemidir. Elektroforez tamponunun **pH'sı 9.2'**dir (en çok kullanılan **barbital tampon**). Boya olarak daha çok **Amido Black** veya **Coomassie Brilliant Blue G-250 (Acid Blue)** kullanılır, bantlar mavi boyanır.



**Şekil 1.** Alkali jel elektroforezinde Hb bantlarının yerleşimi. KA: Karbonik anhidraz.

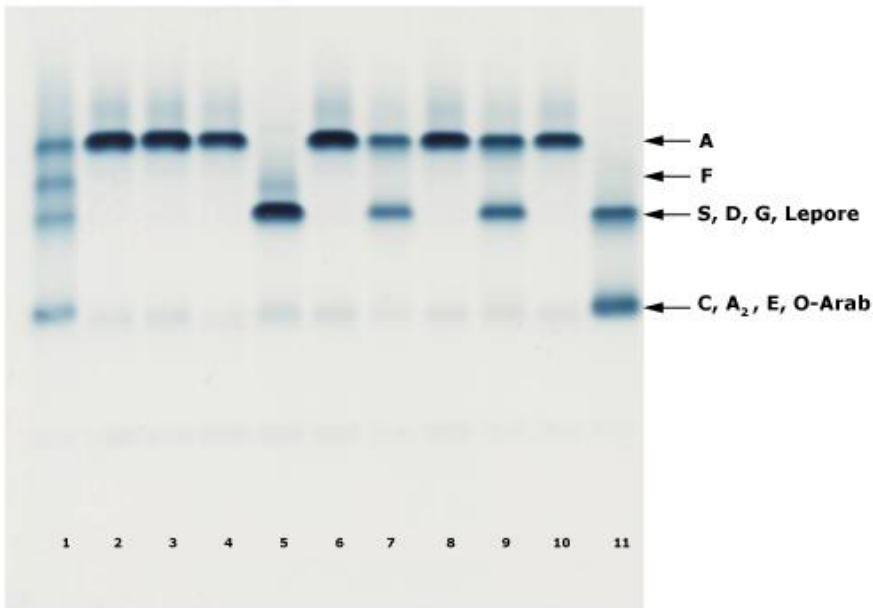


Alkali elektroforez yöntemleri sık kullanılmakla birlikte sonuçlar yüzde olarak verilir. Okuma dancitometre ile yapılır. Kesinliği iyi olmadığından miktar belirtimi için önerilmez.

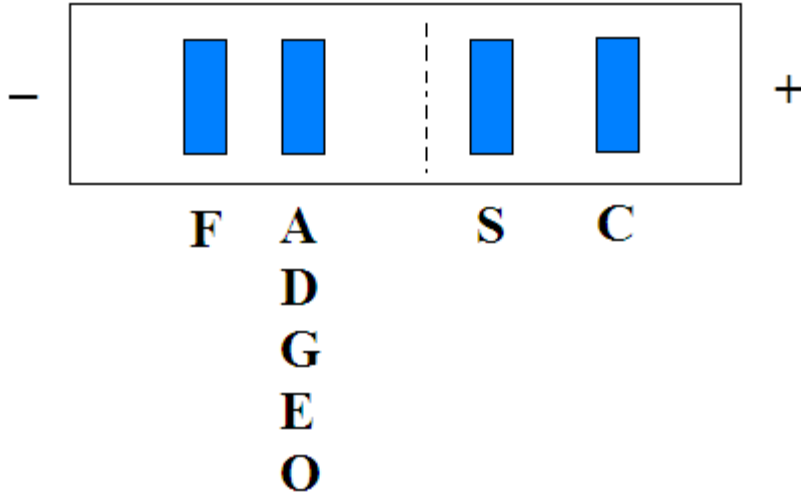
Alkali elektroforezde anoda doğru en hızlı göçen Hb H'dir. Bunu sırasıyla Hb N, Hb I, Hb J, Hb A, Hb F, Hb S ve Hb C izler. Hb D ve Hb G, Hb S ile birlikte göçer. Hb E, Hb O ve Hb A<sub>2</sub> ise Hb C ile çakışır. Uzun Hb, Hb Constant Spring, hafifçe katoda doğru göçer, dolayısıyla uygulama yerinin gerisindedir.

### Asit Elektroforez

**Sitrat Agar Elektroforezi.** Asit elektroforez olarak da adlandırılır. Çünkü elektroforez işlemi pH 6.2 - 6.4'de yapılır. Alkali elektroforezin tamamlayıcısıdır. **Eğer alkali elektroforezde anormal bir Hb bandı görülürse yapılır.** Destek ortamı olarak **agaroz veya agar jel** kullanılır. Boya olarak daha çok "Acid Violet" kullanılır.



**Şekil 2.** Alkali Hb elektroforezi: 1 no'lu numune eşit oranda Hb A, F, S, C içeren kontrol; 2, 3, 4, 6, 8 ve 10 sağlıklı bireylerden alınan numuneler (sadece Hb A görünüyor); numune 5 homozigot Hb S (sadece Hb S ve Hb F görünüyor); numune no 7 ve 9 Hb S trait (Hb S ve Hb A bantları görünüyor), numune 11 Hb SC (Hb S ve Hb C bantları).

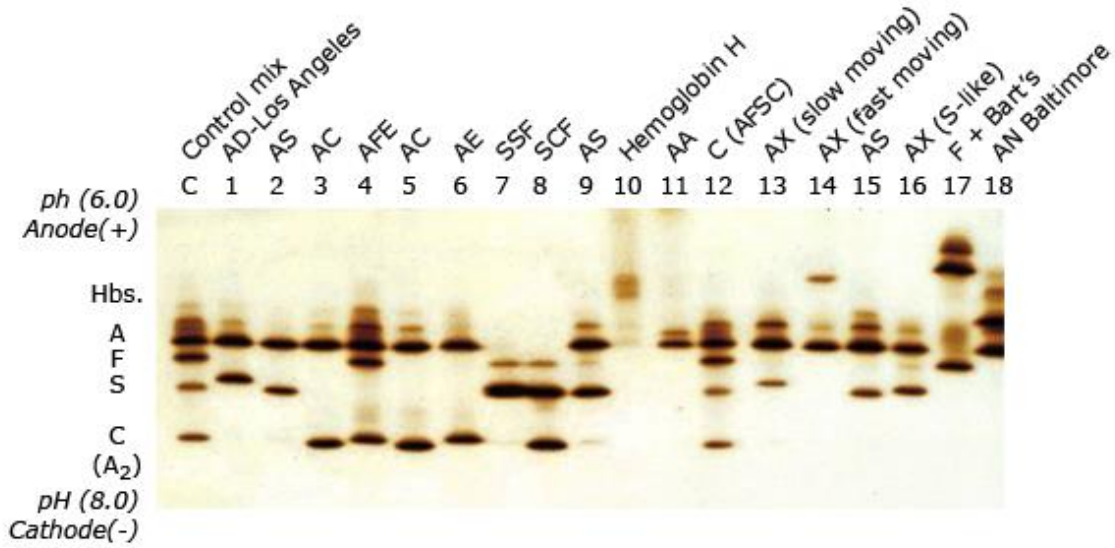


**Şekil 3.** Asit jel elektroforezinde Hb bantlarının yerleşimi.

Asit elektroforezde ortam olarak agar kullanılırsa, agar içindeki **agaropektin** ortamda bazı Hb varyantlarının dış yüzeyindeki amino asitlerle etkileşir. Bu yüzden alkali elektroforeze göre değişik bir göç izlenir. Hb - agaropektin kompleksi hareketsiz agaroz matrisi üzerinde anoda doğru sürüklenir; kompleks yapmamış Hb ise sitrat tamponun elektroendozmotik akışı nedeniyle katoda doğru sürüklenir. **Bu yöntem Hb S, Hb C ve Hb E varlığının doğrulanması için çok yararlıdır.** Bantların katottan anoda doğru sıralaması şöyledir: Hb F, Hb A, Hb S, Hb C. Asit elektroforezde Hb D, G, I, J, O, A2 ve E Hb A ile birlikte göçer.

**İzoelektrik Odaklama.** Konvansiyonel elektroforeze göre Hb varyantlarının ayrımı, rezolüsyonu daha iyidir, bantlar daha keskindir. Ancak, pahalı ve zaman alıcıdır. pH gradyanı selüloz asetat veya poliakrilamid içinde amfoter maddelerle sağlanır. Bu amaçla genellikle küçük proteinler, molekül ağırlığı 300 – 1000 Da arasında olan 50 – 100 bileşik kullanılır. Akım uygulandığında bu amfoter bileşikler sayesinde Hb için pH 6 – 8 arasında bir pH gradyanı oluşur. Bu bileşikler agarozda inkorpore edilir. Boyalar konvansiyonel elektroforezde kullanılan boyalardır. Yüksek voltaj gerektirir. Piyasada ticari ürünler vardır. Ayrılan Hb bantlarının miktar belirtimi yapılabilir. **Ancak Hb F ve Hb A2 miktar belirtimi için izoelektrik odaklama da önerilmez.**

İzoelektrik odaklama kapiller elektroforez tekniği ile de yapılır. Daha hızlıdır, otomatize edilebilir, 15 dakikada sonuç alınır. **Hb F ve Hb A2 için de geçerli kantitatif sonuç alınır.** Okumalar 415 nm'de yapılır.

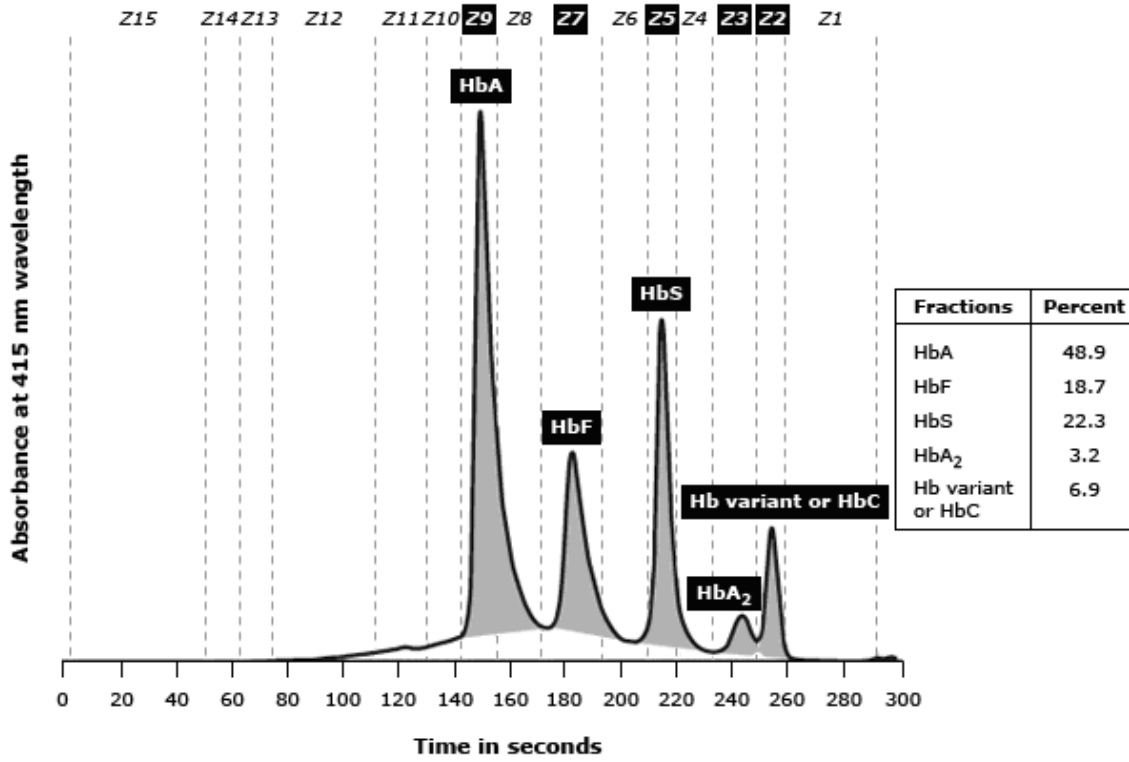


**Şekil 4.** Hb için izoelektrik odaklama çıktısı. C hattı Hb AFSC karışımı (kontrol); 1. ve 2. hatlarda Hb D ve Hb C'nin, 5. ve 6. hatlarda Hb C ve Hb E'nin farkı görülüyor.

**Kapiller Elektroforez.** Kapiller elektroforezin klinik laboratuvar ortamına girişi, elektroforeze olan ilgiyi yeniden artırmıştır. Elektroforez çok ince bir kapiller tüpte yapılır, bu yüzden yüzey alanı geniştir. Bu ısı oluşumunu da dağıtır. **Çok yüksek bir voltaj (10 000 V gibi)** uygulanır. Uygulamada **alkali pH (pH 9.2)** kullanılır. **Hb varyantlarının ayrımı yük farkına, pH'ya ve elektroendozmotik akıma dayanır.** Kapiller tüp silikadan yapılmıştır, iç yüzeyinde negatif yük taşır. Sisteme tampon uygulandığında bir elektroendozmotik akım oluşur. Akım uygulandığında elektroendozmotik güç katoda doğru hareket eder. Gene Hb fraksiyonlarının ayrımında yükleri önemlidir ancak tümü de katoda doğru sürüklenirler. **Sıralama konvansiyonel alkali elektroforezdekini tam tersidir.** Hb varyantları kromatografide olduğu gibi alıkonma (retansiyon) zamanına göre tanımlanır. Hb ölçümü genellikle 415 nm'de yapılır. **Tek bir çalışmada yaygın görülen tüm Hb varyantlarının ayrımı yapılabilir; Hb F ve Hb A2 için miktar verilebilir. Hb A2 ve Hb E'yi ayrıştırabilme, Hb H'ı ölçebilme ve Hb Lepore'yi yakalayabilmesi nedeniyle HPLC tekniklerinden üstündür.** Klinik laboratuvarlar için önemi gittikçe artmaktadır.

#### Numune

Hb elektroforezi için antikoagülanlı tam kan gerekir. Antikoagülan olarak EDTA, sitrat ve heparin uygundur. Taze kan tercih edilir. Eğer hemen çalışılmayacaksa +4 °C'de bir haftaya kadar saklanabilir. Daha uzun süreli saklamak gerekiyorsa, eritrositler yıkandıktan sonra hazırlanan eritrosit paketi -80 °C'de aylarca saklanabilir. Elektroforezde hemolizat kullanılır.



**Şekil 4.** Normal ve bazı sık karşılaşılan varyant Hb'lerin yapay olarak karıştırıldığı bir numunenin kapiller elektroforez çıktısı ve Hb fraksiyonlarının nispi oranları. Yatay ekseninde alıkonma zamanları, dikey ekseninde absorbans verilmektedir.

#### Referans Değerler

Hb A: >%95

Hb A<sub>2</sub>: <%3.5

Hb F: <%2

Hb A<sub>2</sub> sonuçları  $\beta$  talasemi trait için önemli olduğundan kullanılan sistem önerilen doğruluk ve kesinliği sağlamalıdır. Biyolojik değişkenliğe dayalı toplam hata sınırı %4.5, klinik açıdan toplam hata sınırı %7'dir. Bu sınırların altında doğru ve kesin sonuç veren sistemler vardır. Ancak henüz referans ölçüm yöntemi ve referans materyal geliştirilmemiştir. Bu konuda "IFCC Working Group on Hb A<sub>2</sub> Standardization" çalışma grubunun çalışmaları sürmektedir. Hb A<sub>2</sub> için genel kabul gören kesim değeri %3.5'tur. Bugün referans düzeylerde %2,  $\beta$  talasemi düzeyinde (genellikle %4-%6 ama daha geniş tutulursa %3.5 - %7) %1 kesinliğe ulaşılabilir. Klinik açıdan ölçüm belirsizliği %3.6 düzeyinde %0.25'i geçmemelidir.

**Önemli Not:** Her çalışmada AFSC kontrol numunesi kullanılmalıdır.

## Kaynaklar

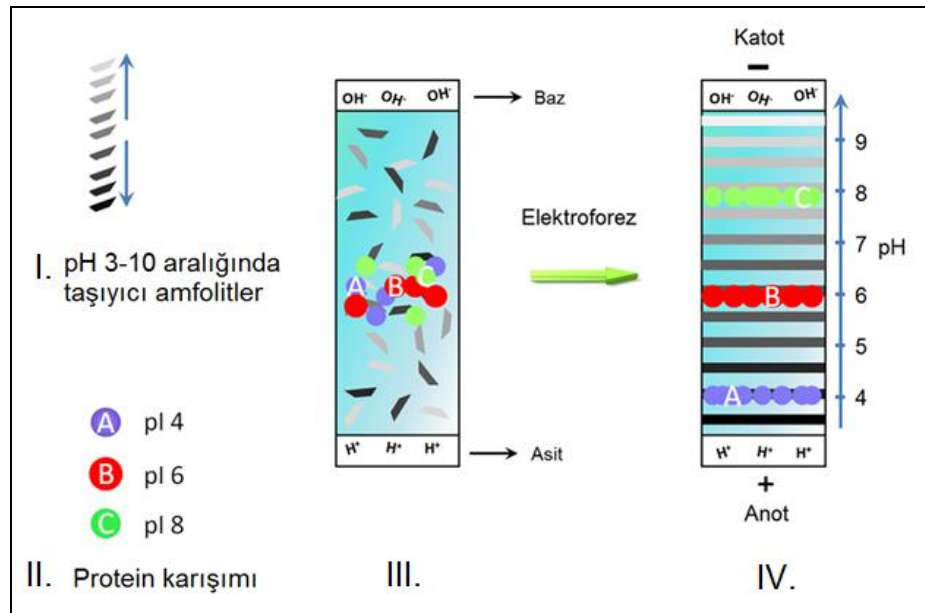
1. Karcher RE, Landers JP. Electrophoresis. (Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2012; pp. 287-305, Elsevier Saunders, St. Louis.
2. Higgins T, Eckfeldt JH, Barton JC, Doumas BT. Hemoglobin, iron and bilirubin. (Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2012; pp. 985-1030.
3. Clarke GM, Higgins TN. Laboratory investigation of hemoglobinopathies and thalassemias: review and update. Clin Chem 2000;46:1284-1290.
4. Dorn-Beineker A, Frietsch T. Sick cell disease – pathophysiology, clinical and diagnostic implications. Clin Chem Lab Med 2002;40:1075-1084.
5. Mosca A, Paleari R, Wild B. Analytical goals for the determination of HbA2. Clin Chem Lab Med 2013;51:937-941.
6. Jenkins M, Ratnaik S. Capillary electrophoresis of hemoglobin. Clin Chem Lab Med 2003;41:747-754.
7. Altinier S, Varagnolo M, Zaninotto M, Plebani M. Identification and quantification of hemoglobins in whole blood: the analytical and organizational aspects of Capillarys 2 Flex Piercing compared with agarose electrophoresis and HPLC methods. Clin Chem Lab Med 2013;51:791-797.
8. Stephens AD, Angastionitis M, Baysal E, et al. on behalf of the International Council for the Standardisation of Haematology (ICSH). ICSH recommendations for the measurement of haemoglobin A2.

**İZOELEKTRİK ODAKLAMA ELEKTROFOREZİ VE KLİNİK KULLANIMLARI**  
**Doç. Dr. Aslı Pınar ([aapinar@hacettepe.edu.tr](mailto:aapinar@hacettepe.edu.tr))**  
**Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve**  
**Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Merkez ve Acil Laboratuvarları, Ankara-Türkiye**

### İzoelektrik odaklama elektroforezi

İzoelektrik odaklama (İEO) elektroforezi proteinler gibi amforetik molekülleri, stabil pH gradienti kullanarak ayıran bir tekniktir. Proteinler amfoterik moleküllerdir. Amfoterik molekül ortam pH'sına göre pozitif/negatif yüklü veya yüksüz olabilen moleküldür. Bir proteinin net yükünün sıfır olduğu pH izoelektrik noktasıdır (pI). Proteinler izoelektrik noktalarından daha asidik ortamda pozitif, daha bazik ortamda ise negatif yük taşırlar.

Molekül ağırlığı 300-1000 D arasında ve pKa'ları birbirinden hafif farklı olan sentetik poliaminopolikarboksilik asit grupları ile pH gradienti oluşturulur. Bu bileşiklere taşıyıcı amfolitler denir. Taşıyıcı amfolitleri içeren agaroz veya büyük porlu poliakrilamid jel kullanılır. Elektrik akımı uygulandığında stabil bir pH gradienti oluşur. Protein pH gradienti içinde ilerlerken izoelektrik noktasına eşit pH noktasında "odaklanır". Bu teknikle 0.02 pH ünitesi kadar farklı pI'lara sahip proteinler bile dar bantlar halinde ayrılabilir. Oluşturulan pH gradienti ile bantların difüzyonu önlenerek rezolüsyonun yüksek olması sağlanır (Şekil 1). Önemli diğer bir nokta ise şekilde de görüldüğü gibi anodun dilue asit, katodun dilue alkali solüsyon içermesidir. Akım uygulandığında, en fazla negatif yüklü taşıyıcı amfolit anodal uçta, en pozitif yük taşıyan amfolit katodal uçta yer alacaktır. Diğer taşıyıcı amfolitler ise bunların arasında uygun biçimde dizileceklerdir.



**Şekil-1** İzoelektrik odaklama prosedürünün şematik gösterimi. I, taşıyıcı amfolit karışımı; II, izoelektrik noktaları sırası ile 4, 6 ve 8 olan A,B ve C proteinleri; III, elektroforez öncesi protein ve amfolit karışımları içeren jel; IV, akım uygulanması sonrasında oluşan pH gradienti ve izoelektrik noktalarına göre ayrılan protein bantları.

Amfolitler yüksek konsantrasyonda olduğu için yüksek voltajlı güç kaynağı gereklidir. Elektroforez sırasında taşıyıcı amfolitler izoelektrik noktalarına geldiklerinde iletkenlikte belirgin düşüş gözlenir. İzoelektrik odaklama için sabit güç uygulaması gereklidir.

Poliakrilamid, elektroendozmoz görülmemesi nedeni ile uygundur. Ancak, yeterli por genişliği sağlansa da IgM gibi proteinlerde pratikte sorun yaşanmaktadır. Agaroz, büyük por genişliği ve uygulama koşullarının basit olması nedeni ile izoelektrik odaklama elektroforezinde yaygın olarak tercih edilmektedir.

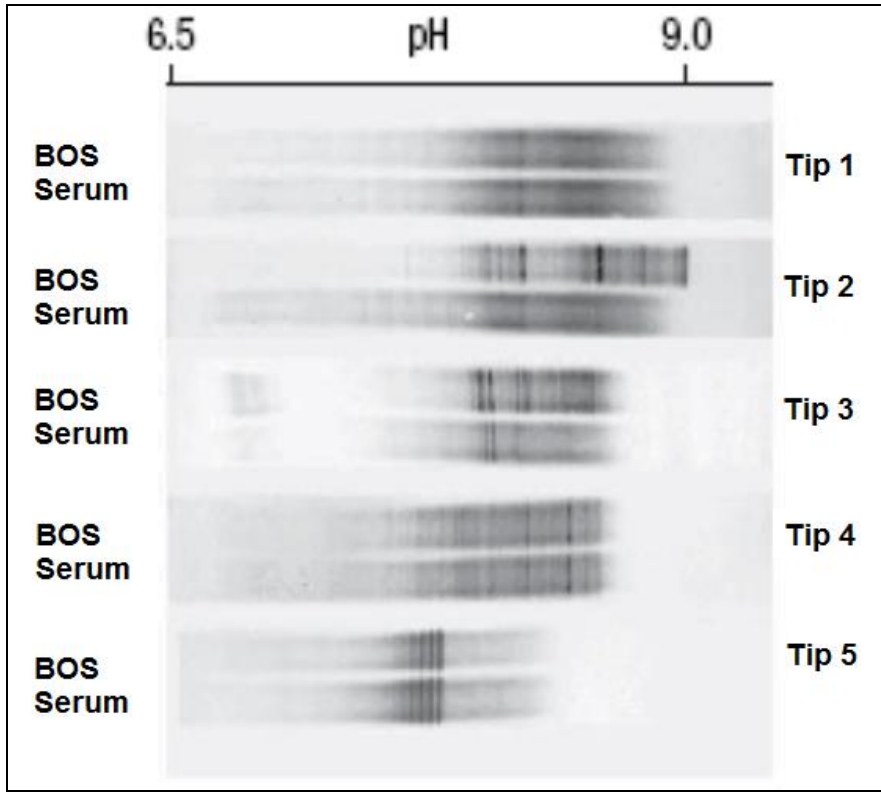
### **BOS'ta oligoklonal bant incelemesi**

BOS, lateral ve dördüncü ventriküllerde bulunan koroid pleksus tarafından yapılır ve beyin ventrikülleri içinde dolaşır, beyin ve medulla spinalisi kuşatır. BOS, birçok fizyolojik olayda önemli rol alan peptidler, proteinler ve enzimler gibi moleküller içermektedir. Metabolik olarak aktif bir ortam olan BOS tanısız amaçlar için son derece değerlidir. BOS kompozisyonunun değişimleri patolojik olayları doğru olarak yansıtmakta, Santral sinir sistemi (SSS) hastalıklarını değerlendirmede benzersiz bir bakış açısı sağlamaktadır.

BOS'ta kantitatif ve kalitatif anormal immunglobulin G (IgG) artışı SSS'nin multiple skleroz gibi (MS) demiyelinizan hastalıklarında olduğu kadar otoimmün, neoplastik veya enfeksiyöz hastalıklarının tanısında da yararlıdır. Kantitatif BOS IgG genellikle IgG indeksi ile ifade edilir. İOE ile saptanan kalitatif BOS IgG ise oligoklonal bantlarla ifade edilmektedir.

BOS rutin analizleri için hazırlanan güncel kılavuzlarda, özellikle MS tanısı olmak üzere intratekal IgG sentezini değerlendirmede kalitatif oligoklonal bant incelemesinin gerekliliği vurgulanmaktadır. Elektroforetik tekniklerle BOS'ta monoklonal, oligoklonal bantlar veya poliklonal cevap saptanabilmekte, humoral cevap değerlendirilebilmektedir. Günümüzde izoelektrik odaklamanın ardından IgG spesifik antikor ile immunifikasyon tekniğinin en duyarlı ve doğru sonucu verdiği konusunda uzlaşılmıştır ve altın standart olarak bu uygulama kabul edilmiştir. Bu uygulamada aynı jel örneğinde eş zamanlı alınan serum ve BOS örnekleri paralel yürütülmelidir. Birçok sistemik hastalık oligoklonal IgG sentezine neden olabilmekte, bozulmuş kan-beyin bariyeri nedeni ile bu bantlar BOS'ta da görülebilmektedir. Bu nedenle BOS ve serumun paralel çalışılması çok önemlidir. Serum ve BOS örnekleri aynı IgG konsantrasyonları olacak şekilde uygulanmalıdır. BOS konsantre edilmemelidir.

İEO elektroforezi görüntülerine göre sonuçlar Tip 1 (BOS ve serumda bant izlenmeyen), Tip 2 (BOS'ta oligoklonal bantlar), Tip 3 (BOS ve serumda oligoklonal bant ve BOS'ta ilave bantlar), Tip 4 (BOS ve serumda paralel bantlar) ve Tip 5 (BOS ve serumda monoklonal bantlar) olarak 5 gruba ayrılmaktadır (Şekil 2). Tip 2 ve Tip 3'de olduğu gibi oligoklonal (2 ve daha fazla) bant bulunması intratekal IgG sentezini göstermektedir (Tablo 1).



**Şekil 2.** İEO elektroforezi görüntülerine göre tiplendirme: Tip 1 (BOS ve serumda bant izlenmemekte), Tip 2 (BOS'ta oligoklonal bant), Tip 3 (BOS ve serumda oligoklonal bant ve BOS'ta ilave bantlar), Tip 4 (BOS ve serumda paralel bantlar) ve Tip 5 (BOS ve serumda monoklonal bantlar).

**Tablo 1.** BOS ve serum oligoklonal bant değerlendirmesi.

	BOS	Serum	Yorum	Klinik durum
Tip 1	Bant yok	Bant yok	Poliklonal IgG	Normal
Tip 2	Oligoklonal bant var	Bant yok	Intratekal IgG sentezi var	MS
Tip 3	Serumdan >2 ilave oligoklonal bant var	Oligoklonal bant var	Intratekal IgG sentezi var BOS ve serumda paralel bantlarla birlikte BOS'ta ilave bantlar vardır. Sistemik inflamatuvar yanıtı bağlı paralel bantlara ek olarak intratekal sentez de vardır.	MS, sistemik lupus eritematozis (SLE), sarkoidoz vb
Tip 4	Oligoklonal bant var	Oligoklonal bant var	Intratekal IgG sentezi yok BOS ve serumda paralel bantlar vardır. Sistemik inflamatuvar yanıtın, kan-beyin bariyeri bozulması sonucu pasif transferi ile BOS'a yansımadır	Guillain-Barre sendromu, akut dissemine ensefalomyelit (ADEM), sistemik enfeksiyonlar
Tip 5	Monoklonal bant	Monoklonal bant	Intratekal IgG sentezi yok	Myeloma, önemi belirlenememiş monoklonal gammopati (MGUS)



Oligoklonal bantların lokal sentezi diagnostik değildir. Klinik tablo ile birlikte değerlendirilmelidir. Oligoklonal bant değerlendirmesinde önerilen konular:

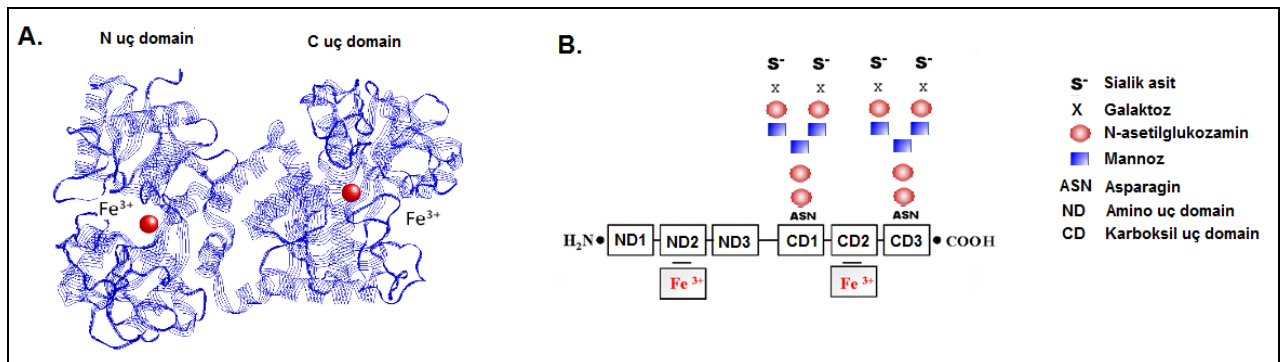
- IgG için BOS kalitatif değerlendirmesinde izoelektrik odaklama ve immunsaptama (blotting veya fiksasyon) en yararlı tek analizdir.
- Bu analiz, konsantrasyon edilmemiş BOS serum ile paralel olarak aynı çalışmada karşılaştırılmalıdır.
- Serum ve BOS aynı konsantrasyonlarda IgG içermelidir.
- Negatif kontrol her çalışmada kullanılmalıdır.

### Karbonhidrat eksik transferrin ve glikozilasyon bozuklukları

Transferrin (Tf), yaklaşık 80 KDa büyüklüğünde, demir taşıyıcı serum glikoproteinidir. Esas olarak karaciğerde hepatositlerden sentezlenir. Beyin gibi başka organlarda da az miktarlarda sentezlenmektedir. Molekül, bir polipeptid zincir, iki bağımsız demir bağlama bölgesi ve iki adet kompleks glikan zincirinden oluşur (Şekil 3).

Transferrin 2 adet  $Fe^{+3}$  bağlamaktadır. Organizmanın demir yüküne göre: demir içermeyen ( $Fe_0$ -Tf veya apo-Tf), bir  $Fe^{+3}$  yüklü ( $Fe_{1N}$ -Tf veya  $Fe_{1C}$ -Tf), veya iki  $Fe^{+3}$  yüklü ( $Fe_2$ -Tf) olarak bulunabilir. Transferrin molekülü üzerinde N-glikan zincir değişik dallanmalar yapabilmektedir. Her uç bir adet sialik asit molekülü ile sonlanır. Her bir N-glikan zincir ucunda birer sialik asit bulunur. Demir bağlama bölgeleri  $Fe^{+3}$  ile bağlandığında molekül net yükünü bu sialik asit grupları belirler. Hiç N-glikan uç içermeyen asialo-Tf formundan, oktasialo-Tf forma kadar farklı Tf izoformları serumda değişen oranlarda bulunabilmektedir (Şekli 4). Transferrin molekülünün izoelektrik noktası (pI) her bir sialik asit eklentisi ile yaklaşık 0.1 pH ünitesi azalır.

Sağlıklı bireylerde total serum Tf'e göre bu formların yüzdeleri: heptasialo-Tf <%1.5, heksasialo-Tf %1-3, pentasialo-Tf %12-13, tetrasialo-Tf %64-80, trisialo -tf %4.5-9, disialo -Tf % <2.5 olarak bulunmaktadır. Asialo-Tf, monosialo-Tf ve disialo-Tf izoformları karbonhidrat eksik transferrin (carbohydrate deficient transferrin; CDT) olarak adlandırılmaktadır.



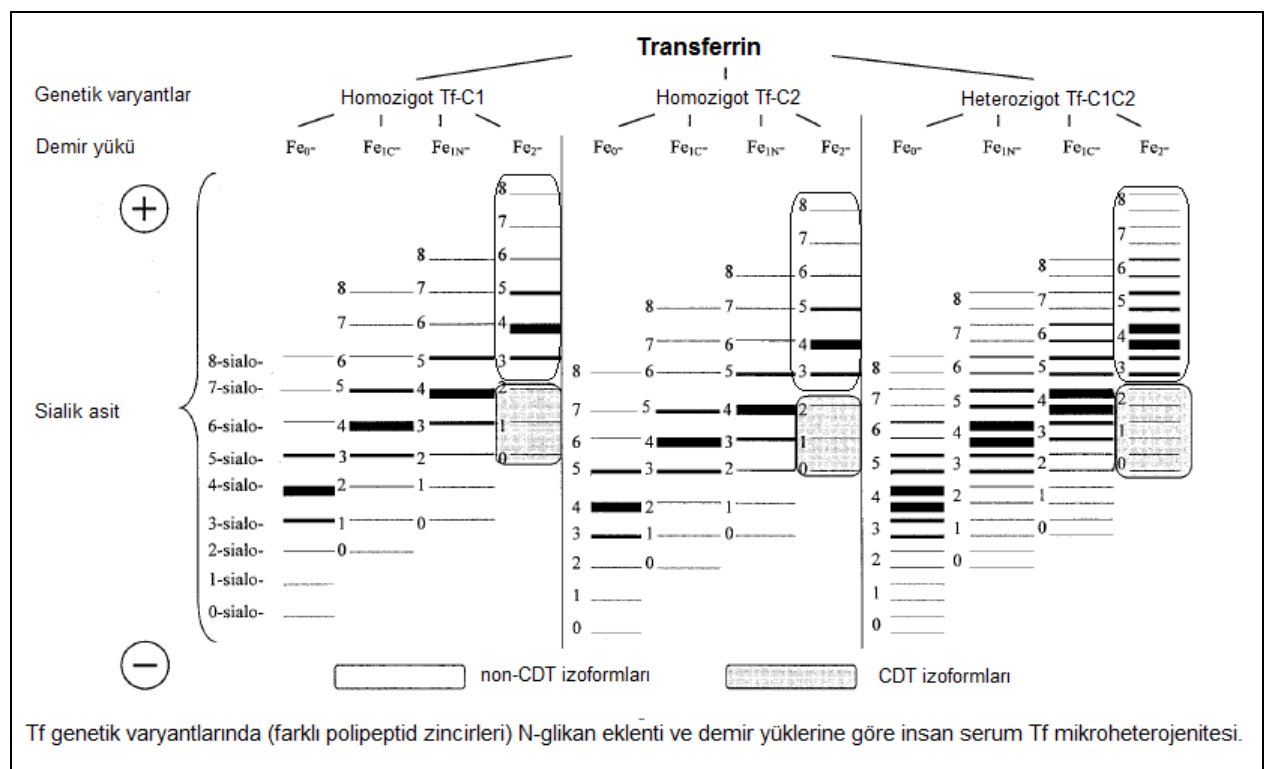
**Şekil 3.** Transferrin molekül yapısı: A, Transferrin molekülünün Amino (N) ve karboksil (C) uç domainleri ve içerdikleri  $Fe^{3+}$ ; B, polipeptid zincir, iki bağımsız metal iyon bağlama bölgesi ve iki adet kompleks N-bağlı glikan zincirinden oluşan Tf şematik yapısı görülmektedir. Metal bağlama bölgelerinden biri N-terminalde, diğeri C-terminalde bulunur.

Tf için, polipeptid zincirinde amino asit değişikliklerinin gözlemlendiği bilinen 38 genetik varyantı vardır. Bunlardan beyaz ırkta en yaygın olanı (>%95) Tf-C1'dir. Bazı Tf varyantları (Tf-B, Tf-D gibi) CDT analizlerinde pozitif veya negatif interferanslara neden olabilmektedir.

Kronik alkol kullanımına bağlı olarak serum transferrin glikoform paterninde değişim görülmekte, CDT artışı saptanmaktadır. CDT, kronik ve yüksek miktarda etanol kullanımında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır. Etanol ve/veya metaboliti asetaldehidin Golgi'de N-glikan zincir sentezini etkilediği düşünülmektedir. Mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Günlük 50-80 g üzerinde düzenli olarak iki hafta süresince etanol kullanımında disialo-Tf ve asialo-Tf izoformlarında artış saptanmaktadır. Sonuçların Tf varyasyonlarından etkilenmemesi için, total Tf'e göre yüzde olarak raporlanması önerilmektedir.

Alkol kullananlar ve sağlıklı bireyler arasında trisialo-Tf konsantrasyonları arasında anlamlı bir fark bulunmamaktadır. Tanısal değeri olmadığı için trisialo- formların CDT içinde kabul edilmemesi gerektiği belirtilmektedir. Özellikle immün ölçüm yöntemlerinde trisialo Tf ölçmeyen immün ölçüm yöntemlerinde tanısal duyarlılık artmaktadır. IFCC-CDT çalışma grubu tarafından monosialo-Tf'nin trisialo-Tf türevi olması nedeni ile CDT içinden çıkarılması gerektiği bildirilmiştir.

Analiz öncesi birçok değişkenin CDT sonuçlarını etkilediği bilinmektedir. EDTA ve heparin Tf'nin Fe<sup>3+</sup> satürasyonunu etkiler. Oda sıcaklığında 3 gün bekleyen örneklerde CDT %25 azalmaktadır. Lipemi türbidimetrik yöntemleri etkilemektedir. Hemoliz yanlış pozitif sonuçlara neden olmaktadır.



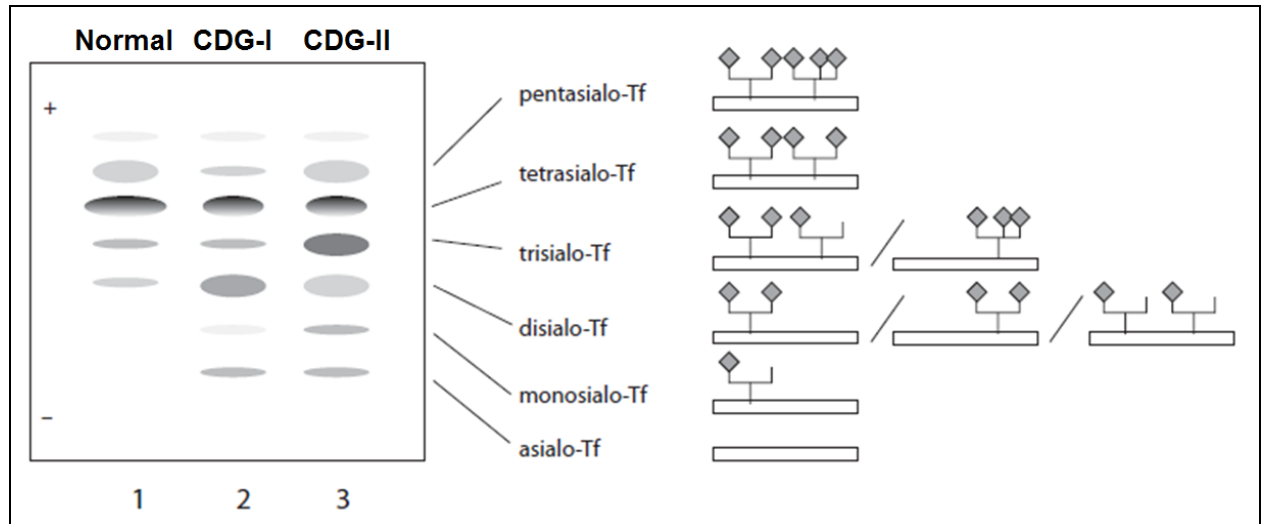
**Şekil 4.** Tf genetik varyantlarında (farklı polipeptid zincirleri) N-glikan eklenti ve demir yüklerine göre insan serum Tf mikroheterojenitesi. Demir yüklerindeki varyasyonlarla beraber homozigotlarda 36 izoform, heterozigotlarda ise 72 izoform görülmektedir.

Tf mikroheterojenitesi, CDT ve non-CDT moleküllerin yapısal benzerliği ve düşük CDT düzeyleri analitik zorluklardır. Elektroforez ve HPLC yöntemlerinde non-CDT ve CDT isoformlarının değişik  $Fe^{+3}$  doygunluğunda pI'larının değişmesi nedeni ile analiz öncesi in vitro olarak mutlaka demir satürasyon basamağı yapılmalıdır.

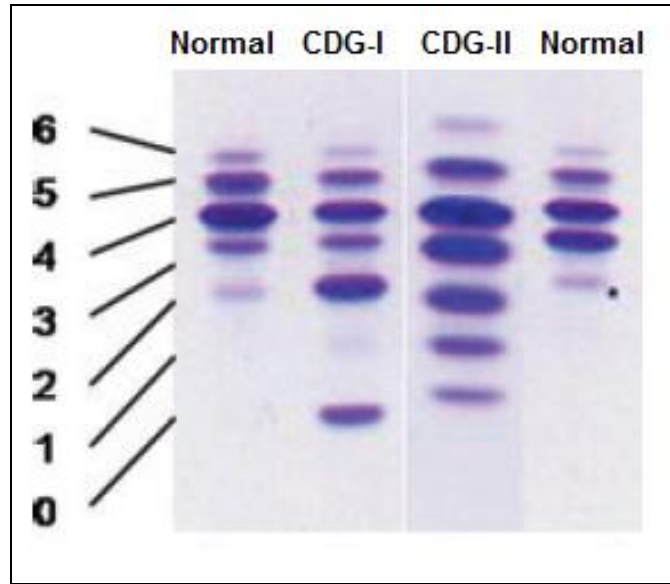
Glikanların (şeker veya karbonhidratlar) protein veya lipidlere kovalent olarak bağlanmasına glikozilasyon denir. Oluşan glikokonjugatların (glikolipid, glikoprotein, glikofosfatidil-inozitol ankorlar veya proteoglikanlar) çok önemli rolleri vardır: proteaz yıkımına direnç, hücre içinde lokalizasyon, immün cevabın düzenlenmesi gibi. Glikozilasyonda rol alan proteinlerde meydana gelen gen mutasyonları, glikokonjugatlarda eksiklik veya bozukluk ile karakterize konjenital glikozilasyon hastalıkları olarak adlandırılan bir grup yenidoğan metabolik hastalıklarına yol açmaktadır.

Proteinlerin glikozilasyon sürecinde 45'den fazla kalıtsal metabolik konjenital glikozilasyon bozukluğu (CDG; congenital disorders of glycosilation) tanımlanmıştır. Gelişme geriliği, hipotoni, nörolojik bulgular, anormal MRI bulguları, koagülasyon bozuklukları ve deri bulguları gibi mültisistemik, geniş klinik görünüm olabilmektedir. Gelişme geriliği, açıklanamayan karaciğer disfonksiyonu, inme benzeri epizodlar, açıklanamayan hipoglisemi gibi durumlarda CDG düşünülmeli ve araştırılmalıdır. Tf izoform paternindeki değişikliklere göre CDG tiplendirmesi yapılmaktadır (Şekil 5 ve 6).

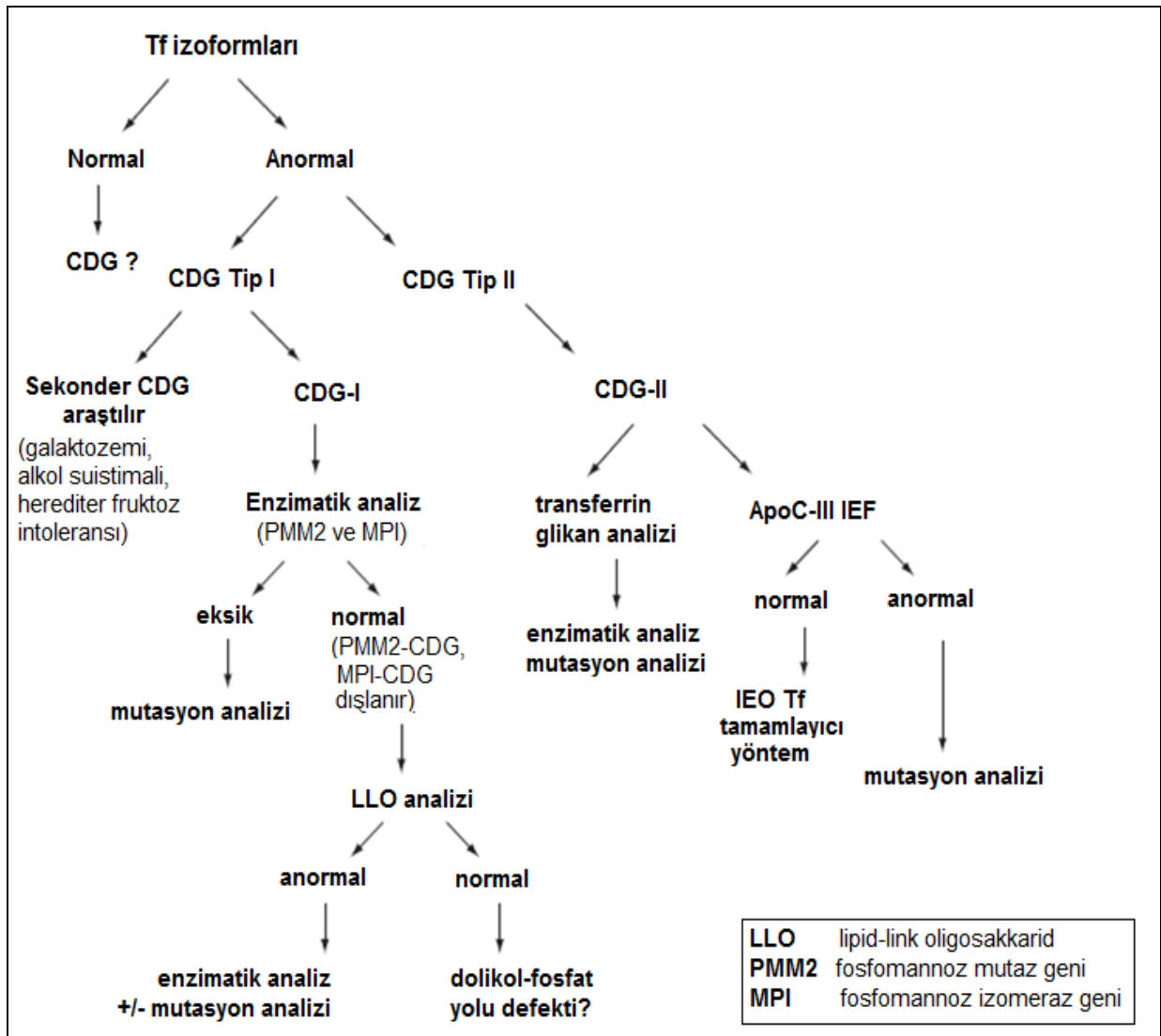
İleri tanısal araştırmalara yönlendirici bilgi vermesi nedeni ile CDT izoformlarının özgül ve duyarlı biçimde saptanması çok önemlidir (Şekil 7).



**Şekil 5.** Transferrin izoformlarının şematik gösterimi. Normal Tf üzerindeki oligosakkaritler en fazla tetrasialo-Tf olarak bulunur (1. Sıra); CDG hastalarında bu normal patern değişmektedir: CDG-I'de disialo-Tf ve asialo-Tf artar (2. Sıra), CDG-II'de asialo-, monosialo-, disialo- ve trisialo-Tf fraksiyonlarının tümünde artış görülür (3. Sıra). Tf izoformlarının yapısal çizimleri sağda verilmiştir.



**Şekil 6.** Serum transferrin izoelektrik odaklama elektroforezi ile normal ve CDG tip-I ve tip-II paternlerinin görünümü. Solda sialik asit sayıları belirtilmiştir.



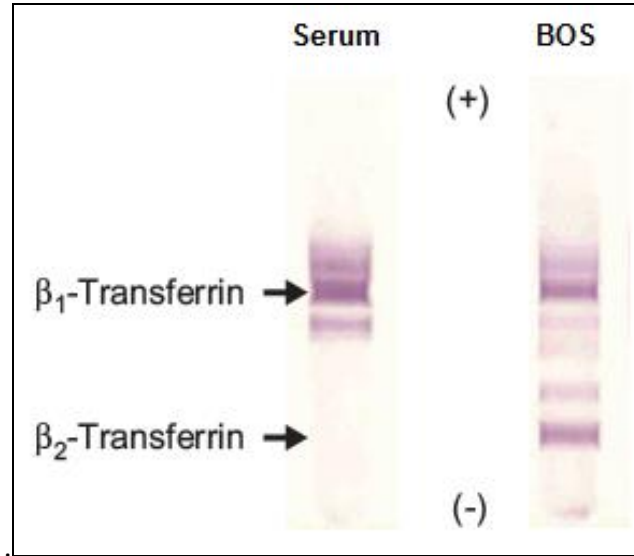
**Şekil 7.** CDG tanısı için önerilen tanısal algoritma.

## $\beta$ -2 transferrin

BOS sızıntısı, laserasyon, künt travma, cerrahi, inflamasyon, tümörler, konjenital malformasyonlar nedenleri ile görülebilmektedir. Sızıntının tedavi edilmemesi durumunda fistülden patojen bakteri geçişi ile vakaların yarısından fazlasında menenjit gelişmektedir. Bu nedenle bu sızıntının yerinin saptanması gereklidir. BOS sızıntısı burundan (rinore), dış kulak yolundan (otore), kafatası ya da omurganın herhangi bir yerinden oluşabilmektedir. Tanı için, sıvının  $\beta$ -2-Tf yönünden elektroforetik analizi, yüksek rezolüsyon CT, kontrastlı MR, cerrahi inceleme yapılabilmektedir. Girişimsel olmaması, ucuz olması, yüksek duyarlık ve özgüllüğü nedeni ile  $\beta$ -2-Tf ilk seçenek olmaktadır.

BOS'ta baskın olarak iki tip Tf izlenmektedir.  $\beta$ -1 serum ile aynı olup protein elektroforezinde serumda olduğu gibi beta-1 bölgesinde görülür.  $\beta$ -2-Tf ise daha katodal yürüyen asialo-Tf'dir. Serumda asialo-Tf normalde saptanmamaktadır (Şekil 8).

Fistül sıvısında  $\beta$ -2-Tf saptanması için İEO elektroforez, elektroforez/ immunofiksasyon, SDS-PAGE sonrası immunblotlama gibi teknikler kullanılabilir. Agaroz jelde yüksek rezolüsyonlu elektroforez sonrası anti-Tf antikor ile immunfiksasyon yöntemi de tanısal duyarlığı ve özgüllüğü yüksek metotlar arasındadır.



**Şekil 8.** BOS örneğinde  $\beta$ -2 transferrin.

## Kaynaklar

1. Deisenhammer F, Bartos A, et al. Guidelines on routine cerebrospinal fluid analysis. Report from an EFNS task force. *Eur J Neurol* 2006; 13:913-922.
2. Deisenhammer F, Bartos A, Egg R, Gilhus NE, Giovannoni G, Rauer S, Sellebjerg F, Tumani H. Routine cerebrospinal fluid (CSF) analysis. In: Gilhus NE, Barnes MP, Brainin M, editor(s). *European handbook of neurological management*. 2nd ed. Vol. 1. Oxford (UK): Wiley-Blackwell; 2011. p. 5-17.
3. Andersson M, Alvarez-Cermeno J, et al. Cerebrospinal fluid in the diagnosis of multiple sclerosis: a census report. *J Neurosurg Psychiatry* 1994; 57:897-902.
4. Katsavos S, Anagnostouli. Biomarkers in multiple sclerosis: an up to date overview. *Mult Scler Int* 2013; 2013: 340508.
5. Freedman MS, Thompson EJ et al. Recommended standard of cerebrospinal fluid analysis in the diagnosis of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005; 62: 865-870.
6. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: A critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clin Chem* 2001; 47: 13-27.
7. Hackler R, Arndt T, et al. Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the phastSystem. *Anal Biochem* 1995; 230:281-289.
8. Bortolotti F et al. Fully automated analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clin Chim Acta* 2007; 380: 4-7.
9. Schellenberg F, Girre C et al. Analytical evaluation of a new capillary electrophoresis method for carbohydrate-deficient transferrin measurement. *Clin Chim Acta* 2007; 382: 48-53.
10. Jeppsson JO, Arndt T, et al. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine Working Group on Standardization of Carbohydrate-deficient Transferrin (IFCC-WG-CDT). Toward standardization of carbohydrate deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med* 2007; 45: 558-562.
11. Schellenberg F and Wielders JPM. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's Capillarys System: intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off. *Clin Chim Acta* 2010; 411:23-24.
12. Goreta SS, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochem Med* 2012; 22: 156-70.
13. McCudden CR, Senior BA, et al. Evaluation of high resolution gel  $\beta$ 2-transferrin for detection of cerebrospinal fluid leak. *Clin Chem Lab Med* 2013; 51:311-315.
14. Bachmann-Harildstad G. Diagnostic values of beta-2 transferrin and beta-2-microglobulin as markers for cerebrospinal fluid fistula. *Rhinology* 2008; 46:82-85.

## İZOENZİM ELEKTROFOREZİ

Doç. Dr. Doğan Yücel

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü

### Tarihçe, Tanım ve Adlandırma

Enzimlerin farklı moleküler formlarının olduğu yaklaşık 65 - 70 yıl önce farkına varılan bir gerçeklikti. İlk kez 1959'da Markert ve Moller, aynı biyokimyasal tepkimeyi katalizleyen farklı protein yapılarını **izoenzim (izozim)** olarak adlandırdılar. Günümüzde de enzimlerin yapısal varyantları ve bunların fizyolojik ve tanısal önemi hala araştırılmakta ve bazı izozimler klinik laboratuvarlarda kullanılmaktadır.

Başlangıçta, genel olarak bir canlı türünde aynı tepkimeyi katalizleyen farklı enzim formlarına izoenzim denilmiştir. **International Union of Biochemistry (IUB)** tarafından 1964 yılında çeşitli enzim formlarının adlandırılışı üzerine bazı önerilerde bulunulmuş, bu öneriler daha sonra **IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN)** tarafından yeniden tekrar gözden geçirilmiş ve 1971'de yayımlanmıştır. İlk önerilen tanımda aynı tepkimeyi katalizleyen herhangi bir türdeki "multiple enzim formları"nın izoenzim (veya izozim) olarak adlandırılması önerilmektedir. Ancak, daha sonraki gelişmeler sonucu, aynı tepkimeyi katalizleyen enzimlerin çeşitli şekillerde birbirlerinden fark gösterdiği saptanmıştır. **Bunun üzerine, multiple enzim formu aynı türde aynı tepkimeyi katalizleyen enzim formlarını tanımlayan genel bir ifade olarak ele alınmış, izoenzim ya da izozim kavramı ise primer yapıdaki (amino asit yapısında) farkların genetik olarak belirlendiği durumlar için doğru bulunmuştur. Buna göre aynı primer yapının genetik olmayan yollardan modifikasyonu izoenzim olarak adlandırılmamalıdır.** Tek bir organ, hatta tek bir hücre içinde bile farklı izoenzimler bulunabilir. IUB, izoenzimlerin kalp tipi, kas tipi, beyin tipi vb. doku dağılımına göre adlandırılmasını da karışıklığa yol açması nedeniyle doğru bulmamaktadır.

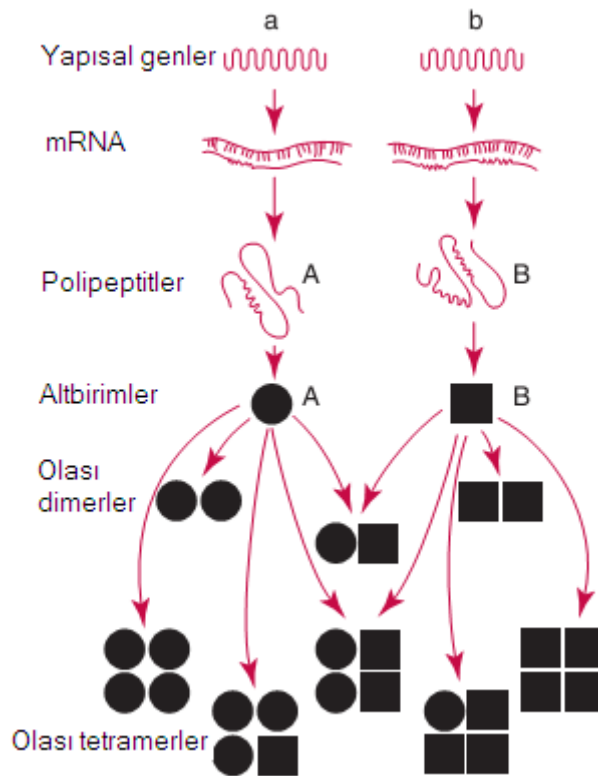
IUB'ye göre izoenzim olarak adlandırılacak enzim formları (1) genetik olarak bağımsız protein yapısı olan enzimler, örneğin CK ve malat dehidrogenaz enzimlerinin mitokondri ve sitozolik formları gibi; (2) CK ve LD gibi iki ya da daha fazla alt birimi olan enzimlerin heteropolimerleri; (3) protein yapısının genetik varyantları, örneğin insanda 150'den fazla varyantı olan glikoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi.

İlk raporda izoenzimlerin elektroforezdeki göçlerine göre ayrılması ve anoda doğru en fazla göç eden izoenzimin en küçük rakam ile (1 rakamı ile) numaralandırılması, diğer izoenzimlerin ard arda verilen numaralarla adlandırılması önerilmiştir. Numaralandırmada elektroforezin esas alınış nedeni elektroforetik ayırım yöntemlerinin basitliği ve rezolüsyonlarının daha üstün oluşudur. Dolayısıyla, izoenzimler aynı tepkimeyi katalizleseler de, katalitik özelliklerinde kantitatif farklılıklar olabilir.

**Enzim proteinini kodlayan birden fazla gen lokusu varsa gerçek izoenzimlerden söz edilebilir.** İnsanda var olan enzimlerin önemli bir bölümü, belki üçte birinden fazlası için, birden fazla yapısal gen lokusu vardır. Farklı lokuslardaki yapısal genler, evrim süresince farklı değişikliklere uğramışlardır. Ve sonuçta birbirlerine benzer ama gerçekte farklı enzim proteinleri (gerçek izoenzimler) üretilir olmuştur.

Farklı enzim formlarının ortaya çıkışında bir diğer etken, enzimin **oligomerik** oluşudur. Farklı altbirimlerin farklı birleşmeler yapması, farklı ama aktif enzim moleküllerinin ortaya çıkmasına yol açar. İzoenzimlerin altbiriminin olup olmaması, varsa bunların sayısı ve yapısı biyokimyasal özellikleri açısından da önemlidir. Eğer tüm altbirimler birincil, ikincil ve üçüncül yapılar açısından aynı ise, izoenzim bir **homopolimerdir**. Eğer altbirimler farklı yapısal genlerden (farklı lokus ya da alel) kaynaklanıyorsa, bu durumda izoenzim bir **heteropolimerdir**, bunlara **hibrit izoenzim** de denilmektedir. İyi bilinen bir örnek olarak kreatin kinaz (CK) ele alınırsa; CK bir dimerdir, birincil, ikincil ve üçüncül yapısı farklı M (kas) ve B (beyin) gibi iki altbirimi vardır; izoenzimleri CK-MM ve CK-BB homopolimerleri (homodimerleri) ile CK-MB heteropolimeridir (heterodimeridir). CK-MB bir hibrit izoenzimdir. Bir tetramer olan LD için ise LD-2, LD-3 ve LD-4 izoenzimleri heterotetramerdir ve hibrit izoenzimlerdir. Hibrit izoenzimlerin oluşumunda altbirimler arasındaki yapısal benzerliklerin önemi büyüktür. Hibrit izoenzimler gerek *in vivo*, gerekse *in vitro* koşullarda oluşabilmektedir (Şekil 1).

**Tüm izoenzimler enzimin özgün tepkimesini katalizleme özelliğindedirler ve aynı Enzim Komitesi (EC) numarasını alırlar.** Aynı tepkimeyi katalizleyen izoenzimlerin molekül ağırlıkları çok yakındır ancak, gene de her birinin farklı bir yapısı, substrat ve kofaktörler için farklı bir ilgisi vardır.

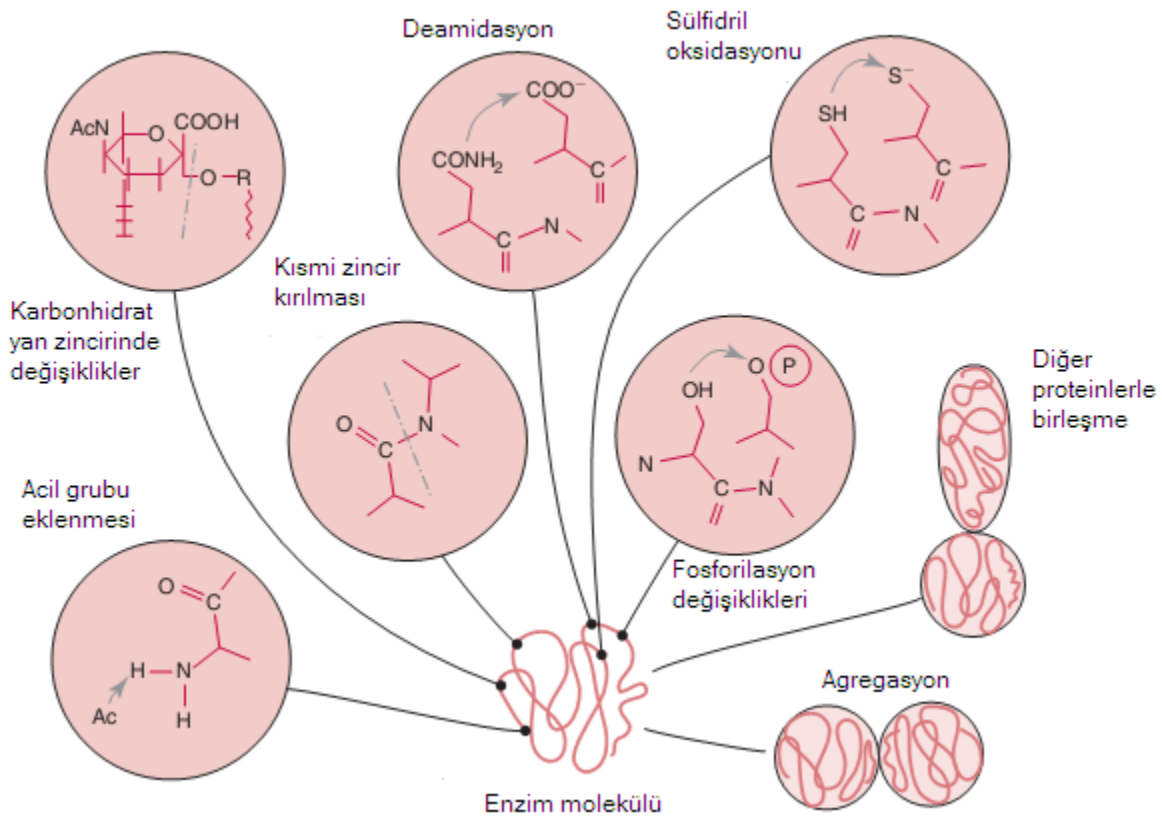


**Şekil 1.** Homopolimer ve heteropolimer özellikteki izoenzimlerin oluşumu. İki farklı gen lokusu ve bu gen lokusundan (a ve b) türeyen proteinlerin etkileşimi.



## Enzim izoformları

**Enzim izoformları ana protein yapısında translasyon sonrası değişiklikler sonucu oluşan farklı enzim formlarına denilmektedir.** İzoformlar da yapı ve biyokimyasal özellikler açısından farklılık gösterebilir. Bu modifikasyonlar: (1) Protein zincirinin koparılması (proteoliz) ve yıkımı; (2) enzim proteininin diğer proteinler ile birleşmesi; (3) enzim proteininin agregasyonu; (4) enzim molekülünün karbonhidrat yan zincirinin değişmesi; (5) fosforilasyon/defosforilasyon değişiklikleri; (6) protein zincirinde acilasyon; (7) deamidasyon; (8) asetilasyon, glikozilasyon, metilasyon; (9) sülfidril oksidasyonu gibi olaylara bağlıdır. Bu olaylar gerek *in vivo*, gerekse *in vitro* koşullarda (ekstraksiyon ya da depolama gibi) açığa çıkabilir. Bunlara ek olarak enzim moleküllerinin birbirleriyle veya enzim özelliği olmayan proteinlerle agregasyonu da izoform oluşumuna yol açar. Ayrıca, enzimler ile enzim özelliği olmayan proteinlerin etkileşmesi sonucunda az rastlanan, büyük moleküllü enzim - protein kompleksleri (makrokompleksleri) ortaya çıkabilir. Bu etkileşme enzim ile plazma immünglobulinlerinin birleşmesi şeklinde olur. Oluşan enzim – protein kompleksi katalitik aktivite gösterir ve **makroenzim** olarak adlandırılır. Bu özellikte olup bulunan ilk enzim “makroamilaz”dır. Bugün klinik laboratuvarlarda rutin ölçümü yapılan çoğu enzimin “makro” formlarının olduğu bilinmektedir. Makroenzimlerin oluşumunda yer alan başlıca immünglobulinler IgG ve IgA’dır. Ancak, enzimlerin immünglobulin dışı proteinler ile etkileşmesi sonucunda da makroenzimler oluşmaktadır.



**Şekil 2.** Enzim formlarının oluşumunda rol oynayan mekanizmalar.

## İzoenzim ve İzoform Analizi

İzoenzim ve izoform analizinde kullanılan yöntemler, enzim molekülündeki değişikliklerin neden olduğu katalitik ve yapısal değişikliklerin araştırılmasına dayanır. İzoenzimlerin amino asit dizilimindeki farklılıklar, dolayısıyla protein yapısındaki değişiklikler fizyokimyasal özelliklerinde az ya da çok değişikliklere yol açar; enzimin katalitik özelliklerinde, aktif bölge yapısında, substrat analoglarıyla verdiği tepkimelerde, izoelektrik noktasında (pI), yük dağılımında, hidrofob özelliğinde, Km değerinde, optimum pH'sında ve inhibitörlere yanıtında farklılıklara neden olur. Bu farklılıklar izoenzimlerin ayırımında ve ölçümünde kullanılmaktadır. Gen klonlama ve dizi analizi gibi moleküler biyoloji teknikleri izoenzimlerin birincil yapısının araştırılmasında büyük bir sıçrama sağlamıştır. Bugün enzimin birincil yapısındaki değişikliklerin farklı gen lokuslarından mı, farklı alellerden mi, yoksa translasyon sonrası değişikliklerden mi kaynaklandığı, bu tekniklerle saptanabilmektedir.

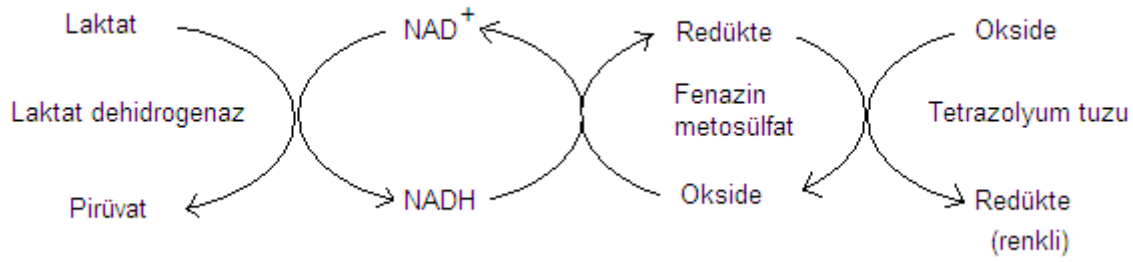
Farklı gen lokuslarından kaynaklanan izoenzimlerin katalitik özellikleri genellikle kantitatif olarak farklıdır. Bu farklar moleküler aktivite, Km değerleri, çeşitli inhibitörlere duyarlılığı, substrat analoglarına göre nispi hız değişikliklerinde kendisini gösterir. Translasyon sonrası değişikliklerden kaynaklanan enzim formları genellikle katalitik aktivite açısından benzerdir. Farklı gen lokuslarından kaynaklanan izoenzimlerin antijenik özellikleri de genellikle farklıdır. Sentez sonrası değişikliklerle oluşan enzim izoformları genellikle ortak antijenik determinatlara sahiptirler.

İzoenzimler arasında genellikle denatürasyona (ısı ya da konsantre üre çözeltileri kullanılarak) direnç farklılıkları vardır. Diğer enzim formları ise ya fark göstermez ya da az fark gösterir. İzoenzim çalışmalarında en çok moleküldeki amino asit diziliminin değişmesinden kaynaklanan net moleküler yük farklılıklarından yararlanır. İzoenzimlerin bu özelliği elektroforez, iyon değişim kromatografisi ya da izoelektrik odaklama teknikleri ile ayırımının esasını oluşturur. Molekül büyüklüğündeki değişiklikler jel filtrasyon tekniği kullanılarak ayırt edilebilirse de, gerçek izoenzimlerde olduğu gibi, eğer enzim molekülleri arasındaki farklar küçükse başarılı olunamaz. Ancak jel filtrasyon, agregasyon ya da enzimin başka proteinlerle birleşmesi sonucu oluşan izoformların ayırımında yararlıdır.

Özetle, izoenzim ve izoform analizinde elektroforetik tekniklerin yanı sıra denatürasyon teknikleri (ısı, kimyasal etkisi), kromatografik ve immünokimyasal teknikler ile katalitik özelliklerdeki farkların kullanıldığı teknikler kullanılmaktadır. Moleküler teknikler ise enzimin birincil yapısının ve polimorfizmlerin aydınlatılmasında yararlıdır.

## Elektroforez

İzoenzim analizinde en çok kullanılan teknik "zone" (bölge) elektroforezidir. Günümüze destek ortamı olarak en çok selüloz asetat ve jel kullanılır. Elektroforetik ayırım sonrasında izoenzim bölgelerinin saptanmasında enzim tepkimesinden yararlanır. Enzimatik aktivite sonucunda renkli bir presipitat oluşturulur. Örneğin LD için substrat olarak laktat kullanılır; laktatın oksidasyonu ara tepkimelerle tetrazolyum tuzlarının indirgenmesine bağlanır. Bir süre sonra tepkime durdurulur ve ortam seyreltik asetik asit ile muamele edilerek elektroforez bantları sabitleştirilir. İzoenzim bantlarındaki renk yoğunluğu enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır. İzoenzimlerin durumunu kantitatif anlamda görmek amaçlanıyorsa, dansitometre ile tarama yapılır bütün izoenzimlerin birbirine göre oranları saptanır.



Elektroforezde dikkat edilmesi gereken bir nokta, serum örneklerinin saklanması sırasında altbirimlerin ayrışması ya da yeniden birleşmesi, inaktivasyon ya da bazı izoenzimlerde değişiklikler sonucu elektroforez örüntüsünün değişebilmesidir. Örneğin CK ve LD için böyle değişiklikler belirlenmiştir. İzoenzim elektroforezi ile elde edilen oranların tekrarlanabilirliği genel olarak iyidir.

İzoelektrik odaklama da izoenzim analizlerinde kullanılmıştır. Burada protein molekülleri ortama elektrik verildiğinde pH gradyanına ve yüklerine göre izoelektrik noktalarına kadar sürüklenirler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Daha uzun süren bir işlemdir. Dezavantajı, enzimlerin kendi izoelektrik noktalarına karşılık gelen pH'da inaktive olabilmeleridir. Ayrıca, pH gradyanını oluşturmada kullanılan amfoter özellikteki maddelerle etkileşebilirler.

### İzoenzim/İzoform Elektroforezinin Klinik Kullanımı

İzoenzim ve izoform analizinde kullanılan materyal serum ya da plazmadır. Serum/plazmada enzim aktivitesini etkileyen en önemli etkenler, enzimin hücreden plazmaya çıkışını etkileyen etkenlerdir. Bu etkenler içinde enzimin hücreden salınış hızının etkilenmesi kadar enzim sentezindeki artış (örneğin belli hücre tiplerinde belli bir enzimin artışı ya da hücre proliferasyonu gibi) da önemlidir. Enzimlerin serumdaki bazal konsantrasyonlarından sorumlu olan normal hücre döngüsü (turnover) ve canlı hücrelerden salınım gibi etkenler izoenzimler için de geçerlidir. Klinik açıdan en çok çalışılanlar LD, CK, ALP izoenzim ve izoformlarıdır.

### Laktat Dehidrogenaz

Laktat dehidrogenaz bir tetramerdir ve iki alt ünitesi vardır: Kalp (Heart: H) ve kas (Muscle: M). Bu alt birimler çeşitli kombinasyonlar ile 5 farklı izoenzim oluştururlar:

- HHHH (LD-1; H<sub>4</sub>)
- HHHM (LD-2; H<sub>3</sub>M)
- HHMM (LD-3; H<sub>2</sub>M<sub>2</sub>)
- HMMM (LD-4; HM<sub>3</sub>)
- MMMM (LD-5; M<sub>4</sub>)

Bunların dışında 4 X (veya C) zincirinden oluşan ve LD-X olarak adlandırılan (LDC'de denir) altıncı bir izoenzim daha vardır; puberte sonrası insan testislerinde bulunur. Ağır hastalarda LD-6 olarak adlandırılan yedinci bir izoenzim de saptanmıştır. Bu izoenzimlerden anodik olanlar LD-1 ve LD-2 özellikle kalp kasında yoğunurlar. En katodik olan LD-5 iskelet kası ve karaciğerde baskındır. LD-3 ve LD-4 ise tüm dokularda farklı miktarlarda bulunan izoenzimlerdir. LD izoenzimleri geçmişte çok çalışılmıştır. Daha çok kalp hasarının göstergesi olarak kullanılmıştır. Normal serumda LD2 baskın izoenzimdir ve LD-1/LD-2 oranı genellikle  $<1$ 'dir. Miyokart infarktüsü (MI) sonrasında başlıca LD-1 ve bir miktar da LD-2 artışı olur ve bu nedenle LD-1/LD-2 oranı değişerek  $>1$  olur. Bu değişiklik MI tanısı için önemlidir. Bugün için klinik yararı sınırlıdır. Çünkü çok daha duyarlı ve özgül kardiyak troponinler bu amaçla kullanılmaktadır. Öte yandan LD, yukarıda belirtildiği gibi, hemen her dokuda bulunan bir enzimdir. Bu nedenle çakışmalar kaçınılmazdır. Örneğin LD-5, iskelet kası hasarını göstermek için kullanılır. Aynı zamanda karaciğerde de baskın izoenzimdir. Dolayısıyla LD-5 artışının kastan mı, karaciğerden mi kaynaklandığı daha ileri testler gerektirir. Ayrıca, LD-5 çeşitli tipte kanser hastalarının serumlarında da artmaktadır. Teratoma, seminoma ve overlerde disgerminoma gibi germ hücre tümörlerinde, olguların %63'ünde LD-1 yüksekliği görülmektedir. Bu açıdan özellikle testis germ hücre tümörlerinde LD-1 hastalığın takibinde yararlıdır. Beyin omurilik sıvısında (BOS) genellikle saptanamayan LD-4 ve LD-5, bakteriyel menenjitte yükselir; viral menenjitte ise lenfositöz nedeniyle LD-1, LD-2 ve LD-3'te artış olur.

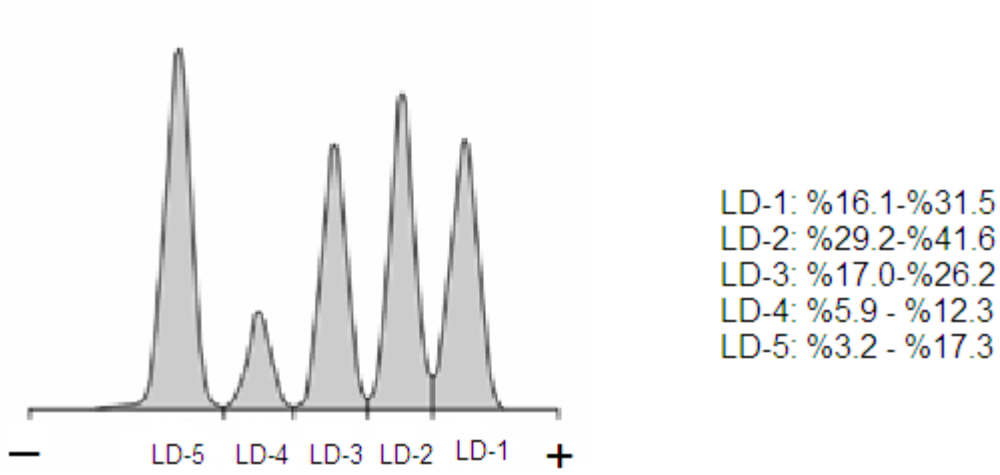
**LD izoenzimlerinin elektroforezi.** Elektroforezde agaroz jel veya selüloz asetat materyal kullanılır. Elektroforez işleminden sonra ortama LD tepkimesi için bir ayıraç sistemi yayılır. Ayıraç sisteminde laktat ve NAD bulunur; LD tepkimesi sonucu pirüvat ve NADH oluşur. NADH, 360-365 nm'de florometrik olarak saptanabilir. Ya da ortama bir tetrazolium tuzu [örneğin fenazin metosülfat (PMS)] eklenerek NADH tarafından indirgenmesi ve sonuçta mavi renkli formazan oluşması sağlanır (Şekil 3).

### Kreatin Kinaz

Kreatin kinaz (CK) bir dimerdir, iki alt biriminin (M ve B) kombinasyonu sonucu üç izoenzimi oluşur (Tablo 2).

- BB (CK-1)
- MB (CK-2)
- MM (CK-3)

Bu izoenzimlerin tümü de sitozolde ya da miyofibriler yapılarla birlikte bulunur. Bunların dışında immünolojik ve elektroforetik mobilite açısından diğerlerinden farklı dördüncü bir form vardır. Mitokondri iç ve dış zarı arasında bulunan bu izoenzim mitokondriyel CK (CK-Mt) olarak adlandırılmaktadır. Kalpte total CK aktivitesinin %15'ini CK-Mt oluşturur. CK'nın immünglobulinlerle birleşerek oluşturduğu "makro" formları da vardır. Makro-CK'nın hastaneye yatırılan hastaların %6'sında geçici olarak pozitif olduğu belirtilmektedir. Tip 1 ve tip 2 olarak adlandırılan iki formu vardır. Bınlardan tip 1 daha çok CK-BB'nin genellikle IgG ile oluşturduğu komplekstir. IgA ile de kompleksler oluşturur. Tip 2 oligomerik CK-Mt'dir ve daha çok ağır kanser veya karaciğer hastalarında, doku yetersizliği olan çocuklarda görülür. Kötü prognoza işaret eder.

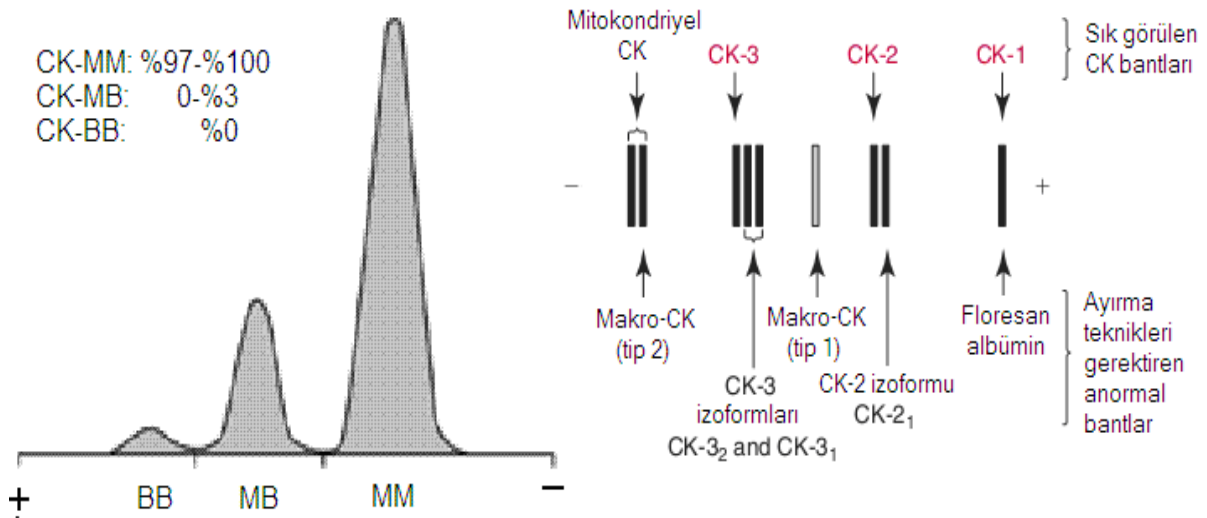


**Şekil 3.** Agaroz jelde LD izoenzimleri.

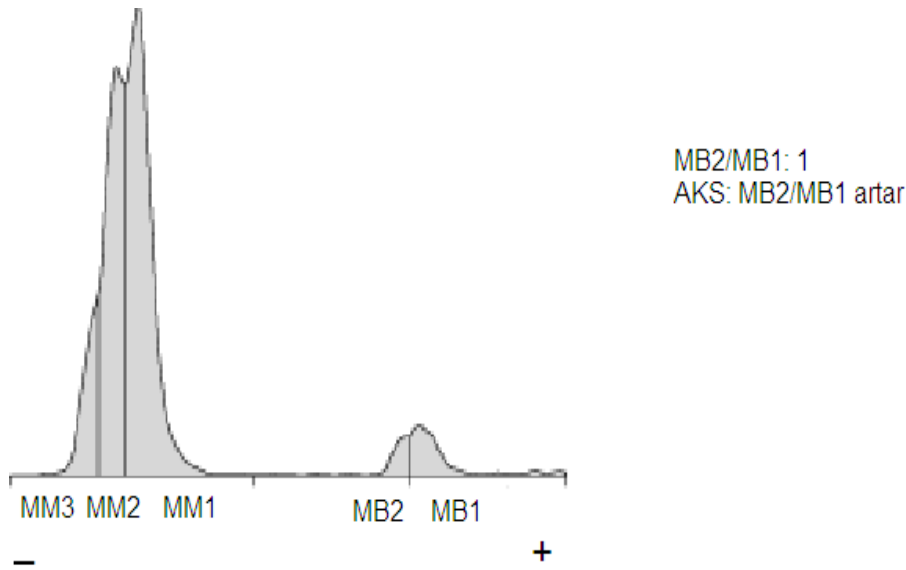
**Tablo 2.** Çeşitli dokularda seruma göre CK konsantrasyonu ve sitoplazmik izoenzim dağılımı.

Doku	Nispi CK aktivitesi	İzoenzimler (%)		
		CK-BB	CK-MB	CK-MM
İskelet kası (tip I)	50 000	< 1	3	97
İskelet kası (tip II)	50 000	< 1	1	99
Kalp	10 000	< 1	22	78
Beyin	5000	100	0	0
Gastrointestinal kanal	5000	96	1	3
Mesane	4000	92	6	2

**CK İzofomları.** CK'nın M ve B altbirimleri C terminalinde lizin amino asiti taşır. Bunlardan M zincirindeki lizinler karboksipeptidazlar tarafından koparılır. Böylece CK-MM izofomları oluşur. Bir altbirimdeki lizin uzaklaştırılmasıyla CK-MM<sub>2</sub> izofomu, her iki M altbirimindeki lizin koparılmasıyla CK-MM<sub>1</sub> izofomları oluşur. Enzimin doku formu ise CK-MM<sub>3</sub>'tür. Pozitif yüklü lizinlerin uzaklaştırılması, CK molekülünün negatif yükünü, dolayısıyla anoda doğru göçünü artırır. CK-MB'de ise tek M altbirimi olduğundan sadece bir CK-MB<sub>1</sub> izofomu oluşur. CK-MB<sub>2</sub> ise enzimin doğal halidir (doku izofomu). İzofomlar kanda oluşur, tek yönlüdür, lenfatik sistemde ya da doku nekrozunda oluşmaz (Şekil 4 ve 5).



**Şekil 4.** Agaroz jelde CK izoenzimleri (solda) ve CK izoenzimleri ve izofomları ile Makro-CK'nın elektroforez plağında yerleşimi (sağ).



**Şekil 5.** Agaroz jelde CK izofomları.

**Klinik Kullanım.** CK izoenzimlerinin en önemli kullanım alanı akut koroner sendromdur. Bu amaçla CK-MB kullanılır. Ancak miyokart için özgüllüğü düşüktür. Kalpte total CK aktivitesinin %14-42'sinden sorumludur. Kalp dışı kaslarda bu oran %10'u bulabilir. Geçmişte MI tanısı için LD izoenzimlerinin yanı sıra CK izoenzimlerinin çalışılması yararlıydı. Bugün daha özgül belirteçler bunların yerini tutmuştur. İskelet kası hasarı CK'da büyük artış yapar. Çünkü iskelet kası kalp kasından çok daha yüksek konsantrasyonda CK içerir. Dolayısıyla, küçük iskelet kası hasarları ya da hastalıkları kalp hasarındaki gibi CK-MB yükselmesine yol açabilir. Eğer kalp ve iskelet kası hasarı bir arada bulunmazsa, total CK yanı sıra CK-MB aktivitesi ölçülerek CK-MB aktivitesinin yükseliş nedeni hakkında hüküm verilebilir. Travma ve cerrahi gibi hem kalp, hem de iskelet kası hasarının birlikte olabileceği durumlarda CK-MB yerine diğer belirteçlerin (troponin gibi) kullanılması yararlı olacaktır. Bu nedenle perioperatif MI tanısında CK-MB'nin değeri düşüktür. CK-MB'nin total CK'ya oranı kas rejenerasyonunda da artar. Bu nedenle musküler distrofi ve polimiyozit durumunda CK-MB'nin total CK'ya oranı %5-15'i bulur.  $MB_2/MB_1$  oranı kalp hasarı için daha özgüldür, tanısız duyarlılığı semptomlardan 4-6 saat sonra %90'ı bulabilir. CK-MB kardioversiyon, açık kalp cerrahisi, kalp nakli, miyokardit, perikardit, pulmoner emboli gibi diğer kardiyak durumlarda da yükselir.

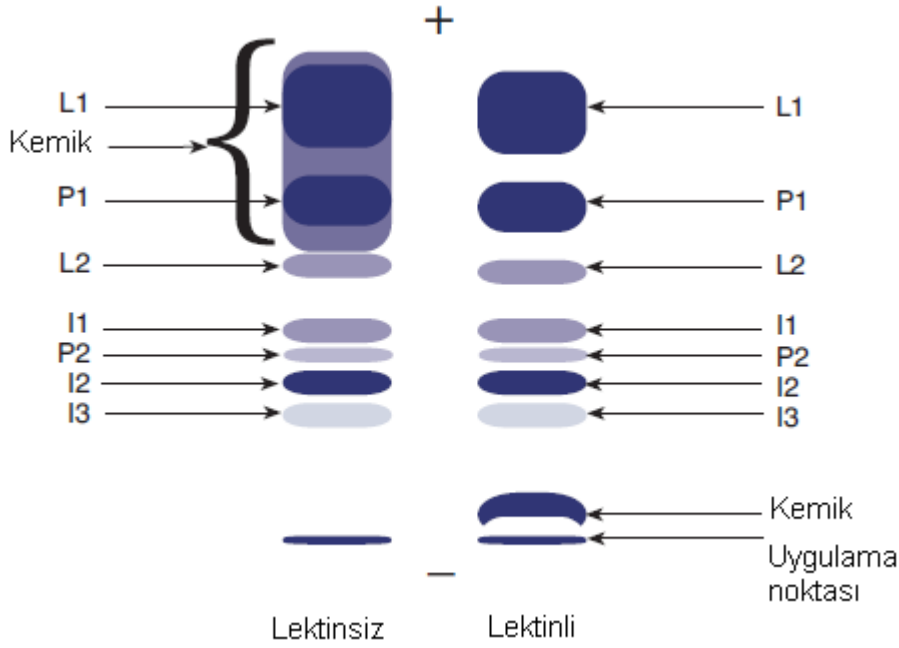
**CK izoenzimlerinin ve izoformlarının elektroforezi.** Elektroforezde destek ortamı agar, agaroz jel veya selüloz asetatıdır. Elektroforez sonrasında konsantre CK ayırıcı ile NADPH oluşturulur. Bu ürün 360-365 nm'de florometrik olarak okunur. Veya NADPH'nin bir tatzolium tuzunu indirgeyerek renkli formazan oluşturması sağlanır.

### Alkalin Fosfataz

ALP'nin çok sayıda farklı formu vardır. Bunların bazıları gerçek izoenzimdir. ALP izoenzimlerini kodlayan en az 4 yapısal gen vardır. Bunlardan plasenta, bağırsak ve germ hücresi ALP'lerini kodlayanlar farklıdır. Kemik, karaciğer ve böbrek kaynaklı ALP formlarının birincil yapısı aynıdır, aynı gen lokusu tarafından üretilirler. Bu gene "özgül olmayan doku geni" denir. Bu gen ürünü enzimlerin karbonhidrat içerikleri farklıdır. Sağlıklı bireylerin serumlarında toplam aktivitenin en büyük bölümünü karaciğer ALP'si oluşturur, kemik kaynaklı ALP de toplam aktivitenin yarısına kadar artabilir. Özellikle kan grubu B veya O olan bireylerin serumlarında bağırsak kaynaklı ALP de az miktarda bulunabilir. ALP'nin farklı "sialidasyona" bağlı en az 15 izoformunun olduğu belirtilmektedir.

**Klinik Kullanım.** ALP izoenzimlerinin gerekli olduğu haller: (1) ALP yüksekliğinin nedeni açık olmadığında ve öğrenilmesi gerektiğinde; (2) başlıca klinik sorunun karaciğerden mi, kemikten mi kaynaklandığını saptamak gerektiğinde; (3) metabolik kemik hastalıklarında hastalığın gidişini görmek ve tedaviyi düzenlemek için osteoblast aktivitesini değerlendirmek amaçlandığında.

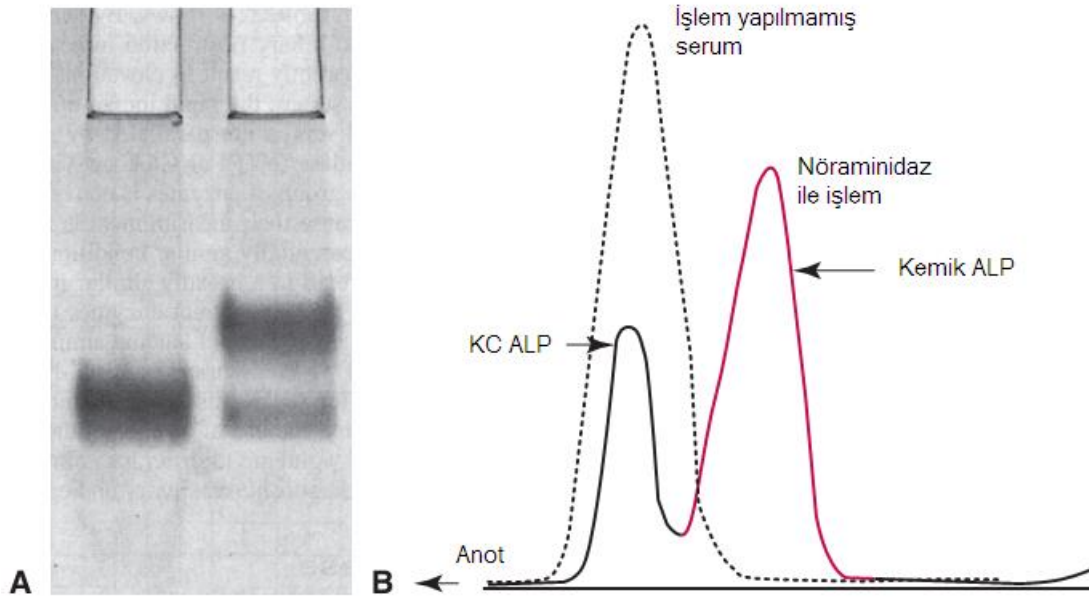
**ALP izoenzim elektroforezi.** Destek ortamı olarak selüloz asetat veya agaroz jel kullanılır. Elektroforez sonrasında ALP bölgeleri tampon ve ALP substratı (örneğin 1-naftil fosfat) ve kromojen sistem (genellikle diazonyum tuzu) ile muamele edilir. Anoda doğru en hızlı göçen karaciğer ALP'sidir. Kemik ALP'si, karaciğere göre daha diffüz bir bant verir ve anoda doğru biraz daha yavaş hareket eder. Ancak genellikle bu iki form çıkarılır. Bağırsak ALP'si, kemik ALP'sini izler. Plasenta ALP'si diffüz kemik bandı üzerinde farklı bir bant olarak görülür. ALP'nin Ig'ler ile yaptığı, klinik önemi olmayan kompleksler (makro - ALP) de vardır. Kemik ve karaciğer enzimlerinin ayırımında, izoenzimlerin karbonhidrat yapısındaki farklılıklardan yararlanır. Başlıca iki yöntem uygulanır. İlkinde elektroforez buğday lektini varlığında yapılır. Lektin kemik ALP'sinin göçünü yavaşlatır (Şekil 6).



**Şekil 6.** Agaroz jelde ALP izoenzimleri. Solda normal işlem, sağda lektin ile işlem sonrası.

Diğerinde serum 37 derecede 15 dakika nöraminidaz ile muamele edilerek terminal sialik asit grupları uzaklaştırılır. Kemik ALP'sinin sialik asit grupları daha kolay koparılır ve bu nedenle kemik formunun elektroforetik mobilitesi azalır. Elektroforez ile kantitatif ölçüm mümkündür.

Nöraminidaz ile uzun süre (bir gece) muamele bağırsak ALP'sinin varlığını saptama açısından yararlıdır. Uzun inkübasyon, bağırsak formları dışındaki formların anodal mobilitelerini azaltır. Bağırsak ALP'si bu işleme dirençlidir, çünkü sialik asit içermez (Şekil 7).



**Şekil 7.** Serumda kemik ve KC ALP'lerinin ayrımında PAGE. Serum nöraminidaz ile işlem görmeden ve gördükten sonra.

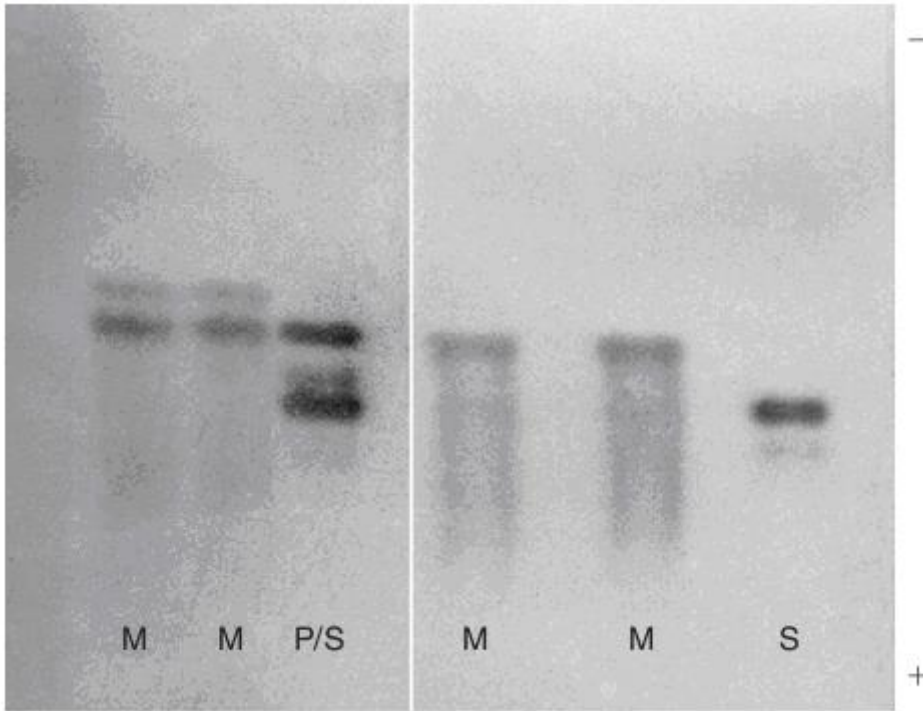


## Amilaz

Serumda amilaz (AMY) aktivitesinin başlıca kaynağı pankreas (P-AMY) ve tükürük bezidir (S-AMY). Bunlar gerçek izoenzimlerdir. AMY izoenzimlerinin translasyon sonrasında deamidasyon, glikozilasyon, deglikozilasyon gibi değişikliklere uğraması ile çok sayıda AMY izoformu oluşmaktadır. P-AMY glikozile olmaz; S-AMY'nin ise hem glikozile hem deglikozile formları vardır. Ayrıca makroamilazlar ile de karşılaşılabilir. Makroamilazlar idrar ile atılmadığından (molekül ağırlığı >200 000'dir) hiperamilazemi olarak görülür. Genellikle S-AMY'nin IgG veya IgA ile oluşturduğu komplekslerdir.

**Klinik Kullanım.** Pankreatik hastalıklarda (pankreatit ve pankreatik travma), karın içi olaylarda (safra yolları hastalığı, intestinal obstrüksiyon, mezenterik infarkt, perfore peptik ülser, gastrit, duodenit, aort anevrizması ruptürü, akut apandisit, peritonit, travma) P-AMY artar; genitoüriner hastalıklarda (ektopik gebelik ruptürü, salpenjit, malign over tümörü), tükürük bezi lezyonları, akut alkol toksikasyonu, diabetik ketoasidoz, septik şok, kalp cerrahisi, tümörler ve ilaçlara bağlı olarak S-AMY artışı olur; böbrek yetmezliğinde her iki izoenzim de yükselir.

**Amilaz izoenzim elektroforezi.** Normal erişkinlerde serumdaki total aktivitenin %40-50'sini P-AMY oluşturur. Makroamilaz, elektroforezde genellikle geniş bir bant olarak görülür (Şekil 8). Doğumdan sonra S-AMY aktivitesi sürekli artış gösterir ve 2 yaşında erişkin değerine yükselir. P-AMY aktivitesi yaşı 6 aydan küçük bebeklerde genellikle saptanamaz, bu yaştan sonra artarak 5 yaşında erişkin değerlerine ulaşır. Pankreas izoformları serum ve idrarda izoelektrik odaklama veya elektroforez teknikleri ile çalışılabilmektedir.



**Şekil 8.** Amilaz izoenzim elektroforezi. M: Makroamilaz; P/S: Pankreas ve tükürük amilazı karışımı; S: Tükürük amilazı.

## Kaynaklar

1. Panteghini M, Bais R. Serum enzymes. (Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2012; pp. 565-598, Elsevier Saunders, St. Louis.
2. Bais R, Panteghini M. Enzymes and rate analyses. (Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2012; pp. 355-377, Elsevier Saunders, St. Louis.
3. Karcher RE, Landers JP. Electrophoresis. (Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2012; pp. 287-305, Elsevier Saunders, St. Louis.
4. Hohnadel DC. Clinical enzymology. (Ed. Kaplan LA, Pesce AJ) Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 2010; pp. 281-301, Elsevier Mosby, St. Louis.
5. Sanhai WR, Christenson RH. Protein isoforms: isoenzymes and isoforms. (Ed. Kaplan LA, Pesce AJ) Clinical Chemistry. Theory, Analysis, Correlation. 2010; pp. 302-309, Elsevier Mosby, St. Louis.

## MUKOPOLİSAKKARİDOZLARIN TARAMASINDA İDRAR GLİKOZAMİNOGLİKAN (GAG) ELEKTROFOREZİ

Doç Dr. İncilay (Sinici) Lay

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı  
ve

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri, Merkez ve Acil Laboratuvarları, Ankara-Türkiye  
(isinici@hacettepe.edu.tr)

Mukopolisakkaridozlar (MPS), glukozaminoglikanların (GAG) yıkımında rol alan lizozomal enzimlerin kalıtsal bozuklukları sonucu oluşan bir grup lizozomal depo hastalığıdır. Yıkılamayan GAG'lar mezenkimal ve parankimal dokuların lizozomlarında birikir ve hücre, doku, organ fonksiyon bozuklukları oluşur. Kronik, ilerleyici ve multisistemik hastalıklardır. MPS'lerde klinik belirtiler birbirinden farklı olsa da ortak klinik bulgular mevcuttur: Kronik ve progresif seyir, multisistem tutulumu, organomegali, dizostozis multipleks, anormal kaba yüz görünümü, ilerleyici mental ve fiziksel gerilik, erken ölüm.



MPS tip II (X'e bağlı resesif) dışındaki tüm tipleri otozomal resesif kalıtım gösterir. İnsidansı genel olarak 1/25000'dir. Akriba evlilikleri oranının %21 olarak tespit edildiği ülkemizde insidansın daha fazla olduğu düşünülmektedir (1-3). Günümüze kadar 6 tipi ve birçok alt tipleri tanımlanmıştır. MPS'lerin farklı tiplerinde bozuk olan enzime göre 4 farklı GAG birikir ve idrarla çok fazla miktarda GAG atılır.

<i>MPS tipleri</i>	<i>Bozuk olan enzim</i>	<i>Biriken glikozaminoglikan (GAG)</i>
<b>MPS IH (Hurler Sendromu)</b>	$\alpha$ -L-İduronidaz	Heparan sülfat, Dermatan sülfat
<b>MPS IH-S (Hurler-Scheie Sendromu)</b>		

<b>MPS IS</b> <b>Scheie Sendromu</b>		
<b>MPS II</b> <b>Hunter Sendromu</b>	İduronat sülfataz *X-geçişli	Heparan sülfat, Dermatan sülfat
<b>MPS IIIa</b> <b>Sanfilippo Sendromu A</b>	Heparan N-sülfataz	Heparan sülfat
<b>MPS IIIb</b> <b>Sanfilippo Sendromu B</b>	$\alpha$ -N-Asetilglukozaminidaz ( $\alpha$ -heksozaminidaz)	
<b>MPS IIIc</b> <b>Sanfilippo Sendromu C</b>	$\alpha$ -Glukozaminid-N- asetiltransferaz	
<b>MPS III d</b> <b>Sanfilippo Sendromu D</b>	N-Asetilglukozamin-6- sülfataz	
<b>MPS IVa</b> <b>Morquio Hastalığı A</b>	Galaktozamin-6-sülfat sülfataz	Keratan sülfat, Kondroidin 6- sülfat
<b>MPS IVb</b> <b>Morquio Hastalığı B</b>	$\beta$ -Galaktozidaz	Keratan sülfat
<b>MPS VI</b> <b>Maroteaux-Lamy</b> <b>Hastalığı</b>	Arilsülfataz B (N-Asetilgalaktozamin-4- sülfataz)	Dermatan sülfat
<b>MPS VII</b> <b>Sly Sendromu</b>	$\beta$ -glukuronidaz	Heparan sülfat, Dermatan sülfat, Kondroidin 4,6-sülfat
<b>MPS IX</b> <b>Natowicz Sendromu</b>	Hyalüronidaz	Hyalüronik asit

Not: MPS tip V ve VIII yoktur.

Tanılarında, klinik bulguların yanında laboratuvarın büyük önemi vardır. Klinik bulgular doğrultusunda MPS'den şüphe edilen hastalarda laboratuvar tanı basamakları şu şekildedir:

- 1- MPS taraması: İdrarda atılan GAG'ların (eski adı mukopolisakkarit) ölçümü
  - A) İdrarda total GAG ölçümü:
 

Spot ve sabah ilk idrar örneğinde çalışılır. Örnekler soğuk zincir ile laboratuvara ulaştırılır. İdrarda total GAG miktarları mg/mmol kreatinin olarak değerlendirilir. İdrardaki GAG atılım miktarları yaşa bağlıdır. İnfantlarda erişkinlere göre idrarla GAG atılımı daha fazladır. Yeni tanı alacak olan MPS hastalarında idrarda total GAG miktarı yüksek beklenir.
  - B) İdrarda selüloz asetat elektroforezi ile 4 farklı GAG'ın tanımlanması:
 

İdrar total GAG miktarına göre elektroforeze uygulama yapılır. Biriken GAG tipine göre olası MPS tipleri ayırt edilir.
- 2- MPS tanısı: Lökosit veya fibroblast kültürlerinde spesifik enzim aktivite ölçümü, tanı için altın standarttır. Elektroforez ile ayırt edilen olası MPS tipleri için tam kandan lökositler izole edilerek spesifik enzim aktivite ölçümü yapılır. Fluoresan substratlar kullanılır ve fluorometre

ile ölçüm gerçekleştirilir. MPS tiplerinin her birinde o tipe özgü bozuk enzimin spesifik aktivitesi çok düşük bulunur.

- 3- MPS mutasyon analizleri: Lökosit spesifik enzim aktivitesi düşük bulunarak tanı almış MPS hastalarının DNA'ları izole edilerek bilinen veya bilinmeyen mutasyonlar tanımlanmaya çalışılır.
- 4- MPS prenatal tanı: Amniyon sıvısı veya koryonik villüs biyopsi kültür hücrelerinde spesifik enzim aktivite tayini veya mutasyon analizleridir. Gebelik durumunda yapılır. Genetik danışmanlık verilmesi gerekir.

MPS tiplerinin tanısı tedavi için önemlidir. Hastalara MPS I, MPS II, MPS IVA ve MPS VI için enzim replasman tedavisi uygulanmakta ve başarılı sonuçlar alınmaktadır (BioMarin Pharmaceutical ve Shire Pharmaceuticals Group). Kemik iliği ve umbilikal kord kan transplantasyonu kısıtlı vakada uygulanmıştır. Enzim replasman tedavisi dışındaki tedaviler semptomları düzeltmeye yöneliktir.

#### **İdrarda total GAG ölçümü:**

GAG'lar, tekrarlayan disakkarit (N-asetilglükosamin veya N-asetilgalaktozamin – glikuronik veya idüronik asit) birimlerinden oluşan, -COOH veya -OSO<sub>3</sub>H grubu taşıyan, asidik, dallanmamış, uzun zincirli polisakkaritlerdir. Deri, kıkırdak, kornea, damarlar, akciğer, karaciğer, kalp, omurga diskleri gibi dokularda bulduklarından MPS'lerde yıkılamayan GAGlar bu dokularda birikir. İdrar ile fazla miktarda GAG atılımı görülür. İdrarda total GAG miktarları mg/mmol kreatinin olarak değerlendirildiğinde örneklerde kreatinin ölçümü de yapılmalıdır.

- Prensibi Alcian Mavi 8GX boyası ile GAG'ların çöktürülmesine dayanmaktadır (4). Alcian Mavi 8GX boyası uygun şartlarda asidik GAG'lar ile çözünmez kompleksler oluşturur.
- Spot idrarda çalışılacaksa sabah ilk idrar alınmalıdır. 24 saatlik idrarda çalışılacaksa 24 saatlik idrar toplama kurallarına uyulmalıdır. 24 saatlik idrar miktarı ölçülmelidir. Örnekler soğuk ortamda (+4°C) saklanmalı ve gönderilmelidir. pH değeri >8 olan örnekler veya kreatinin değeri <2.5 olan idrar örnekleri çalışmaya alınmaz.
- İdrar örnekleri düşük devirde 5 dk santrifüj edilir ve süpernatant kullanılır. Standart olarak kondroidin-4-sülfat tip A kullanılır. İdrar süpernatantları ve bir seri hazırlanmış standart çözeltiler en son hacimde %0.05 (w/v) Alcian Mavi 8GX, 0.05M MgCl<sub>2</sub> ve 0.05 M pH 5.8 sodyum asetat olacak şekilde bu çözeltilerle karıştırılır. 4 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Alcian Mavi 8GX boyası asidik GAG'lar ile çözünmez kompleksler oluşturur. Düşük devirde 15 dk santrifüj ile total GAG-Alcian Mavi 8GX kompleksi çöktürülür. Çöken GAG-Alcian mavi kompleksleri etanol ile yıkanır ve düşük devirde 15 dk tekrar çöktürülür. %7.5 (w/v) SDS çözeltisi ile GAG-Alcian mavi kompleksleri çözülür. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyondan sonra kompleksten salınan Alcian mavi absorbansları 678 nm'de spektrofotometrede okunur. İdrar total GAG miktarı, kondroidin-4-sülfat standartları ile çizilmiş standart eğri ile hesaplanır.

Referans değerler ay ve yıla göre değişmektedir:

	mg/mmol kreatinin
0-1 ay	22 - 41
1-3 ay	9 - 39
3-6 ay	11 - 35
6-12 ay	4 - 31
12-24 ay	6 - 22
2-3 yıl	9 - 20
3-5 yıl	6 - 16
5-7 yıl	6 - 13
7-9 yıl	4 - 11
9-11 yıl	4 - 11
11-13 yıl	2 - 11
13-15 yıl	2 - 8
>15	1 - 5

#### **İdrarda selüloz asetat elektroforezi ile 4 farklı GAG'ın tanımlanması:**

MPS tiplerinin tanısı için altın standart olan spesifik enzim aktivite tayini öncesi, belirli MPS tiplerini tespit etmek için uygulanan ön testtir. Amaç, idrarla atılan GAG çeşidini tespit ederek, olası MPS tiplerini ayırt etmektir.

Çeşitli MPS'larda 4 değişik GAG bulunur. Bunlar:

- Kondroidin sülfat,
- Dermatan sülfat,
- Keratan sülfat,
- Heparan sülfattır.

Tek yönlü elektroforez tekniğidir. Keratan sülfat ve dermatan sülfatı selüloz asetat elektroforezi ile ayırt edemeyiz. 3 bant izlenebilir:

- 1- Kondroidin sülfat bandı
- 2- Keratan sülfat ve dermatan sülfat bandı
- 3- Heparan sülfat bandı

<b>Gözlenen GAG bandı/bantları</b>	<b>Olası MPS tipleri</b>
Heparan sülfat + Dermatan sülfat	MPS I veya MPS II
Heparan sülfat	MPS III
Keratan sülfat	MPS IV
Dermatan sülfat	MPS VI
Heparan sülfat + Dermatan sülfat + Kondroidin sülfat	MPS VII

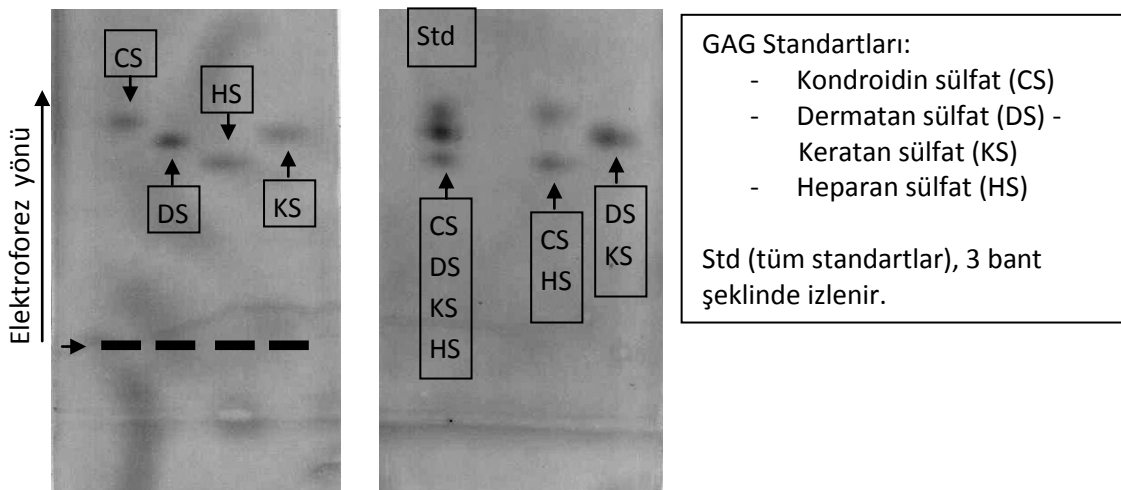
Selüloz asetat elektroforezinde yürütülerek ayrılan GAG bantları, yine Alcian Mavi 8GX ile boyanarak gözlenir.

- Elektroforeze uygulanacak idrar örneklerinin ön hazırlığı:

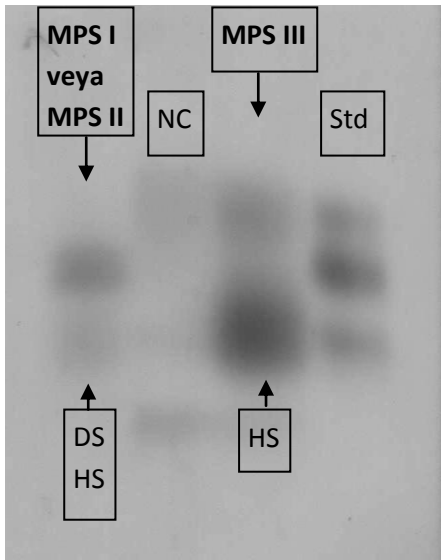
İdrar süpernatanı, miktarının 10 katı olacak şekilde %0.05 (w/v) Alcian Mavi 8GX, 0.05 M Mg Cl<sub>2</sub>, 0.05 M pH 5.8 sodyum asetat içeren çözelti ile karıştırılır. 2 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Düşük devirde 15 dk santrifüj ile GAG-Alcian Mavi 8GX kompleksi çöktürülür. Kompleks 4 M Na Cl-metanol (2:1, v/v) çözeltisi ile vorteksenerek çözülür. Serbest Alcian Mavi 0.1 M sodyum karbonat çözeltisi ile çöktürülür. 30 dk oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır. Düşük devirde 15 dk santrifüj edilir, süpernatan alınır. Süpernatana etanol eklenerek süpernatan içindeki GAG çöktürülür. 10 dk oda sıcaklığında inkübasyon sonrası santrifüj edilir, fazla etanolü uzaklaştırmak için süpernatan atılır. Bir gece GAG içeren çökelti etanolün uçurulması için kurutulur. Ertesi gün 50 µl H<sub>2</sub>O ile çözülür. Santrifüj sonrası süpernatan elektroforeze uygulanır.

- Total GAG miktarı 0.5 µg olacak şekilde idrar süpernatantları selüloz asetat membranına uygulanır. Ticari olarak temin edilen selüloz asetat membranları (5.7x14 cm, 200µ) %30'luk metanol içinde +4°C'da saklanmalıdır. Elektroforez uygulamasına geçmeden önce, membran distile su ile birkaç kez yıkanmalı ve metanol uzaklaştırılmalıdır. Membran, 0.05 M, pH 7.2 kalsiyum asetat tamponu ile 10 dk inkübe edilerek dengelenir. Son derişim her biri 0.25 mg/ml olacak şekilde kondroidin sülfat, dermatan sülfat, keratan sülfat, heparan sülfat standartları hazırlanır. İdrar süpernatantları total GAG miktarı 0.5 µg olacak şekilde ve standartları içeren çözelti elektroforez aplikatörü ile membrana uygulanır. Selüloz asetat membrana yüklenmiş örnekler 100 voltta 2 saat 0.05 M, pH 7.2 kalsiyum asetat tamponunda yürütülür. Yürütme işlemi bittikten sonra, membran elektroforez tankından alınarak metanol:glasiyal asetik asit:H<sub>2</sub>O (50:10:40, v:v:v) içinde hazırlanmış %0.5 Alcian mavi 8GX boya çözeltisi içine konulur. Boyama çözeltisi içindeki membran 5 dk 20 rpm hızdaki çalkalayıcı üzerinde boyanır. Membran boyama çözeltisinden çıkarılarak, arka planda gözlenen fazla boyanın uzaklaştırılması için metanol:glasiyal asetik asit:H<sub>2</sub>O (50:5:45, v:v:v) çözeltisi içine konularak yıkanır. Membran üzerinde gözlenen bantlar doğrultusunda yorumlama yapılır (4).

GAG Standartları:

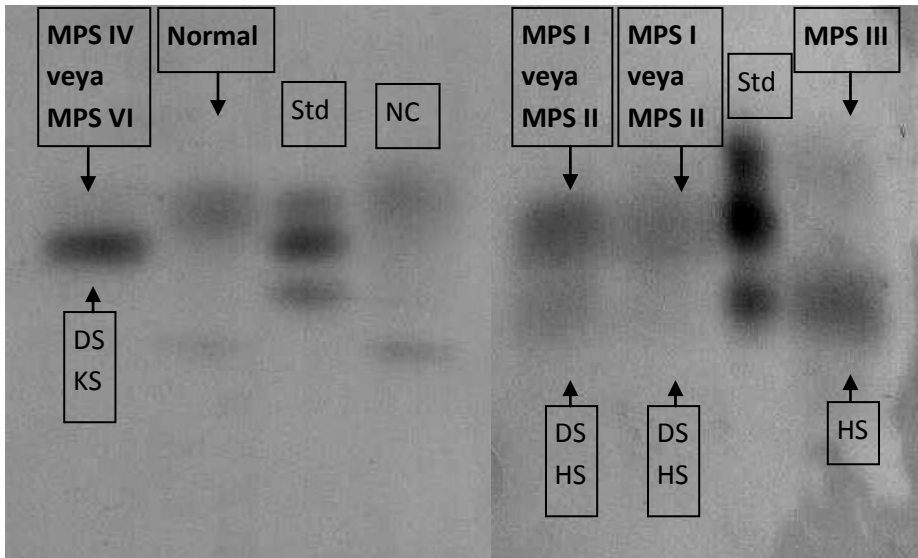


## Hasta örnekleri:



- DS + KS bandının görüldüğü hastanın lökositlerinde yapılan spesifik enzim aktivite tayini sonucu hastaya **MPS II** tanısı konuldu.
- NC: Sağlıklı bireylerden alınan kontrol amaçlı yüklenen idrar örneğidir.
- HS bandının görüldüğü hastanın lökositlerinde yapılan spesifik enzim aktivite tayini sonucu **MPS III** tanısını doğruladı.
- Std: GAG standartları

## Kalite Kontrol: ERNDIM örnekleri



ERNDIM (European Research Network for Evaluation and Improvement of Screening, Diagnosis, and Treatment of Inherited Disorders of Metabolism) kalite kontrol programı:

- ERNDIM programından hasta örnekleri gelmektedir.
- DS + KS bandının görüldüğü hastanın lökosit spesifik enzim aktivite tayini sonucu **MPS IV** tanısı konuldu.
- **Normal**: Sağlıklı bireylerin idrarlarında eser miktar CS bandı gözlenebilmektedir.
- NC: Sağlıklı bireylerden alınan kontrol amaçlı yüklenen idrar örneğidir.
- 2. Membranda ilk sütunda gözlenen DS + KS bandının görüldüğü hastanın lökosit spesifik enzim aktivite tayini sonucu **MPS II** tanısı konuldu.
- 2. Membranda ikinci sütunda gözlenen DS + KS bandının görüldüğü hastanın lökosit spesifik enzim aktivite tayini sonucu **MPS I** tanısı konuldu.
- HS bandının görüldüğü hastanın lökositlerinde yapılan spesifik enzim aktivite tayini sonucu **MPS III** tanısını doğruladı.
- Std: GAG standartları



**Kaynaklar**

- 1- Bařaran N, řaylı BS, Bařaran A. Consanguineous marriages in the Turkish population. Clin Genet 1988; 34:339-341.
- 2- Kılıç M, Kalkanođlu Sivri S, Tokatlı A, Dursun A, Cořkun T. Mukopolisakkaridozlar: 3 Yıllık Hacettepe Deneyimi. J LSD 2010;2(1):83.
- 3- Baehner F, Schmiedeskamp C, Krummenauer F, Miebach E, Bajbouj M, Whybra C, Kohlschütter A, Kampmann C, Beck M. Cumulative incidence rates of the mucopolysaccharidoses in Germany. J Inherit Metab Dis. 2005;28(6):1011-7.
- 4- Whiteman P. The quantitative measurement of Alcian Blue-glycosaminoglycan complexes. Biochem J. 1973 Feb;131(2):343-50.