

Embriyo İmplantasyonunu Destekleyen ve Hücre Proliferasyonunda Önemli Rol Oynayan İmmunosupresif Bir Protein: Erken Gebelik Faktörü

An İmmunosuppressive Protein Supporting Embryonic Implantation and Having An Important Role in Cell Proliferation: The Early Pregnancy Factor

Elvan Özbek, Nureddin Cengiz, Sevinç Yanar

Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Ana Bilim Dalı, Sakarya

Özet

İmmunosupresif özelliğe sahip bir protein olan erken gebelik faktörü (EGF) fertilizasyondan sonra yaklaşık 6-24 saat içerisinde maternal serumda tespit edilebilir ve pek çok canlı türünde gebeliğin ilk iki trimesteri boyunca üretilir. EGF'nin önemi sadece gebelik süreciyle sınırlı değildir. Yapılan çalışmalar EGF'nin tümör hücreleri, normal çoğalan hücreler ve aktif plateletler tarafından hücre büyümesi ve bölünmesi sırasında üretildiğini, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve doku yenilenmesi için de gerekli olduğunu göstermiştir. İnsan plateletinden izole edilen ve moleküler ağırlığı 10,843 Da olarak bulunan EGF'nin amino asit sıralamasının yüzde yetmiş belirlenmiş ve tek bir amino asit rezidüsü dışında sıçan mitokondriyal şaperon 10 (cpn 10) ile aynı olduğu tespit edilmiştir. EGF ile cpn 10'un aynı molekül olup olmadığı tartışmaları ise halen devam etmektedir. EGF tespitinde en çok kullanılan ve aynı zamanda en güvenilir test olan "rozet inhibisyon testi" (RIT) zahmetli, zaman alıcı ve hassas olması sebebiyle rutin kullanımda pratik olmamaktadır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda EGF aktivitesini ölçmek için RIT'a alternatif yeni yöntemlerin araştırılmasıyla birlikte bu alanda yapılacak çalışmalara hız kazandırılması amaçlanmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Erken gebelik faktörü , şaperon 10, rozet inhibisyon testi

Başvuru Tarihi: 01.08.2013 **Kabul Tarihi:** 06.08.2013

Abstract

Early pregnancy factor (EPF), identified as an immunosuppressive protein, can be detected in maternal serum within 6-24 hours of fertilization and is present for at least the first two trimester of pregnancy. Besides pregnancy, EPF is secreted by tumor cells, normal growing cells and active platelets during cell growth and division. It is also required for tumor proliferation and tissue renewal. Seventy per cent of the amino acid sequence of EPF derived from human platelets was determined and except from a single residue, it was identical to the sequence of rat mitochondrial chaperonin 10 (cpn 10). The molecular weight of the protein was found to be 10,843 Da. Whether EPF and cpn 10 are the same molecule or not is still discussed by many researchers. The rosette inhibition test (RIT) which is the most widely used and most reliable assay for EPF detection is not practical for routine utilization since it is laborious, time consuming and sensitive. Recently, it is expected to speed up the EPF studies by investigating novel assay systems that will be more practical than RIT.

Keywords: Early pregnancy factor, chaperonin 10, rosette inhibition test

Application: 01.08.2013 **Accepted:** 06.08.2013

Giriş

İmplantasyon öncesi dönemde maternal ve embriyonik dokular arasındaki ilişkiler, implantasyon ve gebelik sürecinin sağlıklı bir şekilde gerçekleşmesini sağlayan mekanizmaları aktive eder. İmplantasyon öncesinde gebeliğin ilk işareti östrojen ve progesteron seviyelerindeki değişiklikler ile başlatılan lokal endometriyal reaksiyondur. 1974

yılında Morton ve arkadaşları tarafından keşfedilen Erken Gebelik Faktörü (EGF) ise daha erken dönemde maternal sistemi immunolojik olarak implantasyona hazırlamaktadır.¹ Döllenmeyi izleyen 6-24 saat içerisinde konseptüse tepki olarak yumurtalıklardan salgılanan ve Rozet İnhibisyon Testi (RIT) ile tespit edilen EGF, bağışıklık sistemini baskılayıcı bir proteindir. Lenfositlerden supresor faktör üretimini başlatarak hücre-aracılı hipersensitivite reaksi-

yonları gibi bazı immunolojik tepkileri baskılama özelliğine sahip olan EGF maternal serumda bu kadar kısa bir sürede tespit edilebilmesi sebebiyle bu şekilde adlandırılmıştır.² İmmunosupresif faktor etkisi gösteren EGF'nin yeni oluşan embriyoya karşı maternal immun sistemin tepki göstermesini engellemesi çok önemlidir. Çünkü, gebelik ancak, embriyo annenin immun sisteminden kaçmayı başarabilirse gerçekleşir.³ EGF keşfedilmeden önce embriyonun implantasyon öncesi süreçte farkedilemeyeceği, bu sebepten de gebeliğin implantasyon gerçekleşene kadar tespit edilemeyeceği düşünülüyordu. Gebeliğin en erken işaretinin ise "Human Chorionic Gonadotropin" (hCG) olduğu kabul ediliyordu.⁴

Morton ve arkadaşlarının fare serumunda, döllenmeden sonraki 6 saat içinde EGF'nin tespit edilebileceğini göstermesinden sonra bu proteinin domuz, koyun, inek ve at gibi diğer pek çok memeli serumundaki aktivitesi de incelenmiştir. İnsanda EGF aktivitesi ise, yapılan çalışmalarda, maternal serum, idrar, fetal serum, amniyotik sıvı ve plasental ekstraktlarda tespit edilmiştir.³ EGF'nin vücutta bulunma süresi türlere göre değişmektedir; insanda ve kemirgenlerde gebeliğin ilk iki trimesteri boyunca varlığını devam ettirir. Yapılan bir çalışmaya göre embriyonun canlılığı ile yakından ilişkili olan EGF, embriyo transferinden sonraki 12 saat içerisinde ortaya çıkar ve embriyonun ölümü ya da alınmasını takiben 24-48 saat içerisinde kaybolur.⁵ Bu sonuç göstermektedir ki gebelik teşhisinin yanı sıra implantasyon başarısızlıklarını saptamak ve riskli gebeliklerin takibini yapabilmek açısından da EGF büyük önem taşımaktadır. EGF'nin önemi sadece gebelik süreciyle de sınırlı değildir. Yapılan çalışmalar EGF'nin tümör hücreleri, yetişkinlerde normal çoğalan hücreler ve aktif plateletler tarafından hücre büyümesi ve bölünmesi sırasında üretildiğini, tümör hücrelerinin proliferasyonu ve normal doku yenilenmesi için de gerekli olduğunu göstermiştir.⁶

Embriyonik canlılık için EGF'nin önemi

Canlı bir embriyonun göstergesi olan EGF embriyonun yaşama devam etmesi için de gereklidir. EGF'nin embriyo canlılığını sürdürmedeki rolü üzerine yapılan çalışmalar halen devam etmektedir. Bunun için bir çok araştırmacı

tarafından EGF aktivitesini nötralize edecek monoklonal ve poliklonal antikolar hazırlanmıştır. Athanasas-Platsis ve arkadaşları gebe farelerin monoklonal ve poliklonal antikolarla pasif immünizasyonu sonucu embriyonik canlılığın sona erdiğini göstermiştir.² Aynı grup yaptıkları diğer bir çalışmada pasif immunizasyonun gebeliğin çok erken safhalarında (1-2 hücreli evre) embriyoda gelişim geriliğine ve sonrasında implantasyon kusurlarına neden olduğunu göstermiştir.⁷ Bu çalışmayla pasif immunizasyonun pre-implantasyon sürecindeki etkilerini gösteren grup 2000 yılında yaptıkları bir başka çalışmada ise peri-implantasyon aşamasındaki etkilerini araştırmıştır. Post coitum (p.c.)^{3,5-4}. gün peri-implantasyon sürecindeki farelere verilen antikoların embriyoların implantasyonunu engellediği tespit edilmiştir. Bu çalışmalarla, EGF'nin iki önemli süreçte gerekli olduğu sonucuna varılmıştır: Bunlar 1-2 hücreli erken evre ve peri-implantasyon aşamalarıdır.⁸

Shahani'nin yaptığı bir çalışmada ise düşük EGF aktivitesinin klomifen sitrat tedavisi gören kadınlarda subklinik embriyo kayıplarına neden olduğu tespit edilmiştir.⁹ 2012 yılında gebe sıçanlar üzerinde poliklonal anti-EGF antikoları kullanarak pasif immunizasyonun pre-implantasyon sürecini nasıl etkilediğini araştıran Grosso ve arkadaşları çalışmanın sonucunda antikor uygulanan gruptaki embriyo sayısının kontrole kıyasla önemli derecede daha az olduğunu ve embriyoların gelişimlerinin daha geç gerçekleştiğini gözlemlemiştir. Ayrıca, antikor uygulanan sıçanlarda IL-10 ve INF- γ seviyeleri yükselirken, serum ve plasental TGF-Beta seviyelerinde önemli bir düşüş izlenmiştir.¹⁰

Tümör proliferasyonu için EGF'nin önemi

EGF sadece embriyonun canlılığının devamı için değil, aynı zamanda tümör hücreleri için de gereklidir. EGF'nin tümör hücrelerinin büyümesiyle ilgisi olduğu ilk olarak 1983 yılında Rolfe ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir. RIT ile yapılan çalışmada testis germ hücre tümörü bulunan hastaların serumunda EGF bulunduğu tespit edilmiştir. Sağlıklı erkek kontrollerde ya da non-germ hücre tümörü bulunan benign testis hastalığı olan hastalarda ise EGF'ye rastlanmamıştır.¹¹ Mehta ve Shahani ise yaptıkları çalışmada serumda EGF varlığının koryokarsi-

nom hastalarını belirleyebileceğini, aynı şekilde serum EGF aktivitesi olmayan hidatiform mol hastalıklarının da tespit edilebileceğini ifade etmişlerdir.¹²

Quinn ve arkadaşları EGF'nin tümör hücrelerinin büyümesine etkisini araştırmak amacıyla yaptıkları in vitro ve in vivo çalışmalarda monoklonal antikordardan faydalanmışlardır.^{13,14} EGF'nin tümör ve dönüşmüş (transforme) hücrelerin ürünü olduğunu belirleyen çalışma, bu hücrelerin devamlılıkları için de EGF'ye ihtiyaç duyduklarını ortaya koymuştur. Yani, embriyonik hücrelerin canlılıklarının devamı için otokrin büyüme faktörü rolü oynayan EGF tümör hücreleri için de aynı rolü oynamaktadır. Çalışmaya göre EGF üretimi hücre bölünmesi sırasında gerçekleşmekte ve büyüme durduktan sonra veya hücre farklılaşması durumunda ise üretim olmamaktadır. Anti-EGF antikordlarının artan dozlarda uygulandığı tümör hücresi kültüründe ise hücre büyümesinde ve canlılıkta önemli miktarda, doza bağlı bir düşüş olduğu gözlemlenmiştir.¹³

Quinn ve Morton yaptıkları bir diğer çalışmada tümör hücrelerinin in vivo olarak da canlılıklarını korumasında EGF'ye ihtiyaç duyduklarını göstermiştir.¹⁴ MCA-2 tümör hücreleriyle subcutan (s.c.) inoküle edilen CBA farelere 4 gün boyunca anti-EGF uygulanmış ve antikor uygulamasını takip eden 9. ve 13. günlerde ölçüm yapıldığında tümör boyutunda küçülme olduğu tespit edilmiştir. Tümör hücrelerinin DNA sentez hızı belirlendiğinde, anti-EGF antikordlarının tümörün büyümesini inhibe ettiği ortaya çıkarılmıştır. Serum EGF miktarının tümörün DNA sentez hızının inhibisyonuyla ilişkisi olduğunun saptanması, tümör hücrelerinin hücre bölünmesinin optimal seviyede tutulması için EGF'ye ihtiyaç duyduklarını doğrulamıştır.¹⁴

Doku yenilenmesi için EGF'nin önemi

EGF sadece çoğalmakta olan tümör hücreleri tarafından değil, aynı zamanda normal hücreler tarafından da üretilir. Hücre kültüründe büyütülen ve bölünmekte olan aktif primer hücrelerin de EGF ürettiği, yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur. Sıçan hipofiz hücreleri, köpek endotel hücreleri ve sıçan fibroblastlarının primer kültürlerinden elde ettiği uygun besi yerlerini test eden Quinn, 5 günlük inkübasyondan sonra besi yerinde EGF bulunduğunu

tespit etmiştir.¹⁵

Quinn ve arkadaşları başka bir çalışmada EGF'nin sadece kültür hücreleri tarafından değil, in vivo hücreler tarafından da üretildiğini göstermiştir. Sıçanda parsiyel hepatektomi operasyonundan 8 saat sonra serumda EGF tespit edilmiş ve 48 saat sonra da EGF miktarı tepe noktasına ulaşmıştır; 3 hafta içerisinde ise kaybolmuştur. EGF'nin operasyondan 18 saat sonra spesifik antikordlar kullanılarak pasif immünizasyon ile nötralize edilmesi sonucunda, geri kalan karaciğer kısmının H-thymidine alımında düşüş izlenmiştir. Parsiyel hepatektomiden kısa süre sonra serumda EGF gözlenmesi ve antikordların hepatik DNA sentezine olan inhibitör etkisi EGF'nin DNA sentezi ve hücre bölünmesi sırasındaki bir takım olaylar için gerekli olduğunu ve sonuç olarak da doku yenilenmesi sırasında EGF'nin oynadığı önemli rolü göstermektedir.¹⁶

EGF'nin biyolojik fonksiyonlarının çeşitli olması, bu proteinin geniş bir klinik kullanım alanına sahip olmasını sağlayacak önemli bir etkidir. Gebeliğin olabildiğince erken tespit edilebilmesi, yaşanan embriyo kayıplarını azaltmada büyük rol oynayacaktır. Çünkü, embriyo kayıpları en çok fertilizasyon ve implantasyon süreçleri arasında olmaktadır. EGF'nin tümör hücreleri tarafından da üretildiği bilgisi ise kanser teşhisi için alternatif bir yöntem olabileceğini göstermektedir. Ayrıca molekülün anti-tümör aktivitesine sahip olması, EGF'nin terapötik amaçla da kullanılabileceğini göstermektedir. EGF tespitinde yaygın olarak kullanılan RIT'a alternatif daha pratik ve uygulanması daha kolay yeni bir yöntemin geliştirilmesi, tüm bu çalışmalara hız kazandıracak ve molekülün klinik önemini arttıracaktır. Bu sayede, gelecekte EGF erken gebelik testi, kanser teşhisi ve belki de tedavisi gibi pek çok sağlık alanında rutin kullanıma sahip olabilecektir.

EGF'nin izolasyonu ve karakterizasyonu

1980'li yıllarda "erken EGF"nin pre-implantasyon ve implantasyon sürecinde anne vücudu tarafından, "geç EGF"nin ise implantasyondan sonra fetus tarafından salgılandığı düşünülmüyordu. 1990'lı yılların başında ise EGF'nin yumurtalıktan salgılandığı gösterilmiştir. Sueoka yaptığı araştırmasında besi yerindeki döllenmiş insan

yumurtasının EGF aktivitesinin yumurta gelişimi ilerledikçe arttığını ortaya koymuştur. Elde edilen sonuçlar, pre-implantasyon sürecinde EGF'nin iki formu olduğunu düşündürmektedir: yumurtalık kaynaklı ve döllenmiş yumurta kaynaklı. Sonuç olarak ise, EGF salgılanmasının yumurtalıkta başladığı ve daha sonra blastosist ile devam ettiği kabul edilmektedir.^{17,18}

EGF izolasyonunda kullanılan RIT'ın zahmetli ve zaman alıcı olması gibi bir takım zorlukları sebebiyle EGF'nin primer yapısının incelenmesi biraz zaman almıştır. Molekülün biyolojik yapısını anlayabilmek için protein purifikasyonu, kromatografik teknikler ve kütle spektrometrisi gibi çeşitli tekniklerden faydalanılarak analizler yapılmıştır. Çeşitli türlerde gebelik süresi boyunca EGF molekül ağırlığı ve aktivitesi belirlenmeye çalışılmış, gebelik dönemine göre serumdaki EGF büyüklüğünün değişiklik gösterdiği saptanmıştır. Gebeliğin çok erken dönemlerinde görülen büyük moleküler ağırlığa (>200 kDa) sahip EGF aktivitesi gebelik ilerledikçe kaybolmaktadır. İmplantasyondan sonra ise türden türe miktarı ve büyüklüğü çeşitlilik gösteren, daha küçük moleküler ağırlığa (yaklaşık 20-90 kDa) sahip EGF aktivitesi görülmektedir.¹⁹ 1984 yılında yaptığı in vitro çalışmada fareden elde ettiği EGF üzerine çalışan Cavanagh, EGF'nin farklı yerlerden sentezlenen EGF-A ve EGF-B olmak üzere iki birimden oluştuğunu ileri sürmüştür. EGF-A östrus ve gebelik sırasında oviduktta (Fallop tüpü) sentezlenirken, EGF-B pre-implantasyon sürecinde yumurtalıklardan, peri- ve post-implantasyon sürecinde de embriyo tarafından sentezlenmektedir.²⁰ EGF'nin yapısını incelemek için farenin dışında sıçan, koyun ve sığır gibi başka hayvanlar ile de çalışmalar yapılmıştır. İnseminasyondan 24 saat sonra koyun serumundan elde edilen EGF'nin moleküler ağırlığı 20 kDa iken, gebeliğin 3.-8. ayları arasında izole edilen EGF'nin moleküler ağırlığı 20 kDa ile 67 kDa arasında değişmektedir.²¹ İnseminasyondan 8 gün sonra sığır serumunda yapılan analiz sonucu 20 kDa ile 30 kDa arasında değişen 4 farklı moleküler ağırlığa sahip EGF tespit edilmiştir.²² Sıçan EGF'sini inceleyen Ikemizu ve arkadaşları ise immunoblotting analizi sonucunda purifiye EGF fraksiyonunda 22, 24 ve 28 kDa büyüklüklerinde üç bant bulunduğunu gözlemlemiştir.¹⁹

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmaların yanı sıra insan EGF'sinin özelliklerini incelemek üzere de pek çok araştırmacı tarafından çalışmalar yapılmıştır. Mehta ve arkadaşları gebeliğin 5. ve 12. haftaları arasında, insan serumundan izole ettikleri EGF'nin 21,5 kDa moleküler ağırlığa sahip olduğunu göstermişlerdir.²³ İnsan koryonik gonadotropininden EGF purifiye eden Sueoka ve arkadaşları, EGF aktif fraksiyonunun 24-30 kDa'luk bir glikoprotein olduğunu belirtmişlerdir.²⁴ İlerleyen yıllarda, insan plateletinden izole edilen ve moleküler ağırlığı 10,843 Da olarak bulunan EGF'nin amino asit sıralamasının yüzde yetmiş belirlenmiş ve tek bir amino asit rezidüsü dışında sıçan mitokondriyal şaperon 10 (cpn 10) ile aynı olduğu tespit edilmiştir.²⁵ Purifiye edilebilecek EGF miktarının çok az olması, purifikasyon materyali seçimi, RIT'ın zorlukları ve hassasiyeti EGF yapısını incelemeye güçlükler ve sonuçlarda farklılıklara neden olabilmektedir. Molekülün gebeliğin hangi döneminde ve nereden izole edildiği de sonuçlardaki farklılığın sebebidir.

EGF – Şaperon 10: Aynı molekül mü?

EGF'nin amino asit sıralamasının yüzde yetmişinin belirlenmesi ve tek bir amino asit rezidüsü dışında cpn 10 ile identik olduğunun keşfedilmesiyle birlikte pek çok araştırmacı bu iki molekül arasındaki benzerlikleri ve farklılıkları araştırmak amacıyla çeşitli çalışmalar yapmıştır. Cpn 10, moleküler şaperon olarak görev yapan bir ısı şok proteindir (heat shock protein; Hsp). Cpn 60'a bağlanarak onu stabilize eder, birlikte mitokondri ve kloroplastta protein katlanmasını yönetirler. Hsp'ler hücrelerde hayati önem taşıyan rollerde görev alırlar. Ateş, inflamasyon ve ilk embriyonik bölünme gibi acil ve olağanüstü durumlarda hsp konsantrasyonu çok hızlı bir şekilde artar. Hsp'lerin bu özelliği EGF'nin rol aldığı durumlar ile uyumlu olup embriyogenez, doku yenilenmesi ve tümör hücrelerinin büyümesi gibi durumlarda nasıl hızlı bir şekilde ortaya çıktığını açıklayabilir.⁶

Hibridizasyon tekniğinden faydalanan Summers ve arkadaşları, EGF protein sekansına uygun proplar kullanılarak insan melanoma cDNA kütüphanesinden cDNA klonu izole etmişler ve EGF kodlayan sekansın cpn 10 kodlayan sekans ile yüksek homoloji içerisinde olduğunu

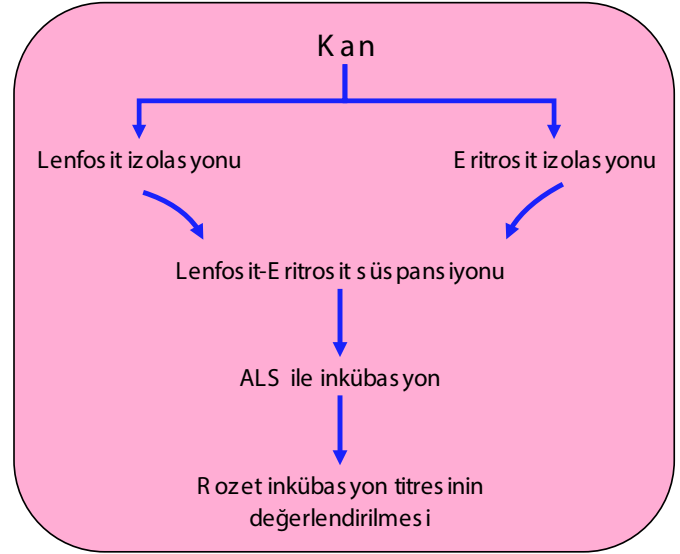
göstermişlerdir. Çalışmaya göre iki proteine ait genlerin de aynı gen ailesi içerisinde olabileceği düşünülmektedir. Ancak elde edilen EGF kopyalarının aktif genlere mi, yoksa pseudo (yalancı) genlere mi ait olduğu kesinlik kazanamamıştır.²⁶ Bu sonuç da göz önünde bulundurulunca EGF'nin cpn 10'un ekstrasellüler bir formu olduğu düşünülmektedir. Cpn 10, yumurtalık kanseri olan hastaların serumunda bulunması gibi, bazı neoplastik hastalıklarda ekstrasellüler boşluklarda bulunabilir. Bu durum ekstrasellüler cpn 10'un EGF ile aynı molekül olduğu, fakat lokasyona bağlı olarak farklı roller üstlendikleri fikrini güçlendirmektedir.¹⁸

İntrasellüler cpn 10, ekstrasellüler cpn 10 ve EGF'nin arasındaki ilişkiyi ortaya koymak üzere yapılmış pek çok çalışma mevcuttur. Ancak bu üç molekülün aynı genin (HSPE1) ürünü olup olmadığı hala kesin olarak bilinmemektedir. Kesin olarak bilinen şudur ki, en az iki varyant bulunmaktadır: intrasellüler ve ekstrasellüler cpn 10. Ancak pek çok araştırmacının tanımladığı gibi ekstrasellüler cpn 10'un EGF ile aynı molekül olup olmadığı kesin olarak ortaya konamamıştır. EGF izolasyonu ve karakterizasyonu için daha verimli ve güvenilir yöntemlerin belirlenmesi bu moleküller arasındaki ilişkinin tam olarak ortaya konmasını kolaylaştıracaktır.

Rozet inhibisyon testi

1960'lı yıllarda anti-lenfosit serumu (ALS), nakil yapılan böbreğin reddedilmesini engellemek amacıyla kullanılıyordu. Bach ve arkadaşları tarafından geliştirilen RIT'in ortaya çıkışı immunosupresyon için kullanılan ALS'nin potansiyelini değerlendirme ihtiyacından doğmuştur.²⁷ Eğer gebe serumunda fetusun reddini engelleyecek bir immunosupresif faktör varsa bu faktörün ALS'nin rozet inhibisyon titresini artıracığı düşünülmüştür. Bu düşünce de RIT'in modifiye edilip EGF'nin keşfedilmesini sağlamıştır. EGF tespitinde kullanılan RIT, ALS'nin lenfosit ve kırmızı kan hücreleri arasında meydana gelen ve çiçek şekline benzeyen rozet oluşumunu inhibe etmesi temeline dayanmaktadır (Şekil 1). Lenfositler daha önceden EGF ile inkübe edildiğinde ALS rozet oluşumunda daha fazla inhibisyona neden olmaktadır.²⁸

Şekil 1 : Rozet inhibisyon testi



EGF'nin keşfedilmesi ve karakterizasyonu için yapılan çalışmalar temelde RIT'a dayanmaktadır. Ancak bu aynı zamanda araştırmalarda kaydedilebilecek hızlı gelişimi engelleyen unsur olmuştur. RIT'in sahip olduğu dezavantajlar EGF'nin karakterizasyonu ve yapısının belirlenmesini güçleştirmiş, bu alanda yapılabilecek çalışmaların kısıtlanmasına neden olmuştur. Oldukça hassas olan bu test çok düşük konsantrasyonlarda EGF tespiti yapabilmekle beraber, yapılışı zahmetli, zor ve zaman alıcıdır. Örnek verilecek olursa kısırlarda gebelik tayin etmek için RIT yaparken önce test yapılacak kısırlardan serum alınması, sağlıklı başka bir attan lenfosit izolasyonu ve bu lenfositlere karşı tavşanlardan anti-serum (ALS) elde edilmesi, koyun, insan veya sıçanlardan eritrosit izole edilmesi gerekmektedir. Lenfositlerin gebelik tayini yapılacak hayvandan alınması yani direkt test yöntemi için ise ALS'nin türe özgü olması gerekmektedir. Bu yöntem fare, insan, domuz gibi bazı canlılarda uygulanabilecekken, fil ya da kanguru gibi daha egzotik türlerde önce serum örneklerinin fare analiz sisteminde test edilmesi gerekmektedir. Dolayısı ile RIT pratik bir test olarak kabul edilememektedir. Bu da güvenilir bir test olmasına rağmen erken gebelik teşhisi için rutinde kullanılmasının çok zahmetli olacağını göstermektedir.⁴

Kompleks bir test olan RIT, su kalitesine karşı oldukça hassastır. Lenfosit hücre yüzeyini etkileyecek en küçük

faktör bile yanlış sonuca ya da testin başarısız olmasına neden olmaktadır. Ancak test titizlikle çalışılır, damıtılmış su ve tek kullanımlık plastik kaplar kullanılırsa elde edilecek sonuçlar doğru ve tekrar edilebilir nitelikte olacaktır.⁴ RIT'in kantitatif ve spesifik olmayışı diğer dezavantajları olarak gösterilmektedir. Geçmiş yıllarda gebelik ile ilgili hCG ve plasental laktojen gibi başka bir çok protein daha incelenmiş ve RIT pozitif olarak bulunmuştur. Ancak daha sonra bu aktivitenin EGF'den kaynaklanan bir kontaminasyon sonucu meydana geldiği fark edilmiştir. Bu sonuçlar RIT'in spesifitesinin tartışmaya açık olduğunu göstermektedir.²⁹ Bütün kısıtlamalarına ve dezavantajlarına rağmen RIT, EGF tayininde hala en güvenilir test olarak kabul edilmekte ve pek çok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır.

Hayvanlarda EGF aktivitesi

1974'te Morton ve arkadaşlarının fare serumunda EGF'yi keşfetmelerinden sonra domuz, at, inek, geyik gibi pek çok hayvan türünde EGF aktivitesi incelenmiştir. Bunların büyük bir kısmını ise çiftlik hayvanları oluşturmaktadır. Verimli ve ekonomik çiftçilik için hayvanların her yıl yavru olması ve gebe hayvanların olabildiğince erken teşhis edilmesi önem taşımaktadır. Ayrıca, kısraklar üzerine yapılmış olan bir çalışmada da üreme verimindeki azalmanın ve subfertilitenin en önemli nedenleri arasında erken embriyo kaybının olduğu gösterilmiştir.³⁰ Dolayısıyla döllenmenin ve embriyonik gelişim aşamalarının incelenmesi üreme veriminin artırılması açısından da önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarda erken embriyo kaybını araştırmak için ultrasonografi, progesteron seviyesi, estron sulfat seviyesi ve EGF aktivitesi incelenmesinden faydalanılmış, bunlar arasından EGF aktivite ölçümünün diğerlerine göre çok daha kısa sürede bilgi vermesi sebebiyle en uygun yöntem olduğu sonucuna varılmıştır.³¹

1980'li yıllardan bu yana en yaygın RIT olmak üzere çeşitli yöntemler kullanılarak farklı hayvanlarda EGF aktivitesi tespit edilmiştir. Gebe sıçan serumunda EGF aktivitesini inceleyen Ikemizu ve arkadaşları amonyum sulfat fraksiyonlama, iyon kromatografisi, afinite kromatografisi ve immunoblotting tekniklerini kullanmışlardır. Immunoblotting sonucu EGF fraksiyonunda 22, 24 ve 28 kDa olmak

üzere üç bant elde etmişler ve EGF'nin EGF-A ve EGF-B olmak üzere iki komponentten oluştuğunu belirtmişlerdir.¹⁹ Üreme döngüsünün farklı fazlarındaki 40 domuzda RIT ile EGF taraması yapan Knotek, yöntemin domuzlar için de başarılı olduğunu ve inseminasyondan sonraki bir hafta içinde gebeliğin tespit edilebileceğini göstermiştir.³² Domuzlar ile yapılan başka bir çalışma ise EGF'nin gebeliğin ortalarında azalmasına rağmen gebelik süresince üretildiğini ortaya çıkarmıştır. EGF-A gebeliğin ilk üç haftasında bazı domuzlarda üretilirken bazılarında üretilmemektedir.³³ EGF ile embriyo canlılığını izleyen Sakonju ve arkadaşları, doğal östrus siklusu esnasında ve süperovulasyon tedavisi sonrasında artifisyal inseminasyon uygulanmış sığırlarda RIT ile EGF aktivitesinin ölçülerek embriyonal canlılığın takip edilebileceğini bildirmişlerdir.³⁴ Gebe sığır ekstraktı ve in vitro döllenmiş ovum kültür besiyerinde EGF tayini yapıldığında ise her iki örnekte de EGF aktivitesine rastlanılmıştır.¹⁷

At yetiştiriciliğinde üreme sezonunun kısa olması sebebiyle kısraklarda gebeliğin en kısa sürede tayin edilmesi önem taşımaktadır. EGF aktivitesinin RIT ile ovulasyondan 2 gün sonra gebe kısrağın serumunda tespit edilebileceği bildirilirken, kısraklarda embriyonik canlılığı izlemede de EGF tespitinin iyi bir yöntem olduğu belirtilmiştir.³¹ Ultrafiltrasyon ve iyon kromatografisi kullanılarak gebe kısraklardan pürifiye edilen EGF'nin moleküler ağırlığı 25.8 kDa olarak bulunmuştur.³⁵ Bufalolarda da EGF tespiti ile gebelik tayini yapılabileceği ise Mavedati ve arkadaşları tarafından gösterilmiştir.³⁶ EGF sentezinin implantasyon ile ilişkili olup olmadığını belirlemek isteyen Lash ve arkadaşları ala geyiklerde (*Cervus elaphus*) yaptıkları çalışmada EGF sentezinin pre-implantasyon ile ilişkili olduğunu ancak molekülün konsantrasyonunda görülen sonraki artışın blastosist oluşumundan kaynaklandığını savunmuşlardır.³⁷ Gebelik sürecinin diğer memelilere göre daha farklı seyrettiği keseli hayvanlarda EGF üretimini izlemek isteyen araştırmacılar *Sminthopsis macroura* türünü kullanmışlardır. 10.7 günlük gestasyon periodunun ilk 9 gününde izlenen EGF, 10. günde artık gözlenmemiştir. Yumurtalıkların immunohistokimyasal analizi ise EGF'nin korpus luteumda kapillerlerde, interstisyel alanlarda ve sekreteruar hücrelerde bulunduğunu göstermiştir.³⁸

Kaynaklar

1. Morton H, Hegh V, Clunie GJA. Immunosuppression detected in pregnant mice by rosette inhibition test. *Nature* 1974; 249:459-460.
2. Athanasas-Platsis S, Quinn KA, Wong TY, Rolfe BE, Cavanagh AC, Morton H. Passive immunization of pregnant mice against early pregnancy factor causes loss of embryonic viability. *J Reprod Fertil* 1989; Nov;87(2):495-502.
3. Jia H, Halilou AI, Hu L, Cai W, Liu J, Huang B. Heat shock protein 10 (Hsp10) in immune-related diseases: one coin, two sides. *Int J Biochem Mol Biol* 2011; 2(1):47-57.
4. Morton H. Early pregnancy factor: an extracellular chaperonin 10 homologue. *Immunol Cell Biol* 1998; 76(6):483-96.
5. Morton H, Rolfe BE, Cavanagh AC. Ovum factor and early pregnancy factor. *Curr Top Dev Biol* 1987; 23:73-92.
6. Cavanagh AC. Identification of early pregnancy factor as chaperonin 10: implications for understanding its role. *Rev Reprod* 1996; 1(1):28-32.
7. Athanasas-Platsis S, Morton H, Dunglison GF, Kaye PL. Antibodies to early pregnancy factor retard embryonic development in mice in vivo. *J Reprod Fertil* 1991; 92(2):443-51.
8. Athanasas-Platsis S, Corcoran CM, Kaye PL, Cavanagh AC, Morton H. Early Pregnancy Factor is Required at Two Important Stages of Embryonic Development in the Mouse. *Am J Reprod Immunol* 2000; 43(4):223-33.
9. Shahani SK, Moniz CL, Gokral JS, Meherji PK. Early pregnancy factor (EPF) as a marker for detecting subclinical embryonic loss in clomiphene citrate-treated women. *Am J Reprod Immunol* 1995; 33:350-353.
10. Grossoa MC, Bellingieri RV, Schadeb R, Viva AB. Neutralization of early pregnancy factor by passive immunization alters normal embryonic development and cytokine balance. *Inmunologia* 2012; 31(4):106-114.
11. Rolfe BE, Morton H, Cavanagh AC. Detection of an early pregnancy factor like substance in sera of patients with testicular germ cell tumors. *Am J Reprod Immunol* 1983;3(2):97-100.
12. Mehta AR, Shahani SK. Detection of an early pregnancy factor like activity in women with gestational trophoblastic tumors. *Am J Reprod Immunol Microbiol* 1987;14(3):67-9.
13. Quinn KA, Athanasas-Platsis S, Wong TY, Rolfe BE, Cavanagh AC, Morton H. Monoclonal antibodies to early pregnancy factor perturb tumour cell growth. *Clin Exp Immunol* 1990;80(1):100-8.
14. Quinn KA, Morton H. Effect of monoclonal antibodies to early pregnancy factor (EPF) on the in vivo growth of transplantable murine tumours. *Cancer Immunol Immunother* 1992;34(4):265-71.
15. Quinn KA. Early pregnancy factor: a novel factor involved in cellular proliferation. Phd thesis. University of Queensland, Brisbane, Queensland, Australia. 1991.
16. Quinn KA, Cavanagh AC, Hillyard NC, McKay DA, Morton H. Early pregnancy factor in liver regeneration after partial hepatectomy in rats: Relationship with chaperonin 10. *Hepatology* 1994;20(5):1294-302.
17. Ito K, Ikemizu Y, Takahashi J, Yasuda Y, Kawahata K, Goto T. Early pregnancy factor: EPF-like substances purified from pregnant bovine ovary and in vitro fertilized ovum culture medium. *J Reprod Dev* 1995;41(1): 85-92.
18. Corrao S, Campanella C, Anzalone R, Farina F, Zummo G, Conway de Macario E, et al. Human Hsp10 and Early Pregnancy Factor (EPF) and their relationship and involvement in cancer and immunity: Current knowledge and perspectives. *Life Sci* 2010;86(5-6):145-52.
19. Ikemizu Y, Yamazaki S, Takahashi J, Yasuda Y. Isolation and purification of early pregnancy factor EPF in rat serum. *J Reprod Dev* 1996; 42(1): 41-45
20. Cavanagh AC. Production in vitro of mouse early pregnancy factor and purification to homogeneity. *J Reprod Fertil* 1984;71(2):581-92.
21. Wilson S, McCarthy R, Clarke F. In search of early pregnancy factor: Isolation of active polypeptides from pregnant ewes' sera. *J Reprod Immunol* 1983;5(5):275-86.
22. Ito K, Yamamoto, Takahashi J, Yasuda Y. Purification of early pregnancy factor from cattle sera. *Anim Sci Technol* 1992;63:394-397.
23. Mehta AR, Eessalu TE, Aggarwal BB. Purification and characterization of early pregnancy factor from human pregnancy serum. *J Biol Chem* 1989;264(4):2266-71.
24. Sueoka K, Dharmarajan AM, Miyazaki T, Atlas SJ, Wallach EE. In vivo and in vitro determination of components of rabbit early pregnancy factors. *J Reprod Fertil* 1989;87(1):47-53.
25. Cavanagh AC, Morton H. The purification of early-pregnancy factor to homogeneity from human platelets and identification as chaperonin 10. *Eur J Biochem* 1994;222(2):551-60.
26. Summers KM, Murphy RM, Webb GC, Peters GB, Morton H, Cassidy AI. The Human Early Pregnancy Factor/Chaperonin 10 Gene Family. *Biochem Mol Med* 1996;58(1):52-8.
27. Bach JF, Antoine B. In vitro detection of immunosuppressive activity of antilymphocyte sera. *Nature* 1968; 217 658-659.
28. Morton H. Early Pregnancy Factor (EPF): a Link between Fertilization and Immunomodulation. *Aust J Biol Sci* 1984;37(5-6):393-407.

29. Rolfe BE, Morton H, Clarke FM. Early Pregnancy Factor is an immunosuppressive contaminant of commercial preparations of human chorionic gonadotrophin. *Clin Exp Immunol* 1983;51(1):45-52.
30. Ball BA, Little TV, Hillman RB, Woods GL. Pregnancy rates at Days 2 and 14 and estimated embryonic loss rates prior to Day 14 in normal and subfertile mares. *Theriogenology* 1986; 26:611-619.
31. Takagi M, Nishimura K, Oguri N, Ohnuma K, Ito K, Takahashi J, et al. Measurement of early pregnancy factor activity for monitoring the viability of the equine embryo. *Theriogenology* 1998;50(2):255-62.
32. Knotek Z. Demonstration of Early Pregnancy Factor in Gilts During the Reproductive Cycle. *Acta Vet Brno* 1990, 59: 35-40 .
33. Morton H, Morton DJ, Ellendorff F. The appearance and characteristics of early pregnancy factor in the pig. *J Reprod Fertil* 1983;69(2):437-46.
34. Sakonju I, Enomoto S, Kamimura S, Hamana K. Monitoring bovine embryo viability with early pregnancy Factor. *J Vet Med Sci* 1993;55(2):271-4.
35. Ohnuma K, Ito K, Takahashi J, Nambo Y, Miyake Y. Partial purification of mare early pregnancy factor. *AJRI* 2004; 51:95-101
36. Mavedati O, Rastegarnia A, Habibian R, Bari YN, Bandarian E. Early Pregnancy Diagnosis in Water Buffalo by Early Pregnancy Factor Measurement Using Rosette Inhibition Test. *Global Veterinaria* 2013;10(4): 391-393
37. Lash GE, Legge M, Fisher M. Synthesis of Early Pregnancy Factor Using Red Deer (*Cervus elaphus*) as a Delayed Implantation Model. *J Assist Reprod Genet* 1997;14(1):39-43.
38. Cruz YP, Selwood L, Morton H, Cavanagh AC. Significance of serum early pregnancy factor concentrations during pregnancy and embryonic development in *Sminthopsis macroura* (Spencer) (Marsupialia: Dasyuridae). *Reproduction* 2001;121(6):933-9.