

## İMMUNOLOJİK YÖNTEMLERLE HORMON TAYİNLERİ VE ZAMAN AYIRIMLI FLUORESANS

### DETERMINATION OF HORMONES BY IMMUNOASSAYS AND TIME - RESOLVED FLUORESCENCE

Huriye KARŞILAYAN\*

---

#### SUMMARY

Immunoassays based on the formation of antibodyhormone conjugates have been widely used in clinical chemistry for the determination of hormones. In this field radioimmunoassays have been extensively applied since 1960. Although extremely sensitive and quite precise, these assays have several drawbacks. In recent years, alternative methods used enzymes, chemiluminescent and fluorescent sustances as labels have been developed. By the use of Eulabelled antibody or hormone, and time - resolved fluorescence measurement, new possibilities towards more. sensitive immunoassays have been opened.

#### ÖZET

Kliniklerde hormon tayinlerinde yaygın olarak uygulanan immunolojik yöntemler antikor - hormon konjugatları oluşumunu esas almaktadır. Bu alanda, radyoizotopik yöntemler 1960 yılından beri kapsamlı olarak uygulanmaktadır. Fazlasıyla hassas ve doğru sonuç vermesine karşın bunların bazı olumsuz yanları da vardır. Son yıllarda işaretleyeci olarak enzimlerin, kemilüminesans ve fluoresans veren maddelerin kullanıldığı alternatif yöntemler geliştirilmiştir. Eu - işaretli antikor veya hormon kullanılması ve zaman ayırmalı fluoresans ölçüm şekli, daha hassas immunolojik yöntemler için yeni olasılıklar yaratmıştır.

---

\* Yıldız Teknik Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü,  
Şişli / İSTANBUL.

## GİRİŞ

Biyolojik örneklerde hormon tayinlerinde uygulanan immunolojik yöntemler antijen ve antikorun birbirine bağlanarak konjugat oluşturma reaksiyonunu esas almaktadır. İşlemden yer alan antijen veya antikor belirli maddelerle işaretlenmektedir. Uygulanan ölçüm şekli bu maddelerin özelliklerine göre belirlenmektedir ( 1, 2).

Kliniklerde yaygın uygulama, radyoizotop işaretli antijen kullanarak 1960 yılında Yalow ve Berson'un insülin tayini, Ekins'in tiroksin tayini için duyarlı yöntemler geliştirmesiyle birlikte başlamıştır. Günümüzde de kullanılan  $10^{-12}$  –  $10^{-15}$  M konsantrasyonda madde tayinine olanak sağlayan radyoizotopik yöntemler, insan sağlığına zarar verme, atıkların özel olarak depolanma gereği gibi olumsuz özelliklere sahiptirler. Ayrıca radyoizotopların yarılanma ömürlerine bağlı olarak, hazırlanan kitler belirli süre kullanılabilir. Uygulamada en yaygın yer alan,  $\gamma$  ışını yayınlayan  $^{125}\text{I}$  radyoizotopunun 60 günlük kısa yarılanma ömrüne sahip olması yanında, büyük atom hacmi nedeniyle immun reaksiyonun ilgisini azaltması da konu olmaktadır. Geliştirilen alternatif yöntemlerde başlıca enzimler, kemilüminesans veya floresans veren maddeler işaretleyici olarak kullanılmıştır.

Floresans veren rodamin, fluorescein, umbelliferon gibi organik maddelerin işaretlemeye kullanıldığı yöntemlerin duyarlılığı  $10^{-9}$  –  $10^{-12}$  M ile sınırlı kalmaktadır. Bunun sebebi, örneklerde girişime neden olan, floresans veren serum proteinleri, NADH, bilirubin gibi maddelerin varlığı ve kolloidal taneciklerden, kuvvet yüzeyinden ileri gelen saçılma-  
dır ( 1 -6).

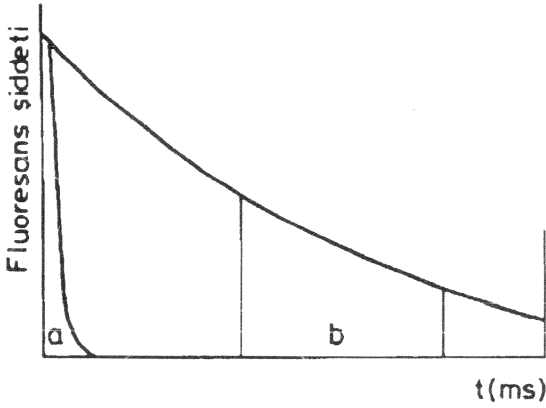
## İşaretlemede lantanid çelatları

Lantanid grubu elementlerinden özellikle Öropyumun üç değerli iyonlarının  $\beta$ - diketonlar ile oluşturduğu çelatlar  $1000\mu\text{s}$  gibi uzun ömürlü floresans vermektirler. Kompleksin ligandı UV ışını absorpsiyonu ile uyarılmış singlet hale geçer. Bu singlet seviyeden triplet seviyeye ve vibrasyonel rezonans oluşumuyla iyonun 4f seviyelerine enerji geçişi olur. Sonuçta iyonik floresansın şiddetinde birkaç kat artma ile birlikte çelatın uzun ömürlü emisyonu gerçekleşir ( 7-9).

İmmunolojik yöntemlerle hormon tayinlerinde uygun antikor ya da hormona önce  $\text{Eu(III)}$  iyonunun komplekslerle oluşturduğu çelat bağlanır. Kararlılık sabiti yüksek olan ancak floresans vermeyen bu çelatla

işaretili biyolojik maddenin, polistiren kapların yüzeyine fiziksel absorpsiyonla tespit edilmiş antikor ya da antikor - hormon konjugatlarına bağlanmasından sonra reaktif fazlası yıkama ile uzaklaştırılır. Hareketsiz katı protein fazı TOPO ve Triston X - 100 yüzey aktif maddelerini içeren asidik çözelti ile muamele edilir. Bu ortamda Eu ( III) iyonu kompleksondan ayrılarak  $\text{Ln}^{3+}(\beta\text{-diketon})_3(\text{TOPO})_{2-3}$  formülü ile verilen çelatl oluşturur. Meydana gelen çelat çözeltide Triton X - 100 tarafından oluşturulan misellerin içine yerleşir ( 7,9, 10).

Beş dakika gibi kısa sürede meydana gelen ligand değişim işlemi sonrasında, 200µl hacimde polistiren kaplarda bulunan örnekler kısa süre UV ışınına maruz bırakılır. Uyarılmadan belirli süre sonra ölçüm yapılarak, yani zaman ayırmalı fluoresans ölçüm tekniği uygulanarak, girişime neden olan kısa ömürlü fluoresansın etkisi yok edilir.



Şekil - 1 : Zaman ayırmalı fluoresans ölçüm yöntemi

### İmmunolojik yöntemle hormon tayinleri

Hormonlar genel olarak peptid ve steroid hormonları olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Peptid hormonları iki farklı peptid zincirinin ( $\alpha$  ve  $\beta$ ) biraraya gelmesiyle oluşurlar. TSH, FSH, LH, hCG gibi kısaltılmış ifadelerle verilen bu hormonların  $\alpha$  zincirleri hepsinde aynı olup immunolojik ve biyolojik fark  $\beta$  zincirlerinden ileri gelir.

Östrojen, testosteron gibi steroid hormonları kolesterolün farklı enzimlerle reaksiyonu sonucu meydana gelirler. Peptid hormonlarında farklı olarak kanda taşıyıcı proteine bağlanarak dolaşırlar (12).

Hormonların serum örneklerinde veya hormon parçalanma ürünlerinin idrar örneklerinde (14) tayini için kullanılan, zaman ayırmalı fluoresans tekniğinin yer aldığı immünolojik yöntemler başlıca iki grupta toplanır (1).

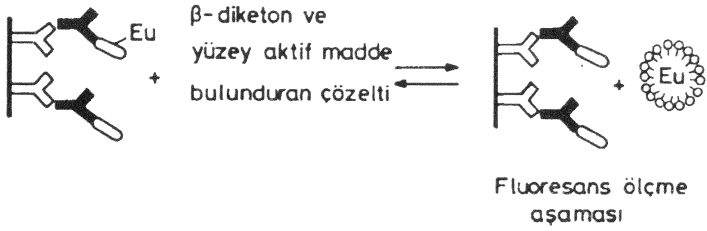
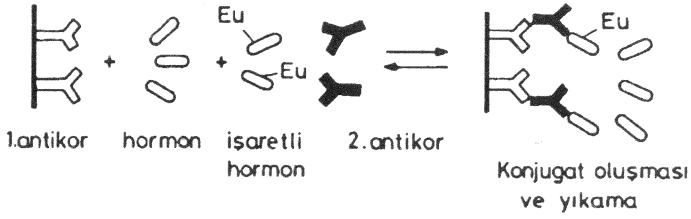
### **1. Sınırlı reaktif yöntemi**

Alternatif immünolojik yöntemlerin gelişmesiyle birlikte, genellikle polisitiren yüzeyine antikor - antijen konjugatlarının bağlanmasıyla, katı faz oluşturularak ayırma uygulaması da başlamıştır.

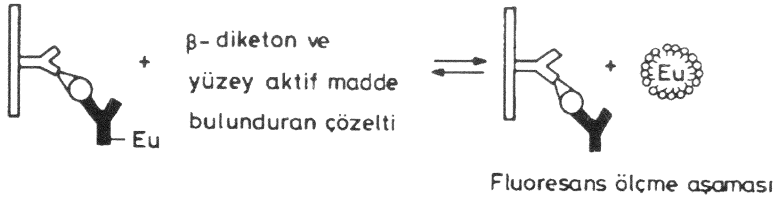
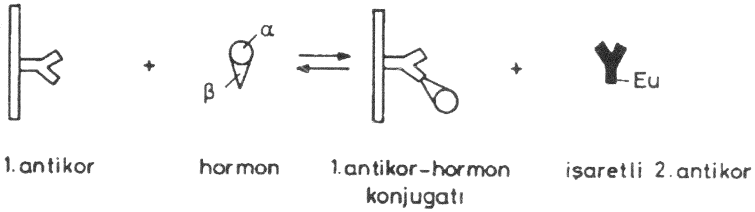
Zaman ayırmalı fluoresans tekniği ile ölçüm yapılan sınırlı reaktif yönteminde 200 µl hacmi olan polistiren hücrelerin yüzeyi önce poliklonal antikor ile kaplanır. Bağlanamayan antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra steroid hormonu bulunduran standart veya monoklonal antikor, birlikte nötral sulu ortama ilave edilir. Örnekte bulunan ve işaretleme olmuş olan hormonların, bu 2 antikora bağlanmak üzere yarışma reaksiyonu gerçekleşir. Reaktif fazlası uygun tampon çözelti ile yıkanarak uzaklaştırılıp, katı biyolojik madde yüzeyi β- diketon, TOPO ve Triton X - 100 bulunduran asidik çözelti ile muamele edilir. ( Şekil 2). Ligand değişim reaksiyonunun gerçekleşmesi için kısa süre beklenir ve fluoresans ölçümü ile hormon miktarı belirlenir. Kullanılan standartlarla elde edilen ölçü eğrisi, hormon miktarının artması ile azalan özellikte olur ( 13, 14 - 16).

### **2. Fazla reaktif yöntemi**

Genellikle peptid hormonlarının tayin edildiği bu yöntemde, polisitiren hücrelerin yüzeyi uygun poliklonal veya monoklonal antikor ile kaplanır. Serbest kalan antikor uzaklaştırıldıktan sonra hücelere sulu çözeltide standartlar ve örnekler ilave edilir. Hormonun tamamının β zinciri ile polimer yüzeyindeki antikora bağlanması gerçekleşir. Yıkama işleminden sonra aynı tampon çözelti içinde işaretlenmiş seçimli monoklonal antikorun hormonun α zincirine bağlanması sağlanır. (Şekil 3). 1. yöntemde olduğu gibi reaktif fazlası uzaklaştırıp uzun ömürlü fluoresans veren ligand eldesi sağlanarak ölçme gerçekleştirilir. Bu yöntemde ölçü eğrisi hormon miktarının artması ile artan özellikte olur ( 17 - 21).



Şekil - 2 : Fazla reaktif yöntemi ile hormon tayini

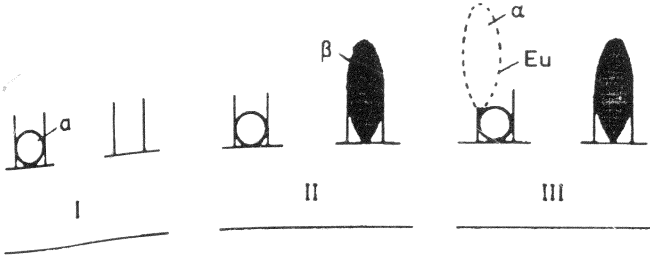


Şekil - 3 : Sınırlı reaktif yöntemi ile hormon tayini

### İdiometrik yöntem

Hormon tayinlerinde sınırlı reaktif yöntemleri fazla duyarlı değildir. Fazla reaktif yöntemiyle daha hassas tayin yapılabilen ancak bu da östrojen, progesteron gibi küçük moleküllü hormonlara uygulanamamaktadır. Antiidiyotipik antikor kullanarak östrojen tayini için geliştirilen idiometrik yöntem küçük moleküllü maddelerin hassas tayinlerini sağlamaktadır.

Bu yöntemde polistiren hücrelerin yüzeyi monoklonal anti - östrojen idiyo-tipik antikor ile kaplanır. Östrojenin tamamının bu antikora bağlanmasından sonra, boş kalan bağlanma yerleri  $\beta$  - tür monoklonal anti - idiyo-tipik antikor ile bloke edilir. 1. antikorda östrojenin yerleştiği bölgelere  $\alpha$  tür işaretli monoklonal anti - idiyo-tipik antikor bağlanır ( Şekil - 4). 1. ve 2. yöntemlerde olduğu gibi işaretleyici maddenin sağladığı fluoresansın ölçümü ile işlem tamamlanır (22 - 24).



Şekil - 4 : İdiyometrik yöntemle hormon tayini

a : hormon

$\beta$  :  $\beta$  türü monoklonal anti - idiyo-tipik antikor

$\alpha$  :  $\alpha$  türü monoklonal anti - idiyo-tipik antikor

### SONUÇ

Hormon tayinlerinde kullanılan immunolojik yöntemlerin özellikleri başlıca kullanılan antikorların seçimliliğine ve işaretleyici maddeye göre belirlenen ölçüm şekline bağlıdır. Daha seçimli antikorların üretilmesi ve yabancı maddelerden ileri gelen girişim etkilerinin azaltılması veya yok edilmesiyle birlikte, daha duyarlı yöntemlerin geliştirilmesi sağlanabilir.

## KAYNAKLAR

1. Lövgren, T., Hemmilä, I., Pettersson, K., Eskola, I. U. and Bertoft, E. : *Talanta*, **31**, 909 - 916 (1984).
2. Hemmilä, I. : *Clin. Chem.*, **31** (3), 359 - 370 (1985).
3. Soini, E. and Hemmilä, I. : *Clin. Chem.*, **25** (3), 353 - 361 ( 1979).
4. O' Donnell, C. M. and Suffin, S. C. : *Anal. Chem.*, **51** (1) 33 - 40 (1979).
5. Barnard, G. I. R. and Collins, W. P. : *Med. Lab. Sci.*, **44**, 249 - 266 (1987).
6. Edwards, R. : *Immunoassay*. Alden Press, Oxford, 1985.
7. Hemmilä, I. : *Scand. Clin. Lab. Invest.*, **48**, 389 - 400 ( 1988).
8. Crosby, G. A., Whan, R. E. and Alire, R. M.: *J. Chem. Phys.*, **34** (3), 743 - 748 ( 1961).
9. Soini, E. and Kojola, H. : *Clin. Chem.*, **29** (1), 65 - 68 ( 1983).
10. Meares, C.F. : *Nucl. Med. Biol.*, **13** (4) 311 - 318 ( 1986).
11. Meares, C. F., McCall, M. J., Reardon, D. T., Goodwin, D. A., Diamenti, C. I., and McGue, M. : *Anal. Biochem.*, **142**, 68 - 78 ( 1984).
12. Alp, H. ve Molvalilar, S. : *Endokrin Hastalıklar*. Bayda A. Ş., İstanbul. 1987.
13. Barnard G., Kohen, F. and Lövgren, T. : *Clin. Chem.*, **35** ( 4) 555 - 559 ( 1989).
14. Barnard, G., Kohen, F., Mikola, H. and Lövgren, T. J. : *Bioluminescence and Chemiluminescence*, **4**, 177 - 184 ( 1989).
15. Eskola, J. U., Näntö, V., Meurling, L. and Lövgren T. N. - E. : *Clin. Chem.*, **31** ( 10), 1731 - 1734 ( 1985).
16. Lawson, N., Mike, N., Wilson, R. and Pandov, H. : *Clin. Chem.*, **32** ( 4), 684 - 686 ( 1986).
17. Kaihola, H. - L., Irjala, K., Viikari, J. and Näntö, V. : *Clin. Chem.*, **31** ( 10), 1706 - 1709 (1985).
18. Pesonen, K., Afthan, H., Stenman, U. - H., Vuinikka, L. and Perheentupa, J. : *Anal. Biochem.*, **157**, 208 - 211 ( 1986).
19. Toivonen, E., Hemmilä, I., Marniemi, J., Jorgensen, P. N., Zeuthen, J., and Lövgren, T. : *Clin. Chem.*, **32** (4), 637 - 640 (1986).
20. Strasburger, C., Barnard, G. Toldo, L., Zarmi, B., Zadlk, Z., Kowarski, A. and Kohen, F. : *Clin. Chem.*, **35** ( 6), 913 - 914 ( 1989).
21. Karşilayan, H., Kohen, F. and Barnard, G. : *Comm. Lab. Med.*, **1** (2), 61 - 66 ( 1992).
22. Barnard, G. and Kohen, F. : *Clin. Chem.*, **36** ( 11), 1945 - 1950 (1990).
23. Barnard, G., Karşilayan, H. and Kohen, F. : *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **165**, 1997 - 2000 (1991).
24. Karşilayan, H., Simmons, L., Loganath, A. and Barnard, G. : *Comm. Lab. Med.*, **1** ( 2), 39 - 47 (1992).

(Received April 14, 1993)