

SERUMDA GLİKOPROTEİN (SEROMUKOİD) TAYİN METODLARININ MUKAYESESİ VE ROMATİZMAL HASTALIKLARDAKİ DEĞERİ

Zühal Yurtaslan*

Sumru Taşman**

Karbonhidrat ihtiva eden proteinler için bugüne kadar çeitli sınıflandırmalar yapılmış ve çeşitli isimler kullanılmıştır. Bugün karbonhidrat ihtiva eden bu proteinler Glikoproteinler ve Mukopolisakkaritler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Mukopolisakkaritlere «glikoz amino glikanlar» adı da verilmektedir. (2) (12)

Serum Glikoproteinlerinin perklorik asitte çözünen fraksiyonu «Seromukoid» olarak isimlendirilmektedir. Seromukoidlerin tayini ise klinik açıdan günden güne önem kazanmaktadır. Lokalize veya sistemik çeşitli akut ve kronik hastalıklarda, mesela malign tümörlerde, romatizmal hastalıklarda, tüberkülozda, diğer bazı infeksiyonlarda, karaciğer sirozunda, psöriazis ve gutta bir artma meydana gelmektedir. (6) (8) (9) (10)

Serumda seromukoidler arttığı zaman idrara da geçtikleri görülmektedir. Bu bakımdan idrarda da glikoprotein tayini önemlidir.

Seromukoid tayini kimyasal metodlar, elektroforez ve kromatografik metodlarla yapılabilir. Kromatografi ve elektroforezin böyle bir maksatla rutinde kullanılması zaman alıcıdır. (6) (7) (9)

Glikoproteinler protein ve karbonhidrattan yapılmışlardır. Yapısında bulunan bu maddelerden birinin ölçümü ile total seromukoid tayini yapılmaktadır. Ancak çeşitli kimyasal metodların sonuçları birbirine uymamaktadır. Bu sebeple biz bu çalışmamızda heksoz üzerinden ve protein üzerinden total glikoprotein tayini yaparak bu iki metodu karşılaştırdık.

Romatizmal hastalıklarda her iki metotla seromukoid tayini yaparak **ayırıcı teşhisteki değerini** ve hangi metodun daha güvenilir sonuçlar verdiğini tespit etmeğe çalıştık.

* A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ve Kimya Kürsüsü Doçenti

** A. Ü. Tıp Fakültesi Biyokimya ve Kimya Kürsüsü Uzman Asistanı

METODUN PRENSİBİ

Total seromukoid tayini için bu fraksiyonun serumdan izole edilmesi gerekir. Serumdaki mukoproteinler perklorik asitte çözünürler. Diğer proteinler ise çözünmez. Bu sebeple seromukoid fraksiyonunu serumdaki diğer proteinlerden ayırmak için perklorik asitle muamele edilerek seromukoid dışındaki serum proteinleri uzaklaştırılır. Çözeltide kalan mukoproteinler fosfotungstik asitle çöktürülür. Bu şekilde çöktürülen seromukoid fraksiyonu çeşitli şekillerde tayin edilir.

Biz bu çalışmada (11) Fenol metodu ile tirozin üzerinden ve orsinol-sülfirik asit reaktifi ile heksoz üzerinden (3) (5) seromukoid tayini yaptık.

TİROZİN ÜZERİNDEN TOTAL SEROMUKOİD TAYİNİ (11)

Reaktifler :

1. % 0,85 NaCl çözeltisi
2. 1,8 M perklorik asit : % 72 lik asitten 28 ml. alınarak su ile 200 ml. ye tamamlanır.
3. % 5 fosfotungstik asit : 2N HCl de hazırlanır.
4. 0,6 M Perklorik asit : 1,8 M perklorik asit 1/3 oranında seyreltilir.
5. Folin-Ciocalteu'nun fenil reaktifi : 2 lt. lik dibi yuvarlak bir balona 100 gm. sodyum tungstat ($\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve 25 gr. sodyum molibdat ($\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) ve takriben 700 ml. su ilâve edilerek çözülür. Üzerine 50 ml. % 85 lik fosforik asit ve 100 ml. konsantre HCl ilâve edilir. 10 saat geri soğutucu altında kaynatılır. Soğuduktan sonra 150 gm. lityum sülfat, 50 ml. su ve bir kaç damla brom ilâve edilir. Bromun fazlası 15 dakika kadar ağzı açık kaynatılarak uzaklaştırılır, soğutulur ve litreye tamamlanır. Çözelti yeşilimsi renk göstermemelidir.
6. % 20 Na_2CO_3 çözeltisi
7. Standart tirozin çözeltisi : Bu çözelti 100 ml, 0,1 N HCl de 10 mg tirozin ihtiva eder.

Yapılışı : Bir tüpe veya küçük bir erlenmayere 4,5 ml % 0,85 NaCl konur. 0,5 ml serum ilâve edilir. Üzerine 2,5 ml 1,8 M perklorik asit damla damla konur, karıştırılır. 10 dakika sonra filtre kâğıdından süzülür. Süzüntüden 5 ml bir santrifüj tüpüne alınır. Üzerine 1 ml % 5 fosfotungstik asit konur, çalkalanır 10 dakika bekletilir. Çöken mukoproteinleri ayırmak için 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilir. Üstteki berrak kısım atılır. Çökeller 1/6 oranında seyreltilmiş fosfotungstik asitle yıkanır. (Bu yıkama 0,6 M perklorik asitle de olabilir). Üstteki berrak kısım atılır, tüp drene edilir. Çökeleğe 1 ml % 20 Na_2CO_3 ilâve edilerek çözülür, üzerine 3,5

ml su ve 0,5 ml fenol reaktifi konur. 37°C de su banyosunda 15 dakika bekletilir, 660 nm de (kırmızı filtre ile) köre karşı okunur.

Standart için bir tüpe 0,5 ml tirozin çözeltisi, 1 ml % 20 Na₂CO₃, 3 ml su ve 0,5 ml fenol reaktifi konur. 37°C de 15 dakika bekletilir.

Kör deney için bir tüpe 3,5 ml su, 1 ml % 20 Na₂CO₃ ve 0,5 ml fonel reaktifi konur. 37°C de 15 dakika su banyosunda bekletilir. Standart ve deney bu köre karşı okunur.

Hesabı : 100 mg mukoprotein 4,2 mg tirozin ihtiva eder.

Netice şu formülle hesaplanır :

$$\frac{\text{Bilinmiyenin O.D si}}{\text{Standardın O.D si}} \times 357 = \% \text{ mg seromukoid}$$

HEKSOZ ÜZERİNDEN TOTAL SEROMUKOİD TAYİNİ (3) (5)

Reaktifler :

1. % 0,85 NaCl çözeltisi
2. 1,8 M perklorik asit (Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanır.)
3. % 5 fosfotungstik asit (Yukarıda anlatıldığı gibi hazırlanır.)
4. 0.1 N NaOH
5. % 60 (V/V) H₂SO₄ çözeltisi
6. Orsinol reaktifi : % 30 (V/V) H₂SO₄ de % 2 lik rekristalize edilmiş orsinol çözeltisi. Bu çözelti buz dolabında bir kaç ay dayanır. Hafifçe pembemsi renk meydana gelince çözelti atılır.
7. Stok standart : 100 mg galaktoz + 100 mg mannoz doygun benzoik asit çözeltisinde çözülür ve 100 ml ye tamamlanır. Çözelti buz dolabında süresiz dayanıklıdır.
8. Çalışma standardı : 1 ml stok standart 9 ml distile su ile seyreltilir. Çözelti her gün taze hazırlanır.

Yapılışı : Fosfotungstik asitle mukoproteinlerin çöktürülmesine kadar işlem tirozin metodunda tarif edildiği gibi yapılır. Santrifüjden sonra kalan mukoprotein 5 ml % 95 lik alkolda yıkanır. Çökelek 0,5 ml 0,1 N NaOH de çözülür. Bu bilinmiyendir. 2 tüp daha alınır, kör için hazırlanan tüpe 0,5 ml su konur, diğer tüpe 0,5 ml çalışma standardı ilâve edilir. Bilinmiyen, kör ve standart tüplerine 1,25 ml orsinol reaktifi ve 7,5 ml % 60 V/V H₂SO₄ konur. Tüpler 20 dakika 80 + 0,5°C lik su banyosunda bekletilir, soğutulur 15 dakika içinde distile suya karşı 530 nm de okunur.

$$\text{Hesabı : } \frac{\text{Bilinmiyenin O.D si} - \text{Kör O.D si}}{\text{Standardın O.D. si} - \text{Kör O.D si}} \times 30 = \% \text{ mg seromukoid}$$

Normal değerler : Tirozin metodu için literatürde çok farklı normal değerler verilmiştir. Winzler ortalama % 80 mg verirken, Huergo ve Ark, erkekler için (% 45 - 117 mg) kadınlar için (% 49 - 100 mg), Lockey, Anderson ve Mac Lagan (% 83 - 203 mg) verdiler.

Heksoz metodunda normal değerler (% 8 - 14 mg) olarak bildirilmiştir.

Çalışmamızda biz kendi tesbit ettiğimiz normal hudutlara göre neticelerimizi değerlendirdik.

BULGULARIMIZ

20 normal şahıs, 12 spondilit rizomelik, 11 artroz ve 20 romatoid artrit vakası olmak üzere toplam 63 vakada her iki metodla seromukoid tayini yapıldı.

Normal şahıslar için tirozin metoduna göre bulunan en küçük değer % 57,6 ve en büyük değer % 116 mg dır. Aritmetik ortalama ($\bar{X}$) % 85,98 mg, standart hata ($\bar{S\bar{X}}$) = 3,321, standart deviasyon (Sd) 14,852 olarak bulundu. Buna göre normal hudutlar % 56,28 - 142,25 olarak tesbit edildi.

Yine normal şahıslarda heksoz metoduna göre en düşük değer % 10 mg ve en yüksek değer % 21,25 mg, $\bar{X} = 16,16$, $S \bar{X} = 0,849$, Sd = 3,795 bulundu.

Buna göre normal hudutlar % 8,57 - 23,16 mg olarak bulunur.

12 spondilit rizomelik vakasında tirozin metoduna göre bulunan en düşük değer % 59,7 mg, en yüksek değer ise % 323 mg idi. Heksoz metoduna göre en düşük değer % 15, en yüksek değer % 43,74 mg olarak bulundu.

12 spondilit rizomelik ve 20 normal şahısta tirozin metodu ile bulunan değerler mukayese edildiğinde $t = 3,220$, $P < 0,01$ bulundu. Bu bulgular, değerler arasındaki farkın önemli olduğunu ortaya koydu.

Aynı gruplarda heksoz metodu ile bulunan değerlerin karşılaştırılmasında $t = 4,101$, $P < 0,001$ olup fark burada da önemlidir.

İncelenen 11 artroz vakasında tirozin metodu ile en düşük değer % 84,5 mg, en yüksek değer % 170 mg, heksoz metoduna göre ise en küçük değer % 16,9 mg en büyük değer % 27,8 mg olarak bulundu.

Normal şahıslarda tirozin metodu ile bulunan değerlerle artroz vakalarındaki değerler karşılaştırıldığında $t = 2,951$, $P < 0,01$ olarak bulundu. Aradaki fark önemliydi.

Aynı serilerde heksoz metodu için $t = 3,168$, $P < 0,01$ idi ve aradaki farkın yine önemli olduğu tesbit edildi. 20 Romatoid artrit vakasında tirozin metodu ile bulunan en küçük değer % 81,59 mg en yüksek değer % 215 mg dı. Heksoz metodu ile bulunan en küçük değer % 21,1 mg ,en yüksek değer % 34,6 mg dı.

Tirozin metodu ile bulunan değerlerin normal şahıslarda aynı metodla bulunan değerlerle mukayesesinde $t = 6,632$, $p < 0,001$ olup aradaki fark önemli bulunmuştur.

Heksoz metodu ile aynı serilerin mukayesesinde $t = 8,218$ ve $p < 0,001$ bulunmuş, aradaki farkın önemli olduğu tesbit edilmiştir. Bundan sonra gruplar birbirleriyle karşılaştırılmış ve aşağıdaki hususlar tesbit edilmiştir.

Romatoid - artrit ile spondilit rizomelik vakalarında tirozin metodu için $t = 0,526$, $p > 0,05$ bulunmuş ve farkın önemli olmadığı görülmüştür. Heksoz metodu ile aynı seriler mukayese edildiğinde $t = 0,859$, $p > 0,05$ bulunmuş ve tirozin metodunda olduğu gibi farkın önemli olmadığı tesbit edilmiştir.

Romatoid artrit ile artroz vakalarında tirozin metodu ile bulunan değerlerin mukayesesinde $t = 3,045$, $p < 0,01$ olarak bulunmuştur. Buna göre aradaki fark önemlidir.

Aynı serilerde heksoz metodu ile elde edilen değerler karşılaştırıldığında $t = 733$, $p < 0,001$ bulunmuş ve tirozin metodunda olduğu gibi farkın önemli olduğu tesbit edilmiştir.

Spondilit rizomelik ve artroz vakalarında tirozin metodu ile elde edilen değerlerin karşılaştırılmasında $t = 1,359$, $p > 0,05$, heksoz metodu ile bulunan değerler için $t = 1,441$ ve $P > 0,05$ olarak bulunmuş, buna göre her iki metod için aradaki farkın önemsiz olduğu tesbit edilmiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Normal şahıslarda tirozin metodu için bulunan normal hudutların (% 56,28 - 142,25 mg) literatürde verilen değerlere uyduğu ve aritmetik ortalamanın ($\bar{X} = \% 85,98$) literatürde verilen ortalama değere (% 80 mg) yakın olduğu tesbit edilmiştir.

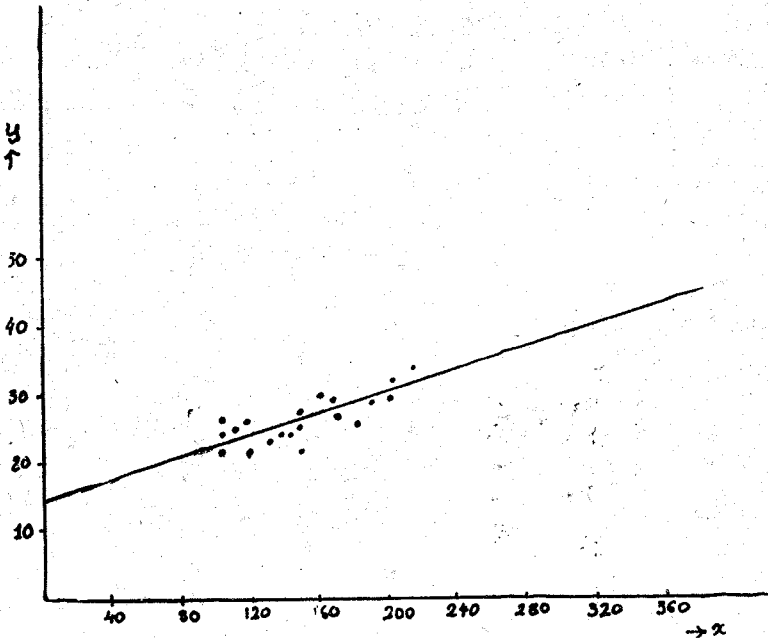
Heksoz metodu ile bulduğumuz normal değerlerin alt hududu literatürde verilen değere uyduğu halde üst hudut daha yüksek bulunmuştur.

İncelediğimiz romatizmal hastalıklarda her iki metodla yapılan seromukoid tayini sonuçlarının normal şahıslarda bulunan değerlerle karşılaştırılmasında aradaki farkların önemli olduğu ortaya çıkmıştır. Buna göre romatizmal hastalıklarda seromukoid tayini gerçekten teşhiste yardımcı olmaktadır. Yine elde ettiğimiz bulguların verdiği istatistik sonuçlarına göre bilhassa romatoid artrit ve spondilit rizomelikte normale göre artış daha fazla olduğundan bu hastalıklardaki teşhis değeri daha yüksektir.

Spondilit rizomelik ve romatoid artritte her iki metodla bulunan değerler mukayese edildiğinde istatistik yönünden önemli bir fark tesbit edilememiştir. ($P >$

0,05). Yukarıda bulgularımız kısmında bu hastalıkların normallerle karşılaştırılmasında aradaki farkın önemli olduğunu belirtmiştik. Buna göre bu iki grupta normale göre önemli bir artış olmakta fakat kendi aralarında bir fark bulunmamaktadır. Şu halde her iki hastalık grubunda seromukoid tayininin teşhis değeri yüksek olduğu halde, seromukoid tayini ile bu iki grubun ayrılması mümkün olmamaktadır.

Artrozda da normale nazaran bir artış olduğunu yukarıda belirtmiştik. Fakat bu hastalıkta bulunan değerlerin spondilit rizomelikle mukayesesinde istatistikî yönden önemli fark olmadığı, ($P > 0,05$), romatoid artrit ile mukayesesinde ise farkın önemli olduğu ($P < 0,01$, $P < 0,001$) tesbit edilmiştir. Buna göre seromukoid tayini artrozla spondilit rizomeliğin ayırıcı teşhisinde faydalı olmadığı halde romatoid artrit ile ayrılmasında yardımcı olabilmektedir.

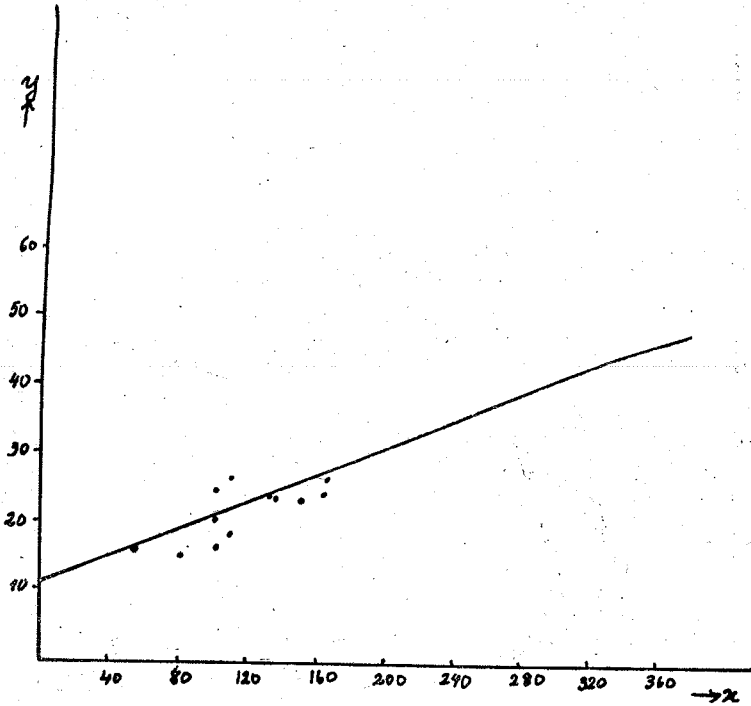


Şekil : 1. Romatoid Artritli hastaların neticeleri : x ekseninde Tirozin üzerinden hesaplanan seromukoid, y ekseninde Heksoz üzerinden hesaplanan seromukoid miktarı gösterilmiştir.

Normal şahıslar ve romatizmal hastalıklarda her iki metodla benzer sonuçlar elde edilmiş ve seromukoid tayini için her iki metodun da uygun olduğu görülmüştür.

Romatoid artrit ve spondilit rizomelikte her iki metodla yapılan seromukoid tayin sonuçları iyi bir regresyon katsayısı vermektedir. (Sırayla $r = 0,772$, $r = 0,887$), burada tirozin metoduna ait değerlere x , heksoz metoduna ait değerlere y dersek romatoid artrit için $y = 14,735 + 0,007 x$ denklemi, spondilit rizomelik için $y = 10,838 + 0,099 x$ denklemi elde edilir. Yukarıdaki regresyon katsayıları her iki metod arasında bir uygunluk olduğunu göstermektedir. Her iki metodla romatoid artrit ve spondilit rizomeliğe ait regresyon doğruları sıra ile şekil 1 ve 2 de gösterilmiştir.

Böylece çalışmamızın isminde de belirtildiği gibi iki metod mukayese edilmiş ve her ikisinin birbirine uygunluk gösterdiği tesbit edilmiştir.



Şekil : 2. Spondilit Rizomelikli hastaların neticeleri : x ekseninde Tirozin üzerinden hesaplanan seromukoid, y ekseninde Heksoz üzerinden hesaplanan seromukoid miktarı gösterilmiştir.

ÖZET

1. Serumda glikoprotein tayininin romatizmal hastalıkların teşhisinde faydalı olduğu tesbit edilmiştir.
2. En fazla yükselme romatoid artrit ve spondilit rizomelikte olmaktadır. Bu sebeple seromukoid tayini bilhassa bu iki hastalık için önemli bir teşhis vasıtasıdır.
3. Artrozda normale nazaran bir yükselme olmakla beraber değerler diğer iki gruptakinden daha düşük bulunmuştur. Bu bakımdan seromukoid tayininin hem artroz teşhisinde ve hemde artrozun romatoid artrit ve spondilit rizomelikten ayrılmasında faydalı olduğu tesbit edilmiştir.
4. Seromukoid tayini için heksoz üzerinden ve tirozin üzerinden tayin yapan metodların karşılaştırılmasında ise benzer sonuçlar elde edilmiş ve her iki metodunda aynı hassasiyette kullanılabileceği tesbit edilmiştir. Ancak yüksek sıcaklıkta derişik H_2SO_4 li ortamda çalışmak zor olduğundan tirozin metodu heksoz metodundan daha kolaydır ve tercih edilebilir.

SUMMARY

The comparison of the methods to determine glycoprotein in serum (Seromuroid) and its importance in diagnosis of rheumatismal diseases

1. It was found that the determination of glycoprotein in serum helps for diagnosing the rheumatismal diseases.
2. The highest increase in seromuroid has occurred in rheumatoid arthritis and spondylitis rhizomelica. Therefore determination of seromuroid is particularly important for these two cases.
3. Although an increase with respect to the normal ranges was observed, in the case of artrosis this increase was small compared to the above two cases. In this way determination of seromuroid helps both to diagnose arthrosis and to distinguish it from rheumatoid arthritis and spondilitis rhizomelica.
4. In the comparison of hexose and tyrosine methods for determination of seromuroid it was found that their results are similar and they may both be used with the same accuracy. Since it is difficult to work in a medium having concentrated H_2SO_4 at high temperatures, it is better to use tyrosine method rather than hexose method.

LİTERATÜR

- 1 - Gottschalk, A. : Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function. B.B.A. Library, Elsevier Publishing Company. Amsterdam - London - New York, Vol. V.S : 190 S : 235, (1966)
- 2 - Harper, H. A. : Rewiev of Physiological Chemistry. Lange Med. Publications Los Altos, California. 15. Edition s : 517. (1975)
- 3 - Henry R. J. Cannon D. C. Winkelman J. W : Clin, Chem Principles and Tehnics. Second Edition Harper and Row, Publishers. Inc. s : 461 (1974)
- 4 - Lehnhardt, W. F. Winzler, R. J. : J. Chromatographie. Determination of Neutral Sugars in Glycoproteins by Gas. - Liquid Chromatoraphy 34, 471 (1968)
- 5 - Mac Donald R.P. : Standart Methods of Clinical Chemistry. Academic Press - New York and London Vol V :, s : 137 (1970)
- 6 - Macbeth, R. A. L. Behesi, J. G. : Cancer Res. Plasma Glycoproteins in Various Disease States Including Carcinoma 22, 1170 (1962)
- 7 - Mrochek. J. E. Stanley, R. D. Waalkes T. P. : Clin. Chem. Liquid Chromatographic Analysis for Neutral Carbonhydrates in serum Glycoproteins 21 (9). 1314 - 22 (1975)
- 8 - Shetlar M. R. : Proressin Clinical Pathology. Edited by Stefanini M. New York, Grune and Stratton. Vol 1 s : 419 (1966)
- 9 - Shetlar M. R. Shetlar, C. L. Richmond, V - Everette, Mr. : Cancer Res. The polysaccharide Content of Serum Fraction in Carcinoma, Arthritis and Infections. 60, 681 (1950)
- 10 - Snyder, S Aswell. G : Clin. Chem. Acta Quantitation of Specific Serum Glycoproteins in Malignancy. 34, 449 (1971)
- 11 - Varley, H. : Practical Clinical Chemistry, Wiliam Heinemann - Medical Books, LTD. and Interscience Book Inc. New York s : 270 (1967)
- 12 - Winzler, R. J. : Methods of Biochemical Analyses. Edited by Glick D. New York, Interscience Vol : 11, s : 279 (1955)
- 13 - Wolters, P. Kaltwasser, F Pieper, J. : Clin Chim. Acta. Quantitative Bestimmung des Eiweissanteites der Serummucoid 15, - 213 - 217 (1967)