

HORMON ANALİZ YÖNTEMLERİ ve ENZİM İMMUNOASSAY (derleme)

Seyfullah HALİLOĞLU¹

Behiç SERPEK¹

Hormone analysis methods and enzyme immunoassay

SUMMARY

Immunoassays are rapidly replacing many other methods used to detect or quantitative substances with important biologic or pharmacologic properties. Since the introduction of the enzyme immunoassay the mass of published work in which the technique is employed is evidence of its broad applicability and potential.

The measurement of hormones associated with growth, development and reproductive function have obvious value in the livestock industry and the use of enzyme immunoassay procedures for their determination would enable their routine assessment to become a practical proposition.

It is aimed in this article to explain the basic understanding of EIA technique.

KEY WORDS: Enzyme immunoassay, hormone analysis

ÖZET

İmmunoassayler biyolojik ve farmakolojik nitelikteki önemli maddelerin belirlenmesinde kullanılan birçok yöntemin yerini hızlı bir şekilde almaktadır. Enzim immunoassayin ilk uygulanmasından günümüze kadar yapılan araştırmaların çokluğu bu tekniğin kullanılabilirliğini ve potansiyelini ortaya koymaktadır.

Büyüme, gelişme ve reproduksiyonla ilgili hormonların ölçümünün çiftlik hayvanları endüstrisinde sağlayacağı yarar açıktır ve bunların belirlenmesinde enzim immunoassay prosedürlerinin kullanımı pratik önerilerin oluşumu için rutin uygulamalara fırsat sağlayacaktır.

Bu makalede EIA tekniğinin temel anlayışının açıklanması amaçlanmıştır.

ANAHTAR KELİMELER: Enzim immunoassay, hormon analizi

GİRİŞ

Hayvan yetiştiriciliğinde endokrin bir bezin fonksiyonu hakkında bilgi edinebilmek için hormon analizlerinin yapılması büyük önem taşır. Bu amaçla biyolojik, fiziko-kimyasal ve biyokimyasal olmak üzere 3 grup altında toplanabilen hormon analiz yöntemleri belirli amaçlar doğrultusunda tek başına kullanılabileceği gibi, bu yöntemlerin kombinasyonu da kullanılabilir.

Kimyasal yapının belirlenmesine kadar olan tüm yöntemlerin temeli daima biyolojik testlere dayanır ve bu yolla bir deneme hayvanı ya da uygun invitro sistemde hormon etkisi karakterize edilebilir.

Biyolojik testler steroid hormon analizlerinde oldukça yaygın kullanılmasına karşın, fiziko-kimyasal yöntemlerin geliştirilmesiyle önemini yitirmiş ve bugün sadece yeni biyolojik faktörlerin ya da sentetik bileşiklerin değişik türlerdeki agonistik ve antagonistik hormon etkilerinin araştırılması amacıyla kullanılmaktadır.

Fiziko-kimyasal yöntemler özellikle bir maddenin (peptitler, proteinler, steroidler vb.) kimyasal yapısının ortaya çıkarılması ve yapıların incelenmesi amacıyla kullanılmaktadır.

Biyolojik materyallerdeki bilinen bileşiklerin rutin analizlerinde birçok fiziko-kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Küçük moleküllerin (steroid, prostaglandinler vb.) organik çözücülerde çözünmesi zorunludur ve çözülmüş küçük moleküller kromatografi ile ayrılanabilir ve değişik yöntemler aracılığı ile miktarları belirlenebilir. Bu amaçla UV-absorbsiyon florans işaretleme, uygun detektörle gaz kromatografi, kütle spektroskopisi ya da bunların kombinasyonları kullanılabilir. Fakat bu yöntemin kantitatif analizlerdeki duyarlılığı ve teşhisin güvenilirliği farklılıklar gösterir. Bu nedenle tüm yöntemlerin bir madde için kullanılmayacağı, her madde ya da madde konsantrasyonları için uygun yöntem seçiminin zorunlu olduğu söylenebilir.

İlk olarak östrojen için geliştirilen (Talalay ve Marcus 1956) biyokimyasal yöntem 17-β-hidroksi steroid dehidrojenaz'ın redoks ekivalanlarının NADH veya NAD⁺ye taşınması temeline dayanan enzimatik bir testtir. Yetersiz spesifitesi ve düşük duyarlılığı nedeniyle hemen hiç kullanım alanı bulamayan bu yöntemden sonra protein bağlanması yöntemleri geliştirilmiş ve proteinler 3 grupta toplanmıştır:

1- Plazma globulinleri (Seksüel hormon bağlayıcı proteinler, kortikosteroid bağlayan proteinler): Seksüel hormon bağlayıcı ya da kortikosteroid bağlayıcı proteinler, yetersiz spesifiteleri

ve sınırlı kullanım olanakları nedeniyle hemen hiç kullanım alanı bulamamıştır.

2- Reseptörler (Sitoplazmik ya da zar üst yüzeyinde bulunan): Radyoreseptör testindeyse (Korenman 1968), reseptörlerin duyarsızlığı bir problemdir ve androjen ya da östrojenler (Blankenstein 1990) veya IGF-II gibi (Baxter ve De Mellow 1986, Zangger ve ark. 1987) spesifik antikorun oluşturulmasının güç olduğu grup analizlerinde kullanılabilir.

3- Arzu edilen hormona karşı immunizasyon sonucu kazanılan immunglobulinler: En yaygın kullanım alanı bulan test yöntemini immünojenik yöntemler oluşturur ve bu testler de antijen verildikten sonra antijene karşı oluşturulan antikorların bağlantı proteini olarak kullanılmasından köken alır. Şayet yeterli markeleme yapılabilirse, endokrinolojik sorunların çözümlenebilmesi için gerekli hassasiyete ulaşılabilir.

İMMUNOLOJİK TESTLER

İmmünojenik hormon testleri direkt, kompetitif olmayan immünojenik testler (Sandwich assayı) ve kompetitif testler olmak üzere 2 temel prensibe göre yürütülür.

Kompetitif olmayan testlerde antikor önce sabit bir faza bağlanır. Daha sonra test çözeltisindeki hormon veya antijen bu sabit faza adsorbe edilir ve nihayet markelenmiş ya da selektif olarak marke edilebilen bir ikinci antikor antijene bağlanır. Bulunan aktivite antijen miktarıyla orantılıdır ya da pozitif bir korelasyon gösterir (Clark ve Engvall 1980).

Kompetitif testlerde ise sabit miktardaki markelenmiş hormon, kendine özel belirli miktarlardaki antikorlara bağlanmak için standart ya da örnekteki markelenmemiş hormonlarla yarışır. Bu sırada bağlanan markelenmiş hormon miktarı, markelenmemiş hormon miktarıyla negatif bir korelasyon gösterir (Clark ve Engvall 1980).

Antikor bağlanması için en az iki bağımsız epitop gerekli olduğundan kompetitif olmayan test sadece yüksek moleküler ağırlıklı antijenlerle kullanılabilirken kompetitif test hemen tüm hormonların analizinde kullanım alanı bulur. Steroid ve prostoglandinler bir epitopa sahiptirler ve iki antikora bağlanma olanaksızdır. Bu nedenle bunlar için kompetitif testten başka alternatif yoktur. Her iki teknikte de bağlı ve bağlı olmayan markelenmiş maddenin (tracer) ayrılması zorunludur. Bu amaçla değişik yöntemler kullanılır. Örneğin antikor sabit bir faza tutunmuşsa serbest haldeki tracer'ın dökülmesi ya da ³H-steroidlerin aktif karbona adsorpsiyonu gibi yöntemler kullanılabilir.

İMMUNOLOJİK TEST YÖNTEMLERİNİN KULLANILMASI

Bugüne kadar tanınan hormonlar, hormon metabolitleri, sentetik hormon agonistleri ya da antagonistleri için geliştirilen radyoimmun testler endokrinolojik bilgilerin zenginleştirilmesini sağlamıştır. Bu bilgi birikimi hayvan yetiştiriciliği ve insan hekimliği gibi değişik alanlarda faydalı olmasına karşın, yöntemle bağlı bazı güçlükleri de vardır.

- Radyonüklidlerin stabil olmaması,

- Sizinlasyon sıvısından ileri gelen hayati tehlike ve radyoaktivite,

- Artıkların yaptığı çevre kirliliği,

- Yasalar çerçevesinde çalışma zorunluluğu,

- Laboratuvar donanımının ve reaktiflerin pahalı olması,

- Ölçümler için çok pahalı cihaz ve uzun zaman ihtiyacı gibi problemler nedeniyle alternatif yöntem arayışları sürmüş ve aglütinasyon testi (Alder ve Chi-Tan 1971), direkt spin radikali (Leute ve ark. 1972), direkt floresans (Aalberse 1973), chemilumineszenz (Schroeder ve ark. 1976) ve yakın zamanda enhanced-time-resolved-florescence (Lövgren ve ark. 1985) testleri geliştirilmiştir. Son yöntemde floresans sinyali Europium gibi maddelerin ilavesiyle oldukça kuvvetlendirilebilir. Spin radikali, çok pahalı değerlendirme cihazına ihtiyaç duyması, floresans ise yetersiz duyarlılık nedeniyle yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Aglütinasyon testi, özellikle gebelik teşhisinde geniş kullanım alanı bulur. Çünkü burada aranılan sadece belli düzeyde HCG varlığıyla oluşan renktir. Miktar tayini önemli değildir. Laboratuvarında oldukça fazla kullanım alanı bulan chemilumineszenz enzim immün testi ve enhanced-time-resolved-immunoassay çok hassas testlerdir ve tekrarlanabilirliği ve doğruluğu çok yüksektir. Fakat ölçüm ve değerlendirme için büyük cihaz donanımına ihtiyaç göstermeleri dezavantajlarını oluştururken, chemilumineszenz'de ayrıca ölçümlerin tekrarlanma şansı yoktur.

ENZİM İMMUNOASSAY (EIA)

Radyoimmunoassay (RIA)'e alternatif olarak geliştirilmiştir ve histoloji sahasında floresans işaretlenmesinde ve immün diffüzyona göre presipitasyon hattının tanınması ya da immün elektroforez için enzimin kullanılması prensibine dayanır (Nakane ve ark. 1966). Daha sonra deney tüpündeki immünreaktif bileşiklerin benzer prensibe göre tayini amacıyla, antijen ya da antikorun katı bir faza bağlanması gerçekleştirilmiştir (Engval ve Paerlman 1971, Van-Weemen ve Schuurs 1971). Bu ilk enzimimmün test, diğerlerinde olduğu gibi bağlı ya da serbest tracer'ın ayrılmasını gerektirir ve heterojen test olarak tanımlanır.

Rubenstein ve ark. (1972) bu ayırlama basamağını gerektirmeyen ve aktif enzimin sterik engellenmesine dayanan bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu tekniğe homojen ya da EMIT (Enzyme Multiplied Immuno Technique) yöntemi adı verilir ve lizozim ile malat dehidrojenaz için uygundur (Rubenstein ve ark. 1972, Rowley ve ark. 1975). Bugüne kadar sadece haptenler için kullanılmıştır ve hapten-enzim konjugatının aktivitesinin haptene antikorun bağlanması sonucu engellenmesi prensibine dayanır. Bu engellenme, serbest haptenin ortama verilmesiyle ortadan kaldırılabilir ve enzim aktivitesi artışı verilen haptin miktarıyla doğru orantılıdır.

Bu yöntemde antikor ya da antijenin sabit faza bağlanmaması bir avantajdır, keza bağlı ve serbest tracer'ın ayrılmasında gerekmez. Ayrıca tüm reaksiyon çözeltisi birbiri ardına verilebilir. Fakat adı geçen enzimlerin çok büyük spesifik aktiviteye sahip olmamaları ve enzim aktivitesinin analize edilecek

biyolojik sınırlardaki faktörlerden etkilenmesi bir dezavantajdır. Bu nedenle bu yöntemin kullanım olanağı yok denecek kadar azdır.

Yöntem çalışmaları sonucu özellikle hem insan hekimliğinde hem de veteriner hekimlikte enfeksiyon hastalıklarının teşhisinde kullanılan kompetitif olmayan, heterojen EIA geliştirilmiştir (Wardley ve Crowther, 1982).

Bu teşhislerde semikantitatif veya kalitatif değerler yeterli olduğundan özellikle hassasiyet açısından beklentilere EIA cevap vermiştir. Fakat 70'li yıllara kadar kompetitif, heterojen EIA hassasiyetinin düşüklüğü ve ancak çok hassas çalışma ile güvenilir sonuçların alınması gibi nedenlerle RIA'e alternatif olamamıştır. Heterojen EIA'nın kullanımında kritik aşama bağlı ve serbest tracer'ın ayrılması aşamasıdır. Başlangıçta bu amaçla elektroforez ya da kromatografi yöntemleri veya immunpresipitasyon kullanılmış, fakat katı faza bağlama en yaygın şekilde çalışılmıştır. Taşıyıcı olarak mikropartiküller (selüloz, agaroz, poliakrilamid, cam, naylon, polisitrol), deney tüpleri, mikrotitre plakları (polisitrol, poliakrilamid, naylon, polivinil klorid, selüloz asetatın yapılmış) kullanılmıştır (Burrels ve Dawson 1982, Carpenter 1984). Selüloz, agaroz, naylon, poliakrilamid gibi partiküllere antijen ya da antikor kovalent bağla bağlanır (Axen ve ark. 1967, Hendry ve Herrmann 1980). Mikropartiküllerin ayrılması santrifüjde gerçekleştirildiğinden zaman kaybına neden olması, çok titiz çalışma ile yeterli hassasiyete ulaşılması bir sorundur.

Polisitrol ve polivinil kloridten yapılmış deney tüplerine protein bağlanması kovalent olmayan adsorbsiyonla gerçekleştirilir. Ayrılma üst sıvının atılması ve yıkama ile yapılabilir. Fakat çok basit yürütülen protein bağlanması üst yüzeylerde adsorbsiyonun değişkenliğinin sonuçlarda hatalara yol açması bir dezavantajdır.

Bu nedenle heterojen EIA'de kullanılacak enzimin aşağıdaki niteliklere sahip olması gerekir (Murachi 1981);

- Çok düşük konsantrasyonlarda basit bir yöntemle hızlı ve güvenilir bir şekilde gösterilebilmesi,
- Enzim aktivitesinde kayıp olmaksızın bir başka moleküle bağlanabilecek reaktif gruba sahip olması,
- Yüksek bir saflık derecesine sahip olması ve stabil formda satın alınabilmelidir.

Enzimin seçiminde ayrıca test sırasında bazı faktörlerin bozucu etkisi, bağlanma kinetiğini etkileyen molekül ağırlığı, substratının dayanıklılığı gibi kriterler de göz önünde bulundurulmalıdır.

Doğada birçok enzim bulunmasına karşın, bugüne kadar kullanım sahası bulan enzimler Tablo 1'de verilmiştir.

En basit analiz prensibi fotometriktir. Bu prensip özellikle mikrotitrasyon plakları teknolojisinin gelişimi ve çok hızlı, hassas çalışan mikrotitre plakları fotometrilerinin üretilmesiyle en çok kullanılan prensip olmuştur. Yukarıdaki tabloda verilen enzimlerden peroksidaz (Horseradish) ve alkali fosfataz (dana barsağından) en yaygın olarak kullanılan enzimlerdir. Peroksidaz düzeylerinin

Tablo 1. Heterojen EIA İçin Kullanılan Enzimler ve Analiz Yöntemleri (Tijssen 1992).

Enzim	Analitik Prensipleri
Alkali Fosfataz	Fotometrik, Florometrik
Peroksidaz	Fotometrik, Florometrik, Lumineszenz
β -Galaktozidaz	Fotometrik, Florometrik
Glikoamilaz	Florometrik
Glikoz-oksidad	Fotometrik, Florometrik
Asetil kolin esteraz	Sizinlasyon, Spektrometrik
Katalaz	Termometrik
Luziferaz	Lumineszenz

belirlenmesinde sayısız substrat kullanılır (Al-Kaissi ve Chitan 1971) ve bunlar içerisinde o-fenil diamin (Gallati ve Brodbeck 1982) ya da 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (Bos ve ark. 1981) H-donörleri ve H₂O₂ co-substratları olarak en iyileridir. Fakat o-fenil diamin kuvvetli mutojen ve kanserojen olduğundan (Ames ve ark. 1975, Voogd ve ark. 1980) karsinojen ve mutojen olmayan tetrametilbenzidin (TMB) en uygun alternatiftir. Alkali fosfataz içinse p-nitrofenil fosfat kullanılır.

Mikrotitre plakları EIA'ile RIA ve diğer immun testler karşılaştırılırsa, mikrotitre plakları EIA'nın çok daha ekonomik olduğu görülür. Mikrotitre EIA'de cihaz ihtiyacı çok daha azdır, ihtiyaç duyulan reaktifler laboratuvar koşullarında üretilebildiğinden çok ucuzdur. Özellikle bu nokta hayvan yetiştiriciliği açısından çok avantajlıdır. Diğer avantajlarına gelince; radyonüklidlere ihtiyaç duyulmaz, atık problemi yoktur, testin yürütülmesindeki aşamalar diğerlerine göre daha azdır (Tijssen 1992).

Bu nedenlerle EIA, RIA'e karşı daima bir alternatif oluşturur ve çok yaygın kullanım alanı bulmaktadır.

EIA teknikleri Porstman ve Porstman (1979, 1981) tarafından aşağıdaki kriterlere göre sınıflandırılmıştır:

- 1- Her antijen molekülüne göre değişik sayıdaki reaksiyon ortakları sayısı (Bir yandan ya da iki yandan bağlanabilme)
- 2- İşaretli ya da işaretsiz reaksiyon ortaklarının reaksiyon verme prensipleri (kompetitif ya da kompetitif olmayan)
- 3- Reaksiyon ortamında bağlanmayan reaksiyon ürünlerinin ayrılması (Homojen ya da heterojen assay'ler)
- 4- Miktarı belirlenecek reaksiyon ortağına göre (Antijen miktarının belirlenmesi=EIA, Antikor miktarının belirlenmesi=ELISA)
- 5- İşaretlenen reaksiyon ortağı (Substrat, enzim, ligant, lektin)
- 6- İşaretlemede kullanılan madde
- 7- Reaksiyonda kullanılan antikorun kökeni (Bir türe özgü assay, iki türe özgü assay)
- 8- Reaksiyon basamakları sırasına göre (aynı zamanlı, ayrı zamanlı).

KAYNAKLAR

- Aalberse RC (1973) Quantitative fluoroimmunoassay. Clin. Chim. Acta., 48, 109.
Alder FL, Chi-Tan L (1971) Detection of morphine by haemagglutination-inhibition, J. Immunol., 106, 1684.

- Al-Kaissi E, Mostratos A (1983) Assessment of substrates for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay, *J. of Immunol. Methods*, 58, 127-132.
- Ames BN, Kammen HO, Yamasaki E (1975) Hair dyes are mutagenic: Identification of a variety of mutagenic ingredients, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72, 24-29.
- Axen R, Porath J, Ernback S (1967) Chemical coupling of peptides and proteins to polysaccharides by means of cyanogen halides, *Nature*, 214, 1302.
- Baxter RC, de Mellow JSM (1986) Measurement of insulin-like growth factor-II by radio receptor assay using ovine placental membranes, *Clin. Endocr.*, 24, 267.
- Blankenstein MA (1990) Comparison of ligand binding assay and enzyme immunoassay of oestrogen receptor in human breast cancer cytosols., *Breast Cancer Research and Treatment*, 17, 91-98.
- Bos ES, Van der Doelen AA, Van Rooy N, Schuurs AHWM (1981) 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as an ames test negative chromojen for horseradish peroxidase in enzyme immunoassay, *J. Immunoassay*, 2, 187.
- Burrells C, Dawson AMCL (1982) Fundamental aspects of elisa technology, In "The ELISA : Enzyme Linked Immuno Absorbent Assay In Veterinary Research And Diagnosis", Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science, Eds. Wardly RC, Crowther JR, Martinus Nijhoff Publishers, Vol.1, The Hague, 1-8.
- Carpenter AB (1984) Enzyme linked immunoassay, In "Manuel of Clinical Laboratory Immunology", Eds. Rose NR, de Macario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM, 2-9, American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Clark BR, Engvall E (1980) Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): Theoretical and practical aspects, In "Enzyme Immunoassay", Ed Maggio ET. 167-181, CRD Press, Boca Raton, Florida.
- Engval E, Paerlman P (1971) Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), Quantitatif assay of Immunglobulin G, *Immunochemistry*, 8, 871.
- Gallati H, Brodbeck H (1982) Peroxidase aus Meerrettich : Kinetische Studien und Optimierung der Aktivitätsbestimmung mit den Substraten H₂O₂ und o-Phenylendiamin. *J. Clin. Biochem.* 20, 221.
- Hendry RM, Herrmann JE (1980) Immobilisation of antibodies on nylon for use in enzyme-linked-immunoassays. *J. Immunol. Methods*, 35, 285.
- Korenman SG (1968) Radio-ligand binding assay of specific estrogens using a soluble uterine macromolecule, *J. Clin. Endocr.* 28, 127.
- Leute R, Ullmann EF, Goldstein A (1972) Spin immunoassay of opiates and narcotics in urine and saliva, *J. Amer. Med. Assoc.*, 221, 1231.
- Lövgren T, Hemmila I, Petterson, Halonen P (1985) Time-resolved fluorometry in Immunoassays, In "Alternative Immunoassay's", Ed. Collins WP, John Wiley and Sons Ltd., England, 203.
- Murachi Takachi MD (1981) Enzyme Reactions, In "Enzyme Immunoassay", Ed. Ishicava E, Kawai T, Miyai T, 5-14, Igaku-Shoin, Tokyo - New York.
- Nakane PK, Sri Ram J, Pierce GB (1966) Enzyme labelled antibodies for light and electron microscopic localisation of antigens. *J. Histochem. Cytochem.*, 14, 789.
- Porstmann B, Porstman T (1979) Aktivitätssteigerung von Merrettich-Peroxidase für den Einsatz im Enzymimmunoassay, *2. Med. Lab. Diegn.*, 20, 87.
- Porstman B, Porstman T (1981) Einsatz des Enzymimmunoassay in der klinisch chemischen, immunologischen und Entwicklungstendenzen., *Dt., Gesundheitswesen*, 36, 1986.
- Rowley GL, Rubenstein KE, Huisjen J, Ullman EF (1975) Mechanism by which antibodies inhibit haptin-malate dehydrogenase conjugates. *J. Biol. Chem.* 250, 3759.
- Rubenstein KE, Schneider RS, Ullman EF (1972) Homogenous enzyme immunoassay, a new immunochemical technique., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 47, 846.
- Schroeder HR, Vogelhut PO, Carrico RJ, Boguslaski RC, Buchler RT (1976) Competitive protein binding assay for biotin monitored by chemiluminiscences, *Anal. Chem.*, 48, 1933.
- Talalay P, Marcus PI (1956) Specificity, kinetics and inhibition of α - and β -hydroxysteroid dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 218, 675.
- Tijssen P (1992) Practice and Theory of Enzyme Immunoassay, In "Laboratory Techniques In Biochemistry And Molecular Biology", Eds. Burdon RH, Van Knippenberg PH vol. 15, Elsevier, Amsterdam.
- Van Weemen BK, Schuurs AHWM (1971) Immunoassay using antigen- enzyme conjugates. *FEBS Letters*, 15, (3), 232.
- Voogd CE, Van der Stel JJ, Jacobs JJAA (1980) On the mutagenic action of some enzyme immunoassay substrates, *J. Immunol. Methods*, 36, 55.
- Wardley RC, Crowther JR (1982) The ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay in veterinary research and diagnosis. Proceeding of a meeting held at the University of Surrey, Guildford, UK, Martinus Nijhoff Publishers the Hague-Boston, Londonor the commission of the European Communities.
- Zangger I, Zapf J, Froesch ER (1987) Insulin like growth factor I and II in 14 animal species and man as determined by three radioligand assays and two bioassays., *Acta Endocr. (Copenh)*, 114, 107.