

**T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
VBY-YL-2009-0002**

**SIĞIRLARDA KAN AKUT FAZ PROTEİNLERİ
DÜZEYLERİ ÜZERİNE HEMOLİZ, LİPEMİ VE
BİLİRUBİNEMİNİN ETKİLERİ**

Bedia AKAY

**DANIŞMAN
Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ**

AYDIN – 2009

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜNE
AYDIN

Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans Programı öğrencisi Bedia AKAY tarafından hazırlanan “**Sığırlarda Kan Akut Faz Proteinleri Düzeyleri Üzerine Hemoliz, Lipemi ve Bilirubineminin Etkileri**” başlıklı tez, 28/09/2009 tarihinde yapılan savunma sonucunda aşağıda isimleri bulunan jüri üyelerince kabul edilmiştir.

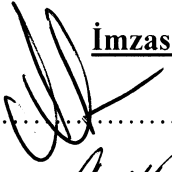

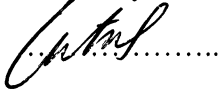
Ünvanı, Adı ve Soyadı :

Üniversitesi :

İmzası:

1– Prof. Dr. Ayşegül BİLDİK

ADÜ, Veteriner Fakültesi


.....

.....

.....

2– Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

3– Doç. Dr. Bülent ULUTAŞ

ADÜ, Veteriner Fakültesi

Jüri üyeleri tarafından kabul edilen bu Yüksek Lisans tezi, Enstitü Yönetim Kurulunun Sayılı kararıyla tarihinde onaylanmıştır.

Doç. Dr. Muharrem BALKAYA
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

Akut faz proteinleri, çeşitli hastalık ve doku hasarı gibi durumlarda plazma konsantrasyonlarında değişiklik görülen proteinlerdir. Veteriner hekimlikte akut faz protein düzeyleri ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır ve bu parametrelerin prognoz ve tedavinin etkinliğinin izlenmesinde önemli belirteçler olduğu bildirilmektedir. Aynı zamanda akut faz protein düzeylerinin hayvanların sağlık durumlarının kontrolünde de kullanılması önerilmektedir. Akut faz protein düzeylerin ticari test kitleri ile belirlenebilmektedir. Laboratuvarlara tanı amaçlı getirilen serum örnekleri hemolizli, lipemik ya da bilirubinemik olabilmektedir. Bu çalışmanın amacı sığırlarda son yıllarda kullanımı giderek artan akut faz proteinleri düzeyleri hemoliz, lipemi ve bilirubineminin üzerine etkilerinin araştırılmasıdır. Analiz sonuçları üzerine hemoliz, lipemi ve bilirubinemini muhtemel etkileri ile ilgili sığırlarda yapılmış bir çalışmaya rastlanmamıştır.

Araştırma, “Sığırlarda kan akut faz proteinleri düzeyleri üzerine hemoliz, lipemi ve bilirubineminin etkileri” isimli ve SAE-08014 kodlu proje olarak, Adnan Menderes Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenerek gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL VE ONAY SAYFASI	i
ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ	vii
1. GİRİŞ.....	1
1. 1. Akut Faz Yanıt.....	2
1.1.1. Akut Faz Yanıtın Başlatılması.....	3
1.1.2. Akut Faz Yanıtın Sürdürülmesi	4
1.1.3. Akut Faz Yanıtın Sonlandırılması	6
1. 2. Akut Faz Proteinleri.....	7
1. 2. 1. Pozitif Akut Faz Proteinleri	9
1. 2. 1. 1. Serum Amiloid A	9
1. 2. 1. 2. Haptoglobin	11
1. 2. 1. 3. Seruloplazmin	12
1. 3. Akut Faz Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları	14
1. 4. Akut Faz Proteinlerinin Klinik Kullanımı	15
1.5. Laboratuvar Analizleri Üzerine Etki Eden Faktörler.....	16
1.5.1. Hemoliz.....	17
1.5.2. Lipemi	18
1.5.3. Bilirubinemi	19
2. GEREÇ VE YÖNTEM	21
2. 1. Gereç	21
2. 1. 1. Hayvan Materyali	21
2. 1. 2. Kullanılan Cihazlar	21

2. 1. 3. Kullanılan Kimyasal Maddeler	21
2. 2. Yöntemler	22
2. 2.1. Hemolizli, Lipemik ve Bilirubinemik Örneklerin Hazırlanışı.....	22
2. 2. 2. Serum Seruloplazmin Düzeyi Ölçümü	23
2. 2. 3. Serum Amilod-A Düzeyinin Belirlenmesi	24
2. 2. 4. Serum Haptoglobin Düzeyinin Belirlenmesi.....	25
2. 2. 5. İstatistiksel Analizler	26
3. BULGULAR.....	27
4. TARTIŞMA	31
5. SONUÇ	34
ÖZET	35
SUMMARY	36
KAYNAKLAR.....	38
ÖZGEÇMİŞ	46
TEŞEKKÜR.....	47

SİMGELER VE KISALTMALAR

AAT	:	α 1-Antitripsin
AFP	:	Akut Faz Proteinleri
AFY	:	Akut Faz Yanıt
C-3	:	Kompleman-3
Ca	:	Kalsiyum
Cp	:	Seruloplazmin
CRP	:	C-Reaktif Protein
EDTA	:	Etilendiamin Tetra Asetik Asit
ELISA	:	Enzyme-Linked İmmunosorbent Assay
Fe	:	Demir
Hb	:	Hemoglobin
HDL	:	High Dansity Lipoprotein
Hp	:	Haptoglobulin
IFN	:	İnterferon
IFN- γ	:	İnterferon- γ
IL	:	İnterleukin
K	:	Potasyum
LDL	:	Low Dansity Lipoprotein
Mg	:	Magnezyum
RNA	:	Ribonükleik Asit
SAA	:	Serum amiloid-A
TNF	:	Tumor Necrosis Factor
VLDL	:	Very Low Dansity Lipoprotein

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1. Akut yangının sonlanması.....	6
Şekil 2. İnflamatuvar uyarıyı takiben bazı pozitif ve negatif akut faz proteinlerinin serum konsantrasyonundaki değişiklikler	9
Şekil 3. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin ortalama haptoglobin sonuçları	28
Şekil 4. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin ortalama serum amiloid A sonuçları	29
Şekil 5. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin ortalama serum seruloplazmin sonuçları.....	30

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1. Pozitif ve negatif akut faz proteinleri	8
Çizelge 2 Yangısal durumlarda farklı türlerdeki AFP reaksiyonları	8
Çizelge 3. Bazı önemli akut faz proteinlerin görevleri	15
Çizelge 4. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin haptoglobin, serum amiloid A ve seruloplazmin sonuçları	27

1. GİRİŞ

Akut faz yanıt (AFY) herhangi bir doku hasarını takiben kısa sürede ortaya çıkan nonspesifik bir reaksiyondur. İnfeksiyöz, immunolojik, neoplastik, travmatik ya da paraziter nedenlerden dolayı oluşur (Kent 1992, Eckersall 2000, Ceron ve ark (2005). Akut faz reaksiyonun en önemli özelliği, karaciğerden haptoglobin, serum amiloid-A (SAA), C-reaktif protein (CRP) gibi AFP'nin üretimidir. Karaciğerden bu proteinlerin üretimi proinflatuvar sitokinler tarafından düzenlenir (Baumann ve Gauldie 1994). AFP'nin biyolojik etkileri tam olarak bilinmese de, yabancı maddeleri bağlamak, opsonizasyonu sağlamak ve fagositik hücre fonksiyonunu düzenlemek gibi etkileri vardır (Ceron ve ark 2005). Veteriner hekimlikte son yıllarda AFP düzeylerinin belirlenmesinin tanı, prognoz ve tedavinin izlenmesinin yanı sıra hayvanların genel sağlık taramalarında da kullanılabileceği rapor edilmiştir (Eckersall 2000). Ruminantlarda en önemli AFP haptoglobin, SAA ve seruloplazmin olarak bildirilmiştir (Conner ve ark 1988, Solter ve ark 1991, Gruys ve ark 1994, Alsemgesst ve ark 1996).

Laboratuvarlara gönderilen serum ve plazma örneklerinde hemoliz, lipemi ve bilirubinemi sık rastlanılan olgulardır. Biyokimyasal analiz sonuçlarını etkilediği bilinen bu etkenlerin sığırlarda AFP düzeyleri üzerine etkilerinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sığırlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan AFP analizlerinin hemoliz, lipemi ve bilirubinemiden etkilenip etkilenmediğinin ortaya konması amaçlanmaktadır. Bu çalışmanın sonuçları rutin biyokimya laboratuvarlarında kullanımı artan AFP analizlerini etkileyen faktörlerin ortaya konması ve hemoliz, lipemi ve bilirubinemik kanlardan yapılan analizlerden nasıl sonuçlar alınacağını göstermesi açısından yararlı olacağı düşünülmektedir.

1.1. Akut Faz Yanıt

AFY; doku hasarını sınırlandırmada, travma, enfeksiyon veya yangıyı takiben iyileştirmeyi uyaran doğal bir savunma mekanizmasıdır (Habif 2005, oşkun ve Şen 2005, McGrotty ve ark 2003). Kushner (1982) tarafından AFY, stres ya da bir travmanın olumsuz etkilerine karşı organizmayı hazırlıklı hale getirmek amacıyla oluşan bir dizi reaksiyonlar olarak tanımlanmıştır. Klinik olarak ise ateş ve anoreksi ile kendini gösterir (McGrotty ve ark 2003). Ayrıca doku hasarına bağlı olarak ortaya çıkan yangı sürecindeki farklı sistemik ve lokal olayları tanımlamak için kullanılır. Diğer bir bakış açısından; AFY terimi, vücuttaki yanıtla ilişkili olarak bir dizi plazma proteinlerinin konsantrasyonlarındaki değişimleri ifade etmektedir. Bu değişimler karaciğerdeki protein sentezinde meydana gelen etkileşimlerin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır (Pannen ve Robotham 1995).

AFY ile bir organın daha fazla hasara uğramasının engellenmesi, enfeksiyöz ajanın izolasyonu ve yok edilmesi, zararlı moleküllerin ve artıkların uzaklaştırılması ve organın normal fonksiyonlarına dönebilmesi için gerekli olan onarım sürecinin başlatılması sağlanmaktadır (Dınarello 1984, Baumann ve Gauldie 1994). Doku hasarını minimuma indirerek başka patojen girişini engellemek, onarımı başlatmak ve böylece konakçı homeostatik mekanizmalarının hızlı bir biçimde normal fizyolojik fonksiyonunu kazanmasını sağlamaktır (Batirel ve ark 2003). AFY, gelişen doku hasarı sonrası süreçte fizyolojik homeostazisin sağlanması ve yaşamın sürdürülebilmesi için ilk koşul olarak değerlendirilmektedir (Dınarello 1984). Bakteriyel, daha az oranda viral enfeksiyonlar, travma, malign neoplasmlar, yanıklar, doku infarktları, immunolojik ve inflamatuvar olaylar, yoğun egzersiz ve doğum AFY'a neden olan uyarılardır. Subklinik enfeksiyonu ya da romatoid artrit, Crohn hastalığı, otoimmun hastalıklar gibi kronik hastalığı olanlarda da akut faz değişikliklerine rastlanabilir. Akut faz değişiklikleri subklinik hastalıkların veya bazı kanserlerin belirtisi de olabilir. Hastalığın lokalize veya generalize doğasından bağımsız olarak, AFY genel bir konakçı reaksiyonudur (Batirel ve ark 2003). AFY non-spesifik immun yanıtın bir parçasıdır ve uyarıcı durumların geniş bir dağılım göstermesinden dolayı bazı komponentleri değişken düzeylerde süreklilik arz etmektedir. AFY'ı daha seçici olan sistemik yanıt takip etmektedir. Sistemik AFY'ın karakteristik özellikleri arasında (i) ateş, (ii) nötrofili, (iii) lipid metabolizmasındaki değişiklikler, (iv) demir ve çinko düzeylerinde azalmalar, (v) glukoneogenezisde artma, (vi) protein katabolizmasında artış ve kastan karaciğere

amino asit transferi, (vii) komplement ve koagulasyon sistemlerinin aktivasyonu, (viii) hormonal değişiklikler ve Akut faz protein (AFP) sentezi yer almaktadır (Kushner 1982, Baumann ve Gauldie 1994, Ay ve ark 1998).

1.1.1. Akut Faz Yanıtın Başlatılması

Hasara uğrayan dokuda yangısal süreç genellikle doku makrofajları veya kandaki monosit hücreleri gibi mononükleer hücreler tarafından başlatılır. Bu hücreler; sitokinler, lipid mediatörler, vazoaktif aminler, komplement ve pıhtılaşma ürünleri, proteazlar, reaktif oksijen türleri ve nitrik oksit gibi geniş spektrumlu yangısal mediatörleri salarak lokal ve sistemik yangısal reaksiyonları oluştururlar (Olson ve ark 1995). Doku hasarının bulunduğu bölgeden salınan medyatörlere cevap olarak sentezlendikleri düşünülen bu proteinlerin serumdaki dönüşümleri hızlıdır. Bu proteinlerin düzeylerinin yükselmesinden önceki döneme lag fazı adı verilmektedir. Lag fazı esnasında alınan serumun hayvanlarda veya organ kültürlerinde AFP'ni uyarma yeteğini aktarabildiği gösterilmiştir (Ay ve ark 1998).

Lokal reaksiyonlar, kapillar geçirgenlikteki artışı ve yangı bölgesine lökosit infiltrasyonunu kapsar. Artan kapillar geçirgenlik, dolaşım ve hasarlı doku alanı arasında proteinaz inhibitörleri, transport proteinler ve iyonlar gibi birçok farklı moleküllerin geçmesine izin verir. Fagositik hücreler olan nötrofilik granülositler ve makrofajlar yabancı antijenlerin uzaklaştırılmasında anahtar rol oynar. Yangı bölgesine lökosit infiltrasyonu için lökositlerin endotele adhezyonları gerekir. Lökositlerin endotele adhezyonunu diapedez takip eder ve yangısal odağa göçleri, farklı kemotaktik faktörlerin rehberliğinde gerçekleştirilebilir (Olson ve ark., 1995).

Sitokinler farklı hücre tipleri tarafından oluşturulan multipotent polipeptidlerdir. Sentezleri yukarıda anlatılan yangısal mediatörler tarafından başlatılır. Tümör nekrozis faktör- α (TNF- α), interlökin-1 (IL-1), interlökin-6 (IL-6) ve interferon- γ (IFN- γ) gibi pro-inflamatuar sitokinler sistemik yangısal yanıtın başlatılabilmesi için gerekli olan başlıca maddelerdir (Kushner ve Mackiewicz 1987, Baumann ve Gauldie 1994, Murtaugh ve ark 1996, Çoşkun ve Şen 2005). IL- 1, aktive edilmiş monosit ve makrofajlar tarafından üretilir, akut faz proteinleriyle ilgili birçok gene etkili olduğu gösterilmiştir. Membrana bağlı IL-1'in konak defansında ve lokal doku homeostatik

mekanizmalarının değiştirilmesinde önemli olduğu görüőü hakimdir. TNF- α , protein metabolizması üzerine etkisinden dolayı kaőeksin diye adlandırılmasının yanı sıra akut faz reaksiyonu sinyallerinin iletilmesini de düzenler. TNF- α ve IL-1 yapı açısından farklı iki düzenleyici olmalarına rağmen, fonksiyonel olarak birçok ortak noktaları vardır. Her iki düzenleyici de ateőe sebep olabilir, prostoglandin sentezini stimule eder, kollajenaz sentezini artırır ve her biri farklı bir hücre yüzey reseptörüyle etkileşmesine rağmen tümör hücresi bölünme hızını yavaşlatır. İnterferon- γ , rekombinant olarak üretilir ve insan mononükleer ve hepatosit hücrelerinde ve sıçan fibroblastlarında C2, C4 ve faktör B sentezini artırırken, akut faz cevabını oluşturan diğer plazma proteinlerinin genleri üzerindeki etkisi bilinmemektedir (Ay ve ark 1998). Lokal reaksiyon bölgesinde bu sitokinler fibroblastlar ve endotel hücreleri gibi stromal hücreleri aktive eder ve sitokinlerin ikinci salınımını başlatır (Baumann ve Gauldie 1994).

Sitokinlerin hedef hücredeki etkileri, diğer sitokinler, hormonlar, sitokin reseptör antagonistleri ve dolaşımdaki reseptörler tarafından uyarılabilmekte ya da inhibe edilebilmektedir (Habif 2005).

1.1.2. Akut Faz Yanıtın Sürdürülmesi

AFY klinik olarak; yangısal bulgular, ateş, iőtahsızlık ve depresyon ile karakterizedir. Bu bulgular hasta hayvanlardaki homeostatik kontrol mekanizmalarındaki değişikler sonucu ortaya çıkmaktadır. Bunlar:

a) Endokrinolojik Değişikler: AFY süresince hormonal etkileşimler tartışılmakta ve farklı hayvan türlerinden elde edilen sonuçlar farklılıklar göstermektedir (Hirvonen 2000). AFY'a bağlı olarak adreno-kortikotropik hormon, kortizol, adrenal katekolaminler, glukagon, insulin, büyüme hormonu, aldosteron, vasopressin ve prolaktin hormonlarının serum konsantrasyonları artış gösterirken (Paape ve ark 1974, Kushner 1982, Kushner ve Mackiewicz 1987, Dınarello 1984, Boosman ve ark 1990, Kushner 1993), akut dönemde renin, tiroksin ve gonadal steroidlerin serum konsantrasyonlarında azalmalar gözlemlendiği bildirilmektedir (Mandrup ve ark 1995). AFY'ta gelişen endokrinolojik değişikliklerin temel nedenleri tam anlamıyla açıklığa

kavuşturulamamış olmakla birlikte, değişliklerin vücuttaki enerji metabolizmasının uyarılması sonucunda oluştuğu düşünölmektedir (Hirvonen 2000).

b) Metabolik Değişikler: AFY sürecindeki temel metabolik değişimler protein katabolizmasında artma ve glukoneogenezisdir. Gıda alımının azalmasıyla birlikte kas proteinleri yeni proteinlerin sentezi için gerekli olan aminoasitlere yıkımlanırlar. Aminoasitler, lenfosit ve fibroblastların proliferasyonu ve doku yenilenmesi için gerekli olan kollojenlerin, hepatik AFP'nin ve immunoglobulinlerin sentezi için gereklidir. Aminoasitler ayrıca glukoneogenezis ve enerji üretimi için de kullanılmaktadır. Anabolik süreç dışında kas proteinlerinin katabolizması hasta hayvanda kilo kaybı ve negatif azot dengesi ile sonuçlanır. Böbrek, karaciğer ve akciğer gibi bazı merkezi organlar seçici olarak bu katabolizmadan korunmaktadırlar. Bunun nedeni tam olarak açık olmamakla birlikte, bu dokular AFY sürecinde aktiviteleri sıklıkla artış gösteren retikuloendotelial sistemin önemli komponentleri olması ile ilişkilendirilmektedir (Jennings ve Elia 1996).

AFY boyunca en önemli metabolik değişiklik ileride daha detaylı olarak anlatılacak olan AFP'nin karaciğerdeki sentezinin yüksek düzeyde artışıdır (Kushner 1982, Kushner ve Mackiewicz 1987, Conner ve Eckersall 1988, Baumann ve Gauldie 1994, Gruys ve ark 1994, Raynes 1994).

c) Hematolojik ve Biyokimyasal Değişikler: AFY ilk saatlerindeki en önemli bulgulardan biri lökopeni ve sola kaymadır. Lökopeni, strese bağlı ortaya çıkan lenfosit azalmasından ve yangısal odağa nötrofil göçünden kaynaklanmaktadır. Erişkin nötrofillerin tükendiği noktada genç nötrofiller dolaşıma geçmekte ve belirgin bir sola kaymaya neden olmaktadır. Erişkin nötrofillerin azalmasından sonraki birkaç saat içinde kemik iliğinden granulopoesis uyarılmaktadır. Bu durum akut yangının başlangıcından sonraki 1 veya 2. günlere denk gelmekte ve belirgin bir lökositoza neden olmaktadır(Kidd 1991, Jain 1993)..

AFY sürecinde serumda bazı iz element konsantrasyonlarında değişimler meydana gelmektedir (Kushner 1982). Çinko ve demir düzeyleri azalmalar gösterirken plazma bakır konsantrasyonunda artışlar gözlenebilmektedir. Bu iyon değişiklikleri katyonların bağlandıkları plazma proteinlerinde meydana gelen değişikliklerden, daha da önemlisi, hücresel mekanizmalardaki değişimlerden kaynaklanmaktadır(Lohuis ve ark 1988, Otabe ve ark 2000).

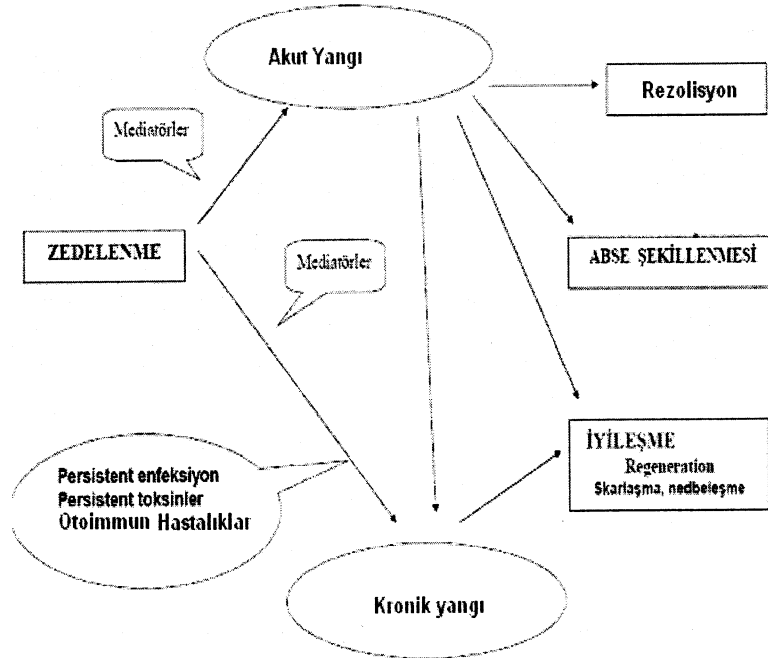
d) *Nörolojik Değişikler*: Merkezi sinir sistemini baskılamasına bağlı olarak, AFY süresinde uyku hali gelişebilmektedir. Yangısal alan sıklıkla ağrılıdır. Bradikinin gibi vazoaaktif aminler AFY’ta ağrı oluşumundan sorumludur (Baumann ve Gauldie 1994).

e) *İmmunolojik değişiklikler*: AFY’ın lenfosit aktivitesi, nötrofillerin bakterisidal etkiliği ve makrofajların fagositik aktivitelerinde azalma gibi immün sistemi baskılayıcı etkinlikleri bulunmaktadır (Kohler ve Prokop 1978, Kushner 1982).

1.1.3. Akut Faz Yanıtın Bitirilmesi:

AFY’ın sonlandırılması için glukokortikoidler, interlökin-4 (IL-4), interlökin-10 (IL-10) ve belirli pro-inflamatuvar sitokinler için reseptör antagonistleri gibi birçok yangısal mediatörlere gereksinim duyulmaktadır. AFY’ın sonlanması ve organizmanın normal fonksiyonlarına dönebilmesi 1-2 günü bulabilmektedir. Akut yangı kronikleştiği takdirde AFY da uzayabilmektedir (Baumann ve Gauldie 1994). AFY sürecini beslenme bozuklukları gibi birçok fizyolojik veya patofizyolojik olay etkilemektedir (Jennings ve Elia 1996).

AKUT YANGINININ SONLANMASI



Şekil.1. Akut yangının sonlanması (Anonim 2009)

1.2. Akut Faz Proteinleri (AFP)

İlk olarak Francis ve Tillet 1930'lu yıllarda *Streptococcus pneumonia* enfeksiyonlarında bir proteinin plazma konsantrasyonunun arttığını göstermiş ve akut enfeksiyon anında artan bu proteine bakterinin C polisakkaritine karşı sentez edildiğini düşünerek C-reaktif protein (CRP) adını vermiştir (Kushner 1982). Daha sonraki araştırmacılar CRP ile birlikte bazı proteinlerin de konsantrasyonlarının arttığını bildirmişlerdir. Bunlardan bazıları, serum amiloid A (SAA), α_1 -antitripsin, seruloplazmin, haptoglobulin gibi proteinlerdir (Gruys ve ark 1994, Ulutaş 2003).

Akut uyarı sonucu konsantrasyonları değişen bu proteinlere AFP denilmiştir. Akut faz yanıt sonucu kanda konsantrasyonları en az %25 artan AFP'ne, pozitif AFP denir. Bu proteinler temelde sitokinlerin spesifik uyarımları ile hepatositlerden salgılanan glikoproteinlerdir. Pozitif AFP'nin hepatik mRNA'lardan sentezi, albümin gibi normalde sentezlenen serum proteinlerinde önemli bir azalma ile birleşir. Akut faz reaksiyon sırasında bazı serum proteinlerinin konsantrasyonlarında azalma gözlenir. Plazma konsantrasyonları azalanlara da negatif AFP denir (Gruys ve ark 1994, Heegard ve ark. 2000). AFP, immunoglobulinler gibi enfeksiyon ya da travma esnasında oluşan yangıya cevap olarak sentez edilirler. Ancak immunoglobulin değildirler. Konakçı savunma mekanizmasında önemli bazı görevler üstlendikleri bildirilmektedir. Bu proteinler fagosit kaynaklı proteazların inhibisyonunda, hücrel atıkların temizlenmesinde, yangısal olayın yönlendirilmesi ve inhibisyonu şeklinde fonksiyon görürler. AFP miktarında önemli değişikliğe neden olan durumlar ise; enfeksiyonlar, travmalar, cerrahi girişimler, yanıklar, doku infarktları ve çeşitli immünolojik hastalık durumlarıdır (Habif 2005). Şiddetli egzersiz, sıcak çarpması ve doğum, ılımlı derecede yükselmelere neden olurken, psikolojik stres sonrasında ve çeşitli psikiyatrik hastalıklarda hafif yükselmeler gözlenebilmektedir. AFP'nin miktarındaki artışın büyüklüğü ise; molekülün büyüklüğüne, yayılım hacmine, uyarının miktarına ve duyarlılığına, katabolizma oranına bağlıdır (Habif 2005). AFP ölçülmesiyle teşhisde, prognozda ve uygulanan tedavinin etkinliğinin gözlenmesinde önemli bilgiler sağlamaktadır (Coşkun ve Şen 2005). Fakat hastalığın dönemi (akut ve kronik) birden fazla AFP'lerin ölçülmesiyle daha iyi değerlendirilebileceği vurgulanmıştır (Eckersall 2004).

Çizelge 1. Pozitif ve negatif akut faz proteinleri (Batirel ve ark 2003)

Pozitif AFP		Negatif AFP
CRP	Ferritin	Albümin
SAA	Fosfolipaz A	Transferin
α 1 Asit Glikoprotein	Fibronektin	Transtretin
Seruloplazmin	Homopeksin	A2 HS Glikoprotein
Kompleman(C3-4)	Mannoz bağlayan protein	
C1 esteraz inhibitörü	Lipopolisakkarid bağlayan protein	
Makroglobin		

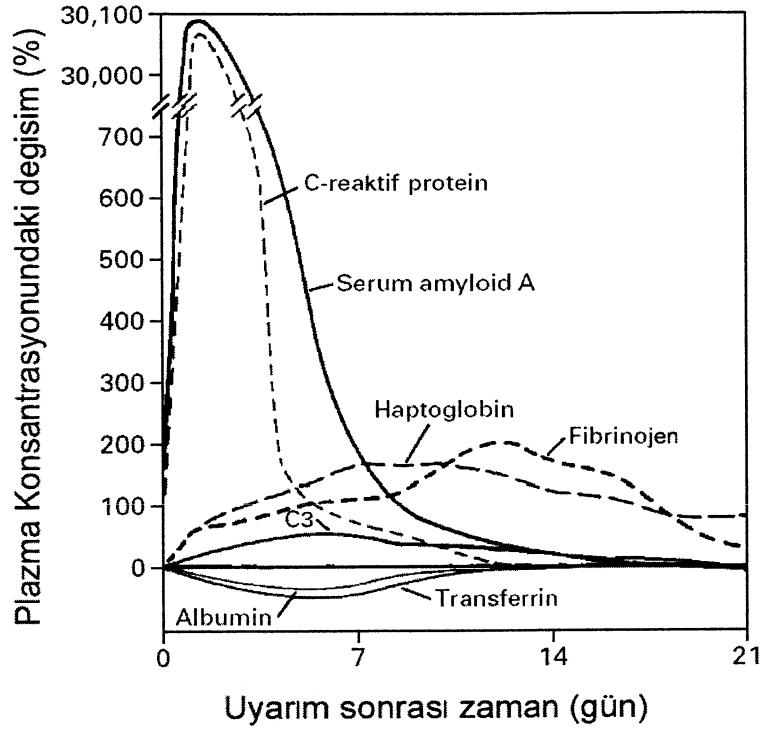
Çizelge 2. Yangısal durumlarda farklı türlerdeki AFP reaksiyonları (Petersen ve ark 2002).

	Köpek	İnsan	Sığır	Fare	Rat
CRP	III	III	0	I	II
SAA	III	III	II	III	0
Haptoglobin	II	II	III	III	II
Fibrinojen	II	II	I	II	II
Albumin	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG
α 1-Asit Glikoprotein	II	II	II	III	II
Serum Amyloid-P	?	0	0	I-III	0

0: Değişiklik yok; I: %50 ile %100 arasında artış; II: %100 ile 10 kat arasında artış; III: 10 kattan daha fazla artışlar; NEG: Konsantrasyonunda düşme; ?: Literatürde protein yanıtı ilişkin bir bilgiye rastlanmadı.

Plazma düzeyinde değişiklik görülen AFP, türler arasında farklılıklar olmasına rağmen genel olarak şu şekilde sınıflandırılabilir:

1. Düzeyi %50 artanlar: Seruloplazmin, kompleman-3(C-3)
2. Düzeyi 2-4 kat artanlar: Haptoglobin, fibrinojen, α -1 antitripsin, α -1 asit glikoprotein
3. Düzeyi 100 kat artanlar: CRP, SAA
4. Düzeyi Azalanlar: Transferrin, Albümin, Prealbümin (Diker 1998, Gruys ve ark 1994, Krüger ve ark 1995).



Şekil 2. Yangısal uyarıyı takiben bazı pozitif ve negatif AFPLerinin serum konsantrasyonundaki değişiklikler (Clayes ve ark 2002).

1. 2. 1. Pozitif Akut Faz Proteinleri

1. 2. 1. 1. Serum Amiloid A

SAA, CRP gibi pentamer yapıdadır. Molekül ağırlığı 15 kD dur (Ceron ve ark 2005). Dolaşımda SAA1, SAA2 ve SAA4 olmak üzere 3 tipi vardır (Habif 2005). SAA1 ve SAA2 infeksiyon ve infeksiyona bağlı olmayan yangılarda çok fazla yükseldikleri için AFP olarak kabul edilmektedirler. SAA4 ise HDL yapısında yer alan yapısal bir apolipoprotein olup, AFP olarak kabul edilmemektedir (Habif 2005). SAA karaciğerde sentez edilir (Muşabak ve ark 2003). Karaciğer A-SAA ve C-SAA'ların primer sentez bölgesi olmasına karşın, ekstrahepatik üretimde bildirilmiştir (Batirel ve ark 2003). Hücre dışına çıkan SAA HDL'ye bağlı olarak kanda taşınmaktadır. SAA üzerinde kalsiyum, laminin, heparin/heparan sülfat için bağlanma bölgeleri tanımlanmış olup bu bağlanmalarla ilişkili olarak yeni işlevlerden söz edilmektedir (Urieli ve ark 2000).

Yangısal durumlarda dolaşımdaki konsantrasyonunda çok yüksek artışlar meydana gelen SAA lenfositlerce antikor oluşumunu engellemekte, trombosit aglutinasyonunu ve kollojenazı inhibe etmekte, endotel hücrelerinde lökosit adezyonunu arttırmaktadır (Jensen ve Whitehead 1998, Habif 2005). Ayrıca hücre adezyonunu, migrasyon, proliferasyon ve agresyonunu da etkilediği gösterilmiştir (Van Lenten ve ark 1995, Yamada 1999).

İnflamatorik durumlarda, HDL yapısındaki Apo AI ve ApoAII düzeyi düşmekte ve SAA düzeyi artmaktadır (Van Lenten ve ark 1995, Yamada 1999, Habif 2005). Yapılan deneysel çalışmalar SAA'dan zengin HDL'nin makrofajlara bağlanma afinitesini arttırdığını göstermiştir. Bu durum doku tamiri için lipidlerin doku hasarı bölgesine taşınmasına aracılık eder (Cunnane ve Whitehead 1999). SAA ayrıca kolesterol esterleşmesinde önemli bir rolü olan lesitin kolesterol açil transferaz enzimini baskılamaktadır. SAA' nın LDL oksidasyonunu arttırarak aterosklerotik arterlerdeki yangılara dahil olduğu bildirilmiştir. Bu durumun, SAA ile birlikte taşınan LDL' nin, spesifik olmayan tutuluşuna bağlı olduğu sanılmaktadır (Habif 2005).

AFY sırasında en hızlı ve en fazla yükselen proteinlerden olan SAA ve CRP arasında bir kıyaslama yapıldığında SAA'daki artışın şiddetinin CRP'den fazla olduğu görülmüştür (Muşabak ve ark 2003). SAA'nın fizyolojik düzeyleri CRP'den daha yüksek olduğu için hafif düzeydeki artışları saptamakta mümkün olmaktadır. Ayrıca SAA düzeyindeki artış CRP'den daha uzun sürmektedir (Orro ve ark 2008). Viral infeksiyonlarda SAA hafif derecede yükselirken, CRP genellikle saptama limitinin altında kalmaktadır. SAA' fizyolojik düzeyleri CRP' den yüksek olduğu için hafif derecedeki artışların gözlenebilmesi daha kolaydır. SAA ile CRP arasındaki en önemli fark, böbrek transplantasyonu uygulanan olgularda gözlenmektedir (Habif 2005).

Ruminantlarda SAA ve haptoglobin en önemli pozitif AFPleri olarak bildirilmiştir (Orro ve ark 2008).

1.2.1.2. Haptoglobin

Haptoglobin, doku hasarı, infeksiyon ve yangı sonucu karaciğerde üretilen bir AFP'dir. (Gryus ve ark 2005, Nakagawa 1997, Petersen ve ark 2002, Young ve ark 1996). Haptoglobinin temel yapısını, immünglobulinlere benzeyen, birbirine disülfid bağlarıyla bağlı olan iki ağır, iki hafif zincir (α_2 ve β_2) oluşturur, elektroforetik olarak üç ayrı fenotip görülebilir. Zencilerin ve Asyalı yetişkinlerin küçük bir yüzdesinde haptoglobin tespit edilemez. Haptoglobin fenotipleri, toplumların etnik orjinini tespit etmede iyi bir göstergedir. Haptoglobin, iki α iki β -polipeptit zincirinin oluşturduğu 4 alt üniteye sahip, total molekül ağırlığı 104,000 dalton olan bir poliformik glikoproteindir (Ay ve ark 1998). Haptoglobin β zinciri ile serin proteazlar arasında yakın benzerlikler mevcuttur. Haptoglobin β geninin evrim sırasında proteolitik aktivitesini kaybederek, hemoglobin bağlama özelliği kazandığı sanılmaktadır (Habif 2005). Plazmada hemoglobin ile stabil bir bileşik oluşturan glikoprotein yapıda bir proteindir. α -2 fraksiyonunda görülür (Burtis ve Ashwood 1999). Bu şekilde böbreklerden serbest hemoglobin kaybını önler (Heegard ve ark 2000, Kaneko 1980, Makimura ve Suzuki 1982, Subiela ve ark 2002). Karaciğerden haptoglobin salgılanması glikokortikoidler ve sitokinlerin kombine etkisi ile başlatılır (Higuchi ve ark 1994, Nakagawa 1997, Petersen ve ark 2002). Haptoglobin demir bağlar ve infeksiyon boyunca demir kaybını önler ayrıca bakterinin kullanabileceği demir düzeyini minimize eder (Regessa ve Noakes 1999). Haptoglobin ya da haptoglobin-hemoglobin kompleksi için ileri sürülen diğer işlevler, demiri bağlayarak serbest radikallere karşı koruyucu etki göstermesi, lokal olarak sentezlenen haptoglobinin akciğerde önemli bir antioksidan olması ve antimikrobiale aktivite göstermesidir (Habif 2005).

Haptoglobin, ruminantlarda hemolitik durumlar dışında en önemli AFPi olarak bildirilmiştir (Gryus ve ark 2005, Regessa ve Noakes 1999). Hemolitik bir epidozu takiben, sirkülasyondan temizlenebilmesi için hemoglobinle kompleks yaptığından haptoglobin konsantrasyonu düşer. Bu durum, hemolitik transfüzyon reaksiyonunda massif hemolizi izleyen periyotta, termal yanıklarda ve otoimmün hemolitik anemide gözlenir. Hemolitik anemide serbest hemoglobininin doku içi birimini engeller (Ay ve ark 1998). Sağlıklı hayvanlarda serum haptoglobin düzeyi belirlenebilir sınırların altındadır. Sığır ve koyunlarda doku hasarı, infeksiyon ve yangıyı takiben konsantrasyonunda belirgin artışlar oluşur (Conner ve Eckersall 1988, Conner ve ark

1988, Horadogada ve Eckersall 1994, Pfeffer ve Rogers 1989, Pfeffer ve ark 1993, Skinner ve ark 1991, Skinner ve Roberts 1994, Walker ve ark 1994, Wittum 1996). Haptoglobin, köpeklerde düşük seviyede tepki veren bir APP olarak tanımlanmasına rağmen, çeşitli yangı durumlarında diagnostik ve prognostik indeks olarak kullanılmaktadır (Çoşkun ve Şen 2005). Serum haptoglobini strese, enfeksiyona, akut enflamasyona veya doku nekrozuna cevap olarak sentezin stimüle edilmesiyle yükselir (Ay ve ark 1998). Plazma haptoglobin seviyesinin nefrotik sendrom ve yanıklarda artarken hemolitik anemilerde haptoglobinin hemoglobine bağlanmasından dolayı, karaciğer hastalıklarında ise sentezlenmediği için azalır (Çoşkun ve Şen 2005). Diğer taraftan otoimmün hemolitik anemili köpeklerde CRP konsantrasyonunun arttığı, fakat haptoglobin seviyesinin azaldığı tespit edilmiştir (Caspi ve ark 1987). Üriner sistem operasyonu geçiren kedilerde yükseldiğini tespit etmişlerdir (Çoşkun ve Şen 2005). Ayrıca mastitis, metritis, pyometra, travmatik retikulositis, abomasum deplasmanı, travmatik perikarditis, bakteriyel nefritis ve hepatik lipidosisli sığırlarda yüksek haptoglobin konsantrasyonu gözlenmiştir (Nakagawa 1997, Yoshino ve ark 1993, Young ve ark 1996). Haptoglobinin görevinin, böbreklerde gelişebilecek hasarı engellemek olduğu düşünülmüştür. Lokal yangısal yanıtın kontrolünde belirgin derecede rol aldıkları ve bunun haptoglobinin birincil görevi olabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca haptoglobin-hemoglobin kompleksi güçlü bir peroksidazdır, fagositoz sırasında ve yangı bölgesinde ölmekte olan lökositlerden açığa çıkan peroksidleri hidroliz etme kapasitesi vardır. Bu nedenle antiinflamatuvar etkisi olan bir AFP'dir (Habif 2005)

1.2.1.3. Seruloplazmin

Tek bir polipeptid zincirinden oluşan ve bir α_2 -globulin olan seruloplazmin molekül başına altı bakır atomu bağlamaktadır (Conner ve Eckersal 1988). Yapısındaki bakır atomlarından dolayı saf protein mavi renklidir ve adını bu özelliğinden alır (Tietz 1989, Burtis ve Ashwood 1999). Molekül ağırlığı 132,000 civarındadır (Hill ve ark 1997). Molekül başına altı bakır atomu bağlanmaktadır. Seruloplazminin polipeptit zincirine bağlı sialik asit kısmı %10 karbonhidrat içermektedir (Ay ve ark 1998). Temel olarak karaciğer parenkim hücrelerinde, az miktarda da makrofaj ve lenfositlerde sentez

edilmektedir. Birincil işlevi, redoks tepkimelerinde rol almasıdır (Habif 2005). Seruloplazmin toksik ferro demirin, toksik olmayan ferri demire oksitlenmesini sağlar (Ceron ve ark 2005). Seruloplazmin demirle ilişkili serbest radikal yaralanmalardan dokuları korumakta, çeşitli antioksidatif ve sitoprotektif olaylarda da görev almaktadır (Murata ve ark 2004, Çoşkun ve Şen 2005). Seruloplazminin sentezi bakır atomları tarafından stimule edildiği gibi AFP olarak bazı hastalıklarda seruloplazmin seviyesi yükselir. İnsanlarda seruloplazmin seviyesi bakır miktarı arasında pozitif korelasyon olduğu, ve bakır toksikasyonlu insanlarda seruloplazmin seviyesinin yüksek olduğu belirtilmiştir (Çoşkun ve Şen 2005). Seruloplazminin, plazmada bakır taşıyan bir protein olup olmadığı tartışmalıdır (Pazarçeviren 2006, Tietz 1989). En önemli görevinin bakır vericisi olduğu düşünülmektedir (Pazarçeviren 2006, Burtis ve Ashwood 1999, Tietz 1989). Plazma bakır içeriğinin %95'i diyalizle ayrılamayan bir formda seruloplazmine bağlı şekilde, kalan %5'lik kısım ise diyalizle ayrılabilir formda albümin ve histidin ile bağlı şekilde bulunur. Bakırın karaciğer ve barsak arasındaki taşınmasında bu diyalizle ayrılabilen formunun rol oynadığına inanılır (Burtis ve Ashwood 1999, Tietz 1989, Ulutaş 2003).

Seruloplazmin organizmada bir antioksidan olarak görev yapar. Spontan olarak oluşan oksidasyon ürünleri pek çok organik madde ile reaksiyona girer ve yaşam için tehlikeli olabilir, fakat dokularda ve plazmada bulunan antioksidanlar bu zararı engeller. Seruloplazmin serbest oksijen radikallerinin oluşumunu ve lipid peroksidasyonunu engeller (Pazarçeviren 2006, Gryus ve ark 2005, Tietz 1989).

Enfeksiyon, malignite, travma, safra yollarının tıkanma ve enfeksiyonlarında seruloplazminin plazma düzeyleri artar; artış Hodgkin gibi RES hastalıklarında daha belirgindir (Ay ve ark 1998). Bir AFPi olan seruloplazminin, akut faz yanıt sırasında konsantrasyonu artar ve bu artış %50'ye ulaşmaktadır (Pazarçeviren 2006, Conner ve Eckersall 1988, Tietz 1989). Yangıyı izleyen 3. günden itibaren yükselmeye başlar ve 4. günde pik seviyeye ulaşır (Pazarçeviren 2006, Diker 1998, Gruys ve ark 1994, Özgür ve ark 1997, Habif 2005). Oral kontraseptif tedavisi, gebelik ve akut faz reaktanı olduğu durumlarda iki kat yükselme görülür (Mc Pherson 1991).

1.3.Akut Faz Proteinlerinin Biyolojik Fonksiyonları

AFP ile ilgili yeni araştırmalar sonucu her geçen gün yeni verilere ulaşılmaktadır (Petersen ve ark 2004, Ceron ve ark 2005). izelge3. de bazı AFP'lerinin fonksiyonları verilmiştir.

AFY sırasında plazma konsantrasyonları artan ve metal bağlayan proteinler arasında haptoglobin ve seruloplazmin bulunmaktadır (Pannen ve Robotham 1995). Haptoglobin demiri bağlamakta ve böylece demir kaybını önlemektedir. Demir kullanımındaki bu azalma, mikrobiyel gelişim için demirin gerekli olması nedeniyle dirençli bakteriyel enfeksiyonların engellenmesi açısından önemli bir durumdur. Haptoglobinin temel fonksiyonu hemoglobin bağlayabilme yeteneği ve haptoglobin-hemoglobin kompleksini karaciğere taşıma özelliği olduğu dşnlmektedir. Bundan dolayı intravasküler hemolizde AFY'nin devam etmesine rağmen haptoglobin düzeyleri belirgin derecelerde düşebilmektedir (Thompson ve ark 1992). Bu nedenle haptoglobin gösterdiği reaksiyon intravasküler hemoliz durumlarında diğer yangısal durumlardan farklıdır. Haptoglobinin immunolojik fonksiyonlarda immun sistemi baskılayıcı görevleri bulunduğu da dşnlmektedir (Murata ve Miyamoto 1993). Haptoglobin ayrıca eritrosit agregasyonunda (Weng ve ark 1997) ve sinirsel depresyonda (Maes 1993) da görev almaktadır.

Bakır seruloplazminin önemli bir kısmıdır, bakır yetmezliği durumlarında seruloplazmin konsantrasyonları artış göstermektedir (Mulher ve Koller 1988). Serum amiloid A ailesi yeleri yüksek dansiteli lipoproteinlerin bir foksiyonuna bağlı olarak bulunan küçük apolipoproteinlerdir (Sellar ve ark 1991, Petersen ve ark 2004). SAA ailesi yesi proteinlerin yangısal durumlarda kolesterol metabolizmasının düzenlenmesinde görevli olduğu dşnlmektedir (Petersen ve ark 2004). AFP'leri, yangısal olayları olmayanlardan ayırmada, tedavi takibinde, prognoz belirleyici olarak kullanılmaktadır (Habif 2005).

Çizelge 3. Bazı Önemli AFP'lerin Görevleri (Petersen ve ark 2004).

AFP	Görevi
CRP	Komplement aktivasyonu ve opsonizasyon Monosit ve makrofajların modülasyonu, sitokin üretimi Kromatine bağlanma Nötrofillerin doku göçünü engelleme
SAA	Ölen hücrelerden ve hepatositlerden kolesterolün transportu Ateşi baskılayıcı etki Nötrofil granulositlerin oksidatif parçalanmasında baskılayıcı etki <i>In vitro</i> immün yanıtta baskılayıcı etki Monositler, lökositler ve T hücrelerinde kemotaksis etkisi Monositlerden kalsiyum mobilizasyonunun uyarılması Trombosit aktivasyonunun baskılanması
Haptoglobin	Hemoglobine bağlanma Bakteriyostatik etki Angiogenezinin uyarılması Lipid metabolizmasındaki rolü İmmunomodülatör etki

1.4. Akut Faz Proteinlerinin Klinik Kullanımı

AFP'nin kullanım alanları türlere göre değişmekle beraber, veteriner hekimlikte; pet hekimliğinde, çiftlik hayvan hekimliğinde, araştırma yapmak amacıyla deney hayvanlarında kullanılırlar. Türlerle özgü temel AFP'nin ölçülmesiyle teşhiste, prognozda ve uygulanan tedavinin etkinliğinin gözlenmesinde önemli bilgiler sağlayacaktır. Fakat hastalığın dönemi (akut veya kronik) birden fazla AFP'lerin ölçülmesiyle daha iyi değerlendirilebileceği vurgulanır (Eckersall 2004). Son 10 yıldır yapılan araştırmalar plazma veya serumdaki AFP konsantrasyon seviyelerinin hastalığın gözlenmesinde, prognozunda ve tespitinde önemli diagnostik bilgiler sağlandığı gözlenmiştir (Eckarsall 2000).

İnsan hekimliğinde sık kullanılan ve veteriner hekimlikte giderek artan oranda kullanılan bu proteinlerin düzeylerinin izlenmesi infeksiyon ve yangıların

belirlenmesinde değerli katkılar sağlar (Subiela ve ark 2002). Doku hasarında artan AFP düzeylerinin belirlenmesi yangının tanısının yapılmasına yardımcı olur (Gruys ve ark 1994, Conner ve ark 1988, Young ve ark 1996, Skinner ve Roberts 1994, Horadogada ve Eckersall 1994, Kent 1992). AFP analizlerinin avantajları Şu Şekilde sıralanabilir:

- Kanın hücresel bileŐenlerinden daha stabildir ve geçici fizyolojik deęiŐikliklerden az etkilenir.
- Deneyler dondurulmuŐ serum örneklerinden yapılabilir.
- AFP'nin belirlenmesi doku travmalı ya da yangılı hayvanın izlenmesi kadar tedaviye verilen yanıtın izlenmesinde de kullanılabilir (Sellar ve ark 1991).
- AFP'nin, et kontrolü açısından kesimden önce olulmesi infekte karkasın ortaya çıkarılmasında yarar sağlar (Gruys ve ark 1994, Kent 1992).
- Sürü taramaları sonucu semptom göstermeyen hasta hayvanların ayırt edilmesinde kullanılabilir.

1.5. Laboratuvar Analizleri Üzerine Etki Eden Faktörler

Analitik süreçlerde etki edebilecek faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkün olduğunca giderilmesi sonuçların doğruluğu açısından çok önemlidir (Türkmen ve ark 2007). Sonuçların doğruluğu, hastalığın tedavisi, klinik olarak takibi ve hastalığın tedavisi açısından gereklidir (Bonini ve ark 2002). Laboratuvar sonuçlarının etkin bir Şekilde yorumlanabilmesi için sonuçları etkileyen faktörlerin önceden bilinmesi ve gerekli önlemlerin alınması bildirilmektedir (Tietz 1989).

Klinik biyokimyada laboratuvar hataları analiz öncesi (preanalitik), analiz anı (analitik) ve analiz sonrası (postanalitik) olmak üzere üç ana baŐlıkta incelenir:

- Preanalitik evre: Testin klinisyen tarafından istenip, analize edilmesine kadar geçen süredir.
- Analitik evre: Laboratuvar tarafından analizin yapıldığı süredir.

- Postanalitik evre: Test sonuçlarının çıkmasından klinisyene ulaşmasına kadar geçen süreye denir.

Preanalitik evrede sonuçları etkileyen faktörler kişisel değişimler, yaş, ırk, cinsiyet gibi internal faktörler ile egzersiz, gebelik, diyet, postür, örnek alımı, örneğin laboratuara iletilmesi ve örneğin laboratuarda gördüğü işlemlerdir. İnternal faktörler değiştirilemez faktörlerdir ve klinisyenlerin sonuçları değerlendirirken bu faktörlere dikkat etmeleri gerekir. Ancak eksternal faktörler kontrol edilebilir değişkenlerdir ve test sonuçlarını direkt olarak etkileyeceğinden mutlaka göz önünde bulundurulmalıdır (Bonini ve ark 2002). Hemoliz, lipemi ve bilirubinemi preanalitik dönem hataları arasında bulunur ve kontrol edilebilen değişkenlerdendir (Türkmen 2007).

1.5.1. Hemoliz

Hemoliz, eritrositlerin hücre zarının parçalanması sonucu hemoglobin molekülünün dışarı çıkmasına denir (Tietz 1989, Karagül ve ark 2000). Hemoliz spektrofotometrik absorbansla direk ilgili olabilir ve enzimatik reaksiyonların pH'sını değiştirir (Turgut 2000, Karagül ve ark 2000, Tiftik 1996). Hemolize bağlı olarak, eritrositlerde, plazmadan daha düşük konsantrasyonda bulunan maddeler için dilue edilme, yüksek bulunan maddeler için kontsantre edilme durumu söz konusu olur. Direk etkilerine ilaveten hemoglobinin vereceği interferensde hatalı sonuçların alınmasına yol açar (Tiftik 1996).

Hemolizin çeşitli nedenlerle oluşabilir. Hemolitik hastalıklar, kan dolaşımında görülen kan parazitleri gibi nedenlerle ortaya çıkan *invivo* hemoliz ve ozmotik parçalanma, kompleman bağımlı hücre parçalanması, fiziksel, mekaniksel ya da kimyasal etkenler sonucu oluşan *invitro* hemoliz şeklinde ortaya çıkar (Barbara ve ark 1990, Türkmen ve ark 2007).

Yapılan çeşitli çalışmalarda hemolizin serum kimyasal parametrelerinde hatalı artış ya da azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (Barbara ve ark 1990). Değişiklikler farklı mekanizmalardan kaynaklanabilir. Bunlardan en yaygın olanı eritrosit içeriğinin yayılmasıdır. Eritrositlerdeki konsantrasyonu fazla olan maddelerin

konsantrasyonlarında hatalı artışlar belirlenebilir. Ayrıca eritrositten plazmaya ayrılan hemoglobin, kendi spektral absorpsiyon sınırları içinde yapılan prosedürlerde (500-600 nm) ölçümü etkilemektedir (Moreno ve Ginel 1999, Ceron ve ark 2005). Kandaki hemoliz hemoglobin konsantrasyonu 20mg/dL den fazla olduğunda gözle görülebilir (Yücel ve ark 2005)

Hemoliz neticesinde plazmada total protein, albumin, trigliserit, kolesterol, bilirübin, aldersterol, noradrenalin, renin, K, Ca, Mg, Fe, inorganik fosfat, aldolaz, asit fosfataz, laktat dehidrogenaz ve izositrat dehidrogenaz gibi parametrelerin konsantrasyonları belirgin şekilde etkilenir (Tiftik 1996).

1.5.2. Lipemi

Hiperlipidemi veya lipemi, hiperkolesteroleminin olduğu veya olmadığı hipertrigliseridemi nedeniyle, serum veya plazmanın makroskopik opak-beyaz renk almasıdır. Lipemik kanda, taze alınmış örneklerde gözle görülebilir lipid molekülleri bulunur. Klinik kimya laboratuvarlarında ölçümü önemli düzeyde etkileyen faktörlerden biride lipemidir (Şeneş ve ark 2005). Hiperkolesterolemi biyokimyasal ölçümleri etkilemez çünkü kolesterol plazma, serum veya kanda bulanıklığa neden olmaz (Turgut 2000). Trigliseridler başlıca trigliserid içeren şilomikronlar ve VLDL'lerle bulunurlar. Şilomikronlar, ince barsaklardan absorbe edilirler ve kana taşınırlar. Plazma veya serum örneğinin bekletilmesiyle, şilomikronlar yüzeyde krema tabakası şeklinde birikir, altındaki serum veya plazma berraklaşır. Bu çeşit lipemi, kaynağı gıdalar ile alınan yağlar olduğundan eksojen lipemi olarak adlandırılır. VLDL'ler karaciğerde sentezlenirler ve diğer dokulara kanla taşınırlar. Bunların oluşturdukları lipemi, endojen lipemi olarak adlandırılır. Serum veya plazma örneklerinin bekletilmesiyle bulanıklık geçmez. Çünkü, VLDL yüzeyde birikmez (Turgut 2000).

Lipemi, biyokimyasal analizleri, ışık saçılımını arttırarak, analiz edilecek maddelerin polar ve nonpolar fazlar arasında dağılmasına neden olarak veya polar ve iyonik maddeleri lipid fazın dışında bırakarak etkiler (Lacher ve Esea 1986). Klinik biyokimyada kullanılan ölçümlerin çoğu, örnekten yayılan, yansıyan, geçen ya da örnek tarafından absorbe edilen ışığın enerjisinin ölçümüne dayanan tekniklerdir ve belirli

reaksiyon koşulları gerekmektedir (Şeneş ve ark 2005). Lipemik kanda görülen lipid moleküllerinin ışığın saçılımını etkilemesi sonucu ölçülen ışık miktarı da etkilenir. Bu da analizlerde kullanılan spektrofotometrik ölçüm sonuçlarında yanlışlığa neden olur. Lipeminin derecesi ve ciddiyeti test sonuçlarındaki anormallik ile orantılıdır (Moreno ve Ginel 1999). Ayrıca lipemi hemolize yol açar ve hemoliz de test sonuçlarını etkileyen önemli nedenlerdendir. Kanda lipemiye neden olan pek çok faktör arasında diabetes mellitus, hipotiroidizm, kronik alkol kullanımı, kronik böbrek yetmezliği, akut pankreatit, koleostasis, hiperadrenocortikoizm, açlık, sistemik lupus eritematosus, ilaç kullanımı (proteaz inhibitörleri, östrojen ve steroidler) sayılabilir (Şeneş ve ark 2005). Ayrıca yağlı bir beslenmeyi takiben 1-3 saat içinde alınan kan örneğinde de şilomikronlar görülebilir. Bunların kanda kalış süreleri de 6-12 saattir (Moreno ve Ginel 1999). Lipemiden meydana gelen hataların giderilmesinde çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar; örnek körü kullanılması, okumaların birden fazla dalga boyunda yapılması, analiz öncesi lipidlerin ultrasantrifüjü, organik çözücülerle ekstraksiyonu ve deterjan eklemesi gibi farklı yöntemlerdir (Türkmen ve ark 2007).

1.5.3. Bilirubinemi:

Laboratuvar ölçümlerinde hataya neden olan bir diğer madde de bilirubindir (Subiela ve Ceron 2005). Kanda bilirubin Hb'nin enzimatik yıkımı sonucu sarı renkli görülen bir pigmentir ve laboratuvar sonuçları üzerinde çeşitli etkileri olduğu bazı araştırmalarda bildirilmiştir (Moreno ve Ginel 1999, Subiela ve Ceron 2005, Lucena ve ark 1998, Subiela ve ark 2002).

Safranın renkli maddesi olan bilirubin karaciğer tarafından metabolize edilen bir anyondur. Bilirubin plazmada birikmesine bilirubinemi denir. Bilirubinün üretim hızı eliminasyon hızını aştığında sarılık meydana gelir. Sarılığın subjektif değerlendirilmesi, bilirubinün serum konsantrasyonu, kapiller permabilite, plazmadan lenfe diffüzyon ve bilirubin bağlayan doku olmak üzere pek çok faktörlere bağlıdır (Bulum ve Mengi 2000). Dolaşımda direkt ve indirekt olmak üzere iki formda bulunur. İndirekt bilirubin, Gilbert sendromunda olduğu gibi indirekt bilirubin karaciğer hücrelerine alınmasıyla ya da Crigler-Najjar sendromu ve yeni doğanın fizyolojik sarılığında olduğu gibi

konjugasyonunda defekt nedeniyle artar. Hemolizde, eritrositlerden fazla miktarda bilirubin açığa çıkararak, indirekt bilirubin düzeyini artırır. Direkt bilirubin, karaciğer ve safra sistemi hastalıklarında artar. Ayrıca taş ve tümör gibi nedenlerle hepatobiliyer obstrüksiyonda, glukuronik asitle konjuge edilmiş direkt bilirubin karaciğerden safra sistemine atılım bozukluğu ile giden Dubin-Johnson ve Rotor sendromlarında artar (Duman ve Erden 2004).

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereç

2.1.1. Hayvan Materyali

Kan örnekleri Aydın bölgesi Işıklı Köyündeki çeşitli işletmelerden, herhangi bir hastalık belirtisi göstermeyen, gebe olmayan, klinik muayene sonucu sağlıklı kabul edilen 20 inekten sağlanmıştır. Serumlar çıkarıldıktan sonra örnekler 4 parçaya ayrılmış ve analiz yapıncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

2.1.2. Kullanılan Cihazlar

Serum amiloid-A ve haptoglobulin analizleri ELISA (Anthos 2010, Aurtralia) cihazında, seruloplazmin ve hemoglobin düzeyleri UV-spektrofotometrede (Schimadzu UV-1601, Japonya) ölçülmüştür. Total lipid ve total bilirubin düzeyleri fotometrede (Sinnova, BS-3000P, Çin) belirlenmiştir.

2.1.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Seruloplazmin analizinde, sodyum asetat, asetik asit, p-fenilen diamin, sodyum azid; hemoglobin düzeyinin belirlenmesinde potasyum ferrosiyaniür ($\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$), potasyum siyaniür, sodyum hidrojen karbonat kullanılmıştır. Total bilirubin ve total lipid

düzeyleri ticari test kitleri (Archem, Türkiye) ile prosedürlerine uygun olarak yapılmıştır. Haptogloblin ve Serum amiloid A analizleri ELISA kitleri (Tridelta LTD, İrlanda) ile prosedürlerine göre ölçülmüştür.

2.2. Yöntem

2.2.1. Hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin hazırlanışı

Hemolizat hazırlanmasında EDTA'lı tüplere alınan kan örnekleri kullanılmıştır. Alınan kan örneği 5 dakika 5000g de santrifüj edilerek kan hücreleri ile plazması ayrılmış ve tüpün dibinde kalan hücre paketi eşit hacimde PBS ilave edilerek yıkanmıştır. Yıkama sonrası 3 dakika 5000 g de santrifüj edilmiş ve bu işlem 3 kez tekrarlanmıştır. Son olarak eritrosit hücre paketi üzerine soğuk distile su eklenmiş ve -20°C'de 20 dakika bekletilerek hemoliz olmaları sağlanmıştır (Türkmen 2007). Örnek son kez santrifüj edilmiş ve elde edilen hemolizattan hemoglobin düzeyi ölçümü yapılmıştır (Tietz 1989).

Testin prensibi:

Hemoglobindeki Fe^{+2} , ferrosiyanür ile oksitlenir ve potasyum siyanür eklenmesiyle siyanmethemoglobine dönüşür. Siyanmethemoglobinin 540nm'de ölçülen absorbansı hemoglobin konsantrasyonu ile orantılıdır.

Kullanılan Ayıraçlar:

Drabkin çözeltisi: 0,198 g potasyumferrosiyanür ($K_3Fe(CN)_6$) ve 0,052 g potasyum siyanür (KCN) 1 g sodyum hidrojen karbonat($NaHCO_3$) ile 1 L bidistile suda çözdürülür.

Testin yapılışı:

Bir deney tüpüne 5 ml Drabkin çözeltisi konuldu. Üzerine 20 µl hemolizat eklendi. Karıştırılıp 10 dakika beklendikten sonra Drabkin ayıracağına karşı 540 nm'de okuma yapıldı.

Hesaplanması:

$$\text{Hemoglobin konsantrasyonu (g/dl)} = \frac{\text{Absorbans} \times \text{Standart konsantrasyon} \times \text{Dilasyon faktörü}}{\text{Standartın Absorbansı} \times 1000}$$

Lipemik serum örneklerini hazırlamak için normal serumlar üzerine ticari yağ emülsiyonları (Lipofundin %20, Almanya) eklenerek her serum örneğinin trigilesrid içeriği 2000 mg/dl olacak şekilde sulanmıştır (Lucena ve ark 1998).

Bilirubinematik örnekleri hazırlamak için 6 mg bilirubin (Sigma Chemical) SAA ve haptoglobin analizleri yapılacak serumlara 10 ml örnek sulandırma solusyonu ile karıştırılarak, seruloplazmin analizi yapılacak serumlara 10 ml asetat buferde çözdürülerek eklenmiştir. Örneklerin son bilirubin konsantrasyonları 60 mg/dl olacak şekilde ayarlanacaktır (Subiela ve Ceron 2005).

2.2.2.Serum Seruloplazmin Düzeyi Ölçümü

Sunderman ve Numato'nun (1970) bildirdiği yöntem ile spektrofotometrik olarak yapılmıştır.

Prensip: Seruloplazmin, p-fenilendiaminin oksidasyonunu katalize ederek mavi-viyole renkli bir oksidasyon ürünü oluşturur. Renkli ürünün meydana gelme oranı serum seruloplazmin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Ayırıklar:

1. *Substrat çözelti:* 144 mg p-fenilendiamin (Sigma P-6001) 100 ml asetat tamponda eritildi. (pH= 5,6)

2. *Asetat Tampon:* 1,34 ml asetik asit (Merck 818755) 26,49 g sodyum asetat

(Merck 106264) 1 L distile suda eritildi. (pH 5.6)

3. *Sodyum Azid* (Merck 106688): 3 g /100 ml sodyum azid içermektedir.

İşlem:

Sodyum azid	Kör 1ml	Test -
Substrat	5ml	5ml
Test serumu	0.1ml	0.1ml
37 °C'de 15 dakika inkübasyon		
Sodyum azid	-	1ml
546 nm'de suya karşı okundu.		

Hesaplanması:

$$\% \text{ mg Seruloplazmin} = 237 \times (A \text{ test} - A \text{ kör})$$

2.2.3. Serum Amilod-A Düzeyinin Belirlenmesi:

Prensip: Tridelta Phase range SAA kiti bir solid faz ELISA kitidir. SAA için spesifik monoklonal antikorlar kuyucuklara kaplanmıştır. Örnekler ve bilinen miktarda SAA içeren standartlar kuyucuklara eklenir. Kuyucuktaki SAA, playtte kaplı immobilize antikor tarafından yakalanır. Bir adımlık bir prosedür ile konjugat anikor ile işaretlenir. Bağlanmamış materyalin uzaklaştırılması için yıkama işlemi yapılır ve Streptavidin- Horse Radish Peroxidaz konjugatı eklenir ve inkübe edilir. İkinci inkübasyonu takiben TMB substrat eklenir. Oluşan renk orijinal örnekteki SAA konsantrasyonunu gösterir.

Ayırıcılar:

1. SAA kaplı plate
2. Yıkama solusyonu
3. Seyreltme solusyonu
4. SAA kalibratörü
5. Biotinylated anti SAA
6. Streptavidin-HRP
7. TMB Substrat

8. Durdurma Solusyonu

Yapılışı:

1. Her kuyucuğa 50 µl seyreltilmiş Biotinylated anti-SAA eklendi.
2. Serum örnekleri vortexlendi ve 1:500 oranında seyreltme solusyonu ile sulandırıldı. Kuyucuklara yerleştirildi. Standartlar da hazırlanarak kuyucuklara kondu.
3. Plate kapatılarak 1 saat 37⁰C' de inkübe edildi.
4. İnkübasyondan sonra 4 kez yıkama işlemi yapıldı ve plate kurutuldu.
5. Her kuyucuğa 100 µl streptavidin-peroksidaz eklendi.
6. Kapatılarak, karanlıkta 30 dakika inkübasyona bırakıldı.
7. Yıkama işlemi tekrarlandı.
8. 100 µl TMB substrat eklendi.
9. Plate kapatılarak 30 dakika oda ısısında inkübe edildi.
10. 50 µl durdurma solusyonu eklenerek reaksiyon durduruldu ve 450 nm dalga boyunda okundu.

Hesaplanması: Her örneğin, kontrol ve standardın absorbansı belirlendi. Standart grafik kağıdı kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve örneklerin konsantrasyonu bu eğriden yararlanılarak belirlendi. Elde edilen sonuçlar serum örnekleri 1:500 oranında sulandırıldığı için 500 ile çarpıldı.

2.2.4. Serum Haptoglobin Düzeyinin Belirlenmesi:

Prensip: Serbest hemoglobin, düşük pH da peroksidaz aktivitesini inhibe eder. Örnekte bulunan haptoglobin hemoglobin ile bağlanır ve bağlı hemoglobin peroksidaz

aktivitesini düşük pH'da korur. Hemoglobinin peroksidaz aktivitesinin koruması örnekte bulunan haptoglobin miktarını gösterir.

Ayırarlar:

1. Hemoglobin
2. Hemoglobin Diluent
3. Kalibratör
4. Kromojen
5. Substrat
6. Örnek sulandırıcı

Yapılışı:

1. 7,5 µl örnek ve hazırlanmış standartlardan her kuyucuğa konuldu.
2. Standartlara ve örneklere 100 µl Hemoglobin solüsyonu eklendi. Plate karıştırılarak örnek, standart ve hemoglobinin birleşmesi sağlandı.
3. Tüm kuyucuklara 140 µl kromojen/substrat solüsyonu eklendi.
4. 5 dakika oda ısısında inkube edildi ve 630 nm'de okundu.

Hesaplanması: Her örneğin, kontrol ve standardın absorbanı belirlendi. Standart grafik kağıdı kullanılarak kalibrasyon eğrisi hazırlandı ve örneklerin konsantrasyonu bu eğriden yararlanılarak belirlendi.

2.2.5. İstatistiksel Analizler

Elde edilen verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesi amacıyla SPSS (for Windows Release 11.5 Standart version Copyright© Spss Inc.1989-2001) hazır paket program kullanıldı. Varyans analizi kullanılarak (ANNOVA) istatistiksel açıdan farkların anlamlı olup olmadığı ve önemlilik düzeyleri saptandı.

3. BULGULAR

Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerdeki ortalama haptoglobin, SAA, seruloplazmin düzeyleri ve standart sapmaları Çizelge 4 ile Şekil 3, 4 ve 5’de gösterilmiştir.

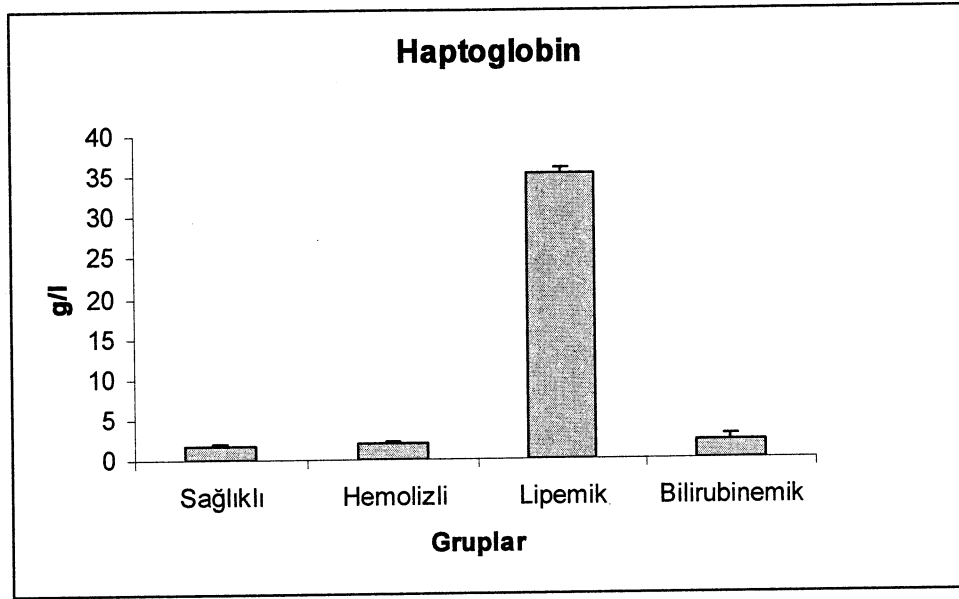
Çizelge 4. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin haptoglobin, serum amiloid A ve seruloplazmin sonuçları. (X±SD)

	Haptoglobin(g/L)	SAA(mg/L)	Seruloplazmin(mg/dl)
	X±SD	X±SD	X±SD
Sağlıklı			
n=20	1,65±0,42 ^a	1,60±0,49 ^a	8,14±2,78 ^a
Hemolizli			
n=20	2,02±0,11 ^a	2,31±0,77 ^a	49,76±7,69 ^b
Lipemik			
n=20	35,35±1,77 ^b	1,98 ±0,85 ^a	-
Bilirubinemik			
n=20	2,20±0,8 ^a	4,21±2,54 ^b	10,87±2,56 ^a
p	***	***	***

*** : p< 0,001

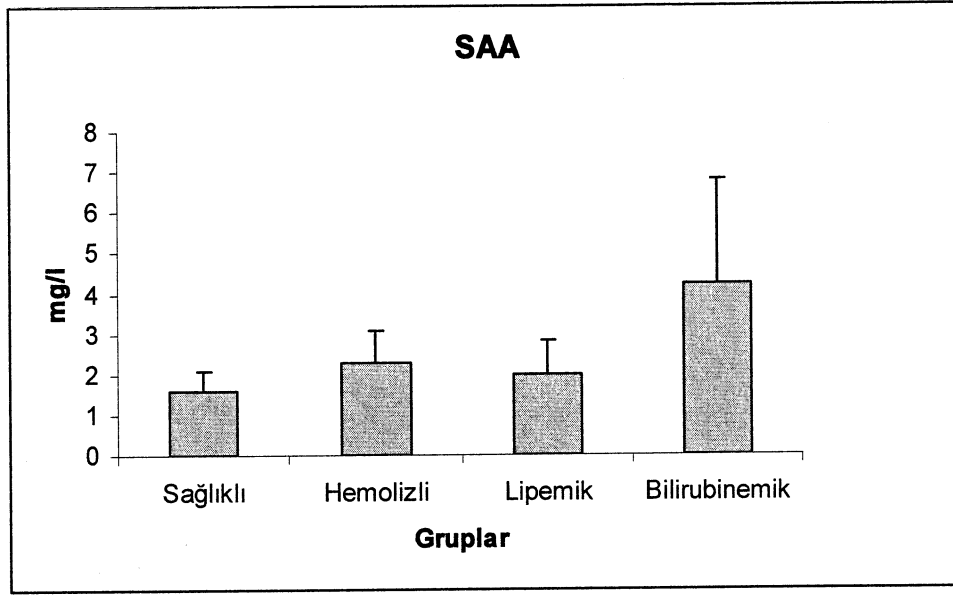
^{a,b} : Aynı sütunda farklı harfler taşıyan değerler arası istatistiki fark p<0,001 düzeyinde önemli.

Sağlıklı serumlarda ortalama haptoglobin düzeyleri $1,65 \pm 0,42$ g/L düzeyinde bulundu. Hemolizli ve bilirubinemik örneklerde sırasıyla ortalama değerler $2,02 \pm 0,11$ ve $2,20 \pm 0,8$ g/L düzeylerinde olarak belirlendi. Bu değerler sağlıklı serum örneklerinden yüksek olmalarına rağmen bu gruplar ile sağlıklı serum örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak lipemik örneklerin haptoglobin düzeyleri ortalama $35,35 \pm 1,77$ g/L olarak belirlendi ve bu değer diğer tüm gruplardan $p < 0,001$ düzeyinde yüksekti (Şekil 3).



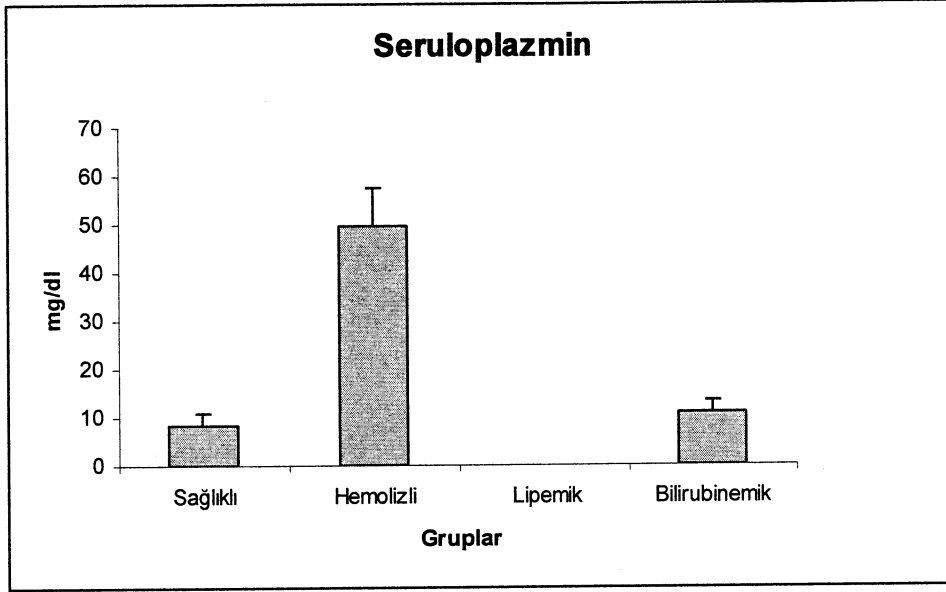
Şekil 3. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin ortalama haptoglobin sonuçları. ($X \pm SD$).

Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve ve bilirubinemik örneklerdeki ortalama SAA düzeyleri Çizelge 4 ile Şekil 4’de gösterilmiştir. Sağlıklı hayvanların serum ortalama SAA düzeyleri $1,60 \pm 0,49$ g/L düzeyinde bulundu. Hemolizli ve lipemik örneklerde sırasıyla ortalama değerler $2,31 \pm 0,77$ ve $1,98 \pm 0,85$ g/L düzeylerinde bulundu. Bu değerler sağlıklı serum örneklerinden yüksek olmalarına rağmen bu gruplar ile sağlıklı serum örnekleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bilirubinemik örneklerin SAA düzeyleri ortalama $4,21 \pm 2,54$ g/L olarak belirlendi ve bu değer diğer tüm gruplardan $p < 0,001$ düzeyinde yüksekti (Şekil 4).



Şekil 4. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin ortalama serum amiloid A sonuçları. ($X \pm SD$).

Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve ve bilirubinematik örneklerdeki seruloplazmin düzeyleri Çizelge 4 ile Şekil 5’de gösterilmiştir. Sağlıklı serumlarda serum ortalama seruloplazmin düzeyleri ortalama $8,14 \pm 2,78$ mg/dl olarak ölçüldü. Hemolizli örneklerde ortalama serum seruloplazmin konsantrasyonları $49,76 \pm 7,69$ mg/dl ve bilirubinematik örneklerde $10,87 \pm 2,56$ mg/dl iken lipemik örneklerin seruloplazmin düzeyleri ölçülemedi. Sağlıklı, hemolizli ve bilirubinematik örnekler arası istatistiki fark $p < 0,001$ düzeyinde önemli bulundu (Şekil 5).



Şekil 5. Sağlıklı, hemolizli, lipemik ve bilirubinematik örneklerin ortalama serum seruloplazmin sonuçları. ($X \pm SD$)

4. TARTIŞMA

Klinik biyokimyada analiz sonuçlarını etkileyen faktörler preanalitik, analitik ve postanalitik faktörler olarak 3 gruba ayrılmıştır. Son yıllarda teknolojik gelişmeler ve kalite kontrol uygulamaları analitik hataları oldukça azaltmıştır. Bu nedenle laboratuvar sonuçlarını etkileyen hatalar arasında preanalitik dönem hataları daha önemli yer tutmaktadır (Türkmen ve ark 2007). Yapılan bazı çalışmalarda hemoglobin, lipid ve bilirubin gibi maddelerin serum ya da plazmada bulunmasının biyokimyasal ve hematolojik analiz sonuçlarını etkilediği bildirilmiştir (Barbara ve ark 1990, Subiela ve Ceron 2005, Subiela ve ark 2007). Genel olarak kimyasal madde ve kit üreticileri örnek toplama aşamasında bu faktörlerin elimine edilmiş olmasını önermelerine rağmen bu konuda sığırlarda AFPleri ölçümleri üzerine yapılmış bir çalışma bulunmamaktadır.

Hemoliz laboratuvar ölçümleri yapılırken hataya neden olabilen en önemli preanalitik faktörlerdir. Eritrosit hücre zarının parçalanmasıyla hemoglobinin kan plazmasına geçmesi sonucu hemoliz şekillenir (Tietz 2006). Hemoliz *invivo* ve *invitro* olarak sınıflandırılır. *Invivo* hemoliz nedenleri arasında hemolitik hastalıklar, uygun olmayan kan transfüzyonları, bakteri ve hayvan toksinleri, kan parazitleri gibi nedenler sayılırken *invitro* hemoliz nedenleri arasında kanın serum çıkarılmadan önce uzun süre bekletilmesi, uygun iğne kullanılmaması, aşırı çalkalama, serumun ayrılması yada santrifüj aşamasında fiziksel etkiler sayılabilir (Subiela ve Ceron 2005). Alleman (1990) hemolizin biyokimyasal analiz sonuçları üzerine etkisinin olası nedenlerini; analizi yapılacak maddenin eritrosit içindeki konsantrasyonunun serumdan yüksek olması, hasar görmüş eritrositten analiz edilecek maddenin seruma sızması, hemoglobinin renginin analizi etkilemesi, eritrosit hücre içerisindeki maddeler ile analizi yapılacak madde arasındaki kimyasal etkileşimler olarak sıralamıştır. Bu çalışmada hemoliz haptoglobin düzeylerinde istatistikî önemde olmayan bir artışa neden

oldu. Hemolizli örnekte ortalama haptoglobin konsantrasyonu $2,02 \pm 0,11$ g/L ve sağlıklı örnekte düzey ortalama $1,65 \pm 0,42$ g/L olarak belirlendi. Benzer şekilde SAA analizinde hemolizli örnek ile sağlıklı örnek arasında istatistiki önemde olmayan bir artış belirlendi. Sağlıklı serum örneklerinde ortama SAA düzeyi $1,60 \pm 0,49$ mg/L iken hemolizli örneklerde bu düzeyin ortalama $2,31 \pm 0,73$ mg/L olduğu ancak bu artışın istatistiksel olarak anlamlı olmadığı belirlendi. Serum seruloplazmin düzeyinin ise hemolizli örnekte sağlıklı örneğe göre önemli düzeyde yüksek olduğu bulunmuştur. Sağlıklı serum seruloplazmin düzeyi $8,14 \pm 2,78$ mg/dl iken hemolizli örnekte $49,76 \pm 7,69$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Benzer şekilde Subiela ve Ceron (2005, 2007) köpek ve domuzlarda yaptıkları iki çalışmada hemolizli örneklerde yapılan seruloplazmin analizlerinde düzeylerin normal seruma göre anlamlı düzeyde yüksek olduğunu göstermişlerdir. Ortaya çıkan bu farklılık serumda bulunan serbest hemoglobinin özellikle 500-600 nm arasında ölçüm yapılan metodlarda ışığı absorbe etmesinden kaynaklandığı ileri sürülmektedir (Subiela ve Ceron 2005). Aynı araştırmacılar CRP ve SAA düzeylerinde hemolizli örneklerde artış olduğunu bildirmişlerdir. Bu çalışmada SAA ve haptoglobin düzeylerinde istatistiki önemde olmayan bir artış belirlenmiştir. SAA ve haptoglobin düzeylerinde görülen artışın hemolizli örnekler hazırlanırken saflaştırılmış hemoglobin kullanılmamasına bağlamışlardır (Subiela ve Ceron 2005, 2007). Bu çalışmada da hemolizli örnekler hazırlanırken saf hemoglobin değil sığır kanından hazırlanan hemolizatlar kullanılmıştır. Elde edilen hemolizat içeriğinde analizi etkileyebilecek hücre membran kalıntıları, proteinler ve hataya neden olabilecek diğer etkenlerde bulunmaktadır. Dolayısıyla hemolizat eklenmesi ile yapılan çalışmalarda saf hemoglobin eklenmesinden daha fazla bir etki ortaya çıkmaktadır. SAA ve haptoglobin düzeylerinde gözlenen hafif artışın nedeninin bu faktörlere bağlı geliştiği düşünülmüştür.

Lipemi, klinik biyokimya laboratuvarlarına gelen serum ve plazma örneklerinde en sık rastlanan hatalardandır. Lipemik örneklerin nedenleri, beslenmeyi takiben kan alınması, diabetes mellitus, hipotiroidizm, kronik alkol kullanımı, kronik böbrek yetmezliği, akut pankreatit, koleostasis, hiperadrenokortikoizm, açlık, sistemik lupus eritematosus, ilaç kullanımı sonucunda oluşabilir (Moreno ve Ginel 1999, Subiela ve ark 2002, Şeneş 2004, Türkmen ve ark 2007). Laboratuara getirilen lipemik örnekler süt manzarasındadırlar. Lipemik örnekler klinik biyokimyada yapılan laboratuvar testlerini pek çok farklı mekanizmalar ile etkilerler. En sık rastlanan mekanizma ışık dalgalarının

lipidler özellikle şilomikron ve düşük dansiteli lipoproteinler tarafından saçılmasıdır (Alleman 1990). Bu çalışmada sağlıklı serum örneklerinde ortalama serum haptogloblin konsantrasyonu $1,65 \pm 0,42 \text{ g/L}$ iken lipemik örneklerde sonuç $35,35 \pm 1,77 \text{ g/l}$ olarak bulunmuştur. Seruloplazmin düzeyi sağlıklı serumda $8,14 \pm 2,78 \text{ mg/dl}$ iken lipemik serumlarda aşırı bulanıktan dolayı sonuç okunamamıştır ve bu nedenle istatistiki bir değerlendirme yapılamamıştır. SAA analizinde ise lipemik örneklerin SAA düzeyleri sağlıklı örneklerden istatistiki olarak önemsiz bir artış göstermiştir. Sığırlarda lipidlerin SAA immunanalizini etkilediğine dair bir çalışma bulunmamaktadır fakat trigliseridlerin immün analizlerde kullanılan protein ve antikörleri değiştirdiği hipotezi bulunmaktadır. Yapılan başka immün analizlerde trigliseridlerin deney sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir (Lee ve ark1991, Parra ve ark 2004).

Bilirubin hemoglobinin enzimatik yıkımı sonucu açığa çıkan sarı renkli bir pigmenttir ve mononükleer fagositik hücrelerden olan makrofajlardan türer (Moreno ve Ginel 1999). Safra kanalı tıkanıklığı veya hepatitis gibi karaciğer hastalıkları ve hemolitik hastalıklar sırasında görülebilir (Tennant 1997, Weiss 2004). Yapılan literatür çalışmasında bilirubineminin sığırlarda AFPi analizi üzerine etkisinin incelendiği bir çalışmaya rastlanmamıştır. Subiela ve Ceron (2005) köpeklerde yaptıkları bir çalışmada seruloplazmin düzeyinin bilirubinemik örneklerde önemli düzeyde arttığını belirlemişlerdir. Bu çalışmada da seruloplazmin düzeyi sağlıklı örneklerde ortalama $8,14 \pm 2,78 \text{ mg/dl}$ iken bilirubinemik serumlarda ortalama $10,87 \pm 2,56 \text{ mg/dl}$ olarak bulunmuştur. Aradaki fark istatistiki olarak önemli bulunmamıştır ancak bilirubinemik örneklerin daha yüksek sonuç verdiği gözlenmiştir. Haptogloblin düzeyinde bilirubinemik örneklerde normal örneklerden biraz yüksek olduğu ($2,20 \pm 0,8 \text{ g/L}$) ancak bu yüksekliğin istatistiki önemde olmadığı görülmüştür. SAA analizlerinde ise bilirubinemik örneklerin normal örneklerden (bilirubinemik örnek $4,21 \pm 2,54 \text{ mg/L}$; normal örnek $1,60 \pm 0,49$) $p < 0,001$ düzeyinde yüksek olduğu belirlenmiştir. Bu sonuçlardan yola çıkılarak SAA immunanalizlerinde kullanılan protein ve antikörlerin lipemik serumlardakine benzer bir mekanizmayla serumda bulunan bilirubinden etkilendiği ve sonuçların bu nedenle yüksek çıktığı düşünülmüştür. Ancak haptogloblin ve seruloplazmin analizleri fotometrik ölçüm yöntemleridir ve bilirubinemik örneklerin ortalamalarında normal sınırlar içerisinde artışlar görülmüştür. Bu hafif düzeydeki artışın serumda bilirubinden meydana gelen renkten kaynaklandığı kanısına varılmıştır.

5. SONUÇ

Sonuç olarak, bu çalışmada veteriner klinik biyokimya laboratuvarlarında son yıllarda artan oranda araştırmaya konu olan ve yakın zamanda rutin testler olarak veteriner pratikte kullanılmaya başlanacağı öngörülen AFPleri düzeylerinin sığır serumlarında hemolizli lipemik ve bilirubinemik örneklerde nasıl sonuç verdiği araştırılmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda serum haptoglobin analizinin hemolizden ve bilirubinemiden normal sınırlar içinde etkilendiği, sonuçların sağlıklı seruma göre yüksek olduğu fakat bu yüksekliğin istatistiki önemde olmadığı görülmüştür. Ancak haptoglobin analizi lipemik örneklerde sağlıklı serumlardan oldukça yüksek bulunmuş ve lipeminin haptoglobin analizini etkilediği sonucuna varılmıştır. SAA analizinde ise hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin yükseldiği ama sadece bilirubinemik örneklerde istatistiki farkın önemli olduğu görülmüştür. Seruloplazmin analizinde hemolizli örnekte istatistiki önemde bir farklılık bulunmuş, bilirubinemik örnekte elde edilen sonucun ise yüksek fakat istatistiki anlamı olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak sığırlarda yapılacak AFPleri analizlerinde hemolizsiz, lipemik olmayan ve bilirubin içermeyen örneklerden yapılması önerilmektedir. Ancak normal serum elde edilemeyen hastalık durumlarında bu çalışmanın bulguları ışığında değerlendirmeler yapılabilir.

ÖZET

Akut faz cevap hayvanda travma, infeksiyon yada yangıya karşı ortaya çıkan bir reaksiyondur. Akut faz reaksiyon sırasında karaciğerden haptoglobın, serum amiloid-A (SAA), CRP gibi AFPleri üretilir. Bu proteinlerin hastalığa karşı dirençte önemli etkileri vardır. Son yıllarda artan oranda yapılan çalışmalarda veteriner hekimlikte AFPleri düzeylerinin belirlenmesinin tanı, diağnoz ve tedavinin izlenmesinin yanı sıra hayvanların genel sağlık taramalarında da kullanılabilceğı bildirilmiştir. Laboratuvarlar gönderilen örneklerde hemoliz, lipemi ve bilirubinemi sık rastlanılan olgulardır. Biyokimyasal analiz sonuçlarını etkilediğı bilinen bu etkenlerin sığırlarda AFPleri düzeyleri üzerine etkilerinin incelendiğı bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle sığırlarda yaygın olarak kullanılmaya başlanan AFP analizlerinin hemoliz, lipemi ve bilirubinemiden etkilenip etkilenmediğinin ortaya konması amaçlanmaktadır.

Serum örnekleri Aydın bölgesi Işıklı Köyündeki çeşitli çiftliklerden 20 klinik olarak sağlıklı inekten elde edilmiştir. Serumlar 4 tüpe bölünmüş ve analiz yapılmaya kadar -20⁰C de saklanmıştır. Serum örneklerine hemolizli kan, lipid ve bilirubin solusyonları eklenerek bu örneklerden haptoglobın seruloplazmin ve SAA analizleri yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar istatistiki olarak değerlendirilmiştir. Haptoglobın analizininin lipemik hemolizli ve bilirubinemik örneklerden yüksek fakat önemsiz, ancak örneklerde sağlıklı serumlardan oldukça yüksek; SAA analizinde ise hemolizli, lipemik ve bilirubinemik örneklerin sonuçlarının yüksek sadece bilirubinemik örneklerde istatistiki farkın önemli olduğu belirlenmiştir. Seruloplazmin analizinde hemolizli örnekte istatistiki önemde bir farklılık bulunmuş, bilirubinemik örnekte elde edilen sonucun ise yüksek fakat istatistiki anlamı olmadığı belirlenmiştir.

Sonuç olarak sığırlarda yapılacak AFPleri analizlerinde hemolizsiz, lipemik olmayan ve bilirubin içermeyen örneklerden yapılması önerilmektedir. Ancak normal serum elde edilemeyen hastalık durumlarında bu çalışmanın bulguları ışığında değerlendirmeler yapılabilir.

Anahtar kelimeler: Akut faz protein, hemoliz, lipemi, bilirubinemi, inek.

ABSTRACT

The Effects of Hemolysis, Lipemia and Bilirubinemia on Acute Phase Protein Levels in Cattle

Acute phase response, is the reaction of an animal against trauma, inflammation and infection. During the acute phase response, APP such as haptoglobin, ceruloplasmine or SAA produce in liver. This proteins have some important effect to resistance the disease. Recent investigations have shown that the quantification of APP concentrations in plasma or serum can provide valuable diagnostic information in the detection, prognosis and monitoring of the disease. Hemolysis, lipemia and bilirubinemia in serum samples are commonly submitted for laboratory analyses. We can't found any investigation about the effects of hemolysis, lipemia and bilirubinemia on APP levels in cattle. For this reason, the aim of this study was to determine whether hemolysis, lipemia and bilirubinemia affect the APP concentrations.

Serum samples were obtained from 20 clinically normal cattle in various farms Aydın region Işıklı Village. Aliquots of sera were divided four tubes and stored at -20°C until analyses. Hemolysed blood, lipid and bilirubin were prepared and added to serum samples as described previously. Haptoglobin, ceruloplasmin and SAA analyses were performed in this samples. The results were estimates statistically. Haptoglobin concentration is higher hemolysed and hyperbilirubinemic samples but this high levels are not statistically important but lipemic samples haptoglobin levels are significantly important compared the normal samples. In SAA analyses all serum samples results were higher than normal samples. Only bilirubinemic serum samples SAA concentrations were significantly important. In cerulplasmin analyses we found important difference between hemolysed and normal samples but bilirubinemic samples concentrations were not statistically important.

As a result it was suggested that serum acute phase analysis must be performed within samples that are unhemolysed, non lipemic and do not containing bilirubin.

However in cases of illness that serum obtaining is not available, the results of the present study should be evaluated.

Key words: Acute phase protein, hemolysis, lipemia, bilirubinemia, cattle.

KAYNAKLAR

- Anonim** (2009) *Yangı*, Erişim: [http://mm_genelpatoloji_2008_leoture_03_75_percent.pdf], Erişim tarihi: 15. 06. 2009.
- Ay M, Gürbilek M, Vatansev H** (1998) *Akut faz proteinleri*, Genel Tıp Dergisi, 8(3): 125-132.
- Alleman AR** (1990) *The effects of hemolysis and lipemia on serum biochemical constituents*, Veterinary Medicine, 85: 1272-1284.
- Alsemgesst SP, Kalsbeek HC, Koeman JP, Van Ederan AM, Gruys E** (1996) *Concentrations of serum amyloid-A (SAA) and haptoglobin as parameters of inflammatory diseases in cattle*, Veterinary Quarterly, 16(1): 21-23.
- Batirel A, Gencer S, Özer S** (2003) *Enfeksiyon göstergesi olarak akut faz reaktanları: C-reaktif protein ve serum amiloid A*, Kartal Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıp Dergisi, 14(3): 220-224.
- Barbara LL, Richard DA, William P, Ladean PS** (1990) *The effect of haemolysis on certain canine serum chemistry parameters*, Laboratory Animals, 24: 32-35.
- Baumann H, Gauldie J** (1994) *The acute phase response*, Immunology Today, 15: 74-80
- Boosman R, Mutsaers C.W.A.A.M, Dieleman SJ** (1990) *Sympathico-adrenal effects of endotoxaemia in cattle*, Veterinary Record, 127: 11-14.
- Bonini P, Plebam M, Cernotti F, Rubboli F** (2002) *Errors in laboratory medicine*, Clinical Chemistry, 48(5): 691-698.
- Bulum LK, Mengi A** (2000) *Normal ve fascioliasis'li sığırlarda serum AST, ALT, GGT, ALP aktiviteleri ile total protein, albumin, total bilirubin düzeyleri üzerine araştırmalar*, İstanbul Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi, 26(2): 311-324.
- Burtis CA, Ashwood ER** (1999) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*, 3rd Ed. 477-507. W.B. Saunders Company.
- Caspi D, Snel JJ, Batt RM, Bennett D, Rutteman GR, Hartman EG, Baltz ML, Pepys MB** (1987) *C-reactive protein in dogs*, American Journal of Veterinary Research, (48)6: 919-921.

Ceron JJ, Eckersall PD, Subiela MS (2005) *Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives*, Veterinary Clinical Pathology, 34(2): 85-99.

Clayes R, Vinken S, Spapen H, Elst K, Decokhez K, Huyghens L, Gorus FK (2002) *Plasma paracalsitonin and C-reactive protein acute septic shock: clinical and biological correlates*, Critical Care Medicine, 30: 757-762.

Conner JG, Eckersall PD (1988) *Acute phase response in dog following surgical trauma*, Research in Veterinary Science, 45: 107-110.

Conner JG, Eckersall PD (1988) *Bovine acute phase response following turbentine injection*, Research in Veterinary Science, 44: 82-88.

Conner JG, Eckersall PD, Wiseman A, Bain RK, Douglas TA (1988) *Acute phase response in calves following infection with Pasteurella haemolytica, Ostertagia ostertagi and endotoxin administration*, Research in Veterinary Science, 47: 203-207.

Cunnane G, Whitehead AS (1999) *Amiloid precursors and amiloidosis in rheumatoid arthritis*, Bailliers Best Pract Research Clinicial Rheumatology, 13(4): 615.

Çoşkun A, Şen İ (2005) *Kedi ve köpek hastalıklarının teşhisinde akut faz proteinlerin önemi*, Veteriner Cerrahi Dergisi, 11: 56-59.

Dinarello CA (1984) *Interleukin-1 and the pathogenesis of the acute-phase response*, The New England Journal of Medicine, 311: 1413-1418.

Diker S (1998) *İmmunoloji*, Medisan Tıp Kitabevi, 1. baskı, Ankara.

Duman C, Erden BF (2004) *Biyokimyasal laboratuvar verilerinin kısa yorumu*, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi, Farmokoloji Anabilim Dalı, 13(7): 256-261.

Eckersall PD, Conner JG (1988) *Bovine and canine acute phase proteins*, Veterinary Research Communucation, 12 (2-3): 169-178.

Eckersall PD (2004) *The time is right for acute phase protein assay*, The Veterinary Journal, 168: 3-5.

Eckersall PD (2000) *Recent advances and future prospects for the use of acute phase proteins as marker of disease in animals*, Revue de Medicine Veterinaire, 151: 577-584.

Gruys E, Oblowo MJ, Toussaint JM (1994) *Diagnosis significanse of major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review*, Veterinary Bulletin, (64) 11: 1009-1015.

Gruys E, Toussaint MJM, Niewold TA, Koopmans SJ (2005) *Acute phase reaction and acute phase proteins*, Jornel of Zhejiang University, 6(B): 1045-1056.

Habif S (2005) *İnflamatuvar yanıtta akut faz proteinleri*, İzmir Atatürk Eğitim Hastanesi Tıp Dergisi, 43: 55-56.

Heegard PMH, Godson DL, Toussaint MJM, Tjørnehoj K, Larsen LE, Viuff B, Ronshold L (2000) *The acute phase response of haptoglobin and serum amyloid A*

in cattle undergoing experimental infection with bovine respiratory syncytial virus, Veterinary Immunology Immunopathology, 77: 151-159.

Hirvonen J (2000) *Acute phase response in dairy cattle*, PhD Thesis. University of Helsinki.

Higuchi H, Katoh N, Miyamoto T, Uchida E, Yuasa A, Takahashi K (1994) *Dexamethasone-induced haptoglobin release by calf liver paranchymal cells*, American Journal of Veterinary Research, (55) 8: 1080-1085.

Hill AG, Siegel J, Rounds J, Wilmore DW (1997) *Metabolic response to interleukin-1, Centrally and peripherally mediated*, Annals of Surgery, 225: 246-251.

Horadogada A, Eckersall PD (1994) *Immediate responses in serum TNF α and acute phase protein concentrations to infection with Pasteurella haemolytica A1 in calves*, Research in Veterinary Science, 57: 129-132.

Jam NC (1993) *Essentials of veterinary hematology*, Lea & Febiger, Philadelphia, 349-380.

Jennings G, Eha M (1996) *Changes in protein distribution in normal and protein deficient rats during an acute-phase "injury" response*, British Journal of Nutrition, 76: 123-132.

Jensen LE, Whiehead AS (1998) *Regulation of serum amiloid A protein expression during the acute phase response*, Biochemical Journal, 15:334 (Pt 3):489.

Kaneko JJ (1980) *Clinical Biochemistry of Domestic Animals*, 3rd Ed. Academic Press, New York.

Karagül H, Fidancı RH, Altıntaş A, Sel T (2000) *Klinik biyokimya*, 1. Baskı Medisan yayıncılık, Ankara.

Kent J (1992) *Acute phase proteins: Their use in veterinary diagnosis*, British Veterinary Journal, 148: 279-282.

Kidd R (1991) *Interpreting neutrophil numbers*, Veterinary Medicine, 86: 975-982.

Kohler W, Prokop O (1978) *Relationship between haptoglobin and Streptococcus pyogenes T4 antigens*, Nature, 271: 373.

Krüger M, Schrödl W, Lindner A, Kunze R (1995) *C-reaktives protein acute phase protein mit labormedizinischer bedeutung in der veterinarmedizin*, Tierarztl Prax, 23: 236-240.

Kushner I (1982) *The phenomenon of the acute phase response*, Annals of the New York Academy of Sciences, 389: 39-48.

Kushner I, Mackiewicz A (1987) *Acute phase proteins as disease markers*, DiseaseMarkers 5: 1-11.

Kushner I (1993) *Regulation of the acute phase response by cytokines*, Perspectives in Biology and Medicine, 36: 611-622.

Lacher DA, Esea AR (1986) *Effect of a lipid-clarifying reagent on results of Becman Astra method*, Clinical Chemistry, 24: 2062-2063.

Lee DE, Lamb SV, Reimers TJ (1991) *Effects of hyperlipemia on radioimmunoassays for progesterone, testosterone, thyroxine and cortisol in serum and plasma samples from dogs*, The American Journal of Veterinary Research, 52: 1489-1491.

Lohuis JACM, Verheijden, JHM, Burvenich, C, ASJPAM. Van Miert (1988) *Pathophysiological effects of endotoxins in ruminants, 2. Metabolic aspects*, Veterinary Quarterly, 10(2): 117-125.

Lucena R, Moreno P, Perez RA, Ginel PJ (1998) *Effects of hemolysis, lipemia and bilirubinemia on an enzyme linked immunosorbent assay for cortisol and free thyroxine in serum samples from dogs*, Veterinary Journal, 156: 127-131.

Maes M (1993) *A review on the acute phase response in major depression*, Reviews in the Neurosciences, 4(4): 407-416.

Makimura S, Suzuki N (1982) *Quantitative determination of bovine serum haptoglobin and its elevation in some inflammatory disease*, Japanese Journal of Veterinary Science, 44: 15-21.

Mandrup PT, Nerup J, Reimers JI, Pociot F, Andersen HU, Karlsen A, Bjerre U, Bergholt R (1995) *Cytokines and the endocrine system, I. The immunoendocrine network*, European Journal of Endocrinology, 133: 660-671.

Mc Pherson RA (1991) *Specific proteins Diagnosis and management by laboratory methods*, Philadelphia: WB Sanders Company, 215-227.

Mc Grotty, Knottenbelt YL, Ramsey IK, Reid AWJ, Eckersall PD (2003) *Haptoglobin in a canine hospital population*, The Veterinary Record, 152: 562-564.

Moreno P, Ginel PJ (1999) *Effects of haemolysis, lipaemia and bilirubinaemia on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time in plasma samples from healthy dogs*, Research in Veterinary Science, 67: 273-276.

Muşabak U, Şengül A, İnal A (2003) *Bazı akut faz reaktanlarının gözden geçirilmesi ve atheroskleraz gelişimindeki rolleri*, Türkiye Klinikleri İmmunoloji ve Romatoloji Dergisi, 3: 95-96.

Murata H, Shimada N, Yoshioka M (2004) *Current research on acute phase proteins in veterinary diagnosis*, The Veterinary Journal, 168: 28-40.

Murtaugh MP, Baarsch MJ, Zhou Y, Scamurra RW, Lin G (1996) *Inflammatory cytokines in animal health and disease*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 54: 45-55.

Mulhern SA, Koller LH (1988) *Severe or marginal copper deficiency results in a graded reduction in immune status in mice*, Journal of Nutrition, 118: 1041-1047.

Nakagawa H (1997) *Detection of serum haptoglobin by enzyme linked immunosorbent assay in cows with fatty liver*, Research in Veterinary Science, 62: 137-141.

Olson NC, Hellyer PW, Dodam JR (1995) *Mediators and vascular effects in response to endotoxin*, British Veterinary Journal, 151: 489-522.

Orro T, Jacobsen S, LePage JP, Niewold T, Alasuutari S, Soveri T (2008) *Temporal changes in serum concentrations of acute phase proteins in newborn dairy calves*, The Veterinary Journal, 176: 182-187.

Otabe K, ITO T, Sugimoto T, Yamamoto S (2000) *C-reactive protein (CRP) measurement in canine serum following experimentally-induced acute gastric mucosal injury*, Laboratory Animal, 34(4): 434-438.

Özgür Y, Tekeli S, Yılmaz H (1997) *Akut faz proteinler ve infeksiyöz hastalıklardaki önemi*, İstanbul Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Dergisi, 23(2): 447-453.

Paape MJ, Schultze WD, Desjardins C, Miller RH (1974) *Plasma corticosteroid, circulating leucocyte and milk somatic cell responses to Escherichia coli endotoxin-induced mastitis*, Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 145(2): 553-559.

Pannen BH, Robothom JL (1995) *The acute phase response*, New Horizons, 2: 183-197.

Parra MD, Bernal LJ, Ceron JJ (2004) *Cortisol and free thyroxine determination by time resolved fluorometry in canine serum*, Canadian Journal of Veterinary Research, 68: 98-104.

Pazarçeviren B (2006) *İshalli buzağularda bazı akut faz proteinleri düzeylerinin belirlenmesi ve klinik önemi*, Adnan Menderes Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Seminer, Aydın.

Petersen HH, Diderikson D, Christiansen BM, Nielsen JP (2002) *Serum haptoglobin concentration as a marker of clinical signs in finishing pigs*, Veterinary Record, 151(3): 81 -89.

Petersen HH, Neilsen JP, PMH, Heegaard (2004) *Application of acute phase protein measurements in veterinary clinical chemistry*, Veterinary in Research, 353: 1-25.

Pfeffer A, Rogers KM (1989) *Acute phase response of sheep: changes in the concentrations of ceruloplasmin, fibrinogen, haptoglobin and the major blood cell types associated with pulmonary damage*, Research Veterinary Science, 46: 118-124.

Pfeffer A, Rogers KM, O’Keeffe L, Osborn PJ (1993) *Acute phase protein response, food intake, liveweight change and lesions following intrathoracic injection of yeast in sheep*, Research in Veterinary Science, 55: 300-306.

Raynes JG (1994) *The acute phase response*, Biochemical Society Transactions, 22(1): 69-74.

Regessa F, Noakes DE (1999) *Acute phase protein response of ewes and the release of PGFM in relation to uterine involution and the presence of intrauterine bacteria*, Veterinary Record, 144: 502-509.

Sellar GC, Debeer MC, Leilas JM, Synder PW, Glickman LT, Felsburg PJ, Whitehead AS (1991) *Dog serum amyloid A protein*, The Journal of Biological Chemistry, 266(6): 3505-3510.

Skinner JG, Brown RA, Roberts L (1991) *Bovine haptoglobin response in clinically defined field conditions*, Veterinary Research, 128: 147-149.

Skinner JG, Roberts L (1994) *Haptoglobin as an indicator of infection in sheep*, Veterinary Record, 134: 33-36.

Solter PF, Hoffmann WE, Hungerford LL, Siegel JP, Denis SH, Dorner JL (1991) *Haptoglobin and ceruloplasmin as determinants of inflammation in dogs*, American Journal of Veterinary Research, 52(10): 1738-1742.

Subiela SM, Tecles F, Eckersall PD, Ceron JJ (2002) *Serum concentrations of acute phase proteins in dogs with leishmaniasis*, Veterinary Record, February, 23: 241-244.

Subiela SM, Ceron JJ (2005) *Effects of hemolysis, lipemia, hyperbilirubinemia and anticoagulants in canine C- reactive protein, serum amyloid A and ceruloplasmin assays*, Canadian Veterinary Journal, Volume, 46: 625-629.

Subiela MS, Tecles F, Ceron JJ (2007) *Comparison of two automated spectrophotometric methods for ceruloplasmin measurement in pigs*, Research in Veterinary Science, 83: 12-19.

Subiela MS, Tecles F, Ceron JJ, Montes A, Gutierrez C (2002) *Effects of haemolysis, lipaemia, bilirubinaemia and fibrinogen on protein electropherogram of canine samples analysed by capillary zone electrophoresis*, The Veterinary Journal, 164 : 261-268.

Şeneş M, Zengi O, Şeker R, Topkaya BÇ, Yücel D (2005) *Lipemi interferansına karşı kolay bir çözüm: Polietilen glikol-dekstran sülfat*, Türk Biyokimya Dergisi, 30(2): 187-193.

Tennant BC (1997) *Hepatic function* In: Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical Biochemistry of Domestic Animals, 5th ed, New York: Academic Press, 327-252.

Tiftik AM (1996) *Klinik Biyokimya*, MIMOZA Basımevi, 1. baskı, Konya.

Tietz WN (1989) *Measurement of plasma haemoglobin*, In: Fundamentals of Clinical Chemistry Third ed Saunders Company, Philadelphia.

Thompson D, Milford-Ward A, Whicher JT (1992) *The value of acute phase protein measurments in clinical practice*, Annals of Clinical Biochemistry, 26: 123-31.

Turgut K (2000) *Veteriner Klinik laboratuvar teşhis*, 2.Baskı, Bahçıvanlar Basımevi, Konya.

Türkmen YH, Serdar MA, Haşimi A, Cihan M, Kurt İ, Akman Ş, Kutluay T, Erbil MK (2007) *Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması*, Gülhane Tıp Dergisi, 49: 5-10.

Ulutaş PA (2003) *Deneyisel Pasteurella haemolytica enfeksiyonlu koyunlarda kolostrum ve ana sütü ile beslemenin kan akut faz proteinleri ve bazı mineral düzeylerine etkisi*, Doktora Tezi, İstanbul Üniversitesi.

Van Lenten BJ, Hama SY, de Beer FC, Stafforini DM, McIntyre TM, Prescott Sm (1995) *et al, Anti-inflammatory HDL becomes pro-inflammatory during the acute phase response, Loss of protective effect of HDL against LDL oxidation in aortic wall cell cocultures*, Journal of Clinical Investigation, 96(6): 2258.

Walker JL, Clarke CR, Lessley BA, Hague CM (1994) *Effect of Pasteurella haemolytica infection on α -1 acid glikoprotein and albumin concentration in serum and subcutaneous tissue chamber fluid of calves*, Research in Veterinary Science, 56: 158-163.

Weiss DJ (2004) *Test for evaluation liver disease*, In: Cowell RL, ed. Veterinary Clinical Pathology Secrets Ist ed. St Louis: Elsevier, 168-173.

Weng X, Cloutier G, Beaulieu R, Roederer GO (1997) *Influence of acute phase proteins on erythrocyte aggregation*, American Journal of Physiology, 271: 2346-2352.

Wittum TE (1996) *Young CR, Stanker LH, Griffin DD, Perino LJ, Littledike ET. Haptoglobin response to clinical respiratory disease in feedlot cattle*, American Journal of Veterinary Research, (57) 5: 646-649.

Yamada T (1999) *Serum amyloid A (SAA): a concise review of biology, assay methods and clinical usefulness*, Clinicial Chemistry Laboratuvarı Medical, 37(4): 381.

Yoshino K, Katoh N, Takahashi K, Yuasa A (1993) *Possible involvement of protein kinase with induction of haptoglobin in cows by treatment with dexhametasone and by starvation*, American Journal of Veterinary Research, 54(5): 689-694.

Young CR, Wittum TE, Stanker LH, Perino LJ, Griffin DD, Littledike ET (1996) *Serum haptoglobin concentrations in a population of feedlot cattle*, American Journal of Veterinary Research, (57) 2: 138-141

Yücel M, Tokalak İ, Kulaksızoğlu S, Arat Z (2005) *CK-MB aktivitesi ve hemoliz: İnfersans nerede başlar*, Türk Biyokimya Dergisi, 30(3): 216-219.

ÖZGEÇMİŞ

1979 yılında Batman'da doğdum. İlkokul ve ortaokulu Batman'da lise öğrenimimi Konya'da tamamladım. 1999 yılında Dumlupınar Üniversitesi Hemşirelik Bölümünü okumaya hak kazandım. 2003 yılında mezun olduktan sonra 2 yıl boyunca özel sektörde hemşirelik yaptım. 2006 yılında Adnan Menderes Üniversitesi Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında Yüksek Lisans Eğitimime başladım. Aynı zamanda İstanbul Paşabahçe Devlet Hastanesi Acil Serviste hemşire olarak çalışmaktayım.

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmamda ilgi, yardım, hoşgörü ve sabrını eksik etmeyen danışmanım ADÜ Veteriner Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Pınar Alkım ULUTAŞ' a ve çalışmamın her aşamasında yardımlarını esirgemeyen Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ayşegül Bildik ve Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri Doç. Dr. Kamil Seyrek, Doç. Dr. Funda Kıral ve Araş. Gör. Hasan Akşit' e ve örneklerin toplanması aşamasında yardım eden İç Hastalıkları Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Bülent Ulutaş' a sonsuz destek ve anlayışlarından dolayı teşekkür ederim.

Beni bu günlere getiren, maddi manevi desteklerini esirgemeyen babama ve anneme sabır ve özverilerinden dolayı teşekkür ederim.