



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

YENİ BİR KİNETİK SERULOPLAZMİN ÖLÇÜM YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ

Uzmanlık Tezi
Salim NEŞELİOĞLU

Ankara, 2013

T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
TÜRKİYE KAMU HASTANELERİ KURUMU
Ankara İli 2. Bölge Kamu Hastaneleri Birliği Genel Sekreterliği
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi
TIBBİ BİYOKİMYA BÖLÜMÜ

YENİ BİR KİNETİK SERULOPLAZMİN ÖLÇÜM YÖNTEMİ
GELİŞTİRİLMESİ

Uzmanlık Tezi
Salim NEŞELİOĞLU

Tez Danışmanı
Prof.Dr. Özcan EREL

Ankara, 2013

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Uzun bir eğitim dönemi sonunda edinilen tecrübelerin bir sonucu olarak ülkede katma değer oluşturacak bir çalışma yapma kaygısıyla gerçekleştirilen bu tezde;

İhtisas eğitimim süresince ilminden ve tecrübelerinden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile örnek aldığım, yanında bulunmuş olmaktan onur duyduğum saygıdeğer hocam Prof. Dr. Özcan EREL'e

Kişisel ve bilimsel anlamda ihtiyaç duyduğum her zaman karşılık bulabildiğim Doç. Dr. Cemile KOCA'ya, başasistanımız Serpil ERDOĞAN'a desteklerini daima hissettiğim uzmanlarımız Pervin BARAN ve Orhan ŞEN'e çalışmaktan zevk aldığım asistan arkadaşlarım Semra IŞIKOĞLU, Merve ERGİN ve Murat ALIŞIK ile tüm laboratuvar çalışanlarına,

Bu günlere gelmemde büyük emeği olan annem ve babam ile inancı ve eksik etmediği desteğiyle daima yanımda bulunan eşime teşekkürlerimi sunarım.

Salim NEŞELİOĞLU

Ankara, 2013

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖNSÖZ	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
TABLolar(ÇİZELGELER) DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ÖZGEÇMİŞ	xii
1.GENEL BİLGİLER	1
1.1. Seruloplazmin	1
1.1.1. Seruloplazmin Metabolizması ve Etkileri	2
1.1.2. Seruloplazmin Eksikliği	5
1.1.3. Seruloplazmin Toksikitesi	6
1.2. Bakır	6
1.2.1. Emilimi, Depolanması, Regülasyonu ve Atılımı	6
1.2.2. Klinik Önemi	8
1.2.3. Bakır Eksikliği	8
1.2.4. Bakırın Toksik Etkileri	9
1.2.5. Menkes Hastalığı	9
1.2.6. Wilson Hastalığı	10
1.3. Demir Kromojenleri	12
1.4. Redüktant Maddeler	15
2. GEREÇ VE YÖNTEM	18
2.1. Geliştirilen Yöntem ile Ferroksidaz Enzim Aktivitesinin Ölçümü	18
2.2. Asetohidroksamik Asit konsantrasyonunun Optimizasyonu	19
2.3. Amonyum Demir(2) Sülfat Hekzahidrat konsantrasyonunun Optimizasyonu	19
2.4. Kullanılan Örnek Hacimlerinin Optimizasyonu	19
2.5. Kullanılan 1. Reaktif (R1) Hacimlerinin Optimizasyonu	20
2.6. Kullanılan 2. Reaktif (R2) Hacimlerinin Optimizasyonu	20
2.7. Diğer Seruloplazmin Ve Ferroksidaz Ölçüm Yöntemleri	20
2.8. Kromazurol B Kullanılan deneysel Ferroksidaz Ölçüm Yöntemi	22

2.9. Bakır ile Seruloplazmin Aktivitesinin/Düzeylerinin Karşılaştırılması	22
2.10. Referans yöntemlerle karşılaştırma	23
3. BULGULAR	27
3.1. Optimum Reaksiyon Koşulların Oluşturulması	27
3.2. Asetohidroksamik Asit Optimizasyon Bulguları	28
3.3. Amonyum Demir(2) Sülfat Hekzahidrat Optimizasyon bulguları	29
3.4. Kullanılan Örnek Hacminin Optimizasyon bulguları	30
3.5. Kullanılan 1. Reaktif (R1) Hacimlerinin Optimizasyon bulguları	32
3.6. Kullanılan 2. Reaktif (R2) Hacimlerinin Optimizasyon bulguları	35
3.7. Kromazurol B Kullanılan Deneysel Ferroksidaz Ölçüm Yöntemi Bulguları	39
3.8. Bakır İle Seruloplazmin Aktivitesi/Düzeyleri Arasındaki Karşılaştırma Bulguları	40
4. TARTIŞMA	47
5. SONUÇLAR	51
6. KAYNAKLAR	52

ÖZET

Seruloplazmin; ferrokسيداز enzim aktivitesi gösteren, temel görevi kanda bakırın taşınması olan, bunun yanı sıra antioksidan ve akut faz proteini olmak gibi işlevleri bulunan çok fonksiyonlu globüler bir proteindir. Seruloplazmin proteini aynı zamanda ferrokسيداز aktivitesi ile demir metabolizmasında da önemli bir rol üstlenmektedir. Genetik bir mutasyondan kaynaklanan Wilson hastalığı ile Menkes sendromu ve edinilmiş hastalıklar olan karaciğer yetmezliği, infektif ve inflamatuvar hastalıklar gibi oksidasyon seviyesinin arttığı durumlarda düzeyi değişir.

Seruloplazmin, sahip olduğu ferrokسيداز enzim aktivitesi ile vücuttaki endojen substratı olarak kabul edilen ferröz demir iyonlarını ferrik demir iyonları formuna dönüştürür. Bu dönüşümün kinetik olarak izlenmesi ile ferrokسيداز enziminin aktivitesi tayin edilir. Serum içerisinde bulunan ferrokسيدaz enzimi, substrat olarak reaksiyon ortamına eklenen ferröz demir iyonlarını, ferrik demir iyonlarına oksitler, oluşan ferrik demir iyonları, hem şelatör hem de kromojen olarak fonksiyon gösteren asetohidroksamik asit ile bağlanır ve bu bağlanma sırasında ferrokسيدaz enzim aktivitesiyle doğru orantılı olarak gözlenen renk değişimi kinetik olarak izlenir.

Yöntemde gerçekleştirdiğimiz optimizasyon çalışmaları, ferrokسيدaz enzim aktivitesi için referans olarak kabul edilen; substrat ve kromojen olarak O-dianizidin kullanılan referans yöntem ile karşılaştırma yapılarak desteklendi. Bu iki yöntem arasında anlamlı bir korelasyon ($r: 0,981, p<0,001$) bulundu.

Seruloplazmin proteininin tayin edildiği immünotürbidimetrik yöntemde, bu proteinin sadece miktarı belirlenirken, teze konu olan ferrokسيدaz aktivitesi ölçüm yönteminde, miktarı hakkında fikir sahibi olmanın yanında fonksiyonu hakkında da kantitatif bir veri elde edildi. Aynı zamanda bu yöntem ile düşük maliyetli, hızlı sonuç alınabilen ve tam otomatik sistemlere kolayca uyarlanabilen bir test elde edilmiş oldu.

Anahtar Kelimeler: Seruloplazmin, Ferrokسيدaz, Asetohidroksamik asit

ABSTRACT

Ceruloplasmin is a multi-function globular protein that shows ferroxidase enzyme activity, and its main task is the transportation of the copper within the blood. Additionally, ceruloplasmin has functions such as being an antioxidant and acute phase protein. With the help of its ferroxidase activity it also plays an important role in iron metabolism. In case of the following diseases the ceruloplasmin protein level is changed; the Wilson's disease which is caused by a genetic mutation, liver failures which is caused by the Menkes syndrome, and infectious and inflammatory diseases which leads an increase in the oxidation levels.

By means of its ferroxidase enzyme activity, ceruloplasmin converts the ferrous iron ions, which are accepted as the endogenous substrates in the body, into the ferric iron ions. Ferroxidase enzyme activity is determined by kinetic investigation of this transformation. The ferroxidase enzyme present in serum oxidizes the ferrous iron ions, which are added as substrate to the reaction medium, into the ferric iron ions. The resulting ferric iron ions are binded to the acetohydroxamic acid which functions as both the chelator and the chromogen. The color change which is directly proportional to the ferroxidase enzyme activity, is kinetically investigated during the binding process.

Optimization of the method is performed and results are supported by comparing the method to the reference method that is used for the ferroxidase enzyme activity; the method which uses the O-dianizidin as substrate and chromogen. A meaningful correlation is found ($r: 0,981, p<0,001$) between two methods.

In the immunoturbodimetric method in which the ceruloplasmin protein is determined, only the amount of the protein is obtained. However, in the ferroxidase activity measurement method which is also the subject of the thesis, a quantitative data for both the amount and function of the ceruloplasmin protein is obtained. At the same time with this method a low cost and fast test which can be easily adapted to the fully automated systems is obtained.

Keyword: Ceruloplasmin, Ferroxidase, Acetohydroxamic acid

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa no
Şekil-1 Seruloplazminin ferroksidaz aktivitesi	4
Şekil-2 Ferrozin	12
Şekil-3 Ferene	12
Şekil-4 Norfloksasin	12
Şekil-5 Ksilenol oranj	13
Şekil-6 Kromazürol B (Mordant mavisi)	14
Şekil-7 Asetohidroksamik asit	14
Şekil-8 Ditiyotreitöl	15
Şekil-9 β -Merkaptoetanol	15
Şekil-10 TCEP (Tris(2-karboksietilfosfin))	16
Şekil-11 Sodyum borohidrat	16
Şekil-12 Lityum borohidrat	17
Şekil-13 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile o-dianisidin kullanılan yöntemlerin korelasyon grafikleri	23
Şekil-14 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile p-fenilendiamin kullanılan yöntemlerin korelasyon grafiklerinin karşılaştırılması	24
Şekil-15 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile nefelometrik ölçüm yöntemlerinin korelasyon grafiklerinin karşılaştırılması	25
Şekil-16 Su ve düşük/orta/yüksek ferroksidaz aktivitesine sahip numunelerin en uygun asetohidroksamik asit konsantrasyonu ile gerçekleştirilen ferroksidaz enzim kinetiği	28
Şekil-17 Su ve düşük/orta/yüksek ferroksidaz aktivitesine sahip numunelerin en uygun amonyum demir(2) sülfat hekzahidrat ile gerçekleştirilen ferroksidaz enzim kinetiği	29
Şekil-18 Farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 3,5 μ L)	30
Şekil-19 Farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 5 μ L)	30
Şekil-20 Farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 6,5 μ L)	31
Şekil-21 Farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 10 μ L)	31
Şekil-22 Farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (100 μ L /80 μ L)	32

Şekil-23 Farklı R1/R1dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (120 µL /60 µL)	32
Şekil-24 Farklı R1/R1dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (140 µL /40 µL)	33
Şekil-25 Farklı R1/R1dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (160 µL /20 µL)	33
Şekil-26 Farklı R1/R1dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (180 µL /0 µL)	34
Şekil-27 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 10 µL)	35
Şekil-28 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 20 µL)	35
Şekil-29 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 30 µL)	36
Şekil-30 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 40 µL)	36
Şekil-31 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 50 µL)	37
Şekil-32 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 60 µL)	37
Şekil-33 Farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 70 µL)	38
Şekil-34 Kromazürol B kullanılan deneysel ferroksidaz ölçümü kinetik grafiği	39
Şekil-35 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	40
Şekil-36 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (O-dianisidin kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	41
Şekil-37 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (PPD kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	42
Şekil-38 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (Nefelometrik seruloplazmin ölçüm yöntemi)	43
Şekil-39 Kromojen/şelatör olarak AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemimizin linearite grafiği	45

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa no
Tablo-1 Menkes hastalığı ile Wilson hastalığının karşılaştırılması	11
Tablo-2 Bakır metabolizması için kullanılan ana laboratuvar testleri	11
Tablo-3 Geliştirdiğimiz Yöntem İle Ferroksidaz Ölçüm Aplikasyonu	19
Tablo-4 P-fenilendiamin kullanılan referans ferroksidaz ölçüm aplikasyonu	21
Tablo-5 O-dianisidin kullanılan referans ferroksidaz ölçüm aplikasyonu	21
Tablo-6 Kromazurol B Kullanılan Deneysel Ferroksidaz Ölçüm Aplikasyonu	22
Tablo-7 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile o-dianisidin kullanılan yöntemlerin korelasyon verilerinin karşılaştırılması	23
Tablo-8 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile p-fenilendiamin kullanılan yöntemlerin korelasyon verilerinin karşılaştırılması	24
Tablo-9 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile nefelometrik ölçüm yöntemlerinin korelasyon verilerinin karşılaştırılması	25
Tablo-10 Bütün serum plazmin/ferroksidaz ölçüm yöntemlerinin birbirleri ile olan korelasyon verilerinin karşılaştırılması	26
Tablo-11 Kromazurol B kullanılan deneysel ferroksidaz ölçüm aplikasyonu	39
Tablo-12 Bakır ve serum plazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	40
Tablo-13 Bakır ve serum plazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (O-dianisidin kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	41
Tablo-14 Bakır ve serum plazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (PPD kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)	42
Tablo-15 Bakır ve serum plazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (Nefelometrik serum plazmin ölçüm yöntemi)	43
Tablo-16 Bakır miktarları ve ferroksidaz/serum plazmin ölçüm yöntemleri ile elde edilen serum plazmin düzeyleri arasındaki korelasyon verileri	44
Tablo-17 Serum ferroksidaz aktivitesinin gün-içi ve günler-arası keskinlik ölçümleri	46

SİMGELER VE KISALTMALAR

Cp	Seruloplazmin
Cu	Bakır
DM	Diyabetes mellitus
DTT	Ditiyotreitol
Fe⁺²	Ferröz demir iyonu
Fe⁺³	Ferrik demir iyonu
LDL	Küçük yoğunluklu lipoprotein
LiBH₄	Lityum Borohidrat
MI	Miyokard infarktüsü
NaBH₄	Sodyum Borohidrat
NOS	Nitrik oksit sentaz
PPD	P-fenilendiamin
TCEP	Tris(2-karboksi)etilfosfin
PEG	Polietilen glikol
R1	1. Reaktif
R2	2. Reaktif
AHA	Asetohidroksamik asit
CAB	Kromazurol B (mordant mavisi)

ÖZGEÇMİŞ

Salim NEŞELİOĞLU 1981 yılında Adana’da doğdu. İlk, orta ve lise öğrenimini Adana’da tamamladı. 2000 yılında girdiği Osmangazi Üniversitesi fen edebiyat fakültesi kimya bölümünden 2001 yılında yatay geçişle Çukurova Üniversitesi’ne geçiş yaptı ve buradan 2004 yılında mezun oldu. 2005–2006 yılları arasında askerlik görevini tamamladı. 2006–2007 yılları arasında Adana’da özel bir kuruluşta AR-GE sorumlusu olarak görev yaptıktan sonra, tıpta uzmanlık sınavı ile girdiği Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümünde 2009 yılından bu yana asistan olarak görev yapmaktadır.

PATENT

DİSÜLFİT MİKTARI ÖLÇÜM VE TİYOL HOMEOSTAZİS DEĞERLENDİRME KİTİ

PROJE

YENİ NESİL DOYMAMIŞ DEMİR BAĞLAMA KAPASİTESİ (DDBK) ÖLÇÜM KİTİ

YAYINLAR

- 1) Oxidative stress and anti-oxidative defence in patients with age-related macular degeneration. Uğurlu N, Aşık MD, Yülek F, **Neselioglu S**, Cagil N. Curr Eye Res. 2013 Apr;38(4):497-502
- 2) Relationship between total thiol status and thrombocytopenia in patients with Crimean-Congo hemorrhagic fever. Guner R, Tasyaran MA, Keske S, Hasanoglu I, Kalem AK, Yapar D, Gulen TA, **Neselioglu S**, Isikoglu S, Erel O. Southeast Asian J Trop Med Public Health. 2012 Nov;43(6):1411-8

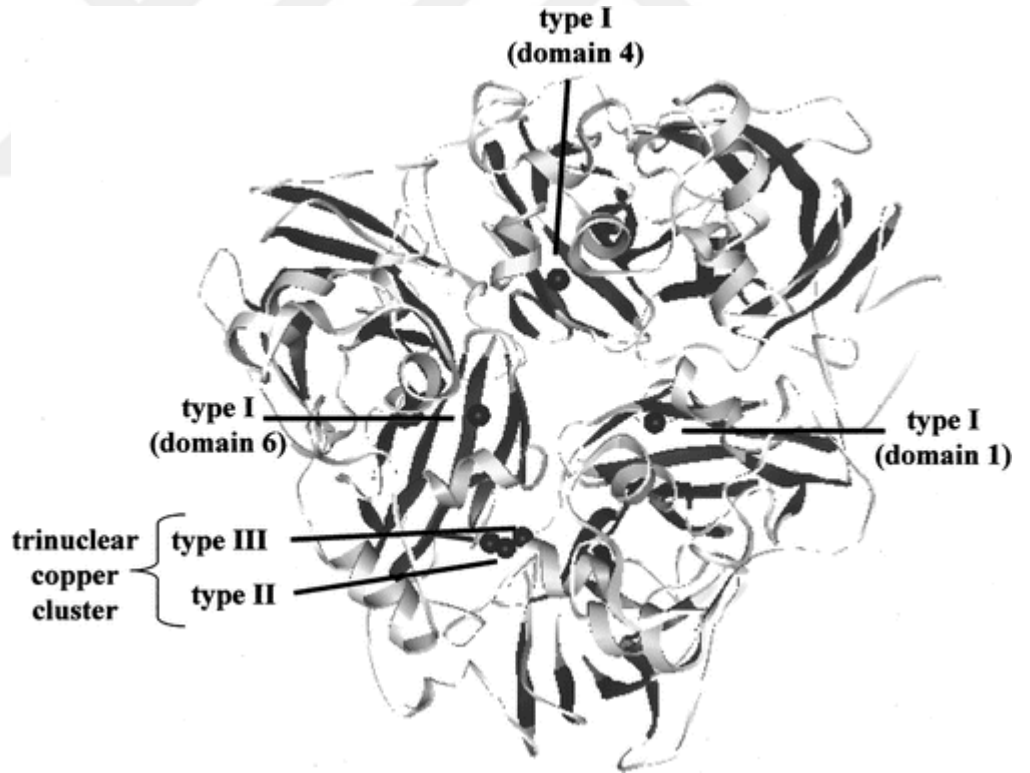
- 3) The association of oxidative stress and disease activity in seborrheic dermatitis. Emre S, Metin A, Demirseren DD, Akoglu G, Oztekin A, **Neselioglu S**, Erel O. Arch Dermatol Res. 2012 Nov;304(9):683-7.
- 4) Total antioxidant capacity and total oxidant status of synovial fluids in patients with temporomandibular joint pain and dysfunction. Etöz OA, Akçay H, **Neşeliöđlu S**, Erel Ö, Alkan A. Clin Oral Investig. 2012 Dec;16(6):1557-61
- 5) Evaluation of serum oxidative and antioxidative status in patients with erectile dysfunction. Aldemir M, Okulu E, **Neşeliöğlu S**, Erel O, Ener K, Kayıgil Ö. Andrologia. 2012 May;44 Suppl 1:266-71
- 6) Maternal serum 25(OH)D levels in the third trimester of pregnancy during the winter season. Ustuner I, Keskin HL, Tas EE, **Neselioglu S**, Sengul O, AvsarAF. J Matern Fetal Neonatal Med. 2011 Dec;24(12):1421-6
- 7) Pistachio diet improves erectile function parameters and serum lipid profiles in patients with erectile dysfunction. Aldemir M, Okulu E, **Neşeliöğlu S**, Erel O, Kayıgil O. Int J Impot Res. 2011 Jan-Feb;23(1):32-8
- 8) H.Sahin Kavakli, O.Erel, O.Karakayali, **S.Neselioglu**, F.Tanriverdi, F.Coskun, A.F.Kahraman Oxidative stress isolated blunt traumatic brain injury. Scientific Research and Essay (ISI) , 2832-36 pp., 2010

1.GENEL BİLGİLER

1.1.Seruloplazmin

Seruloplazmin (Cp) ilk olarak 1948 yılında tanımlanmış, 151 kDa molekül ağırlığında, total serum bakırının % 95'ini içeren bir α_2 -globülinidir. Yapısında 6 bakır atomu içerecek şekilde hepatik parankimal hücrelerde sentezlenir. İçeriğinde bulunan bakır atomları nedeniyle mavi renktedir(1).

Albumin ve transkuprein en önemli bakır taşıyan proteinlerdendir. Albumin, bakırın transportunda seruloplazminden daha büyük bir öneme sahiptir. Bunun nedeni albuminin bakırı daha az sıkı bağlaması ve gerektiğinde ihtiyaç olan bölgelere daha kolay bırakabilmesidir(2,3).

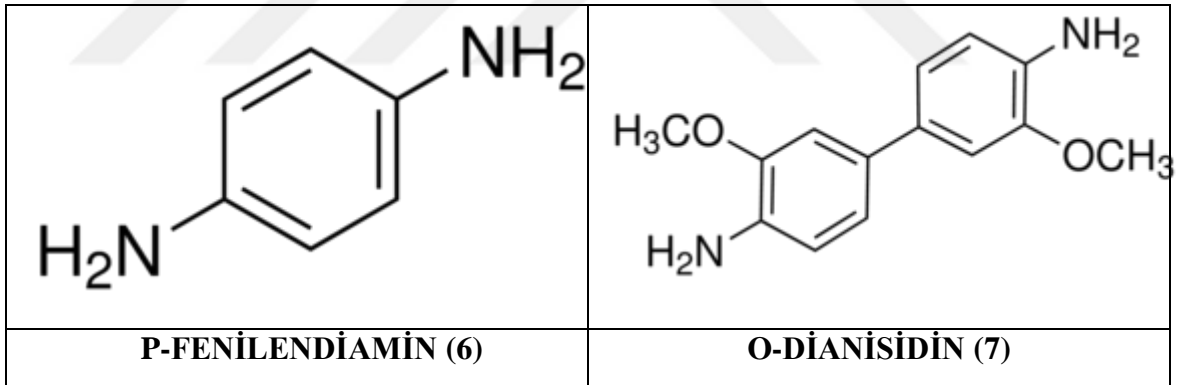


Seruloplazmin Üzerinde Bakır Bağlanma Bölgeleri (4)

1.1.1.Seruloplazmin Metabolizması ve Etkileri

Cp' nin primer fizyolojik rolü plazma redoks reaksiyonlarıyla ilişkisidir. Serbest ferrik iyonları ve ferritin bağlayan bölgelerin varlığı gibi faktörlere bağlı olarak oksidan veya antioksidan öneme sahiptir. Cp demirin iyonik durumunu düzenlemede yaşamsal önemdedir, özellikle Fe^{+2} 'in Fe^{+3} 'e oksidasyonunu ve böylece toksik demir ürünleri oluşmaksızın demirin transferine bağlanmasını sağlar. Bu durum, metabolizmada bakır taşıma fonksiyonu olan seruloplazminin ferrokسيدaz aktivitesinin olduğunu göstermektedir(1,2).

Ferrokسيدaz (EC 1.16.3.1) olarak da anılan seruloplazmin; ferröz demir (Fe^{+2}), polifenoller ve poliaminlere (p-fenilendiamin, o-dianisidin gibi) karşı oksidaz aktivitesi gösterir. Bununla birlikte ferröz demir (Fe^{+2}) seruloplazminin biyolojik substratı olarak kabul edilir ve ferröz demire karşı olan afinitesi diğer substratlardan daha fazladır.(5)



Seruloplazmin; akut faz proteinidir.

Enfeksiyon ve inflamasyon boyunca Cp aktivitesindeki artış, serum Cp'nin bir akut faz proteini ve bir antioksidan gibi hareket ettiğini göstermektedir(8).

Serüloplazmin, akut faz proteini olma özelliği sayesinde, doğal organizma defansının temel faktörlerindedir. Serüloplazmin kritik hastalığı olan vakaların (septik olaylar, kardiovasküler ve onkolojik hastalıklar), ve acil durumların (yanıklar,

radasyon ve şiddetli kazalar) tedavisinde kullanılabilir uygun bir tedavidir. Serüloplazmin intoksikasyonu azaltmakta, kalp fonksiyonlarının devamını sağlamakta, hemotopoetik ve immün sistemi kuvvetlendirmektedir. Özellikle, preoperatif dönemde zayıf ve anemik hastalarda, erken postoperatif dönemde ve masif kan kaybı olan ve proinflatuar komplikasyonlu süreçlerde endikedir. Böylelikle, doku hipoksisi azaltılıp, intrasellüler oksido-redüksiyon süreçler düzelir, solunum ve dolaşım fonksiyonları regüle olur (9).

Serüloplazminin belirgin etkisi, akut ve kronik osteomyelit, romatizma, infektif endokardit ve iskemik kalp hastalığı olan hastaların tedavisinde de gözlenmiştir (9).

Serüloplazmin ancak özel klinik koşullar eşliğinde i.v. olarak uygulanabilmektedir. Şu andaki medikal kullanımını oldukça kısıtlı olsa da, her geçen gün lehine yayınlanan klinik veriler, gelecekte çok daha geniş bir kullanım alanına sahip olacağını işaret etmektedir.

Serüloplazmin; antioksidan bir proteindir.

Oksidasyon ürünlerinin üretimiyle, plazmada artan oksidatif stresi kompanse etmek üzere, bir serum antioksidanı olan serüloplazmin düzeyi artar(10). Böylece serbest oksijen radikalleri ve lipid peroksidasyonu gibi serbest radikallerin dokulara ve plazmaya yaptığı zararlı etkileri engeller(11,12,13). Ayrıca DNA hasarını engellediği de bilinmektedir(14,15).

Serüloplazmin; prooksidan bir proteindir.

Serüloplazminin ferooksidaz aktivitesinin, iyi tanımlanmış deneysel şartlarda, makromoleküller özellikle düşük dansiteli lipoproteinler üzerinde oksidatif hasara neden olabileceği ortaya konmuştur. Serüloplazminin fazla miktar dializinin prooksidan aktivitesini değiştirmedeği ortaya konmuştur bu da prooksidan bakırın sıkıca bağlandığını göstermektedir. Ancak, şelasyon ligand olan Chelex-100'ün solid fazının tedavisi ile, serüloplazminin prooksidan aktivitesi tamamen inhibe edilmektedir. En

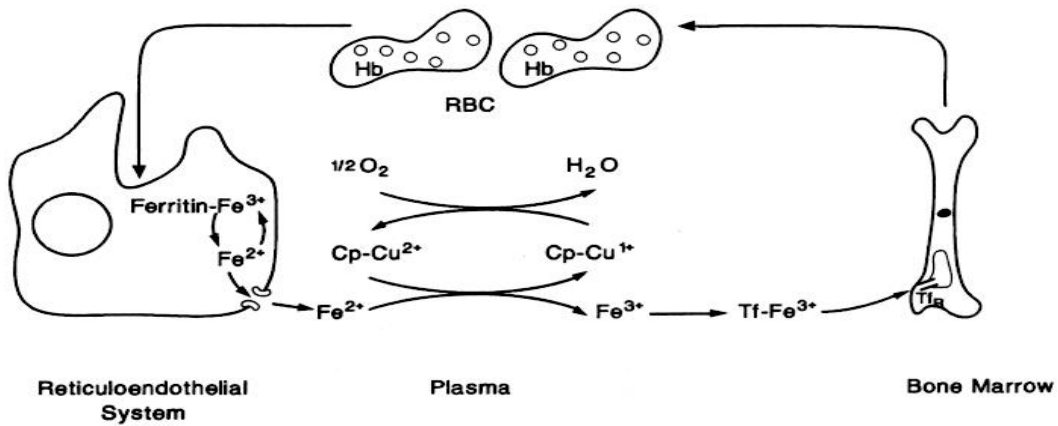
dipte yerleşmiş bir parça olan, His 426, direkt oksijen ile reokside olması nedeniyle, ROS oluşumuna neden olup, prooksidan aktiviteden sorumludur. (16)

Seruloplazmin; vasküler tonusun regülasyonunda görevlidir.

Seruloplazminin, vasküler tonusun düzenlenmesinde görev alan endotelial nitrik oksit sentaz (NOS) enziminin fonksiyonunu değiştirebileceği gösterilmiş ve seruloplazminin damar endotelinin nitrik okside bağlı dilatasyonunda bir rolü olabileceği düşünülmüştür(11). Nitrik oksidin nitrosothiol ürünleri, nitrik oksit transporterları olarak fonksiyon görüp, hücre içi ve hücreler arası sinyal transdüksiyonundan sorumludur(17). NO, serüloplazminin substratları içinde, direkt mavi bakır bölgelerine bağlanabilme özelliğine sahip olması nedeniyle tektir(18).

Seruloplazmin; ferrokسيدaz aktiviteye sahip proteindir.

Seruloplazmin, ferrokسيدaz aktivitesiyle ferröz demirin (Fe^{+2}) ferrik demire (Fe^{+3}) oksidasyonunu katalizleyerek demirin transport proteini olan transferrin ve depo proteini olan ferritine bağlanmasını kolaylaştırır ve aynı zamanda Fenton reaksiyonunu da önleyerek antioksidan aktivite gösterir(19).



Şekil 1: Seruloplazminin ferrokسيدaz aktivitesi (20)

Seruloplazminin tip 1 bakır bölgeleri uzun, dar ve negatif yüklü yarıқта yerleşmiş olup, 2 yüklü metal iyon bağlanma bölgesinin altındadır. Bunun hemen üst kısmında, daha zayıf yerleşmiş, negatif yüklü alan vardır ki, bu bölgenin 3 yüklü iyonlar bağlanma bölgesi olduğu düşünülmektedir(21).

1.1.2.Seruloplazmin Eksikliği

Karaciğer yetmezliği ve malnütrisyon gibi protein sentez bozuklukları, protein kaybettiren enteropati, nefrotik sendrom, herediter hiposeruloplazminemi, Wilson hastalığı, Menkes hastalığı, nutrisyonel bakır eksikliği (22,23) ve diyabetli hastalarda (24) plazma Cp düzeylerinin önemli düzeyde düşük olduğu bildirilmiştir.

1987’de Miyajima, “Aseruloplazminemi” adını verdiği, dolaşımdaki seruloplazminin hemen hemen yokluğu ile karakterize, otozomal resesif, nörodejeneratif bir hastalık tanımladı. Seruloplazmin geninde mutasyonla ortaya çıkan aseruloplazminemide; pankreas, retina ve beyinde fazla demir birikimi meydana gelmekte ve (25) artan demir konsantrasyonu, beyinde lipid peroksidasyonunun artışına neden olabilmektedir. Ayrıca sistemik demir akümülyasyonundan dolayı hastalarda, artmış ferritin düzeyi, düşük transferin saturasyonu ve hafif düzeyde anemi gözlenmiştir. Bu yeni hastalık, ‘aserüloplazminemi’ serüloplazminin, demir hemostazisi için esansiyel bir ferooksidaz olduğunu ortaya koymuştur(26).

Aseruloplazminemi durumunda yapılan PET çalışmalarında, beyin glukoz ve oksijen hipometabolizması izlenmiştir. Bazal ganglianın mitokondriyal solunum zincirinde, özellikle kompleks I ve IV’ de, enzim aktiviteleri % 43-50 oranında azalmaktadır. Ayrıca serebral ve serebellar kortekstede % 62-65 oranında düşüş gözlenmiştir(26). Tüm bu veriler, serüloplazmin yetersizliğinin, artmış lipid peroksidasyonu, azalmış mitokondriyal enerji üretimi ve demir aracılı serbest radikallerin artması nedeniyle nöronal hücre hasarına yol açtığını ispatlamaktadır(26). Farelerde Cp eksikliğinde karaciğer ve diğer organlarda demir birikimi gözlenmiştir(27).

Serüloplamin gen hasarı oluşturularak yapılan bir çalışmada(28), Cp-/- farenin sinir sisteminde, serebellum ve beyin sapında demir birikimi gözlenmiştir. Bazı S.S.S. bölgelerinde, lipid peroksidasyonu izlenmiştir. Cp-/- fare, beyin sapı dopaminerjik nöronların kaybına bağlı motor koordinasyon defisiti göstermiştir. Bu durum, serüloplazminin S.S.S.'ni demir aracılı radikal hasardan koruduğunun ispatıdır ve Parkinson, Alzheimer gibi nörodejeneratif hastalıklarda antioksidan etkisinin önemini vurgulamaktadır.

1.1.3. Serulolazmin Toksisitesi

Bu proteinin yüksek düzeyleri aterosklerozis gelişimine zemin hazırlar. Çok sayıda araştırmacı kardiovasküler hastalıklar ve artmış Cp seviyeleri arasında korelasyon göstermişlerdir(29). Miyokard infarktüsündeki (MI) artmış riskin, Cp'nin prooksidan aktivitesinden ve LDL'yi oksidatif modifikasyona uğratarak aterosklerozun fizyopatolojisine katkıda bulunmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmektedir(30). Tip 2 diyabetes mellituslu (DM) hastalarda serum Cp düzeyleri kontrol grubuna göre yüksek olmasına karşın serum Cp seviyelerinin kan glikoz seviyeleriyle ilişkisi henüz belirlenememiştir(31).

1.2.Bakır (Cu)

Bakır çok sayıda metalloproteinle ilişkisi olan önemli bir eser elementtir. Biyolojik sistemlerde hem Cu^{+1} (cuprous) hem Cu^{+2} (cupric) değerlikli durumda bulunur. Atom ağırlığı 63,546 g/mol, atom numarası 29 olan bakır, periyodik tabloda 1B grubunun ilk elementidir. Normal bir diyetle ortalama 0,6 - 3 mg/gün bakır alınmaktadır(32).

1.2.1.Emilimi, Depolanması, Regülasyonu ve Atılımı

Bakır Emilimi duodenumda maksimumdur ve mideden de emilebilir. İntestinal mukozal hücrelerde bakır, merkaptopeptid oluşumu yoluyla bakırı bağlayan, sülfidril

grubundan zengin bir protein olan metallothionein ile reaksiyona girebilir. Metallothioneinin normal emilim sürecinde rol alıp almadığı ve bakır alımı yüksek olduğunda aşırı emilimi önleyip önlemediği açık değildir. Diğer metal iyonları, özellikle çinko ve kadmiyum sülfidril bağlayan bölgeler için bakırla yarışır ve bu durum adı geçen metallerin bakır emilimine antagonizmalarını açıklar. Oral olarak alınan bakırın % 50–80 kadarı barsakta emilir. Bakır emilimini etkileyen faktörler; cinsiyet (kadınlarda emilim yüzdesi daha büyüktür), alınan miktar, kimyasal form ve belli diyetel içeriklerdir. Bakır emilimi sprue, lenfosarkoma ve skleroderma gibi ince barsağı etkileyen diffüz hastalıkları olan bireylerde yetersiz olabilir(33).

Emilen bakır; bakır-albümin veya bakır-histidin kompleksleri şeklinde hızla karaciğere taşınır, burada çoğunlukla metallothionein benzeri bakırlı bir protein olarak depolanır. Bakır karaciğerden çok işlevli bir bakırlı protein olan ve plazmadaki toplam bakırın % 95 inden sorumlu olan serüloplazmin olarak salınır. Bakır; bakır içeren enzimlerin yapısına girmek için hücre içine, serüloplazmin, transkuprein, bakır-albümin ve bakır-aminoasit komplekslerini içeren belirli taşıma mekanizmaları ile taşınabilir.

Erişkin insan vücudu 80 – 150 mg bakır içerir. Doku konsantrasyon aralığı 1,5–2,5 µg/g'dır. Karaciğer bakırın esas depo yeridir ve bakır içeriği 30 – 50 µg/g kuru doku ağırlığıdır. Göreceli olarak kalp, beyin ve böbreklerde de yüksek miktarlarda bulunur. Kas ve kemik bakır konsantrasyonları düşüktür fakat büyük kütleleri nedeniyle toplam vücut bakırının % 50'sini oluştururlar. Bakır başlıca feçesle atılır, bu bakır barsaktan emilemeyen formu ile biliyer ve gastrointestinal sekresyonlardan doğan bakırı içerir.

Karaciğer bakır regülasyonunda anahtar organdır. Burada bakır depolanır, yapıya katılır ve kan düzeylerini sürdürebilmek için serüloplazmin olarak salınır. İntestinal emilim mekanizması ve biliyer atılımın bakır homeostazının düzenlenmesinde önemli rol oynadığı görülmektedir(33).

1.2.2.Klinik Önemi

Bakır metalloproteinlerin en büyük işlevleri oksidasyon redüksiyon reaksiyonlarıyla ilişkilidir; Bakır içeren enzimler moleküler oksijeni direkt olarak bağlarlar ve oksijen ile reaksiyona girerler. Bakır; seruloplazmin, sitokrom c oksidaz, süperoksit dismutaz, dopamin β -hidroksilaz, askorbat oksidaz, lizil oksidaz ve tirozinaz gibi birçok metalloenzimin bileşenidir.

Bakır Wilson hastalığında eksikliği görülen intrasellüler bir ATPaz tarafından peptid zincirine eklenir. Bakır normal polipeptid zincirinin katlanması için esastır; apoCp, bakır veya ATPaz yokluğunda bile sentezlenir, fakat çoğu intrasellüler olarak yıkılır, ancak az bir miktarı dolaşıma salınır(1,2).

1.2.3. Bakır Eksikliği

Çok sayıda patolojik durum bakır içeren enzim aktivitesinde kayıpla ilişkilendirilmiştir. Deri pigmentasyonunda yetersizlik melanin sentezinin ilk basamağında gerekli tirozinaz aktivitesinin baskılanmasına bağlıdır. Çeşitli destek doku (kardiyovasküler ve iskelet) çapraz bağlanma defektlerine aminoasit oksidaz, özellikle lizil oksidaz aktivitesi kaybının neden olduğuna inanılmaktadır. Ataksi, motor nöronlarda sitokrom c oksidaz aktivitesindeki azalma sonucu ortaya çıkabilir. Azalmış dopamin β -hidroksilaz aktivitesi katekolaminlerin birbirine çevrimlerinde anormallikle sonuçlanabilir. Bakır demir metabolizmasında önemli bir role sahiptir. Bakır eksikliği demir emilimini bozar ve şiddetli bakır eksikliğine anemi eşlik eder.

Bakır eksikliğinin belirtileri;

1. Erken evrede nötropeni ve hipokromik anemi: her ikisinden de demir değil oral bakır alımının eksikliği sorumludur.
2. Osteoporoz ve çeşitli kemik ve eklem anormallikleri: Bu durum kemik kollajen ve bağ dokusunun bakıra-bağımlı çapraz-bağlanmasındaki eksiklik nedeniyledir.

3. Melanin sentezi için gerekli tirozinaza bağlanan bakır, deri pigmentasyonunda azalma ve genel solukluk hali oluşturur.
4. Daha geç evrelerde, olasılıkla sitokrom c oksidazın neden olduğu nörolojik anormallikler (hipotoni, apne, psikomotor retardasyon) görülür.

Plazma bakır ve seruloplazmin konsantrasyonları bakır eksikliği ve tedaviye cevap derecesini yansıtır.

Eser elementlerden eksik infüzyon sıvılarıyla uzun süreli hiperalimentasyonun hem yeni doğanda hem erişkinde bakır eksikliği oluşturduğu gösterilmiştir. Gözlenen belirtiler genellikle düşük plazma bakır ve seruloplazminini içeren bakır eksikliği ile ilişkili anemi, nötropeni, lökopeni ve hiposellüler kemik iliğidir. İnsan bakır eksikliği aynı zamanda orak hücreli anemi için çinko tedavisi ve penisilamin gibi bakır bağlayan ajanlarla tedavi ile ilişkili olabilir. Bakır eksikliğinin kalp ritmi düzensizliği ve hiperlipidemi yoluyla koroner kalp hastalığı riskini arttırdığı düşünülür(33).

1.2.4. Bakırın Toksik Etkileri

Bakır toksisitesi insanlarda nadir görülür. Metabolizmada hasara neden olan hidroksil radikalinin (OH^{*}) ortaya çıkması bakırın indüklediği oksidatif mekanizmayla oluşabilir(34,35).

1.2.5. Menkes Hastalığı

Menkes hastalığı bakır bağlayan p-tipi bir ATPaz genindeki mutasyonlardan kaynaklanır. Menkes hastalığı (“kırık” veya “çelikleşmiş” saç hastalığı) bir bakır metabolizması hastalığıdır. X’ e bağlı, sadece erkek çocukları etkileyen, sinir sistemi, bağ dokusu ve damarları tutan ve genellikle bebeklik döneminde ölümle sonuçlanan bir hastalıktır. Bu ATPaz’ın bakırın hücrelerden dışarı çıkışından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Mutasyonla değişikliğe uğradığında, bakır bağırsaktan normal bir şekilde hareket ettirilememekte ve diğer bir grup hücre ve dokularda olduğu gibi

buraları terk edemeyerek ilgili yerlerde birikime uğramaktadır. Bakırın birikmiş olmasına karşın, olasılıkla apoenzimlerle birleştirilmesindeki bir kusura bağlı olarak bakıra bağımlı birçok enzimin etkinliği azalmıştır. Normal karaciğer, bu ATPaz'ı çok az ifade etmektedir ve bu da Menkes hastalığında karaciğer tutulumunun olmamasını açıklayabilir. Bu veriler, karaciğerin Wilson hastalığının oluşmasına katılabilen farklı bir bakır bağlayıcı ATPaz içerebildiği olasılığının ileri sürülmesine yol açmıştır(3).

1.2.6. Wilson Hastalığı

Wilson hastalığı (hepatolentiküler dejenerasyon) bakır bağlayan bir p-tipi ATPaz'ı kodlayan gendeki mutasyonlardan kaynaklanır. Bakırın safra ile atılamadığı ve karaciğer, beyin, böbrek ve eritrositlerde biriktiği kalıtsal bir hastalıktır. Bakırın artan miktarlarda birikmesiyle, olgularda hemolitik anemi, karaciğer hastalığı (siroz, hepatit) ve bazal ganglionlarla diğer merkezlerde bakır birikmesine bağlı olarak nörolojik bir sendrom gelişir. Kayser-Fleischer halkası sık rastlanan klinik bir bulgudur. Bu desseman zarında bakır birikmesine bağlı olarak kornea çevresinde oluşan yeşil veya altın rengi pigmentli bir halkadır. Wilson hastalığından kuşku duyuluyorsa karaciğer biyopsisi yapılmalıdır. Karaciğer bakır miktarı 250 µg/g kuru ağırlık düzeyinden yüksek iken plazma seruloplazmin düzeyinin 20 mg/dl'nin altında oluşu tanı koydurucudur. 1993'te Wilson hastalığının nedeni de ortaya çıkarılmıştır. Menkes hastalığına neden olan genin keşfini takiben, benzer bir bakır bağlayıcı p-tipi ATPaz'ı kodlayan bir gendeki çeşitli mutasyonların bu hastalıktan sorumlu olduğu bulunmuştur. Bu genin, Menkes sendromundaki gen ürününün ileri derecede benzeri olan 1411 aminoasitlik bir proteini kodladığı saptanmıştır. Bugün tam olarak açıklanamamış bir tarzda, işlevsiz bir ATPaz, bakırın safra içine kusurlu atımına, bakırın aposeruloplazminle birleştirilmesinde bir azalmaya ve bakırın, önce karaciğer daha sonra beyin gibi diğer organlarda birikmesine neden olmaktadır. Wilson hastalığının tedavisi, düşük bakır içeren bir diyetin yanı sıra hastaya, yaşam boyu penisillamin verilmesi şeklindedir. Bakır ile şelat yapan penisillamin idrarla atılır ve böylece bu mineralin vücuttan kaybını sağlar(33).

HASTALIK	MENKES HASTALIĞI	WILSON HASTALIĞI
Genin konumu	Xq13.3	Xq14.3
Kalıtım	X e bağlı çekinik	Otozomal çekinik
Gen ürünü	Cu ⁺² bağlayan p-tipi ATPaz	Cu ⁺² bağlayan p-tipi ATPaz
İfadesi	Karaciğer dışı tüm dokular	Karaciğer, böbrek, plasenta
Başlangıç	Doğumda	Geç çocukluk
Klinik bulgular	Serebral dejenerasyon, anormal saç, diğer bulgular, erken ölüm	Karaciğer hastalığı, nörolojik bulgular, geç erişkinliğe kadar hayatta kalabilir.
Laboratuvar bulguları	Azalmış serum ve KC Cu ⁺² Azalmış serum Cp Artmış bağırsak Cu ⁺² Artmış böbrek Cu ⁺²	Azalmış serum Cu ⁺² Azalmış serum Cp Artmış idrar Cu ⁺² Artmış karaciğer Cu ⁺²
Hücre kültürü	Artmış Cu ⁺² birikimi Azalmış Cu ⁺² atılımı	Çoğu olguda normal
Kusur	Bağırsaktan Cu ⁺² emilimi, Cu ⁺² bağımlı enzimlerde eksiklik	Safrayla Cu ⁺² atılımı, seruloplazminle Cu ⁺² birleşmesi
Tedavi	Etkin tedavisi yok	Penisillamin

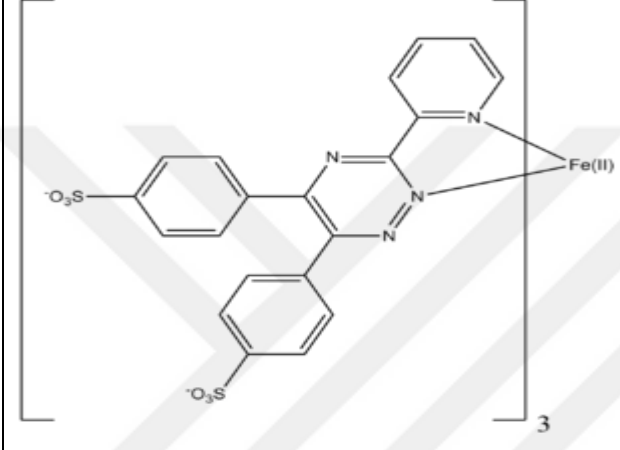
Tablo-1 Menkes hastalığı ile Wilson hastalığının karşılaştırılması(3)

Test	Normal erişkinde referans aralıklar
Serum bakırı	10-22 µmol/L
Seruloplazmin	200-600 mg/L
İdrar bakırı	< 1 µmol/24 saat
Karaciğer bakırı	20-50 µg/g kuru ağırlık

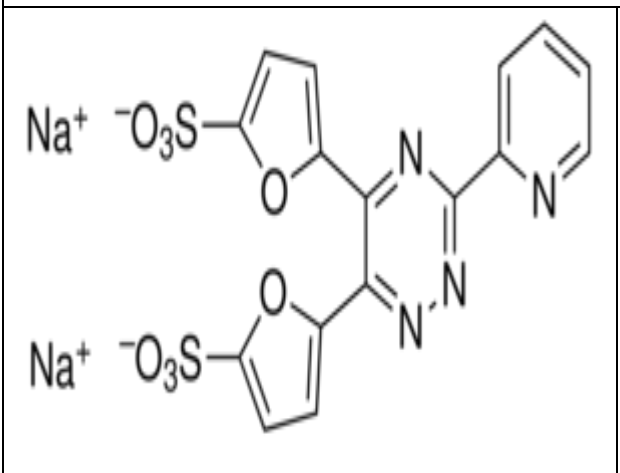
Tablo-2 Bakır metabolizması için kullanılan ana laboratuvar testleri(3)

1.3 Demir Kromojenleri

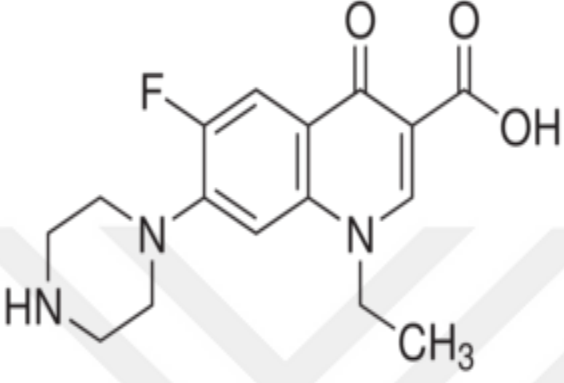
Ferrozin

Ferrozin	
(3-(2-Pyridyl)-5,6-diphenyl-1,2,4-triazine-pdisulfonicacid monosodiumsalt hydrate)	
Şekil-2	
	Ferrozin, Fe ⁺² iyonu ile birleşerek 562 nm dalga boyunda en yüksek absorbanası vermektedir. Bu madde, Fe ⁺² iyonuna spesifik bir kimyasaldır. Klinik olarak serumda mevcut demir miktarının ölçümü için kullanılır(36).

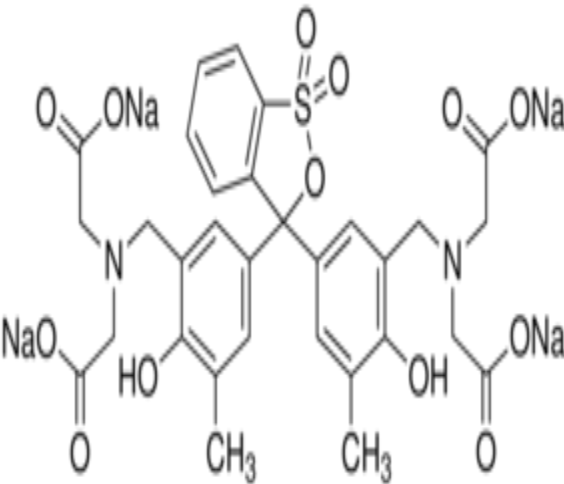
Ferene

Ferene	
(3-(2-Pyridyl)-5,6-di(2-furyl)-1,2,4-triazine-5',5''-disulfonic acid disodium salt)	
Şekil-3	
	Ferene, Fe ⁺² iyonu ile birleşerek 593 nm dalga boyunda en yüksek absorbanası vermektedir. Bu madde, Fe ⁺² iyonuna spesifik bir kimyasaldır. Klinik olarak serumda mevcut demir miktarının ölçümü için kullanılır(37).

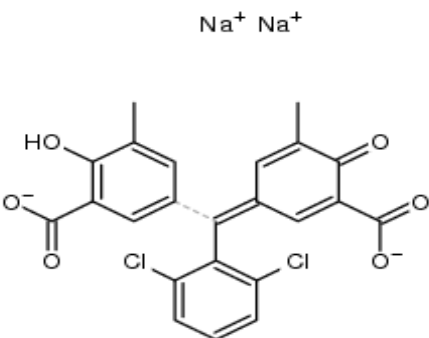
Norfloksasin

Norfloksasin	
(1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-1H-quinoline-3-carboxylicacid)	
Şekil-4	
	Sentetik bir kemotöropatik antibakteriyel ajandır. Fe^{+3} ile stabil bir kompleks oluşturur ve 415 nm dalga boyunda maksimum absorpsiyon vermektedir(38).

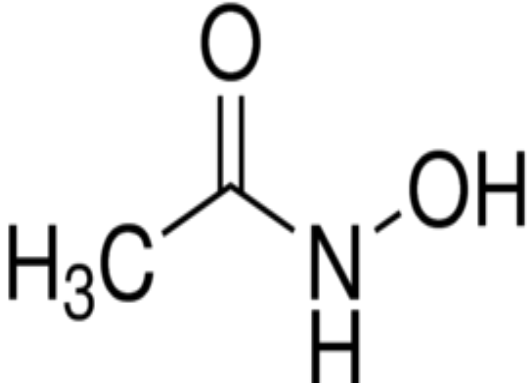
Ksilenol oranj

Xylenol Orange	
3,3-Bis (N,N-bis(carboxymethyl)aminomethyl)-o-cresolsulfonephthalein tetra sodium salt	
Şekil-5	
	Ksilenol oranj ferrik demir (Fe^{+3}) iyonları ile en uygun dalga boyu olan 560 nm'de renkli bir kompleks oluşturur. Ksilenol oranj ile ferrik demir 1:1 olarak kompleks yapar(39).

Kromazurol B (Mordant mavisi)

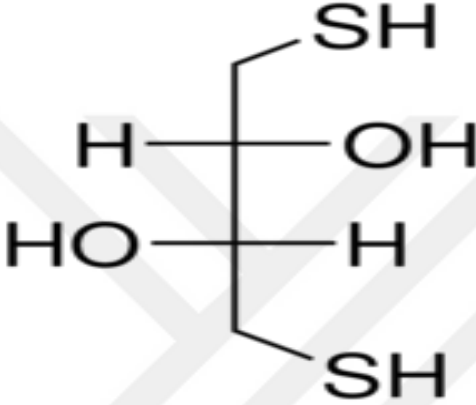
Kromazurol B (Mordant mavisi)	
Şekil-6	
	Kromazurol B ferrik demir (Fe^{+3}) iyonları ile optimum dalga boyu olan 660 nm de renkli bir kompleks oluşturur(40).

Asetohidroksamik Asit

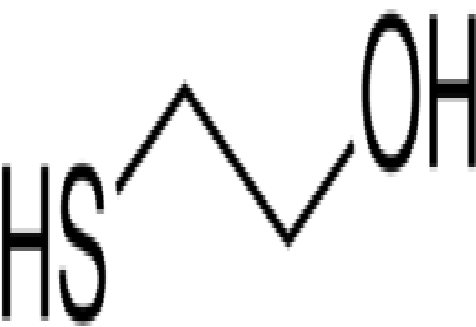
Asetohidroksamik asit	
Şekil-7	
	Asetohidroksamik asit ferrik iyonlar (Fe^{+3}) ile şelasyon oluşturarak, optimum dalga boyu olan 444 nm dalga boyunda en yüksek absorbanası vermektedir(41).

1.4. Redüktant Maddeler (42)

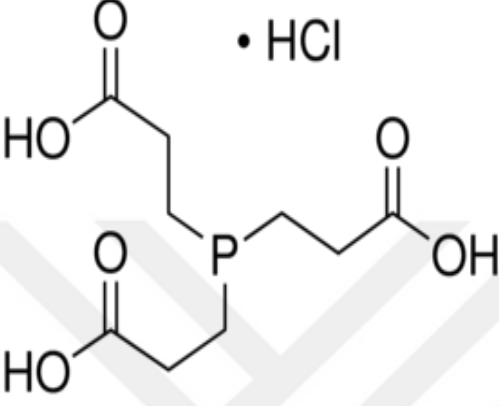
Ditiyotreitol (DTT)

Ditiyotreitol (DTT)	
Şekil-8	
	İlımlı bir redüksiyon ajanıdır. Genellikle proteinlerin redüksiyonunda kullanılır. Çok stabil değildir, hava ile belli bir süre teması sonunda, yapısında bulunan ve redüksiyon işleminden asıl sorumlu olan tiyol grupları, oksitlenerek disülfid formuna dönüşür ve sahip olduğu redüksiyon kapasitesi azalır.

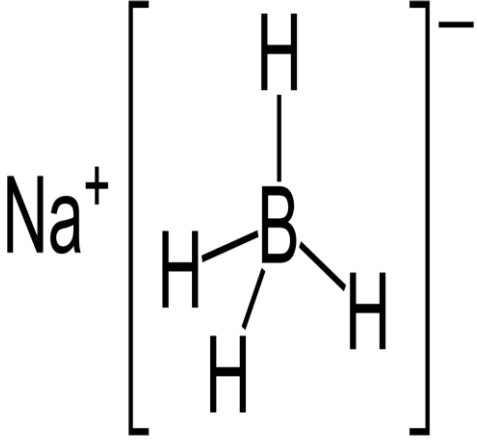
β -Merkaptoetanol

β -Merkaptoetanol	
Şekil-9	
	Redüksiyon işlemini içerdiği tiyol grubu ile gerçekleştirir ve birçok özelliği bakımından DTT kimyasalına benzer ama tek bir tiyol grubu içermesi nedeniyle DTT den daha zayıf bir redüksiyon ajanıdır.

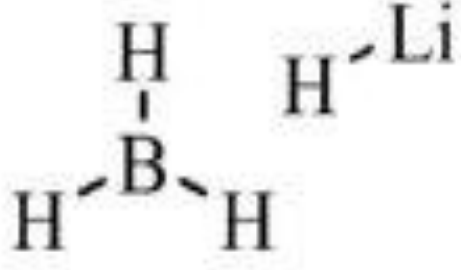
TCEP (tris(2-karboksietilfosfin))

TCEP (tris(2-karboksietilfosfin))	
Şekil-10	
	Çok güçlü redüksiyon kapasitesi ve hava ile teması halinde dahi redüksiyon gücünün devam etmesi TCEP kullanımının popüler olmasını sağlamıştır.

Sodyum Borohidrat

Sodyum Borohidrat	
Şekil-11	
	Güçlü indirgeme kapasitesi olan redüksiyon ajanlarından biridir. Su ve alkol gibi polar çözücülerde çok iyi çözünür, aktivitesinin uzun süre devam etmesi için içinde çözündüğü ortamın pH' sı alkali yapılıdır. Klasik oksidasyon sırası alkol-aldehit/keton-karboksilik asit şeklinde olan bu organik yapılardan, aldehit ve basit keton yapılarını alkole indirgeyebilme gücüne sahip bir redüksiyon ajanıdır.

Lityum Borohidrat

Lityum Borohidrat	
Şekil-12	
	Sodyum borohidrata benzer kimyasal özelliklere sahip olmasına karşın sodyum borohidrattan daha güçlü redüksiyon kapasitesine sahiptir. Aynı zamanda karboksilik asitleri alkollere kadar indirgeme kapasitesine sahiptir.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

Yeni geliştirilen bir yöntem olan, tam otomatik ve spektrofotometrik olarak tayini gerçekleştirilebilen ferrokسيداز ölçüm metodu; primer görevi, plazmada bakırın taşınması olan seruloplazmin proteininin, ferrokسيداز aktivitesinden yararlanarak ortamdaki ferröz demir iyonlarını ferrik demir iyonları formuna çevirmesiyle gözlenen kinetiğin ölçülmesi prensibine dayanmaktadır. Tüm kimyasallar sigma-aldrich Co. LLC.'den temin edilmiştir. Spektrofotometrik ölçümlerde roche marka Cobas C 501 model otomatik analizör kullanılmıştır.

Kullanılan Kimyasallar:

Asetik asit	Amonyum demir(2) sülfat hegzahidrat
Sodyum asetat	P-fenilendiamin
Asetohidroksamik asit	O-dianisidin
Ditiyotreitöl (DTT)	Sülfürik asit
Kromazurol B	

2.1. Geliştirilen Yöntem İle Ferrokسيداز enzim aktivitesinin ölçümü

1. Reaktif (R1)

5 mM asetohidroksamik asit 450 mM pH: 5,8 asetat tamponu içinde çözülür.

2. Reaktif (R2)

1000 ml deiyonize su içinde; 2,07 mM Ditiyotreitöl (DTT) ve 4,08 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Amonyum demir(2)sülfat hegzahidrat) kimyasalları çözülür.

Örnek(μ L)	R1(μ L)	R1dilüent(μ L)	R2(μ L)	R1dilüent(μ L)
3,5	120	60	40	-

Tablo-3 Geliştirdiğimiz Yöntem İle Ferroksidaz Ölçüm Aplikasyonu

Ana dalga boyu: 444 nm / yan dalga boyu: 700 nm olacak şekilde kinetik okuma yapılır.

2.2. Asetohidroksamik Asit Optimizasyonu

Referans yöntemlere göre ferroksidaz aktivite ölçümü yapılarak düşük, orta ve yüksek aktivite gösteren serumlar gruplara ayrıldı ve üç farklı seviyede serum havuzu oluşturuldu. Yöntemimizin optimizasyon çalışmaları serum havuzundan hazırlanan düşük, orta ve yüksek aktivite gösteren numunelerle gerçekleştirildi. Farklı derişimlerde çalışılarak optimal asetohidroksamik asit konsantrasyonu belirlendi(Şekil-16).

2.3. Amonyum Demir(2) Sülfat Hekzahidrat Optimizasyonu

Referans yöntemlere göre ferroksidaz aktivite ölçümü yapılarak düşük, orta ve yüksek aktivite gösteren serumlar gruplara ayrıldı ve üç farklı seviyede serum havuzu oluşturuldu. Yöntemimizin optimizasyon deneyleri serum havuzundan hazırlanan düşük, orta ve yüksek aktivite gösteren numunelerle değerlendirildi.

Ferroksidaz enzim substratı olan amonyum demir(2) sülfat hekzahidrat ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4).6\text{H}_2\text{O}$) farklı konsantrasonlarda çalışıldı(Şekil-17).

2.4. Kullanılan Örnek Hacminin Optimizasyonu

Yöntemimiz için kullandığımız örnek hacmi, ferroksidaz enziminden reaksiyon ortamındaki en yüksek verimi alabilmek amacıyla 3,5 μ L /5 μ L /6,5 μ L /10 μ L olacak şekilde farklı hacimlerde numune çalışılarak elde edilmiştir.

(Şekil-18, Şekil-19, Şekil-20, Şekil-21)

2.5. Kullanılan 1. Reaktif (R1) Hacimlerinin Optimizasyonu

R1 hacimleri / R1 dilüent hacimleri 100 µL /80 µL, 120 µL /60 µL, 140 µL /40 µL, 160 µL /20 µL, 180 µL /0 µL olacak şekilde farklı seviyelerde çalışılarak reaksiyon grafikleri elde edilmiştir. (R2 hacmi 40 µL' de sabit tutulmuştur) (Şekil-22, Şekil-23, Şekil-24, Şekil-25, Şekil-26)

2.6. Kullanılan 2. Reaktif (R2) Hacimlerinin Optimizasyonu

R2 hacimleri 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL, 60 µL 70 µL olacak şekilde farklı seviyelerde çalışılarak reaksiyon grafikleri elde edilmiştir. (R1 hacmi/R1dilüent hacimleri 120 µL/ 40 µL' de sabit tutulmuştur.) (Şekil-27, Şekil-28, Şekil-29, Şekil-30, Şekil-31, Şekil-32, Şekil-33)

2.7. Diğer Seruloplazmin Ve Ferroksidaz Ölçüm Yöntemleri

Başlıca seruloplazmin tayin yöntemleri:

- 1) Seruloplazmin “miktarının” kantitatif analizine dayanan; nefelometrik yöntem
- 2) Seruloplazminin “enzim aktivitesine” (ferroksidaz aktivitesi) dayanan; p-fenilendiamin, O-dianisidin ve ferröz demir iyonları gibi kimyasalların, substrat olarak kullanıldığı ölçüm yöntemleri olarak gruplanmaktadır.

Nefelometrik yöntem ile gerçekleştirilen seruloplazmin tayini;

Spesifik bir antiseruma karşı ölçüm yapılması prensibine dayanmaktadır. İlk reaktifinde, fosfat tamponu içerisinde 50 g/L polietilen glikol (PEG) ikinci reaktifinde, fosfat tamponu içerisinde insan serüloplazminine spesifik anti-seruloplazmin anti serumu (> 0,42 g/L) bulunmaktadır. Maksimum absorbanansı ana dalga boyu 340 nm, yan dalga boyu 700 nm de olacak şekilde çalışılmaktadır.(43,44)

Seruloplazminin ferroksidaz aktivitesinin ölçümüne dayanan tayin yöntemleri:

P-fenilendiamin(PPD) oksidasyonu temelinde gerçekleştirilen yöntem; bu yöntemde substrat olarak p-fenilendiamin kullanılır. İçeriğinde substrat olarak 0,0135 M p-fenilendiamin ihtiva eden, pH: 5.2 , konsantrasyonu 0.598 M asetat tamponunun bulunduğu bu metod, serumdaki ferroksidaz enzimiyle PPD' nin oksidasyonu ve buna bağlı olarak ferroksidaz aktivitesinin 550 nm dalga boyunda ölçüldüğü kinetik bir yöntemdir(45,46,47,48).

Örnek(μ L)	R1(μ L)
10	100

Tablo-4 P-fenilendiamin kullanılan referans ferroksidaz ölçüm aplikasyonu
Dalga boyu: 550 nm olacak şekilde kinetik okuma yapılır.

O-dianizidin oksidasyonu temelinde gerçekleştirilen yöntem; burada substrat olarak O-dianisidin kullanılmaktadır. Serumdaki ferroksidaz enziminin O-dianisidini oksitlemesiyle, ferroksidaz aktivitesinin ölçüldüğü bir yöntemdir. Bu yöntem iki reaktiflidir. İlk reaktif, örneğin içerisindeki ferroksidaz enziminin optimum çalışabilmesi için uygun pH ortamı oluşturan asetat tamponudur (450 mM, pH: 5,85 asetat tamponu). İkinci reaktif ise, içerisinde ferroksidaz enziminin okside edeceği ve böylece enzimin aktivitesinin ölçülebileceği substrat olan o-dianisidin (Deiyonize su içerisinde, 10 mM o-dianisidin ve 25 mM sülfürik asit) bulunmaktadır(46,47,48).

Örnek(μ L)	R1(μ L)	R2(μ L)
10	100	30

Tablo-5 O-dianisidin kullanılan referans ferroksidaz ölçüm aplikasyonu
Dalga boyu: 444 nm olacak şekilde kinetik okuma yapılır.

Ferröz demir iyonlarının (Fe^{+2}) oksidasyonu temeline dayanan yöntem; substrat olarak, içerisinde ferröz demir (Fe^{+2}) iyonları bulunduran, $Fe(NH_4)_2SO_4$ bileşiği kullanılmaktadır. pH: 5,8 ve konsantrasyonu 0,45 M olan asetat tamponu içerisinde, kromojen olarak ferene S, substrat olarak 70 mM $Fe(NH_4)_2SO_4$ bulunan bu yöntemde, feroksidaz enziminin katalitik etkisiyle, reaktif içerisindeki ferröz demir iyonlarının azalarak ferrik demir iyonlarına dönüşümü kinetik olarak izlenmektedir.(5,48)

2.8. Kromazurol B Kullanılan Deneysel Ferroksidaz Ölçüm Yöntemi

Bu yeni yöntem denemesi, bilinen ferrik demir kromojenlerinden biri olan kromazurol B (Mordant Mavisi) kimyasalını kullanarak gerçekleştirilmiştir. Bu deneysel yöntemde iki reaktif kullanılmıştır. Birinci reaktif içerisinde 450 mM pH: 5,8 asetat tamponu içinde 5 mM kromazurol B bulunmakta, ikinci reaktif içerisinde ise deiyonize su içerisinde 2,07 mM Ditiyotreitol (DTT) ve 4,08 mM $Fe(NH_4)_2(SO_4).6H_2O$ (Amonyum demir(2)sülfat heksahidrat) kimyasalları bulunmaktadır.

Örnek(μ L)	R1(μ L)	R1 dilüent(μ L)	R2(μ L)	R1 dilüent(μ L)
3,5	30	150	5	-

Tablo-6 Kromazurol B Kullanılan Deneysel Ferroksidaz Ölçüm Aplikasyonu
Ana dalga boyu: 660 nm / yan dalga boyu: 800 nm olacak şekilde kinetik okuma yapılır.

2.9. Bakır İle Seruloplazmin Aktivitesinin/Düzeylerinin Karşılaştırılması

Dolaşımda seruloplazmine bağlı olarak taşınan bakır ile seruloplazmin miktarı veya aktivitesi arasında güçlü bir ilişki beklendiğinden dolayı; atomik absorpsiyon ile ölçülen bakır düzeyleri ve geliştirdiğimiz enzimatik yöntem, diğer referans enzimatik yöntemler ve nefelometrik seruloplazmin ölçüm yöntemleri ile elde ettiğimiz seruloplazmin miktarı ve aktivitesi arasındaki ilişki istatistiksel olarak araştırılmıştır. (Tablo-10, Şekil-35, Tablo-11, Şekil-36, Tablo-12, Şekil-37, Tablo-13, Şekil-38, Tablo-14)

2.10. Referans yöntemlerle karşılaştırma

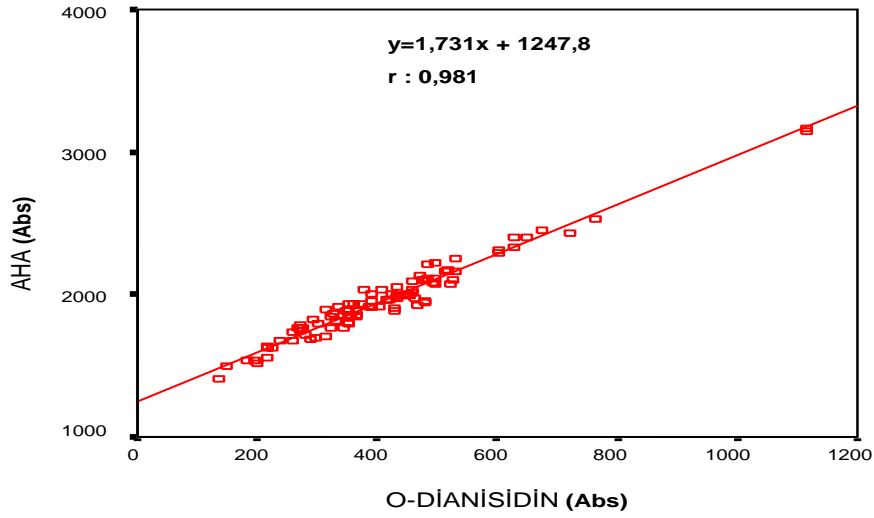
KORELASYON

	O-DİANİSİDİN	AHA
O-DİANİSİDİN	Pearson Korelasyon	1
	Anlam Derecesi	,000
	N	95
AHA	Pearson Korelasyon	,981**
	Anlam Derecesi	,000
	N	95

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

AHA: Asetohidroksamik Asit

Tablo-7 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile o-dianisidin kullanılan yöntemlerin korelasyon verilerinin karşılaştırılması



Şekil-13 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile o-dianisidin kullanılan yöntemlerin korelasyon grafiklerinin karşılaştırılması

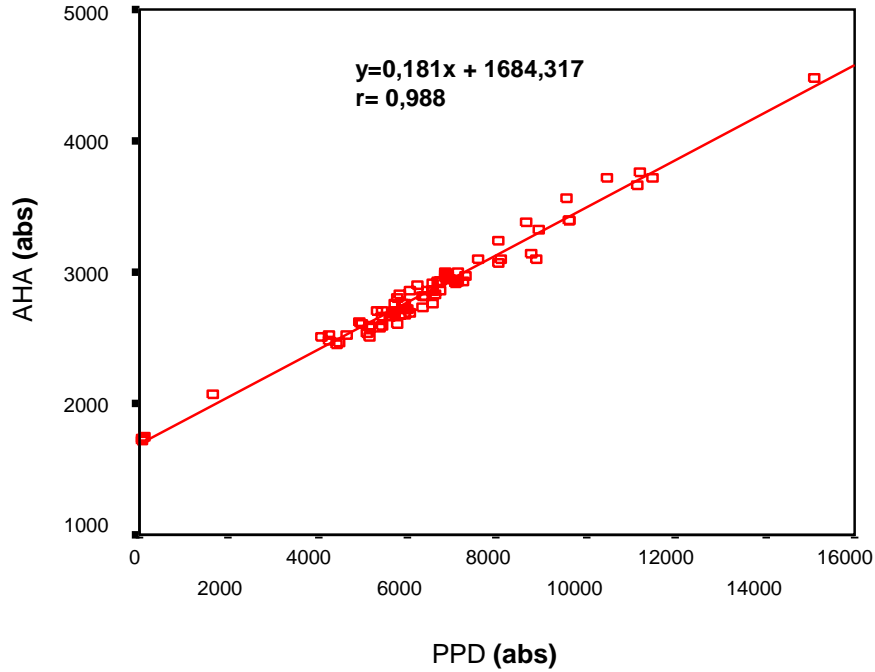
Korelasyon

		PPD	AHA
PPD	Pearson korelasyon	1	,988**
	Anlam derecesi	.	,000
	N	95	95
AHA	Pearson Korelasyon	,988**	1
	Anlam Derecesi	,000	.
	N	95	95

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlıdır

PPD : p-fenilendiamin
AHA : Asetohidroksamik Asit

Tablo-8 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile p-fenilendiamin kullanılan yöntemlerin korelasyon verilerinin karşılaştırılması



Şekil-14 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile p-fenilendiamin kullanılan yöntemlerin korelasyon grafiklerinin karşılaştırılması

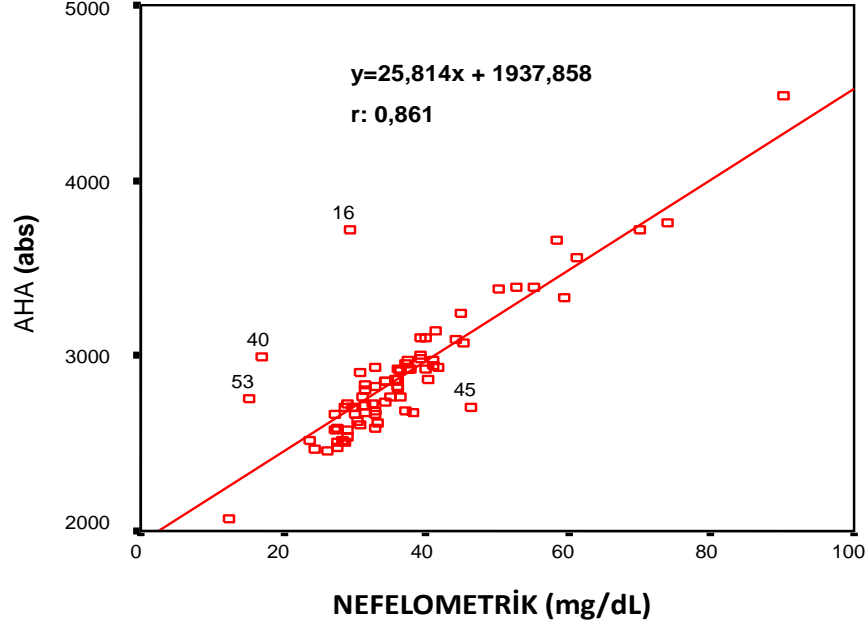
Korelasyon

		NEFELOMETRİK	AHA
NEFELOMETRİK	Pearson Korelasyon	1	,861**
	Anlam Derecesi	.	,000
	N	95	95
AHA	Pearson Korelasyon	,861**	1
	Anlam Derecesi	,000	.
	N	95	95

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

AHA: Asetohidroksamik Asit

Tablo-9 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile nefelometrik ölçüm yöntemlerinin korelasyon verilerinin karşılaştırılması



Şekil-15 Asetohidroksamik asit kullanılan yöntem ile nefelometrik ölçüm yöntemlerinin korelasyon grafiklerinin karşılaştırılması

KORELASYON

		AHA	O-DİANİSİDİN	PPD	NEFELOMETRİK
AHA	Pearson Korelasyon	1	,981** *	,988** *	,861** *
	Anlam Derecesi	.	,000	,000	,000
	N	95	95	95	95
O-DİANİSİDİN	Pearson Korelasyon	,981** *	1	,962** *	,832** *
	Anlam Derecesi	,000	.	,000	,000
	N	95	95	95	95
PPD	Pearson Korelasyon	,988** *	,962** *	1	,873** *
	Anlam Derecesi	,000	,000	.	,000
	N	95	95	95	95
NEFELOMETRİK	Pearson Korelasyon	,861** *	,832** *	,873** *	1
	Anlam Derecesi	,000	,000	,000	.
	N	95	95	95	95

**Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

AHA: Asetohidroksamik asit

PPD: P-fenilendiamin

Tablo-10 Bütün serum plazmin/ferroksidaz ölçüm yöntemlerinin birbirleri ile olan korelasyon verilerinin karşılaştırılması

3. BULGULAR

3.1. Optimum Koşulların Oluşturulması

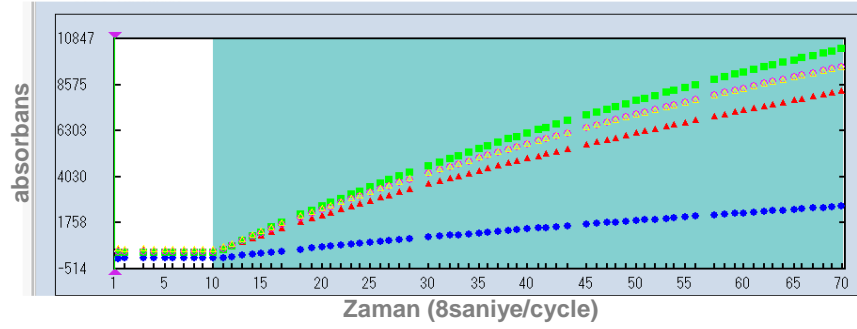
Ferroksidaz aktivite ölçümü için, pH aralığı 4,5 ile 5,9 arasında değişen asetat tampon çözeltisi kullanıldı. En uygun tampon pH ve konsantrasyonu sırasıyla 5,8 ve 0,45 mol/L olarak ayarlandı.

Ferroksidaz enziminin oksidasyonu ile oluşan ferrik demir iyonlarını bağlayan, şelatör ve kromojen olarak kullandığımız asetohidroksamik asit kimyasalının en uygun konsantrasyon düzeyi, farklı seviyelerde çalışılarak optimize edildi ve 5 mM olarak belirlendi.

Kullanılan tampon, reaksiyon ortamında ferröz demir iyonlarının oksidasyonunu spontan olarak arttırmaktadır. Bu durumun azaltılması amacıyla uygun koşulları sağlayacak şekilde, reaksiyon ortamına zayıf bir antioksidan olan Ditiyotreitol (DTT) ilave edildi. Optimize edilen DTT konsantrasyonu 2,07 mM olarak ayarlandı. Reaktif içerisinde bulunan bir diğer kimyasal madde olan amonyum demir(2) sülfat heksahidrat ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4) \cdot 6\text{H}_2\text{O}$)'ın ise farklı düzeylerde çalışılarak içeriğindeki en uygun ferröz demir (Fe^{+2}) konsantrasyonu 4,08 mM olarak saptandı.

3.2. Asetohidroksamik Asit Optimizasyon bulguları:

Farklı derişimlerde çalışılarak optimal asetohidroksamik asit konsantrasyonunun 5 mM olması gerektiği saptandı(Şekil-16).

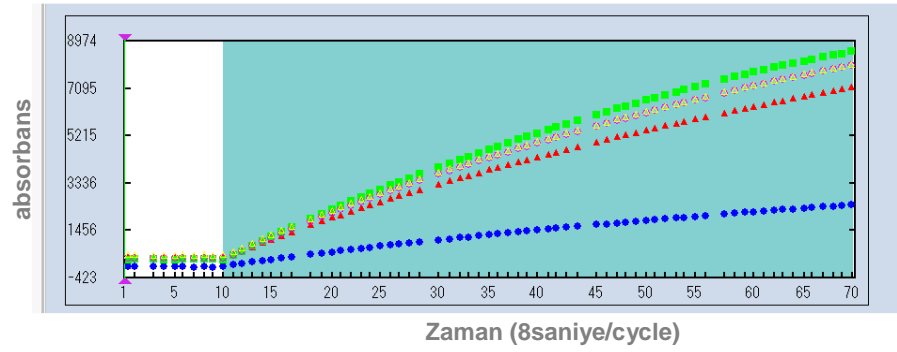


Şekil-16 Su ve düşük/orta/yüksek ferrokسيداز aktivitesine sahip numunelerin en uygun asetohidroksamik asit konsantrasyonu ile gerçekleştirilen ferrokسيداز enzim kinetiği

Grafikte su da görülen aktivite, ölçüm sonuçlarında etkili olmayıp, spontan olarak ferröz demirin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır.

3.3. Amonyum Demir(2) Sülfat Hekzahidrat Optimizasyon bulguları:

Ferroksidaz enzim substratı olan amonyum demir(2) sülfat hekzahidrat ($\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_6\text{H}_2\text{O}$) farklı seviyelerde çalışılarak, en uygun ferröz demir iyon konsantrasyonunun 4,08 mM olduğu belirlendi.(Şekil-17)

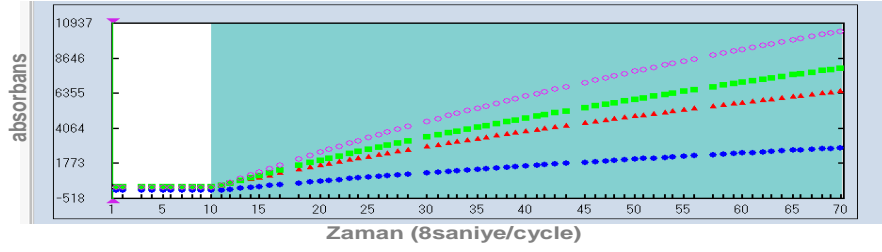


Şekil-17 Su ve düşük/orta/yüksek ferroksidaz aktivitesine sahip numunelerin en uygun amonyum demir(2) sülfat hekzahidrat konsantrasyonu ile gerçekleştirilen ferroksidaz enzim kinetiği

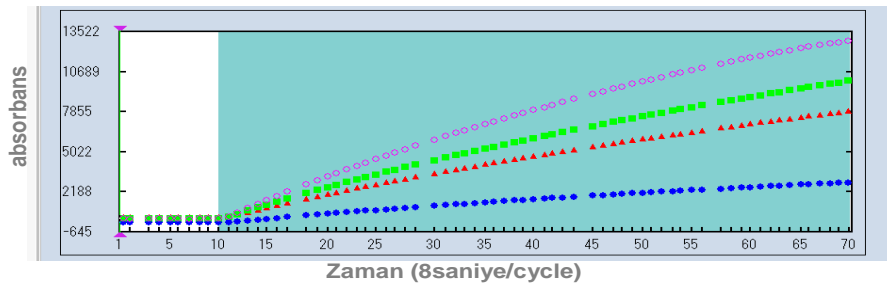
Grafikte su da görülen aktivite, ölçüm sonuçlarında etkili olmayıp, spontan olarak ferröz demirin oksidasyonundan kaynaklanmaktadır.

3.4. Kullanılan Örnek Hacminin Optimizasyon bulguları:

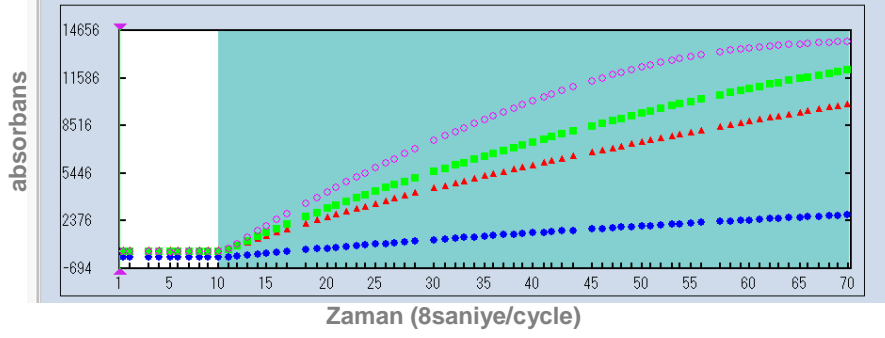
Yöntemimiz için kullandığımız örnek hacimleri 3,5 μL /5 μL /6,5 μL /10 μL olacak şekilde çalışılarak sırasıyla aşağıdaki grafikler elde edilmiştir.



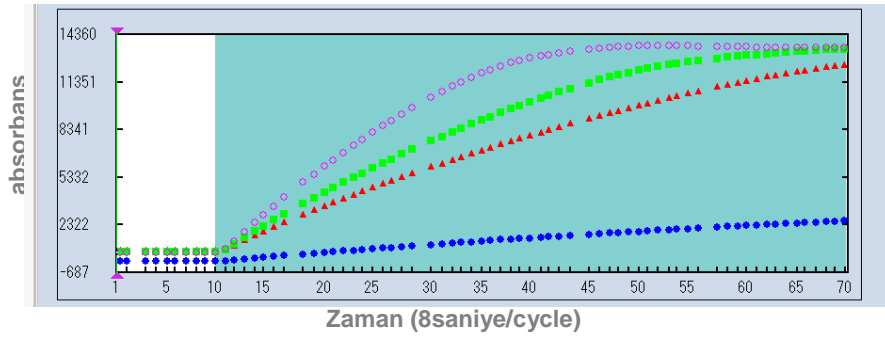
Şekil-18 farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 3,5 μL)



Şekil-19 farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 5 μL)



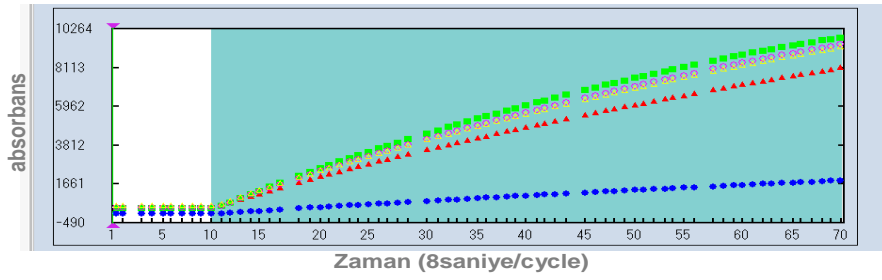
Şekil-20 farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 6,5 μ L)



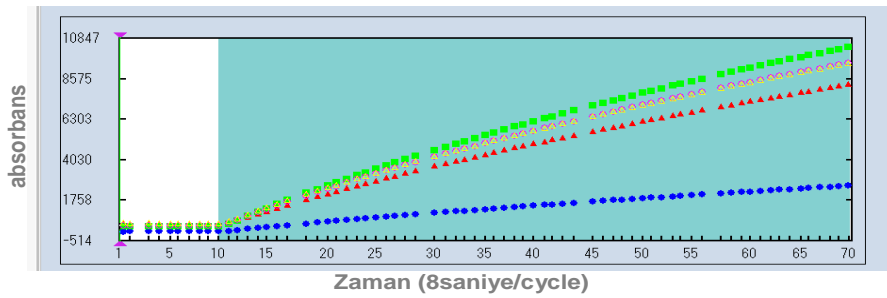
Şekil-21 farklı örnek hacimleriyle optimizasyon çalışması (örnek hacmi 10 μ L)

3.5. Kullanılan 1. Reaktif (R1) Hacimlerinin Optimizasyon bulguları:

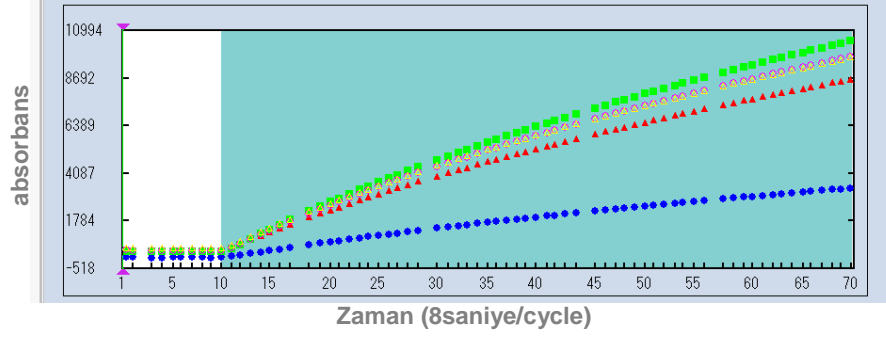
R1 hacimleri / R1 dilüent hacimleri 100 μL /80 μL , 120 μL /60 μL , 140 μL /40 μL , 160 μL /20 μL , 180 μL /0 μL olacak şekilde çalışılarak sırasıyla aşağıdaki grafikler elde edilmiştir. (R2 hacmi 40 μL ' de sabit tutulmuştur.)



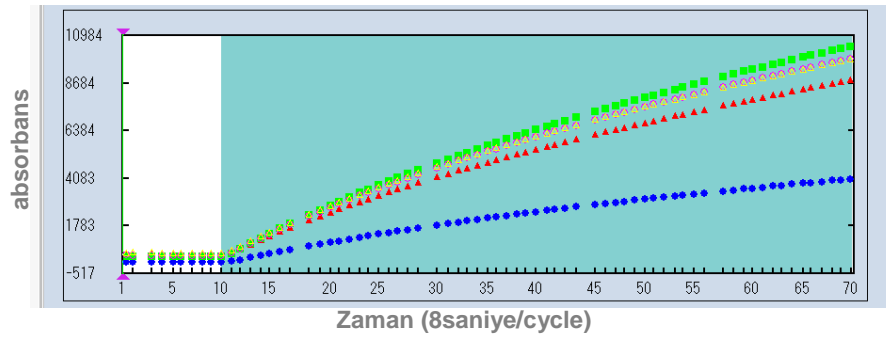
Şekil-22 farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (100 μL /80 μL)



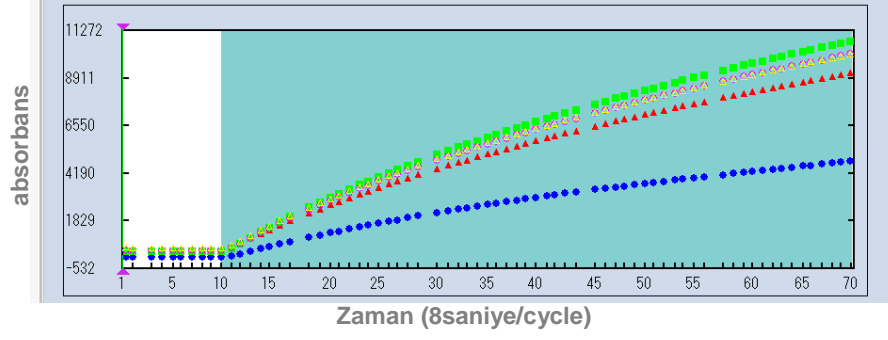
Şekil-23 farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (120 μL /60 μL)



Şekil-24 farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (140 µL /40 µL)



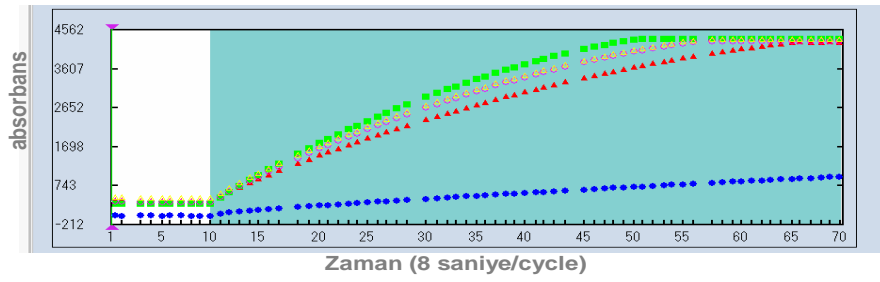
Şekil-25 farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (160 µL /20 µL)



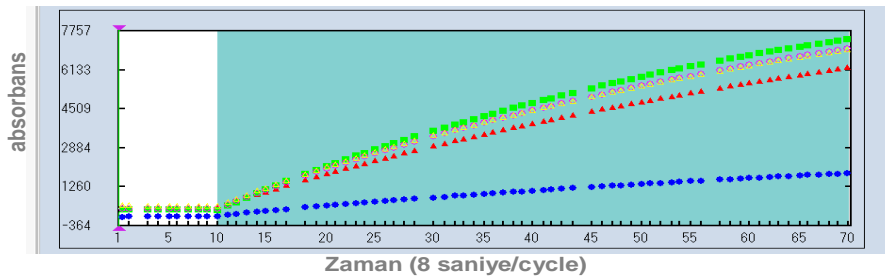
Şekil-26 farklı R1/R1 dilüent hacimleriyle optimizasyon çalışması (180 µL /0 µL)

3.6. Kullanılan 2. Reaktif (R2) Hacimlerinin Optimizasyon bulguları:

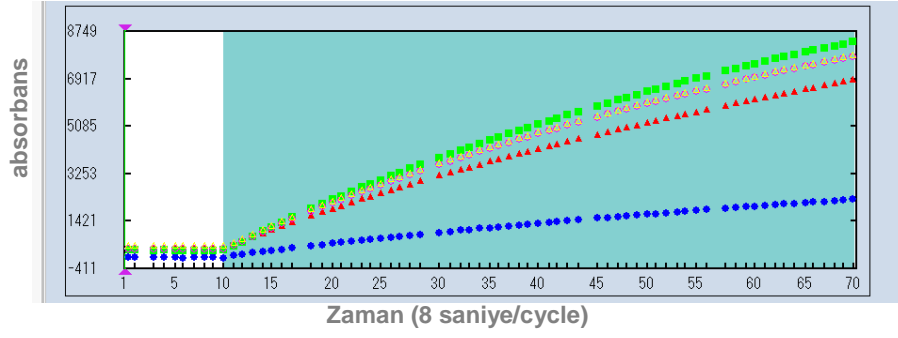
R2 hacimleri 10 μL , 20 μL , 30 μL , 40 μL , 50 μL , 60 μL 70 μL olacak şekilde çalışılarak sırasıyla aşağıdaki grafikler elde edilmiştir. (R1 hacmi/R1 dilüent hacimleri 120 μL / 60 μL ' de sabit tutulmuştur.)



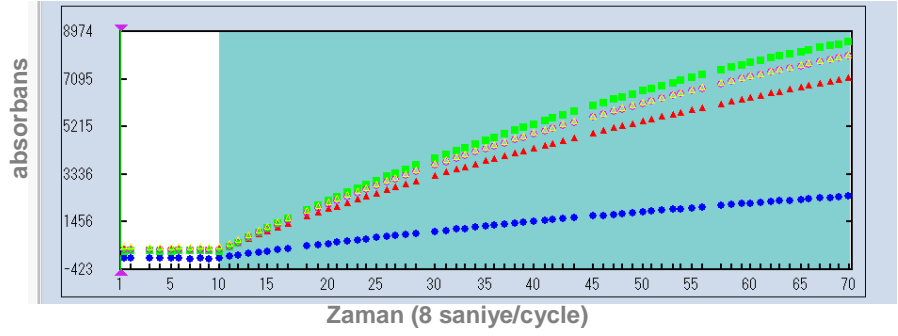
Şekil-27 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 10 μL)



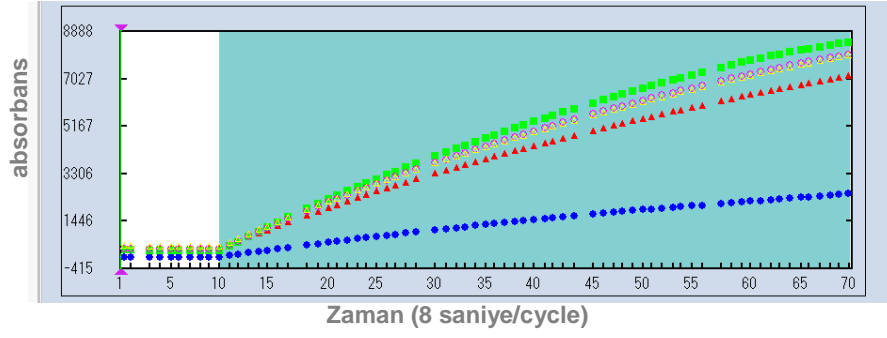
Şekil-28 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 20 μL)



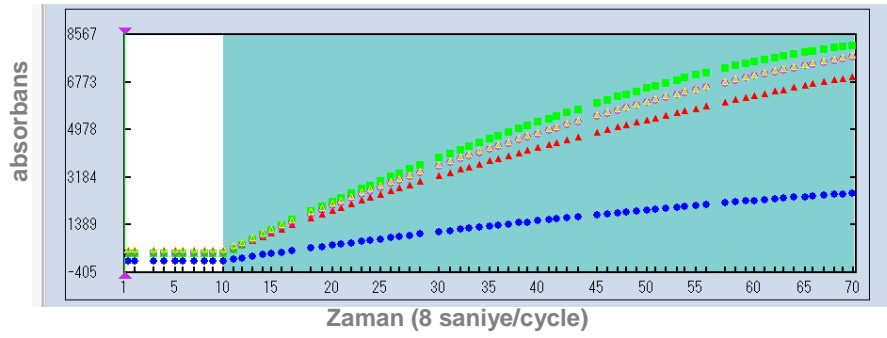
Şekil-29 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 30 μ L)



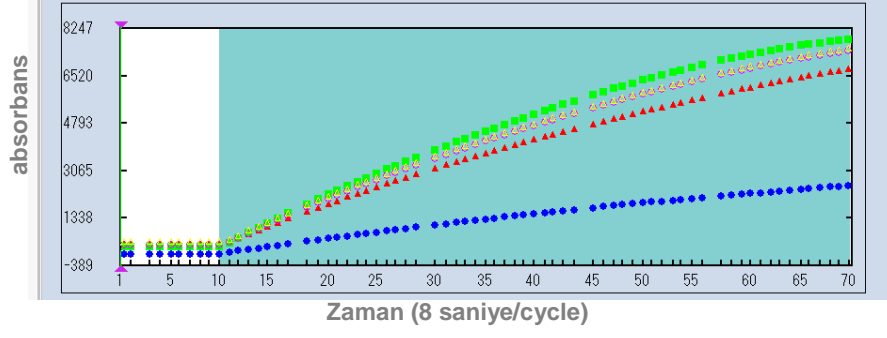
Şekil-30 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 40 μ L)



Şekil-31 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 50 µL)



Şekil-32 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 60 µL)



Şekil-33 farklı R2 hacimleriyle optimizasyon çalışması (R2 hacmi 70 μ L)

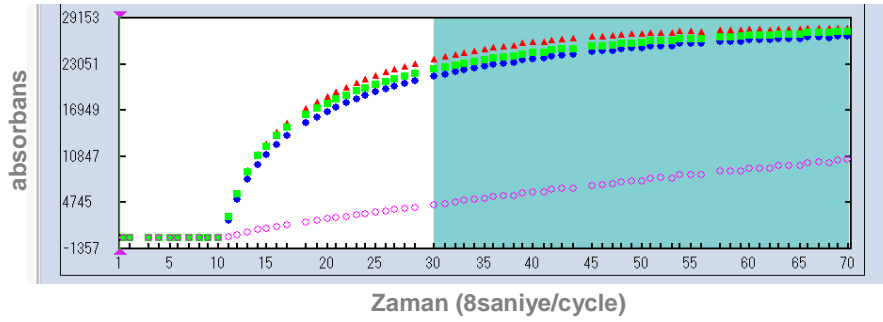
3.7. Kromazurol B Kullanılan Deneysel Ferroksidaz Ölçüm Yöntemi Bulguları:

Bu yeni yöntem denemesi, bilinen ferrik demir kromojenlerinden biri olan kromazurol B (Mordant Mavisi) kimyasalını kullanarak gerçekleştirilmiştir.

Örnek(μL)	R1(μL)	R1 dilüent(μL)	R2(μL)	R1 dilüent(μL)
3,5	30	150	5	-

Tablo-11 kromazurol B kullanılan deneysel ferroksidaz ölçüm aplikasyonu

Ana dalga boyu: 660 nm / yan dalga boyu: 800 nm olacak şekilde kinetik okuma yapılır.



Şekil-34 Kromazurol B kullanılan deneysel ferroksidaz ölçümü kinetik grafiği

3.8. Bakır ile seruloplazmin aktivitesi/düzeyleri arasındaki karşılaştırma bulguları:

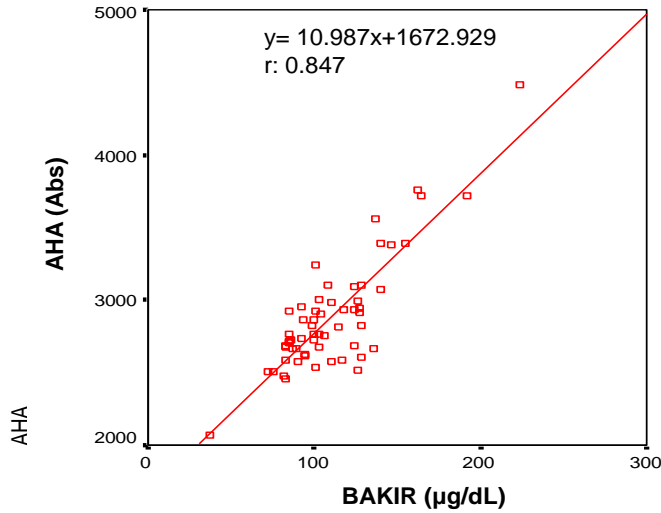
KORELASYON

	BAKIR	AHA
BAKIR	Pearson korelasyon	,847**
	Anlam derecesi	,000
	N	59
AHA	Pearson korelasyon	,847**
	Anlam derecesi	,000
	N	76

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

AHA: Asetohidroksamik asit

Tablo-12 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)



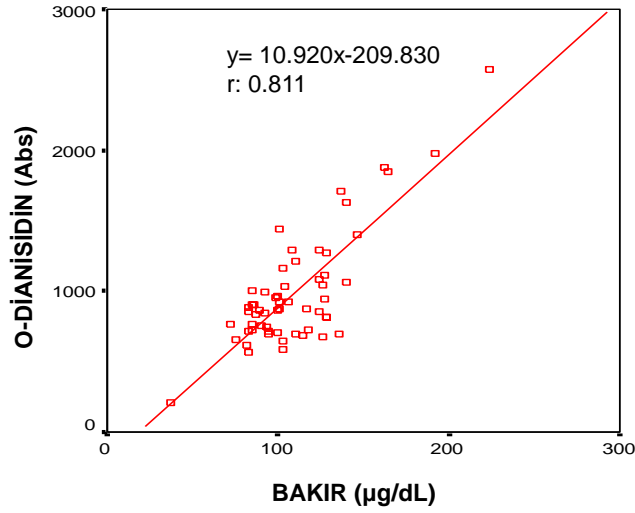
Şekil-35 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)

KORELASYON

	BAKIR	O-DİANİSİDİN
BAKIR	Pearson korelasyon	,811**
	Anlam derecesi	,000
	N	58
O-DİANİSİDİN	Pearson korelasyon	,811**
	Anlam derecesi	,000
	N	58

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

Tablo-13 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (O-dianisidin kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)



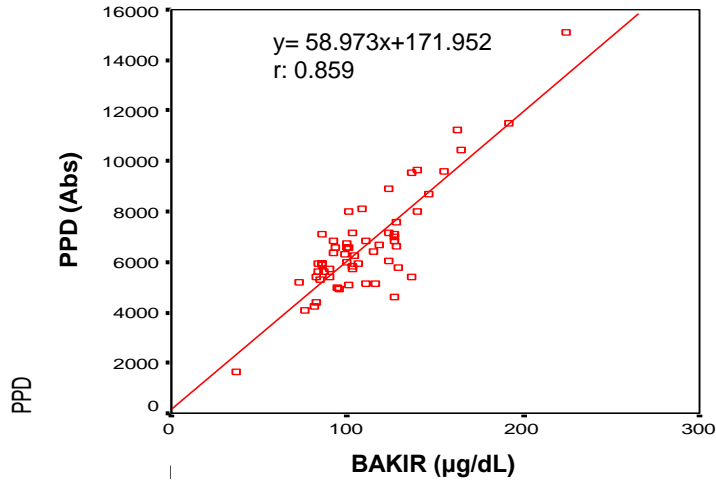
Şekil-36 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (O-dianisidin kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)

KORELASYON

	BAKIR	PPD
Pearson korelasyon	1	,859**
BAKIR Anlam derecesi	.	,000
N	59	59
Pearson korelasyon	,859**	1
PPD Anlam derecesi	,000	.
N	59	76

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

Tablo-14 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (PPD kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)



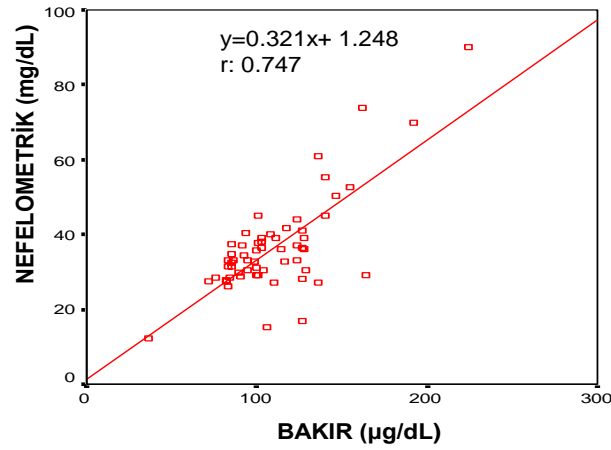
Şekil-37 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (PPD kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemi)

KORELASYON

	BAKIR	NEFELOMETRİK
BAKIR	Pearson korelasyon	,747**
	Anlam derecesi	,000
	N	59
NEFELOMETRİK	Pearson korelasyon	,747**
	Anlam derecesi	,000
	N	73

** Korelasyon 0.01 düzeyinde anlamlı

Tablo-15 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon verileri (Nefelometrik seruloplazmin ölçüm yöntemi)



Şekil-38 Bakır ve seruloplazmin/ferroksidaz aktivite düzeylerinin korelasyon grafikleri (Nefelometrik seruloplazmin ölçüm yöntemi)

KORELASYON

	BAKIR	AHA	O-DİANİSİDİN	PPD	NEFELOMETRİK
Pearson Korelasyon	1	0.847**	0.811**	0.859**	0.747**
BAKIR Anlam Derecesi		0.001	0.001	0.001	0.001
N	59	59	58	59	59

** . Korelasyon 0.01 Düzeyinde Anlamlı

AHA : Asetohidroksamik asit
PPD: P-fenilendiamin

Tablo-16 Bakır miktarları ve ferrokسيدaz/seruloplazmin ölçüm yöntemleri ile elde edilen seruloplazmin düzeyleri arasındaki korelasyon verileri

İnhibisyon:

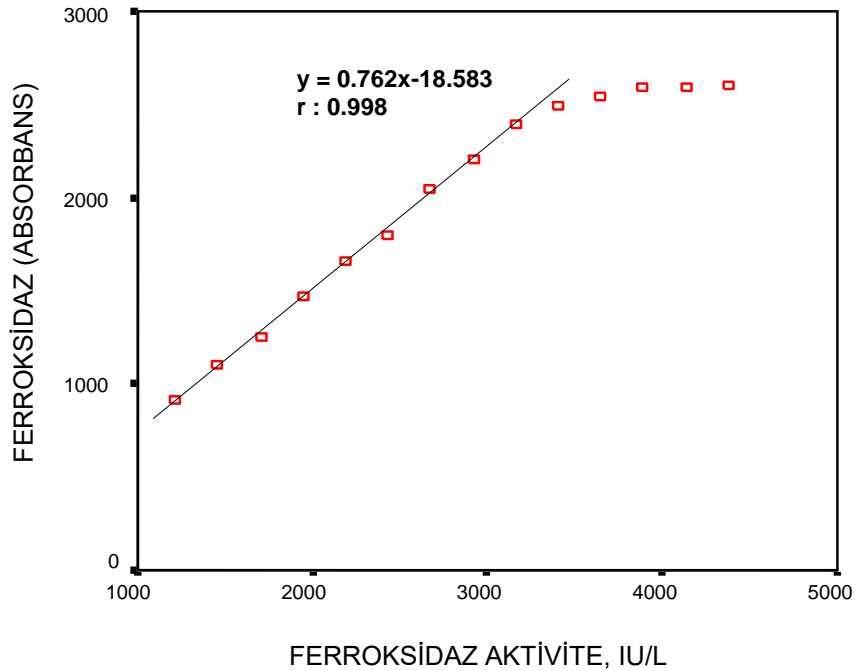
Heparinli kan örnekleri ölçüm yöntemimiz üzerinde inhibisyon yapmazken, sitratlı kan örnekleri inhibisyon yapabilmektedir.

Sodyum azid, serüloplazmin içeren örneklerinin ferroksidaz aktivitelerini tam olarak inhibe eden bir kimyasaldır ve serum ferroksidaz aktivitesini % 95 – 99 oranında inhibe etmiştir.

Bu metod hemolizli, ikterik ve lipemik örneklerin oluşturduğu interferanslardan etkilenmemektedir.

linearite (doğrusallık) :

linearitenin üst sınırı 3213 U/L olarak ölçülmüştür. Regresyon analizinde r değeri 0,998, eğim (slop) 0,762 olarak bulunmuştur.



Şekil-39 Kromojen/şelatör olarak AHA kullanılan ferroksidaz ölçüm yöntemimizin linearite grafiği

Saptama sınırı (detection limit):

Metodun saptama sınırı, sıfır kalibratör (deiyonize su) 10 kez ölçülerek belirlendi. Sonuçlar; ortalama \pm standart sapma şeklinde; 1215 ± 13 IU/L olarak bulunmuştur.

Tekrarlanabilirlik / kesinlik (presizyon) ve saklama:

Gün-içi ve günler-arası kesinlik, düşük, orta ve yüksek ferroksidaz aktivitesine sahip serumlar için aşağıdaki tabloda hesaplanmıştır. Serum ferroksidaz aktiviteleri 4 °C de 1 hafta ve - 20 °C de 1 ay etkilenmeden saklanabilir.

Serum Ferroksidaz Aktivitesinin Gün-İçi Ve Günler-Arası Kesinlik Ölçümleri			
Aktivite, IU/L			
		Ortalama	Standart sapma
Gün-içi ölçümler			
Yüksek	30	2747	23
Orta	30	2079	8
Düşük	30	1633	6
Günler-arası ölçümler			
Yüksek	30	2803	18
Orta	30	2011	5
Düşük	30	1613	4

Tablo-17 Serum Ferroksidaz Aktivitesinin Gün-İçi Ve Günler-Arası Kesinlik Ölçümleri

Geri kazanım (recovery) :

Yüzde geri kazanım aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır:

$$\% \text{ Geri kazanım} = (\text{geri kazanılmış miktar}) / (\text{eklenmiş miktar}) \times 100$$

Burada eklenmiş miktar, örnek içerisindeki bilinen seruloplazmin miktarıdır.
Geri kazanım/verim(recovery) %101 (Aralık 96,1–105,4 %) olarak elde edilmiştir.



4.TARTIŞMA

Reaktif içerisindeki ferröz demir (Fe^{+2}) bekledikçe, kendiliğinden oksidasyona uğrayarak ferrik demir (Fe^{+3}) formuna dönüşmektedir. Bu durum, enzimin reaksiyon ortamında gerçekleştirdiği oksidasyona ek olarak, tamponun etkisi ve reaktifin hava ile temasından kaynaklanan spontan bir ferröz demir oksidasyonunun da gerçekleştiği anlamına gelmektedir. Bununla ilişkili olarak elde ettiğimiz sonuçlar yalancı pozitif sonuçlardır. Bunu engellemek için, ferröz demir bulunan reaktifin içerisine, demirin oksidasyona uğramadan Fe^{+2} iyonu halinde durabilmesi için bir redüksiyon ajanı ilave edilmiştir. Eklenen bu redüktantın kimyasal karakteri önemlidir; kullanacağımız redüktant eğer kuvvetli bir redüksiyon ajanı ise seruloplazminin ferroksidaz aktivitesi ile yaptığı Fe^{+2} (ferröz demir) den Fe^{+3} (ferrik demir) oksidasyonu ile oluşan ferrik demir (Fe^{+3}), ortamdaki kuvvetli redüktantın etkisiyle tekrar ferröz demir formuna dönüşecek ve Fe^{+3} 'e spesifik kromojen olan asetohidroksamik asit ile bağlanamayacak ve ölçüm için gerekli kinetik reaksiyonu elde edemeyeceğiz. Bu sorunu bertaraf etmek için indirgeme özelliğinin zayıf olduğunu bildiğimiz bir redüksiyon ajanı olan ditiyotritol (DTT) kullandık.

Yöntemimizde, kimyasalların uygun miktarlarının belirlenmesinin ardından (Şekil-16, Şekil-17) reaksiyon ortamında bulunması gereken reaktif ve örnek hacimlerinin optimizasyonu gerçekleştirilmiştir.

İlk adım olarak, kullanılacak örnek hacimleri 3,5 μ L /5 μ L /6,5 μ L /10 μ L olacak şekilde farklı hacimlerde çalışılmıştır. Şekil-18, Şekil-19, Şekil-20 ve Şekil-21 de görülen grafikler belirtildiği gibi artan serum hacimleri şeklinde oluşturulmuştur. Serum hacmi arttırıldıkça, artan ferroksidaz enzimi ile ortamdaki ferröz demir hızla reaksiyona girerek, linearitenin bozulmasına sebep olmakla birlikte, 3,5 μ L örnek hacmi kullanılan grafikte (Şekil-18) linearitenin düzgün olması ve örnekler arasındaki diskriminasyonun uygun olması dikkat çekicidir. Bu grafikler göz önünde bulundurularak, alınması gereken en uygun örnek hacminin 3,5 μ L olması gerektiği sonucuna ulaşılmıştır.

İkinci adım olarak, birinci reaktif (reaktif 1; R1) hacminin optimizasyonu işlemi gerçekleştirildi. Bu aşamada, 180 µL olarak belirlenen R1 hacmi ile, tam bir linearite ve diskriminasyon sağlanamadığı için, R1'e aşamalı olarak dilüsyon uygulandı. Şekil-22, Şekil-23, Şekil-24, Şekil-25 ve Şekil-26 grafiklerinde de görüldüğü gibi linearitenin düzgün olması ve serumlar arasındaki diskriminasyonun tam anlamıyla görülmesi açısından en uygun verinin Şekil-23'te elde edilen kinetik grafikte olduğu bulunmuştur. Şekil-23'te kullanılan R1/R1 Dilüent hacmi: 120 µL /60 µL'dir.

Üçüncü ve son adım, ikinci reaktif hacminin optimum seviyelere getirilmesidir. Bu çalışmada R2 hacimleri 10 µL, 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL, 60 µL ve 70 µL olacak şekilde çalışılarak sırasıyla Şekil-27, Şekil-28, Şekil-29, Şekil-30, Şekil-31, Şekil-32 ve Şekil-33 grafikleri elde edilmiştir. Artan R2 hacimlerinin kullanıldığı bu çalışmada; 10 µL R2 hacmi kullanılan Şekil-27'deki kinetik grafikte, ikinci reaktif içerisindeki asetohidroksamik asitin yetersiz kaldığı, ferrokسيداز enzimi ile oluşan ürünün (ferrik demir) miktarı yetersiz olan asetohidroksamik asit ile hızla tükendiği gözlemekteyiz. 20 µL, 30 µL, 40 µL, 50 µL, 60 µL ve 70 µL hacimlerde R2 kullanılan ölçümlerde asetohidroksamik miktarı yeterli olmak ile birlikte en uygun linearite ve diskriminasyon verilerini, 40 µL R2 hacmi kullandığımız, şekil-30'daki kinetik eğride elde etmiş bulunmaktayız.

Seruloplazmin proteininin sahip olduğu enzimatik karakterden yararlanarak, spektrofotometrik ferrokسيداز aktivitesini ölçmenin, seruloplazmin miktar ölçümünün gerçekleştirildiği nefelometrik yöntemden göreceli üstünlükleri bulunmaktadır. Ferrokسيداز aktivitesi ölçümünde, seruloplazminin miktarından ziyade aktivitesi ve etkinliği, dolayısıyla enzimin iş yapabilirligi hakkında kantitatif veri elde ederken, nefelometrik seruloplazmin ölçümü ile sadece seruloplazmin proteininin miktarını belirleyebiliriz. Seruloplazminin "enzimatik aktivitesinin" ölçülmesinin, "miktarının" ölçülmesine göre daha üstün olduğunu; Asetohidroksamik asit kullanılan enzimatik ölçüm yöntemimiz ile ferrokسيداز enziminin ölçümünde referans olarak kabul edilen o-dianisidin ve p-fenilendiamin yöntemleriyle karşılaştırarak ve seruloplazminin "miktar tayininin" yapıldığı referans bir yöntem olan nefelometrik methodla karşılaştırarak

gözlemekteyiz. Asetohidroksamik asit kullandığımız enzimatik yöntemimiz ile o-dianisidin ve p-fenilendiamin kullanılan enzimatik referans yöntemler karşılaştırıldığında Tablo-5 ve Tablo-6 verilerinde de gözlenebileceği gibi yüksek bir ilişki bulunmuştur. (sırasıyla; $r: 0,981$, $p: 0,001$ ve $r: 0,988$, $p:0,001$). Bu yüksek ilişki şekil-13 ve şekil-14 grafiklerinde de şematik olarak görüldüğü gibi tamamen lineerdir. Buna ek olarak enzimatik yöntemimiz ile miktar tayinine dayanan referans nefelometrik seruloplazmin metodunu karşılaştırdığımızda (Tablo-7) korelasyon ilişkisi $r: 0,861$, $p: 0,001$ olarak bulunmuştur. Enzimatik yöntemler arasındaki korelasyon verilerine göre daha düşük olan bu korelasyon değerinin, enzimatik yöntemlerin üstünlüğünden kaynaklandığını öngörmekteyiz. Bu üstünlük, yöntemimiz ile nefelometrik yöntemin karşılaştırıldığı şekil-15'te açıkça görülmektedir. Şekil-15'te 16, 40, 45 ve 53 numaralı serum örnekleri linearitenin dışında kalmıştır. 16, 40 ve 53 numaralı numunelerdeki seruloplazmin miktarı göreceli olarak düşüktür fakat aktivitesi yüksektir. Ayrıca 16 numaralı numunedeki seruloplazmin miktarı ise göreceli olarak yüksek olmasına rağmen aslında aktivitesi düşüktür. Bu grafikten anlaşılıyor ki; sözü geçen numunelerdeki nefelometrik ölçüme dayanan seruloplazmin miktarları, seruloplazminin aktivitesini doğru gösterememekte ve miktarı nispeten düşük olan ama yeteri kadar aktiviteye sahip olan seruloplazmin numuneleri ile miktarı nispeten yüksek olan ama aktivitesi yeteri kadar olmayan numuneleri belirleyememektedir.

Tablo-10' da bütün seruloplazmin/ferroksidaz ölçüm yöntemlerinin toplu olarak birbirleriyle olan korelasyon verileri karşılaştırılmıştır. Enzimatik ölçüm yöntemimizi karşılaştırdığımız ve çok yüksek korelasyon değerleri bulduğumuz referans yöntemlerin, kendi aralarındaki yüksek ilişki de, yöntemimizin doğruluğunu ve güvenilirliğini bir kat daha arttırmaktadır. Buna ek olarak; yöntemimiz ile diğer enzimatik referans yöntemlerin (o-dianisidin ve p-fenilendiamin), miktar ölçümüne dayanan nefelomotrik yöntemle olan korelasyon düzeylerinin çok yakın olması, enzimatik yöntemlerin, miktar ölçümüne dayanan yöntemlerden daha efektif olduğunu destekler niteliktedir.

Demir miktarını belirlemek amacıyla kromojen özelliğinde olan çeşitli şelatörler bulunmaktadır. ferrozin, ferene, norfloksasin, ksilenol oranj, kromazurol B ve asetohidroksamik asit bunlardan bir kaç tanesidir. ferrozin ve ferene, ferröz demir ile şelasyon oluşturan kromojenler olduğu için yöntemimizde kullanılmaya uygun değildir. Asetohidroksamik asit ise mevcut yöntemimizin temelini oluşturmaktadır. Norfloksasin ve ksilenol oranj yeni bir yöntem geliştirmek için değerlendirilebilecek potansiyele sahip olmakla birlikte kromazurol B tarafımızdan denenmiştir.

Yeni bir yöntem geliştirmek amacıyla, kromojen olarak kromazurol B kullanılarak gerçekleştirilen ferrokسيداز tayin yönteminde, optimum şartlar sağlanmasına rağmen istenilen ölçüm gerçekleştirilememiştir. Şekil-34'te gözlenen grafikten anlaşılabilceği gibi, ferrokسيداز enziminin kinetik olarak ölçümünün yapılabilmesi için gerekli olan linearite sağlanamamıştır. Bunun nedenini; ferrokسيداز enziminin ürün olarak açığa çıkarttığı ferrik demir iyonları ile kromazurol B kromojeninin reaksiyona girme hızlarının çok yavaş gerçekleşmesinden kaynaklandığını öngörmekteyiz. İstenilen ölçümün gerçekleştirilememesinin bir başka sebebi de, yine Şekil-34'de gözlendiği gibi, düzeyleri referans yöntemlerle belirlenen üç farklı ferrokسيداز aktivitesine sahip numunenin diskriminasyonunun sağlanamamış olmasıdır.

Bakır miktarı ve farklı metotlarla ölçülen seruloplazmin düzeylerini karşılaştırdığımız; tablo-10, şekil-35, tablo-11, şekil-36, tablo-12, şekil-37, tablo-13 ve şekil-38 verilerinde beklendiği gibi anlamlı ve lineer ilişkiler gözlenmiştir. Bakır düzeyiyle, asetohidroksamik asit kullandığımız kendi yöntemimiz arasında güçlü ve lineer bir ilişki ($r: 0.847$ $p: 0.001$) bulunmuştur. Referans olarak kullanılan, diğer enzimatik ölçüm yöntemleri olan; o-diansidin ve p-fenilendiamin kullanılan yöntemler ile bakır arasında da güçlü ve lineer korelasyonlar (sırasıyla $r: 0.811$ $p:0.001$ ve $r: 0.859$ $p:0.001$) gözlenmiştir. Bunun yanı sıra nefelometrik olarak seruloplazmin "miktarının" ölçüldüğü yöntem ile bakır arasında, göreceli olarak daha düşük fakat anlamlı korelasyon ($r:0.747$ $p:0.001$) elde edilmiştir.

Seruloplazminin ferrokسيداز aktivitesinden yararlanarak gerçekleştirilen -kendi yöntemimizin de dahil olduğu- enzimatik ölçümler ile bakır arasındaki korelasyonun,

nefelometrik miktar tayinine dayanan seruloplazmin ile bakır arasındaki korelasyondan daha yüksek çıkmasının sebebini; bazı hastalarda seruloplazminin taşıdığı bakır miktarının, normalde bulunması gerekenden daha az olmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.



5.SONUÇLAR

Yöntem geliştirmeye yönelik; Referans yöntemlerle karşılaştırma, inhibisyon, linearite, saptama sınırı, tekrarlanabilirlik / kesinlik, saklama ve geri kazanım gibi tüm basamakların kontrol edildiği, bu yeni seruloplazmin ölçüm yöntemi, klasik nefelometrik seruloplazmin ölçümünden daha değerli veriler sağlamaktadır.

Geliştirilen yeni, kinetik seruloplazmin/ferroksidaz ölçüm yöntemi; seruloplazminin miktarı hakkında fikir oluşturmasının yanında, asıl olarak fonksiyonel seruloplazmin aktivitesini de ölçebilmesinden dolayı, hastalığa yaklaşımı, tanı konulmasını ve klinik karar verme aşamasını doğrudan etkilemektedir. Sadece miktar tayininin yapılabildiği yöntemler bu konuda yarar sağlayamamaktadır. Bu durum geliştirilen bu yöntem için önemli bir ayrıcalıktır. Ferroksidaz aktivitesinin klinik karar vermedeki üstünlüğü; normal referans aralığı içerisinde bulunan, fakat ferroksidaz aktivitesi bakımından fonksiyonel olmayan seruloplazmine sahip bireylerin ve ferroksidaz aktivitesi bakımından fonksiyonel olan fakat bu fonksiyonelliği karşılayacak yeterli düzeyde seruloplazmini olmayan bireylerin ayırıcı tanısını ortaya koymasındadır.

Seruloplazminin ferroksidaz aktivitesinden yararlanarak gerçekleştirilen kinetik, kolorimetrik ölçüm yöntemi, miktar tayininin yapıldığı yöntemlerden çok daha düşük maliyetlerde yapılmaktadır. Ayrıca, antijen-antikor reaksiyonları oluşturularak miktar tayininin gerçekleştirildiği bahsedilen yöntemlere kıyasla, hazırlanabilirliği ve uygulanabilirliği daha basittir. Bu nedenle gerek araştırma çalışmalarında gerekse rutin uygulamalarda, laboratuvar ortamlarında hızlı bir şekilde elde edilebilecek bir yöntemdir.

Günümüzde, nefelometrik ve immünotürbidimetrik gibi miktar tayinine dayanan seruloplazmin istemleri hala popüleritesini korumakla beraber, ilerleyen dönemlerde, ferroksidaz enziminin avantajlarının daha fazla kabul göreceğini öngörmekteyiz.

6.KAYNAKLAR

- 1.Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler 5. Baskı, 332
- 2.Vinayak Gaware, Kiran Kotade, Kiran Dhamak, Sachin Somawanshi, Ceruloplasmin Its Role And Significance: A Review, Ijbr 1 [4] [2010]153–162
- 3.Harper Biyokimya 25. Baskı,743-744
- 4.http://www.annualreviews.org/na101/home/literatum/publisher/ar/journals/content/nut/2002/nutr.2002.22.issue1/annurev.nutr.22.012502.114457/production/images/medium/nu22_0439_1.gif
- 5.Özcan Erel, Automated measurement of serum ferroxidase activity, Clinical Chemistry 1998 Nov;44(11):2313–9
- 6.<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/p6001?lang=en®ion=TR>
- 7.<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d9143?lang=en®ion=TR>
- 8.Gitlin JD. Transcriptional regulation of ceruloplasmin gene expression during inflammation. J.Biol. Chem. (1988) 263,6281- 6287
- 9.Nina Konstantinivna R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, oncology and Radiobiology NAS of Ukraine-50 th. Anniversary. Preface. Medline. Exp. Oncol. 2010;32(3):118-9
- 10.Osaki S, Johnson DA. and Frieden E. The possible significance of the ferrous oxidase activity of Ceruloplasmin in normal human serum. J. Biol. Chem. (1966) 241, 2746- 2751.
- 11.Floris G, Medda R, Padiglia A, Musci G. The physiopathological significance of ceruloplasmin. A possible therapeutic approach. Biochem. Pharmacol. (2000) 60, 1735-41.

- 12.** Milne DB, Burtis CA, Ashwood ER Trace Elements. In: Environ Health Perspect; 102: 79-82 Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Philadelphia: WB Saunders; (1999) 1029 -1055.
- 13.** Gruys E, Oblowo MJ, Toussaint JM Diagnosis significance of major acute phase proteins in veterinary clinical chemistry: a review. Vet Bull, (1994) (64) 11. 1009–1015.
- 14.** Cha, M.K. and Kim, I.H. Biochemistry, (1999) 38, 12104 – 12110.
- 15.** Park, Y.S., Suzuki, K., Taniguchi, N. and Gutteridge, J.M.C. F.E.B.S. Lett., (1999) 458, 13-136
- 16.** Mukhopadhyay, C.K., Mazumder, B., Lindley, P. and Fox, PL. Proc. Natl. Acad. Sci., USA (1997) 94, 11546-11551.
- 17.** Akaike, T. Free Radic. Res., (2000) 33, 461 – 469.
- 18.** Musci, G., Di Marco, S., Bonaccorsi di Patti, M.C. and Calabrese, L. Biochemistry, (1991) 30, 9866 – 9872.
- 19.** Fox PL, Mazumder B, Ehrenwald E, Mukhopadhyay CK Ceruloplasmin and cardiovascular disease. Free Rad. Biol. & Med. (2000) 28, 1735- 44.
- 20.** Harris et al, American Journal of Clinical Nutrition 67:972S-977S.
- 21.** Lindley, P., Card, G., Zaitseva, I., Zeitsev, V., Reinhammer, B., Selin-Lindgren, E. et. al. J. Biol. Inorg. Chem., (1997) 2, 454 – 463.
- 22.** Scheinberg IH, Steinlieb, Ceruloplasmin; in Wilson Disease, Lloyd, H. and Smith, Jr. (eds.), (1984) pp. 1- 171, W. B. Saunders Co, Philadelphia, USA.
- 23.** Danks DM. Disorders of copper transport; in The Metabolic Basis of Inherited Disease, Scriver CR, Beaudet, AL, Sly WS and Vale D (eds.), (1989) pp. 1411- 1431, McGraw Hill, New York, USA

- 24.**Cunningham J, Leffell M, Mearkle P, Harmatz P) Elevated plasma ceruloplasmin in insulindependent diabetes mellitus: evidence for increased oxidative stress as a variable complication. *Metabolism* (1995) 44, 996–999.
- 25.**Xu X, Pin S., Gathinji M., Haris ZL. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Ann N. Y. Acad Sci.*(2004) Mar; 1012: 299- 305
- 26.**Miyajima H, Kono S, Takahashi Y, Sugimoto M. Increased lipid peroxidation and mitochondrial dysfunction in aceruloplasminemia brains. *Blood cells Mol Dis.* Nov (2002); 29 (3): 433- 8.
- 27.**Patel BN, Dunn RJ, Jeong SY, Zhu Q, Julien JP and David S. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *J. Neurosci.* (2002) 22: 6578–6586
- 28.**Bharatkumar N., Robert J. Dunn, Suh Young Jeong, J. Pierre Julien. Ceruloplasmin regulates iron levels in the CNS and prevents free radical injury. *The Journal of Neuroscience*, Aug 1, 2002, 22(1)
- 29.**Fox PL, Mukhopadhyay C, Ehrenwald E Structure, oxidant activity and cardiovascular mechanisms of human ceruloplasmin. *Life Sci.* (1995) 56 (21), 1749-58.
- 30.**Lamb DJ, Leake DS. Acidic pH enables ceruloplasmin to catalyse the modification of lowdensity lipoprotein. *FEBS (1994). Letters* 338, 122- 6.
- 31.**Daimon M, Susa S, Yamatani K, et al Hyperglycemia is a factor for an increase in serum ceruloplasmin in type 2 diabetes. *Diabetes Care* (1998), 21: 1525-1528.
- 32.**Danks DM. Copper and liver disease. *Eur J Pediatr;* (1991), 150: 142- 8

- 33.**Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler 5. BASKI, 571–573
- 34.**Britton RS. Metal induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*; (1996) 16: 3- 12.
- 35.**Gaetke LM, Chow CK. Copper toxicity, oxidative stres and antioxidant nutrients. *Toxicology*; (2003) 189: 147- 163
- 36.**Pierre-Marie Sarradin, Nadine Le Bris, Christian Le Gall, Philippe Rodier, Fe analysis by the ferrozine method: Adaptation to FIA towards in situ analysis in hydrothermal environment, *Talanta* 2005 Jun 15;66(5):1131–8
- 37.**Laurence Pieroni, Lina Khalil, Frederic Charlotte, Thierry Poynard, Annie Piton, Bernard Hainque, and Franc Eoise Imbert-Bismut, Comparison of Bathophenanthroline Sulfonate and Ferene as Chromogens in Colorimetric Measurement of Low Hepatic Iron Concentration, *Clin. Chem.* 2001 Nov;47(11):2059–61.
- 38.**Mohamed Gaber, Abdalla M. Khedr, Ahmed S. El-Kady, Spectrophotometric determination of norfloxacin in pure and dosage forms by complexation with Fe(III) and Cu(II) ions, *International Research Journal of Pharmacy and Pharmacology* (ISSN 2251-0176) Vol. 2(5) pp. 97–102, May 2012
- 39.**Gay C, Collins J, Gebicki JM, Determination of iron in solutions with the ferric-xyleneol orange complex, *Anal Biochem.* 1999 Sep 10;273(2):143–8.
- 40.**Ihara K, Hasegawa S, Naito K. Collection of iron(III) from homogeneous aqueous solutions on membrane filters using Chromazurol B with Triton X-100 *Anal Sci.* 2003 Feb;19(2):265-8.
- 41.**Shazia Nisar, S. Arif Kazmi, Kinetics of the reduction of Fe(III) Acetohydroxamic acid Complex by L-Cysteine, *j.App. Em. sc:* 1 (3) 158–163 April 2006
- 42.**Han, J. C. & Han, G. Y.(1994) *Anal. Biochem.* 220, 5–10; *Preview*(1999) volume 2, issue 4, page 16, technical publication by Pierce Chemical Co.

- 43.**Wolf PL. Ceruloplasmin: methods and clinical use. *Crit RevClin Lab Sci* 1982;17:229-245.
- 44.**Pesce MA, Bodourian SH. Nephelometric measurement of ceruloplasmin with a centrifugal analyzer. *Clin Chem.* 1982 Mar;28(3):516-9.
- 45.**Jose joaquin ceron, silvia martinez-subiola an automated spectrophotometric method for measuring canine ceruloplasmin in seum. *Vet. Res.* 2004 Nov-Dec;35(6):671-9
- 46.**Linder, M. C., Moor, J. R. and Wright, K. (1981) Ceruloplasmin assays in diagnosis and treatment of human lung, breast and gastrointestinal cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 67, 263–275
- 47.**Montaser, A., Tetreault, C. and Linder, M. C. (1992) Comparison of copper bindingproteins in dog serum with those in other species. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 200,321–329
- 48.**Gray LW, Kidane TZ, Nguyen A, Akagi S, Petrasek K, Chu YL, Cabrera A, Kantardjieff K, Mason AZ, Linder MC, Copper proteins and ferroxidases in human plasma and that of wild-type and ceruloplasmin knockout mice. *Biochem J.* 2009 Apr 1;419(1):237–45

