

Köpeklerde Soğanın (*Allium cepa*) Bazı Hematolojik ve Biyokimyasal Parametreler Üzerine Etkisi

Zahid T. AĞAOĞLU¹ Ali ERTEKİN²

Mecit YÖRÜK³ Burhanettin BAYDAŞ⁴ Ebubekir CEYLAN¹

¹ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı - VAN

² Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı - VAN

³ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı - VAN

⁴ Yüzüncü Yıl Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı - VAN

ÖZET

Bu çalışmada, köpeklerde soğanın bazı hematolojik ve biyokimyasal parametreler ile Heinz cisimciklerinin oluşumu üzerine etkisi irdelendi. Araştırmada 8-19 kg canlı ağırlıkta, 1-3 yaşında, sağlıklı 12 adet köpek kullanıldı. Hayvanlar deneme ve kontrol grubu olmak üzere iki eşit gruba ayrıldı. Deneme grubu köpeklere, 24 saatlik bir açlık periyodundan sonra kıyılmış soğanın (300 g/kg) suda 15 dk kaynatılmış-soğutulmuş ekstraktından 500 ml verildi. Uygulamanın 2,4,8,12 ve 24. saatlerinde normal, heparinli ve EDTA'lı tüplere kan alındı. Yapılan analizlerde deneme grubu Hb, PCV ve RBC miktarlarında kontrol grubuna göre bir düşüş saptanmasına karşın bu fark istatistiki olarak önemli bulunmadı ($p>0.05$). G-6-PD aktivitesinde kontrol grubuna göre en fazla düşüş 8. saatte saptandı. Bu değer istatistiki olarak $p<0.001$ düzeyinde anlamlı bulundu. Uygulamanın 8. saatinde Heinz cisimciklerinin şekillendiği saptandı. SA ve LSA düzeylerinde denemenin 2. saatinden itibaren bir yükselme olduğu, 8. saatte en yüksek düzeye ulaştığı ve 24. saatte ise kısmen düştüğü gözlemlendi. Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında istatistiki olarak önemli bulundu ($p<0.001$). ALT ve ALP düzeylerinde ise herhangi bir değişiklik saptanmadı. Araştırmada elde edilen bulgulara göre, soğandaki n-propil disülfitten kaynaklanan lipid peroksidasyonuna ve eritrositlerdeki deformasyona bağlı olarak SA ve LSA düzeylerinin arttığı, G-6-PD ile Heinz cisimcikleri arasında negatif bir korelasyonun var olduğu söylenebilir.

Anahtar Kelimeler: Köpek, Soğan, Heinz cisimcikleri, G-6-PD, SA, LSA

The Effect of Onion (*Allium cepa*) on Some Hematological and Biochemical Parameters in Dogs

SUMMARY

In this study, the effect of onion on some hematological and biochemical parameters and on the formation of Heinz bodies was investigated in dogs. Healthy 12 dogs (8-19 kg body weight, 1-3 years old) were used in this study. Animals were divided into equal two groups as experimental (6 animals) and control (6 animals). The extract prepared from boiled onion (300 g/kg) was given at 500 ml to experimental group following 24 hours fasting. Blood samples were taken at 2,4,6,12 and 24th hours after giving the extract and put into three groups of tubes. First group were treated with heparin, second group with EDTA and third group left with no treatment. The levels of Hb, PCV and RBC were decreased in experimental group, as compared with control group, but this was statistically not significant ($p>0.05$). According to control groups, G-6-PD activity showed the most decrease at the 8th hours. This parameter was found important statistically ($p<0.001$). Formation of Heinz bodies was found at the 8th hours. The levels of SA and LSA were started to increase at the second hours, reached their highest level at the 8th hours and decreased gradually after the 24th hours. These parameters were found statistically important compared with control group ($p<0.001$). No changing were found in ALT and ALP levels. According to the findings in this study, It could be concluded that SA and LSA levels increase secondary to lipid peroxidation erythrocyte deformation caused by n-propyl disulphide in onion. From this investigation it could be suggested that there is a negative correlation between G-6-PD and Heinz body.

Key Words: Dog, Onion, Heinz body, G-6-PD, SA, LSA

GİRİŞ

Soğanın (*Allium cepa*), sığır, at, koyun, köpek ve kedi gibi evcil hayvanlarda hemolitik anemiye neden olduğu bildirilmektedir (7,15,17,30,25,16,33,14,21,20). Ayrıca pişirilmiş, kızartılmış, kurutulmuş ya da suyunun etkisinin çığ soğanla aynı olduğu bir çok araştırmacı tarafından ortaya konulmuştur (7,10,15,18,17,30). Soğan toksikasyonuna karşı en duyarlı hayvan sığır, orta derecede köpek ve at, en dayanıklı hayvanlar ise koyun ve keçilerdir (4,26).

Soğanın toksik etkisi yapısında bulunan oksidatif bir alkaloid olan n-propil disülfid'ten ileri gelmektedir (35,28).

Eritrositler, oksidatif kimyasal maddelerden ve hücre metabolizmasının normal oksidatif ürünlerinden kaynaklanan zararlı etkileri azaltmak için koruyucu bir mekanizmaya sahiptirler (22).

n-Propil disülfid, eritrositlerde bulunan Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz (G-6-DH) enzimini yıkımlar ve eritrosit membran lipidlerinin ve sülfidril gruplarının oksidasyonuna neden olur, böylece methemoglobin ve Heinz cisimcikleri oluşur (5, 29, 8, 13). Heinz cisimciklerini taşıyan eritrositler retikulo-endotelial sistem (RES) tarafından uzaklaştırılır ve bunun sonucunda da anemi ortaya çıkar (26,11).

Sialik asit (SA), pirüvik asitin mannozamin ile kondansasyon ürünü olan nöraminik asitten türeyen bir bileşikler ailesidir. (27,34). Organizmada glikoprotein, glikolipid, oligosakkarit ve polisakkaritlerin komponentlerine bağlı olarak ve az miktarda da serbest halde bulunur (9,32). İç membran sistemi bulunmayan eritrositlerde sialik asidin hepsi yüzeyde toplanmış olup, nöyraminidaz ile serbest hale gelebilir (1,6). Eritrosit membranından izole edilen glikoproteinlerin % 25-27.8 oranında sialik asit içerdikleri bilinmektedir (24, 23).

Bu çalışmada, soğanın köpeklerde bazı biyokimyasal (G-6-DH, ALP, SA, LSA) ve hematolojik (eritrosit, hemogloblin, hematokrit) parametreler ile eritrositlerde Heinz cisimciklerinin oluşması üzerine etkisinin irdelenmesi amaçlanmıştır.

MATERYAL VE METOT

Bu çalışmada, her iki cinsiyetten 8-19 kg canlı ağırlıkta, 1-3 yaşlı toplam 12 adet sağlıklı melez köpek kullanıldı. Köpekler Y.Y.Ü Veteriner Fakültesi İç Hastalıklar Anabilim Dalı bokslarında barındırıldı. Hayvanlar kontrol (6 köpek) ve deneme (6 köpek) olmak üzere iki eşit gruba ayrıldı.

Kontrol ve deneme gruplarındaki köpekler 21 günlük bir adaptasyon periyoduna tabi tutuldu. İç ve dış parazitlere karşı ivermectin (İvomec, Topkim), niclosamid (şeridif, DİF) ve phoxim (Sebasil, Bayer) uygulandı. Bu süre içinde hayvanlar türüne özgün gıdalarla beslendiler ve önlerinde sürekli içme suyu bulunduruldu.

24 saatlik bir açlık periyodundan sonra deneme grubuna kıyılmış soğanın (300 g/kg) suda 15 dakika kaynatılmış ve soğutulmuş ekstraktı, kontrol grubuna ise 500 ml içme suyu ora-gastrik sondayla içirildi.

Denemenin 2, 4, 8, 12 ve 24. saatlerinde her iki gruptaki köpekler klinik muayeneden geçirilerek beden ısısı, nabız ve solunum sayıları belirlendi. Aynı süreler içinde köpeklerden usulüne uygun bir şekilde normal, heparinli ve EDTA'lı tüplere kan örnekleri alındı.

Kan serumundaki G-6-PD enzim aktivitesi ticari kit'le (Randox) spektrofotometrik olarak, AST ve ALT enzimleri otoanalizör (Technicon RA-XT) ile, Sialik asit miktarı Sydow'un önerdiği metot ile (31), lipid-bağlı sialik asit miktarı ise spektrofotometrede (Perkin-Elmer Lambda 1A) kolometrik olarak ölçüldü (19).

Kanda eritrosit sayısı, hematokrit değeri ve hemogloblin miktarı kan sayım cihazıyla (Coulter MAXM) belirlendi.

Heinz cisimciklerini demonstre etmek amacıyla, sodyum klorit (%0.73'lük) içerisinde hazırlanan %1'lik kristal violet solüsyonundan 0.025 ml lam üzerine damlatılarak üzerine bir damla heparinize kan eklendi ve üzeri lamel ile hemen kapatıldı (36). Hazırlanan bu preparat 5 dakika bekletildikten sonra mikroskopta (Nikon Optiphot 2) incelenerek fotoğrafları çekildi.

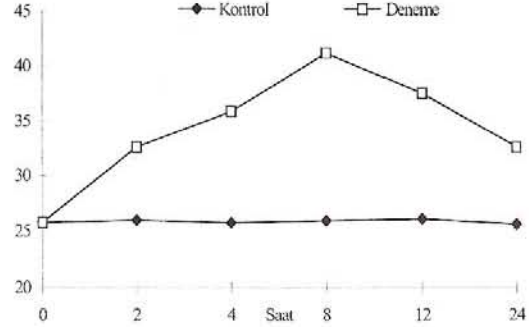
İstatistikî analizler Minitab (version 10.2) paket programı kullanılarak student's t-testi ile yapıldı.

BULGULAR

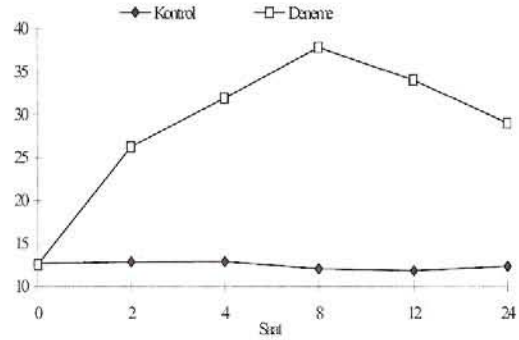
Bu çalışmada, adaptasyon periyodu süresince ve denemenin 2,4, 8, 12 ve 24. saatlerinde her iki gruptaki köpeklerin klinik olarak sağlıklı oldukları gözlemlendi. Beden ısısı, nabız ve solunum sayılarının normal fizyolojik sınırlar içinde olduğu

belirlendi. Örnekleme zamanlarında (2,4,8,12 ve 24. saatler) belirlenen hematolojik ve bazı biyokimyasal parametreler Tablo 1' de verilmiştir.

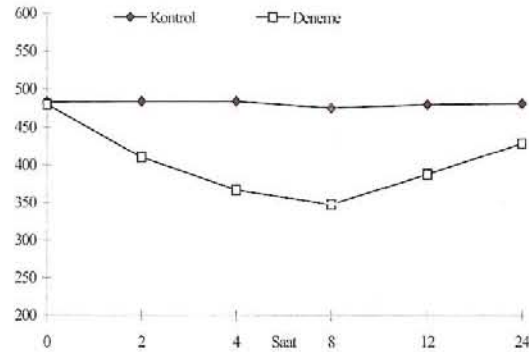
Eritrositlerde özellikle sitoplazmanın perifer kısımlarında pembemsi inklüzyonlar şeklinde gözlenen Heinz cisimciklerinin (şekil 4), denemenin 8. saatinde görülmeye başladığı, 12. saatte seyrekleştiği ve 24. saatte tamamen kaybolduğu saptandı.



Şekil 1. Kontrol ve deneme gruplarında sialik asit düzeyleri (mg/dl)



Şekil 2. Kontrol ve deneme gruplarında lipid bağlı sialik asit düzeyleri (mg/dl)

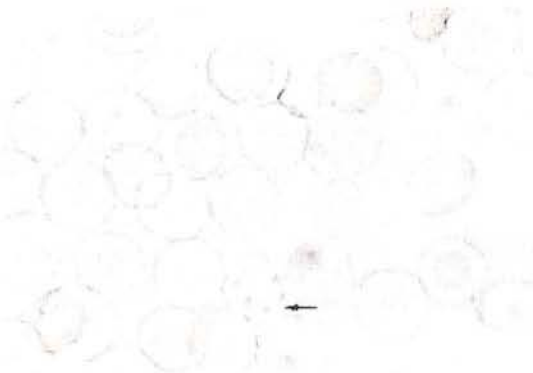


Şekil 3. Kontrol ve deneme gruplarında G-6-PD enzimi aktivitesi (U/L)

Tablo 1: Soğan ekstraktı verilen köpeklere kontrol ve deneme gruplarına ait bazı biyokimyasal ve hematolojik değerler: (n=6).

Biyokimyasal Parametreler	0.Saat		2. Saat		4. Saat		8. Saat		12.Saat		24. Saat	
	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx	Kontrol x ± Sx	Deneme x ± Sx
SA (mg/dl)	25.80±0.54	25.79±0.45	26.01 ± 0.37	32.62 ± 0.44 *	25.75 ± 0.60	35.89 ± 0.22 *	25.97 ± 0.45	41.19 ± 0.65 *	26.12 ± 0.75	37.55 ± 0.63 *	25.65 ± 0.77	32.64 ± 0.69 *
LSA (mg/dl)	12.70±0.47	12.57±0.50	12.89 ± 0.21	26.24 ± 0.37 *	12.92 ± 0.26	31.93 ± 0.28 *	12.10 ± 0.30	37.84 ± 0.47 *	11.87 ± 0.68	34.05 ± 0.20 *	12.35 ± 0.49	28.99 ± 0.45 *
G-6-PD (U/L)	483.58±10.71	480.25±11.80	484.17 ± 13.26	410.50 ± 12.70 *	484.50 ± 12.89	366.83 ± 9.91 *	475.75 ± 12.06	347.75 ± 10.87 *	480.15 ± 10.42	387.75 ± 10.87 *	481.08 ± 11.07	428.75 ± 12.98 *
ALT (U/L)	23.50±0.54	23.66±1.21	23.33 ± 0.81	24.17 ± 0.75	23.50 ± 0.70	23.66 ± 0.81	24.65 ± 0.42	25.16 ± 0.75	24.50 ± 0.54	24.66 ± 0.51	23.35 ± 0.73	24.16 ± 0.75
ALP (U/L)	78.98±0.74	79.23±0.41	79.43 ± 0.70	80.20 ± 0.75	80.47 ± 0.65	80.42 ± 1.15	78.95 ± 1.0	80.90 ± 0.97	78.10 ± 0.75	79.86 ± 0.68	78.95 ± 0.61	79.40 ± 0.73
RBC(10 ⁶ /mm ³)	6.94±0.45	6.79±0.50	6.92 ± 0.59	6.74 ± 0.45	6.91 ± 0.45	6.28 ± 0.33	6.92 ± 0.75	6.21 ± 0.51	6.91 ± 0.55	6.11 ± 0.38	6.90 ± 0.35	5.20 ± 0.74
Hb (g/dl)	15.29±1.28	14.85±1.01	15.47 ± 1.35	14.57 ± 0.22	15.10 ± 0.70	14.07 ± 0.49	14.95 ± 1.0	13.82 ± 0.29	14.78 ± 1.10	13.27 ± 0.58	14.48 ± 0.65	12.47 ± 0.55
PCV (%)	44.93±1.41	45.10±1.38	45.50 ± 1.63	44.80 ± 1.73	45.20 ± 1.10	42.40 ± 0.82	44.95 ± 0.95	40.92 ± 1.67	45.40 ± 1.0	39.08 ± 1.61	44.82 ± 1.40	36.46 ± 1.28

* p<0.001



Şekil 4. Eritrositlerde şekillenen Heinz cismicikleri (ok), kristal violet, X 1900.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada, deneme periyodunca yapılan klinik muayenelerde köpeklerin normal oldukları, beden ısısı, nabız ve solunum sayılarının fizyolojik sınırlar içinde olduğu belirlendi.

Soğan verilen köpeklerde eritrosit, hemoglobin ve hematokrit düzeylerinin önemli derecede düştüğü bir çok araştırıcı tarafından bildirilmiştir (7,10,16,17,25). Bu çalışmada, deneme grubunda (2,4,8,12 ve 24. saatler) belirlenen değerler kontrol grupları ile karşılaştırıldığında bir düşüşün olduğu gözlemlendi (tablo 1). Ancak, ortalama değerler normal fizyolojik sınırlar içerisinde olup istatistiki olarak önemli bir fark göstermemiştir ($p>0.05$). Bu durum muhtemelen soğanın tek doz uygulanmasıyla açıklanabilir.

Deneme grubu köpeklerde G-6-PD aktivitesi, uygulama öncesi (0. saat) 480.25 ± 11.80 U/L olarak belirlendi. Bu değer 2. saatte 410.50 ± 12.70 U/L'ye düştüğü, 8. saatte daha fazla düşerek 347.75 ± 10.87 U/L'ye geldiği, 24. saatte ise 428.75 ± 12.98 U/L'ye kadar çıktığı saptandı. Bu değerler kontrol grubu ile karşılaştırıldığında (şekil 3) aradaki farkın istatistiki olarak önemli bulunduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Bu durumu, bir çok araştırıcı (5,29,8,13) soğanda bulunan oksidatif bir madde olan n-propil disülfid eritrositlerdeki G-6-PD enzimini yıkımlamasına bağlamaktadır.

Literatürlerde Heinz cismiciklerinin oluşmasından metemoglobin sorumlu olduğu (3,11,12) ayrıca G-6-PD aktivitesi ile metemoglobin arasında negatif bir korelasyonun var olduğu bildirilmektedir (2). Bu çalışmanın 8. saatinde belirlenen en düşük G-6-PD aktivitesi ile birlikte Heinz cismiciklerinin görülmesi bu görüşleri destekler niteliktedir.

Eritrositlerin peroksidasyon ürünlerine karşı koruyucu bir mekanizmaya sahip olduğu bilinmektedir (22). n-Propil disülfid G-6-PD'ı yıkımlamak suretiyle eritrosit membranında bulunan okside glutatyonun redükte glutatyona dönüşüm mekanizmasını negatif yönde etkileyip, eritrositin antioksidan koruma sistemini bozarak membranda lipid peroksidasyonuna neden olmaktadır (22,13).

Kan serumunda SA ve LSA düzeyleri analiz edildiğinde (şekil 1 ve 2) denemenin 2. saatinden itibaren yükseldiği (32.62 ± 0.44 , 26.24 ± 0.37 mg/dl), 8. saatte en yüksek seviyeye geldiği (41.19 ± 0.65 , 37.84 ± 0.47 mg/dl) ve sonra düşmeye başladığı, denemenin 24. saatinde ise 32.64 ± 0.69 , 28.99 ± 0.45 mg/dl'ye kadar düştüğü gözlemlendi. Bu yükselmelerin hem eritrositlerin membran bütünlüğünün bozulmasından hem de membrandaki lipid peroksidasyonundan kaynaklanmış olabileceği düşünülmektedir. Elde edilen bu sonuçlar kontrol grubunda belirlenen değerlerle karşılaştırıldığında aradaki farkın önemli olduğu gözlemlendi ($p<0.001$).

Kontrol ve deneme grubu köpeklerde, deneme süresince serum ALT ve ALP düzeyleri incelendiğinde (tablo 1), her iki grup arasında istatistiki olarak bir fark belirlenmedi. Bu durum muhtemelen soğanın karaciğer enzimleri üzerine önemli bir etkisinin olmaması ile açıklanabilir.

Sonuç olarak, bu çalışmada soğan ekstraktının köpeklerde eritrosit, hematokrit ve hemoglobin düzeylerini önemli derecede etkilemediği ancak eritrositlerde Heinz cismiciklerinin şekillenmesine, SA ve LSA düzeylerinde bir artışa ve G-6-PD enzim aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olduğu saptandı. Bu bağlamda Heinz cismicikleri ile G-6-PD enzim aktivitesi arasında negatif bir korelasyonun var olduğu söylenebilir.

KAYNAKLAR

- 1-Brocher JR, Payne RC., Conrad ME. (1975): Role of Sialic Acid in Erythrocyte Survival. *Lancet* 45, 11-19.
- 2-Çamaş H., Ergun H. (1985): Kuzuların Kanında Metemoglobin ve Vitamin C Değerleri ile Glikoz-6-Fosfat Dehidrogenaz Aktivitesi Üzerine Araştırmalar. *U.Ü. Vet. Fak. Derg.* 1,2,3 (4); 35-41.
- 3-Carrell R.W., Winterbourn C.C. and Rachmilewitz E.A. (1975): Activated Oxygen and Hemolysis. *Brit. J. Haematol.* 30: 259-264.
- 4-Cheeke P. R. (1985): Onion Poisoning in Livestock In: *Natural Toxicants in Feeds and Poisonous Plants*. Westport Conn. AVI Publishing Co. 279.
- 5-Durgun Z., (94) Keskin E., Kocabatmaz M., Eksen M., Keçeci T. ve Kaya Ş. (1994): Soğanın Bazı Hematolojik Değerler Üzerindeki Etkileri. *Konya Sağlık Eğt. Enst. Derg* 1;116-126.
- 6-Eylar E.H., Madoff A.M., Brody O.V., Oncley J.L. (1962): The Contribution of Sialic Acid to The Surface Change of The Erythrocyte. *J. Biol. Chem.* 237 (16); 1992-2000.
- 7-Farkas M.C. and Farkas J.N. (1974): Hemolytic Anemia due to Ingestion of Onion in a Dog. *J.A.A.H.A.*, 10; 65-66.
- 8-Fernandez F. R., Davies A. P., Techout D. J., Krake A., Christopher M.M. and Perman V. (1984): Vitamin K Induced Heinz Body Formation in Dogs. *J. Anim. Hosp. Assoc.* 20, 711-720.
- 9-Gerbaut I., Rey E. and Lombart C. (1973): Improvement Automated Determination of Bound N-Acetyl Neuraminic Acid in Serum. *Clişn. Chem.* 19, 11; 1285-1287.

- 10-Gruhzid O.M. (1931):** Anemia of Dogs Produced by Feeding of The whole Onion Fractions. *Am. J. Med. Sci.* 181; 812-815.
- 11-Harley J.D. and Mauer A. M. (1961):** Studies on The Formation of Heinz Bodies. I. Methemoglobin Production and Oxihemoglobin Destruction. *Blood* 16: 1722-1735.
- 12-Harley J.D. and Robin H. (1961):** Studies on The Formation of Heinz Bodies. II. The Nature and Significance of Heinz Bodies. *Blood* 17: 418-433.
- 13-Harvey J.W. and Rackear D. (1985):** Experimental Onion-Induced Hemolytic Anemia in Dogs. *Vet Pathol.* 22 (4): 387-392.
- 14-Huckison T.W.S. (1977):** Onions as a Cause of Heinz Body Anemia and Death in Cattle. *Can. Vet. J.* 18; 358-360.
- 15-Imada O. (1980):** Experimental Studies on The Onion Poisoning in Dogs- Relation Between The Quantity of Supplied Onion and Onset of The Disease. *Bull. Azabu Univ. Vet. Med.*, 1; 271-287.
- 16-James F. and Binns W. (1966):** Effects of Feeding Wild Onions (*allium validum*) to Bred Ewes. *JAVMA*, 149; 512-514.
- 17-Jeffrey M.K. (1983):** Onion Toxicity in a Dog. *Modern Vet. Practice* 64; 477-479.
- 18-Join S. K. and Hochstein P. (1979):** Generation of Superoxide Radicals by Hydrazine. Its Role in Phenylhydrazine-Induced Hemolytic Anemia. *Bichim. Biophys. Acta* 586;128-136.
- 19-Katapodis N., Hirshaut Y., Geller N.L. and Stock J.J. (1982):** Lipid Associated Sialic Acid Test for The Dedection of Human Cancer. *Cancer Res.* 42: 5270-5275.
- 20-Kobayashi K. (1981):** Onion Poisoning in The Cat. *Feline practice* 11;22-27.
- 21-Koger L.M. (1956):** Onion Poisoning in Cattle *JAVMA* 129;75.
- 22-Lincoln S. D., Howell M.E., Combs J.J., Hinmann D.D. (1992):** Hematologic Effects and Feeding Performance in Cattle Fed Cull Domestic Onions (*allium cepa*). *JAVMA* 200 (8); 1090- 1094.
- 23-Marchesi V.T., Tillack T.W., Jackson R.L., Segrest J.P., Seatt R.E. (1972):** Chemical Characterization and Surface Orientation of The Major Glycoprotein of The Human Erythrocyte Membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 69, 1445.
- 24-N.G., S., Dai J.A. In; Rosenberg A., Schengrund C. ed. (1976):** Biological Roles of Sialic Acid. Plenum Press, New York.
- 25-Pierce K.R., Joice J.R., England R. B. and Jones L.P. (1972):** Acute Hemolytic Anemia Caused by Wild Onion Poisoning in Horses *JAVMA* 160;323-327.
- 26-Schalm O. W. Jain N. C., Carrol E. J. (1975):** Anemias Associated with Heinz Body Information. *Veterinary Hematology* 2nd. ed. Philadelphia, Lea-Febigert, 447-449.
- 27-Schelenberg F., Beange F., Bourdin J., Baurre J.M. and Weill J. (1991):** Alcohol Intoxication and Sialic Acid in Erythrocyte Membrane and in Serum Transferrin. *Pharma. and Biochem. and Behaviour* Vol. 39, 443-447.
- 28-Sebrel W. H. (1930):** An Anemia of Dogs Produced by Feeding Onions. *Public Health Rep.* 45; 1175-1191.
- 29-Solter P. and Scott R. (1987):** Onion Ingestion and Subsequent Heinz Body Anemia in a Dog; A case report. *JAVMA* 23, 544-546.
- 30-Spice R.N. (1976):** Hemolytic Anemia Associated with Ingestion of Onions in Dog. *Can. Vet. J.* 17;181-183.
- 31-Sydow, G.A. (1980):** Simplified Quick Method for Determination of Sialic Acid in Serum. *Biomed. Biochim. Acta.* 44 - 11/12: 1721-1723.
- 32-Tuppy H. and Gottschalk A. (1972):** The Structure of Sialic Acids and Their Quantitation, Glycoproteins, Their Composition, Structure and Function. Revised and expanded. 2nd. ed. Elsevier, Amsterdam, London, New York.
- 33-Van Kamper K.R., James L.F. and Johnson A. E. (1970):** Hemolytic Anemia in Sheep Fed with Wild Onion (*allium validum*) *JAVMA* 156;328-332.
- 34-Whitehouse M.V. and Zilliken F. (1963):** Isolation and Determination of Neuraminic (sialic) Acids; in *Methods of Biochemical Analysis*. Ed. Glik D. Interscience Publishers, New York, London, Sydney. Vol XIII, 199-200.
- 35-Williams H.H., Erickson B. E., Beach E.F. et al. (1941):** Biochemical Studies of The Blood of Dogs with n-Propyl-Disulfide Anemia *J. Lab. Clin. Med.* 26;996-1008.
- 36-Williams W.J., Beutler E., Erslev A.J. (1983):** *Hematology*. 3rd Edition. McGraw-Hill Book Co. New York.