

KANDA BAZI BİYOKİMYASAL DEĞERLER ÜZERİNE DEPOLAMA SÜRESİ VE FARKLI ANTİKOAGULANTLARIN ETKİLERİ

Firuze Kurtoğlu¹

Nuri Başpınar¹

Vahdettin Altunok¹

Effects of Storage Duration and Different Anticagulants of Blood Samples on Biochemical Values

Summary: This study was conducted with healthy, fertile 10 Holstain dairy cows that have same breeding, feeding and environmental factors in Konya Animal Central Research Institute. Blood sera, heparinized and EDTA plasma were obtained from V. Jugularis blood samples; alkaline phosphatase(AP), alanine aminotransferase (ALT), gamma glutamyl transferase (GGT), albumin, cholesterol, magnesium (Mg), calcium (Ca), inorganic phosphor (Pi), copper (Cu) and zinc (Zn) values were determined immediately with a series of the samples and this parameters were repeatedly measured after stored 100 days in - 20 °C. Cu, Zn values were measured by atomic absorpsiyon spectrophotometer (Buck Scientific modem 200A). Other analyses were made by spectrophotometer (Shimadzu UV-2100). In serum, EDTA and heparinized plasma treatments for 0. days there were found significant differences between groups as albumin (P<0.01), P (P<0.001), Mg (P>0.05),cholesterol (P>0.05), AP (P<0.001), ALT (P>0.05) GGT (P>0.05), Cu (P<0.01), Zn (P<0.001), Ca (P<0.01). In addition this differences between groups for 100. days were found to be P<0.001; P<0.001; P<0.001; P>0.05; P<0.001; P>0.05; P>0.05; P>0.05; P<0.001; P<0.001 respectively. For the all parameters differences between 0. and 100. days were revised in treatment groups and obtained various statistically significant results.

Key words: Serum, EDTA, heparin, blood contents

Özet: Çalışma, Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü' nde yetiştirilen 10 adet sağlıklı, fertil, aynı bakım, besleme ve çevresel faktörler altında bulunan Holştayn ırkı süt ineklerinde yürütülmüştür. Hayvanların V. jugularislerinden alınan kan örneklerinden serum ile EDTA ve heparinize plazmalar elde edilmiş; bu örneklerin bir serisi ile alkalın fosfataz (AP), alanin amino transferaz (ALT), gamma glutamil transferaz (GGT), albumin, kolesterol, magnezyum (Mg), kalsiyum (Ca), inorganik fosfor (Pi), bakır (Cu) ve çinko (Zn) analizleri hemen yapılmış, diğer serisi ise - 20 °C de 100 gün bekletilerek aynı ölçümler tekrarlanmıştır. Cu ve Zn analizleri atomik absorpsiyon cihazında (Buck Scientific modem 200 A), diğer analizler ise spektrofotometrik (Shimadzu UV- 2100) olarak gerçekleştirilmiştir. Serum ile EDTA ve heparinize plazma uygulamalarında 0. gün için gruplar arasında albumin (P<0.01), P (P<0.001), Mg (P>0.05), kolesterol (P>0.05), AP (P<0.001), ALT (P>0.05) GGT, (P>0.05), Cu (P<0.01), Zn (P<0.001), Ca (P<0.01) önem düzeyinde farklılıklar bulunmuş; aynı parametreler yönünden 100. günde ise farklılıklar sırası ile P<0.001; P<0.001; P<0.001; P>0.05; P<0.001; P>0.05; P>0.05; P>0.05; P<0.001; P<0.001 olarak belirlenmiştir. Her bir parametre açısından ise 0. ve 100. gün değerleri arasında oluşan farklılıklar her üç uygulama grubunda değerlendirilmiş ve farklı önem derecelerinde sonuçlar elde edilmiştir.

Anahtar kelimeler : Serum, EDTA, heparin, kan değerleri

Giriş

Klinik biyokimyada bilimsel araştırmalar ile hastalıkların teşhis ve seyrinin takibi açısından ya-

pılan kan analizlerinin önemi büyüktür. Kan örneklerinin toplanmasını takiben serum ve plazma elde edilmesinde; kullanılan antikoagulantın türü, depolama ısısı ve süresi gibi faktörler önem taşımaktadır (Gervin ve ark., 1983; Kaneko, 1989;

Burtis ve Ashwood, 1994; Chuang, 1998). Laboratuvarlarda tüm kan ya da plazma analizleri yapılacağı zaman mutlaka bir antikoagulant kullanılması gereklidir. Tüm kan klinik biyokimyada çoğunlukla kan gazları, amonyak ve bazı iz element tayinleri için kullanılır. Pıhtılaşmış kandan elde edilen serum pek çok analiz sisteminde plazmaya göre daha çok tercih edilir (Burtis ve Ashwood, 1994). Buna rağmen plazma bazı sahalarda serumla göre daha fazla kullanım alanı bulur. Çünkü serum elde edilmesinde santrifüj işleminden önce tam bir pıhtılaşma için 15-30 dakika beklenilmesi gerekir, plazma ise acil analiz durumlarında bu sebeple tercih sebebi olabilmektedir. Ayrıca, tüm kandan elde edilecek plazma miktarı serumdan daha fazladır. Bunun yanısıra depolandığı zaman bazı fibrin dükümlerinin ya da partiküllerinin şekillenmesi özellikle otomatik analizler açısından plazma için bir dezavantajdır. Plazma, elektroforez çalışmaları için de uygun değildir. Çünkü fibrin oluşumu elektroforetik aşamaların sıra ve düzenini bozabilmektedir (Burtis ve Ashwood, 1994; Nizamlioğlu ve Kurtoğlu, 1998; Kalaycioğlu ve ark., 1998).

Örneklerin toplanması kadar depolama şartlarında büyük önem taşımaktadır. Kan örneklerinin toplandığı plastik tüpler ve kullanılan enjektörlerin özellikle mineral madde analizleri açısından değerleri etkileyebilecek unsurlar olduğu belirtilmektedir. Bu amaçla yapılan bir çalışma (Gervin ve ark., 1983) da plastik enjektör kullanımı ve örneklerin lastik kapaklı tüplerde depolanması sonucunda Zn yönünden yapılan ölçümlerde değerlerin oldukça yüksek olduğu tespit edilmiş ve bu durumun lastik kapakların üretimleri esnasında Zn tuzlarının kullanılmış olmasından kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Aynı çalışmada özellikle Zn ve Cu analizleri yönünden kullanılan antikoagulant tipinin önemli olduğu belirtilmiş ve heparinin iz element analizleri için en uygun antikoagulant olduğu, EDTA kullanımının özellikle Zn değerlerinde yükselmelere neden olduğu vurgulanmıştır. Bu ifadeler bir diğer araştırmacı grubu (Keen ve Feldman, 1987; Srivastava ve Pandey, 1992) tarafından da doğrulanmaktadır. Hemoliz meydana gelmiş olmasında eritrositlerin plazmadan

10 kat daha fazla Zn içermesi bakımından Zn konsantrasyonlarını yükseltmektedir (Keen ve Feldman, 1987). Framstad ve ark (1989), yaptıkları çalışmalarında plazma ve serumda AST, LDH, GGT, Mg, P ve glikoz analizleri yönünden önemli bir fark tespit etmediklerini, fakat kan örneklerinin ayırılmanmaksızın analiz esnasına kadar saklanmasını takiben elde edilen plazma ve serumlarda söz konusu değerlerde büyük değişimler olduğunu bildirirlerken; Thoresen ve ark. (1995), 10 adet sağlıklı köpekten topladıkları kan örneklerinden serum ve heparinize plazma örnekleri elde etmişler ve bu örnekleri 90 ve 240 gün süreyle iki farklı ısıda (-20 ve -70 °C) depolamışlar; ALT, AST, CK, GGT, LDH, lipaz, albumin, Ca, kolesterol, Na, trigliserid gibi değerlerde büyük farklılıkların oluştuğunu ortaya koymuşlardır.

McMurtry ve ark. (1984) ise iyonize kalsiyum açısından ele aldıkları çalışmalarında sodyum heparin ile elde edilen ve +4 °C de 8 saat bekletilen plazmada iyonize kalsiyumun taze plazmaya göre önemli oranda düşük olduğunu, taze plazma ve serum arasında ise farklılık tespit etmediklerini belirtmektedirler.

Nonsteroidal, antiinflamatorik, analjezik bir madde olan ve özellikle yarış atlarında normal kondüsyonun devamı için terapötik bir ajan olarak kullanılan fenilbutazon (PBZ) ' un plazmada tayini önem taşımaktadır. Bu konuda yapılan çalışmada (Ellsworth ve ark., 1986) PBZ tayini için özellikle lityum heparinin kullanılmasının daha uygun olacağı bildirilmektedir. Nierenberg (1984), retinol yönünden incelemelerde bulunduğu çalışmasında EDTA, sitrat ve okzalat antikoagulantlarının retinol miktarında düşmeye neden olduğunu tespit etmiş ve serum ya da heparinize plazma kullanımının daha duyarlı ve doğru sonuçlar vereceğini vurgulamıştır. Aynı sonuçlar karotinler açısından da doğrulanmıştır (Nierenberg, 1985). EDTA, lityum heparin, okzalat, florid gibi antikoagulantlar kullanılarak plazmada yapılan AP, AST, GGT, SOD analizlerinde, enzim aktivitelerinin hem serumda hem de değişik depolama ısılarında büyük ölçüde farklı değerler gösterdiği tespit edilmiştir (Jones, 1985).

Eritrositlerin ozmotik frajilitelerinin an-

tikoagulantlar tarafından ne derece etkilendiğinin araştırıldığı bir çalışma (Kafka ve Yermiahu, 1998) da EDTA ve heparin antikoagulantları kullanılmış ve heparine oranla EDTA'nın ozmotik frajilite artışında daha etkili olduğu sonucuna varılmıştır.

Smith ve ark (1998), Pb konsantrasyonlarını serum ile EDTA ve heparinize plazma örnekleri arasında karşılaştırmışlar; EDTA örneklerinin EDTA antikoagulantından kaynaklanan Pb kontaminasyonu sebebiyle daha yüksek plazma Pb düzeyleri gösterdiğini tespit etmişlerdir.

T ve B lenfositler açısından yapılan incelemelerde de antikoagulant tiplerinin öneminin büyük olduğu bildirilmektedir (Nielsen, 1985; Robertson ve Maxwell, 1993).

Bu çalışmada, serum ile iki farklı antikoagulant kullanılarak elde edilen plazma örneklerinde bazı kan değerleri yönünden oluşabilecek farklılıkların tespiti ve bu örnekleri -20 °C de depolamanın kan değerleri üzerinde ne oranda etkisinin olduğunun araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Araştırmada Konya Hayvancılık Merkez Araştırma Enstitüsü'nde yetiştirilen, aynı yaş, bakım-besleme ve çevresel faktörler altındaki sağlıklı ve fertil 10 adet Holştayn süt ineği kullanıldı. Hayvanların V. jugularislerinden birer kez kan alımı yapılarak her bir kan örneğinden serum ile EDTA ve heparinize plazmalar elde edildi; bu örnekler plastik ependorf tüplere alındı. EDTA plazmalarda her bir örnek için 2 mg/ml kan oranında Na-EDTA, heparinize plazmalarda ise yine her bir örnek için 25

IU/ml oranında Na-heparin kullanıldı. Soğuk zincirde laboratuvara getirilen örnekler +4 °C de 2000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek serum ve plazmaları ayrıldı. Her bir örnek iki paralel gruba ayrılarak bir serisinde AP, ALT, GGT, Mg, Ca, P, kolesterol, albumin, Cu, Zn değerleri hemen (0. Gün) tespit edildi. Aynı ölçümler -20 °C de 100 gün bekletilen 2. seri örneklerde tekrarlandı. Kan serumu ve plazmalarında AP, ALT enzimleri Human (Gesellschaft für Biochemica und Diagnostica mbH Silberbachstraße 9 D- 65232 Taunusstein Germany); GGT enzimi HiChem Diagnostics (Smithfield, RI 02917); Mg, Ca, P, kolesterol ve albumin ise Bioaktif Diagnostics ticari test kitleri ile spektrofotometrik (UV-2100 Shimadzu) olarak analiz edildi. Cu ve Zn değerleri atomik absorpsiyon (Buck Scientific model 200A) cihazında tespit edildi.

Verilerin istatistik değerlendirilmesinde örneklerin 0. ve 100. gün ölçümleri eşler arası t testi (paired t test); serum, EDTA ve heparin uygulamaları arası değerlendirmeler için de varyans analizinden faydalanıldı. Oluşan farklılıklar Duncan testi ile belirlendi. Sadece Ca ölçümleri açısından EDTA plazma grubu değerlendirilmeye alınmadı ve serum ile heparinize plazma Ca değerleri bağımsız t testi yöntemi ile karşılaştırıldı (SPSS inc.1993).

Bulgular

Çalışmada uygulama gruplarının 0. ve 100. gün değerleri Tablo 1 de; 0. gün gruplar arası varyans analizi değerleri Tablo 2 de; 100.gün gruplar arası varyans analizi değerleri ise Tablo 3' te sunulmuştur.

Tablo 1. Çalışmada her bir grupta 0 -100. günde elde edilen ortalama değerler

	SERUM			EDTA			HEPARİN		
	0. Gün X±Sx	100. Gün X ±Sx	P	0. Gün X ±Sx	100. Gün X ±Sx	P	0. Gün X ±Sx	100. Gün X ±Sx	P
Alb (g/dl)	4.46 ±0.32	4.15 ±0.48	0.003	4.66 ±0.26	4.25± 0.19	0.001	5.14 ±0.66	4.85 ±0.31	0.055
Ca (mg/dl)	12.65 ±1.54	11.86 ±1.56	0.002	-	-	-	10.83 ±1.76	10.48 ±1.05	0.059
P (mg/dl)	5.01 ± 0.37	4.79 ±0.37	0.052	5.86 ±0.35	5.54±0.42	0.007	5.79 ±0.48	5.65 ±0.53	0.008
Mg (Meq/L)	2.03 ± 0.13	2.11 ±0.10	0.067	2.06 ±0.02	2.20 ±0.03	0.000	2.03 ±0.01	1.87 ±0.19	0.028
Kol. (mg/dl)	125.48±14.08	123.55±14.40	0.031	119.37 ±12.04	116.54 ±12.02	0.000	113.61 ± 10.42	111.64 ±11.19	0.040
AP (U/L)	53.74 ± 9.35	52.51 ±9.15	0.002	32.05 ±7.99	31.01 ±7.69	0.000	54.29 ±9.35	53.17 ±9.16	0.000
ALT (U/L)	20.57 ±3.89	19.76 ±3.52	0.006	19.93 ±4.82	18.03 ±4.48	0.000	20.68 ±3.56	18.95 ±3.73	0.000
GGT (U/L)	13.26 ±3.96	12.64 ±4.04	0.001	11.51 ±2.73	9.93 ±2.11	0.000	12.45 ±3.05	11.22 ±2.48	0.002
Cu (µmol/L)	5.07 ±0.19	5.09 ±0.23	0.318	5.21 ±0.16	5.25 ±0.16	0.520	4.94 ±0.15	5.06 ±0.14	0.001
Zn (µg/dl)	42.75 ±4.03	43.34 ±3.96	0.061	51.24 ±5.23	52.71 ±5.18	0.015	41.20 ±4.20	41.83 ±3.35	0.381

Kol: Kolesterol; Alb: Albumin

Tablo 2. Çalışmada 0. günde gruplar arasında elde edilen ortalama değerler

	SERUM X ± Sx	EDTA X ± Sx	HEPARİN X ± Sx	P
Alb (g/dl)	4.46 ±0.32b	4.66 ±0.26b	5.14 ±0.66a	0.007
P (mg/dl)	5.01±0.37b	5.86 ±0.35a	5.79 ±0.48a	0.000
Mg (meq/L)	2.03 ±0.13 a	2.06 ±0.02 a	2.03 ±0.01 a	0.068
Kol. (mg/dl)	125.48 ±14.08 a	119.37 ±12.04 a	113.61 ±10.42 a	0.237
AP (U/L)	53.74 ±9.35a	32.05 ±7.99b	54.29 ±9.35a	0.000
ALT (U/L)	20.57 ±3.89a	19.93 ±4.82a	20.68 ±3.56a	0.908
GGT (U/L)	13.26 ±3.96a	11.51 ±2.73a	12.45 ±3.05a	0.503
Cu (µmol/L)	5.07 ±0.19ab	5.21 ±0.16a	4.94 ±0.15b	0.004
Zn (µg/dl)	42.75 ±4.03b	51.24 ±5.23a	41.20 ±4.20b	0.000
Ca (mg/dl)	12.65±1.56	-	10.83 ±1.76	0.007

a,b: Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur

Tablo 3. Çalışmada 100. günde gruplar arasında elde edilen ortalama değerler

	SERUM X ± Sx	EDTA X ± Sx	HEPARİN X ± Sx	P
Alb (g/dl)	4.15 ±0.48b	4.25 ±0.19b	4.85 ±0.31a	0.000
P (mg/dl)	4.79 ±0.37b	5.54 ±0.42a	5.65 ±0.53 a	0.000
Mg (meq/L)	2.11 ±0.10 a	2.20 ±0.03 a	1.87 ±0.19b	0.000
Kol. (mg/dl)	123.55 ±14.40 a	116.54 ±12.01 a	111.64 ±11.19 a	0.300
AP (U/L)	52.51 ±9.15 a	31.01 ±7.69b	53.17 ±9.16 a	0.000
ALT (U/L)	19.76 ±3.52 a	18.03 ±4.48 a	18.94 ±3.72 a	0.623
GGT (U/L)	12.64 ±4.04 a	9.93 ±2.11 a	11.22 ±2.48 a	0.147
Cu (µmol/L)	5.09 ±0.23 a	5.25 ±0.16 a	5.06 ±0.14 a	0.060
Zn (µg/dl)	43.34 ±3.96b	52.71 ±5.18 a	41.83 ±3.35 b	0.000
Ca (mg/dl)	11.86 ± 1.56	-	10.48 ± 1.05	0.000

Aynı satırda farklı harf taşıyan değerler birbirinden farklı bulunmuştur

Tartışma ve Sonuç

Farklı antikoagulant kullanımıyla elde edilen plazmalar ile serum örnekleri arasında; incelenen parametreler yönünden elde edilen farklılıklar ve bu değerlere depolama süresinin etkileri Tablo 1,2 ve 3 de izlenebilmektedir. Örneklerin - 20 °C de 100 gün bekletilmesi sonucunda Cu ve Zn değerleri ile serum ve EDTA grubu Mg değerlerinin dışındaki diğer parametreler 0. güne göre farklı oranlarda düşüşler göstermiş; EDTA plazma örneklerinde serum ve heparinize plazma örneklerine göre 0. ve 100. gün ölçümlerinde Zn değerleri önemli (P<0.05) düzeyde, Cu değerleri ise önemsiz (P>0.05) oranda daha yüksek bulunmuştur (Tablo 1).

Kaneko (1989), tarafından ineklerde Ca, Pi, Mg, kolesterol, AP, ALT, GGT ve Cu için normal değerler sırasıyla, 9.7- 12.4 mg/dl, 5.6-6.5 mg/dl, 1.8-2.3 mg/dl, 80-120 mg/dl, 49-57 U/L, 14-38 U/L, 6.1-17.4 U/L, 5.16-5.54 (µmol/L olarak; albumin ve Zn değerleri ise Burtis ve Ashwood (1994) tarafından; 4.17-5.47 g/dl ve 42-54 (µg/dl olarak bildirilmiştir. Çalışmada serum örneklerinde tespit edilen değerler belirtilen araştırmacıların bil-

dirdikleri değerler ile uyum içerisinde bulunmuştur.. Bunun yanısıra EDTA plazma örnekleri AP değerleri yönünden serum ve heparinize plazma örneklerine oranla oldukça düşük (P<0.001) tespit edilmiştir (Tablo 2 ve 3). Bu sonuç, EDTA'nın alkalın fosfataz, kreatin kinaz ve löysin aminopeptidaz aktivitesini metalik kofaktörlerle şelat oluşturmak suretiyle inhibe ettiği görüşü (Burtis ve Ashwood, 1994; Nizamlioğlu ve Kurtoğlu, 1998) ile uyum göstermektedir. Ca ölçümleri ise EDTA plazma örneklerinde EDTA-Ca şelasyonu prensibine uygun olarak negatif değerlere ulaşmış ve bu nedenle değerlendirilmeye alınmamıştır. Nitekim birçok araştırmacı (Jones,1985; Burtis ve Ashwood, 1994; Nizamlioğlu ve Kurtoğlu,1998; Kalaycioğlu ve ark.,1998) EDTA'nın Ca ile şelat oluşturma özelliğinden dolayı Ca ve Fe' in kolorimetrik ve titrimetrik analizlerinde kullanımının uygun olmayacağını bildirmektedirler.

Bekleme sürelerinin etkileri enzimler ve metabolitler yönünden ayrı ayrı değerlendirilebilir. Enzimlerin, depolama süresinin uzunluğu ile orantılı olarak daha fazla aktivite kaybettikleri, mineral madde üzerindeki değişimlerin ise normal değerler içerisinde seyrettiği belirtilmektedir (Framstad ve ark.1989; Thoresen ve ark. 1995; Nizamlioğlu ve

Kurtoğlu, 1998). Enzimlerde özellikle depolama ısısı düştükçe (+4, -20, -70 °C) stabilitenin arttığı, fakat transaminazlar için bu durumun farklılık arzettiği, AST de özellikle - 20 °C de depolamayı takiben önemli aktivite kayıplarının tespit edildiği bildirilmiştir (Jones, 1985). Aynı araştırıcı hidroksi bütirat dehidrogenaz (HBDH) için oda sıcaklığına göre + 4 °C nin daha labil etkili olduğunu belirtirken; + 20 °C de 24 saat içinde heparin plazma ve serum kreatin kinaz (CK) değerlerinde önemli düşüşler, plazma ALT değerlerinde ise aktivite artışı tespit etmişlerdir. Aynı ısı derecesinde (+20 °C) hem serum, hem de plazmada AP, AST, GGT, LDH, SOD, GSP-Px gibi enzimlerinde en az üç gün stabil olduğunu, bu stabilitenin asetilkolin esteraz (ACHE), aldolaz, AST ve GGT de plazmada seruma göre daha fazla olduğu (- hidroksi butirat dehidrogenaz ve laktat dehidrogenazda serumda aktivitenin plazmaya göre daha yüksek olduğu Jones (1984, 1985) tarafından açıklanmıştır. Spate ve ark (1970), +4 °C de bazı enzimlerin belirli bir süre dayanıklı oluşlarının, inhibitör etkili maddelerin belirtilen ısı derecesinde enzimlerden daha önce yıkılması ile açıklanabileceğini belirtmektedirler. Sunulan çalışmada AP, ALT ve GGT enzimleri yönünden 0. ve 100. gün ölçümleri arasında serumda $P < 0.01$ önem düzeyinde bir aktivite düşüşü tespit edilirken; EDTA ve heparin gruplarında AP ve ALT için aktivite kaybı $P < 0.001$, GGT için ise $P < 0.01$ önem düzeyinde gerçekleşmiştir (Tablo 1). Çalışmada incelenen AP, ALT ve GGT enzimlerinde 100 gün depolamayı takiben oluşan bu aktivite kayıpları % değerler olarak serum, EDTA ve heparin gruplarında her üç enzim için sırasıyla; % 2.29, 3.94, 4.68; % 3.24, 9.53, 13.73; % 2.06, 8.37, 9.88 oranında tespit edilmiş ve en fazla aktivite kaybı tüm enzimler için EDTA grubunda şekillenirken, bunu heparin ve serum grubu izlemiştir.

Enzim aktivitelerine farklı antikoagulant uygulaması ve depolama sürelerinin etkileri hayvan türleri ile insanlarda farklılık gösterebilmektedir. Örneğin buzağılarda yapılan bir deneme (Jones, 1985) de, AST ve ALT aktiviteleri serumda plazmadakinden daha yüksek bulunurken; bu durum trombosit enzimlerinin pıhtılaşma aşamalarındaki sızıntılarına bağlanmıştır. EDTA plazmanın ko-

yunlarda transaminaz aktivitesini artırırken aynı etkinin buzağı ve insanlar üzerinde gözlenmediği ifade edilmiştir (Demetriou, 1974). Bu farklılığın mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte koyun enzimlerinin, interferens mekanizmasına daha duyarlı oldukları bildirilmiştir (Jones 1984). Sığırlar için özellikle ALT ve AST analizlerinde heparinize plazmaların daha stabil oldukları belirtilmiştir (Jones 1985).

Koyunlarda CK aktivitesi serumda 77 U/L iken EDTA plazmada bu değer 296 U/L olarak belirlenmiştir (Jones,1984). Aynı araştırıcı eritrositlerin CK ihtiva etmemelerine bağlı olarak hemolizin CK aktivitesini değiştirmedini ifade etmektedir. Çalışmada EDTA plazma örneklerinde AP değerlerinin düşük ($P < 0.001$) bulunması (Tablo 2 ve 3) EDTA nın, Zn ile şelasyon oluşturacağı ve Zn bağımlı bir enzim olan AP nin aktivitesini inhibe edeceği görüşünü (Fishman, 1974) desteklemektedir.

Çalışmada Tablo 2 ve 3 de izlenebildiği gibi antikoagulantlar 0. günde sadece albumin, Pi, AP, Cu, Zn, ve Ca değerlerinde önemli değişmelere neden olurken, 100.günde ise albumin, Pi, Mg, AP, Zn ve Ca değerlerinde önemli değişmeler tespit edilmiştir. Thoresen ve ark (1995), - 20 °C' de örnekleri 90 gün bekletmenin mineral ve metabolitler üzerinde % 10 kayıp yarattığını fakat bu kaybın yine normal değerler içerisinde değiştiğini, farklı antikoagulantlar arasında ise farklılık tespit etmediklerini belirtmişlerdir. Sunulan çalışmada Tablo 1 ' de de izlenebileceği gibi Cu, Zn, Mg, Pi ve Ca minerallerinin bekletme süresinden, farklı derecelerde etkilendikleri, özellikle her üç grupta Cu ve Zn değerlerinde herhangi bir düşme gözlenmezken, serum, EDTA ve heparin gruplarında Pi değerleri % 4.39, 5.46, 2.41 oranında azalma göstermiş, Mg için ise bu azalma sadece heparinli örneklerde tespit edilmiştir (% 7.88).

Çalışmada Ca ölçümleri serum ve heparin grupları arasında 0. Günde $P < 0.01$, 100 gün ölçümlerinde ise $P < 0.001$ önem düzeyinde farklılık göstermiş ve serum örneklerine oranla heparinli plazmalarda Ca değerleri daha düşük bulunmuştur. Bu durum Ladenson ve Bowers (1973)' in Ca analizlerinde, şelasyon aşamaları ve özelliklerinden doğabilecek hatalardan kaçınmak için serum ör-

neklerinin tercih edilmesi görüşü ile uyum göstermiştir. Buna karşın Mc Murtry ve ark (1984) total Ca' un serum ve heparinize plazma örnekleri arasında birbirine yakın ölçüm değerleri gösterdiğini tespit etmişlerdir. Aynı araştırmacılar total ve iyonize Ca analizleri için sodyum ve amonyum heparin kullanılmasının uygun olacağını ve bu antikoagulantların 10 U/ml konsantrasyonda kullanılması gerektiğini vurgulamaktadırlar. Burtis ve Ashwood, (1994) bu konsantrasyondan daha az miktarların her zaman için koagülasyonu tam olarak inhibe edemeyeceğini, santrifüj sonrası plazmanın hemen ayrılması ve hemolizden kaçınılmasının serum ya da plazma Ca analizleri açısından oldukça önem taşıdığını belirtmektedirler.

Kan plazması Zn analizleri için kullanılması gerekli antikoagulant tipi üzerinde ise farklı görüşler mevcuttur. Keen ve Feldman (1987), heparinin iz element çalışmaları için en uygun antikoagulant olduğunu, EDTA kullanımının ise eritrosit çinkosu ile şelasyon ve bu şelatin plazmaya mobilizasyonu sonucu plazma Zn değerlerinde yükselmelere sebep olduğunu vurgulamalarına karşın, Gervin ve ark (1983), heparinin bir çinko kaynağı olduğunu ve dolayısı ile Zn analizlerinde özellikle Na-heparinin kullanılmasının uygun olmayacağı görüşünü savunmaktadırlar. Sunulan çalışmada ise Keen ve Feldman (1987) nin görüşlerine uygun şekilde hem 0. hem de 100. gün Zn değerleri açısından EDTA - plazmalarda serum ve heparin gruplarına göre belirgin ve önemli ($P < 0.001$) bir artış tespit edilmiş, serum ve heparin örnekleri arasında ise değerler birbirine yakın bulunmuştur. Hemolizli örneklerin eritrositlerin plazmaya oranla 10 kat daha fazla Zn içermeleri nedeniyle Zn ölçümleri için uygun olmadığı; Cu analizleri için ise plazma ve eritrosit Cu konsantrasyonlarının birbirine çok yakın olması nedeniyle gerekli bazı durumlarda hemolizli örneklerin de Cu analizlerinde kullanılabilmesi belirtilmektedir (Keen ve Feldman, 1987).

Çalışmada Cu analizleri yönünden antikoagulant uygulaması ve - 20 °C de bekletme süresinin farklı bir etki oluşturmadığı tespit edilmiştir.

Keen ve Feldman (1987) ise inekler için Cu konsantrasyonlarını EDTA plazmada en yüksek 110 µg/dl, heparin plazma ve serumda ise sırasıyla 106; 98 µg/dl olarak tespit etmişler ve aynı çalışmada EDTA grubunda plazma Zn konsantrasyonunu çok yüksek 455 µg/dl bulduklarından dolayı mineral madde ölçümleri için EDTA kullanılmasının uygun olmayacağı sonucuna varmışlardır.

Sonuç olarak ineklerde Ca, Zn, Pi, ile AP enzimi analizlerinde serumun tercih edilmesi; Cu ve albumin analizlerinde serumun yanısıra albumin için EDTA, Cu için heparinli plazmaların kullanılabilmesi; ancak Zn analizlerinde EDTA nın kullanılmaması gerektiği kanaatine varılmıştır. Depolama süresinin etkisi yönünden ise enzim analizlerinde EDTA başta olmak üzere her iki antikoagulantın seruma göre daha fazla aktivite kaybı oluşturduğu, Cu ve Zn ölçümlerinde ise herhangi bir aktivite kaybının ortaya çıkmadığı sonucu elde edilmiştir.

Kaynaklar

- Burtis, CA. and Ashwood, ER., (1994). Tietz Textbook of Clinical Chemistry Second Edition. W B Saunders Company Philadelphia.
- Chuang,CK. (1998). Effects of anticoagulants in amino acid analysis: comparisons of heparin, EDTA, and sodium citrate in vacutainer tubes for plasma preparation. *Clinical Chemistry*, 44,5, 1052-1056
- Demetriou, J.A., Drewes, P.A., Gin, J.B. (1974) *Clinical Chemistry, Principles and Techniques*, 2nd. Ed. Eds: R.J.Henry, D.C. Cannon and J.W. Winkleman. Hagerstown, Harper and Row. Bristol.
- Ellsworth, M., Ruhr,L.P. and Archbald,F. (1986). Effect of heparin and EDTA anticoagulants on phenylbutazone levels in equine plasma. *J.Vet. Pharmacol. Therap*, 9, 2, 227- 229
- Framstad, T., Havre, GN., Morberg,H (1989). Effect of storage, centrifugation and sodium heparinate on clinical chemical analysis of blood constituents from pigs. *Norsk-Veterinaertidsskrift*.101, 4, 237-243 (abstract).
- Fishman, W.H. (1974). Perspectives on alkaline phosphatase isoenzymes. *American J of Medicine* 56, 5, 617-650.
- Gervin, A.S., Nichols, W., Corrian, J.J (1983). Problems

in the measurement of zinc using he parin as an anticoagulant. *Life Sciences*, 33, 2643-2649.

Jones, DG.(1984). Stability and storage characteristics of enzymes in sheep blood. *Res. Vet. Sci.* 38, 3, 307-311.

Jones, DG.(1985). Stability and storage characteristics of enzymes in bovine blood. *Res. Vet. Sci.* 38, 4, 315-318.

Kafka,M. And Yermiahu, T (1998). The Effect of EDTA as an anticoagulant on the osmotic fragility of erythrocytes. *Clin. Lab. Haematol*, 20, 4, 213-16.

Kalaycıoğlu,L., Serpek,B., Nizamlioğlu, M., Başpınar, N. Ve Muhtar, A.M (1998). *Biyokimya. Ders Kitabı*, ISBN: 975 448 135 0. S.Ü.Veteriner Fakültesi Yayın Ünitesi. Konya.

Kaneko,JR. (1989). *Clinical Biochemistry Domestic Animals*. Fourth Edition. Academic Press.Inc. New York.

Keen, C.L and Feldman, B.F. (1987). Measurement of Zinc and Copper in Plasma : Potential Negative Effects of Anticoagulant Choice on Analysed Values. *Agri- Practice*, 8, 4, 4-5.

Ladenson, J.H., and G.N.Bowers. (1973). Free calcium in serum. II. Rigor of homeostatic control, correlations with total serum calcium and review of data on patients with disturbed calcium metabolism. *Clin. Chem.* 19, 575-582.

McMurtry, J.P., Rosebrough, R.W. and Steele, N.C. (1984). Studies on Blood Calcium Relationships in the Turkey. *Poultry Sci.* 63, 2094-2099.

Nielsen, H.(1985). Influence of five different anticoagulants on human blood monocyte isolation and functional activities. *Acta path. Microbiol. Scand .Sect. C*, 93, 49-52

Nierenberg, D.W. (1984). Determination of Serum and Plasma Concentrations of Retinol Using High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 311, 239- 248.

Nierenberg, D.W. (1985). Serum and plasma (-Carotene Levels Measured with an Improved Method of High-Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography*, 311, 239- 248.

Nizamlioğlu, M . ve Kurtoğlu, F (1998). *Laboratuar Çözeltileri ve Pratik Biyokimya. Ders Kitabı* S.Ü.Vet. Fak. Yayın Ünitesi Konya.

Robertson, G.W and Maxwell, M.H (1993). Importance of optimal mixtures of EDTA anticoagulant: Blood for the preparation of well-stained avian blood smears. *British Poultry Science*, 34, 615-617.

Smith, DR., Llstre, RP., Osterloh, JD. (1998). Methodological considerations for the accurate determination of lead in human plasma and serum. *Am. J. Ind. Med*, 33, 5, 430-38.

Spate, M.P., Burks, M.F., Evans, P.S. and Tumbleson, M.E.(1970). Concentrations and Activities of Bovine Serum Biochemic Constituents as a Function of Storage Time and Temperature. *Clin. Biochemistry*, 3, 137-149.

SPSS for Windos. Released 6.0 June 17 1993 Copy right (c.spss inc. 1989-1993)

Srivastava, N.K. and Pandey, N.N (1992). Keeping qualities of cattle blood on storage at 4 °C with different anticoagulants. *Indian Journal of Animal Sciences*, 62, 9, 816-823.

Thoresen, SI., Tverdal,A., Havre, G., Morberg, H (1995). Effect of storage time and freezing temperature on clinical parameters from canine serum and heparinized plasma. *Veterinary Clinical Pathology*. 24, 4, 129-133 (abstract).