

Serum ve İdrar Proteinlerinin Elektroforetik Analizi ve Veteriner Hekimlikteki Önemi*

Arif ALTINTAŞ

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Mehmet ŞAHAL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Sefa ÇELİK, Özkan DURU

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Naci ÖCAL

Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Ankara-TÜRKİYE

Geliş Tarihi: 14.01.2000

Özet: Değişik ırkta ve yaşta 18 böbrek hastası ve 17 kontrol olmak üzere toplam 35 erkek köpek üzerinde yürütülen çalışmada, böbrek bozukluğuna bağlı olarak serum ve idrar proteinlerinde kalitatif ve kantitatif değişiklikler ile diğer laboratuvar ve klinik bulgular arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlanmıştır.

Kateter ile alınan idrar örneklerinin idrar çubukları kullanılarak biyokimyasal analizleri yapılmış ve proteinüri tespit edilenler santrifüj ve ultrafiltrasyon işleminden sonra kan serum örnekleri ile birlikte protein elektroforezine tabi tutulmuştur. Serum ve idrar proteinleri SDS-PAGE ile (% 10'luk jelde) ayrılmıştır. Protein bandlarının % dağılımları dansitometrede elde edilmiştir.

Serum ve idrar kreatinin miktarı Jaffe reaksiyonu, serum üre miktarı modifiye Gentskow yöntemi (nesslerizasyon), serum toplam protein miktarı Biuret yöntemi ile tayin edilmiştir. Serum A/G ile idrar protein/kreatinin oranları ise matematiksel olarak hesaplanmıştır.

Hastalarda serum üre ve kreatinin değerlerinin yüksek ve istatistik önemli (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$), 66 kDa serum protein bandının ise düşük ve anlamlı ($p < 0.05$) olduğu saptanmıştır. Akut bozukluklarda 55 ve 45 kDa serum protein bandlarının artışa meyilli oldukları gözlenmiştir.

İdrar proteinlerinin SDS-PAGE bandları 3 grupta toplanmış ve büyük moleküllü protein bandları (>45 kDa) glomeruler yada glomerulo-tubuler bozukluklara, küçük moleküllü protein bandları (45-25 kDa) tubulo-interstisiel bozukluklara ve çok küçük moleküllü protein bandları (25-10 kDa) ise tubuler bozukluklara yorumlanmıştır. Üç hastada böbrek bozukluğu, serum üre ve kreatinin artışından önce idrar protein elektroforezi ile saptanabilmiştir. İdrar protein elektroforezi ile bozukluğun, 18 hastanın altısında glomeruler, dördünde glomerulo-tubuler, dördünde tubuler ve diğer dördünde ise tubulo-interstisiel olduğu belirlenmiş, klinik ve diğer laboratuvar bulgularıyla birlikte değerlendirilerek daha çok akut seyirli olduğu saptanmıştır.

Hastaların sağaltımında kas içi antibiyotik (sefalosporin 20 mg/kg ve ampisilin 100 mg/kg), vitamin C (redoxan) ve vitamin B kompleksi (neurogriseovit) uygulaması yanında ayrıca, sıvı gereksinimi olanlara laktatlı ringer ve % 5 dekstroz çözeltileri damar içi verilmiştir.

Klinik olarak önemli bazı serum ve idrar parametrelerine ait sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası değerler arasında istatistik önemli bir farklılık bulunamamışsa da, sağaltım sonrası izlenen hasta köpeklerde klinik ve biyokimyasal parametrelerin büyük çoğunlukta düzelmesi veya normale dönmesi, uygulanan sağaltım yöntemlerinin etkinliğine yorumlanmıştır.

Sonuç olarak, idrar protein bandlarının molekül ağırlıklarından ve bunların % dağılımlarından primer böbrek hastalıklarının tanısında ve bozukluğun yerinin belirlenmesinde rutin yararlanılabileceği, az sayıda hastanın kısa süre izlenmesine rağmen hastalığın prognozuna ve uygulanan sağaltıma verdiği yanıtın izlenmesine de ışık tutabileceği kanısına varılmıştır.

Anahtar Sözcükler: Köpek, Böbrek bozukluğu, Proteinüri, SDS-PAGE, İdrar, Serum

Determination of serum and urine proteins by electrophoresis and its importance in clinical veterinary medicine

Abstract: In this study, for the investigation of routine clinical usage of urine protein electrophoresis in the laboratory to compare with the clinical findings in veterinary medicine, qualitative and quantitative changes in protein patterns of serum and urine from dogs with kidney disorders and proteinuria were investigated using electrophoresis.

Eighteen dogs (patient group) of various ages and breeds with kidney disorders proved in the clinic and the laboratory and seventeen healthy dogs (control group) were used in this study. The histories (age, sex, breed) of the dogs in the control and patient groups were recorded in the clinic. The blood was collected from the cephalic vein, and the serum was removed using a centrifuge. Urine

* TÜBİTAK'ın desteklediği (VHAG-1242) aynı başlıklı araştırma projesinden özetlenmiştir.

was obtained by a sterile catheter from the ureter. Biochemical analysis of urine was performed in the clinic. The urines of dogs with proteinuria were centrifuged and ultrafiltrated to concentrate for protein electrophoresis. Serum and urine proteins were separated by 10 % SDS-PAGE. Creatinine in serum and urine was detected using the Jaffe reaction, and urea and total protein in serum by the modified Gentzkow and biuret methods respectively. A/G ratios in serum and protein/creatinine ratios in urine were calculated arithmetically.

Levels of serum urea and creatinine were found to be high and statistically significant ($p<0.05$ and $p<0.01$ respectively) in the diseased group. In the diseased group, 66 kDa serum protein pattern was significantly high ($p<0.05$); this may have a correlation with serum albumine in their size. In acute disorders, 55 kDa serum protein pattern tended to increase.

Disorders of three dogs with kidney disease were diagnosed by urine protein electrophoresis before the increased levels of urea and creatinine in serum. Urine proteins of eighteen dogs with primary kidney disease were separated by electrophoresis, and glomerular, glomerulo-tubular, tubular disorders were seen in six, four and four dogs respectively. These disorders were usually found to be acute when evaluated with the other laboratory and clinical findings.

Protein patterns were divided into three groups by SDS-PAGE analysis; proteins with high molecular weight (>45 kDa) refer to glomerular or glomerulo-tubular disorders, proteins with medium molecular weight (45-25 kDa) refer to tubulo-interstitial disorders, and proteins with small molecular weight (25-10 kDa) refer to tubular disorders.

For the treatment of dogs with the disease, an antibiotic (sephalosporin, 20 mg/kg and ampicilin, 100 mg/kg) via intramuscular, and vit C (redoxan) and vit B complex (neurogriseovit) were applied. Ringer solution with lactate and 5 % dextrose were also applied intravenously to the dogs. There was no significant differences in the values of clinically significant various serum and urine parameters between pre- and post-treatments of dogs. However, the dogs with disease recovered well according to clinical and biochemical parameters after treatment.

In conclusion, molecular weights and percentage distribution of urine protein patterns may be used routinely for the diagnosis of kidney diseases and to detect the location of disorders and although a small number of animals were used and analysed in a short time, it may also be useful for the prognosis and for the follow up of responses to the treatments.

Key Words: Dog, Kidney disorder, Proteinuria, SDS-PAGE, Urine, Serum.

Giriş

Böbrek bozuklukları (nefropati) köpeklerde hiç de küçümsenemeyecek boyutlarda olup, en önemli ölüm nedenleri arasında yer alır (1, 2). Bozukluğun görülme riski yaş ile artar (2) ve Terrier'ler başta olmak üzere bazı köpek ırkları yüksek risk taşırlar (3).

Böbrek bozukluklarında en önemli laboratuvar bulgu proteinüri olup idrarda anormal miktarda protein varlığını (300 mg/l ve üzeri) ifade eder (4) ve böbrek hastalarında prognozun iyi olmadığını gösterir (5). Böbrek kaynaklı proteinüri glomeruler veya tubuler bozukluklarla ilgili olabilir (4). Ancak, bu iki anatomik oluşumdan birinde mevcut bir bozukluk kısa süre içinde diğerine yayılabilir (6). En sık rastlanılan ve şiddetlisi glomeruler proteinüri olup plazma proteinlerinin idrarda varlığı ile karakterizedir (4, 7). Molekül ağırlığı ne olursa olsun tüm plazma proteinleri Bowman kapsülünden geçerek süzülürler ve elektroforezde sulandırılmış serum örneğine benzer bandlar verirler. (7, 8). Tubuler proteinüride protein kaybı genellikle ılımlı olup (9), plazma ile ilgili olmayan proteinler idrarda hakimdir (7).

İdrar protein bandlarının elektroforetik incelenmesi, primer böbrek bozukluklarının ayırıcı tanısında (7, 10, 11, 12, 13, 14) ve prognozunda (14, 15) yararlı olabilir,

böbrek bozukluğunun varlığını serum üre ve kreatinin değerlerindeki artıştan çok daha önce haber verebilir (16).

Çalışmada, klinik ve laboratuvar olarak böbrek bozukluğu belirtileri gösteren köpeklere ait serum ve idrar protein elektroforezi sonucu gözlenen kalitatif ve kantitatif değişiklikler ile laboratuvar ve klinik bulgular arasındaki ilişkinin incelenmesi ve idrar protein elektroforezinden veteriner klinikte rutin yararlanma yollarının araştırılması amaçlanmıştır.

Materyal ve Metot

Klinik olarak böbrek bozukluğu belirtileri gösteren ve idrar çubukları ile proteinüri saptanan (Multi-stix 10 SG Bayer diagnostics) değişik ırktan 18 erkek köpek ile (hasta) klinik olarak sağlıklı bulunan 17 erkek köpek (kontrol), çalışmanın materyalini oluşturmuştur. Sağlıklı köpeklerin bir kısmı aşılacak üzere kliniğe getirilen hayvanlardan oluşmuş, diğer kısmı ise Ankara çevresinde beslenen özel yerlerden sağlanmıştır. Yedi kangal (karabaş), 5 Alman kurt melezi, 2 yerli melez, 1 kangal melezi, 1 doberman ve 1 pekingese kontrol köpekleri oluşturmuştur (15 adedi 1-3 yaş arası, biri 4 yaşlı ve bir diğeri 5 yaşlı). Hasta köpeklerin biri 1 yaş altı, beşi 3 yaş

üzeri (en büyüğü 6 yaşında) geri kalanı ise, 1-3 yaş arasındadır (Tablo 3).

Hasta ve kontrol hayvanların klinik muayenelerinden sonra laboratuvar muayeneleri için hasta hayvanlardan sağaltım öncesi bir ve sağaltım sonrası en az bir olmak üzere toplam en az iki kez, kontrol hayvanlardan ise bir kez kan ve idrar örnekleri alınmıştır. Örnek alımları beslenmeden 6 saat sonra gerçekleştirilmiş ve kan örnekleri Vena cephana antebrachii'den alınmış ve serumları çıkarılmıştır. İdrar örnekleri, steril idrar sondaları (RÜSCH marka ureteric catheter, size 8.0) ile alınmış ve örnek üzerine bir enzim inhibitörü (propanolde % 10'luk timol çözeltisinden her ml idrara 2 damla hesabıyla) eklenerek idrar proteinlerinin bakteriyel parçalanması önlenmiştir (10).

Klinikte idrar çubukları kullanılarak idrar örneklerinin analizleri yapılmış, veriler her hayvan için ayrı ayrı işlenmiştir. İdrar proteinlerinin elektroforezi idrarda belli konsantrasyonda (>25 g/l) protein varlığını gerektirdiği için (7, 11) idrar çubukları ile proteinüri saptanan örnekler 1500 RPM'de 10 dakika santrifüjden sonra ultrafiltrasyon ile (Millipor 10.000 NMWL) konsantre edilerek serum örnekleri gibi protein elektroforezine tabi

tutulmuşlardır. Serum ve idrar proteinlerinin molekül ağırlıklarına göre ayırımı SDS-PAGE ile % 10'luk separasyon jeli üzerinde gerçekleştirilmiştir (17). Ayırımı takiben bandlar Coomassie Blue R-250 ile boyanıp metanol-asetik asit karışımında berraklaştırıldıktan sonra bir lam üzerine dikkatle yerleştirilmiş ve bandlar (Şekil 1) dansitometrede (Helena Junior 24 Model) 590 nm dalga boyunda değerlendirilmiş ve bozukluğun yerinin tespitine yorumlanmıştır (Şekil 2, 3, 4, 5 ve 6). Elektroforez işlemi çoğu örnekte hemen uygulanmış, bazı örnekler ise + 4°C'de saklanmış ve elektroforez en geç 10 gün içinde tatbik edilmiştir. Örnekleri dondurarak muhafaza önerilmemekte ve bir kaç kez çözme-dondurma olayı da uygun bulunmamaktadır (11). Serum ve idrar kreatinin miktarı Jaffe reaksiyonu ile (18), üre miktarı Modifiye Gentzkow'un nesslerizasyon yöntemiyle (19), toplam protein miktarı Biüret yöntemiyle (20) tayin edilmiştir.

Hasta 11 köpeğe günde 20 mg/kg dozda kas içi cefazolin sodium (sefazol), 7'sine de günde 100 mg/kg dozda kas içi ampisilin (ampisina), sağaltım süresince deri altı vitamin C (redoxan) ve vitamin B kompleksi (neurogriseovit) uygulanmıştır. Oligürik ve sıvı-elektrolit gereksinimi olan köpeklere 60-80 ml/kg/gün miktarında

Tablo 1. Böbrek hastası değişik ırktan köpeklere ait klinik muayene sonuçları.

Örnek No	İrk	Yaş (yıl)	Böbrek palpasyonunda ağrı		Mukozalar			İştah			Kusma		İdrar yapma (ürinasyon)			Polidipsi		Üremik Tablo	
			Var	Yok	Anemik	Hiperemik	Normal	İyi	Az	Yok	Var	Yok	Oligüri	Poliüri	Normal	Var	Yok	Var	Yok
1	Collie	2,5	X	Y	XY			Y	X		X2	Y			XY		XY		XY
2	Beagle Melezi	1,5	X			X				X		X	X				X		X
3	Alman Çoban	1,0	X	Y		X	Y	Y		X	X1	Y	X	Y		XY		XY	XY
4	Pit Bull	1,5	X	Y	X	Y		Y	X			XY	X	X	Y		XY		XY
5	Collie	4,0		XY				Y	X			XY			Y		XY		XY
6	Alman Kurt Mel.	2,0	X		X					X	X2				X		X		X
7	Pointer	1,5	X			X				X	X3				X		X		X
8	Doberman	3,0		X			X		X			X		X			X		X
9	Kangal	5,0	X			X			X			X		X		X		X	X
10	Kangal	5,0	Y	X		XY		Y	X		XY		XY		XY		XY		XY
11	Alman Kurt Mel.	2,0	X			X			X			X		X		X		X	X
12	Kangal Melezi	2,0		X	X				X			X	X				X		X
13	Kangal	6,0	X	Y	Y	X		Y		X	X1	Y	X		Y		XY		XY
14	Saint-Bernard	2,5	X			X				X	X2		X				X		X
15	Alman Kurt Mel.	0,6	X			X			X			X		X		X		X	X
16	Cocker Spaniel	6,0	X	Y		XY		Y	X		X3 Y1		X	Y			XY		XY
17	Alman Kurt Mel.	3,0	X				X	X				X		X			X		X
18	Pointer Melezi	1,2	X			X				X	X1			X			X		X
Toplam değerlendirme			14X	4X	4X	11X	3X	1X	7X	10X	8X	10X	7X	6X	5X	-	18X	-	18X
			1Y	6Y	2Y	3Y	2Y	5Y	2Y	-	1Y	6Y	-	2Y	5Y	-	7Y	-	7Y

X : Sağaltım öncesi

Y : Sağaltım sonrası (izlenen 7 köpek)

damar içi % 5 dekstroz ile laktatlı ringer çözeltisi ve/veya NaCl elektrolit çözeltileri ve 1 ml/kg dozda 2-5 ml/dak miktarında % 10'luk mannitol çözeltisi uygulanmıştır. Sentral kusma kesici olarak phenothiazin türevi olan largactil (0.3 mg/kg), belirtiler ortadan kalkıncaya kadar derialtı tatbik edilmiştir. Hastalara biyolojik değeri yüksek, kısıtlı protein (kuru maddesinde % 14-17 protein) ve özellikle fosfor ve sodyumdan fakir, enerjiden zengin bir diyet uygulanmıştır. Bunun için piyasada hazır halde bulunan köpek mamalarından yararlanılmıştır. Sağaltım sonrası, iki hasta 1 gün, üç hasta 3 gün, bir hasta 5 gün ve bir diğeri ise 7 gün süre ile izlenebilmiştir. Hastaların bazılarının uzaktan gelmesi ve hasta sahiplerinin kontrole geliştiki isteksizliği, hayvan barınak yetersizliği nedenleri ile hastaların tümü izlenememiştir.

Çalışmada kontrol ve hasta grup arasında her parametreye ait ortalama değerler arası farkın önemliliği "t testi" ile, idrar protein bandları ve bazı serum ve idrar parametrelerine ait değerler arasındaki farkın önemliliği ise tek yönlü varyans analizi ile incelenmiştir (21).

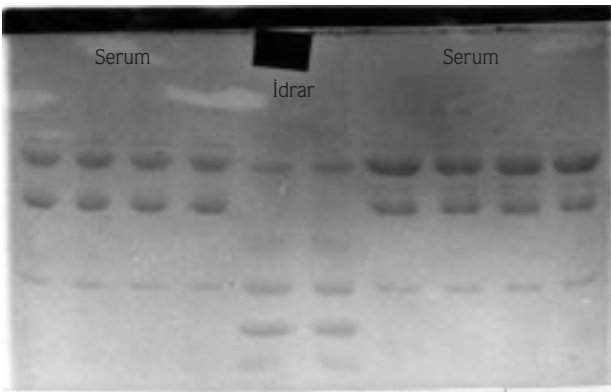
Bulgular

Klinik muayene sonrası hastalara ait bulgular Tablo 1'de görülmektedir. Bazı hastalarda rastlanan yüksek beden sıcaklığı hastalığın akut seyri ile ilişkilendirilmiştir. İzlenebilen 7 köpeğin altısında sağaltım sonrası beden sıcaklığının normal sınırlarda kaldığı, birinde ise 39.5°C'nin üzerine çıktığı saptanmıştır (Tablo 2). Hasta ve sağaltım sonrası izlenen köpeklerin hiç birinde polidipsi ve üremi tablosu gözlenmemiştir (Tablo 1). Bazı hastalarda gözlenen bilirubinüri, köpeklerde bilirubinün böbrek eşiğinin düşük oluşu ile ilişkilendirilmiştir. Sağlıklı 17 köpeğe ait nabız sayısı 88-120/dakika, solunum sayısı

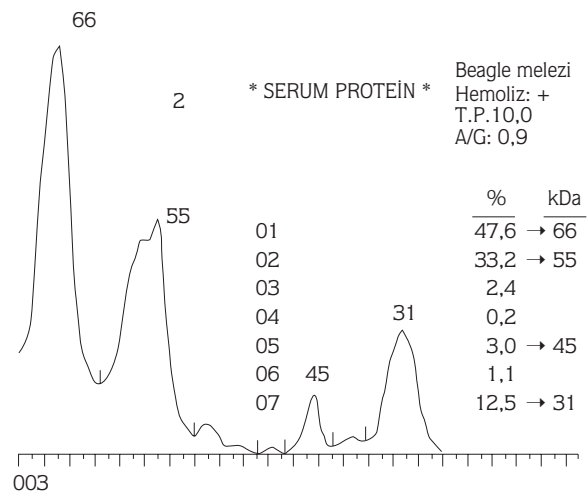
20-30/dakika ve beden sıcaklığı ise 38.5-39.5 °C olarak ölçülmüştür. Bunlara ait idrarın pH'sı 5.0-7.0 ve dansitesi 1.015-1.030 arasında tespit edilmiştir.

Proteinüri derecesi + olanların sayısı 6, ++ olanların sayısı 8, +++ ve ++++ olanların sayısı ikişer olarak kaydedilmiş ve proteinürinin hemen hemen % 50'sinin tubuler, gerisinin de glomeruler kökenli olduğu saptanmıştır (Tablo 3). Proteinüri saptanan 18 hastada, beklenildiği gibi, serum üre ve kreatinin değerlerinde kontrol gruba oranla önemli düzeyde (sırasıyla $p < 0.05$ ve $p < 0.01$) bir artış, albümin ile ilişkilendirilen 66 kDa serum protein bandında ise önemli ($p < 0.05$) bir düşüş saptanmıştır. Diğer parametreler için ortalama değerler arasında istatistik önemli bir fark bulunamamıştır (Tablo 5). Serum protein elektroforezinde kontrol ve hasta hayvanlarda 4 protein bandı (66, 55, 45 ve 31 kDa) dikkat çekici bulunmuştur (Şekil 2). Hastalarda 55 ve 45 kDa protein bandları geniş sınırlar arasında bir dağılım gösterdiği ve bireysel değerler arasında ise makroskopik olarak önemli farklılıklar olduğu saptanmıştır. Bazılarında (özellikle akut olgularda) molekül ağırlığı 55 kDa olan serum protein bandında artışa meyil, 66 kDa bandda ise önemli düşüş ($p < 0.05$) gözlenmiştir. Serum toplam protein ve albümin/globulin oranında önemli farklılıklar gözlenmemiştir (Tablo 5).

İdrar protein elektroforezi kontrol ve hasta hayvanlara ait örnekler üzerinde yürütülmüş fakat kontrol gruba ait idrar örnekleri konsantre olmalarına rağmen çok silik ve belirsiz band vermişler, dansitometrede değerlendirilememişlerdir. Hastalara ait



Şekil 1. Serum ve idrar proteinlerine ait SDS-PAGE bandları



Şekil 2. Serum protein bandlarının dansitometrik değerlendirilmesi

Tablo 2. Böbrek hastası köpeklere ait bazı fizyolojik özellikler ile serum ve idrar değerleri.

Örnek No	İdrar Protein/Kreatinin Oranı		Serum A/G Oranı		İdrar pH		İdrar Dansitesi (g/cm ³)		Beden ısı (rektal) °C		Nabız sayısı (x/dakika)			Solunum sayısı (x/dakika)							
	<0,5 Normal	0,5-1,0 İlimli	>1 Anormal	<0,59 Normal	0,59 – 1,1 Normal	>1,1 Normal	<5,5 Normal	5,5-7,0 Normal	>7,0 Normal	1,015 Normal	1,015-1,045 Normal	>1,045 Normal	<38 Normal	38,0-39,5 Normal	>39,5 Normal	<70 Normal	70 -120 Normal	>120 Normal	<15 Normal	15 -30 Normal	>30 Normal
1	X	y		X	y	X	X	y	X	X									X		
2		X		X		X	X		X										X		
3	X	y		y	X	X	X		y	X									X		
4	X	y		y	X	X	X	X	X										X		
5	X	y		X	y	X	X		X										X		
6		X				X	X		X										X		
7			X	X		X	X		X										X		
8			X	X		X	X		X										X		
9	X			y	X	X	X		X										X		
10	X	y		y	X	X	X		X										X		
11	X			X	X	X	X		X										X		
12	X			X	X	X	X		X										X		
13	y	X		X	y	X	X		X										X		
14			X	X		X	X		X										X		
15	X			X	X	X	X		X										X		
16	y		X	X	X	X	X		X										X		
17			X	X	X	X	X		X										X		
18			X	X	X	X	X		X										X		
Toplam	9 x	3 x	6 x	2 x	8 x	8 x	18 x	-	2 x	-	16 x	1 x	14 x	3 x	-	15 x	3 x	-	14 x	4 x	
	7 y	-	-	-	5 y	2 y	6 y	-	-	-	7 y	-	6 y	1 y	-	6 y	1 y	-	5 y	2 y	

x : Sağaltım öncesi

y : Sağaltım sonrası (izlenen 7 köpek)

Tablo 5. Kontrol ve böbrek hastası köpeklere ait ortalama değerler ve istatistik önemlilikleri

Parametre	n	Kontrol Grup X	Sx	n	Hasta Grup X	Sx	P	
Serum Üre (mg/dl)	17	29,13	8,89	18	57,32	49,01	p<0,05	
Serum Kreatinin (mg/dl)	17	1,09	0,29	18	2,55	1,62	p<0,01	
İdrar Kreatinin (mg/l)	17	2973,1	2254,9	18	2523,3	1785,3	Ö.D	
T.Protein (g/dl)	17	7,60	0,76	18	8,18	1,59	Ö.D	
A/G Oranı	17	1,16	0,28	18	1,02	0,39	Ö.D	
Serum Protein	66 kDa	17	51,68	6,02	18	44,50	13,16	p<0,05
	55 kDa	17	23,05	6,15	18	24,17	10,80	Ö.D
Paternleri (%)	45 kDa	17	5,67	3,92	18	6,61	3,11	Ö.D
	31 kDa	17	10,23	4,59	18	10,04	3,88	Ö.D

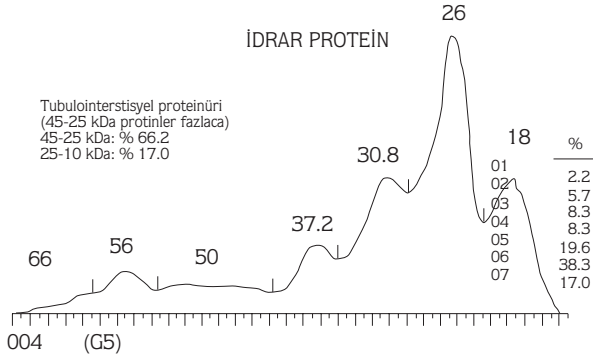
Ö.D. : Önemli değil

Tablo 6. Hastalara ait serum kreatinin değerleri ile idrar ve serum protein paternleri dağılımı

Serum Kreatinin	Örnek No	İdrar protein paternleri (%)			Serum protein paternleri (%)			
		>45 kDa	45-25 kDa	25-10 kDa	66 kDa	55 kDa	45 kDa	31 kDa
≤ 1,57 mg/dl	5	54	43,7	2,3	58,4	9,8	5,4	8,1
	6	90	5	5	29,8	37,7	10,5	10,9
	18	15	7	78	50,1	17,0	1,2	11,1
> 1,57 mg/dl	1	3	17	80	51,0	24,7	3,8	8,3
	2	16	66	18	47,6	33,2	3,0	12,5
	3	17	83	00	62,9	13,3	8,5	5,4
	4	17	65	18	59,7	15,3	4,4	7,6
	7	14	9	77	36,2	16,5	9,5	10,1
	8	69	19	12	50,9	21,3	3,7	11,3
	9	79	6	15	53,5	27,1	6,9	9,6
	10	60	26	14	51,5	18,4	6,3	11,4
	11	86	14	00	41,1	21,0	6,0	5,0
	12	85	15	00	37,0	21,5	5,1	10,3
	13	10	20	70	45,8	18,7	13,6	14,6
	14	37	48	15	20,9	54,5	5,9	5,6
	15	38	51	11	54,4	19,3	2,3	6,1
	16	83	17	00	16,0	35,4	6,8	11,6
17	25	59	16	34,1	30,3	5,3	21,3	

Tablo 7. Sağaltım uygulanan hayvanların sağaltıma verdikleri yanıt ile sağaltım öncesi ve sonrası bazı serum ve idrar değerleri dağılımı

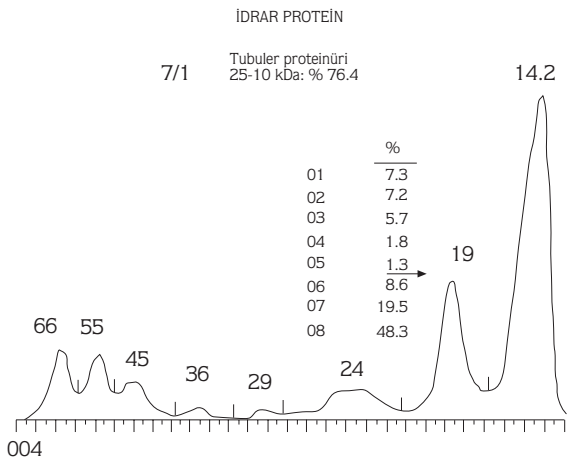
Sağaltıma Yanıt	Örnek No	Sağaltım Öncesi					Sağaltım Sonrası				
		Serum Kreatinin	İdrar Pro/Kre	> 45 kDa (%)	45-25 kDa (%)	25-10 kDa (%)	Serum Kreatinin	İdrar Pro/Kre	>45 kDa (%)	45-25 kDa (%)	25-10 kDa (%)
+	1	2,03	0,26	3	17	80	2,48	0,27	43,9	42,5	13,6
	3	2,25	0,24	17	83	00	3,40	0,06	25,8	55,6	18,6
	4	2,48	0,19	17	65	18	3,83	0,05	40,9	53,0	06,1
	5	1,13	0,18	54	44	23	1,26	0,07	56,4	38,7	04,9
	10	2,02	0,24	60	26	14	1,80	0,18	84,1	11,4	04,5
	13	3,15	0,59	10	20	70	2,92	0,12	0,00	0,00	0,00
-	16	2,30	0,47	83	17	00	2,02	0,42	76,4	23,6	0,00



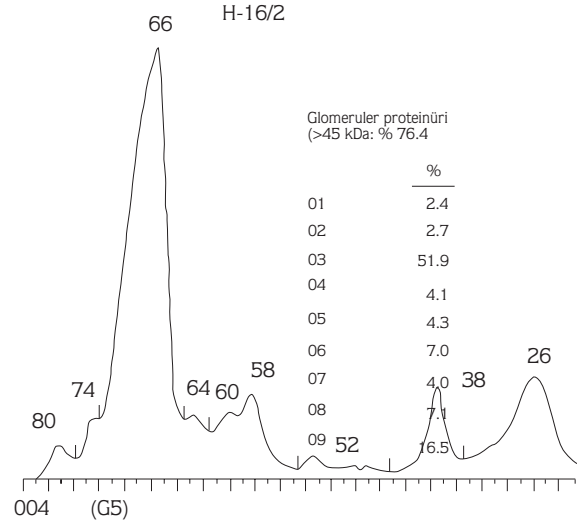
Şekil 3. Tubulo-interstisyel proteinüri'ye örnek densitometrik değerlendirme (2 nolu hasta, Beagle melezi)

olan ve SDS-PAGE ile ayırımı yapılan idrar protein bandları üç grupta değerlendirilmiştir: 1o Büyük moleküllü protein bandları (>45 kDa) dağılım yüzdelere göre glomeruler veya glomerulo-tubuler bozukluklara, 2o küçük moleküllü protein bandları (45-25 kDa) daha çok tubulo-interstisyel bozukluklara, 3o çok küçük moleküllü protein bandları (25-10 kDa) ise, tubuler bozukluklara yorumlanmıştır. Böylece, idrar protein bandlarının % dağılımlarından proteinürinin kaynağını, dolayısıyla da böbrek bozukluklarının yerini belirlemede yararlanılmıştır. Buna örnek oluşturacak birkaç densitometrik değerlendirme Şekil 3, 4, 5 ve 6'da görülmektedir.

Proteinürinin bu şekilde, 4 hastada tubuler, 4 hastada tubulo-interstisyel, 6 hastada glomeruler ve 4 hastada ise glomerulo-tubuler kaynaklı olduğu saptanmıştır (Tablo



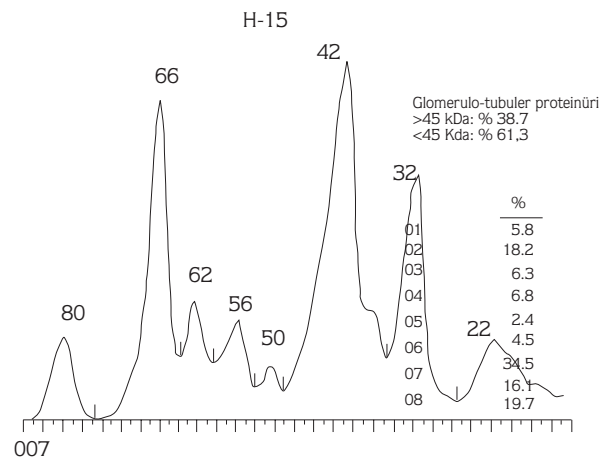
Şekil 5. Tubuler proteinüri'ye örnek densitometrik değerlendirme (7 nolu hasta, Pointer)



Şekil 4. Glomeruler proteinüri'ye örnek densitometrik değerlendirme (16 nolu hasta, Cocker spaniel)

3). Proteinüri kaynağı 7 hasta üzerinde uygulanan sağaltıma cevabın izlenmesinde de kullanılmıştır. Klinik gözlemler ve laboratuvar analiz sonuçları dikkate alınarak, bozukluğun 13 hastada akut seyirli, geri kalan 5'inde ise kronik seyirli olduğu gözlenmiştir (Tablo 3).

Hastaların dokuzunda anormal bir idrar protein/kreatinin oranı, onunda ise anormal bir serum A/G oranı hesaplanmıştır (Tablo 2). Ancak, iki hasta dışında bu anormal değerler aynı örnek üzerinde örtüşmedikleri için oranların dağılımından bireysel değerlendirme dışında genel bir sonuç çıkarmak mümkün olamamıştır.



Şekil 6. Glomerulo-tubuler proteinüri'ye örnek densitometrik değerlendirme (15 nolu hasta, Alman kurt melezi)

Kontrol gruba ait en üst serum kreatinin seviyesi olan 1.57 mg/dl esas alındığında, 18 hastanın onbeşinde değerlerin yüksek olduğu gözlenmiştir (Tablo 6). Geri kalan 3 hastada ise, kreatinin değerleri kontrol grup için hesaplanan değişim sınırları (0.58-1.57 mg/dl) içinde yer almıştır. Bu durum, idrar protein bandlarındaki kalitatif ve kantitatif değişiklikler, bozukluğu kreatinindeki artıştan önce haber verebileceğinin göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

İdrar protein bandlarına göre serum protein bandları ile bazı serum ve idrar değerleri tek yönlü varyans analizi ile incelenmiş ve gruplar arasında istatistik önemli bir fark saptanamamıştır (Tablo 4). Ancak, idrar protein bandları % dağılımlarından, klinikte böbrek bozukluğunu tanımada ve yerini belirlemede rutin olarak yararlanılabileceği sonucu ortaya çıkmıştır (Tablo 3). Çok kısa süre izlenebilen 7 hastanın altısında sağaltıma olumlu yanıt anlamına gelebilecek sonuçlar elde edilmiştir (Tablo 3 ve 7). Sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası idrar protein bandları ile serum kreatinin değerleri ve idrar protein/kreatinin oranları arasında anlamlı bir ilişki bulunamamıştır (Tablo 7). İdrar protein/kreatinin oranında sağaltım sonrası önemli düşüşler saptanmış ve diğer belirtiler ile birlikte sağaltıma olumlu yanıt anlamında yorumlanmıştır.

Tartışma ve Sonuç

Kontrol köpeklerde beden sıcaklığı 38.5-39.5°C; nabız sayısı dakikada 88-120; solunum sayısı ise dakikada 20-30 arasında ölçülmüştür. Köpeklerde normal değer olarak, beden sıcaklığı 38.0-39.5 °C arasında, nabız sayısı dakikada 70-120 arasında, solunum sayısı ise dakikada 15-30 arasında bildirilmiştir (22). Klinik incelemede, bazı köpeklerde saptanan beden sıcaklığı, nabız ve solunum sayılarındaki artışlar enfeksiyonun şiddeti ile değerlendirilmiştir (23). Akut nefritis olgularında, seyrek olarak, köpeğin genel durumu bozulabilir ve iştah azalabilir (23), abdominal palpasyonda özellikle sol böbrek bölgesinde ağrı hissi belirlenebilir (23, 24). Çalışmadaki köpeklerin, bu bildirimlerin aksine, onunda iştahın tamamen kaybolduğu, yedisinde azaldığı, birinde ise normal olduğu görülmüştür. On dört köpekte ise, akut nefritis belirtisi olarak abdominal palpasyonda sol böbrek bölgesinde ağrı hissi belirlenmiştir (Tablo 1). Akut nefritis olgularında, köpeklerde, mukozalar çoğunlukla solgun ve anemiktir (23). Mukozaların muayenesi sırasında, 11

hastada hiperemi saptanması, enfeksiyonun daha çok akut ve şiddetli oluşuna yorumlanmıştır. Yedi hastada ise, bu bildirimlere uygun olarak mukozaların anemik veya normal olduğu gözlenmiştir (Tablo 1). Bu durum, böbrek bozukluğuna bağlı olarak bir yandan kemik iliğinin olumsuz etkilenmesi, diğer yandan eritropoietin sentezi ve salınımının azalması ile ilgili olabilir (25). Çalışmadaki hastaların sekizinde günde 2-3 kez kusma görülmesi akut nefritise yorumlanmıştır. Nitekim, akut veya kronik nefritis olgularında kusma görülebileceği bildirilmiştir (23).

Köpeklerde nefritis olgularının başlangıç döneminde, koyu renkte yoğun bir idrarla birlikte hastalarda oligüri dikkati çekebilir ve daha sonra bunu poliüri izleyebilir. Kronik böbrek yetmezliklerinde ise poliüri ile birlikte polidipsi de gözlenir (25). Araştırmadaki hasta köpeklerin yedisinde oligüri, altısında ise poliüri kaydedilmiştir (Tablo 1). Hastaların hiç birisinde polidipsi görülmemesi, belirtilerin genellikle akut böbrek yetmezliğinden kaynaklandığına yorumlanmıştır.

İzlenen 7 hastada, diyet uygulamasına başladıktan sonra iştahın 2 köpekte hafif, 5 köpekte ise iyi derecede düzeldiği görülmüş (Tablo 1) ve bunun diğer klinik ve laboratuvar bulgulara paralel olarak ortaya çıktığı saptanmıştır. Diyete bağlı herhangi bir yan etki gözlenmemiştir. İzlenen hastalarda klinik göstergelerin büyük çoğunlukla düzelmesi veya normale dönmesi (Tablo 1, 2, 3) uygulanan sağaltım yöntemlerinin etkinliğine yorumlanmıştır.

İdrar kreatinin miktarı için grup ortalamaları arasında istatistik önemli bir fark bulunamamıştır. Ortalama değer hastalarda 2523.3 mg/l, kontrollerde 2973.1 mg/l olarak bulunmuştur (Tablo 5). İdrar dansitesi normal olarak köpeklerde 1015-1045 arasında bildirilmiştir (8). Kontrol köpeklerde idrar dansitesi 1.015-1.030 arasında bulunmuştur. Hastaların onaltısında dansite 1.015-1.030 arasında, ikisinde ise 1.015'in altındadır (Tablo 2). İdrar dansitesi böbreğin idrarı konsantre etme yeteneğinin bir ölçüsüdür ve daha çok tubuler bozukluğa yorumlanır (25). Düşük dansiteli idrar örneğine sahip iki hastada da poliüri gözlenmiş (Tablo 1) ve sadece birinde literatüre uygun olarak proteinürinin kaynağı tubulo-interstisiyel olarak belirlenmiştir. Diğer hastada ise proteinüri kaynağının glomeruler olduğu saptanmıştır (Tablo 3). İdrar pH'sı kontrollerde 5.0-7.0; hastalarda ise 5.5-7.0 arasında bulunmuş ve değerler normal sınırlar arasında yorumlanmıştır (Tablo 2).

İdrarda protein/kreatinin oranı idrarla günlük protein kaybının saptanmasında iyi bir göstergedir. İdrarın sulandırılması proteinürilerin kantitatif yorumunda esansiyel bir faktördür. Bu, rasgele zamanda idrar örneği alınımında bilhassa önemlidir. En sık kullanılan düzeltme, aynı birim ile ifade edilmek koşulu ile idrar protein düzeyini kreatininkine oranlamak şeklindedir. Bu oran, idrarın sulandırılmasından ve yoğunlaştırılmasından etkilenmez. Hayvan ister sağlıklı ister glomeruler bozukluklu olsun günlük toplam atılımla uyumludur. Hafif hematüriler bu oranın tanısai değerini etkilemez. Günün ya da gecenin değişik zamanlarında besin alımına göre de değişmez (3). Çalışmada elde edilen 0,5'ten düşük oranlar "normal", 0.5-1.0 arası oranlar "ılımlı" ve 1.0'den büyük oranlar ise "anormal" olarak değerlendirilmiş (3) ve dokuz hastada (% 50) normal dışı bulunmuştur. Üç hastada ılımlı kabul edilen değişiklik, 6 hastada anormal olarak yorumlanmıştır (Tablo 2). Özellikle üç hastada (Örnek no: 8, 16, 17) bu oranın 4.0'ün üzerinde olması bozukluğun yeri ve şiddeti ile ilişkilendirilmiştir. Bu hastalardan ikisinde bozukluğun glomeruler, birinde ise glomeruler katkılı tubulo-interstisiel (karışık) olduğu saptanmıştır (Tablo 3). Glomerulonefritte idrar protein/kreatinin oranının 5 ve üzerinde olabileceği bildirilmiştir (3).

Serum üre ve kreatinin değerlerinin hastalarda bir hayli yüksek ve istatistik önemli (sırasıyla $p<0.05$ ve $p<0.01$) olduğu, toplam protein değerleri ve A/G oranı açısından önemli bir farklılık olmadığı saptanmıştır (Tablo 5). Köpeklerde normal serum üre değeri 20-40 mg/dl olup 102-120 mg/dl'nin üzerinde "üremi"den söz edilebilir (8). Normal serum kreatinin ve toplam protein değerleri ise sırasıyla 0.5-1.5 mg/dl ve 6.3-8.1 g/dl arasında verilmiştir (26). Serum kreatinin için 1.57 mg/dl'nin üzerindeki değerler idrar oluşumunda ve atılmasında bozukluğa yorumlanmıştır (8, 9, 27).

Serum kreatinin değerleri şüpheli 3 örnek dışında hastaların tümünde yüksek bulunmuştur (Tablo 6). Bu üç hayvanın idrar protein bandları ve klinik bulguları böbrek hastası olduklarını göstermektedir. Böbrek bozukluğu saptanan bu üç hastada serum kreatinin değerlerinin normal sınırlar içinde oluşu literatüre (16) uygun olarak, idrar proteinlerinin molekül ağırlıkları dağılımı böbrek bozukluğunu serum üre ve kreatinin artışından önce haber verebileceğine yorumlanmıştır. Çünkü, serum üre ve kreatinin için anormal yüksek değerler nefronların yaklaşık % 75'inin görev dışı kalması halinde mümkündür

(25). Hastalarda yüksek serum kreatinin düzeyleri ile serum ve idrar protein bandları dağılımı arasında beklenen ilişki, literatürdeki gibi (14) istatistik önem düzeyinde ortaya konamamıştır (Tablo 6). Hafif derecede serum protein artışları, köpeklerin bakım-beslenme koşulları ve immün sistemleri ile ilişkili olarak değerlendirilmiştir.

Serum protein elektroforezi ve dansitometrik okumalar sonunda 4 temel protein bandı (66, 55, 45 ve 31 kDa) saptanmıştır (Şekil 2). Serum protein bandları % dağılımı açısından 66 kDa bandın hastalarda düşük, 55 ve 45 kDa bandların yüksek olduğu ve 31 kDa bandın ise değişmediği gözlenmiş, istatistik olarak sadece 66 kDa banddaki değişikliğin anlamlı olduğu ($p<0.05$) saptanmıştır (Tablo 5). Serum albümini ile aynı molekül ağırlığına sahip bu banddaki önemli düşüşün böbrek bozukluğu ile ilişkilendirilebileceği ve bu banddaki değişikliklerden, böbrek hastalarına uygulanacak olan sağaltımın izlenmesinde yararlanılabileceği ortaya çıkmıştır. Oligüri veya anüri ile birlikte serum protein elektroforezinde 55 kDa band artışı, bozukluğun akut oluşuna yorumlanmıştır.

Proteinürinin idrar örneği alışı saatleri, yaş, cinsiyet, ağırlık ve vücut yüzeyi ile etkilenmediği, cinsiyetin sadece kateterle idrar kesesinden örnek alınımında etkili olabileceği, erkeklerde üretral ve prepusial kaynaklı olması nedeniyle konsantrasyonun hafif yükselebileceği bildirilmiştir (28).

Böbrek hastası insanlarda idrar protein bandlarının böbrek bozukluklarının yeri ile ilişkili olduğu ve 67 kDa ve üzerinde protein bandlarının glomeruler proteinüriye, 67-23 kDa arası bandların karışık glomerulo-tubuler proteinüriye işaret ettiği ifade edilmiştir (29). Benzer bir diğer çalışmada (14), proteinüri SDS-PAGE ile incelenmiş ve 4 band elde edilmiştir. Buna göre, 70 kDa protein uzaklaştırılması fizyolojik proteinüri, 150 kDa protein atılması saf glomeruler proteinüri, 23 kDa düşük moleküllü karışık proteinüri ve 10 kDa (yada 23-10 kDa arası) çok düşük moleküllü proteinüri şeklinde ifade edilmiştir. Burada, sadece iki band (23 ve 10 kDa) düşük molekül ağırlıklı protein olarak karakterize edilmiş ve tubulo-interstisiel bozukluk için farklılık istatistik yönden önem sınırında bulunmuştur.

Çalışmada, idrar proteinleri SDS-PAGE ile incelenmiş ve konu ile ilgili literatürlerden de (14, 29) yararlanılarak 3 grupta değerlendirilmiştir. 45 kDa'dan büyük moleküllü

protein bandları glomeruler ya da glomerulo-tubuler bozukluklara, 45-25 kDa arası küçük molekül protein bandları tubulo-interstiel bozukluklara ve 25-10 kDa arası çok küçük molekül protein bandları ise tubuler bozukluklara yorumlanmıştır (Tablo 3). İdrarda 45 kDa ve üzeri protein yüzdesi 70 ve yukarıya ise proteinüri glomeruler kaynaklı, 45 kDa'luk band yanında 45-25 kDa'luk band yüzdesi de önemli bir yer tutuyorsa ve idrar protein dağılımının dansitometrik görünümü aynen serum proteinlerindeki gibi ise glomerulo-tubuler kaynaklı olarak değerlendirilmiştir.

Sağaltıma yanıt veren hayvanlarda sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası serum kreatinin değerleri arasında önemli bir fark saptanamamıştır (Tablo 7). Bu durum, serum kreatinin değerlerinde çok kısa olan sağaltım süresinde anlamlı bir düşüşün fizyolojik olarak mümkün olamayacağı şeklinde yorumlanmıştır.

İdrar protein bandlarında düşük molekül ağırlıklı protein varlığının yüksek serum kreatininin değerleriyle önem kazanabileceği ve tubulo-interstiel lezyonlara yorumlanabileceği bildirilmiştir (30). Çalışmada, hastalara ait serum kreatinin değerlerinin yüksek olduğu saptanmıştır (Tablo 5).

Sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası idrar protein bandları ile serum kreatinin değerleri ve idrar protein/kreatinin oranı incelenmiş ve serum kreatinin değerleri açısından önemli bir fark bulunamamış, idrar protein bandları ise % olarak normal dağılım göstermediklerinden istatistik veri alınamamış ve serum kreatinin ile ilişkisi gösterilememiştir. İdrar protein/kreatinin oranı açısından sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası farkın önemli olduğu gözlenmiştir (Tablo 7). İdrar protein/kreatinin oranındaki düşüş sağaltıma yanıtta önemli bir bulgu olarak değerlendirilir. İdrar protein/kreatinin oranı ile düşük ve yüksek molekül

ağırlıklı idrar protein bandlarının SDS-PAGE ile ayırımı böbrek bozukluklarında belirleyici olabilir (31). Çalışmada, sağaltım sonrası oranlarda önemli düşüşler gözlenmiş ve sağaltıma yanıtta pozitif olarak değerlendirilmiştir (Tablo 3, 7).

İdrar protein bandlarına göre serum protein bandları ile bazı serum ve idrar değerleri tek yönlü varyans analizi ile incelenmiş ve istatistik önemli ilişkiler saptanamamıştır (Tablo 4).

Böbrek bozukluğunun tahmini olarak akut/kronik oluşu, hastalığın kesin tanısından sonra günlük olarak çıkarılan idrar miktarı ve elektroforezden elde edilen protein bandının (55 kDa) artışı dikkate alınarak değerlendirilmiştir. Oligüri veya anüri ile birlikte serum protein elektroforezinde 55 kDa band artışı, bozukluğun akut oluşuna yorumlanmıştır.

Önemli bazı serum ve idrar parametrelerine ait sağaltım öncesi ve sağaltım sonrası değerler arasında istatistik önemli bir farklılık bulunamamışsa da, sağaltım sonrası izlenen hasta köpeklerde klinik parametrelerin büyük çoğunlukta düzelmesi veya normale dönmesi, uygulanan sağaltım yöntemlerinin etkinliğine yorumlanmıştır.

Çalışma sonucunda, böbrek bozukluğundan şüpheli ve proteinüri saptanan köpeklerde idrar proteinlerinin molekül ağırlıklarının incelenmesinden veteriner hekimliğinde, primer böbrek hastalıklarının erken ve ayırıcı tanısında, yerinin saptanmasında rutin yararlanılabileceği ortaya çıkmıştır. Ayrıca, izlenen hasta sayısı az ve sağaltımı izleme süresi kısa olmakla birlikte, prognozda da yararlanılabileceği, uygun ve ekonomik bir sağaltım programının etkinlikle belirlenebileceği, hastanın klinik gözetim süresi ve hastalığın seyri üzerine de yararlı katkı sağlayabileceği kanısına varılmıştır.

Kaynaklar

1. Berkin, Ş ve Alçıgır, G.: 1973-1984 periyodunda incelenen 523 köpeğin post-mortem bulguları üzerinde survey çalışma. A.Ü.Vet. Fak. Derg. 1986; 33 (1) : 153-164.
2. Pages, J.P., Trouillet, J.L.: Les maladies rénales chez le vieux chien étude de l'examen histopat-hologiques de chiens âgés de plus de 9 ans. Prat. Méd. Chir. Anim.Comp.1990; 25 (5):559-563.
3. Lulich, J.P., Osborne, C.A., Polzin, D.J.: Diagnosis and long-term management of protein-losing glomerulonephropathy. A 5-year Case-based approach. Vet. Clin. North Amer. Small Animal Practice, 1996; 26 (6) : 1401-1405.
4. Pages, J.P., Trouillet, J.L.: Les Protéinuries. Prat. Méd. Chirur. Anim. Comp.1990; 25 (6): 585-597.
5. Woo, K.T., Lau, Y.K.: Pattern of proteinuria in tubular injury and glomerular hyperfiltration. Ann Acad Med Singapore, 1997; 26 (4) : 465-470.
6. Pamukçu, M.: Üriner Sistem Hastalıkları. Veteriner Patoloji. III. Cilt. 2. Bölüm. A.Ü. Veteriner Fakültesi yayınları : 309. Ankara, p.7-47, 1974.

7. Guelfi, J.F., Florio, R.: De l'électrophorese des protéines sériques et urinaires en pathologie canine. Rev. Méd. Vét., 1974; XXXVII (1): 1-26.
8. Braun, J.P., Cotard, J.P., Delverdier, M., Guelfi, J.F., Lefebure, H., Med ille, C., Pages, J. P., Pechereau, D.: Exploration biologique du rein. Prat. Méd. Chir. Anim. Comp, 1996; Special, Supplement 4.
9. Whitby, L.G., Smith, A.F., Beckett, G.J., Walker, S.W.: Renal Disease (Chapter 9). Lecture Notes on Clinical Biochemistry. Blackwell Science, Australia, p 139, 1996.
10. Groulade, J., Groulade, P., Gros Lambert, P.: Electrophorese des protéines urinaires chez le chien. Bull. Acad. Vét. Fr, 1977; 50, 499.
11. Valle-Perot, F.: Electrophorese des protéines sériques et Urinaires chez le chien insuffisant renal, (These pour le Doctorat Vétérinaire), Ecole Nationale Vétérinaire D'Alfort, 1982.
12. Stierle, H.E., Oser B., Boesken, W.H.: Improved classification of proteinuria by semiautomated ultrathin SDS polyacrylamide gel electrophoresis. Clin Nephrol, 1990; 33 (4) : 168-173.
13. Pedraza-Chaverri, J., Sosa, G., Cruz, C., Medina-Campos, O.N., Ibarra-Rubio, M.E.: Time course analysis of serum and urinary proteins by SDS-PAGE in experimental nephrotic syndrome. Ren. Fail, 1996; 18 (2) : 181-194.
14. Bazzi, C., Petrini, C., Rizza, V., Arrigo, G., Beltrame, A., D'Amico, G.: Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides. SDS-PAGE patterns: clinical significance and prognostic value of low molecular weight ("tubular") proteins. Am J. Kidney Dis, 1997; 29 (19) : 27-35.
15. Batamuzi, E.K., Kristensen, E., Jense, A. L.: Serum protein electrophoresis: Potential test for use in geriatric companion animal health programmes. Zentralbl Veterinarmed A, 1996; 43 (8):501-508.
16. Meyer-Lindenberg, A., Wohlsein P., Trautwein G., Nolte, I.: Urine protein analysis with the sodium-dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel-electrophoresis (SDS-PAGE) in healthy cats and cats with kidney diseases. Zentralbl Veterinarmed A, 1997; 44 (1) : 39-54.
17. Anonim, HSI, Hoefel Scientific Instruments, laboratuvar el kitabı. San Francisco, USA, 1993.
18. White, W.L., Erickson, M.M., Stevens, S.C.: Chemistry for the Clinical Laboratory. 4 th edn. IX+756, The Mosby Comp. Saint Louis, 1976.
19. Annino, J. S.: Clinical chemistry. Little, Brown and Co., p 155, 1964.
20. Natelson, S.: Microtechniques of Clinical Chemistry. 2nd edn, Charles C. Thomas. Publisher. Springfield, Illinois, USA. p.346, 1961.
21. Kutsal, A., Alpan, O., Arpacık, R.: İstatistik uygulamalar. X+231, Ankara, 1990.
22. İmren, H.Y.: Veteriner İç Hastalıklarına Giriş. Medisan Yayınevi. Ankara, p 47, 65, 90, 1994.
23. Freudiger, U., Nieren., Harnwege. In: Freudiger, U., Grünbaum, E.G., Schimke, E.: Klinik der Hundekrankheiten. Ferdinand Enke Verlag. Stuttgart, 1997.
24. Brown, S.A., Barsanti, J.A.: Diseases of the bladder and urethra. In: Ettinger, S.J.: Textbook of Veterinary Internal Medicine Diseases of the dog and cat. W.B. Saunders Company. Philadelphia, p.1208-1241, 1989.
25. Kaneko, J.J.: Clinical Biochemistry of Domestic Animals. Third ed., XIII+832, Academic Press. Inc. London. 1980.
26. Altıntaş, A ve Fidancı, U.R.: Evcil hayvanlarda ve insanda kanın biyokimyasal normal değerleri. A.Ü.Vet.Fak.Derg, 1993; 40 (2) : 173-186.
27. Finco, D.R., Duncan, J.R.: Evaluation of blood urea nitrogen and serum creatinine concentrations as indicators of renal dysfunction: A study of 111 cases and a review of related literature. J. Amer Vet Med Assoc, 1976; 168 : 593-601.
28. Barsanti, J.A., Finco, D.R.: Protein concentration in urine of normal dogs. Amer. J. Vet. Res, 1979; 40, 1583-1588.
29. Bazzi, C., Petrini, C., Rizza, V., Arrigo, G., Beltrame, A., D'Amico, G.: Characterization of proteinuria in primary glomerulonephritides: Urinary polymers of albumin. Am J. Kidney Dis, 1997; 30 (3): 404-412.
30. Nagy, J., Miltenyl, M., Dobos, M., Burger, T.: Tubular proteinuria in Ig A glomerulonephritis. Clin. Nephrol, 1987; 27 : 76-78.
31. Chamberland, G., Belanger, D., Dallaire, A., Blais, J.S., Vermette, L., Lariviere, N.: Urinary protein excretion of semidomesticated mink in a chronic methylmercury study. J. Toxicol Environ Health, 1996; 47 (3): 285-297.

