

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İDRARDA TOTAL PROTEİN VE ALBÜMİN DÜZEYİNİN TAYİNİNDE
KULLANILAN YÖNTEMLERİN PERFORMANS ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

Uzmanlık Tezi

Dr. Tuba ESEN

TRABZON - 2011

**T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**İDRARDA TOTAL PROTEİN VE ALBÜMİN DÜZEYİNİN TAYİNİNDE
KULLANILAN YÖNTEMLERİN PERFORMANS ÖZELLİKLERİNİN
BELİRLENMESİ**

**DETERMINATION OF PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF METHODS
USED FOR TOTAL PROTEIN AND ALBUMIN MEASUREMENTS IN URINE**

Uzmanlık Tezi

Dr. Tuba ESEN

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. Orhan DEĞER**

TRABZON - 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık tezi olarak sunduğum bu çalışmada bilgi ve deneyimlerini aktaran, her konuda bana yardımcı olan tez danışmanım Sayın Prof. Dr. Orhan DEĞER olmak üzere, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri Prof. Dr. E. Edip KEHA'ya, Prof. Dr. Asım ÖREM'e, Prof. Dr. Caner KARAHAN'a, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU'na, Doç. Dr. Birgül VANİZÖR KURAL'a, Doç. Dr. Ahmet ALVER'e, Yrd. Dr. Fulya BALABAN YÜCESAN'a Nefroloji A.D. öğretim üyesi Prof. Dr. Şükrü ULUSOY'a,

Yardımlarından dolayı çalışma arkadaşlarım Dr. Filiz İRHAN'a, Dr. Utku UÇAR'a, Dr. Ayşegül TURAN'a, Dr. Sabiha KAMBUROĞLU'na, Dr. Selçuk YAMAN'a, Dr. Ayşegül YILMAZ'a, Dr. Nazime ÇEBİ'ye, Dr. Suret AĞAÇ'a, Dr. Hüseyin YAMAN'a, Arş. Gör. Dr. Ayşe Akyüz ŞENTÜRK'e, Arş. Gör. Dr. Diler US'a, Arş. Gör. Dr. Cemil KAHRAMAN'a, Arş. Gör. Dr. Tuba ÇAKIROĞLU'na, Arş. Gör. Dr. Tuğba MAZLUM'a, Arş. Gör. Dr. Buket AKCAN'a, Arş. Gör. Dr. İbrahim TURAN'a, Arş. Gör. Dr. Selim DEMİR'e ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, bölüm sekreterimiz Mine KARAMUSTAFA'ya

Rutin laboratuvarındaki tüm çalışanlara,

Her zaman bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme, özellikle kız kardeşim Leyla BENAN AYRANCI'ya en içten dileklerle teşekkür ederim.

Dr. Tuba ESEN

Trabzon, 2011

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iii
TABLolar DİZİNİ.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
KISALTMALAR DİZİNİ.....	viii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Böbreklerin Anatomisi	4
2.2. Böbrek Fonksiyonları	5
2.2.1. Böbreğin Sekretuar Fonksiyonları	5
2.2.2. Böbreğin Düzenleyici Fonksiyonları	6
2.2.3. Böbreğin Metabolik Fonksiyonları	6
2.3. Glomerüler Filtrasyon	6
2.3.1. Büyüklük Seçici Özellik.....	7
2.3.2. Yük Seçici Özellik	8
2.3.3. Proteinlerin Tübüllerden Reabsorbsiyonu.....	8
2.4. Proteinüri	9
2.4.1. Proteinüri Tipleri	10
2.4.1.1. Atılan Protein Miktarına Göre Proteinüriler	10
2.4.1.1.1. Nefrotik Olmayan Proteinüri	10
2.4.1.1.2. Mikroalbuminüri	10
2.4.1.1.3. Nefrotik Proteinüri	10
2.4.2. Devam Etme Süresine Göre	11
2.4.2.1. Geçici Proteinüri	11
2.4.3. Oluş Mekanizmasına Göre	12
2.4.3.1. Glomerüler Proteinüri	12
2.4.3.2. Tübüler Proteinüri	15
2.4.3.3. Taşma Proteinürisi.....	15
2.5. Hastalıklarda Proteinüri Mekanizmaları	15
2.6. İdrarda Protein Ölçüm Yöntemleri.....	17

2.6.1. İdrarda Proteinin Kalitatif Ölçüm Yöntemleri	17
2.6.2. İdrarda Proteinin Semikantitatif Ölçüm Yöntemi	19
2.6.3. İdrarda Proteinin Kantitatif Ölçüm Yöntemleri	20
2.6.3.1. Türbidimetrik Yöntemler	21
2.6.3.2. Boya Bağlayıcı Yöntemler	22
2.6.3.3. Diğer Yöntemler.....	23
2.7. Albüminüri	24
2.7.1. İdrardaki Bulunan Albüminin Moleküler Yapısı	25
2.7.2. İdrarda Albüminin Ölçüm Yöntemleri	26
2.7.2.2. İmmünonefelometrik Yöntem	27
2.7.2.3. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi).....	28
3. MATERYAL VE METOD	29
3.1. Materyal	29
3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler.....	29
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	29
3.2. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması	30
3.2.1. Retrospektif Grup.....	30
3.2.2. Prospektif Grup	30
3.2.3. Otoanalizörlerde Tayin Edilen Parametreler.....	30
3.2.3.1. İdrarda Albümin (Nefelometre)	30
3.2.3.2. İdrarda Albümin (İmmünotürbidimetrik).....	31
3.2.3.3. İdrarda Protein (Türbidimetrik).....	32
3.2.4. Lowry Yöntemi	33
3.2.5. Bradford Yöntemi	34
3.2.6. Modifiye Purdy Yöntemi	35
3.2.7. İstatistiksel Analiz	35
4. BULGULAR	37
4.1. Retrospektif Çalışma Grubunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları.....	37
4.2. Prospektif Çalışma Grubunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları	41
4.2.1. İdrarda Albüminin Analiz Sonuçları	41
4.2.2. İdrarda Albüminin Analiz Yöntemlerinin Performans Verileri	43
4.2.3. İdrarda Protein Analiz Sonuçları.....	45
4.2.2. İdrarda Protein Analiz Yöntemlerinin Performans Verileri	52
5. TARTIŞMA.....	54

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	60
6.1. Sonuçlar.....	60
6.2. Öneriler.....	61
7. ÖZET	62
8. SUMMARY	63
9. KAYNAKLAR.....	64

TABLOLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1. Primer Glomerüler Hastalıklar	13
Tablo 2. Sekonder Glomerüler Hastalıklar	14
Tablo 3. İdrarda Protein Ölçüm Yöntemlerinin Analitik Performansları	23
Tablo 4. Albuminürinin Sınıflandırılması.....	24
Tablo 5. Protein Tayini Standart Numunelerinin Miktarı ve Eklenme Sırası.....	34
Tablo 6. İmmünotürbidimetrik ve İmmünonefelometrik Yöntemle Ölçülen İdrar Albüminleri.....	42
Tablo 7. İmmünotürbidimetrik ve İmmünonefelometrik Yöntemle Ölçülen İdrar Albümin Analizleri mg/dL (n=30)	42
Tablo 8. İmmünotürbidimetrik Yöntemle İdrarda Albüminin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları.....	44
Tablo 9. İmmünotürbidimetrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi İntraassay Albüminin % CV Sonuçları	44
Tablo 10. İmmünonefelometrik Yöntemle İdrarda Albüminin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları.....	45
Tablo 11. İmmünonefelometrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi İntraassay Albüminin % CV Sonuçları	45
Tablo 12. Lowry, Bradford, Türbidimetre, Modifiye Purdy Yöntemleriyle Çalışılan İdrarda Total Protein Değerleri mg/ dL.....	46
Tablo 13. Dört Yönteme Ait İdrarda Total Protein Analiz Sonuçları mg/dL (n=40)	47
Tablo 14. Lowry Yöntemliyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Albüminin Çalışma İçi % CV Sonuçları.....	52
Tablo 15. Bradford Yöntemiyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları.....	52
Tablo 16. Modifiye Purdy Yöntemiyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları	52
Tablo 17. Türbidimetrik Yöntemle İdrarda Protein Analizinin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları.....	53
Tablo 18. Türbidimetrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları	53
Tablo 19. İdrar Total Protein Ölçümünde Dört Yöntemin Analitik Hassasiyeti	57
Tablo 20. İdrar Albümin Ölçümünde İki Yöntemin Analitik Hassasiyeti.....	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1. Böbreğin Anatomik Yapısı	4
Şekil 2. Nefronun Yapısı.....	5
Şekil 3. Glomerüler Kapiller Duvarın Histolojik Yapısı	7
Şekil 4. İmmünotürbidimetrik Metod	27
Şekil 5. Lowry Standart Grafiği	34
Şekil 6. Bradford Standart Grafiği	35
Şekil 7. Olguların İdrar Albümin Değerlerinin Frekans Dağılımı	37
Şekil 8. Olguların İdrar Albümin Değerlerinin Yüzde Dağılımı	38
Şekil 9. Olguların İdrar Total Protein Değerlerinin Frekans Dağılımı	38
Şekil 10. Olguların İdrar Total Protein Değerlerinin Yüzde Dağılımı	39
Şekil 11. İdrar Albümin ve Total Protein Düzeyleri (n=977) Arasındaki Regresyon Grafiği.....	40
Şekil 12. İmmünonefelometrik ve İmmünotürbidimetrik Metodlarla İdrarda Albümin Ölçümünün, Doğrusal Regresyon Grafiği	43
Şekil 13. Dört Yönteme Ait İdrarda Total Protein Analiz Sonuçlarının Grafiği	47
Şekil 14. Lowry Yöntemi ile Bradford Yöntemlerinin Regresyon Grafiği	48
Şekil 15. Lowry Yöntemi ile Türbidimetre Yöntemlerinin Regresyon Grafiği.....	49
Şekil 16. Lowry Yöntemi ile Modifiye Purdy Yöntemlerinin Regresyon Grafiği	49
Şekil 17. Modifiye Purdy Yöntemi İle Bradford Yöntemlerinin Regresyon Grafiği	50
Şekil 18. Modifiye Purdy Yöntemi ile Türbidimetri Yöntemlerinin Regresyon Grafiği.....	51
Şekil 19. Bradford Yöntemi ile Türbidimetri Yöntemlerinin Regresyon Grafiği	51

KISALTMALAR DİZİNİ

DM	: Diabetes Mellitus
GKD	: Glomerüler kapiller duvar
GBM	: Glomerüler bazal membran
HNO₃	: Nitrik asit
IGF-I	: İnsülin Growth Faktör -I
IL-1	: İnterlökin -1
IL-8	: İnterlökin-8
MA	: Molekül Ağırlığı
MCNS	: Minimal değişiklik gösteren nefrotik sendrom
MCP-1	: Monosit Kemoatraktan Protein
NF-κB	: Nükleer faktör-kappa-B
RANTES	: Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted
SD	: Slit diyafram
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SLE	: Sistemik Lupus Eritematozus
SSA	: Sülfosalisilik asit
TCA	: Triklorasetik asit
TNF-α	: Tümör Nekrozis Faktör Alfa

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Proteinüri, 200 yıldan daha uzun süre önce tanımlanmıştır. 1827 yılında ilk olarak Richard Bright albümin içerikli idrar ile böbrek hastalığını ilişkilendirmiştir (1).

Normal idrar, proteinleri, albumin, Tamm-Horsfall proteini, Ig fragmentleri, düşük molekül ağırlıklı proteinleri içerir. Sağlıklı insanlarda referans değeri < 150 mg /gün'dür. Bunun üzerindeki atılım proteinüri olarak tanımlanır (2).

Proteinürideki ısrarlı bir artış genellikle böbrek hasarının bir göstergesidir. Böbrek hastalığının tipine bağlı olarak düşük molekül ağırlıklı globulinler ve albumin idrara çıkar. Düşük molekül ağırlıklı globulinlerin çıkışındaki artış tübülointersisyal hastalığın bazı tipleri için tanıda kullanılmaktadır. Albümin atılımındaki artış diabetes mellitus, glomerüler hastalık veya hipertansiyon sonucu oluşan kronik böbrek hastalığının duyarlı bir belirteçidir (3).

İdrarda total protein tayini;

1. Lowry metodu
2. Triklorasetik asit veya sülfosalisilik asit ile muamele sonrası türbidimetrik tayin
3. Benzetonyum klorür, amonyum klorür ile muamele sonrası türbidimetrik tayini
4. Coomassie brilliant blue ile boyama
5. Pirogallol kırmızı, molibdat ile boyama yöntemleriyle yapılmaktadır (4).

Benzetonyum klorür içeren türbidimetrik veya boya bağlayıcı yöntemler bir çok Laboratuarda manuel tekniklerin yerini almıştır (2).

İdrar kompleks bir karışımdır. Geniş değişken osmalitesi, iyonik kompozisyonu, metabolit içeriğinin değişken olması nedeniyle idrarda bulunan protein karışımları, (albumin, globulin, Tamm-Horsfall proteini, polipeptitler) farklı protein reaktifleriyle farklı oranlarda reaksiyona girerler (2). İdrardaki total protein düzeyinin ölçümünde, kullanılan metodların kalibrasyonundaki varyasyonlar da dahil olmak üzere, analitik özelliklerdeki farklılıkların bir sonucu olduğu düşünülen ciddi bir varyasyonun mevcut

olduğu bilinmektedir. Bu durum, çalışmalar arasındaki diyagnostik performans farklılıklarına da açıklayabilir (5).

Albüminüri tanımı, albüminin birim zamanda (genellikle /24 saat) idrar yoluyla atılım miktarı şeklinde belirtilmektedir (6). Albümin atılımının geleneksel normal üst limiti 30 mg/gün olmasına rağmen, son epidemiyolojik veriler genel popülasyondaki seviyelerin daha düşük olduğunu göstermiştir (7).

Mikroalbüminüri, albümin-kreatinin oranı 30 ila 300 mg albümin /g kreatinin aralığında olmasıdır (8). Makroalbüminüri, albümin /kreatinin oranı 300 mg /g üzerinde olmasıdır (9).

İdrardaki albümin atılımı, böbrek hasarı ile beraber böbrek hastalığının progresyonunu göstermektedir. Aynı zamanda son dönemde yapılan çalışmalarda, kardiyovasküler hastalık için de bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (6).

İdrarda bulunan albüminin moleküler formları ve çeşitliliği; albüminin modifiye formlarının farklı filtrasyonu ve farklı tübüler geri alınımı, albüminin üriner yol boyunca proteoliz aracılığıyla maruz kaldığı modifikasyonlar, oksidan, serbest radikal ve idrarda bulunan diğer ligandların meydana getirdiği kimyasal değişiklik ve idrarı dondurma esnasında oluşan değişiklikler sebebiyle plazmadakinden farklıdır (6). Bu yüzden, idrarda albüminin referans materyali elde edilememiştir. Referans metodu yoktur (6,10). İdrar albümin düzeyi ölçümünün rolü, doğru ve net rapor edilen laboratuvar sonuçlarına odaklıdır (6).

İdrarda albümin, immünotürbidimetrik, immünonefelometrik, ELISA, HPLC, likit kromatografi, tandem mass yöntemleriyle tayin edilmektedir (10). Bu bilgiler ışığında tüm dünyada, henüz idrarda total protein ve albüminin standardizasyonu tamamlanmamıştır.

İdrarda total protein ve albümin ölçümü, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan, ancak mevcut yöntemlerin birbirinden farklı avantaj ve dezavantajları nedeniyle hangi yöntemin kullanılacağı hakkında üzerinde fikir birliğine varılamamış bir konudur. Amacımız, idrarda total protein ölçümü için, biyokimya laboratuvarımızda kullanılan türbidimetrik metodu ile, Modifiye Purdy metodunu, Lowry, Bradford metodlarının analitik performanslarını karşılaştırmaktır. İdrarda albümin ölçümü için, biyokimya laboratuvarımızda kullanılan immünotürbidimetrik metod ile, immünonefelometrik yöntemin analitik performanslarını karşılaştırmaktır.

Bu çalışma sonuçlarına göre, idrarda total protein ve idrarda albümin için hangi yöntemlerin analitik performans açısından daha uygun olabileceğine karar verilebilecektir. Bu da hastaların böbrek fonksiyonlarının daha doğru değerlendirilmesini sağlayacaktır.

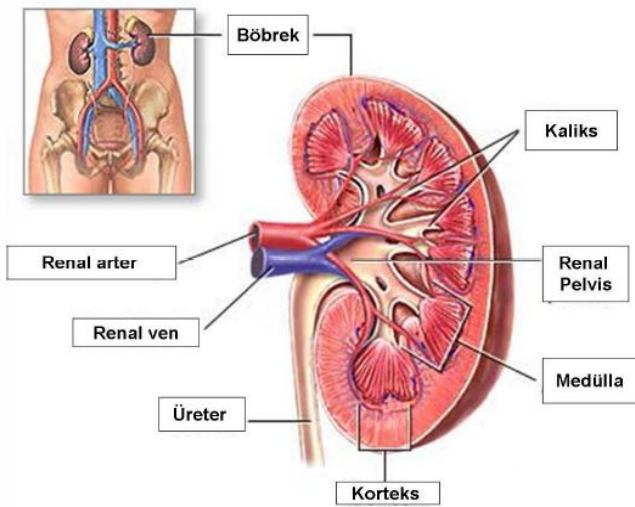
2. GENEL BİLGİLER

2.1. Böbreklerin Anatomisi

Böbrekler retroperitoneal yerleşimli organlar olup üst kutuplar 12. torasik, alt kutuplar 3. lomber vertebra hizasındadır. Her biri ortalama 150 (130- 180) gram ağırlığındadır (4).

Böbreklerin konkav olan iç yüzünde böbrek hilusu bulunmaktadır. Böbrek hilusunda böbreğin damarları, lenfatikleri, sinirler ve renal pelvis yer alır. Renal pelvis ilk önce 3 majör kalikse, majör kaliksler de 8 veya daha fazla minör kalikse bölünür. Böbreğin sagittal kesitinde medülla ve korteks olmak üzere 2 ayrı bölge fark edilir.

Her bir böbrek, genellikle birinci lomber vertebra hizasında aortadan çıkan tek bir arter ile kanlanır. Bu arterler dallanarak afferent ve efferent arteriollere kadar uzanır ve venöz sistem yoluyla inferior vena kavaya dökülür. Şekil 1’de böbreğin anatomik yapısı görülmektedir (11).



Şekil 1. Böbreğin Anatomik Yapısı

Böbreğin en küçük anatomik ve fonksiyonel ünitesi nefronudur. Her bir böbrekte yaklaşık 1.200.000 nefron bulunur. Nefron; glomerül, proksimal tübülüs, henle kulbu, distal tübülüs ve toplayıcı kanallardan oluşur (4). Şekil 2 de nefronun yapısı görülmektedir.

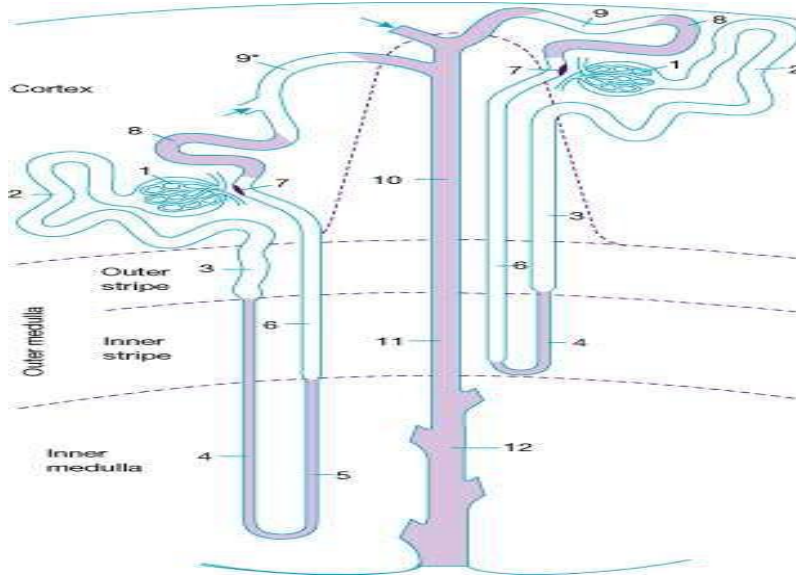
2.2. Böbrek Fonksiyonları

Böbreklerin 3 önemli fonksiyonu vardır. Bunlardan birincisi sekretuar fonksiyon, ikincisi düzenleyici fonksiyon ve üçüncüsü metabolik fonksiyondur (12).

2.2.1. Böbreğin Sekretuar Fonksiyonları

Kanla perfüze olan böbreklerden idrar oluşumu iki basamaklı bir olaydır ve her bir basamak nefronun anatomik olarak ayrı iki segmenti tarafından yerine getirilir: glomerüllerden plazmanın filtrasyonu ve tübülüslerde selektif reabsorbsiyon ve sekresyon.

Sonuç olarak metabolik artık maddelerin (üre, kreatinin, ürik asit gibi) ve ekzojen maddelerin (ilaçlar, toksinler ve metabolitleri) atılımını sağlar (11).



Şekil 2. Nefronun Yapısı

1, glomerül ve Bowman kapsülü 2, proksimal kıvrımlı tübül; 3, proksimal düz tübül (pars rekta); 4, ince inen kol 5, ince çıkan kol 6, kalın çıkan kol; 7, makula densa; 8, distal kıvrımlı tübül; 9, bağlayıcı tübül; 10, kortikal toplayıcı kanal; 11, dış medüller toplayıcı kanal; 12, iç medüller toplayıcı kanal.

2.2.2. Böbreğin Düzenleyici Fonksiyonları

Böbreğin regülatuar fonksiyonu denilince akla sıvı-elektrolit dengesi gelmektedir. Böbrek bu görevi birinci olarak total vücut suyunun ve plazma osmolalitesinin idamesi ile su dengesini kontrol ederek ve ikinci olarak asit-baz ve elektrolit (sodyum, klorür, kalsiyum vb) dengesini sağlayarak yerine getirir (11).

2.2.3. Böbreğin Metabolik Fonksiyonları

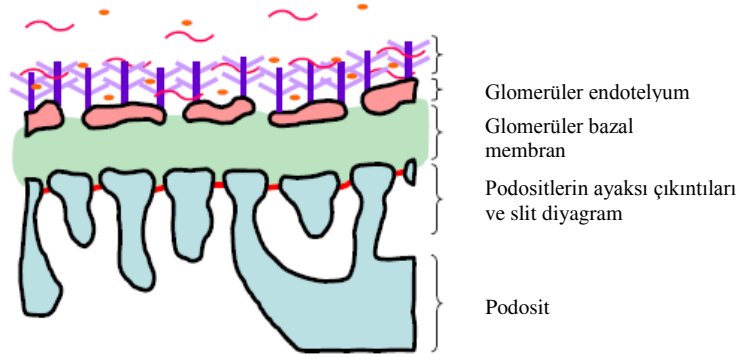
Böbrek çeşitli hormonların yapım ve yıkım yeri olarakta görev almaktadır. Böbrekte sentez edilen hormon ve benzeri maddeler; renin, vitamin D, eritropoetin, prostaglandinler, kallikrein-kinin, büyüme faktörleri ve endotelindir. Böbrek özellikle peptit yapılı hormonların katabolizmasında görev alır. Bu hormonlar; insülin, glukagon, parathormon, kalsitonin, prolaktin, büyüme hormonu, vazopressin ve gastrointestinal hormonlardır. Ayrıca böbrek glukoneogenez ve lipid metabolizmasında da rol oynar (4,12).

2.3. Glomerüler Filtrasyon

İdrar oluşumunun ilk basamağı glomerüler ultrafiltrasyondur. Glomerüler filtrasyon, plazmanın filtrasyon membranından ultrafiltrasyonla süzülerek, bowman kapsülü aralığına geçmesidir. 180-200 L/gün plazma ultrafiltratı oluşur. Nefronda glomerüler filtrasyon, tübüler sekresyon ve tübüler geri emilim olayları sonucunda idrar oluşur (4,12).

Glomerüler kapiller duvar üç komponentten oluşur. İçteki duvar, fenestreli endotelyum, glomerüler bazal membran, epitelyal hücre tabakası, epitelyal tabakada parmaksı çıkıntıların arasındaki filtrasyon yarıklarını (slit diyagram) içerir (13,14). Glomerüler bazal membran her bir komponentle beraber glomerüler seçiciliğe katkıda bulunur (15).

Glomerüler kapiller duvar (GKD) yüksek ultrafiltrasyon kapasitesine sahip özel kapiller ağ dan oluşan bir membrandır. GKD' ın histolojik yapısı Şekil 3'te şematize edilmiştir.



Şekil 3. Glomerüler Kapiller Duvarın Histolojik Yapısı (16).

Kapiller hücreleri arasında 40-100 nm çapında porlar mevcuttur. Bu porlar negatif yüklü biyomoleküller ile çevrilidir. Plazma proteinleri, endotelial açıklıklardan kolayca geçerek glomerüler bazal membrana ulaşır (17).

Bazal membran lamina rara eksterna, lamina rara interna, lamina densa olmak üzere 3 tabakadır. Lamina densa glikoprotein, proteoglikan, tip 4 kollajen içerir. Lamina densa proteinlerin tübüler lümene geçmesini engelleyen esas boyut bariyerini oluşturur. Lamina rara heparin sülfat gibi negatif yüklü polianyonik glikoproteinlerden zengin olduğu için esas yük bariyerini oluşturur (4).

Epitel hücreleri podosit olarak adlandırılır ve bunların bazal membrana uzanan ayaklı çıkıntıları vardır. Ayaklı çıkıntılar arasında filtrasyon yarıkları (Slit diyafram) vardır.

Ayaklı çıkıntılar glikosialoproteinler ile kaplıdır, Sialik asitten zengindir. Slit diyafram (SD) ise glomerül filtrasyon bariyerinin en önemli komponentidir. GKD'dan protein geçişinin engellenmesi ancak kısmen anlaşılmıştır (14,15).

Glomerüler bariyerden moleküllerin geçişi, moleküllerin büyüklük, yük ve diğer biyokimyasal özelliklerine bağlıdır (15).

2.3.1. Büyüklük Seçici Özellik

Herhangi bir molekülün glomerül kapiller duvardan filtre olması molekülün büyüklüğü ile ters orantılıdır. Büyüklük seçici bariyere endotel hücrelerinin katkısı yoktur. Endotel hücrelerinin arasında bulunan pencereler kanın şekilli elemanlarının geçişini engeller ancak makromoleküllerin filtrasyonuna engel olamazlar (4). SD, ayaklı

çıkıntılarının birbiriyle ilişkisini sağlar. Filtrasyon bariyerinin biyolojik aktif bileşenidir. Slit diyaframın yapısını oluşturan nephrin molekülündeki mutasyonun nefrotik sendroma yol açtığına gösterilmesi bu yapının patogenezdaki önemine dikkati çekmektedir (13).

Membran küçük solütlere ve suya oldukça geçirgen iken daha büyük moleküllerin geçişine karşı önemli bir engel oluşturmaktadır (14).

Moleküllerin yarıçapı 2 nm den azsa GKD'dan geçer. Glomerüler filtrata MA küçük olanlar geçebildiği halde >40 kDa molekül ağırlığı (MA) olanlar geçemez (14).

Albümin 69 kDa ağırlığındadır. GKD tarafından ultrafiltrata geçişi engellenir. Büyüklük glomerüler filtrasyon için tek belirleyici faktör değildir. Çalışmalar göstermiştir ki, aynı çaptaki nötral dekstran molekülleri bariyeri, (-) yüklü dekstran moleküllerinden daha kolayca geçer (14).

2.3.2. Yük Seçici Özellik

Glomerüler bazal membran (GBM)'da bulunan heparan sülfat ve diğer proteoglikanlar nedeniyle negatif yük taşırlar. Glomerüler epitelyal hücreler ve ayakası çıkıntılarının yüzeyleri de negatif yüklü sialoproteinler ile kaplıdır (15) . Bu komponentler anyonik maddelerin azalmış filtrasyonuna neden olur. Çoğu serum proteinleri örneğin albümin fizyolojik pH da (-) yüklenir. (-) yüklü bariyer albüminin geçişini sınırlar. Lizozim gibi serumdaki polikasyonlar glomerüler kapiller duvardan kolayca geçer (14).

2.3.3. Proteinlerin Tübüllerden Reabsorbsiyonu

Son yıllarda yapılan çalışmalar glomerülden filtre olan albumin miktarının eskiden kabul edildiğinden daha fazla olduğunu göstermiştir. Comper, Molitoris ve arkadaşları tarafından yapılan 2-foton mikroskopisi çalışmasında proteinürisi olmayan hayvanların albümini önceden düşünülen 50 kat fazla filtre ettiklerini göstermiştir. İn vivo ya da izole perfüze böbrekte yapılan çalışmalarda, renal artere verilen radyoaktif albüminin, renal vende radyoaktif profilinin belirlenmesiyle ilgili çalışmalar yapılmıştır (1).

Proksimal tübül hücreleri tarafından alınan ve tekrar kan dolaşımına gönderilecek olan albümin, başlangıçtaki radyoaktif işaretli albüminin geçişinin ardından, renal vende ikinci bir pik olarak işaretli albümin gösterilmiştir (1). Süzülen albüminin büyük bir kısmı

(>%95) geri kazanım yolağı tarafından alınıp kan dolaşımına döndürülür. Geri kazanım yolağı tarafından alınan albüminin dışındaki, küçük orandaki (<%5) albümin de, degradasyon yolağına ve bunu takiben de idrar yoluyla atılıma iletilir (1).

Albümin, proksimal tübül hücreleri tarafından hızlı bir şekilde endositozla alınır. Albuminin proksimal tübülünde iki protein reseptörüne bağlandığı (megalin ve cubilin) ve reseptör aracılıklı endositoz ile geri emildiği gösterilmiştir (4,14).

40 kDa'ın altında olan ve serbestçe filtre olan proteinler özellikle proksimal tübülde reabsorbe olur sonra da katabolize edilmektedirler (4). Böbrek, düşük molekül ağırlıklı proteinlerin, peptidlerin, hormonların (Paratroid hormon, insulin gibi), Ig parçacıklarının (hafif zincir, β 2 mikroglobulin) ve çeşitli enzimlerin (lizozom, amilaz gibi) katabolize edildiği primer organdır. Tübüllerin reabsorbsiyon ve metabolize etme kapasitesini aşacak şekilde bu proteinler filtre olursa o zaman idrarda saptanabilirler (4).

2.4. Proteinüri

Proteinüri, 200 yıldan daha uzun süre önce tanımlanmıştır. Nefroloji tarihini anlatan bir makalede J.S. Cameron, Domenico Cotogno'nun 1770 yılında proteinüri ile ilgili ilk verileri kağıda döktüğünü bildirmiştir. 1827 yılında ilk olarak Richard Bright, albümin içerikli idrar ile böbrek hastalığını ilişkilendirmiştir (1).

İdrarla günlük protein atılımı fizyolojik koşullarda yetişkinlerde 150 mg ın altındadır. Tekrarlanan ölçümlerde 150 mg/gün üzerinde protein atılımının saptanması proteinüri olarak tanımlanır (4) . Genellikle proteinüri, yeni doğanlarda (ilk 30 gün) $145 \text{ mg/m}^2/24$ saat, çocuklarda (2-10 yaş) $85 \text{ mg/m}^2/24$ nın üzerinde olmasıdır (18).

İdrar proteinlerinin %60' ı plazma, %40' ı böbrek dokusu kaynaklıdır. (19) Normal idrar proteinleri, albumin, Tamm-Horsfall proteini, Ig fragmentleri, düşük molekül ağırlıklı proteinleri içerir (2). Böbrek orjinli üç protein vardır. Tamm- Horsfall proteinleri, distal tübüldeki epitelyal hücreler tarafından sentezlenir. Mukoprotein yapısındadır. Anti-viral aktivitesi var olduğu düşünülmektedir. Ürokinaz, tübüler hücreler tarafından lüminal sıvıya sekrete edilen antifibrinolitik bir enzimdir. Sekretuar Ig A, böbrek tübüler epitelyal hücreler tarafından sentezlenir (14). İdrar proteinlerinin yaklaşık 1/3 albümin, 2/3 ü de globülinidir. 24 saatlik idrarda 70 mg mukoprotein, 16 mg albümin, 6 mg immünglobülin, 16 mg asit mukopolisakkarit, diğer proteinler, enzimler, hormonlar içerir (14).

2.4.1. Proteinüri Tipleri

Proteinüri tipleri aşağıdaki kriterlere göre belirlenebilir (1-4):

2.4.1.1. Atılan Protein Miktarına Göre Proteinüriler

2.4.1.1.1. Nefrotik Olmayan Proteinüri

Yetişkinlerde ise 3,5 gr/gün'den az olması durumudur. Bu aralıktaki proteinüri, glomerüler hastalıkları dışlamaz, tübülointersisyel veya vasküler hastalıkları düşündürür,

Bu hastalıklar, intersisyel nefrit, reflü nefropatisi, polikistik böbrek hastalığı, ilaç kullanımıyla (analjezik) uyarılan nefropatileri, akut tübüler nekroz, kollojen doku hastalıkları, multiple myelom, ağır metal zehirlenmelerini içermektedir. Çeşitli sistemik hastalıklar böbreği etkileyebilir. Hipertansiyon, SLE (Sistemik Lupus Eritematozus) çeşitli derecelerde proteinüriye neden olabilir. Hipertansiyon bu aralıktaki proteinürinin en önemli sebebidir (20).

2.4.1.1.2. Mikroalbuminüri

Glomerüler proteinürinin bir tipidir. Normal düzeyin üzerinde olan ancak dipstick ile saptanamayan bir albümin atılımı söz konusudur. İdrar örneğinde 2-20 µg/dk (mg/dL) (1) veya 30-300 mg/gün (18). 5 yıldan uzun süreli diyabetli olan hastaların %4-15'inde mikroalbuminüri görülmektedir. Tip 1 diabetes mellitusta nefropatinin en erken ve muhtemelen geri dönüşümlü glomerüler hasar göstergesi olarak görülmektedir (21).

2.4.1.1.3. Nefrotik Proteinüri

Çocuklarda 40 mg/ m²/saat'in üstünde yetişkinlerde ise 3,5 gr/gün'den fazla protein atılımı nefrotik proteinüri kabul edilir. Masif proteinüri, hipoproteinemi, ödem ve hiperkolesterolemiye neden olan her türlü glomerüler hastalık nefrotik sendrom olarak adlandırılır (22).

Nefrotik sendrom nedenleri primer ve sekonder nedenler olarak sınıflanmaktadır.

Primer nefrotik sendrom nedenleri:

Minimal değişiklikler gösteren nefrotik sendrom (MCNS).

Fokal glomerülosklerozis.

Diffuz mezengioproliferatif glomerülonefrit.

Membranoproliferatif glomerülonefrit.

Konjenital nefroz (Fin tipi nefropati)'dur.

Sekonder nefrotik sendrom nedenleri:

Postenfeksiyöz nedenler:

Grup A Beta Hemolitik Steptokok

Tuberküloz

Viral (Varisella,HepatitB,HIVtipI, Enfeksiyöz mononukleozis)

Artrit, Poliarteritis Nodoza

Diabetes mellitus

Malignensiler (Lösemi, Lenfoma, Wilm's tumoru, Feokromasitoma)

İlaçlar (probenesid, fenoprofen, kaptopril, lityum, warfarin, civa, altın, trimetadion) (23).

Sistemik hastalıklardan en sık rastlanılanı diabetik nefropatidir. Komplike olmayan hipertansiyonda nadiren proteinüri görülürken, malign hipertansiyonda nefrotik proteinüri görülür (20).

2.4.2. Devam Etme Süresine Göre

Proteinüri geçici yada kalıcı olabilir.

2.4.2.1. Geçici Proteinüri

Proteinürinin bir idrar örneğinde saptanırken, sonrakinde saptanmamasıdır. En sık rastlanan proteinüri şeklidir. Erkeklerde %5, kadınlarda %7 oranında görülür. Geçici proteinüri; fonksiyonel, intermitant ya da ortostatik olabilir (17).

Fonksiyonel proteinüri: böbrek hastalığı olmadan üriner proteinin fazla çıkışı ile karakterizedir. Fizyolojik olarak egzersiz, ateş, soğuga maruziyet stres gibi faktörler geçici

olarak artmış protein atılımına yol açabilir (15,17). Egzersizden sonra, glomerüler filtrasyonun arttığı, tübüler reabsorpsiyonun azaldığı gösterilmiştir (20).

İntermittant proteinüri: Arada normal dönemleri olan ataklar halinde proteinüri görülmesidir. Bu hastalar hipertansiyon veya diğer sebepler açısından değerlendirilmelidir.

Postural veya ortostatik proteinüri, çok ayakta kalan bireylerde olur. Tam mekanizması bilinmemektedir. Postural proteinüri, glomerüler orjinlidir. Artmış böbrekteki venöz veya lenfatik basıncın artmasıyla ilişkilendirilebilir. Postural proteinürisi olan bireyler periyodik olarak kontrol edilmelidir. Çünkü, proteinüri bilinen böbrek hastalıkları ya da ayakta kalmayla da artabilir (15,20).

Sürekli (persistan) proteinüri, klinik olarak en önemli grubu oluşturmaktadır. proteinürinin devamlı olarak saptanması altta yatan sistemik veya böbrek hastalığının bir göstergesidir ve mutlaka yakın izlem gerektirir (17,24). Proteinüri, primer böbrek hastalıkları ve sekonder böbrek hastalıkları (sistemik hastalıklar nedeniyle) sonucu sürekli ve şiddetli olabilir. Genellikle, kalıcı ve ilerleyici proteinüriye sahip olan bireylerin yaşam beklentisi genel popülasyonla kıyaslandığında azalmıştır (20).

2.4.3. Oluş Mekanizmasına Göre

Glomerüler, tübüler ve taşma (overflow) proteinüri olarak üç çeşittir. İnate proteinürinin en sık sebebi de glomerüler proteinüridir.

2.4.3.1. Glomerüler Proteinüri

Bu durum makromoleküllerin (albumin) glomerüler duvardan normalden fazla filtre edilmesi ile ortaya çıkar. Glomerüler hastalıklarda, proteinlere karşı glomerüller geçirgenliğinin artması proteinüri ile sonuçlanır. Başlıca albumin ve transferrin, alfa-1 asid glikoprotein, alfa-1 antitripsin, prealbumin, antitrombin gibi büyüklük ve elektriksel yük olarak albumine benzer proteinlerin, daha az oranda, IgG gibi yüksek moleküler ağırlıklı proteinlerin ve çok az oranda da düşük moleküler ağırlıklı proteinlerin idrarla atılımı söz konusudur (17).

Glomerüler hastalığın ayırt edici bir özelliği tübüler hastalıkta genellikle olmayan yüksek molekül ağırlıklı proteinlerin varlığıdır (14). Glomerüller selektivite korunduğu

sürece büyük molekül ağırlıklı proteinler idrarda görünmezler (17). Tübüler fonksiyon normaldir ve küçük plazma proteinleri büyük oranda geri emilir. Glomerüler proteinürinin en önemli sebebi DM dir. Ağır proteinüri, diyabetik nefropatinin klinik belirtilerindendir. Diabetlilerin % 10-30 unda glomerüler yapıdaki hasardan dolayı artan permeabiliteye bağlı olarak proteinüri gelişir (25,26).

Primer glomerüler hastalıklar Tablo 1’de, Sekonder glomerüler hastalıklar Tablo 2’de özetlenmiştir.

Tablo 1. Primer Glomerüler Hastalıklar

1. Minimal değişiklik hastalığı
2. Mezangial proliferatif glomerülonefrit
3. Fokal segmental glomerüloskleroz
4. Membranöz nefropati
5. Membranoproliferatif glomerülonefrit
6. IgA nefropatisi

Tablo 2. Sekonder Glomerüler Hastalıklar

1-Multisistemik hastalıklar:	2-Herediter hastalıklar
Diyabetes mellitus Amiloidozis SLE Vaskülitler Kriyoglobülinemi Dermatomiyozit Sarkoidoz Miksödem	Alport sendromu Fabry hastalığı Nail-patella sendromu Orak hücreli anemi Konjenital nefrotik sendrom a1-antitripsin eksikliği
İlaçlar ve allerjenler:	4- İnfeksiyon hastalıkları:
Kaptopril, organik altın, D-penisilamin, probenesid, organik ve elementer cıva, eroin, kontrast maddeler, arı sokması, polenler, yılan zehiri, alfa interferon, nonsteroid antiinflatuar ilaçlar Penisilamin, probenesid	Bakteriyel: Poststreptokoksik glomerülonefrit, subakut bakteriyel endokardit, ventriküloatriyal şant nefriti, konjenital sfiliz, reflü nefropatisi Viral: Hepatit B, Hepatit C, HİV Protozoal: Malarya, toksoplazma
Neoplaziler:	Diğer nedenler:
Soliter: Akciğer, kolon, mide, meme, böbrek, serviks, over, prostat, pankreas Ca Lenfoproliferatif : Lösemi, lenfoma, multipl myelom	Gebelik, Akselere hipertansiyon, Konjestif kalp yetmezliği, Konstrüktif perikardit, V. cava inferior trombozu, Renal ven trombozu, Vezikoüreteral reflü, Kr. transplant rejeksiyonu

Glomerüler kaynaklı proteinüri mekanizmaları:

1- Glomerüler bazal membranın geçirgenliği bozulur ve buna bağlı olarak proteinüri oluşur. Artmış protein yükü tubuler geri emilim kapasitesini aşar, idrarda belirir.

2- Glomerül kapillerindeki yük dengesinin bozulması sonucu selektif proteinüri oluşur.

3- Nefron sayısının azaldığı durumlarda kalan nefronlar, glomerüler geçirgenliklerini arttırarak protein kaybına neden olur.

4- Stres esnasında görülen ve yüksek anjiotensin düzeylerine bağlı proteinüride neden, filtrasyon fraksiyonundaki artma ve efferent arteriolde gelişen vazokonstriksiyon ile

oluşan transkapiller hidrostatik basıncı artırarak glomerüler filtrasyon hızını artırarak filtrasyon fraksiyonunu yükseltir (27).

2.4.3.2. Tübüler Proteinüri

Proksimal tübüler reabsorbsiyon bozulduğunda serum proteinleri ultrafiltratta görülür. Primer tübüler proteinüri, normal glomerüler permeabilitenin varlığında düşük MA proteinlerin tamamlanmamış reabsorbsiyonu ile karakterizedir. Düşük MA' lı proteinlerin idrarda bulunması böbrek parankimal hastalıkların erken saptanmasında, takibinde yararlı olabilir (14).

Tübüler proteinüri de β_2 mikroglobülin, Retinol binding protein, lizozim, α_1 -asit glikoprotein, çeşitli hormon ve enzimler artmış olabilir (28,29). Pür tübüler proteinüri ile ilişkilendirilmiş rahatsızlıklar, günlük atılan idrar proteinlerinin 1 g'dan az olmasıyla sonuçlanır. Tübüler proteinüride albümin önemli miktarda bulunur, fakat <50 kDa altındaki proteinler daha hakimdir (14).

2.4.3.3. Taşma Proteinürisi

Bu durum, nefronun normal geri emme kapasitesini aşan miktarda düşük molekül ağırlıklı proteinlerin vucuttaki diğer dokular tarafından üretilmesine ve böbreklerle geri emilememesine bağlı olarak ortaya çıkmaktadır. Bu proteinlerin çoğu immunoglobulin hafif zincir proteinleridir (multipl myelom, benign monoklonal gammopati vb) (30). Hemoglobin, myoglobin ve lizozim taşma proteinürisine neden olabilen diğer nedenlerdir (2,13).

2.5. Hastalıklarda Proteinüri Mekanizmaları

Diabetik nefropati, gelişmiş ülkelerde son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) nedeniyle ilk kez diyalize giren hastaların yaklaşık %50'sinde etiyoloji Diabetes Mellitus (DM)' dur ve diabete bağlı mortalite ve morbiditenin en önde gelen nedenidir (31). Diabetik nefropati patogenezinde, glikotoksisite ve neden olduğu metabolik olaylar kadar hemodinamik mekanizma da sorumlu tutulmaktadır (32). Glikotoksisite ve hemodinamik

olaylar sonucu, makrofajlardan TNF- α , İnsülin Growth Faktör -I (IGF-I) ve IL-1 (İnterlökin -1) gibi bir çok sitokin salgılanır (33,34). Diabetik nefropatide klinik bulguların ilerlemesiyle glomerüler bazal membranda kalınlaşma, mezanşial matrikste genişleme ve fokal glomerüloskleroz görülür (35). Filtrasyon alanında ve nefron kitlesinde azalma, daha yüksek kapiller akımla sonuçlanır ve bu adaptasyon mekanizmalarıyla artan intraglomerüler basınç, hiperfiltrasyon ve bazal membrandaki seçici geçirgenlikteki değişiklikler ile hızlanan ilerleyici proteinüri oluşur (17).

Böbreklerde hipertansiyona bağlı olarak afferent arteriyollerde hyalinizasyon ve skleroz oluşur. Laboratuvar da ise mikroalbuminüri en erken bulgudur. Mikroalbuminüri intraglomerüler hipertansiyon varlığının göstergesidir. Böbrek fonksiyonları progresif olarak azalır ve kaçınılmaz olarak önlemlerin alınmasına göre belirli oranda böbrek hasarı er veya geç oluşur. Hatalı önlem ve tedaviler sonucunda kronik böbrek yetmezliği gelişebilir (36).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, proteinürinin yalnızca glomerüler hasarın derecesini yansıtmakla kalmadığını, bununla beraber böbrek hastalıklarının çoğunda hastalığın ilerlemesinde etkili olduğunu göstermiştir. Proteinürinin derecesi, bir çok böbrek hastalığı için kötü bir prognoz göstergesidir (37). Cameron ve arkadaşlarının (1978) nefrotik düzeyde proteinürisi olan hastaların prognozunun, nefrotik düzeyde proteinürisi olmayan hastalara göre belirgin kötü olduğunu göstermesi (38), proteinüri ve böbrek hasarının ilerleyişi arasındaki ilişkinin ilk kanıtlarıdır. Günümüzde; proteinürinin eşlik ettiği glomerülopatilerde, glomerüler kapiler bariyer üzerinden gerçekleşmekte olan anormal protein trafiğinin hastalığın bir parçası olmasının yanı sıra intrinsik bir toksisiteye yol açtığı ve hastalığın ilerlemesine doğrudan katkısı olduğu kabul edilmektedir. Proteinürinin bu etkisi, esas olarak varolan inflamasyonu artırmasından kaynaklanmaktadır. Buna yönelik kanıtlar arasında atılan protein miktarının, tübülointerstisiyel infiltrattaki inflamatuvar hücre ve özellikle T lenfosit miktarı ile ilişkisi olması gösterilebilir (39) Proteinüriye eşlik eden inflamasyonda, normalde proksimal hücre bazal duvarda bulunması gereken T lenfosit CD40 reseptörleri tübüler duvara kaymaktadır (40). T lenfositlerine bağlanmış proksimal hücreler daha fazla inflamatuvar sitokin ve kemoatraktan üretmektedirler. Artmış protein geri Emilimi, özellikle proksimal tübül hücrelerinde, gen transkripsiyonunu da etkiler. Artmış protein geri Emilimi, özellikle proksimal tübül hücrelerinde, gen transkripsiyonunu da etkiler. Yapılan in-vitro çalışmalarda; lipidden

arındırılmış albumin, transferrin ve İmmunoglobulin G'ye maruz bırakılan proksimal tübül hücrelerinin konsantrasyona bağımlı olarak ve giderek artan miktarlarda endotelin-1 sentezledikleri gösterilmiştir (41).

Albumin ve transferrinin monosit kemoatraktan protein (MCP-1) geninin transkripsiyonunu uyardığı gösterilmiştir (42). Yine, albuminin RANTES sitokininin (Regulated on Activation Normal T Expressed and Secreted) IL-8 (İnterlökin-8) miktarında artışa yol açtığı bilinmektedir (43). Moleküler düzeyde inflamatuvar gen transkripsiyonunun artmasına neden olan faktör, nükleer faktör-kappa-B'dir (NF-kB). Normalde proksimal hücre sitoplazmasında inaktif durumda bulunan bu faktör, protein filtrasyonunun artmasına bağlı olarak proksimal tüplerde albuminin geri emiliminin artmasıyla miktara bağlı olarak aktive olur ve inflamatuvar gen transkripsiyonu üzerindeki engellemeyi ortadan kaldırır (44).

NF-kB ye bağlı genlerin aktive olmasıyla kemotaktik proteinler ve immunoregülatör sitokinler salınır. Sonuçta inflamatuvar hücrelerin infiltrasyonu ve fibrojenik sitokinlerin etkisi ile interstisyel fibroblastlarda proliferasyon, matriks birikimi ve parankimada skarlaşma olduğu ileri sürülmektedir (17).

Proteinüri, kardiyovasküler ve böbrek hastalığı için bağımsız bir risk faktörü olarak bilinmektedir. Hatta protein atılım düzeyinde artış tespit edilmesinin, böbrek hastalığına tanı konması ve doğrulanması açısından önemli değere sahip olduğu; ve proteinüri miktarının saptanmasının, tedavi etkinliğini ve hastalığın progresyonunu değerlendirmede güvenilir bir faktör olduğu bilinmektedir (5).

Amerikan Ulusal Böbrek Vakfı (National Kidney Foundation) protein atılım düzeyinde görülen artışın böbrek hastalığı gelişmesi açısından risk altında bulunan hastalarda bir tarama yöntemi olarak kullanılmasını önermektedir (5)

2.6. İdrarda Protein Ölçüm Yöntemleri

2.6.1. İdrarda Proteinin Kalitatif Ölçüm Yöntemleri

- Triklorasetik Asit (%20)
- Sülfosalisilik Asit
- Kaynatma- Asetik Asit

- Heller Yöntemi
- Tanret Yöntemi

%20'lik triklorasetik asit (TCA) ile idrarda protein aranması:

Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. Deney tüpündeki berrak idrar üzerine %20'lik TCA damla damla eklenir; bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. İdrar üzerine %20'lik TCA damlatıldıktan sonra gözlenenlere göre sonuç rapor edilir. Bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir (45).

Sülfosalisilik asit (SSA) ile idrarda protein aranması:

Bir deney tüpün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. Deney tüpündeki berrak idrar üzerine %20'lik sülfosalisilik asit çözeltisinden damla damla eklenir; bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. İdrar üzerine %20'lik sülfosalisilik asit damlatıldıktan sonra gözlenenlere göre sonuç rapor edilir. Bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir (45). Yüksek yoğunluktaki idrarda, ciddi hematuride, sefalosporin, penisilin, sülfanamid metabolitleri yanlış (+) sonuç verir (46).

Kaynatma-asetik asit yöntemi ile idrarda protein aranması:

Hafifçe asitlendirilmiş 10 mL idrar, bir deney tüpüne konur ısıtılır; bu sırada ısıtılan kısımda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır. Bir bulanıklık husule gelirse sebebi ya albüminler veya fosfat ve karbonat tuzlarıdır. Tüpteki idrara damla damla % 10'luk asetik asit solusyonu ilave edilir.Bulanıklık albüminden oluşuyorsa artar. Fosfat ve karbonattan ileri geliyorsa asit ilavesinden sonra kaybolur (45).

Heller yöntemi ile idrarda protein aranması:

Bir deney tüpüne az miktarda konsantre HNO_3 (Nitrik asit) konur, bunun üzerine aynı miktarda idrar tabakalandırılır; tabakaların temas yerinde beyaz bir halka oluşup oluşmadığına bakılır. Beyaz bir halka oluşumu gözlenmezse idrarda protein (-)'dir,beyaz bir halka oluşumu gözlenirse idrarda protein (+)'dir (45).

Tanret yöntemi ile idrarda protein aranması:

Bir deney tüpünün 2/3'üne kadar berrak idrar konur. Deney tüpündeki berrak idrar üstten ısıtılır; bu sırada ısıtılan kısımda bir bulanıklık veya çökelti oluşup oluşmadığına bakılır.

Isıtılan bölgede bulanıklık gözlenirse, bunun sebebi albümin, fosfat veya karbonatlardır. İdrara 1-2 damla Tanret reaktifi (36 g KI ve 13,55 g HgCl₂ bir miktar distile suda çözüldükten sonra volüm 1000 mL'ye tamamlanır. Bu çözeltinin 100 mL'si 20 mL glasiyal asetik asit ile karıştırılarak kullanılır) damlatılır; bulanıklığın değişimi gözlenir. Isıtma ve Tanret reaktifi damlatma sonucunda gözlenenlere göre sonuç rapor edilir.

Isıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık gözlenmezse idrarda protein (-)'dir, ısıtma sırasında ısıtılan bölgede bulanıklık oluşur ve Tanret reaktifi damlatma ile bulanıklık artarsa idrarda protein (+)'dir (45).

2.6.2. İdrarda Proteinin Semikantitatif Ölçüm Yöntemi

Dipstik testleri proteinüriyi tesbit ederken en çok kullanılan testlerdendir. Kağıt striplerde, reaktif genellikle tetrabromfenol olup, pH indikatörü vardır. Tamponun pH' sı 3 tür. Proteinlerden özellikle albümin varlığında emdirilmiş boyaların renk değiştirmesi esasına dayanmaktadır (46). İndikatör sarı renktedir, anyonik olan protein varlığında, maviye doğru, miktara göre değişik tonlarda renk değişimi gözlenir (17).

Dipstik, özellikle albümin (-) yüklü olduğu için albümine spesifiktir. Diğer (+) yüklü proteinleri göz ardı eder. Düşük MA lıklı proteinlerden Ig hafif zinciri, β_2 mikroglobülin tesbitinde sensitif değildir. (47). Alt ölçüm sınırı 15-30 mg/dL arasındadır. Semikantitatif değerlendirme de 0 dan 4+ ya kadar derecelendirme yapılır, (17) .

Dipstik yöntemlerin sensitivitesi %32-46, spesifitesi % 97-100 arasındadır (48).

Yanlış (+) sonuçlar aşağıdaki durumlarda verebilir (46).

Alkali idrarda (pH> 7.5), alkali ilaç alan bir hastadan veya bakterilerle kontamine olmuş bir idrarda olduğu gibi proteinüri olmadığı halde pozitif sonuç verir (49).

Yüksek konsantrasyonlu idrarda, ciddi hematüride, mukus, semen, lökosit varlığında idrar dilüe edilmişse, protein kaybı hafifse yanlış (-) sonuçlar görülebilir (46).

2.6.3. İdrarda Proteinin Kantitatif Ölçüm Yöntemleri

İdrarda kantitatif protein analizi için 24 saatlik idrar toplanmalıdır. Sonra, protein tayini yapılarak sonuç mg/24 saat cinsinden hesaplanır. Günümüzde idrar proteinini kantitatif olarak ölçebilen ticari kitler geliştirilmiştir (50).

İdrarda protein çıkışının değerlendirilmesinde yaygın kabul edilebilen ortalama standart, tek bir method veya teknik yoktur (51). İdrar kompleks bir karışımdır. Geniş değişken osmalitesi, iyonik kompozisyonu, metabolit içeriğinin değişken olması nedeniyle idrarda bulunan protein karışımları, (albumin, globulin, Tamm –Horsfall proteini, polipeptitler) farklı protein reaktifleriyle farklı oranlarda reaksiyona girerler (2).

Düşük MA protein ve peptitlerin ölçümünün yanısıra, albümin ve globülinlerin, var olan metodlarla saptanmasında sıkıntı vardır. Üriner proteinlerin geniş varyasyonları nedeniyle, var olan otomatik yöntemler, global, kabul edilebilir, bir kalibratörden yoksun olduğu için globülinler ve düşük MA proteinler göz ardı edilmiştir. İdeal metod bütün proteinlere aynı oranda hassas olmalıdır (14).

İdrarda Proteinin Kantitatif Ölçüm Yöntemleri

1) Türbidimetrik

- a) Sülfosalisilik asit (SSA)
- b) Triklorasetik asit (TCA)
- c) Benzethonyum klorür

2) Boya bağlama

- a) Coomassie brillant mavisi (Bradford)
- b) Ponceau S
- c) Molibdat-Pyrogallol kırmızısı
- d) Folin Lowry

3) Diğer

- a) Purdy
- b) Modifiye Purdy
- c) Esbach

İdrardaki protein analiz metodları, proteinlerin solusyon içerisindeki özelliklerine dayanır.

1985 yılında Amerikan Patoloji Koleji tarafından yapılan çalışmada idrarda total protein ölçümünde, en sık kullanılan yöntem türbidimetrik metoddur, labaratuvarlar içinde benzethonyum klorür yöntemiyle çalışanlar (% 41) ve diğer türbidimetrik yöntemlerle (% 31) oranındadır. Bunu da boya bağlayıcı yöntemlerden Coomassie Brilliant Blue (%26) oranıyla takip eder (14).

2.6.3.1. Türbidimetrik Yöntemler

TCA ve SSA içeren türbidimetrik metodlarda, bu asitlerin idrara eklenmesiyle açığa çıkan süspansiyondaki presipite olmuş proteinlerin türbidimetrik yöntemle ölçülmesidir (14).

TCA ve SSA metodları ölçümleri arasında farklılıklar vardır. Bu farklı proteinlerle oluşan farklı reaktiviteden meydana gelir (14).

Türbidimetrik ölçümleri, asit presipitatların kimyasal yapısı, protein tipi, asit konsantrasyonu, sıcaklık, asit eklenmesinin hızı ve asitin içinde kalma süreci etkiler. Buna ilave olarak, ilaçlar türbidimetrik metodları interfere edebilir. Düşük MA' lıklı proteinleri presipite etmeyebilir (14).

Sabit sıcaklıkta albümin, gama globuline nazaran SSA ile daha çok bulanıklık oluşturur. SSA aynı zamanda idrardaki polipeptitlerin bir çoğunu presipite eder. 20-25 C° arasında TCA albümin ve globülinle birbirine yakın bulanıklık oluşturur. Daha yüksek sıcaklıklarda TCA globüline nazaran albüminle daha çok bulanıklık oluşturur (14).

Benztenyum klorür içeren türbidimetrik veya boya bağlayıcı yöntemler bir çok laboratuvarlarda manuel tekniklerin yerini almıştır (2).

Benzetenyum klorür metodu, türbidimetrik yöntem olup, alkalin solüsyonda kuarterner amonyum tuzlarının proteinle etkileşimi sonucu benzetonyum klorür bulanıklık oluşturur (14), 700/505 nm de ölçüm yapılır (52). Isıya daha az duyarlı olup, SSA ve TCA dan daha stabildir (14). İdrarda alkalin solüsyonda protein olmayan içerikler (Ca,Mg gibi) türbidite oluşturur ve idrarda protein tayinini interfere eder . Bu yüzden bu yöntemde, tetra sodyum EDTA kullanılır (53). Konjuge bilirübin konsantrasyonu 20 mg/dL olana kadar belirgin etkileşim olmaz.

Ortak ilaç panelleri kullanılarak terapötik konsantrasyonlarda hiçbir interferansın olmadığı bulunmuştur. İstisna olarak Levo-dopa, metil dopa, Na- sefoksitin yanlış yüksek

total protein sonuçlarına neden olur, kalsiyum dobesilat yanlış düşük total protein sonuçlarına neden olur (52).

Ölçüm Aralığı 40-2000 mg/L dir. Alt ölçüm sınırı 40 mg/L dir.

Hesaplanabilir ölçüm aralığı: 40-6000 mg/L

Referans Değeri : 24 saatlik idrarda < 150 mg/24 saatdir

Spot idrarda < 120 mg/L dir (52).

2.6.3.2. Boya Bağlayıcı Yöntemler

Coomassie brillant mavisi, Ponceau S, Molibdat-Pyrogallol kırmızısı boya bağlayıcısı yöntemleridir, hızlı, kolay, otomatik olarak ölçülebilir (54).

Bradford yönteminde; Coomassie Brilliant blue, boyasının idrardaki proteinlere bağlanması ile 365-595 nm arasında maksimum absorbans oluşturur (55). Asidik boya genel olarak arjinin ve lizin rezidülerine bağlanır, yalnız serbest aminoasitlere bağlanmaz (56).

Bu ölçümde oluşan renk bir saat kadar stabildir. Proteine boya bağlanma işlemi 2 dakika içinde tamamlanır (55). Lowry'den daha hızlı ve kolaydır (56). Bradford yöntemini, Na^+ , K^+ gibi katyonlar ve de karbohidratlar, EDTA, gliserol interfere etmezler ya da çok az interfere ederler. Sodyum dodesil sülfat gibi deterjanlar ölçümü interfere eder (55). Hemoglobin beklendiği gibi (+) interferansa neden olur. 1 mg lık Hb artışı idrarda 1 mg lık protein artışına neden olur (57). 2

Referans Değeri: 24 saatlik idrarda < 120 mg/24 saatdir (58).

Ölçüm Aralığı: 5-1500 mg/L (57).

Alt ölçüm sınırı: 5 mg/L (55).

Lowry yönteminde, Lowry ve ark'ı protein miktarı ölçümünü biüret metoduna dayandırmışlardır. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinin peptit bağlarıyla kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgenir. İndirgenmiş bakır ve proteinlerin yan zincirinde yer alan Tyr ve Trp aminoasitleri, Folin- Ciocalteu'nun fenol reaktifini indirgeyerek, molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana gelir (4).

Biüret metodundan 100 kat daha düşük seviyeleri ölçebilir. Düşük konsantrasyondaki proteinleri ölçmek için bir avantajdır. Lowry metodu, doku kaynaklı proteinlerin ve enzimlerin tayininde yaygın olarak kullanılır (4).

Düşük konsantrasyonların saptanabilmesine rağmen idrarda uygulanması tam bir başarı sağlayamaz. Çünkü reaktifler protein olmayan maddelerle bağlanarak yanlış (+) hata verirler (4).

İdrardaki pigmentlerin yanında, nitrojen ve sülfür içeren bileşikler bakırla kompleks yaparak yanlış (+) sonuçlara neden olurlar (59). Lowry metodu farklı proteinlerle farklı oranlarda renk değişimine neden olur (58).

K⁺, Mg⁺, EDTA, karbohidrat, gliserol interferans meydana getirir (57). Salisilatlar, tetrasiklin (+) interferansa neden olur (4).

Ölçüm Aralığı: 1-100 mg/dL (56).

Alt ölçüm sınırı: 1 mg/dL (56).

İdrarda protein ölçüm yöntemlerinin analitik performansları Tablo-3'de özetlenmiştir.

Tablo 3. İdrarda Protein Ölçüm Yöntemlerinin Analitik Performansları (14).

Metod	Analitik Sensitivite (mg/L)	Linearite (mg/L)
TCA	20	0-2400
SSA	10-25	0-3000
Comassie Brilliant	5	5-1500
Folin Lowry	10	10-1000
Benzetenyum klorür	40	40-2000

2.6.3.3. Diğer Yöntemler

Purdy Metodu

Prensip: Proteinlerin asitlerle çöktürülmesi esasına dayanır (50).

Dereceli satrifüj tüpü 10 mL işaretine kadar berrak idrarla doldurulur. Bunun üzerine 2 mL glassial asetik asit ve 3 mL % 10 luk potasyum ferrosiyanür ilave olunur. Karıştırıldıktan sonra 3-5 dakika kendi halinde bırakılır. Çöken proteinler tüpün taksimatından okunur. Çökeleğin hacmi 0,21 ile çarpılırsa % gram protein olarak elde edilmiş olur (50).

Modifiye Purdy metodu

15 mL'lik konik ve dereceli bir santrifüj tüpüne, 10 mL çizgisine kadar berrak idrar konur. Santrifüj tüpündeki berrak idrar üzerine, 15 mL çizgisine kadar % 20'lik TCA

eklenir (45). TCA, proteindeki amino asitlerinlerin yan zincirindeki iyonik grupların yüklerini değiştirerek iç elektrostatik dengeyi bozar ve proteinin denatürasyonuna neden olur. Denatüre olan proteinler, çözünürlükleri değişeceğinden çökerler. İdrarda protein varsa bu sırada tüpteki idrarda bir bulanıklık ve çökelti oluşur (58).

Esbach metodu, Esbach tüpü U işaretine kadar, asitlendirilmiş idrarla doldurulur. R işaretine kadar Esbach reaktifi konur (Esbach reaktifi: 10 g pikrik asit ile 20 g sitrik asit 1000 mL distile suda eritmek suretiyle yapılır). Tüpün ağzı bir mantarla kapatılır. Tüpün üstündeki taksimattan idrardaki protein okunur. Bu rakam, 1000 mL idrardaki protein miktarını gram olarak verir. Esbach yöntemi, urat, kalsiyum tuzları, kinin ile çökelek verir (45).

2.7. Albüminüri

Albüminüri tanımı, albüminin birim zamanda (genellikle /24 saat) idrar yoluyla atılım miktarı şeklinde belirtilmektedir (6). 24 saatlik süreçteki idrar protein atılımının hesaplanması altın standart metod olarak kabul edilmektedir (5). 24 saatlik idrar örneğinin toplanması hususundaki sıkıntılar yüzünden, bunun yerine idrar albümin ve kreatinin konsantrasyon oranları (ACR) kullanılmaktadır (6). Albümin atılımının geleneksel normal üst limiti 30 mg/gün olmasına rağmen, son epidemiyolojik veriler genel popülasyondaki seviyelerin daha düşük olduğunu göstermiştir (7). Albüminürinin sınıflandırılması Tablo 4'de özetlenmiştir.

Tablo 4. Albuminürinin Sınıflandırılması (9).

	Spot İdrar		24 Saatlik İdrar
	Albümin konsantrasyonu (mg/dL)	Alb/Kreatinin (mg/g)	Albümin konsantrasyonu (mg/gün)
Normal	<2	<30	30
Mikro		30-300	30-300
Makro		>300	>300

Mikroalbüminüri, albümin- kreatinin oranı 30 ila 300 mg albümin /g kreatinin aralığında olmasıdır (8). Makroalbüminüri, albümin /kreatinin oranı 300 mg /g üzerinde olmasıdır (9).

Albüminüri mekanizması, günümüz böbrek fizyolojisi hususundaki belki en kompleks ve bununla birlikte en önemli sorulardan birisidir. Yakın zamanda gerçekleştirilmiş olan araştırmalar, sağlıklı bir glomerülün önemli miktarda albümini süzdüğünü göstermiştir (1).

Bu süzölmüş albümin, sonrasında iki farklı yolak aracılığıyla proksimal tübüler hücrelere iletilir. Süzölmüş albüminin büyük bir bölümü, bir geri kazanım yolağı aracılığıyla peritübüler kana karışır. Süzölmüş albüminin geri kazanılmamış küçük bir miktarı, idrarla atılım öncesinde minik peptid fragmentleri şeklinde kaçınılmaz bir lizozomal degradasyona uğrar. Bu degradasyon yolağı; hipertrofi ile fibrozisten sorumlu, hiperglisemik ve hipertansif koşullarca stimüle edilen, anjiyotensin-2 ve transforming growth faktör- β 1 gibi moleküllere duyarlıdır (1).

Egzersiz, postür ve sirkadiyen ritm albüminüriyi etkiler. Yüksek rakım hipoksisi, renal arterleri cerrahi olarak çapraz klemleme ve myokard iskemisi de albümin ekskresyonunu artırır, stres etkeni ortadan kalktığında albüminüri de ortadan kalkar (7) .

İdrardaki albümin atılımı, böbrek hasarı ile beraber böbrek hastalığının progresyonunu göstermektedir. Aynı zamanda son dönemde yapılan çalışmalarda, kardiyovasküler hastalık için de bir risk faktörü olduğu ortaya konulmuştur (6).

2.7.1. İdrardaki Bulunan Albüminin Moleküler Yapısı

Hepatositlerden, insan serum albümin geni tarafından, preproalbümin şeklinde kodlanmaktadır ve intrasellüler olarak olgun plazma proteinine dönüştürölüp 585 aminoasitlik bir primer zincirden meydana gelmektedir (6).

Molekül ağırlığı 66 kDa olup, 3 globüler domainden oluşur. Albümin 17 iç disülfid çapraz bağı ile α - helikal yapı stabilize edilmektedir ki, bunların sonucunda molekül denatürasyona karşı dayanıklı hale gelmektedir (60).

Üriner albümin, plazmadaki albüminden farklıdır İdrardaki pH, üre ve yüksek glukoz konsantrasyonu, askorbik asit, idrar yolu enfeksiyonlarındaki artmış nitrit gibi çevresel faktörlerden albümin geniş bir iyonik etkileşime maruz kalabilir (61).

İdrarın normal pH aralığı (pH= 5-8), albümin üzerine bir etki yapmamaktadır. pH değerleri 4'ün altında ya da 8'in üzerinde olduğu durumlarda, albümin çoğu reversible olmak üzere büyük konformasyonel değişimlere maruz kalır (6).

Albümin, pek çok sayıda küçük organik molekül ve iyon için taşıyıcı özelliğe sahiptir. Bu moleküllere bağlanması sonucunda albüminin konformasyonunda değişiklikler olabilir (62). Bakır ve tiroksin gibi pek çok diğer endojen moleküller albümine bağlanır ancak plazmadaki albüminin %1'inden azı bu moleküllerle bağlıdır (6). Fizyolojik plazma konsantrasyon değerleri içerisinde, albümin molekülü başına 1 veya 2 Ca^{+2} ve 7 veya 8 Cl^- bağlanmış durumdadır. Bahsedilen iyonların bağlanması pH'a bağımlı olarak gerçekleşmektedir ve bu sebeple idrardaki değerleri değişiktir. Analiz esnasında iyonlar başka iyonlarla hızlı bir şekilde yer değiştirebilirler (61).

Sirküle kanda albüminin yarı ömrü yaklaşık 19 gündür (63) ve bu özelliği albümine kimyasal modifikasyon özelliği kazandırmaktadır. Penisilin, sülfonamidler, salisilatlar gibi çok sayıda ilaç albümine bağlanma özelliği gösterir. Plazmadaki albümin moleküllerinin

%1- 10'u DM mevcut bireylerde, daha yüksek konsantrasyonların varlığı sonucunda glukoz reaksiyonu aracılığıyla glikolize halde bulunmaktadır. Plazmaya kıyasla idrarda daha yüksek olan glikolize albümin düzeyi, glikolize formun tübüler geri alım etkinliğindeki zayıflık ile ilişkilendirilmiştir (6).

Özellikle idrar, plazmaya kıyasla düşük molekül ağırlıklı peptidler ve hippürik asit ile fenilasetilglutamin gibi aminoasitten derive moleküller açısından da zengindir (64).

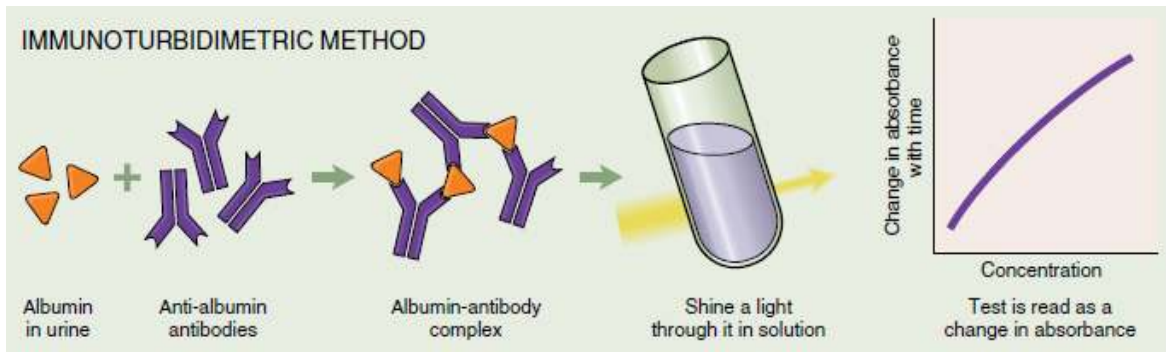
Albümin, proksimal tübül hücreleri tarafından hızlı bir şekilde endositozla alınır. Süzölmüş albüminin geri kazanılmamış küçük bir miktarı, idrarla atılım öncesinde peptid fragmentleri şeklinde kaçınılmaz bir lizozomal degradasyona uğrar (1). İdrarda >5 kDa büyüklüğünde çeşitli albümin fragmanları tespit edilmiştir (6). Albüminin lizozomlarca parçalanma derecesine bağlı olarak tesbit edilebilen veya tesbit edilemeyen fragmentler ortaya çıkmaktadır. Mikroalbüminüri düzeyi, intakt ve degrede albümin formlarının dengesindeki değişikliklere bağlı olarak değişir. Nefrotik düzeyde proteinürisi olanlarda ise degradasyon yolağı inhibe olur (65).

2.7.2. İdrarda Albüminin Ölçüm Yöntemleri

İdrarda albümin immünotürbidimetrik, immünonefelometrik, ELISA, HPLC, likit kromatografi, tandem mass yöntemleriyle tayin edilmektedir (10).

2.7.2.1. İmmünotürbidimetrik Yöntem

Türbidite bulanıklık demektir. Antialbumin antikorları, örnekteki antijenle reaksiyona girerek, bulanıklık oluşturlar. Oluşan bulanıklık nedeniyle ışığın geçişinde azalma olur. Absorbe olan ışığın miktarı numüne konsantrasyonu ile ilişkilidir. Antijen – antikor reaksiyonları türbidimetrimin başlıca kullanım alanıdır. Serum, beyin omurilik sıvısı, idrar ve diğer vücut sıvılarında protein ölçümleri yapılabilir (49). Şekil 4’de İmmünotürbidimetrik metodun prensibi gösterilmiştir.



Şekil 4. İmmünotürbidimetrik Metod

Ölçüm Aralığı: 3-40 mg/dL

Hesaplanabilir ölçüm aralığı: 3-440 mg/dL

Alt ölçüm sınırı: 3 mg/dL

2.7.2.2. İmmünonefelometrik Yöntem

Türbidimetri gibi bulanıklığın ölçümü esasına dayalı bir yöntemdir. Bir ışık süspansiyon içindeki partiküle çarptığı zaman absorbe ve reflekte olup saçılır veya transmittir olur. Nefelometride ölçülen ise saçılan ışıktır. Nefelometri, geçen transmittir ışık ile aynı yönde olmayan, dedektöre yönlendirilen saçılan veya yansıyan ışık enerjisinin saptanmasıdır. Çoğu nefelometreler gelen ışığa dik olarak saçılan ışığı ölçmektedir. Ancak, türbidimetriden temel farkı ortamdaki partiküllerce, geliş eksenine göre 90° açıyla yerleştirilmiş olan fotosele doğru saptırılan ışınların ölçülmesidir. Nefelometri düşük konsantrasyondaki antijen-antikor reaksiyonlarının duyarlı ölçümünde bir avantaj sağlamaktadır (4).

Ölçüm Aralığı: 1:1 dilüsyonda (2 mg/dL -64,53 mg/dL) arası,
1:20 dilüsyonda (40,3 mg/dL-1290 mg/dL)

2.7.2.3. HPLC (Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi)

Bir karışımın bileşenlerini, iki ya da daha çok fazdan oluşan sistemler arasındaki göç farklılıklarına bakarak tanımlamak ve niceliklerini belirlemek amacıyla yapılan bir analitik ayırma işlemidir. İlk olarak bir Rus bilim adamı Mikhail Semyonovich Tsvet tarafından bitki pigmentlerini ayırma metodu olarak geliştirilmiş ve ismini oradan almıştır. Günümüzde son derece duyarlı ve etkin bir yöntem olarak geçerliliğini sürdürmektedir.

Genel olarak kromatografi, molekül büyüklüğü, şekli, elektrik yükü, uçuculuğu, çözünürlüğü veya yüzeye tutunabilme (adsorptiviti) gibi fiziksel özelliklerdeki farklılıklar temelinde bir karışımın bileşenlerine ayrılmasında kullanılır (66).

Son yıllarda yeni kolon dolgu maddelerinin geliştirilmesiyle biyomoleküllerin ayrılmasında yüksek basınçlı sıvı kromatografisi tekniği ile geniş çapta kullanılmaya başlanmıştır. Aminoasitler, karbohidratlar, lipidler, nükleik asitler, proteinler, pigmentler,

Steroidler ve diğer biyolojik moleküllerin ayrımının yapılmasında ve tanımlanmasında çok iyi sonuçlar veren bu teknik otomatik hale getirilmiştir (58).

İdrar immuno-reaktif ve immunoreaktif olmayan komponentlerin kompleks bir karışımıdır. Immunoassayler sadece; >12 kDa albumin fragmentlerini ve polimer albumin agregatlarını (kümeleşme) algıladığı gibi immunoreaktif intakt idrar albuminini algılayabilir, ancak immunoassaylerin tam olarak hangi albumin komponentlerini tespit ettiği bilinmemektedir. HPLC analizleri ise gerek immunoreaktif gerek immuno nonreaktif komponentleri analiz etmesi sebebiyle iyi tanımlanmıştır (67).

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler

Biyokimya Otoanalizörü (ROCHE /Hitachi Cobas 6000 c501)

Nefelometre (Dade Behring BNII)

Otomatik Pipet Gilson P-1000, P-250, P-100 µl

Santrifüj (EPPENDORF 5810)

Karıştırıcı (AUTOVORTEX MIXER SA2)

Hassas Terazî (OERTLING NA 164)

Derin Dondurucu (NEW BRUNSWICK SCIENTIFIC ULTRA LOW TEMPERATURE FREEZER)

Deiyonize su cihazı (BARNSTEAD)

Elisa okuyucusu (Molecular Devices Versa Max)

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Albümin (Sığır serumu, SIGMA ALDRICH)

Bakır Sülfat Pentahidrat (MERCK)

Coomassie Blue G250 (SERVA)

Etanol (SIGMA)

Folin-Ciocalteu's Fenol reaktifi (2N SIGMA)

Fosforik Asit (%85 MERCK)

Sodyum bikarbonat (MERCK)

Sodyum Hidroksit (RIEDEL –DE HAEN)

Sodyum-potasyum Tartarat (MERCK)

Triclor asetik asit (MERCK)

ALBT2 Tina quant Albumin Gen.2 kiti Cobas c 501 kendi uyumlu kiti

N Antiserum to Human Albumin kiti Dade Behring kendi uyumlu kiti

TPUC3 Total Protein Urine/CSF Gen.3 Cobas c 501 kendi uyumlu kiti

3.2. Deneyin Planlanması ve Numunelerin Toplanması

3.2.1. Retrospektif Grup

KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından 03.12.2009-01.12.2010 tarihlerinde çeşitli klinikler tarafından laboratuvarımızdan eşzamanlı idrarda total protein ve albümin ölçümü istenen ve ölçümleri gerçekleştirilen 977 hasta çalışmaya alınmıştır.

3.2.2. Prospektif Grup

KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında idrarda total protein düzeyi rutin olarak türbidimetrik yöntemle, belirlenen 24 saatlik idrarlardan 40 örnek seçildi ve -80 °C’de donduruldu. Dondurulan örnekler 6 aylık süre içinde çözülüp, Modifiye Purdy, Lowry, Bradford yöntemiyle çalışıldı. Örnekler, idrarda total protein düzeyi, 10 mg/dL altında 10 idrar, 10mg/dL üstünde 30 idrar olacak şekilde gruplandırıldı.

İdrarda albümin ölçümü için gelen ve rutin olarak immünotürbidimetrik yöntemle çalışılan 24 saatlik idrarlardan 30 örnek seçildi ve İdrarda albumin düzeyi, 0-20 mg/dL olan 10 idrar, albümin düzeyi >20mg/dL nin üzerinde olan 20 idrar -80 °C de donduruldu. Dondurulan örnekler 6 aylık süre içinde çözülüp, immünonefelometrik yöntemle çalışıldı.

3.2.3. Otoanalizörlerde Tayin Edilen Parametreler

3.2.3.1. İdrarda Albümin (Nefelometre)

Dade Behring BNII otoanalizöründe kendi orijinal kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaktif

Yüksek oranda saflaştırılmış, insan albümini ile immünize olmuş tavşan serumundan elde edilir. İnsan vucut sıvısındaki proteinler, spesifik antikorlarla immünokimyasal reaksiyon veren immün kompleksler oluştururlar. Bu immün kompleksler nefelometrik yöntemle ölçülür. Saçılan ışığın oranı, örnekteki protein konsantrasyonu ile orantılıdır.

Ölçüm Aralığı: 1:1 dilüsyonda (2 mg/dL -64,53 mg/dL) arası, 1:20 dilüsyonda (40,3 mg/dL-1290 mg/dL)

N Prot Standard SL ile kalibrasyon yapılır. N Prot Standard SL içerisinde

Analit	Kaynak
Homosistein	İnsan serumu
Ig E	İnsan serumu
Ferritin	İnsan serumu
β -2 mikroglobulin	İnsan serumu
Ferritin	plasental
β -2 mikroglobulin	İdrar

3.2.3.2. İdrarda Albümin (İmmünotürbidimetrik)

Roche/ Hitachi Cobas 6000 c501 otoanalizörlerinde kendi orijinal kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Reaktifler

R1-TRIS tamponu: 50 mmol/L, pH 8,0; PEG: %4,2; EDTA: 2,0 mmol/L; koruyucu madde

R2-Poliklonal anti-insan albümin antikorları (koyun); titreye bağlı TRIS tamponu; 100 mmol/L, pH 7,2; koruyucu madde

R3-Antijen fazlalık kontrolü için reaktif

Seyreltilmiş serumda (insan) albümin; NaCl: 150 mmol/L; fosfat tamponu: 50 mmol/L,

pH 7,0; koruyucu madde

Poliklonal anti-albümin antikorları numune içindeki antijenle reaksiyona girip, antijen-antikor kompleksleri oluşturur ve aglütinasyonun ardından bu kompleksler türbidimetrik olarak ölçülür.

Ölçüm Aralığı: 3-40 mg/dL

Konsantrasyonu daha yüksek olan numuneleri rerun (tekrar çalışma) fonksiyonu aracılığıyla tayin edilir. Tekrar çalışma fonksiyonu ile numunelerin dilüsyonu 1:11 oranında dilüsyondur. Seyreltilen numune sonuçları otomatik olarak 11 faktörü ile çarpılır.

Hesaplanabilir ölçüm aralığı: 3-440 mg/dL

Alt ölçüm sınırı: 3 mg/L

İdrar Örneklerin Stabilitesi :15-25 ° C de 7 gün

2-8 ° C de 1 ay

(-15)-(-25) ° C de 4 ay

Kalibrasyon için C.f.a.s (Calibrator for automated systems-otomatik sistemler için kalibratör) PUC (Proteins in urine /CSF –İdrar/BOS içindeki Proteinler) kullanılır.

C.f.a.s PUC tamponlu sulu solüsyon kullanıma hazır sıvı kalibratördür.

İçerisinde reaktif bileşenler: HEPES tamponu: 20 mmol/L, pH 7,5 ve belirtildiği şekilde kimyasal katkı maddeleri ve biyolojik kaynaklı maddedir.

Analit	Kaynak
Albümin	İnsan Serumu
α - 1 Mikroglobülin	İnsan İdrarı
İmmünoglobülin G	İnsan Serumu
Total protein	İnsan Serumu/koyun serumu

3.2.3.3. İdrarda Protein (Türbidimetrik)

Roche/ Hitachi Cobas 6000 c501 otoanalizörlerinde kendi orijinal kitleri kullanılarak gerçekleştirildi.

Numune, potasyum ve magnezyum iyonlarının neden olduğu interferansı ortadan kaldıran EDTA içeren alkalin solüsyon içinde önceden inkübe edildi. Daha sonra benzetonyum klorür eklendi ve bulanıklık oluşturuldu. Türbidimetrik olarak ölçüm yapıldı.

R-1 Sodyum hidroksit: 530 mmol/L ;EDTA –Na :74 mmol/L

R-2 Benzetonyum klorür:32 mmol/L

Ölçüm Aralığı 4-200 mg/dL dir. Konsantrasyonu daha yüksek olan numuneleri rerun (tekrar çalışma) fonksiyonu aracılığıyla tayin edilir.Tekrar çalışma fonksiyonu ile numunelerin dilüsyonu 1:3 dilüsyondur.Sonuçlar otomatik olarak 3 ile çarpılır.

Alt ölçüm sınırı 4 mg/dL dir.

Hesaplanabilir ölçüm aralığı:4-600 mg/dL

C.f.a.s PUC, tamponlu sulu solüsyon kullanıma hazır sıvı kalibratördür.

İdrar Örneklerin Stabilesi:15-25 ° C de 1 gün

2-8 ° C de 7 gün

(-15)-(-25) ° C de 1 ay

3.2.4. Lowry Yöntemi

Lowry yöntemiyle protein tayini yapıldı. Bu yöntemde protein, önce, alkali bakır çözeltisiyle reaksiyona sokuldu. Alkali ortamdaki Cu^{+2} , proteinin peptit bağlarıyla kompleks oluşturarak Cu^{+1} 'e indirgendi. Daha sonra, Folin ve Ciocolteu'nun fenol reaktifi ilave edildi. Fosfotungstik ve fosfomolibdik asitlerin indirgenmesiyle molibdenyum mavisi ve tungsten mavisi renkleri meydana geldi (49).

Kullanılan Çözeltiler:

Reaktif I : % 2 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$

Reaktif II : % 2 Na-K – Tartarat

Reaktif A : 0.1 M NaOH içerisinde % 2 Na_2CO_3

RI : RII : RA = 1 : 1 : 100 = RB

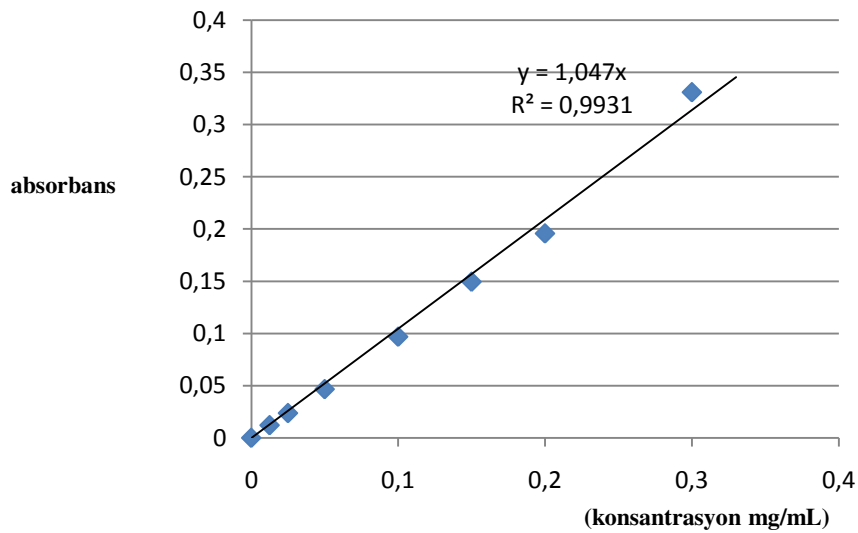
Folin reaktifi 1: 1 oranında seyreltilerek çalışmalar sırasında taze hazırlandı.

Albumin standartları: 15 mg albumin 50 mL deiyonize suda çözülerek 0,3 mg/mL albumin standardı hazırlandı. Bu çözeltiden 0,0125; 0,025; 0,05;0,1;0,15;0,2;0,3 mg/mL' lik örnekler hazırlandı. Bu veriler doğrultusunda protein tayini standart grafiği çizildi(Şekil 5).

Tablo 5. Protein Tayini Standart Numunelerinin Miktarı ve Eklenme Sırası

	Kör	Standart	Numune
Distile su	400 µL	-	-
Standart	-	400 µL	-
Numune	-	-	400 µL
RB	400 µL	400 µL	400 µL
Karıştırılarak 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi			
Folin reaktifi	200 µL	200 µL	200 µL

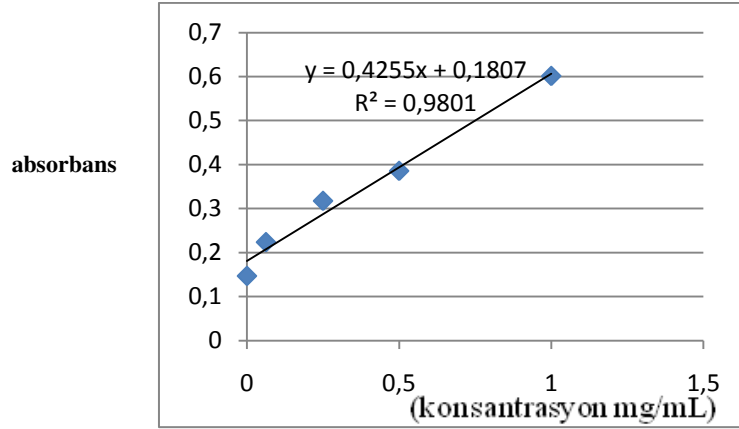
Folin reaktifi eklenen numuneler hemen vorteksle karıştırıldı ve 30 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 660 nm’de absorbanslar okundu.

**Şekil 5. Lowry Standart Grafiği**

3.2.5. Bradford Yöntemi

Coomassie Brilliant blue, G250’ nin kullanıldığı bir boya bağlama yöntemidir. Çalışmamızda 30 mg Coomassie Brilliant blue G250 ,15 mL % 95 lik etanolde çözüldükten sonra 30 mL % 85 lik fosforik asit eklendi. Son hacmi 300’ mL ye tamamlandıktan sonra 100µL reaktiften, 10 µL numuneden konularak 600 nm’de absorbans ölçümleri yapıldı.

Albumin standartları: 12,5 mg albumin 5 mL deiyonize suda çözülerek, 2,5 mg/ mL albumin standardı hazırlandı. Bundan 0,0625; 0,25; 0.5; 1 mg/ mL lik standartlar hazırlandı,



Şekil 6. Bradford Standart Grafiği

3.2.6. Modifiye Purdy Yöntemi

15 mL’lik konik ve dereceli bir santrifüj tüpüne, 10 mL çizgisine kadar berrak idrar konur. Santrifüj tüpündeki berrak idrar üzerine, 15 mL çizgisine kadar % 20’lik TCA eklenir; Tüp alt-üst edilir ve 5 dakika beklenir. Daha sonra idrar tüpü, yaklaşık dakikada 1500 devirli bir santrifüje bir başka tüple dengelenerek konur ve 5 dakika santrifüj edilir. Dereceli konik tüpteki çökeltinin yüksekliği, tüp üzerindeki skaladan okunur. Okunan çökelti yüksekliğinin 0,21 ile çarpımı, % gram cinsinden idrardaki protein miktarını verir (43).

3.2.7. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda ölçümle elde edilen veriler aritmetik ortalama (X), standart sapma (SD) ve ortanca (minumum-maksimum) şeklinde ifade edildi. Frekans veriler sayı (%) olarak ifade edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğuna Kolmogorov-Smirnov testi ile bakıldı. Normal dağılıma uymadıkları için eşleştirilmiş örneklerde Wilcoxon analizi ile anlamlılıklarına bakıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi. Farklı yöntemler arasındaki karşılaştırmada Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.01$ olarak alındı. Yöntemler arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile belirlendi. İki gruptan fazla bağımlı grupta Friedman istatistik analizi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.01$ olarak alındı. Metodlar tekrar ikili gruplar halinde Wilcoxon analizi ile değerlendirildi.

Metodun analitik hassasiyeti (precision) ve doğruluğu (accuracy) varyasyon katsayısı

(% CV) hesaplanarak ifade edildi.

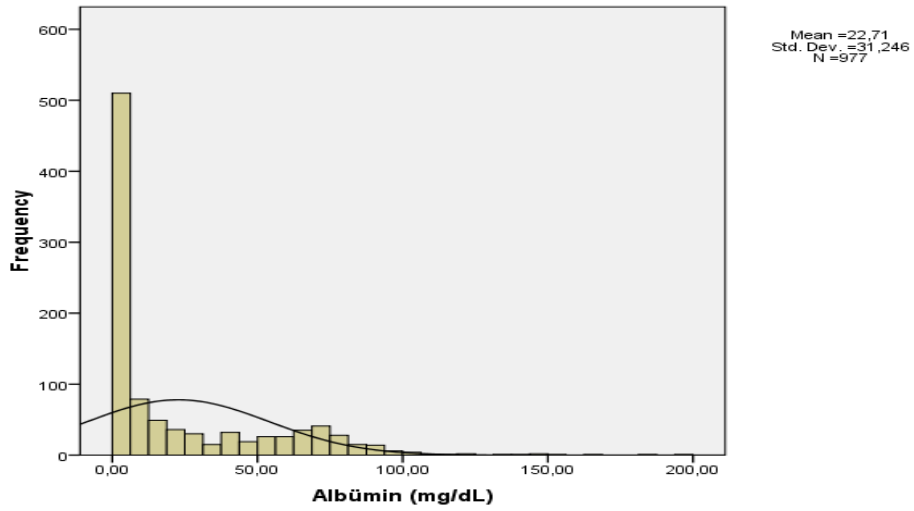
$$\% CV = (SD/X) \times 100$$

4. BULGULAR

4.1. Retrospektif Çalışma Grubunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları

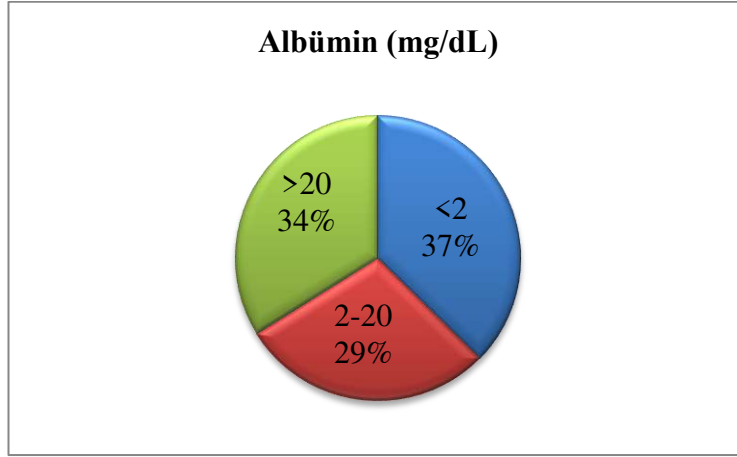
KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından 03.12.2009-01.12.2010 tarihlerinde eşzamanlı idrarda total protein ve albümin istenen 977 hastanın idrar sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmeye alındı.

977 hastanın İdrar albümin ortalama değeri $22,7 \pm 31,25$ mg/dL (0,01-199,5), median değeri 5,24 mg/dL olarak bulundu. İdrar albümin değerlerinin frekans dağılımı Şekil 7’de gösterilmiştir.



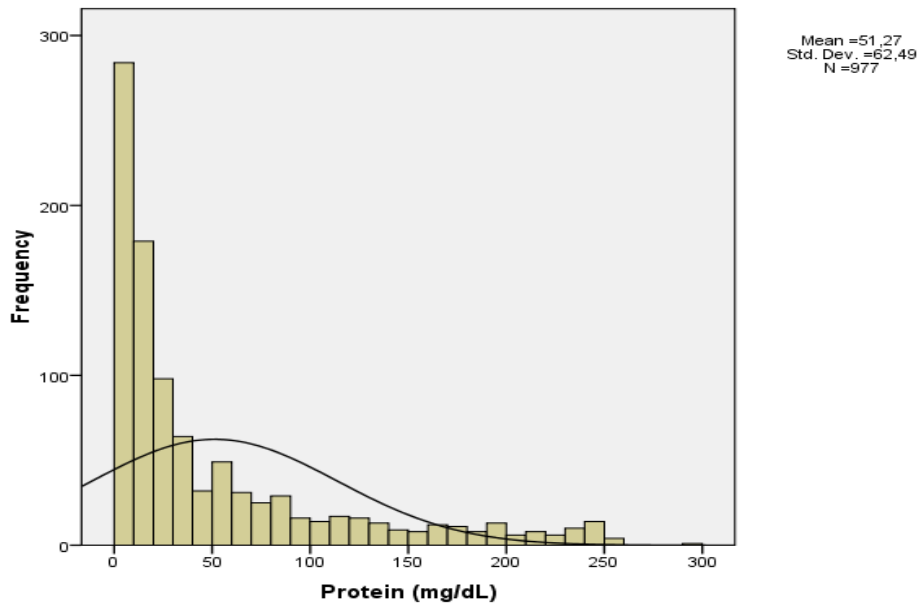
Şekil 7. Olguların İdrar Albümin Değerlerinin Frekans Dağılımı

977 hastanın % 37' sinin (365 hasta) İdrar Albümin düzeyi < 2 mg/dL ,% 29'unun (281hasta) 2-20 mg/dL, % 34'ünün (331hasta) >20 mg/dL nin üzerinde bulundu. İdrarda Albümin düzeylerinin yüzde dağılımı Şekil 8' da gösterilmiştir.



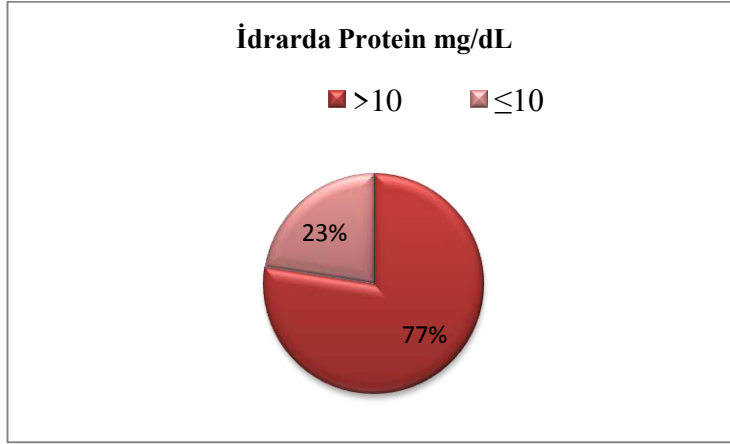
Şekil 8. Olguların İdrar Albümin Değerlerinin Yüzde Dağılımı

977 hastanın İdrar Total Protein ortalama değeri $51,3 \pm 62,49$ mg/dL (0,01-297,51), median değer 22,5 mg/dL olarak bulundu. İdrar Total Protein değerlerinin frekans dağılımı Şekil 9' da gösterilmiştir.



Şekil 9. Olguların İdrar Total Protein Değerlerinin Frekans Dağılımı

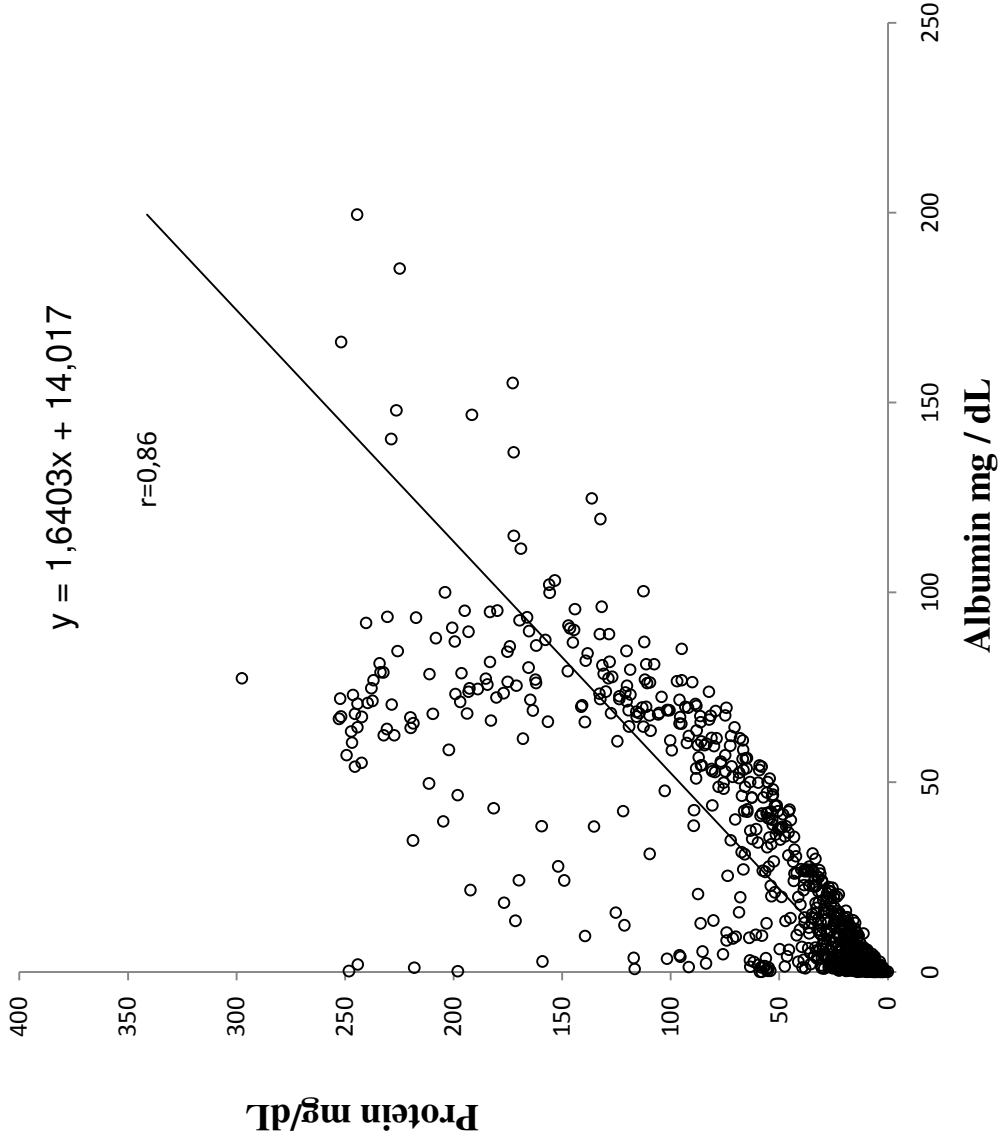
977 hastanın %77' sinin (696 hasta) İdrar Total Protein düzeyi 10 mg/dL' nin üstünde, %23' ünün (281hasta) İdrar Total Protein düzeyi 10 mg/dL'nin altında bulundu. Olguların İdrarda Total Protein düzeylerinin yüzde dağılımı Şekil 10' de gösterilmiştir.



Şekil 10. Olguların İdrar Total Protein Değerlerinin Yüzde Dağılımı

03.12.2009-01.12.2010 tarihlerinde 977 hastanın eşzamanlı idrarda total protein ve albümin değerlerinin normal dağılıma uygunluğu 'Kolmogorov-Smirnov' testi ile belirlendi. Non-parametrik 'Spearman' korelasyon testi uygulandı. Korelasyon Katsayısı $r=0,86$ $p=0,001$ istatistiksel olarak güçlü (+) korelasyon bulundu. Regresyon analizi uygulandı,

Şekil 11'da gösterilmiştir. Regresyon denklemi $y=1,6403x + 14,017$ olarak bulundu.



Şekil 11. İdrar Albümin ve Total Protein Düzeyleri (n=977) Arasındaki Regresyon Grafiği

4.2. Prospektif Çalışma Grubunun Biyokimyasal Analiz Sonuçları

4.2.1. İdrarda Albüminin Analiz Sonuçları

Prospektif aşamasında, immünotürbidimetrik yöntemle çalışılan örneklerden 30 idrar seçildi ve immünonefelometrik yöntemle çalışıldı, değerler Tablo 6'da gösterilmiştir. İmmünotürbidimetrik yöntemin ortalaması $65,1 \pm 80,34$ mg/dL (0,97-291,8), median değer 33,09, immünonefelometrikyöntemin $73,5 \pm 97,05$ mg/dL (0,79-343,0) median değer 29,6 olarak bulundu.8 örnekte idrarda albümin değerini, immünonefelometrik yöntem immünotürbidimetrik yöntemden düşük olarak ölçüldü. 22 idrarda albümin değerini, immünonefelometrik yöntem, immünotürbidimetrik yöntemden yüksek olarak ölçüldü. Yapılan non-parametrik Wilcoxon analizinde $p=0,024$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu.

Tablo 6. İmmünotürbidimetrik ve İmmünonefelometrik Yöntemle Ölçülen İdrar Albüminleri

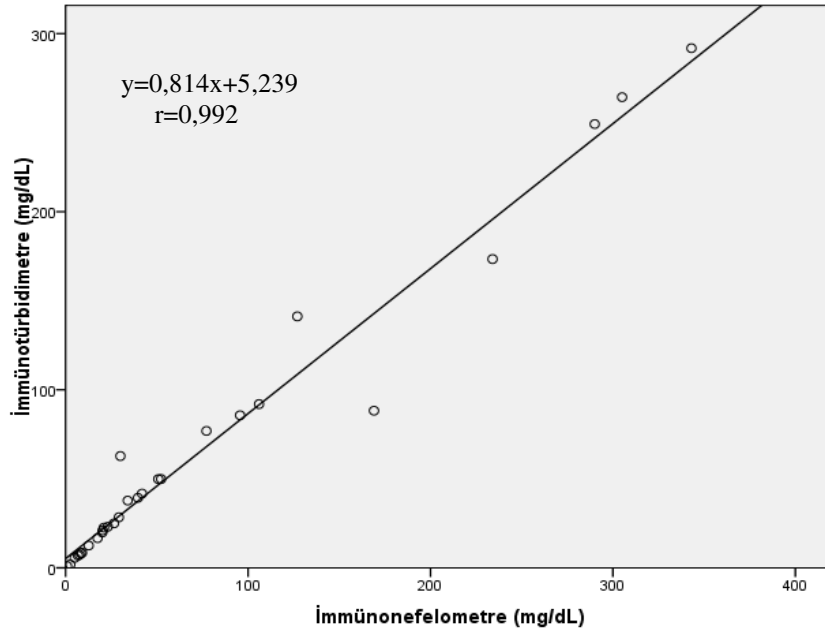
Hasta No	İmmünotürbidimetre(mg/dL)	İmmünonefelometre(mg/dL)
1	16.6	17.5
2	8.19	8.34
3	7.31	7.58
4	12.5	12.6
5	6.89	6.82
6	1.90	2.54
7	0.97	0.79
8	8.47	8.95
9	19.9	20.1
10	5.58	4.98
11	21.1	20.3
12	264	305
13	25.0	26.5
14	85.7	95.6
15	173	234
16	49.8	50.8
17	39.3	39.6
18	141	127
19	28.4	29.2
20	249	290
21	62.7	30.0
22	23.1	23.1
23	91.9	106
24	22.6	21.0
25	88.3	169
26	291	343
27	41.7	41.9
28	76.9	77.2
29	37.8	34.0
30	49.9	52.3

Tablo 7. İmmünotürbidimetrik ve İmmünonefelometrik Yöntemle Ölçülen İdrar Albümin Analizleri mg/dL (n=30)

Yöntem	Ortalama (mg/dL)	SD	Minimum	Maksimum
İmmünotürbidimetrik	65,1*	80,33	0,97	291,8
İmmünonefelometrik	73,5	97,05	0,79	343,0

*Wilcoxon analizinde p=0,024 olduğundan anlamlı fark var.

Non-parametrik ‘Spearman’ korelasyon analizi uygulandı. İstatistiksel olarak çok kuvvetli (+) korelasyon bulundu ($r=0,992$). Regresyon analizi uygulandı, İmmünonefelometrik ve İmmünotürbidimetrik metodlarla idrarda albümin ölçümünün, regresyon grafiği Şekil 12’de gösterilmiştir. Regresyon denklemi $y=0,814x + 52,39$ olarak bulundu.



Şekil 12. İmmünonefelometrik ve İmmünotürbidimetrik Metodlarla İdrarda Albümin Ölçümünün, Doğrusal Regresyon Grafiği

4.2.2. İdrarda Albüminin Analiz Yöntemlerinin Performans Verileri

İdrarda albümin ölçümü yaptığımız immünotürbidimetrik yönteminin analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirmesini kontrol numuneleri ile yapıldı. (Kontrol 1=Normal, Kontrol 2=yüksek seviye idrar albümin kontrolleri). Kontrol numunelerinde çalışma içi (intraassay) $n=5$ % CV kontrol 1’de % 7,35, kontrol 2’de % 3,27; hergün yapılan ölçümde günler arası (day to day) kontrol 1’de % 4,5 , kontrol 2’de % 3,30 bulundu ($n=5$). Sonuçlar ‘mg/dL’ cinsinden ifade edildi. Yine insan idrar örneklerinde ($n=10$) tekrarlanabilirliği test edildi. Çalışma içi (intraassay) ortalaması birinci idrar örneğinin 1,96 mg/dL, % CV değeri 8,54, ikinci idrar örneğinin ortalaması 17,91 ve % CV değeri 3.09 bulundu. Bulgular Tablo 8 ve 9 da verildi.

Tablo 8. İmmünotürbidimetrik Yöntemle İdrarda Albüminin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları

Örnek	Okunması Gereken Değer (mg/dL)	n	Ortalama	SD	% CV	Bias
Çalışma içi						
Kontrol 1	2.98±2,4	5	3,27	0,24	7,35	+0,29
Kontrol 2	11±9	5	11,85	0,38	3,27	+0,85
Günler arası						
Kontrol 1	3,05±2,4	5	3,03	0,13	4,5	-0,02
Kontrol 2	10±8	5	9,90	0,32	3,30	-0,1

SD = standart deviation, CV = coefficient of variation, n = ölçüm sayısı

Tablo 9. İmmünotürbidimetrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi İntraassay Albüminin % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	1,9	0,17	8,94
İnsan idrar 2	17,9	0,55	3,07

İdrarda albümin ölçümü yaptığımız immünonefelometrik yönteminin analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirmesini kontrol numuneleri ile yaptık. (Kontrol=yüksek seviye idrar albümin kontrolleri). Kontrol numunelerinde çalışma içi (intraassay) ortalaması 14,5, kontrolde % CV değeri 3,58; hergün yapılan ölçümde günler arası (day to day) kontrolde ortalama 16,3, kontrolde % CV değeri % 5,85 bulundu (n=5). Sonuçlar ‘mg/dL’ cinsinden ifade edildi. Yine insan idrar örneklerinde (n=10) tekrarlanabilirliği test ettik. Çalışma içi (intraassay) ortalaması birinci idrar örneğinin ortalaması 1,9 mg/dL ve % CV değeri 4,7, ikinci idrar örneğinin ortalaması 22,1, % CV değeri 5,2 bulundu. Bulgular Tablo 10 ve 11 de verildi.

Tablo 10. İmmünonefelometrik Yöntemle İdrarda Albüminin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları

Örnek	Okunması gereken değer (mg/dL)	n	Ortalama	SD	% CV	Bias
Çalışma içi						
Kontrol	16,3±1,22	5	14,5	0,52	3,58	-1,84
Günler arası						
Kontrol	16,3±1,22	5	16,3	0,95	5,85	-0,02

Tablo 11. İmmünonefelometrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi İntraassay Albüminin % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	1,91	0,09	4,7
İnsan idrar 2	22,1	1,14	5,2

4.2.3. İdrarda Protein Analiz Sonuçları

Çalışmanın prospektif aşamasında, Türbidimetrik yöntemle çalışılan örneklerden 40 idrar seçildi ve Lowry, Bradford, Modifiye Purdy yöntemleriyle çalışıldı, değerler Tablo 12’de gösterilmiştir. Lowry yönteminin ortalaması 451,8±282,6 mg/dL (127,2-1369,7); Bradford yönteminin ortalaması 162,5±149,4 mg/dL (0,05-444,1); Modifiye Purdy yönteminin ortalaması 94,5±83,7 mg/dL (21-315) ; Türbidimetrik yönteminin ortalaması 84,8±82,1 mg/dL (3,09-241,9) olarak bulundu, Non-Parametrik Friedman istatistik analizi uygulandı, p=0,001 olduğundan Lowry, Bradford, Modifiye Purdy, Türbidimetrik yöntemler arasında anlamlı fark bulundu (Tablo 13, Şekil 13).

Tablo 12. Lowry, Bradford, Türbidimetre, Modifiye Purdy Yöntemleriyle Çalışılan İdrarda Total Protein Değerleri mg/ dL

Hasta	Lowry	Bradford	Türbidimetre	Modifiye Purdy
1	356.22	10.17	4.01	<21
2	211.62	2.561	4.26	<21
3	185.87	0.047	3.09	<21
4	300.13	5.781	5.09	<21
5	127.83	0.822	4.43	<21
6	362.49	2.702	6.53	<21
7	414.68	17.69	9.03	<21
8	257.55	2.937	6.67	<21
9	193.38	16.09	5.61	<21
10	184.2	78.73	28.31	31.5
11	510.99	348.2	236.26	115.5
12	537.99	84.37	24.06	<21
13	514.05	2.115	15.13	<21
14	398.67	190.1	104.99	84.0
15	1369.7	49.11	22.98	<21
16	145.09	140.6	51.24	52.5
17	266.73	109.1	46.75	42.0
18	341.19	258.0	168.63	63.0
19	217.6	72.15	32.02	<21
20	679.54	40.07	23.09	<21
21	214.26	166.1	70.96	63.0
22	306.26	57.34	29.83	<21
23	419.83	289.7	150.56	105.0
24	284.27	72.03	35.75	21.0
25	1073.8	444.1	106.14	315.0
26	1047.8	137.8	52.32	21.0
27	127.27	72.03	88.39	31.5
28	133.95	42.42	16.43	<21
29	609.25	424.7	145.99	315.0
30	288.16	155.1	58.33	31.5
31	799.51	405.5	216.31	168.0
32	467.29	326.3	189.3	42.0
33	606.05	340.3	227.78	105.0
34	761.93	441.0	127.04	210.0
35	443.49	252.5	132.31	42.0
36	580.58	308.4	199.36	42.0
37	576.27	353.7	235.72	147.0
38	641.68	305.5	213.06	84.0
39	801.04	359.9	241.9	105.0
40	314.89	114.4	54.14	31.5

Tablo 13. Dört Yönteme Ait İdrarda Total Protein Analiz Sonuçları mg/dL (n=40)

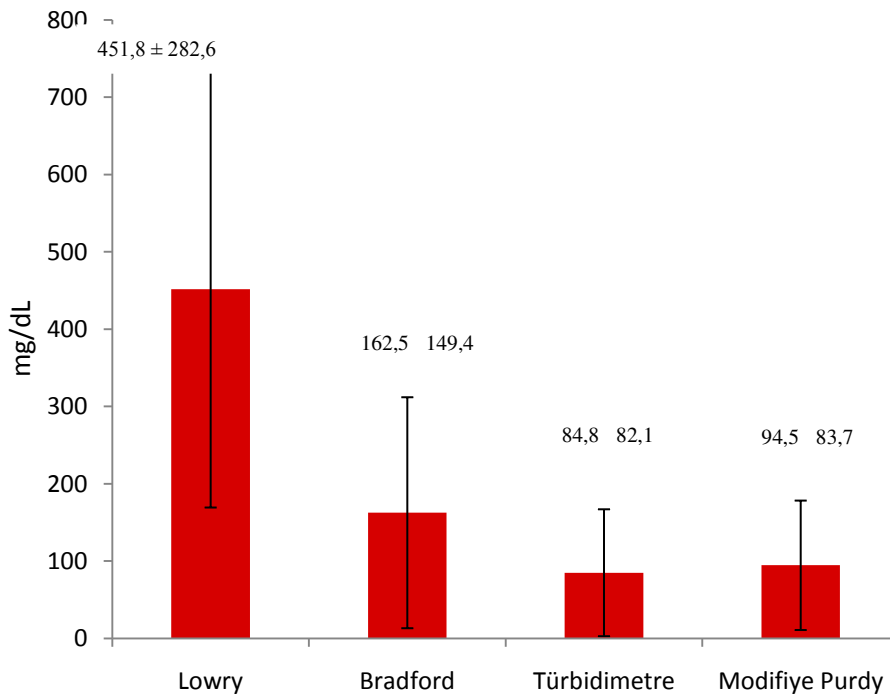
Yöntem*	Ortalama (mg/dL)	SD	Minimum	Maksimum
Lowry**	451,8	282,6	127,2	1369,7
Bradford***	162,5	149,4	0,05	444,1
Türbidimetre****	84,8	82,1	3,09	241,9
Modifiye Purdy	94,5	83,7	21,0	315

*Friedman istatistik analizi'ne göre $p=0,001$

**Lowry yöntemi diğer üç yöntemden anlamlı derecede yüksek (Wilcoxon, her biri için $p<0,001$)

***Bradford yöntemi diğer iki yöntemden anlamlı derecede yüksek (Wilcoxon, her biri için $p<0,001$)

**** Türbidimetre yöntemi ile Modifiye Purdy yöntemi arasında anlamlı fark var (Wilcoxon $p<0,01$)



Şekil 13. Dört Yönteme Ait İdrarda Total Protein Analiz Sonuçlarının Grafiği

Modifiye Purdy; yönteminde alt ölçüm sınırı 21 mg/dL olarak belirlendi bu nedenle ile 16 idrar örneği Bradford yöntemi ile karşılaştırılmadı. Modifiye Purdy 24 idrar örneğinde de Bradford yönteminden düşük idrar protein değerleri tesbit edildi.

Modifiye Purdy; yönteminde alt ölçüm sınırı 21 mg/dL olarak belirlendi bu nedenle ile 16 idrar örneği yöntemi Türbidimetri ile karşılaştırılmadı. Modifiye Purdy yöntemiyle

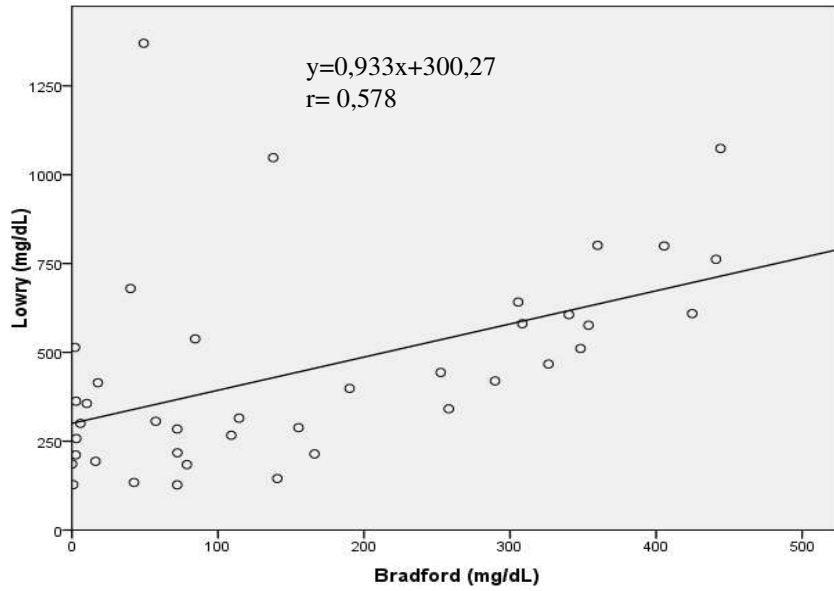
19 idrar örneğinde Türbidimetri yönteminden düşük, 5 idrar örneğinde ise Türbidimetri yönteminden yüksek idrar protein değerleri tesbit edildi.

Bradford yöntemi ile Türbidimetrik yöntem karşılaştırıldığında 33 idrar örneğinde

Türbidimetri yönteminden yüksek, 7 idrar örneğinde ise düşük idrar protein değerleri tesbit edildi.

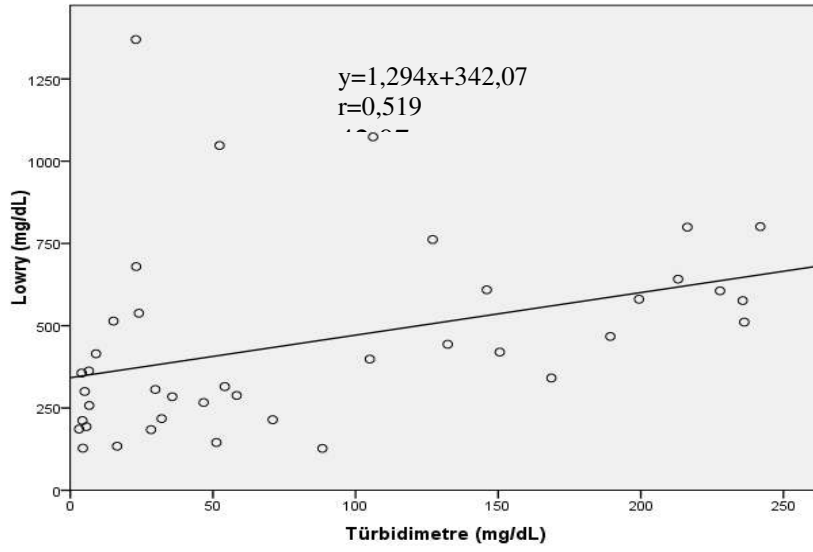
İdrar protein tayininde kullandığımız dört yöntemin sonuçlarının birbirinden oldukça anlamlı farklı olduğu anlaşılmaktadır.

Lowry yöntemi ile Bradford yöntemi arasında non-parametrik ‘Spearman’ korelasyon analizi uygulandı ve $r = 0,578$ orta (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y = 0,933x + 300,27$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 14’de gösterilmiştir.



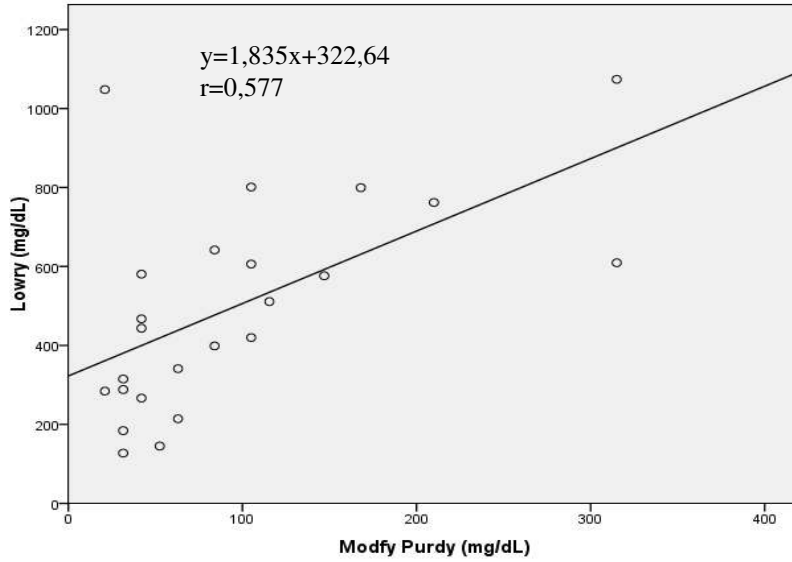
Şekil 14. Lowry Yöntemi ile Bradford Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

Lowry yöntemi ile Türbidimetri yöntemi arasında korelasyon analizi uygulandı ve korelasyon katsayısı $r = 0,519$ orta (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y = 1,294x + 342,07$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 15’de gösterildi.



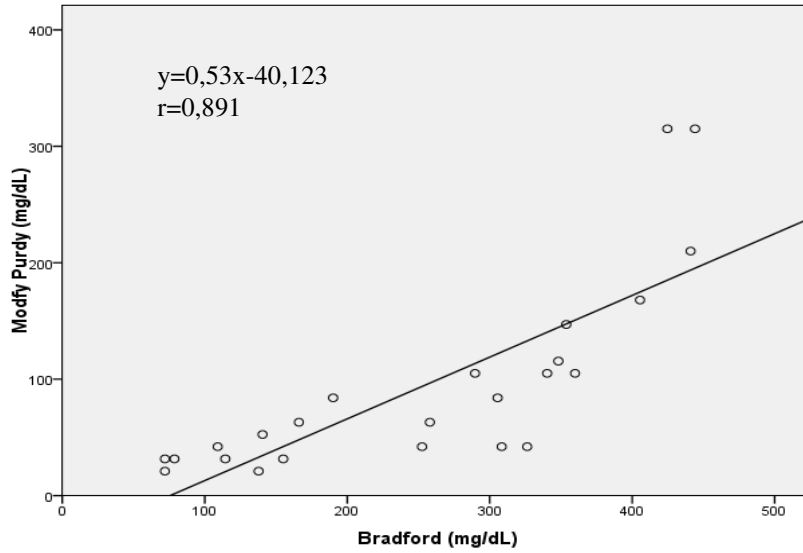
Şekil 15. Lowry Yöntemi ile Türbidimetre Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

Lowry yöntemi ile Modifiye Purdy yöntemi arasında korelasyon analizi uygulandı ve korelasyon katsayısı $r=0,577$ orta (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y=1,835x+322,64$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 16’de gösterildi.



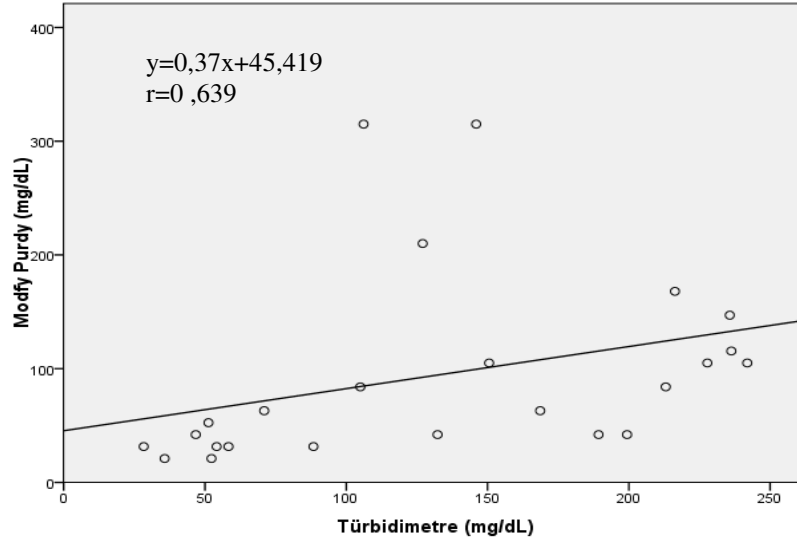
Şekil 16. Lowry Yöntemi ile Modifiye Purdy Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

Modifiye Purdy yöntemi ile Bradford yöntemi arasında korelasyon analizi uygulandı ve korelasyon katsayısı $r=0,891$ kuvvetli (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y=0,53x-40,123$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 17’de gösterildi.



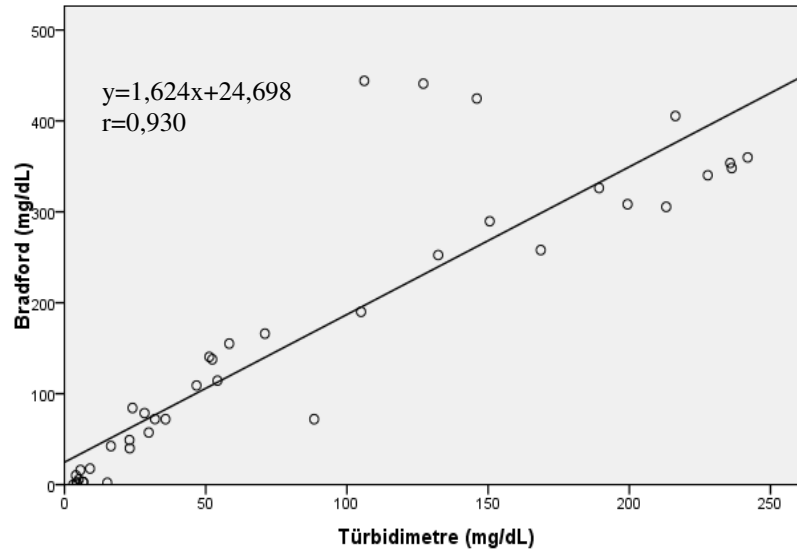
Şekil 17. Modifiye Purdy Yöntemi İle Bradford Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

Modifiye Purdy yöntemi ile Türbidimetri yöntemi arasında korelasyon analizi uygulandı ve korelasyon katsayısı $r=0,639$ orta (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y=0,37x+45,419$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 18’de gösterildi.



Şekil 18. Modifiye Purdy Yöntemi ile Türbidimetri Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

Bradford yöntemi ile Türbidimetri yöntemi arasında korelasyon analizi uygulandı ve korelasyon katsayısı $r=0,930$ çok kuvvetli (+) korelasyon bulundu. Yapılan lineer regresyon analizinde iki yöntem arasındaki ilişkiyi tanımlayan denklem $y=1,624x+24,698$ idi. İki yöntem arasındaki ilişki Şekil 19’de gösterildi.



Şekil 19. Bradford Yöntemi ile Türbidimetri Yöntemlerinin Regresyon Grafiği

4.2.2. İdrarda Protein Analiz Yöntemlerinin Performans Verileri

Lowry yönteminde, İdrarda protein ölçümünün analitik hassasiyetini ölçmek için, insan idrar örneklerinde (n=10) tekrarlanabilirliği test ettik. Çalışma içi (intraassay) birinci idrar örneğinin ortalaması 279,64 mg/dL ve % CV değeri 4,5, ikinci idrar örneğinin ortalaması 433,5, % CV değeri 11 bulundu. Bulgular Tablo 14’ de verildi.

Tablo 14. Lowry Yöntemiyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Albüminin Çalışma İçi % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	279,64	12,65	4,5
İnsan idrar 2	433,50	50,73	11

Bradford yönteminde, İdrarda protein ölçümünün analitik hassasiyetini ölçmek için ,insan idrar örneklerinde (n=10) tekrarlanabilirliği test ettik. Çalışma içi (intraassay) ortalaması birinci idrar örneğinin ortalaması 176,76 mg/dL ve % CV değeri 9,5, ikinci idrar örneğinin ortalaması 284,43, % CV değeri 4,3 bulundu. Bulgular Tablo 15’ de verildi.

Tablo 15. Bradford Yöntemiyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	176,76	18,89	10,6
İnsan idrar 2	284,43	12,36	4,3

Modifiye Purdy yönteminde, İdrarda protein ölçümünün analitik hassasiyetini ölçmek için, insan idrar örneklerinde (n=10) tekrarlanabilirliği test ettik. Çalışma içi (intraassay) ortalaması birinci idrar örneğinin ortalaması 44,10 mg/dL ve % CV değeri 10, ikinci idrar örneğinin ortalaması 81,9, % CV değeri 8,1 bulundu. Bulgular Tablo 16’da verildi.

Tablo 16. Modifiye Purdy Yöntemiyle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	44,1	4,42	10
İnsan idrar 2	81,9	6,64	8,1

Türbidimetri yönteminde, İdrarda protein ölçümünün analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirmesini kontrol numuneleri ile yaptık. (Kontrol 1=Normal, Kontrol 2=yüksek seviye idrar protein kontrolleri). Kontrol numunelerinde çalışma içi (intraassay) % CV kontrol 1’de % 7,74, kontrol 2’de % 1,62; hergün yapılan ölçümde günler arası (day to day) kontrol 1’de % 4,45, kontrol 2’de % 1,7 bulundu (n=5). Sonuçlar ‘mg/dL’ cinsinden ifade edildi. Yine insan idrar örneklerinde (n=10) tekrarlanabilirliği test ettik. Çalışma içi (intraassay) ortalaması birinci idrar örneğinin ortalaması 10,24 mg/dL, % CV değeri 7,1, ikinci idrar örneğinin ortalaması 86,02 mg/L , % CV değeri 1, üçüncü idrar örneğinin ortalaması 168,83 ve % CV değeri 1 bulundu. Bulgular tablo 17 ve 18 de verildi.

Tablo 17. Türbidimetrik Yöntemle İdrarda Protein Analizinin Hassasiyet (Precision) ve Doğruluk (Accuracy) Kontrol Sonuçları

Örnek	Okunması gereken değer (mg/dL)	n	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV	Bias
Çalışma içi						
Kontrol 1	18±1,4	5	19,63	1,52	7,74	+1,63
Kontrol 2	140±11,2	5	138,98	2,26	1,62	-1,02
Günler arası						
Kontrol 1	17,5±1,4	5	16,60	0,74	4,45	-0,9
Kontrol 2	129±10,3	5	122,74	2,10	1,7	-6,26

SD = standart deviation, CV = coefficient of variation, n = ölçüm sayısı

Tablo 18. Türbidimetrik Yöntemle Çalışılan İnsan İdrar Örneklerindeki Çalışma İçi Protein % CV Sonuçları

Örnek (n=10)	Ortalama (mg/dL)	SD	% CV
İnsan idrar 1	10,24	0,73	7,1
İnsan idrar 2	86,02	0,86	1
İnsan idrar 3	168,83	1,71	1

5. TARTIŞMA

Proteinüri, kardiyovasküler ve böbrek hastalıkları için bağımsız bir risk faktörü olarak bilinmektedir. Hatta protein atılım düzeyinde artış tespit edilmesinin, böbrek hastalığına tanı konması ve doğrulanması açısından prognostik değere sahip olduğu ve proteinüri miktarının saptanması tedavinin etkinliği ve hastalığın progresyonunun değerlendirilmesinde güvenilir bir faktör olduğu bilinmektedir. Protein ya da albümin atılım düzeylerinde görülen artış; preeklampsi, diyabetik nöropati ve ilaçların etkisiyle gelişebilen nefrotoksisite gibi çeşitli spesifik tabloların erken teşhisinde de kullanılmaktadır (5).

İdrarda protein tayini, idrarda yapılan analizler içerisinde en sık olanıdır (19). İdrar proteinlerinin tayininde kullanılan kantitatif yöntemler bulanıklık oluşumu, boya bağlama ya da renk oluşumu temeline dayanırlar. Bulanıklık oluşumuna dayanan türbidimetrik yöntemler triklorasetik asit (TCA), sülfosalisilik asit (SSA), ya da alkali benzenyonyum klorür yöntemlerini kapsar. Boya bağlama yöntemleri, Coomassie brilliant blue, Ponceau-S ve özellikle son yıllarda yaygınlaşan Pyrogallol Red yöntemleridir. Renk oluşum temeline dayanan yöntemler ise Folin-Lowry reaksiyonlarıdır. 1985 yılında Amerikan Patoloji Koleji tarafından yapılan çalışmada, en sık kullanılan yöntem türbidimetrik metoddur, laboratuvarlar içinde benzenyonyum klorür yöntemiyle çalışanlar (%41) ve diğer türbidimetrik yöntemlerle (% 31) oranındadır. Bunu da boya bağlayıcı yöntemlerden Coomassie Brilliant Blue (%26) oranıyla takip eder (14).

İdrar kompleks bir karışımdır. Geniş değişken osmolitesi, iyonik kompozisyonu, metabolit içeriğinin değişken olması nedeniyle idrarda bulunan protein karışımları, (albumin, globulin, Tamm–Horsfall proteini, polipeptitler) farklı protein reaktifleriyle farklı oranlarda reaksiyona girerler (2). Total üriner protein konsantrasyonunu ölçmede kullanılan metodların varyasyonları iki ana sebebe dayanmaktadır.

1. Total üriner proteinin, fizyolojik seviyelerde bile neyi tanımladığı bilinmemektedir. İdrar, çeşitli proteinlerden oluşan bir karışımdır ki farklı bireylerde farklı oranlarda ve farklı içeriklerde proteinler vardır.

2. Çeşitli metodların, farklı reaksiyon mekanizmalarına dayanması ile farklı bireysel proteinlere ve onların peptit fragmanlarına farklı hassasiyetler gösterirler.

Böylece bu metodların hiçbiri, üriner proteinlerin toplamının gerçek sonucunu vermez.

Üriner protein metodları için doğruluk tanımlaması zordur. Bu yüzden idrar proteini için referans materyal geliştirmek de zordur (68).

J. Dube ve arkadaşlarının, otoanalizörlerdeki idrar protein ölçümlerindeki problemleri araştırırken, boya bağlayıcı ve türbidimetrik yöntemlerde yaptıkları geri kazanım (recovery) çalışmalarında albümin yüksek recovery oranlarına sahipken gama globülinler düşük recovery oralarına sahiptir. Tamm-Horsfall proteinlerinin, recovery ölçümlerinde reaksiyona girmediği gösterilmiştir. Polipeptitler, bazı otoanalizörlerde reaksiyona girmezken bazıları ile yüksek yoğunlukta reaksiyona girer (2). Çalışmamızda otoanalizörlerden Roche sistemi; türbidimetrik (benzetenyum klorür) metodu kullanıldı. Manuel olarak boya bağlayıcı yöntemlerden Lowry ve Bradford yöntemlerini ve TCA kullanılarak proteinleri çöktüren Modifiye Purdy yöntemi kullanıldı.

Bu çalışmada 40 idrar seçildi ve total protein konsantrasyonları Lowry, Bradford, Modifiye Purdy, Türbidimetrik yöntemlerle çalışıldı. Lowry yönteminin ortalaması $451,8 \pm 282,6$ mg/dL; Bradford yönteminin ortalaması $162,5 \pm 149,4$ mg/dL; Modifiye Purdy yönteminin ortalaması $94,5 \pm 83,7$ mg/dL; Türbidimetrik yönteminin ortalaması $84,8 \pm 82,1$ mg/dL idi. Non-Parametrik Friedman istatistik analizi uygulandı, $p=0,001$, olduğundan yöntemler arasında anlamlı fark bulundu. Ortalamalardan anlaşılabileceği gibi Lowry yöntemiyle elde edilen sonuçlar diğer yöntemlerin sonuçlarından en az dört kat daha yüksekti. Dolayısıyla çalışmamızda idrarın kompleks ve değişken protein içeriklerinin (albümin, globülin, Tamm-Horsfall, polipeptit) farklı protein reaktifleri ile farklı reaksiyon verdiği anlaşıldı.

Bu idrarlar içinde Türbidimetrik yöntemle ölçülen < 10 mg/dL(referans aralıkta) 10 idrar seçildi, bunlarda da yöntemler arasında anlamlı farklar bulundu.

Jihei Iwata ve arkadaşlarının, yaptığı serebrospinal sıvıda ve idrardaki proteinlerin mikro türbidimetrik metodlarla belirlenmesi adlı çalışmada, Lowry ve Türbidimetrik

benzetonyum klorür metoduyla yaptıkları karşılaştırmada 50 mg/dL lik γ -globülin ölçümünde Lowry metodunun daha sensitif olduğu gözlenmiştir. 200 mg/dL lik pepton solüsyonunu kullanılarak reaktifin peptitlerle mi proteinle mi etkileştiğini araştırmışlar, Lowry metodu ile çok yüksek absorbands değerleri ölçülürken, benzetonyum klorür metodunda sıfıra yakın absorbands ölçülmüştür. Aynı çalışmada nefritli hastalardan iki idrar alınıp Lowry metodu ile; 1. idrar 226,8 mg/dL, 2. idrar 440,8 mg/dL ölçüldüğü halde, Türbidimetrik benzetonyum klorür; 1.idrar 24,4 mg/dL, 2.idrar 130,8 mg/dL olarak ölçülmüştür (53). Bizim çalışmamızda da idrar proteinin referans aralığındaki ve nefritli hastalardaki Lowry yönteminin ortalamasının yüksek oluşunun nedeni, Lowry yönteminin peptitlerle ve diğer protein fragmentleri ile etkileşmesi olabilir. Aynı zamanda idrardaki pigmentlerin yanında, azot ve sülfür içeren bileşikler bakırla kompleks yaparak (59) ya da K^+ , Mg^+ , EDTA, karbohidrat, gliserol ile (56) interferans meydana getirmiş olabilir.

Protein tayin yöntemlerinden Lowry yöntemi ile diğer yöntemler arasındaki korelasyon analizlerinde düşük korelasyonlar bulunması (Şekil 14-16)'da Lowry yönteminin idrar protein analizinde iyi sonuçlar vermediğine işaret etmektedir.

Modifiye Purdy yöntemini (manuel TCA ile proteinleri çöktürme), asitin kimyasal yapısı, protein tipi, asit konsantrasyonu, sıcaklık, asit eklenmesinin hızı ve asitin içinde kalma süreci etkiler. TCA, düşük MA lıklı proteinleri presipite etmeyebilir (14). Kullanılan örnek hacminin 10 mL gibi fazla olması, ölçümün manuel oluşu nedeniyle zaman ve işgücü kaybı açısından negatif özellikleri vardır. Modifiye Purdy yönteminde alt ölçüm sınırını 21 mg/dL olarak bulmamız, en önemli dezavantajlarından biridir. Modifiye Purdy yöntemi ile Bradford yöntemi arasında $r=0,891$ kuvvetli (+) korelasyon bulmamıza rağmen, Modifiye Purdy yöntemi ile türbidimetre arasında orta (+) korelasyon ($r=0,639$) bulundu. Nitekim Modifiye Purdy ile her iki yöntem arasında protein değerleri açısından anlamlı fark bulundu. Dolayısıyla, alt sınır problemi ve rutin kullanımdaki türbidimetrik yöntemle uyumsuzluğu, üstelik manuel olması gibi dezavantajları olduğundan; rutin idrar protein analizinde Modifiye Purdy yönteminin tercih edilmemesinin nedenini göstermektedir.

Bradford yönteminde kullanılan Coomassie Brilliant Blue, küvetleri boyadığı için otomasyona uygun değildir. Son zamanlarda Pyrogallol Red boyası kullanılan otomatize yöntem kullanılmaktadır (69).

Bradford yöntemi ile türbidimetrik yöntem arasında çok kuvvetli (+)korelasyonun ($r=0,930$) bulunması, klinik biyokimya laboratuvarlarında otoanalizörlerde, idrarda protein analizi için sıkça kullanılan türbidimetrik (benzetenyum klorür) yöntemin, boya bağlayıcı yöntemlerden olan, manuel olarak uygulanan Bradford yöntemi ile uygunluğunu ortaya koymuştur.

İdrarda protein ölçümünün analitik hassasiyetini değerlendirmek için dört farklı metod ile aynı idrarlar çalışıldığında (Tablo 14-18), elde edilen sonuçlara göre (Tablo:19) Dört yöntem arasında türbidimetrik yöntemin analitik hassasiyetinin diğer yöntemlere göre oldukça iyi olduğu belirlendi.

Tablo 19. İdrar Total Protein Ölçümünde Dört Yöntemin Analitik Hassasiyeti

Metodlar	İnsan idrarı 1 (% CV)	İnsan idrarı 2 (% CV)
Lowry	4,5	11
Modifiye Purdy	10	8,1
Bradford	10,6	4,3
Türbidimetre	1	1

Ancak türbidimetri yönteminde, idrarda protein ölçümünün analitik hassasiyet ve doğruluk değerlendirmesinde Kontrol 1=Normal ($18\pm1,4$) mg/dL seviyedeki kontrol numunelerinde çalışma içi (intraassay) % CV % 7,74, Çalışma içi idrar örneğinin ortalaması 10,24 mg/dL iken % CV değerinin de 7,1 olması bu seviyelerdeki analitik hassasiyetinin daha düşük olduğunu düşündürmektedir. Ayrıca proteinüri değerlendirilmesinde 10 mg/dL üzeri eşik değeri olarak kabul edildiğinden düşük değerlerdeki yüksek CV değerlerinin problem oluşturmadığı kanaatindeyiz.

Çalışmalarımız, idrardaki total protein düzeyinin ölçümünde, kullanılan metodların kalibrasyonundaki varyasyonlar da dahil olmak üzere, analitik özelliklerdeki farklılıkların bir sonucu olduğu düşünülen ciddi bir varyasyonun mevcut olduğunu göstermiştir. Bu durum, çalışmalar arasındaki diyagnostik performans farklılıklarına da neden olabilir.

Kalibrasyon materyali için, çeşitli proteinleri içeren albümin /globülin karışımları kullanılarak kalibratör stratejileri geliştirilebilir. Evrensel bir kalibratör kullanımı ciddi varyasyonları azaltabilir, ölçümler arasındaki karşılaştırılabilirliği geliştirebilir.

İdrarda bulunan albüminin moleküler formları ve çeşitliliği; albüminin modifiye formlarının farklı filtrasyonu ve farklı tübüler geri alınımı, albüminin üriner yol boyunca

proteoliz aracılığıyla maruz kaldığı modifikasyonlar, oksidan, serbest radikal ve idrarda bulunan diğer ligandların meydana getirdiği kimyasal değişiklik ve idrarı dondurma esnasında oluşan değişiklikler sebebiyle, idrardaki albümin plazmadaki albümininden farklıdır .Bu yüzden, idrarda albüminin referans materyali elde edilememiştir.Referans metodu yoktur (6). İdrar, immuno-reaktif ve immunoreaktif olmayan komponentlerin kompleks bir karışımıdır. Immunoassayler sadece; >12 kDa albumin fragmentlerini ve polimer albumin agregatlarını algıladığı gibi immunoreaktif intakt idrar albuminini algılayabilir, ancak immunoassaylerin tam olarak hangi albumin komponentlerini tespit ettiği bilinmemektedir (67).

İdrardaki albümin atılımının böbrek hasarını göstermekle beraber ve böbrek hastalığı progresyonu ile kardiyovasküler hastalık için de bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. İdrar albümin düzeyi ölçümünün rolü, doğru ve net rapor edilen laboratuvar sonuçlarına duyulan ihtiyaca odaklıdır. Bu amaçla çalışmamızda idrarda albümin ölçümünde, immünotürbidimetrik yöntemle immünonefelometrik yöntemin uygunluğu karşılaştırıldı, çok kuvvetli (+) ($r=0,992$) korelasyon bulunması, yöntemler arasındaki karşılaştırılabilirliği kuvvetlendirmiştir.

İdrarda albümin ölçümünün analitik hassasiyetini değerlendirmek için iki farklı metod (Tablo 9,11) ile aynı idrarlar çalışıldı (Tablo 20). İmmünotürbidimetrik yöntemle birinci idrar örneğinin 1,97 mg/dL ikinci idrar örneğinin ortalaması 17,91, İmmünonefelometrik yöntemle birinci idrar 1,91 mg/dL, ikinci idrar örneğinin ortalaması 22,13 mg/dL idi.

Tablo 20. İdrar Albümin Ölçümünde İki Yöntemin Analitik Hassasiyeti

Metodlar	İnsan idrarı 1 (% CV)	İnsan idrarı 2 (% CV)
İmmünotürbidimetrik	8,94	3,07
İmmünonefelometrik	4,7	5,2

İmmünotürbidimetrik yöntemin, normal seviyelerdeki albümin ölçümlerinde immünonefelometrik yönteme göre analitik hassasiyetinin daha düşük olduğu, ancak makroalbüminürik seviyelerde analitik hassasiyetinin daha iyi olduğu değerlendirildi.

Dolayısıyla mikroalbüminüri tesbiti için immünonefelometrik, makroalbüminüri tesbiti için ise İmmünotürbidimetrik yöntemin kullanımasının daha uygun olabileceği anlaşılmaktadır.

Retrospektif çalışmamızdaki 977 hastanın % 37'sinin (365 hasta) İdrar Albümin düzeyi < 2 mg/dL ,% 29'unun (281hasta) 2-20 mg/dL ,% 34'ünün (331hasta) 20 mg/dL nin üzerinde olduğu bulundu.977 hastanın %63 ünün mikroalbüminürik ve makroalbüminürik seviyede olması, idrarda albümin ölçümünde, doğru ve net rapor edilen laboratuvar sonuçlarının önemini göstermektedir.

İdrardaki total protein düzeyinin ölçümünde ciddi varyasyonların bulunması nedeniyle, idrardaki albümin ölçümünün metodolojik varyasyonu azaltılabileceği ve bununla birlikte klinik diagnostik sensitiviteyi de artırma potansiyeli bulunduğu öne sürülmektedir.

Amerikan Ulusal Böbrek Kuruluşu (NKF) ile Amerikan Diyabet, Sindirim Sistemi ve Böbrek Hastalıkları Ulusal Enstitüsü (NIDDK)'nın 2003 'teki Durum Bildiriminde Diabet mevcut postpubertal çocuklarda ve erişkinlerde Kronik böbrek hastalığı tanısı koymak için idrarda total protein ölçümünden ziyade idrar albümin ölçümü tercih edilmelidir, çocuklarda total protein ölçümünün hem albüminüri hem de küçük molekül ağırlıklı proteinürinin saptanması amacıyla kullanımı uygundur (9) şeklinde tavsiyesi bulunmaktadır.

Bu kapsamda KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından 03.12.2009-01.12.2010 tarihlerinde eşzamanlı idrarda total protein ve albümin istenen 977 hastanın idrar sonuçları retrospektif olarak değerlendirilmeye alındı. İdrar total protein ve albümini arasında güçlü (+) korelasyon ($r=0,86$) bulduk (şekil 11). Regresyon grafiği dikkatli incelendiğinde makroalbüminüri ve proteinüri değerlerinde kümelenmenin dağıldığı anlaşılmaktadır. Bunun nedeni makroalbüminüri ile birlikte böbrek fonksiyonlarının bozulması ve böylece idrara albümin dışındaki diğer proteinlerin de çıkış ihtimalinin artması olabilir. İdrarda total protein analizinde albümin dışındaki diğer protein kayıpları üzerinde de fikir elde edilmiş olduğundan idrarda hem total protein hem de albüminin aynı örnekte analiz edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1. Sonuçlar

Prospektif çalışmamızda, idrarda total protein düzeyi rutin olarak türbidimetrik yöntemle, belirlenen idrarlardan 40 örnek Modifiye Purdy, Lowry, Bradford yöntemleriyle çalışıldı ve idrarda albümin ölçümü için gelen ve rutin olarak immünotürbidimetrik yöntemle çalışılan 30 idrar immünonefelometrik yöntemle çalışıldı elde edilen sonuçlar şöyle özetlenmiştir.

1. Protein tayin yöntemlerinden Lowry yöntemi ile Modifiye Purdy, Lowry, Bradford yöntemleri arasındaki korelasyon analizlerinde düşük korelasyonların bulunması Lowry yönteminin idrar protein analizinde iyi sonuçlar vermediğine işaret etmektedir.
2. Modifiye Purdy yöntemi ile Bradford ve türbidimetrik yöntem arasında protein değerleri açısından anlamlı fark bulundu. Alt sınır problemi ve rutin kullanımdaki türbidimetrik yöntemle uyumsuzluğu, üstelik manuel olması gibi dezavantajları olması; rutin idrar protein analizinde Modifiye Purdy yönteminin tercih edilmemesinin nedenini göstermektedir.
3. Bradford yöntemi ile türbidimetrik yöntem arasında çok kuvvetli (+) korelasyonun bulunması, klinik biyokimya laboratuvarlarında otoanalizörlerinde, idrarda protein analizi için sıkça kullanılan türbidimetrik (benzetenyum klorür) yöntemin, boya bağlayıcı yöntemlerden olan, manuel olarak uygulanan Bradford yöntemi ile uygunluğunu ortaya koymuştur.
4. Modifiye Purdy, Lowry, Bradford, türbidimetrik yöntemler arasında türbidimetrik yöntemin analitik hassasiyetinin diğer yöntemlere göre oldukça iyi olduğu belirlendi.
5. İdrardaki total protein düzeyinin ölçümünde ciddi varyasyonların bulunması nedeniyle, idrardaki albümin ölçümünün metodolojik varyasyonu azaltılabileceği

ve bununla birlikte klinik diagnostik sensitiviteyi de artırma potansiyeli bulunduğu düşünülmektedir.

6. İdrarda total protein analizinde albümin dışındaki diğer protein kayıpları üzerinde de fikir elde edilmiş olduğundan idrarda hem total protein hem de albüminin aynı örnekte analiz edilmesi gerektiği sonucuna varılmıştır.
7. 7-İdrarda albümin için, immünotürbidimetrik yöntemle immünonefelometrik yöntemin uygunluğu araştırıldı, çok kuvvetli (+) korelasyonun bulunması, yöntemler arasındaki karşılaştırılabilirliği kuvvetlendirmiştir.
8. 8-İmmünotürbidimetrik yöntemin, normal seviyelerdeki albümin ölçümlerinde immünonefelometrik yöntemle göre analitik hassasiyetinin daha düşük olduğu, ancak makroalbüminürik seviyelerde analitik hassasiyetinin daha iyi olduğu değerlendirildi.
9. Dolayısıyla mikroalbüminüri tesbiti için immünonefelometrik, makroalbüminüri tesbiti için ise immünotürbidimetrik yöntemin kullanımasının daha uygun olabileceği anlaşılmaktadır.

6.2. Öneriler

1. Çalışmalarımız, idrardaki total protein düzeyinin ölçümünde, kullanılan metodların kalibrasyonundaki varyasyonlar da dahil olmak üzere, analitik özelliklerdeki farklılıkların bir sonucu olduğu düşünülen ciddi bir varyasyonun mevcut olduğunu göstermiştir. Bu yüzden Evrensel bir kalibratör kullanımı ciddi varyasyonları azaltabilir, ölçümler arasındaki karşılaştırılabilirliği geliştirebilir. Kalibrasyon materyali için, çeşitli proteinleri içeren albümin /globülin karışımları kullanılarak kalibratör stratejileri geliştirilebilir.
2. İdrar analizi için geliştirilen bir referans metod, özellikle saf idrarda bulunan albümin moleküllerini ölçmelidir. İdrardaki moleküler albümin formlarının heterojenitesi sebebiyle ölçülen değerler net değildir ve tanımlanmaları gerekmektedir. İdrarda albüminin referans materyali de elde edilememiştir. Referans materyal ve referans metod için daha fazla sayıda araştırmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

7. ÖZET

İDRARDA TOTAL PROTEİN VE ALBÜMİN DÜZEYİNİN TAYİNİNDE KULLANILAN YÖNTEMLERİN PERFORMANS ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İdrarda total protein ve albümin ölçümü, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan, ancak mevcut yöntemlerin birbirinden farklı avantaj ve dezavantajları nedeniyle hangi yöntemin kullanılacağı hakkında üzerinde fikir birliğine varılamamış bir konudur. Amacımız, idrarda total protein ölçümü için, biyokimya laboratuvarımızda kullanılan türbidimetrik metodu ile, Modifiye Purdy, Lowry, Bradford metodunu ve idrarda albümin ölçümü için, biyokimya laboratuvarımızda kullanılan immünotürbidimetrik metod ile, immünonefelometrik yöntemin analitik performanslarını karşılaştırmaktır. Retrospektif çalışmamızda KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarından çeşitli klinikler tarafından laboratuvarımızdan eşzamanlı idrarda total protein ve albümin ölçümü istenen ve ölçümleri gerçekleştirilen 977 hasta çalışmaya alınmıştır. Prospektif çalışmamızda, KTÜ Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında idrarda total protein düzeyi rutin olarak türbidimetrik yöntemle, belirlenen idrarlar Modifiye Purdy, Lowry, Bradford yöntemiyle çalışıldı. İdrarda albümin ölçümü için gelen ve rutin olarak immünotürbidimetrik yöntemle çalışılan örnekler immünonefelometrik yöntemle çalışıldı. Retrospektif çalışmamızda eşzamanlı idrarda total protein ve albümin değerleri arasında istatistiksel olarak güçlü (+) korelasyon ($r=0,86$) bulundu. Prospektif çalışmamızda Modifiye Purdy, Lowry, Bradford, türbidimetrik yöntemler karşılaştırıldığında $p=0,001$ olduğundan yöntemler arasında arasında anlamlı fark bulundu. Modifiye Purdy, Lowry, Bradford ve türbidimetrik yöntemler arasında türbidimetrik yöntemin analitik hassasiyetinin diğer yöntemlere göre oldukça iyi olduğu belirlendi. İdrarda albümin için yapılan prospektif çalışmamızda, immünonefelometrik yöntem ile immünotürbidimetrik yöntem arasında $p=0,024$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu. İmmünonefelometrik ve İmmünotürbidimetrik metodlarla idrarda albümin ölçümleri arasında çok kuvvetli (+) korelasyon ($r=0,992$) bulundu. Böbrek fonksiyonlarını değerlendirmek için idrarda eş zamanlı total protein ve albümin tayinlerinin yapılması gerektiği sonucuna varıldı.

Anahtar Kelimeler: İdrar Proteinleri, İdrar Albümini, İdrar Total Protein Tayin Yöntemleri, İdrar Albümin Tayin Yöntemleri

8. SUMMARY

DETERMINATION OF PERFORMANCE CHARACTERISTICS OF METHODS USED FOR TOTAL PROTEIN AND ALBUMIN MEASUREMENTS IN URINE

Determination of urinary total protein and albumin is used widely in clinical laboratories, but there is no agreement about which method should be used, since present methods have various advantages and disadvantage. The major aim is to compare analytical performances of methods for measurement of urinary total protein including turbidimetric method used in our biochemistry laboratory, Modified Purdy method, Lowry method, Bradford method and also for methods urinary albumin measurement including immuno-turbidimetric and immuno-nephelometric methods used in our laboratory. In retrospective study, 977 patients whose their urinary total protein and albumin measurements were done in biochemistry laboratory, Faculty of Medicine, KTU were included. In prospective study, urine samples which their total protein levels were measured by turbidimetric method were measured also by Modified Purdy, Lowry, and Bradford methods. Urine samples measured by immuno-turbidimetric method for urinary albumin measurement were studied by immuno-nephelometric method. In the retrospective study, a significant positive correlation between total protein and albumin levels was found. In the prospective study, a significant statistical difference was found among urinary total protein methods. Analytical sensitivity of turbidimetric method was found to be the best among total protein methods. For urinary albumin determination, a statistically significant difference ($p=0,024$) and a strong positive correlation ($r=0.992$) between immuno-turbidimetric and immuno-nephelometric methods were found. It was concluded that both total protein and albumin measurement in urine should be done to evaluate kidney functions.

Key Words: Urinary Proteins, Urinary Albumin, Determination of Urinary Total Protein, Determination of Urinary Albumin.

9. KAYNAKLAR

1. Wayne DC, Lucinda MH, David JN-Paterson, Leileata M: Disease-dependent mechanisms of albuminuria. *Am J Physiol Renal Physiol* 295: 1589–1600. 2008.
2. Dubea J, Girouard J, Leclerc P, Douville P: Problems with the estimation of urine protein by automated assays. *Clinical Biochemistry* 38: 479– 485 .2005.
3. Cynda AJ, Andrew SL, Josef C, Levin JL, Garabed E: Clinical Practice Guidelines for chronic kidney disease in adults: part 11. glomerular filtration rate, proteinuria and other markers. *Am Fam .Physician* 70:869-876. 2004.
4. Lamb, E,Newman DJ,Price CP"Kidney Function Tests"Ed. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE: *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th Edition, Missouri, Elsevier Saunders . 2006
5. Pricen CP, Newall RG, Boyd JC: Use of protein : creatinine ratio measurements on random urine samples for prediction of significant proteinuria . *Clin Chem* 51:9 1577–1586. 2005.
6. Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Kristin MA, Matthew JM, Itoh Y, Lieske JC: Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* 55:124–138. 2009.
7. Danziger J: Importance of low-grade albuminuria . *MD Mayo Clin Proc.* 83: 806-812. 2008.
8. Venkat KK: Proteinuria and microalbuminuria in adults:significance, evaluation and treatment. *Southern Medical Journal* 97,10:969-979. 2004.
9. Eknoyan G, Hostetter T, Bakris GL, Hebert L, Levey AS, Parving HH, Steffes MW, Toto R: Proteinuria and other markers of chronic kidney disease: a position statement of the National Kidney Foundation (NKF) and the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). *American Journal of Kidney Diseases*;42,4: 617-622.2003
10. Shaikh A, Seegmiller JC, Borland TM, Burns BE, Ladwig PM, Singh RJ, Kumar R, Larson TS, Lieske JC: Comparison between immunoturbidimetry,size-exclusion

chromatography and LC-MS to quantify urinary albumin. Clin Chem ; 54:9 1504–1510. 2008.

11. Ozmen Ş: Glomerülonefritli Hastalarda Spot İdrar Protein/Kreatinin Oranının, Günlük Proteinüri Miktarının Belirlenmesindeki Rolü. Yan Dal Uzmanlık Tezi, Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diyarbakır. 2008.
12. Kaplan MA: Yağsız vücut kitlesini yeni bir formülle glomerüler filtrasyon hızı tayini. Uzmanlık tezi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı Diyarbakır. 2007.
13. Mir S: Nefrotik sendroma yol açan proteinüri mekanizması. Güncel Pediatri; 4(1): 34-35. 2006.
14. Kathy V, Wailer K.M. , Ward J.D. Mahan K: Wlsmatt Current concept in proteinüria. Clin Chem; 35:5, 755-765. 1989.
15. Camici M: Renal glomerular permselectivity and vascular endothelium. Biomedicine & Pharmacotherapy; 59: 30-37. 2005.
16. Satchell SC, Tooke JE: What is the mechanism of microalbuminuria in diabetes: a role for the glomerular endothelium. Diabetologia; 51:714–725. 2008.
17. Kocabaş RN, Başol G: Proteinüri ve Laboratuvar Değerlendirmesi. Klinik Biyokimya Derg; 4:3: 133-145. 2006.
18. Miltenyi M: Urinary protein excretion in healthy children. Clin Nephrol; 12:216-221.1979
19. Le Bricon T:Biological analysis of proteinuria in the laboratory quantitative features; Ann Biol Clin ;59 : 701-715. 2001
20. Wingo CS, Clapp WL: Proteinuria: potential causes and approach to evaluation. The American Journal of the Medical Sciences ; 320 :188-194. 2000.
21. Viberti GC, Jarrett RJ, Keen H: Microalbuminuria as predictor of nephropathy İn diabetics The Lancet; 320(8298): 611.1982.
22. Godfrey CA, Martin BT: Steroid-Responsive Nephrotic Syndrome. Pediatric Nephrology. 4th ed; 731-747. 1999.
23. Kherr KK, Sudesh PM: Nephrotic Syndrome. Clinical Pediatric Nephrology;137-168. 1992.
24. Sinniah R, Law CH, Pwee HS: Glomerular lesions in patients with asymptomatic persistent and orthostatic proteinuria discovered on routine medical examinations. Clin Nephrol; 7:1–14.1977

25. Carrie BJ, Myers ED: Proteinuria and functional characteristics of the glomerular barrier in diabetic nephropathy. *Kidney Int*;17:669-676. 1980
26. Mogensen CE: Progression of nephropathy in long-term diabetics with proteinuria and effect of initial anti-hypertensive treatment. *Scand J Lab Invest* ;36:383-388. 1976
27. Ünver A: Steroide duyarlı primer Nefrotik Sendromlu çocuklarda remisyon dönemindeki hiperlipidemi ile sık relaps ilişkisi. *Uzmanlık Tezi, İstanbul* . 2004
28. Bernard AM, Moreau D, Lauwerys R: Comparison of retinol-binding protein and beta 2-microglobulin determination in urine for the early detection of tubular proteinuria. *Clin Chim Acta*.;24;126:1-7. 1982
29. Tomlinson PA: Low molecular weight proteins in children with renal disease. *Pediatr Nephrol*. 6;6:565-571. 1992
30. Fleur W, Dominique W: Immunonephelometric quantification of specific urinary proteins versus a simple electrophoretic method for characterizing proteinuria. *Clinical Biochemistry*; 41; 418-422. 2008.
31. Williams ME, Stanton RC: Management of diabetic kidney disease. In: Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ, editors. *Joslin's diabetes mellitus* 14th ed. Boston: Lippincott Williams&Wilkins; 925- 950. 2005.
32. Roberto Z, Timothy WM: Predominance of hemodynamic rather than metabolic factors in the pathogenesis of diabetic glomerulopathy. *Medical Sciences*; .5963-5967.1985
33. Hasegawa G, Nakano K, Sawada M, Uno K, ShibayamaY, Ienaga K: Possible role of tumor necrosis factor and interleukin-1 in the development of diabetic nephropathy. *Kidney Int*.; 40: 1007-1012 .1991
34. Sugimoto H, Shikata K, Wada J, Horiuchi S, Makino H: Advanced glycation end products cytokine nitric oxide sequence pathway in the development of diabetic nephropathy: aminoguanidine ameliorates the overexpression of tumour necrosis factor-alfa and inducible nitric oxide synthase in diabetic rat glomeruli. *Diabetologia*; 42: 878-86. 1999.
35. Phillips AO, Steadman R: Diabetic nephropathy: the central role of renal proximal tubular cells in tubulointerstitial injury. *Histol Histopathol*; 17: 247-52. 2002.
36. Spitalowitz S, Faubert PF, Porush JG: Chronic renal insufficiency in hypertension : slowing it's progression. Ed: Oparil S, Weber MA. In: *Hypertension*. 1 th Ed, Philadelphia: Saunders Co.; 286-296. 2000.
37. Remuzzi G, Bertani T: Pathophysiology of progressive nephropathies. *N Eng J Med*; 339: 1448-1456. 1998.

38. Cameron JS, Turner DS, Ogg GS, Chantler C, Williams DG: The long term prognosis of patients with focal segmental glomerulosclerosis. *Clin Nephrol*;10: 213-218. 1978.
39. D'Amico G, Ferrario F, Rastaldi MP: Tubulointerstitial damage in glomerular diseases: it's role in progression of renal damage. *Am J Kidney Dis*; 26:124-132.1995.
40. Van KC, Gerritsma JSJ, Paape MA, Van Es LA, Banchereau J, Daha MR: Possible role for CD40-CD40L in the regulation of interstitial infiltration in the kidney. *Kidney Int.*; 51: 711-721. 1997.
41. Perico N, Codreanu I: Basic research in progressive glomerulonephritis pathophysiology of disease progression in proteinuric nephropathies. *Kidney Int.*; 67,79-82. 2005.
42. Wang Y, Chen J, Chen L, Tay YC, Rangan GK, Harris DCH: Induction of monocyte chemoattractant protein-1 in proximal tubule cells by urinary protein. *J Am Soc Nephrol*; 8: 1537-1545. 1997.
43. Zoja C, Donadelli R, Colleoni S, Figliuzzi M, Bonazzola S, Morigi M, Remuzzi G: Protein overload stimulates RANTES production by proximal tubular cells depending on NF-kB activation. *Kidney Int*: 53: 1608-1615. 1998.
44. Barnes PJ, Karin M: Nuclear factor-kB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory disease. *N Eng J Med*; 336: 1066-1071. 1997.
45. Kazım A, Gülseren E: Klinik Laboratuvar Metodları Teşhis ve Klinik Anlamları. *Klinik Biyokimya*. 1991.
46. Kashıf W, Sıddıqı N, Dinçer HE: Proteinuria: How to evaluate an important finding. *Cleveland Clinic Journal Of Medicine*; 70,6 :535-547.2003.
47. Gyure WL: Comparison of several methods for semiquantitative determination of urinary protein. *Clin Chem*; 23:876-879. 1977.
48. James GP, Bee DE, Fuller JB: Proteinuria: accuracy and precision of laboratory diagnosis by dipstick analysis. *Clin Chem*; 24:1934-1939. 1978.
49. Adam B, Ardıçoğlu Y: Klinik Biyokimya Analiz Metodları 1.Baskı. 2002.
50. Mehmetoğlu İ: Klinik Biyokimya Laboraruvanı El Kitabı 4. Baskı Nobel Tıp Kitapevi .2007.
51. Mc Eldery IF, Tarbit IF ,Cassells-Smith AJ: Six methods for urinary protein compared .*Clin Chem*; 28/2 356-360. 1982.
52. Roche Diagnostics GmbH, TPUC3, insructions ,D 68298 Germany

53. Iwata J, Nishikaze O: New micro-turbidimetric method for determination of protein in cerebrospinal fluid and urine. *Clin Chem*; 25, 1317-1319. 1979.
54. Marshall T, Williams KM: Total protein determination in urine: elimination of a differential response between the coomassie blue and pyrogallol red protein dye-binding Assays. *Clin Chem*; 46:3. 2009.
55. Marion M, Bradford A: Rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*; 72, 248-254.1976.
56. Waterborg HJ,Matthews HR"The Lowry Method For Protein Quantitation"İn Walker JM The Protein Protocols Handbook. 1996
57. Lott JA, Viciid A, Stephan KA, Prit C: Evalation of the Coomassie Brilliant Blue G-250 Method For Urinary Protein., Jr. *Clin Chem*; 29,11. 1946-1950. 1983.
58. Temizkan G, Arda N: Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler 3.baskı ; 2008.
59. Doetsch K, Gadsden RH: Determination of total urinary protein ,combining Lowry sensitivity and Biuret specificity *Clin.Chem.* 19/10,1170-1178.1973.
60. Peters T: All about albumin: biochemistry, genetics,and medical applications. *Clin Chem*;43:2014-2015. 1997.
61. Andersen NF: Albumin calcium association at different ph, as determined by potentiometry. *Clin Chem* 23/11 2122-2126.1977.
62. Andersen NF, Bjerrum PJ: Ionic binding , net charge and donnan effect of serum albumin as a function of Ph . *Clin Chem.*39/1 ,48-52 .1993.
63. Berthil HC, Prinsen MT, Monique GM: Albumin turnover: experimental approach and its application in health and renal diseases. *Clinica Chimica Acta*; 347;1 –14. 2004.
64. Sviridov D, Drake SK, Hortin GL: Reactivity of urinary albumin (microalbumin) assays with fragmented or modified albumin. *Clin Chem*;54:61– 68. 2008.
65. Clavant SP, Osicka TM, Comper WD: Albuminuria: its importance in disease detection. *Laboratory Medicine*; ;38 :35-38.2007.
66. Aygan A: Haloalkalofil Bacillus Sp. İzolasyonu, Amilaz, Selülaz Ve Ksilanaz Enzimlerinin Üretimi, Karakterizasyonu Ve Biyoteknolojik Uygulamalarda Kullanılabilirliği. *Biyoloji Anabilim Dalı Adana, Çukurova Doktora Tezi*; 2008.
67. Comper WD, Jerums G, OsickaT M: Differences in urinary albumin detected by four immunoassays and high-performance liquid chromatography *Clinical Biochemistry*; 37: 105– 111. 2004.

68. Perlingova I , Dabrowsk L , Tichy M, Kueera J: Reference material “total protein in human urine”Fresenius J Anal Chem; 361 : 756–760. 1998.
69. Yılmaz FM, Kazan N, Yücel D,İdrar Proteini Ölçümünde Otomasyona Uygun Yeni Bir Yöntem .Turk J Biochem]; 28 (2); 50-53. 2003.