

# Romatoid artrit ve ankilozan spondilit hastalarında serum ve eritrosit membranı sialik asit düzeyleri ve metodolojik bir değerlendirme

[Serum and erythrocyte membrane sialic acid levels in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis and a methodological evaluation]

Mehmet Fatih Alpdemir<sup>1</sup>,  
Hatice Süreç<sup>1</sup>,  
Gülsevrim Saydam<sup>1</sup>,  
Hakan Genç<sup>2</sup>,  
Hatice Rana Erdem<sup>2</sup>,  
Doğan Yücel<sup>1</sup>

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi  
Biyokimya Bölümü<sup>1</sup>, 2.FTR Kliniği<sup>2</sup>  
Ankara, TÜRKİYE

**Yazışma Adresi**  
[Correspondence Address]

**Doğan YÜCEL**

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi  
Biyokimya Bölümü  
Cebeci/Ankara 06340, Türkiye  
Telefon: 90-312-5953212  
Fax: 90-312-3621857  
E-mail: doyu cel@yahoo.com

Kayıt Tarihi : 24 Şubat 2011; Kabul Tarihi : 30 Ocak 2012  
[Registered: 24 February 2011; Accepted: 30 January 2012]

## ÖZET

**Amaç:** Çalışmada romatoid artrit ve ankilozan spondilitli hastaların serum ve eritrosit membranı total sialik asit düzeylerinin ölçülmesi, total sialik asit düzeyleri ile hastalık aktivite skoru ve diğer enflamasyon değişkenleri arasındaki ilişkinin incelenmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** 24 romatoid artrit, 19 ankilozan spondilit hastası ile 24 sağlıklı kontrolde serum total sialik asit ve eritrosit membranı sialik asit düzeyleri ölçülerek serum C-reaktif protein, anticyclic citrullinated peptid, romatoid faktör, alkalen fosfataz, eritrosit sedimentasyon hızı ve hastalık aktivitesi ile karşılaştırıldı.

**Bulgular:** Her iki hasta grubunun da serum total sialik asit ve diğer enflamasyon belirteçleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti ( $p < 0.05$ ). Romatoid artrit grubunda total sialik asit düzeyleri, ankilozan spondilitlilerden yüksekti ( $p < 0.05$ ). Eritrosit membran sialik asit düzeyleri gruplar arasında fark göstermedi. Serum total sialik asit ile serum C-reaktif protein arasında romatoid artrit ve ankilozan spondilitlilerde ( $r = 0.411$ ,  $r = 0.825$ ), total sialik asit ile eritrosit sedimentasyon hızı arasında ise ankilozan spondilit grubunda anlamlı korelasyon saptandı ( $r = 0.515$ ). Ankilozan spondilitlilerde eritrosit membranı sialik asit ile serum C-reaktif protein arasındaki negatif korelasyon anlamlıydı ( $r = -0.570$ ).

**Sonuç:** Total sialik asit, bir enflamasyon belirteci olarak yararlıdır; aynı zamanda romatoid artrit ve ankilozan spondilit arasında tanısal ayırımında kullanılabilir.

**Anahtar kelimeler:** ankilozan spondilit, romatoid artrit, sialik asit.

**Çıkar Çatışması:** Yoktur.

## ABSTRACT

**Objectives:** Aim of this study was to investigate serum and erythrocyte membrane total sialic acid levels in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis and demonstrate any correlation between total sialic acid and disease activity score and other inflammation variables.

**Material and methods:** Serum total sialic acid and erythrocyte membrane sialic acid levels were measured in 24 rheumatoid arthritis, 19 ankylosing spondylitis patients and 24 healthy controls as well as serum C-reactive protein, anticyclic citrullinated peptide, rheumatoid factor, alkaline phosphatase and erythrocyte sedimentation rate and compared with activity of the diseases.

**Results:** Serum total sialic acid levels of patient groups were statistically higher than control group ( $p < 0.05$ ). Serum total sialic acid levels in rheumatoid arthritis were significantly higher than the ankylosing spondylitis patients ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the groups for erythrocyte membrane sialic acid. Significant correlation was found between serum total sialic acid and serum C-reactive protein in both groups ( $r = 0.411$ ,  $r = 0.825$ ); correlation between serum total sialic acid and erythrocyte sedimentation rate was found only in ankylosing spondylitis group ( $r = 0.515$ ). There was a significantly negative correlation between erythrocyte membrane sialic acid and serum C-reactive protein in ankylosing spondylitis group ( $r = -0.570$ ).

**Conclusion:** Serum total sialic acid is a useful diagnostic tool as an inflammatory parameter and can be used in the differential diagnosis of rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis.

**Key Words:** ankylosing spondylitis, rheumatoid arthritis, sialic acid

**Conflict of interest:** None.

## Giriş

Romatoit artrit (RA); 30-50 yaşlar arasında görülen, kronik, sistemik, enflamatuvar ve otoimmün bozukluklar sonucunda ortaya çıkan küçük ve büyük eklemlerin simetrik poliartriti ile karakterize bir hastalıktır (1). En yaygın enflamatuvar artrit olup her 100 000 kişiden 25 erkek, 54 kadının etkilendiği tahmin edilmektedir. Genetik, hastalığın ciddiyetinde önemli rol oynamaktadır ve baskın risk faktörü olarak sınıf II MHC haplotipi gösterilmektedir. Tetikleyici olay enfeksiyöz veya otoimmün kaynaklı eklem enflamasyonudur. Hastalık sürecinde birden fazla immün hücre tipi ve bunların sitokinleri, proteinazları ile büyüme faktörleri arasındaki kompleks etkileşimlerden dolayı eklem hasarı ve sistemik komplikasyonlar gelişir (2).

Ankilozan spondilit (AS), popülasyonun %0.5'ini etkileyen, esas olarak omurgayı ve sakroiliak eklemleri tutan, sırt ağrıları ile karakterize kronik inflamatuvar bir hastalıktır (3-5). RA ve AS için önemli laboratuvar belirteçleri eritrosit sedimentasyon hızı (ESR), serum C-reaktif protein (CRP) gibi akut faz reaktanları ve immünglobulinlerdir. Ancak bu belirteçlerin özgüllükleri düşüktür ve hastalık aktivitesi ile iyi korelasyon göstermedikleri bildirilmiştir (1).

Sialik asitler nöraminik asidin asetilenmiş türevleridirler. Sialik asit (N-asetil nöraminik asit, SA), negatif yüklü kompleks bir karbonhidrattır. Hücre yüzeyinin komponentleri olan glikoproteinler ve glikolipidlerin terminal sakkaritidir (6-9). Enflamasyon süresince total sialik asit (TSA) artışının, SA içeren akut faz glikoproteinlerinin ( $\alpha$ -1-asitglikoprotein,  $\alpha$ -2-makroglobulin, haptoglobin gibi) artışından kaynaklandığı ileri sürülmektedir (6,10). Ayrıca enflamasyonun erken döneminde protein sializasyonu da artmaktadır (11). Bu nedenlerden dolayı, serum SA düzeyi, akut faz cevabının belirteçlerinden biri olarak kullanılabilir. SA'lar hücre membranlarına sağladıkları negatif yük dolayısıyla agregasyonun engellenmesi ve membran bütünlüğünün korunmasında önemlidir. Eritrosit membranlarında SA'nın büyük çoğunluğu glikoforinlere bağlı olarak bulunmaktadır (7). Eritrositler dolaşım sayesinde hemen hemen tüm dokularla temasta olan hücrelerdir. Dolayısıyla, eritrosit membranları dokulardaki değişiklikleri yansıtabilir (12). Biz bu çalışmada RA'lı ve AS'li hastaların serum ve eritrosit membranlarının TSA düzeylerini ölçmeyi, bu hastalıklarda TSA düzeyleri ile Disease Activity Score (DAS28) ve Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index (BASDAI) skorları, diğer enflamasyon değişkenleri, özellikle RA'da "objektif aktivite kriteri" olarak kabul edilen ESR ve CRP arasındaki ilişkiyi incelemeyi amaçladık. Öte yandan, literatürde TSA ölçümleri genellikle tiyobarbitürik asit (TBA) reaksiyonuna dayanan kolorimetrik yöntemle yapılmıştır (13). Çalışmada bunun yanı sıra, TBA ürünü florofor özellikle olduğundan, spektrofotometrik olarak da TSA düzeyi ölçümleri yapmayı ve bu yöntemin performans özelliklerini araştırmayı planladık.

## Gereç ve Yöntemler

### Hasta ve Kontrol Grupları

Çalışma, S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Bölümü tarafından II. Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Kliniği'nin katkılarıyla gerçekleştirildi. Çalışma protokolu hastane Eğitim, Planlama ve Koordinasyon Kurulu tarafından onaylandı. Tüm hastalara çalışma hakkında bildirim yapıldı ve sözlü olarak onayları alındı. Hipertansiyon (HT), diabetes mellitus (DM), tiroid, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı, RA ve AS dışında kronik enflamatuvar hastalığı, bilinen başka bir hastalığı (kanser, ateroskleroz vb.) olanlar ile kronik alkol kullanan hastalar çalışmaya alınmadı. Kontrol grubu, HT, DM, tiroid, kronik karaciğer ve böbrek hastalığı veya başka bilinen bir hastalığı olmayan, sağlıklı gönüllülerden oluşturuldu.

RA tanısı için 1987 American College of Rheumatology (ACR) kriterleri (14), AS tanısı için ise Modifiye Newyork kriterleri (15) kullanıldı. RA hastaları; hassas eklem sayısı, şiş eklem sayısı, sedimentasyon ve görsel analog skalaya (VAS) dayanarak hesaplanan DAS 28 değerlerine göre üç alt gruba ayırdı: İnaktif <3.2, Orta derecede aktivite 3.2-5.1, Yüksek aktivite >5.1. AS hastalarında klinik değerlendirme için hastalık aktivite indeksi olarak BASDAI skoru kullanıldı. Hasta ve Kontrol grubu demografik özellikleri Tablo 1'de verilmiştir.

### Örnek Alınışı ve Hazırlanışı

Hasta ve kontrol grubundan kan örnekleri, vakumlu jelli düz biyokimya tüpleri ve EDTA-K<sub>3</sub> içeren tam kan tüplerine alındı (Vacutainer, Becton Dickinson, USA). Alkalen fosfataz (ALP), romatoit faktör (RF), CRP, anticyclitruinated peptide (anti-CCP) ve ESR testleri aynı gün çalışıldı. TSA ölçümü için ayrılan serum örnekleri analiz zamanına kadar -80 °C'de saklandı. EDTA'lı tüplere alınan örneklerde eritrosit membran izolasyonu ve eritrosit membranında protein ölçümleri aynı gün içerisinde yapıldı. İzole edilen eritrosit membranları analiz gününe kadar -80 °C'de saklandı.

### Yöntemler

**Eritrosit paketinin hazırlanması ve membran izolasyonu:** Eritrosit membranı izolasyonunda Hanahan and Ekholm'un (16) geliştirdiği yöntem kısmen modifiye edilerek kullanıldı (12).

**Eritrosit membranı protein ölçümü:** Eritrosit membranı protein ölçümü Olympus AU640 analizöründe (Mishima Olympus Co Ltd., Olympus Corporation, Japan) benzalkonyum klorür yöntemi (17) kullanılarak yapıldı. Protein ölçümü için düşük ve yüksek düzeyde (66.2, 628.3 mg/L) günler arası varyasyon katsayıları (%VK): %4.5 ve %1.6 olarak hesaplandı.

### Sialik asit ölçüm yöntemi

**TSA ölçümü:** TSA düzeyi, Denny ve ark.'nın (18) kullandıkları periodat / tiyobarbiturat yöntemine göre verilen hidroliz işleminde hacimler 10'ar kat artırılarak ya-

**Tablo 1.** Hasta ve Kontrol Grubu Demografik Özellikleri

Demografik Özellikler	Romatoid Artrit	Ankilozan Spondilit	Kontrol
Yaş ( $\bar{X} \pm s$ )	43.9±14.07	37.2±9.4	43.12±9.76
Hastalık süresi (yıl) ( $\bar{X} \pm s$ )	6.75±4.57	7.42±4.69	-
Erkek (%)	1 (%4)	17 (%89)	15 (%62.5)
Kadın (%)	23 (%96)	2 (%11)	9 (%37.5)
Sigara kullananlar	4 (%16)	7 (%33)	3 (%12)
Aile Hikayesi (1.derece) (%)	6 (%25)	3 (%15)	-
DAS 28 ( $\bar{X} \pm s$ )	3.6±1.5	-	-
DAS 28'e göre hastalık aktivitesi (%)			
İnaktif	10 (%41)	-	-
Orta düzeyde aktivite	9 (%37.5)	-	-
Yüksek aktivite	5 (%20.9)	-	-
BASDAI ( $\bar{X} \pm s$ )	-	3.71±2.44	-
AntiCCP (+)	10 (%41.6)	-	-
RF (+)	8 (%33)	-	-
NSAİİ (%)	13 (%63.1)	12 (%63.1)	-
Klorokin/Hidroksiklorokin (%)	10 (%41.6)	-	-
Sulfasalazin/Salisilazosulfapridin (%)	5 (%20.8)	13 (%68.4)	-
Metotreksat (%)	8 (%33.3)	3 (%15.7)	-
Kolşisin (%)	-	2 (%10.5)	-
Prednizolon (%)	4 (%16.6)	-	-
BA (%)	-	3 (%15.7)	-

$\bar{X}$  : Ortalama; s: Standart sapma; DAS28: Hastalık Aktivite Skoru; BASDAI: Bath Ankylosing Spondylitis Disease Activity Index; Anti-CCP: Anticyclic citrullinated peptide; RF: Romatoid faktör; NSAİİ: Steroid dışı antiinflamatuvar ilaç; HMEİ: Hastalık modifiye edici ilaç; BA: Biyolojik ajan. Anti-CCP ve RF pozitifliği sadece RA grubu için kullanılmıştır.

pıldı (50 µL örnek + 950 µL H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, total hacim 1 mL). Çalışmada bu hidroliz ürününden 25 kullanıldı.

**Eritrosit membranı sialik asit (EMSA) ölçümü:** Serum ölçümünden farklı olarak H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ile hidrolize edilen örnek hacminden 25 µL yerine 100 µL kullanıldı. Ayrıca 0.0, 0.0781, 0.1562, 0.3125 ve 0.6250 mmol/L konsantrasyonlarında N-Asetil nöraminik asit (NANA) içeren standartlar kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizildi. Elde edilen SA değerleri eritrosit membran proteini değerine oranlanarak verildi (µg SA/mg protein). Serum TSA ölçümlerinde spektrofloreometre (Hitachi F-2500, Hitachi High Technologies Corp., Japan) slit aralığı 10 nm, EMSA ölçümlerinde analitik duyarlılığı artırmak için 20 nm olarak seçildi. Okumalar 550 nm uyarı (ekzitasyon), 570 nm yayım (emisyon) dalgaboyunda yapıldı. *Sialik asit yönteminin analitik özellikleri*

*Doğrusallık çalışması:* Doğrusallık (lineerite) çalışması için, 10 mmol/L NANA içeren stok standart hazırlandı. Bu standarttan seri seyreltmeler yapılarak konsantrasyonu 10.0, 9.0, 8.0, 7.0, 6.0, 5.0, 4.0, 3.3, 2.0, 1.0 ve 0.5 mmol/L olan örnekler hazırlandı ve her bir örnek çift çalışıldı.

*Keskinlik çalışması:* Çalışma içi ve günler arası keskinlik (presizyon) çalışması için orta ve yüksek düzeyde SA

içeren iki ayrı serum havuzu oluşturuldu (2.50 ve 3.40 mmol/L). Çalışma içi (n = 21) ve günler arası (n = 25) varyasyon katsayısı hesaplandı.

*Saptama sınırı çalışması:* Yöntemin alt saptama sınırını belirlemek için 11 kez boş örnek (kör) çalışması yapıldı. Ortalama ve standart sapma hesaplandı. Ortalama değere 3 standart sapma eklenerek elde edilen değere karşılık gelen konsantrasyon saptama sınırı olarak belirlendi. Aynı seride 0.5 mmol/L konsantrasyonda NANA içeren örnek hazırlandı. Bu örnekten seri seyreltmeler yapılarak ölçüm yapıldı.

*Geri kazanım çalışması:* Geri kazanım çalışması için, 0.625 mmol/L konsantrasyonundaki örneğe bilinen miktarlarda standart eklendi ve çift çalışıldı; elde edilen %geri kazanım değerlerinin ortalaması alınarak %R hesaplandı.

**Çalışılan diğer değişkenler ve ölçüm yöntemleri:** Serum CRP ve RF, Beckman Coulter Immage analizöründe nefelometrik, serum ALP, Olympus AU2700 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle orijinal ayıraçlar kullanılarak ölçüldü. ESR, Alifax SPA cihazı ile ölçüldü. Serum anti-CCP, Dynex Dsx cihazında Anti-MCV ELISA (Orgentec) yöntemi ile ölçüldü. AntiCCP ve RF için kullanılan eşik değerler sırası ile 20 kU/L ve 20 IU/mL idi.

Yöntemlerin varyasyon katsayıları (%VK) anti-CCP için 22, 117, 527 kU/L değerlerinde sırasıyla %2.7, %2.3, %1.9); CRP için 3.5, 49.5, 66.9 mg/L düzeyinde %12.1, %3, %4; RF için 124, 299, 637 IU/L düzeyinde %2.8, %2.9, %3.2; ALP için 108 ve 467 U/L düzeyinde %4.5 ve %1.8; ESR için 4.3 ve 63.5 mm/saat düzeyinde %1.1 ve %4.6 olarak belirlendi.

**İstatistiksel Analiz:** Tanımlayıcı istatistikler yapıldı. Hasta ve kontrol grupları arasındaki karşılaştırmalar, Kruskal–Wallis Testi ile yapıldı. Anlamli fark bulunması durumunda Mann–Whitney Testi testi uygulandı. RA grubu, Anti-CCP ve RF pozitifliğine göre altgruplara ayrıldı, pozitif ve negatif gruplar Mann–Whitney Testi ile karşılaştırıldı. Grup karşılaştırmalarında  $p < 0.05$  ise gruplar arasındaki fark anlamlı kabul edildi. Değişkenler arasındaki korelasyon Spearman korelasyon analizi ile değerlendirildi. Bu işlemler için “SPSS for Windows versiyon 15.00” ve “Analyse it” paket istatistik programları kullanıldı.

## Sonuçlar

RA, AS ve Kontrol Gruplarında Ölçülen Değişkenler RA, AS ve Kontrol gruplarında ölçülen değişkenlerin değerleri Tablo 2’de verilmektedir. Kruskal–Wallis Testi gruplar arasında TSA, CRP, ESR ve ALP için anlamlı fark olduğunu gösterdi (tüm parametreler için  $p < 0.001$ ). RA grubu Anti-CCP ve RF pozitifliğine göre altgruplara ayrıldı. Bu altgruplarda elde edilen değerler Tablo 3’de gösterilmiştir. Tablo 2’de görüldüğü gibi, hem RA, hem de AS grubunda TSA, CRP, ESR, Anti-CCP ve ALP değerleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek

lik gösterdi. EMSA değerleri gruplar arasında fark göstermedi. RA grubunda TSA ve ESR değerleri AS grubuna göre istatistiksel olarak yüksekti. RA grubu Anti-CCP ve RF pozitifliğine göre altgruplara ayrıldığında, altgruplar içinde sadece ESR, RF pozitif altgrupta anlamlı yükseklik gösterdi. Anti-CCP pozitifliği için 20 kU/L, RF pozitifliği için 20 kU/L eşik değerleri kullanıldı.

## Değişkenler Arasındaki Korelasyonlar

TSA, RA grubunda sadece CRP ile korelasyon gösterdi ( $r = 0.411$ ;  $p = 0.045$ ). EMSA, RA grubunda diğer belirteçlerle korelasyon göstermedi. AS grubunda TSA ile CRP arasında güçlü korelasyon vardı ( $r = 0.825$ ;  $p < 0.001$ ). Bu grupta TSA ESR ve ALP ile orte düzeyde anlamlı korelasyon gösterdi (sırasıyla  $r = 0.515$ ;  $p = 0.023$  ve  $r = 0.554$ ;  $p = 0.013$ ). AS grubunda EMSA sadece CRP ile negatif korelasyon gösterdi ( $r = -0.570$ ;  $p = 0.011$ ). Hasta gruplarında ölçülen belirteçlerle hastalık skorları arasında korelasyon saptanmadı. Kontrol grubunda ölçülen parametreler arasında korelasyon yoktu. Tüm gruplar birleştirildiğinde ( $n = 67$ ), TSA ile CRP, ESR ve ALP arasında korelasyon saptandı (sırasıyla  $r = 0.650$ ,  $p < 0.001$ ;  $r = 0.646$ ,  $p < 0.001$ ;  $r = 0.389$ ,  $p = 0.001$ ).

## Sialik Asit Yönteminin Performans Özellikleri

Çalışmada kullanılan spektrofolorometrik yöntem 10 mmol/L SA konsantrasyonuna kadar doğrusal okuma yapabiliyordu. Saptama sınırı 0.0156 mmol/L olarak belirlendi. Ortalama geri kazanım %R = %95.5 idi. Çalışma içi %VK düşük havuzda %3.6, yüksek havuzda %2.4; günler arası %VK düşük havuzda %7.7, yüksek havuzda %5.4 olarak bulundu.

**Tablo 2.** Değişkenlerin AS, RA ve Kontrol Gruplarında Karşılaştırılması.

Belirteç		Kontrol (n = 24)	Romatoid Artrit (n=24)	Ankilozan Spondilit (n=19)
<b>TSA</b> (mmol/L)	$\bar{x} \pm s$	2.40 ± 0.28	3.44 ± 0.49*#	2.97 ± 0.63*
	M (IQR)	2.40 (0.41)	3.48 (0.38)	2.86 (1.05)
<b>EMSA</b> (µg/mg protein)	$\bar{x} \pm s$	65.4 ± 8.77	62.4 ± 7.2	61.3 ± 9.65
	M (IQR)	64.5 (11.04)	62.7 (8.37)	59.1 (14.6)
<b>CRP</b> (mg/L)	$\bar{x} \pm s$	3.30 ± 1.90	13.5 ± 18*	13.9 ± 13.6*
	M (IQR)	2.70 (3.80)	8.15 (9.63)	10.6 (12.6)
<b>ESR</b> (mm/saat)	$\bar{x} \pm s$	7.75 ± 7.20	35.9 ± 26.1*#	20.7 ± 18.8*
	M (IQR)	5.0 (7.0)	31.0 (40.0)	16.0 (19.0)
<b>AntiCCP</b> (kU/L)	$\bar{x} \pm s$	7.52 ± 5.70	139 ± 304*	-
	M (IQR)	5.45 (7.36)	18.7 (74.7)	
<b>ALP</b> (U/L)	$\bar{x} \pm s$	65.9 ± 14.7	90 ± 29.4*	99.4 ± 34.1*
	M (IQR)	65 (17.8)	87.5 (38.0)	95.0 (31.0)

\* İstatistiksel olarak kontrol grubuna göre anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0.05$ ).

# İstatistiksel olarak AS grubuna göre anlamlı fark görülmüştür ( $p < 0.05$ ).

Gruplar Kruskal - Wallis Testi ile karşılaştırılmış, ikili grup karşılaştırmalarında Mann - Whitney Testi uygulanmıştır.

AS grubunda anti-CCP ölçümü yapılmamıştır.

$\bar{x}$  : Ortalama; s: Standart sapma; M: Ortanca (medyan); IQR: Çeyrekler arası aralık (interquartile range).

**Tablo 3.** Romatoid Artrit Grubunda Anti CCP Negatif ve Pozitif, RF Negatif ve Pozitif Hastalardaki Değişkenler

Belirteç		AntiCCP(-) (n=14)	AntiCCP(+) (n=10)	RF(-) (n=16)	RF(+) (n=8)
TSA (mmol/L)	$\bar{X} \pm s$	3.35±0.45	3.39±0.41	3.39±0.41	3.55±0.65
	M	3.47	3.50	3.50	3.41
	(IQR)	(0.30)	(0.27)	(0.27)	(1.13)
EMSA (µg/mg protein)	$\bar{X} \pm s$	60.94±6.35	61.30±5.87	61.30±5.87	64.62±9.5
	M	62.27	62.27	62.27	64.49
	(IQR)	(9.48)	(7.76)	(7.76)	(16.94)
CRP (mg/dL)	$\bar{X} \pm s$	8.8±6.1	8.6±5.6	8.6±5.6	23.4±28.9
	M	8.1	7.6	7.6	13
	(IQR)	(7.7)	(6.1)	(6.1)	(38.1)
ESR (mm/saat)	$\bar{X} \pm s$	32.14±20.30	28.25±18.55	28.25±18.55	51.12±34.65*
	M	31	22.5	22.5	50
	(IQR)	(36.75)	(27)	(27)	(45.5)

İstatistiksel olarak RF (-) gruba göre anlamlı fark görülmüştür (p <0.05).

Gruplar Mann – Whitney U Testi ile karşılaştırılmıştır.

$\bar{X}$  : Ortalama; s: Standart sapma; M: Medyan; IQR: Çeyrekler arası aralık.

## Tartışma

Çalışmada serum TSA konsantrasyonu hem RA, hem de AS hasta grubunda sağlıklı kontrol grubuna göre yüksek bulundu. Yükseklik istatistiksel olarak anlamlıydı. EMSA değerleri gruplar arasında fark göstermedi. RA grubu anti-CCP ve RF pozitifliğine göre altgruplara ayrıldığında sadece ESR, RF pozitif grupta RF negatif gruba göre yükseklik gösterdi. Spektroflorometrik SA ölçüm yönteminin analitik özellikleri rutin çalışmalara uygundu.

Canlı organizmada akut faz cevabında plazma proteinlerinde büyük değişiklikler olur. Bazı plazma proteinlerinin sentezi, dolayısıyla plazma konsantrasyonu artar, bazıları değişmeden kalır, bazılarının ise plazma konsantrasyonu düşer. Bu plazma proteinlerinin büyük bölümü glikoprotein yapısındadır. Akut faz cevabı sırasında plazma proteinlerinin şeker bileşenleri de kalitatif ve kantitatif değişikliklere uğrar. Chavan ve ark. (11) yaptıkları çalışmada, akut faz cevabının erken aşamalarında, plazma proteinlerinin NANA içeriğinde artış, fukoz içeriğinde ise azalma görmüşlerdir. NANA içeriğindeki bu değişikliğin pozitif akut faz proteini olan  $\alpha_1$ -asitglikoprotein, akut faz proteini olmayan  $\alpha_1$ -makroglobin ve negatif akut faz proteini olarak bilinen  $\alpha_1$ -inhibitör3 gibi plazma proteinlerindeki değişikliklerden kaynaklandığını göstermişlerdir. Bu çalışmada akut faz sırasında NANA artışının sadece pozitif akut faz proteinlerinde değil, diğer plazma proteinlerinde de olduğu belirtilmektedir. Tajiri ve ark. (19) 43 subakut granüloamatöz tiroiditli hastayı hem akut faz süresin-

ce, hem de sonrasında takip etmişlerdir. Akut faz süresince serum TSA seviyeleri (3.20 ±0.6 mmol/L), kontrol grubuna (1.84 ±0.21 mmol/L) göre yüksek bulunmuştur. Tedavi sürecinde, glukokortikoid kesildikten sonra serum TSA seviyelerinin düştüğü, aksine tiroglobulin ve ESR'nin tedavi sonlandırıldıktan sonra bile normalin üstünde kaldığı, CRP'nin ise 1 hafta sonra negatif değerlere döndüğü saptanmıştır. Biz yaptığımız çalışmada, RA'lı ve AS'li hastalarda serum TSA düzeylerini (sırasıyla; 3.44 ±0.49 mmol/L, 2.97 ±0.63 mmol/L), sağlıklı kontrollere oranla (2.40 ±0.28 mmol/L) anlamlı derecede yüksek bulduk (p <0.001, p = 0.001). RA'lı hastalarda serum TSA düzeyleri serum CRP düzeyleri ile anlamlı korelasyon gösterirken (r = 0.411; p = 0.045), ESR düzeyleri ile korelasyon göstermedi. Toplam 24 RA hastasından 8'inde ESR değerleri referans üst sınırı veya altında (≤20 mm/saat) iken, aynı hastalarda serum TSA değerleri kontrol grubuna göre dikkat çekici bir yükseklik gösterdi. TSA için kesim değeri 2.50 mmol/L alındığında RA grubunda duyarlılık %95.8, özgüllük %66.7 olmaktadır. CRP için 7 mg/L kesim değeri alındığında ise duyarlılık ancak %58.3'de kalmakta, özgüllük %91.7 olmaktadır. ESR'de duyarlılık %66.7, özgüllük %87.5'tir. Kosoaki, RA'lı hastalarda SA düzeylerinin arttığını ve serum TSA düzeylerinin ESR ve CRP'den bağımsız bir enflamasyon belirteci olduğunu belirtmektedir (20). Alturfan ve ark. (6) 20 inaktif RA'lı (iRA) ve 20 primer osteoartritli hastada yaptıkları çalışmada, bizim bulgularımıza uygun olarak iRA'lı hastaların serum TSA düzeylerini (3.11 ±0.47 mmol/L) kontrol grubuna göre (2.21 ±0.16 mmol/L) anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır.

Çalışmamızda sonuçlar TSA'nın RA'da duyarlılığı yüksek bir belirteç olduğunu; diğer inflamatuvar belirteçlerle korelasyonunun iyi olmaması, bağımsız özellikte olduğunu göstermektedir. Bu özellikleriyle TSA düzeyleri tanı yanı sıra RA'lı hastaların izlenmesinde de kullanılabilir.

Çalışmamızda TSA düzeyleri AS grubunda da kontrollere göre anlamlı yükseklik gösterdi. AS grubunda TSA'nın duyarlılığı aynı kesim değeri (2.50 mmol/L) alındığında %84.2 olmaktadır. Bu grupta diğer inflamatuvar belirteçlerin duyarlılıkları CRP için %73.7, ESR için %58.0'dir. Susheela ve ark. (5) bizim bulgularımızla uyumlu olarak serum SA düzeylerini, AS'li hastalarda (895 ±183.9 mg/L) kontrol grubuna göre (722 ±67.1 mg/L), anlamlı derecede yüksek bulmuşlardır. TSA, AS grubunda diğer inflamatuvar belirteçlerle daha güçlü korelasyon göstermiştir (CRP ile  $r = 0.825$ , ESR ile  $r = 0.515$ ). Bu durum TSA'nın diğer inflamatuvar belirteçlerle birlikte alevlenme dönemlerinin saptanmasında ve hastalığın izlenmesinde yararlı olabileceğini göstermektedir.

Pönniö ve ark. yaptıkları çalışmada, serum TSA düzeyinin erkeklerde olmasa da, kadınlarda yaş ile anlamlı olarak yükseldiğini göstermişlerdir (21). Çalışmamızda hastalıkların özellikleri sonucu, RA grubunda kadın hastalar, AS grubunda erkek hastalar çoğunluktadır. Bu cinsiyet farklılığının sonuçları etkileyebileceği düşünülebilir. Ancak çalışmamızda yaş ile SA arasında anlamlı bir korelasyon saptanmadı. (Hasta ve kontrol grupları birlikte değerlendirildiğinde  $r = -0.072$ ;  $p = 0.562$ , RA grubunda  $r = 0.218$ ;  $p = 0.305$ , AS grubunda  $r = -0.028$ ;  $p = 0.907$ ). Bu bulguların yanı sıra, sağlıklı kontrol grubunda da TSA ile yaş arasında pozitif bir korelasyon bulunamaması, hasta gruplarında serum TSA düzeylerinin yaştan bağımsız olarak arttığını göstermektedir. Yaptığımız çalışmada EMSA düzeyleri hem RA grubunda, hem de AS grubunda kontrol grubuna oranla düşük bulundu ancak bu düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildi. (RA:  $62.41 \pm 7.2$  µg/mg protein, AS:  $61.28 \pm 9.65$  µg/mg protein, kontrol:  $65.43 \pm 8.77$  µg/mg protein;  $p > 0.05$ ). EMSA, serum TSA ve ESR ile ve hastalık skorlarıyla (RA grubunda DAS28, AS grubunda BASDAI) korelasyon göstermedi. Ancak, AS grubunda EMSA değerleri CRP ile anlamlı, negatif bir korelasyon gösterdi ( $r = -0.570$ ;  $p = 0.011$ ). Kızıltunç ve ark. (9) 52 RA hastası ve 24 sağlıklı kişide yaptıkları çalışmada, benzer şekilde, RA'lı hastaların eritrosit membranlarında, SA düzeyini kontrol grubuna göre düşük ( $p < 0.001$ ) bulmuşlardır. Bizim çalışmamızdaki sonuçlara benzer şekilde bu değişkenler ile CRP ve ESR arasında herhangi bir uyum saptanamamıştır. Çoğalgil ve Taysi'nin (7) 42 RA'lı hasta ve 30 sağlıklı kişide yaptıkları çalışmada RA'lı hastalarda EMSA düzeyleri de ( $0.942 \pm 0.27$  mmol/L) kontrol grubuna ( $1.346 \pm 0.31$ ) göre düşük bulunmuş, EMSA düzeyleri ile CRP ve ESR arasında bir korelasyon bulunamamıştır. Bizim çalışmamızda bu çalışmalarla çelişkili olarak, RA'lı hastaların EMSA düzeyleri ile kont-

rol grubu arasında anlamlı bir fark yoktu. Ancak yukarıda söz edilen EMSA düzeyleri mmol/L cinsinden verilmiştir. Elde edilen membran miktarı örnekten örneğe değişebildiği için, bizce EMSA sonuçlarının membran protein miktarına oranlanıp verilmesi daha doğrudur. Ayrıca çalışmamızda SA spektrofotometrik yöntemle ölçülmüş, bu çalışmalarda kolorimetrik yöntem kullanılmıştır. Genel olarak spektrofotometrik yöntemlerin alt saptama sınırı ve analitik duyarlılığı kolorimetrik yöntemlere göre daha iyidir. Bu sebepler önceki çalışmalarla olan çelişkiyi kısmen açıklayabilir. Çalışmamızda, EMSA değerleri RA grubunda sağlıklı kontrollere göre istatistiksel olarak anlamlı olmasa da düşüktü. Bu düşüklük, sialidaz aktivitesindeki artışa bağlı olarak membran SA'sının uzaklaştırılmasından yada SA sentezindeki azalmadan kaynaklanabilir (7,9). Her iki hasta grubunda da eritrosit membranlarındaki SA azalışı, eritrositlerdeki negatif yükün azalmasına ve eritrosit yapısının bozulmasına yol açabilir ve bu değişiklikler hastalık patolojisi açısından önemli olabilir. Özellikle AS grubunda EMSA ile CRP arasındaki negatif korelasyon bu düşünceleri destekler özelliktedir. Literatürde AS'de eritrosit membranlarında SA ölçümü yapılan başka bir çalışma yoktur.

Anti-CCP, RA için yeni ve oldukça spesifik bir belirteçtir, eroziv artrit gelişimi ve radyolojik hasar ile de ilişkilidir. Erken RA teşhisinde kullanılabilecek bir testtir (22). Dündar ve ark.'nın yaptığı 37 RA hastasını kapsayan bir çalışmada, hastaların 15'inde (%40,5) RF pozitif, 22'sinde (%59,5) ise negatif olarak tespit edilmiştir. Anti-CCP sonuçları ise 24 hastada (%64,9) pozitif, 13 hastada (%35,1) negatif bulunmuştur. Ancak, anti-CCP pozitif ve negatif hastalar karşılaştırıldığında; ortalama ESR ve CRP değerleri arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır. Aynı şekilde RF pozitif ve negatif hastalar kendi içlerinde değerlendirildiğinde ortalama ESR ve CRP değerleri arasında da anlamlı bir fark saptanamamıştır (22). Serdaroğlu ve ark. da (23) Dündar ve ark. gibi anti-CCP pozitif ve negatif hastalar arasında CRP, ESR açısından anlamlı bir fark bulunamamışlardır. Serdaroğlu ve ark. ek olarak anti-CCP düzeyleri ile DAS28 arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Çalışmamızda anti-CCP hastaların %54.2'sinde eşik değerin (20 kU/L) üzerinde bulundu (duyarlılık: %54.2); anti-CCP özgüllüğü ise %100 idi. Biz de çalışmamızda daha önceki çalışmalarda olduğu gibi CRP, ESR ve DAS28 değişkenleri arasında ve bunlara ek olarak TSA ve EMSA düzeyleri ile anti-CCP düzeyleri arasında korelasyon saptamadık. Bizim yaptığımız çalışmada da, önceki çalışmalara uygun olarak anti-CCP negatif hastalardaki ESR ( $32.14 \pm 20.30$  mm/saat) ve CRP ( $8.8 \pm 6.1$  mg/L) düzeyleri ile anti-CCP pozitif hastalardaki ESR ( $28.25 \pm 18.55$  mm/saat) ve CRP ( $8.6 \pm 5.6$  mg/L) düzeyleri arasında anlamlı bir fark bulunamadı. Ayrıca iki grup arasındaki TSA ( $3.35 \pm 0.45$  ve  $3.39 \pm 0.41$  mmol/L) ve EMSA ( $60.94 \pm 6.35$  ve  $61.30 \pm 5.87$  µg/mg protein) düzeyleri arasında da anlamlı bir fark saptanamadı. Aynı şekilde RF nega-

tif hastalardaki TSA, EMSA ve CRP düzeyleri ile RF pozitif hastalar arasındaki TSA, EMSA ve CRP düzeyleri arasında da anlamlı bir fark saptanamadı. Fakat RF negatif hastalardaki ESR düzeyleri ( $28.25 \pm 18.55$  mm/saat) ile pozitif hastalardaki ESR düzeyleri ( $51.12 \pm 34.65$  mm/saat) arasında anlamlı bir fark vardı ( $p < 0.045$ ). Öte yandan, anti-CCP ile DAS28 aktivite skoru arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Sonuç olarak anti-CCP antikorları, RA'nın erken tanısı için kullanılabilir, özgülüğü yüksek, potansiyel yeni bir kriter olabilir, ancak hastalık aktivasyonunun değerlendirilmesi açısından yeterli değildir (22, 23).

### **Spektroflorometrik Yöntemin Performans Özellikleri**

Doğrusallık çalışmasındaki bulgularımız, uyguladığımız spektroflorometrik TSA yönteminin 10 mmol/L'ye kadar doğrusal olduğunu gösterdi. Denny ve ark. (18) bizimle aynı reaktifleri kullandıkları florometrik yöntemde 0.309 mmol/L'ye, kolorimetrik yöntemde ise 12.5 mmol/L'ye kadar lineer okuma yapabildiklerini belirtmektedirler. Florometrik yöntemler arası bu çarpıcı farkta bizim yaptığımız bazı modifikasyonlar [0.1 mL total hacim yerine, 1mL total hacimden (50 µL örnek + 950 µL 0.05 mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) 25 µL kullanmış olmamız (böylece örnek hacmi ¼ oranında azaltılmıştır), 5 nm yerine 10 nm slit aralığı ve 565 nm yerine 570 nm emisyon dalga boyu kullanmamız] rol oynamış olabilir. Crook ve ark. (13) yaptıkları çalışmada, Warren ve resorsinol yöntemleri ile 4.8 mmol/L'ye kadar örneklerin seyreltme yapılmadan doğru olarak okunabildiğini göstermişlerdir. Bizim çalışmamızda kullandığımız spektroflorometrik yöntem ile seyreltme yapmadan doğru olarak ölçüm yapılabilme sınırı bu değerinkinden oldukça üzerindedir. Florometrik yöntemin çok daha yüksek konsantrasyonlara kadar doğru ölçüm yapabilmesi, özellikle idrarla SA atılımının 3-20 kat arttığı sialidozis (sialidaz enziminin eksikliği) gibi hastalıklarda örneklerin seyreltilmeden ölçülebilmesini sağlayabilir. Ayrıca, slit aralığı 5 nm'ye çekilerek çok daha yüksek konsantrasyonları okumak mümkündür. Böylece ekzitasyon enerjisi düşürülür ve birim konsantrasyon başına elde edilecek emisyon şiddeti de düşer, bu durum doğrusallığı geliştirebilir.

Saptama sınırı çalışmasında, spektroflorometrik TSA ölçümü ile 0.0156 mmol/L'ye kadar ölçüm yapılabildiği görüldü. Bu değer Denny ve ark.'nın (18) kolorimetrik ölçümünden (0.250 mmol/L) daha iyi, aynı yazarların florometrik ölçümünde tespit edilen 0.0096 mmol/L değerine ise yakındı. Bizim kullandığımız yöntemde örnek hacmi ¼ oranında azaltılmıştır. Bu hacim artırılarak saptama sınırı gerektiğinde daha da düşük konsantrasyonlara çekilebilir. Ancak, yöntemin saptama sınırı bu haliyle yeterlidir. Crook ve ark. en düşük ölçülebilir SA konsantrasyonunu resorsinol yöntemi için 0.12 mmol/L, Warren yöntemi için ise 0.20 mmol/L olarak bildirmiştir. Elde ettiğimiz değer Crook ve ark.'nın ölçtüğü değerlerden çok daha düşüktür.

Geri kazanım çalışmasında kullandığımız florometrik TSA yöntemi için ortalama %R değeri %95.5 bulundu. Bu değer Crook ve ark. Warren ve resorsinol yöntemlerinde bulunduğu değerlere (%96-%105) yakındı. Çalışma için %VK değerleri düşük (2.50 mmol/L) ve yüksek (3.4 mmol/L) konsantrasyonlu havuzlarda %3.6, %2.4, toplam %VK ise %7.7, %5.4 olarak bulundu. Crook ve ark. 0.32, 2.08 ve 3.20 mmol/L konsantrasyonları için çalışma için %VK değerini TSA Warren yöntemi ile sırasıyla: %19, %2.1 ve %8.2, TSA resorsinol yöntemi için; %12, %1.7 ve %6.1 olarak bulmuşlardır. Çalışmalar arası %VK değerlerini ise bu iki yöntem için sırasıyla; %4.5 ve %3.1 olarak bulmuşlardır. Ancak çalışmalar arası için kullanılan materyalin SA konsantrasyonu belirtilmemiştir. Buna göre, kullandığımız florometrik yöntemin çalışma için tekrarlanabilirliği, Crook ve ark.'na göre daha iyi idi. Elde ettiğimiz toplam %VK ise Crook ve ark.'nın bildirdiği çalışmalar arası %VK'ya göre yüksek görünmektedir.

Sonuç olarak, çalışmada hasta gruplarının serum TSA düzeyleri sağlıklı kontrollere göre belirgin yükseklik gösterdi. EMSA düzeyleri hasta gruplarında düşük olmakla birlikte gruplar arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Hasta gruplarında serum CRP ve ESR gibi enflamasyon belirteçleri ile serum TSA arasındaki anlamlı pozitif korelasyon olması, serum TSA düzeyindeki artışın inflamatuvar sürece bağlı olarak KC'den sentezlenen, SA'ca zengin akut faz proteinleri sentezinin artmasına bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Bu yüzden serum TSA, inflamatuvar hastalıklarda inflamasyon ve aktivasyon belirteci olarak kullanılabilir. Öte yandan, RA'lı ve AS'li hastalarda hastalık aktivite skorları (DAS28 ve BASDAI) ile laboratuvar belirteçleri (EMSA, serum TSA, CRP ve ESR) arasında korelasyon saptanamamıştır. Bunun nedenlerinden birisi, denek sayısının düşüklüğü ve bu sayı içinde hastalığı aktif olanların çok daha düşük kalışı olabilir. Ayrıca, bu skorlamalarda hastalık ile ilgili olarak hastalara yöneltilen sorular subjektif değerlendirmeler gerektirebilir. Ek olarak, RA'lı ve AS'li hastalar serum TSA açısından karşılaştırıldığında iki grup arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. TSA konsantrasyonları RA grubunda AS'ye göre daha yüksektir. Bu yüzden serum TSA düzeyi bu hastalıkların ayırt edilmesi açısından da yarar sağlayabilir. SA, genel olarak akut faz reaktanlarında bulunduğundan, klinik açıdan geleneksel akut faz reaktanları gibi kullanılabilir. Bunun yanı sıra, SA akut faz özelliği olmayan proteinlerde de bulunduğundan, bu durum diğer pek çok hastalıkta SA'ya üstünlük sağlayabilir.

**Çalışmanın Sınırlamaları.** Çalışmada hastalıkların özelliği gereği cinsiyet eşleştirmesinin olamaması veya hastalık aktivitelerinin homojen olmaması, inaktif, tedavi gören veya hastalık skorları düşük hastaların bir arada bulunması, ölçülen belirteçlerin, bizce özellikle EMSA değerlerinin, klinik anlamını zayıflatmış olabilir.

**Çıkar Çatışması:** Yoktur.

## Kaynaklar

- [1] Majithia V, Geraci AS. (2007) Rheumatoid arthritis diagnosis and management. *Am J Med.* 120:936-939.
- [2] American College of Rheumatology Subcommittee on Rheumatoid Arthritis Guidelines. (2002) Guidelines for the management of rheumatoid arthritis: 2002 update. *Arthritis Rheum.* 46:328-346.
- [3] Braun J, Sieper J. (2007) Ankylosing spondylitis. *Lancet.* 369:1379-1390.
- [4] Shaikh SA. (2007) Ankylosing spondylitis: recent breakthroughs in diagnosis and treatment. *J Can Chiropr Assoc.* 51:249-260.
- [5] Susheela AK, Tapos KD, Jasvir SK, Jayaswal A, Dave PK. (1988) Circulating levels of sialic acid and glycosaminoglycans: a diagnostic test for ankylosing spondylitis. *Ann Rheum Dis.* 47:833-837.
- [6] Alturfan AA, Uslu E, Alturfan EE, Hatemi G, Fresko İ, Kokoğlu E. (2007) Increased serum sialic acid levels in primary osteoarthritis and inactive rheumatoid arthritis. *Tohoku J Exp Med.* 213:241-248.
- [7] Coğalgil Ş, Taysi S. (2001) Sialic acid, intercellular adhesion molecule-1 and rheumatoid arthritis: a study on the erythrocyte membrane. *Ege Fiz Tıp Reh Der.* 7:51-56.
- [8] Varki MN, Varki A. (2007) Diversity in cell surface sialic acid presentations: implications for biology and disease. *Lab Invest.* 87:851-857.
- [9] Kızıltunç A, Coğalgil Ş, Uğur M, Avcı B, Akçay F. (1998) Sialic acid, transketolase and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase in patients with rheumatoid arthritis. *Clin Chem Lab Med.* 36:289-293.
- [10] Nayak BS, Robets L. (2006) Relationship between inflammatory markers, metabolic and anthropometric variables in the Caribbean type 2 diabetic patients with and without microvascular complications. *J Inflamm.* 3:1-7.
- [11] Chavan MM, Kawle PD, Mehta NG. (2005) Increased sialylation and defucosylation of plasma proteins are early events in the acute phase response. *Glycobiology.* 15:838-848.
- [12] Yücel D, Aydoğdu S, Çehrelı Ş, Saydam G, Canatan H, Şeneş M, Topkaya BÇ, Nebioğlu S. (1998) Increased oxidative stress in dilated cardiomyopathic heart failure. *Clin Chem.* 44:148-154.
- [13] Crook M, Haq M, Tutt P. (1993) Evaluation of three assays for determination of serum total sialic acid. *Clin Biochem.* 26:449-454.
- [14] Arnett FC, Edworthy SM, Bloch DA, McShane DJ, Fries JF, Cooper NS, Healey LA, Kaplan SR, Liang MH, Luthra HS. (1988) The American Rheumatism Association 1987 revised criteria for the classification of rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.* 31:315-324.
- [15] Van der Linden S, Valkenburg HA, Cats A. (1984) Evaluation of diagnostic criteria for ankylosing spondylitis: a proposal for modification of the New York criteria. *Arthritis Rheum.* 27:361-368.
- [16] Hanahan DJ, Ekholm JE. (1974) The preparation of red cell ghosts (membranes). *Methods Enzymol.* 31:168-172.
- [17] Yılmaz FM, Celebi N, Yücel D. (2004) Automated turbidimetric benzalkonium chloride method for measurement of protein in urine and cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 50:1450-1452.
- [18] Denny PC, Denny PA, Allerton SE. (1983) Determination of sialic acid using 2-thiobarbituric acid in the absence of hazardous sodium arsenite. *Clin Chim Acta.* 131:333-336.
- [19] Tajiri J, Noguchi S, Morita M, Tamaru M, Murakami T, Murakami N. (1993) Serum sialic acid levels in the diagnosis and follow-up of subacute granulomatous thyroiditis. *Endocr J.* 40:83-87.
- [20] Kosoaki O. (1991) Clinical relevance of sialic acid determination in serum and synovial fluid in orthopaedic disorders. *Japanese J Clin Pathol.* 39:197-207.
- [21] Pönniö M, Alho H, Nikkari ST, Olsson U, Rydberg U, Sillanauke P. (1999) Serum sialic acid in a random sample of the general population. *Clin Chem.* 45:1842-1849.
- [22] Dündar Ü, Evcik D, Çakır T, Aktepe O, Altındaş M, Kavuncu V. (2005) Romatoid artritli hastalarda anti-CCP antikorlarının hastalık aktivitesi ve radyolojik hasar ile ilişkisi. *Romatizma.* 20:9-14.
- [23] Serdaroğlu M, Çakırbay H, Değer O, Cengiz S, Kul S. (2008) The association of anti-CCP antibodies with disease activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatol Int.* 28:965-970.