

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**İN VİTRO HEMOLİZ SÜRECİNDE
ETKİLENEN HÜCRE TİPİ VE SAYISININ
BAZI BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Dr. BURCU ÜNLÜ

UZMANLIK TEZİ

İZMİR-2015

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA
ANABİLİM DALI

**İN VİTRO HEMOLİZ SÜRECİNDE
ETKİLENEN HÜCRE TİPİ VE SAYISININ
BAZI BİYOKİMYASAL TEST SONUÇLARI
ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. BURCU ÜNLÜ

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ

Doç. Dr. Tuncay KÜME

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin
2013.KB.SAG.074 sayılı proje desteği ile gerçekleştirilmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ ve AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER.....	8
2.1 TOPLAM TEST SÜRECİ.....	8
2.2 İNTERFERANS	10
2.2.1 Eksojen İnterferantlar	11
2.2.1.1 İlaçlar.....	11
2.2.1.2 Tüp Bileşenleri.....	11
2.2.1.3 Carryover (Çapraz Bulaş)	12
2.2.1.4 Matriks etkisi	12
2.2.2 Endojen interferantlar	13
2.2.2.1 Lipemi.....	13
2.2.2.2 İkter	13
2.2.2.3 Paraproteinemi	14
2.2.2.4 Hemoliz	14
2.3 KAN ve BİLEŞENLERİ	15
2.3.1 Kırmızı Kan Hücreleri (RBC).....	15
2.3.2 Beyaz Kan Hücreleri (WBC).....	17
2.3.2.1 Polimorfonükleer Lökositler (PMNL)	17
2.3.2.2 Mononükleer Lökositler (MNL)	20
2.3.3 Kan Pulcukları (PLT)	24
2.4 HEMOLİZ.....	26
2.4.1 İn Vivo Hemoliz.....	26
2.4.2 İn Vitro Hemoliz	29
2.4.3 Hemolize Yol Açan Nedenler	31
2.4.3.1 Kan Alımı İle İlişkili Hemoliz Nedenleri	31
2.4.3.2 Kan Örneğinin Taşınması ve Saklanması İle İlişkili Hemoliz Nedenleri	33
2.4.3.3 Örneğin İşlenmesi İle İlişkili Hemoliz Nedenleri	34
2.4.4 Hemolizin Laboratuvar Bulguları	35
2.4.5 Klinik Biyokimyada Hemolizin Neden Olduğu İnterferansın Mekanizmaları.....	37
2.4.5.1 Analitlerin İntrasellüler ve Ekstrasellüler Konsantrasyon Farklarından Kaynaklanan İnterferans.....	37
2.4.5.2 Kimyasal İnterferans	38
2.4.6 Klinik Laboratuvarlarda Hemolizli Örneklerin Sıklığı	40

2.4.7	Örneklerdeki Hemolizin Varlığının ve Miktarının Saptanması.....	41
2.4.7.1	Görsel Değerlendirme	42
2.4.7.2	Analitik Değerlendirme	42
2.4.8	Örneklerdeki Hemoliz Miktarının Sınıflandırılması	45
2.4.9	Hemoliz Sorununun Çözümü.....	46
2.4.9.1	Örneklerde Hemoliz Oluşumunun Önlenmesi.....	46
2.4.9.2	Örneklerden Hemolizin Giderilmesi	46
2.4.9.3	Hemolizli Örnek Test Sonuçlarının Verilmemesi veya Kontrollü Bir Şekilde Verilmesi.....	46
3.	GEREÇ ve YÖNTEMLER	51
3.1	ARAÇ ve GEREÇLER	51
3.2	OLGULARIN SEÇİMİ ve ÖRNEKLERİN TOPLANMASI	52
3.3	ÇALIŞMANIN BASAMAKLARI	53
3.3.1	İnterferantın Hazırlanması	54
3.3.1.1	Kan Alımı	54
3.3.1.2	Hücre Ayrılması	55
3.3.1.3	Hücre Saflaştırılması	56
3.3.1.4	Hücrelerin Yıkılması.....	56
3.3.1.5	Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması	57
3.3.1.6	Hücre Süspansiyonlarının Tam Hemolizi	58
3.3.1.7	Süpernatant Elde Edilişi	58
3.3.2	Serum Havuzunun Hazırlanması.....	58
3.3.2.1	Kan Alımı	58
3.3.2.2	Serum Eldesi	58
3.3.3	İnterferans Deneyi	59
3.3.3.1	Örnek Hazırlığı	59
3.3.3.2	Biyokimya Test Parametreleri ve Serum İndekslerinin Analizi	59
3.3.4	Sitoliz Belirteçlerinin Analizi	62
3.3.4.1	Miyeloperoksidaz (MPO) Ölçümü.....	62
3.3.4.2	β -Tromboglobulin (β -TGB) Ölçümü	65
3.3.4.3	Serbest Hemoglobin (fHb) Ölçümü	67
3.4	İSTATİSTİKSEL ANALİZLER	69

4. BULGULAR	70
4.1 AYRIMLANMIŞ HÜCRE HEMOLİZATLARI HAZIRLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ	70
4.1.1 Hücre Saflaştırılmasının Değerlendirilmesi	70
4.1.2 Hücre Süspansiyonlarının Hazırlığının Değerlendirilmesi.....	72
4.1.3 Tam Hemolizin Değerlendirilmesi.....	72
4.2 AYRIMLANMIŞ HÜCRELERİN LİZİSİNİN BİYOKİMYASAL TEST PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNE İLİŞKİN BULGULAR	73
4.3 AYRIMLANMIŞ HÜCRELERİN LİZİS BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	88
4.3.1 RBC Lizisinin Belirteci Olan fHb'nin Değerlendirilmesi	88
4.3.2 WBC Lizisinin Potansiyel Belirteci Olan MPO'nun Değerlendirilmesi.....	88
4.3.3 PLT Lizisinin Potansiyel Belirteci Olan β -TGB'nin Değerlendirilmesi.....	89
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	90
6. KAYNAKLAR ve EKLER.....	108
6.1 KAYNAKLAR.....	108
6.2 EKLER.....	120

TABLO LİSTESİ

Sayfa No

Tablo 1 : Kan sayımı parametreleri ortalama değerleri ve referans aralıkları	26
Tablo 2 : İn vivo hemolize yol açan başlıca nedenler	28
Tablo 3 : İn vitro hemolizin olası nedenleri	30
Tablo 4 : Örneklerdeki hemolizin varlığını ve miktarını saptama yöntemleri ve özellikleri. .	45
Tablo 5 : Örneklerde hemoliz miktarının sınıflandırılması	46
Tablo 6 : Hemolizli örneklerdeki potasyum konsantrasyonlarını düzeltmek için önerilen bazı formüller	48
Tablo 7 : Çalışmada kullanılan cihazlar.	51
Tablo 8 : Çalışmada kullanılan kitler.	52
Tablo 9 : Hücre süspansiyonlarının hedef hücre sayıları.	57
Tablo 10 : Serum indeks işaretleri ve karşılık gelen konsantrasyonlar	62
Tablo 11 : MPO enzim immunoassay kiti içeriği.	63
Tablo 12 : β -TGB enzim immunoassay kiti içeriği	65
Tablo 13 : fHb ölçümü için gerekli malzemeler.	67
Tablo 14 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki RBC süspansiyonlarının bileşimleri.	70
Tablo 15 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki WBC süspansiyonlarının bileşimleri.	71
Tablo 16 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki PLT süspansiyonlarının bileşimleri.	71
Tablo 17 : Farklı RBC konsantrasyon seviyelerinin içerdiği fHb konsantrasyonlarının ortalama değerleri ve bunların karşılık geldiği Beckman AU5800 otoanalizörüne ait hemoliz indeks işaret ve aralıkları.....	72
Tablo 18 : Her bir konsantrasyon seviyesi için 12 adet biyokimyasal test parametresinin yüzde değişimi ve her bir parametre için %Bias sınırları.	74
Tablo 19 : Hücre lizisinin biyokimyasal testlere analitik ve klinik açıdan anlamlı etkilerinin başladığı eşik değerler.....	75

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa No
Şekil 1 : Toplam laboratuvar sürecinde karşılaşılan hata çeşitleri ve oranları	10
Şekil 2 : Çalışmanın basamakları.	54
Şekil 3 : 4'lü kan torba sistemi ve içerikleri.	55
Şekil 4 : MPO standart eğrisi.	64
Şekil 5 : β -TGB standart eğrisi.	67
Şekil 6 : fHb standart eğrisi.	68
Şekil 7 : RBC sayıları ve karşılık gelen fHb değerleri arasındaki ilişki.	69
Şekil 8 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının LDH test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	76
Şekil 9 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının potasyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	77
Şekil 10 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının AST test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	78
Şekil 11 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının demir test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	79
Şekil 12 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının CK test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	80
Şekil 13 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının magnezyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	81
Şekil 14 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının total protein test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	82
Şekil 15 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının total kolesterol test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	83
Şekil 16 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının inorganik fosfor test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	84
Şekil 17 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının glukoz test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	85
Şekil 18 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının kalsiyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	86

Şekil 19 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının BUN test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.	87
Şekil 20 : RBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile fHb arasındaki ilişki.	88
Şekil 21 : WBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile MPO arasındaki ilişki.	89
Şekil 22 : PLT süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile β -TGB arasındaki ilişki.	89
Şekil 23 : Hemolizde hücre kompartmanlarının birleşmesinin teorik modellenmesi.	105

KISALTMALAR

RBC : Kırmızı kan hücresi

WBC : Beyaz kan hücresi

PLT : Kan pulcuğu

MPO : Miyeloperoksidaz

β -TGB : β -Tromboglobulin

Hb : Hemoglobin

fHb : Serbest Hb

IUPAC : *International Union of Pure and Applied Chemistry*

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

IFCC : *International Federation of Clinical Chemistry*

β -hCG : Beta insan koryonik gonadotropini

VLDL : Çok düşük yoğunluklu lipoprotein

IgM : İmmunoglobulin M

IgG : İmmunoglobulin G

HDL-Kol : Yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol

CRP : C-reaktif protein

EDTA : Etilendiamin tetra asetik asit

CFU-GEMM : Ortak miyeloid progenitör

CFU-MegE : Megakaryosit/RBC serisine sınırlı progenitör

BFU-E : *Burst-forming unit-erythrocyte*

CFU-E : *Colony forming unit erythrocyte*

CFU-GM : Nötrofil ve monositler için ortak progenitor

CFU-G : Granülosit progenitor hücresi

CFU-M : Monosit progenitor hücresi

CFU-Eo : Eozinofil progenitor hücresi

CFU-Baso : Bazofil progenitor hücresi

PMNL : Polimorfonükleer Lökositler

MNL : Mononükleer Lökositler

MBP : *Major basic protein*

ECP : Eozinofil katyonik protein

EDN : *Eosinophil derived-neurotoxin*

ECF-A : *Eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis*
SRS-A : *Slow-reacting substance of anaphylaxis*
PAF : *PLT activating factor*
NK : *Natural killer*
TCR : T hücre reseptörü
pro-T hücreleri : Progenitor T hücreleri
pro-B hücreleri : Progenitor B hücreleri
MHC : *Major histocompatibility complex*
CFU-MegE : *Colony forming unit- megakaryocyte-erythroid*
CFU-Meg : *Colony forming unit- megakaryocyte*
PF4 : PLT faktör 4
vWF : *Von Willebrand factor*
ADP : Adenozin difosfat
ATP : Adenozin trifosfat
GDP : Guanozin difosfat
HCT : Hematokrit
MCV : Ortalama RBC hacmi
MCH : Ortalama RBC Hb'i
MCHC : Ortalama RBC Hb konsantrasyonu
CV : *Coefficient of variation*
LDH : Laktat dehidrogenaz
AST : Aspartat transaminaz
CD163 : *Cluster of Differentiation 163*
CK : Kreatin kinaz
CK-MB : *Creatine kinase muscle-brain fraction*
AMP : Adenozin monofosfat
ALT : Alanin transaminaz
GGT : Gama glutamil transferaz
ALP : Alkalen fosfataz
SIBioC : *Italian Society of Clinical Biochemistry and Molecular Biology*
SIMeL : *Italian Society of Laboratory Medicine*
LBS : Laboratuvar Bilgi Sistemi

WHO : Dünya Sağlık Örgütü
BUN : Kan Üre Azotu
CPDA : Sitrat-Fosfat-Dekstroz-Adenin
K₃EDTA : Tripotasyum etilendiamin tetraasetik asit
LDL-Kol : Düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol
HbsAg : Hepatit B yüzey antijeni
Anti-HCV : Hepatit C antikoru
Anti-HIV : Human Immunodeficiency Virus antikoru
SAG-M : Salin-Adenin-Glukoz-Mannitol
HEM : Hemoliz indeksi
ICT : İkterik indeks
LIP : Lipemik indeks
ISE : İyon selektif elektrod
NAD⁺ : Okside nikotinamid adenin dinükleotid
NADH : Redükte nikotinamid adenin dinükleotid
TPTZ : 2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin
NADP : Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
G6PDH : Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz
NADPH : Redükte nikotinamid adenindinükleotid fosfat
GEDTA : Glikoleterdiamin-N,N,N',N'- tetraasetik asit
Arsenazo III : 2,2'-(1,8-Dihidroksi-3,6-disülfonaftilen-2,7-bisazo)-bisbenzenarsonik asit
TMB : 1,2,4-trimetoksibenzen
TE : Total hata
TAE : Total izin verilebilen hata
MCHC : Ortalama RBC Hb konsantrasyonu

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince bilimsel birikimlerini ve manevi desteklerini esirgemeyen, uzmanlık eğitimimde emeği geçen başta Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı'mız Sayın Prof. Dr. Canan ÇOKER olmak üzere tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı değerli öğretim üyelerine;

Tez çalışmamın en başından sonuna kadar her aşamasında bilgi ve tecrübelerinden faydalandığım, bilimsel birikimleriyle bana her konuda destek olan tez danışmanım değerli hocam Doç. Dr. Tuncay KÜME'ye;

Tezin planlama aşamasından sonuç aşamasına kadar her konuda bilgi birikiminden yararlandığım değerli hocam Prof. Dr. Canan ÇOKER'e;

Uzmanlık eğitimim boyunca eşsiz deneyim ve bilgilerinden yararlandığım, yardımlarıyla bu alanda yetişmeme büyük katkı sağlayan değerli hocalarım, Prof. Dr. Banu ÖNVURAL, Prof. Dr. Sezer UYSAL, Prof. Dr. Pınar AKAN, Doç. Dr. Ali Rıza ŞİŞMAN ve Doç. Dr. Murat ÖRMEN'e;

Araştırma planlaması ve verilerin istatistiksel analizinde bana yardımcı olan Halk Sağlığı Anabilim Dalı'ndan Sayın Prof. Dr. Gül ERGÖR'e ve Uzm. Dr. Mestan EMEK'e;

Araştırmanın deneysel aşamasında yardımlarını esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Yavuz DOĞAN'a ve Veli GÜNAL'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca arkadaşlık ve dostluklarını esirgemeyen asistan arkadaşlarım; Dr. Esra DOĞAN, Dr. Ferhat DEMİRCİ, Dr. Barış SAĞLAM, Dr. Birsan TUĞLU, Dr. Ayşegül KESER, Dr. Nur YUSUFOĞLU, Dr. Rabia KIYAK, Dr. Ali YILDIRIM, Dr. Yasin KENESARI, Dr. Banu DEVECİ, Dr. Deniz KALKANDELEN, Dr. Emre DEMİRAY, Dr. Müge G. GÜLEÇOĞLU, Dr. G. Feyza ALTAŞ, Dr. M. Oğuz ERBAĞCI, Dr. Abdullah DİRİM'e ve Uzm. Dr. Özlem GÜRSOY ÇALAN'a;

Uzmanlık eğitimimiz boyunca tüm işlerimizi kolaylaştıran anabilim dalı sekreterimiz Sayın Eda OLUM'a;

Beni bugünlere getiren sevgili aileme;

Bu zor süreci benim için kolaylaştıran ve hayatın her basamağında desteğini hissettiğim sevgili eşim Cem ÜNLÜ'ye en içten dileklerle teşekkür ederim.

ÖZET

Klinik laboratuvarların en sık preanalitik hata kaynağı olan hemoliz, biyokimyasal test sonuçlarına etkisi çok değişken olabilen bir interferanstır. Bu çalışmanın amacı, hemolizdeki değişkenliğin bir sebebi olarak düşünülen, hemolize uğrayan hücre tipi ve sayısının etkisini deneysel bir modelle ortaya koymaktır.

Gönüllü 10 bireyden elde edilen 1'er ünite tam kandan 4'lü kan torba sistemiyle önce RBC ve PLT süspansiyonları; ardından, ana torbada kalan kandan dansite gradient santrifügasyonu yöntemi ile WBC süspansiyonları elde edildi. Hücre süspansiyonları serum fizyolojik ile yıkandı, yedi ayrı konsantrasyonda seri olarak dilüe edildi ve dondurup çözme yöntemi ile hücrelerin tam hemolizi sağlandı. Gönüllü 3 bireyin serumlarından havuzlanarak elde edilen serum örneklerine; bazal ölçüm için serum fizyolojik ve deney grupları için hazırlanan hücre hemolizatları, 1:20 oranında eklendi. Tüm örneklerde, 12 adet biyokimya test parametresi (LDH, potasyum, AST, demir, CK, magnezyum, total protein, total kolesterol, inorganik fosfor, glukoz, kalsiyum ve BUN) ve serum indeksleri Beckman Coulter AU5800 otoanalizöründe ölçüldü. Lizis belirteci olarak RBC için fHb spektrofotometrik olarak; WBC için MPO ve PLT için β -TGB ELISA yöntemleriyle manuel olarak ölçüldü. Her hücre tipi ve konsantrasyon seviyesi için; biyokimyasal test parametrelerinin düzeyi, "Wilcoxon İşaretli Sıralar Testi" kullanılarak serum fizyolojik içeren bazal konsantrasyon seviyesi ile karşılaştırıldı. Ayrıca, biyokimyasal test parametrelerinin bazal konsantrasyon seviyesine göre yüzde değişimi hesaplandı. Her parametre için, istatistiksel olarak anlamlı farklılığa yol açan hücre sayısı analitik eşik ve klinik açıdan anlamlı biasa yol açan hücre sayısı klinik eşik olarak tanımlandı.

Ölçülen biyokimyasal parametrelerin klinik açıdan anlamlı eşik değeri aştığı RBC sayıları (adet/ μ L); LDH için 50000, AST için 100000, potasyum için 200000, magnezyum ve inorganik fosfor için 400000, total protein için 800000, CK ve total kolesterol için 1620000 olarak belirlendi. PLT açısından bakıldığında ise bu sayıların (adet/ μ L); LDH ve total protein için 90000 olduğu saptandı. Ayrıca LDH testi için 12000 adet/ μ L PLT ve potasyum için 90000 adet/ μ L PLT içeren seviyelerde analitik olarak anlamlı eşiğin aşıldığı tespit edildi. WBC süspansiyonları yeterince saf elde edilemediğinden net etkisi değerlendirilemedi. Belirteçler değerlendirildiğinde; RBC sayısı ile fHb arasında anlamlı bir korelasyon saptanmasına ($r=0.999$, $p=0,001$) rağmen, WBC sayısı ile MPO ve PLT sayısı ile β -TGB arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı (sırasıyla $p=0,436$; $p=0,277$).

Bu çalışma bulguları, hemolize uğrayan değişik hücre tipi ve sayısının hemolize katkısının farklı olduğunu ve dolayısıyla, hemolizde biyokimyasal test sonuçlarındaki değişkenliğin bir sebebi olabileceğini ortaya koymaktadır. İleriye yönelik hemoliz mekanizmasının daha iyi anlaşılmmasını sağlayan bu tür araştırmalar, klinik laboratuvarlarda sık görülen bu interferansın çözümünde önemli ipuçları sağlayacaktır.

Anahtar kelimeler : Hemoliz, analitik interferans, laboratuvar testleri, fHb, MPO, β -TGB

SUMMARY

Hemolysis, the most frequent preanalytical error in clinical laboratories, is an interference which has very variable effects on biochemical test results. The aim of this study is to examine the effects of the hemolysed cell type and number as a reason for this variability using an experimental design.

One unit of blood was obtained from 10 volunteers and RBC and PLT suspensions were prepared using quadruple blood bag system, WBC suspensions were prepared from the blood left in the primary bag from each subject. Cell suspensions were washed with serum physiological followed by serial dilutions to obtain seven different concentrations and then the hemolysis of cells was achieved by freeze-thaw cycle. Serum physiological and cell hemolysates were added (1:20) to the serum pool prepared from the serum samples of 3 volunteers to obtain the basal and seven different concentrations respectively. The 12 biochemical test parameters (LDH, potassium, AST, iron, CK, magnesium, total protein, total cholesterol, inorganic phosphorus, glucose, calcium ve BUN) and serum indices were measured by Beckman Coulter AU5800 autoanalyser. As cell lysis markers, free hemoglobin for RBC was measured by spectrophotometrically; MPO for WBC and β -TGB for PLT were measured by ELISA methods manually. The levels of biochemical test parameters were compared to basal sample using “Wilcoxon Signed Rank Test”. Additionally, the relative change of each parameter according to the basal sample was calculated. The cell number which caused statistically significant difference was defined as the analytical threshold and the cell number which caused clinically significant bias was defined as the clinical threshold for each parameter.

The RBC concentrations (number/ μ L) defined as the clinical threshold were 50000 for LDH, 100000 for AST, 200000 for potassium, 400000 for magnesium and inorganic phosphorous, 800000 for total protein, 162000 for CK and total cholesterol. The PLT concentration (number/ μ L) defined as the clinical threshold was 90000 for LDH and total protein while the analytical threshold was 12000 for LDH and 90000 for potassium. The effect of WBC lysis could not be evaluated since WBC suspensions were contaminated by other cell types. As a cell lysis marker, fHb was significantly correlated with RBC number ($r=0.999$, $p=0.001$), while MPO and β -TGB showed no significant correlation to WBC and PLT numbers respectively ($p=0.436$ and $p=0.277$).

The findings of this study point out that the hemolysed cell type and number contribute to the influence of hemolysis in a variable manner and thus may be a reason for the variability of the biochemical test results in hemolysed samples. Further studies that explain the mechanisms of hemolysis will provide important findings to solve this common interference in clinical laboratories.

Key Words : Hemolysis, analytical interference, laboratory testing, free Hb, MPO, β -TGB

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Preanalitik evre, toplam test sürecinde laboratuvar test sonuçlarını etkileyen hataların çoğunun olduğu zaman aralığıdır. Bu durum; preanalitik evrenin diğer laboratuvar evrelerinden uzun ve çok basamaklı olması nedeniyle çeşitli faktörlerin örnek bütünlüğünü etkilemesine zemin hazırlamasından kaynaklanmakta ve sonuç güvenilirliğini tehdit etmektedir. Preanalitik faktörlere bağlı olarak oluşan uygunsuz örneklerden elde edilen test sonuçları, sadece tüm laboratuvar sürecinin kalitesini etkilemekle kalmamakta, ayrıca klinik ve ekonomik olumsuz sonuçlara da neden olmaktadır (1).

Kendisi analitik evreyi etkilemekle birlikte; sıklıkla preanalitik evredeki çeşitli etkenlerden kaynaklanan interferans, laboratuvar tıbbında karşılaşılan yaygın bir sorundur (2,3). İnterferans terimi, “örneğin özelliği veya başka bir bileşenin etkisi nedeniyle ölçülen analit konsantrasyonunda meydana gelen klinik olarak anlamlı bias nedeni” olarak tanımlanmaktadır (4). Başka bir deyişle; interferans, örnekte bulunan ve bir analitin genellikle konsantrasyon veya aktivite olarak ifade edilen sonucunu değiştiren bir maddenin etkisidir (5).

Analiz materyali olan vücut sıvıları, heterojen ve değişken bir bileşim içeren matrikse sahiptir. Vücut sıvılarında bulunan endojen ve/veya eksojen kaynaklı çeşitli bileşikler, yani interferantlar, analiz sonuçlarının doğruluğunu etkileyebilmektedir (5). Endojen interferantlar, örneğin doğasında var olan, sıklıkla preanalitik faktörlerden, nadiren fizyolojik veya patolojik etkenlerden kaynaklanan maddelerdir. Bunlar; hemoliz (fHb veya diğer maddeler), bilirubin, lipidler, proteinler, antikorlar (otoantikorlar, heterofil antikorlar), aşırı analit konsantrasyonu ve çapraz reaksiyon gösteren maddeler (örneğin, Jaffe yöntemiyle kreatinin ölçümünde ketonlar)’dır. Eksojen interferantlar ise, örneğin doğasında bulunmayan maddelerdir. Bunlar; ilaçlar (ana ilaç, metabolitleri ve katkı maddeleri), zehirler, bitkisel ürünler, intravenöz sıvılar, tedavi olarak verilen maddeler (örneğin antikorlar, digibind), örnek tüpü bileşenleri ve *carryover* (çapraz bulaş) kontaminantlardır (6).

Hemolizli örnekler, laboratuvar pratiğinde preanalitik faktörlerden kaynaklanan en sık görülen interferans nedenidir. Klinik laboratuvarlara gönderilen rutin örneklerin ortalama %3’ü ve kabul edilen uygunsuz örneklerin %39-69’undan sorumludur (İkinci sık nedenden yaklaşık 5 kat daha fazla) (7). Hemoliz, latince “hemo” (kan) ve “lysis” (parçalanma) kelimelerinden köken almaktadır (8,9). Bazı yazarlar hemolizi sadece kırmızı kan hücreleri

(RBC) ile sınırlamaktadır (eritroliz) (10–12). Diğerleri ise tüm kan hücrelerinin parçalanmasını (pansitoliz) kastetmektedir (9,13–16). Hemoliz, in vivo olarak meydana gelebilmektedir; fakat klinik laboratuvarların karşılaştığı başlıca sorun örnek alımı sırasında veya sonrasında preanalitik evrede meydana gelen in vitro hemolizdir (5). İn vivo hemolize çeşitli konjenital ve kazanılmış hastalıklar (örneğin, hemolitik anemiler) yol açmaktayken, in vitro hemolize kan örneklerinin alınması, işlenmesi ve depolanması sırasındaki birçok durum neden olabilmektedir. Dolayısıyla in vitro hemolize yol açan etkenler, hasta başında başlamakta ve örneğin analizine kadar olan süreç boyunca devam etmektedir. Bu etkenler; hastadan kaynaklanan durumlar (örneğin fragil venler, kanı alan kişinin yeterlilik seviyesi (örneğin, eğitim), kan örneğinin alınma, taşınma ve depolanma koşulları şeklinde sınıflandırılabilir (10,17).

Hemolizden kaynaklanan interferans; kan hücrelerinden hücre dışına çıkması sonucu analit konsantrasyonlarındaki değişme, fHb veya diğer intraselüler içeriğin ölçüm reaksiyonuna yaptığı kimyasal interferans ve Hb'nin yüksek absorpsiyon gösterdiği dalga boylarında meydana gelen spektrofotometrik interferans mekanizmalarıyla oluşmaktadır (18). Mekanizmaları iyi bilinmesine rağmen; hemolizin sebep olduğu interferansın laboratuvar test sonuçlarına etkisi çok değişkendir (19–23).

Hemoliz, fHb konsantrasyonu 30 mg/dL'yi aştığında görülebilir hale gelmektedir ve serum veya plazmaya pembeden kırmızıya kadar değişen bir renk vermektedir (10,17). Örneklerin görsel olarak değerlendirilmesi subjektif bir yöntem olduğundan, birçok laboratuvar, örnekteki hemoliz miktarını tutarlı olarak saptamak amacıyla otomatize spektrofotometrik ölçümlerin kullanımını benimsemiştir. Hemoliz indeksi olarak bilinen bu ölçüm, hemolizli örneklerin analiz için uygun olup olmadığını belirleme konusunda laboratuvara yardımcı olmaktadır (11).

Hemolizli örneklere ait test sonuçlarının hemoliz nedeniyle reddi, hasta güvenliğini tehlikeye atacak şekilde tanıda gecikmelere neden olabilmekte; hastadan tekrar kan alınması gerektiği durumlar ise artmış iş yükü ve laboratuvarlar için artmış maliyet anlamına gelmektedir (8).

Birçok analit, hemolizden kaynaklanan interferans etkisine maruz kalmakla birlikte, en yaygın olarak hemolizin potasyum sonuçları üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Potasyum ölçümlerinin sıklığı ve hipokalemi veya hiperkaleminin yanlış tanısının ciddi sonuçları,

hemolizli örneklerle yaklaşım açısından çeşitli seçenekler araştırılmasına sebep olmuştur. Bu seçenekler; hemolizli örneğin bütünüyle reddi, hemolizli örneğin analizi ve potasyum sonucunun yanlış olabileceğinin bildirilmesi, hemolizli örneğin analizi sonrasında ölçülen potasyum sonucuna hemolizin şiddetine göre hesaplanmış bir düzeltme faktörü uygulanarak sonucun verilmesini içermektedir (24).

Bazı çalışmalar, ölçülen potasyum konsantrasyonları üzerinde in vitro hemolizin etkisini hesaplamak için düzeltme faktörlerinin kullanımını desteklemektedir (19,25–27). Düzeltme faktörleri, hastalardaki gerçek potasyum konsantrasyonlarını değerlendirme olanağı sağlamakla birlikte önerilen düzeltme faktörleri arasındaki değişkenlik korkutucudur (8,24). Bu farklılığa neden olabilecek faktörler; in vitro hemolizi oluşturmak için kullanılan yöntem, eritrosit/Hb konsantrasyonundaki bireyler arası değişkenlik ve RBC yaşının intrasellüler potasyum konsantrasyonu üzerine etkisidir. Dolayısıyla, önerilen düzeltme faktörlerinin gerçek potasyum sonuçlarını öngörmek için kullanılmasının uygun olmayabileceği ve hasta güvenliğini tehdit edebileceği belirtilmektedir (24,28,29).

Bu araştırmanın amacı, hemolizin biyokimyasal testlere etkisindeki değişkenliğin bir sebebi olarak düşünülen, hemolize uğrayan hücre tipi ve sayısının etkisini ortaya koymaktır. Bunun için serum örneğine, in vitro hemolize uğratılmış olan değişik tip ve sayıda hücreden oluşturulmuş hemolizatlar eklenerek, hemolizin bazı biyokimyasal test sonuçları üzerindeki etkisi deneysel bir modelle incelenmiştir.

Bu araştırmanın hedefleri :

- 1- Serum örneğinde, in vitro hemolize uğrayan hücre tiplerinin ve sayılarının bazı rutin biyokimyasal test sonuçları üzerindeki etkisini belirlemek,
- 2- Serum örneğinde, in vitro hemoliz miktarının saptanması için fHb'den farklı potansiyel belirteçlerin ölçümlerini ortaya koymak,

2. GENEL BİLGİLER

2.1 TOPLAM TEST SÜRECİ

Toplam test süreci; Lundberg'in "*brain-to-brain loop*" olarak tanımladığı kavrama dayanmaktadır. Bu kavrama göre; süreç, klinik hekiminin kafasında oluşan klinik soru ve buna yönelik test istemi ile başlamakta, bunu örnek alımı, örneğin laboratuvara taşınması ve laboratuvar personelinin analizi gerçekleştirmesi takip etmekte, test sonucunun hekime ulaşması, hekimin onu değerlendirip bir karar vermesi ile sonlanmaktadır (30). Tüm bu basamaklar klasik olarak 3 evreye ayrılmaktadır: Preanalitik, analitik ve postanalitik (31,32). Örneğin analizine kadar olan evre preanalitik, örneğin analizini içeren evre analitik ve analizden sonraki evre ise postanalitik evredir (32). Bazı yazarlar, preanalitik evreyi pre-preanalitik ve preanalitik olarak; postanalitik evreyi ise post-postanalitik ve postanalitik olarak üzere ikiye ayırmışlardır (33,34). Pre-preanalitik evre; laboratuvarın dışındaki test istemi, örnek alma, örneğin laboratuvara taşınması ve örneğin laboratuvara kabulü gibi işlemleri içerirken klasik preanalitik evre; santrifüj, alikotlama, dilüsyon, örneklerin otoanalizör için gruplanması ve sıralanması gibi laboratuvarın kontrolü altındaki işlemleri içermektedir (35). Benzer olarak; laboratuvarın kontrolünde olan, analiz sonucunun raporlanması ve hekime ulaşmasını içeren evre postanalitik evre, hekimin sonucu değerlendirmesi ve klinik karara varması ise post-postanalitik evre olarak isimlendirilmiştir. Bununla birlikte; bu tanımlar ve kullanımları yaygın değildir. Aslında temel terimler olan preanalitik, analitik ve postanalitik evrenin tanımları dahi yazarlar arasında değişiklik gösterebilmektedir (32).

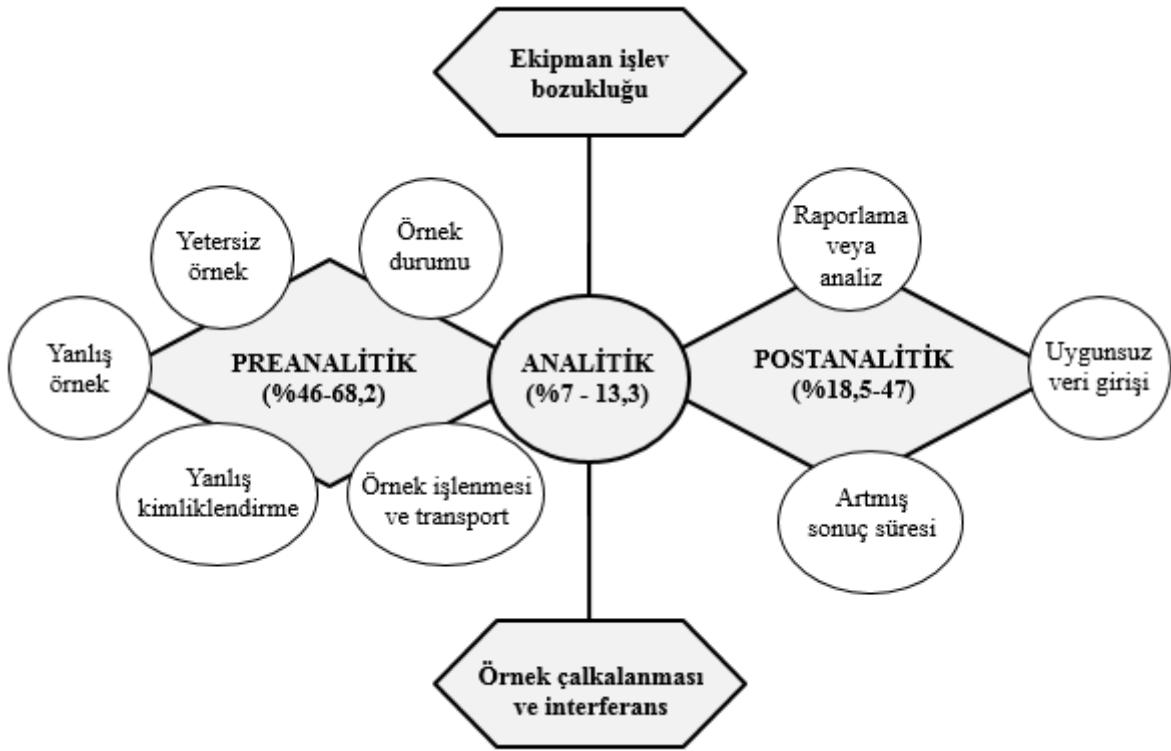
Analitik evrenin yanında preanalitik ve postanalitik evre, diğer bir deyişle ekstraanalitik evre de laboratuvar sonuçlarının kalitesi üzerine çok büyük etki göstermektedir (36). Özellikle analitik evre laboratuvarın kontrolü altındadır; bununla birlikte preanalitik ve postanalitik evreler çoğunlukla laboratuvar kontrolü altında değildir (37). 1990'lardan sonra yapılan çalışmalar, laboratuvar sürecinde meydana gelen hataların büyük çoğunluğunun preanalitik evreden kaynaklandığını göstermiş ve bu evrenin laboratuvar sonuçları ve hasta güvenliği üzerine etkisine dikkat çekmiştir (2,38–40). Plebani ve arkadaşları, 1996 yılında laboratuvar evrelerinde meydana gelen hataların sıklığı ile ilgili yaptıkları çalışmalarında %68,2'lik bir oranla preanalitik evrenin hataya en açık evre olduğunu, onu %18,5'luk oranla postanalitik evrenin takip ettiğini saptamışlardır (39). Aynı grubun 10 yıl sonra aynı laboratuvarda, aynı

Çalışma dizaynını kullandıkları çalışmalarında benzer sonuçlar elde etmişlerdir. Bu çalışmada dikkati çeken diğeri bir bulgu ise hataların %73'lük kısmının önlenebilir olarak sınıflanmasıdır (2).

Günümüz klinik laboratuvar rutininde, yeterli bir analitik kalite seviyesine ulaşmak için çaba gösterilmekte ve tüm kaynaklar bu yönde kullanılmaktadır. Bununla birlikte; preanalitik evre hasta bakımına büyük ölçüde etki eden değışkenliklere ve hatalara daha yatkındır (7). Preanalitik evrede yer alan hastanın kimliklendirilmesi, test istemi, örnek alınması ve taşınması gibi işlemlerde hekim, hemşire, hasta gibi laboratuvar dışı kişiler rol oynamaktadır (37). Preanalitik fazda meydana gelen hataların oğru, sistem kusurlarından ve bu evrede görev alan kişilerin yeterince denetlenmemesinden kaynaklanmaktadır. Bu durum ise kabul edilemez miktarda uygunsuz örnek ile sonuçlanmaktadır (7).

Örnek uygunluğunun değıerlendirilmesi, test sonuçlarının doğıruluğunu ve kullanılabilirliğıni etkileyen ciddi bir preanalitik faktördür (41). Wiwanitkit, preanalitik hataların eşitleri ve sıklığı ile ilgili yaptığı çalışmasında %47'lik oranla uygunsuz örneklerin önde gelen hata kaynağı olduğunu saptamıştır (40). Örneğinin analiz için uygunluğuna etki eden en yaygın preanalitik faktör ise örnekte bulunup interferansa yol açan maddelerdir (42).

Kendisi analitik evreyi etkilemekle birlikte; sıklıkla preanalitik evredeki çeşitli etkenlerden kaynaklanan interferans, laboratuvar tıbbında karşılaşılan yaygın bir sorundur (2,3). şekil 1'de preanalitik, analitik ve postanalitik evrenin laboratuvar sürecindeki hatalara katkı oranları görölmektedir :



Şekil 1 : Toplam laboratuvar sürecinde karşılaşılan hata çeşitleri ve oranları (36).

2.2 İNTERFERANS

İnterferans terimi, çeşitli kaynaklarda farklı şekilde tanımlanmaktadır. “*International Union of Pure and Applied Chemistry (UIPAC)*” tarafından interferans, “bir örnekte bir arada bulunanların varlığından kaynaklanan sinyalin ölçümündeki sistematik hata” olarak tanımlanırken “*Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)*” ise “örneğin özelliği veya başka bir bileşenin etkisi nedeniyle ölçülen analit konsantrasyonunda meydana gelen klinik olarak anlamlı bias nedeni” şeklinde tanımlanmaktadır (4,43). “*International Federation of Clinical Chemistry (IFCC)*” ilaç ve/veya metabolitlerinin neden olduğu interferanstan, bu bileşiklerin başka bir bileşene bağlı olarak miktar ölçümünün herhangi bir basamağını interfere etmesi” şeklinde söz ederken, başka bir kaynaktan ise interferans, “örnekte bulunan ve bir analitin genellikle konsantrasyon veya aktivite olarak ifade edilen sonucunu değiştiren bir maddenin etkisi ” şeklinde ifade edilmektedir (5,44).

Bir biyokimya laboratuvarı, biyokimyasal parametrelerin ölçümü için birçok yöntem kullanır. Tüm bu yöntemler, çeşitli kaynaklardan interferansa açıktır. Bir yöntemi etkileyen interferans bir diğeri için önemli olmayabilir (45).

İnterferansa sebep olan faktörler, interferant olarak isimlendirilir. İnterferantlar, analitten farklı kimyasal maddelerdir ve kaynağına göre endojen interferantlar ve eksojen interferantlar olmak üzere iki başlık altında sınıflandırılabilir :

2.2.1 Eksojen İnterferantlar

Eksojen interferantlar, örneğin doğasında bulunmayan maddelerdir (6). İlaçlar, tüp bileşenleri, “carryover” (çapraz bulaş) ve matriks bileşenleri başlıca eksojen interferantlardır (5).

2.2.1.1 İlaçlar

İlaç interferansları, laboratuvarlarda hastaya ait tedavi bilgisi bulunmadığından sıklıkla farkedilmemektedir. İnterferans; ana ilaç, ilacın metaboliti veya katkı maddelerinden kaynaklanabilmektedir (6).

İlaç interferansı üç mekanizma ile meydana gelebilir. Bunlar; ana ilaç, ilacın metaboliti veya katkı maddelerinin çapraz reaktivite gösterdiği kimyasal interferans; ilaçlar veya katkı maddelerinin ölçüm reaksiyonunu hızlandırması veya inhibe etmesi ve ana ilaç, ilacın metaboliti veya katkı maddelerinin ölçülen kromojenle benzer absorbsiyon piklerine sahip olması şeklindedir (6).

İlaç metabolitlerinin neden olduğu interferansı saptamak, ana ilacın neden olduğu interferansı saptamaktan daha zor olabilmektedir. Bunun nedeni, sıklıkla metabolitlerin bilinmemesi ve metabolit konsantrasyonlarının öngörülememesidir (5).

2.2.1.2 Tüp Bileşenleri

Kan alınan tüpler; antikoagülasyon, glikoliz inhibisyonu gibi amaçlarla çeşitli maddeleri içermektedir (5). Bu maddelerin birçok analitin ölçüm yöntemini interfere ettiği gösterilmiştir (46). Bu tüplerde bulunup interferansa neden olabilen diğere maddeler; kayganlaştırıcılar, pıhtı aktivatörleri, sürfaktanlar ve bariyer jellerdir (47).

Tüp bileşenleri; katkı maddesinin ölçülecek analitin kendisini içermesi şeklinde, ölçüm reaksiyonunu aktive veya inhibe ederek, immunoassayler için ise nonspesifik adsorbsiyon veya bağlanmaya neden olarak interferansa yol açabilmektedir (47,48).

2.2.1.3 Carryover (Çapraz Bulaş)

Carryover interferansı, bir önceki örneğin veya reaktifin sonraki reaksiyon karışımına bulaşmasıdır. Tipik olarak, ölçümden bir önceki örneğin veya reaktifin yüksek analit konsantrasyonuna sahip olması ve yıkama işlemleri ile yeterince temizlenememesinden kaynaklanmakta ve özellikle otomatize ölçümlerde beklenen konsantrasyon aralığı çok geniş olan beta insan koryonik gonadotropini (β -hCG), tümör belirteçleri gibi testlerde karşılaşılmaktadır (6,49). *Carryover* varlığını belirleyebilmek için prob, karıştırıcı ve kuvvet gibi bileşenler için ek yıkama işlemleri yapılmalıdır (6).

Carryover, kan alma işlemi sırasında vakumlu tüp kullanıldığı durumlarda tüp sıralamasına uyulmadığı takdirde de meydana gelebilmektedir (50). Burada çok sayıda örnek alınması gerektiği durumlarda bir önceki tüpteki katkı maddesi ile kontamine kan alma iğnesi bu maddeyi bir sonraki tüpe aktarabilmekte ve yanlış test sonuçlarına yol açabilmektedir (51).

2.2.1.4 Matriks etkisi

Analitik kimyada matriks etkisi, ölçülen analit hariç olmak üzere örneğin diğer tüm bileşenlerinin ortak etkisi olarak tanımlanmaktadır. Kan, plazma, idrar, feçes, safra ve doku örnekleri sık karşılaşılan matrikslerdir. Bu kompleks matriksler birçok ortak bileşene sahip olmakla birlikte, tüm bileşenler bilinmemekte ve düzeyleri bireyler arasında değişkenlik gösterebilmektedir. Örneğin klinik araştırmalara katılan farklı hastalardan elde edilen plazma örnekleri, hastaların genetik yapıları ve/veya hastalıklarının yanısıra kullandıkları çeşitli ilaçlardan kaynaklanan farklı seviyelerde endojen bileşenler içerebilmektedir. Fosfolipidler, karbohidratlar, endojen metabolitler (örneğin bilirubin) gibi endojen biyolojik bileşenler matriks etkisine neden olabilmektedir (52).

Matriks etkisi ile kontrol ve kalibrasyon materyallerinde de karşılaşılabilmektedir (5). Burada analitin değerindeki değişiklik, bilinmeyen veya örnekte net şekilde tanımlanamamış etkenlerden kaynaklanmaktadır. Bu etkenler; materyalin cinsi (örneğin; at, insan), koruyucular (örneğin; sodyum azid veya antibiyotikler), stabilizatörler (örneğin; asetilsistein) veya liyofilizasyon, dondurma gibi fiziksel değişiklikleri içerir (53). Örneğin, serum

havuzlarının işlemlenmesi ve liyofilize edilmesinin, birçok analizör için kolesterol sonucunu etkilediği ve bu analitin standardizasyon işlemini interfere ettiği gösterilmiştir (54).

2.2.2 Endojen interferantlar

Endojen interferantlar, örnekte doğal olarak var olan fakat normalde karşılaşılandan daha yüksek miktarda bulunan maddelerdir. Hemoliz, lipemi, ikter ve paraproteinemi endojen interferant örnekleridir (55).

2.2.2.1 Lipemi

Lipemi, serum ve plazma örneklerinde bulanıklığın en yaygın formudur. Tam kan örneklerinde de görülebilmekle birlikte örnekte bulunan hücreler tarafından perdeleneceğinden farkedilmesi çok zor olabilir (55).

Lipeminin sebep olduğu interferansta 3 mekanizma rol oynamaktadır. Bunlar: Mikro emülsiyonların sıvı fazın yerini alması ve dolayısıyla örnek hacmindeki sıvı fazı azaltması; steroid hormonlar, dilantin gibi lipofilik ilaçların plazmanın şilomikron ve çok düşük yoğunluklu lipoprotein (VLDL) partikülleri içeren nonpolar kısmında bulunması ve yine bu partiküllerin büyük boyutları nedeniyle ışık saçılımına neden olmasıdır (55).

Lipid interferansını azaltmak için ultrasantrifügasyon veya yüksek hızda santrifüj yapılabilir, lipid temizleyici madde kullanılabilir ya da indirekt iyon selektif elektrod yöntemi kullanılan durumlarda imkan varsa direkt iyon selektif elektrod yöntemi ile ölçüm yapılabilir (6,56).

2.2.2.2 İkter

Artmış bilirubin konsantrasyonu bir diğer endojen interferans kaynağıdır (5). Bilirubin iki şekilde interferansa neden olur: Spektral interferans ve kimyasal interferans. Spektral interferans yaklaşık 456 nm'de absorban piki veren bilirubinin bu dalga boyuna yakın analitlerin ölçümünde meydana getirdiği interferanstır (6). Kimyasal interferansın mekanizması ise bilirubinin analit ölçümünde kullanılan reaktiflerle reaksiyona girmesidir (56). Örneğin bilirubin, peroksidaz yöntemlerinde analitin ölçümünü beş şekilde interfere edebilir: Peroksidaz için substrat olarak, ölçüm reaksiyonunun ürünüyle aynı dalga boyunda

absorbans yaparak, oksidaz ara ürününü alıkoyarak veya uzaklaştırarak, hidrojen peroksit gibi bir peroksidaz ara ürünü ile reaksiyona girerek ve son reaksiyonun rengini açarak (57).

Bilirubin etkisi hangi formda bulunduğu ile de ilişkilidir. İndirekt bilirubin alkali çözeltilerde metaboliti olan biliverdine dönüşme eğilimindeyken, direkt bilirubin için bu etki daha azdır. Kreatinin ölçümünde kullanılan alkali pikrat yönteminde alkali ortam meydana gelmekte ve örnekte bulunan bilirubin biliverdine dönüşmesi negatif interferansa neden olmaktadır (58,59)

2.2.2.3 Paraproteinemi

Protein interferansının çoğu paraproteinler (monoklonal immunoglobulinler), genellikle de immunoglobulin M (IgM) ve immunoglobulin G (IgG) ile ilişkilidir. Paraproteinler tüm otomatize yöntemleri interfere edebilir (spektrofotometrik, immuniturbidimetrik, immunonefelometrik) ve total bilirubin, fosfat, yüksek yoğunluklu lipoprotein kolesterol (HDL-Kol), gama glutamil transferaz, C-reaktif protein (CRP) ve glukoz sonuçlarını etkilediği gösterilmiştir (60,61).

Paraproteinler, yöntem reaktifi ile fizikokimyasal etkileşime girerek çökebilir. Çökme, genellikle bir tampon olan ilk reaktif ile meydana gelir. Bu tip interferansın giderilmesi için örnek tipinin değişmesi, farklı yöntem veya örnek dilüsyonları gerekebilir (61). Ayrıca, protein, hacim yer değişimi etkisiyle indirekt iyon selektif elektrod yönteminde, özellikle sodyum ölçümünde belirgin hatalara neden olur (hiperproteinemide hiponatremi, hipoproteinemide hipernatremi şeklinde) (62). Genel olarak, total protein konsantrasyonu >100 ve <40 g/L olan örnekler, direkt iyon selektif elektrod yöntemi ile çalışılmalıdır (6).

2.2.2.4 Hemoliz

Hemoliz, latince “*hemo*” (kan) ve “*lysis*” (parçalanma) kelimelerinden köken almaktadır (8,9). Bazı yazarlar hemolizi sadece RBC’lerle sınırlamaktadır (eritroliz) (10–12). Diğerleri ise tüm kan hücrelerinin parçalanmasını (pansitoliz) kastetmektedir (9,13–16). Aslında hemolize her zaman Hb salınması eşlik etmez. Örneğin; kan, düşük fakat dondurucu olmayan bir sıcaklıkta saklandığında bu durum gerçekleşebilmektedir. Ayrıca, interferantlar hem PLT hem de granülosit parçalanmasından kaynaklanabilmektedir (16).

Hemoliz konusu, ilerleyen bölümlerde ayrıntılı olarak bahsedilecektir.

2.3 KAN ve BİLEŞENLERİ

Kan, plazma adı verilen proteinden zengin bir sıvıdan ve bu sıvı içinde süspanse olmuş hücresel elemanlardan meydana gelmektedir. Bu hücresel elemanlar; beyaz kan hücreleri (WBC), RBC ve kan pulcukları (PLT)'lerdir. Dolaşımdaki kan vücut ağırlığının %8'ini oluşturmaktadır ve 70 kg ağırlığındaki bir kişide 5600 mL'dir. Bu hacmin %55'ini plazma meydana getirmektedir (63).

Kanın sıvı kısmı olan plazma; vücudun çeşitli bölgelerine taşınmakta olan veya diğer maddelerin taşınmasına yardım eden çok sayıda iyon, inorganik ve organik molekülleri içermektedir. Normal plazma volümü vücut ağırlığının %5'ini oluşturmaktadır ve 70 kg vücut ağırlığı olan bir kişide yaklaşık olarak 3500 mL'dir (63). Yapılan *metabolomics* araştırmaları ile plazma bileşimi tam olarak ortaya konmaya çalışılmaktadır (64,65).

Klinik laboratuvarlarda kanın kimyasal bileşimi, tam kan örneğini santrifügasyonla kan hücrelerinden ayırarak elde edilen kan sıvısında analiz ile saptanır. Geleneksel olarak kan örneği kan pıhtılaşması tamamlandıktan sonra kan hücrelerinin ayrımı ile elde edilen serum şeklinde en sık analiz edilir. Bazen de antikoagülan maddeler [etilendiamin tetra asetik asit (EDTA), sitrat, heparin, hirudin gibi] eklenerek pıhtılaşması engellendikten sonra kan hücrelerinin ayrımı ile elde edilen plazma şeklinde de analiz edilir. Plazma hem analiz süresini yaklaşık 30 dk kısaltması hem de kan örnek hacmini %15-20 artırması açısından avantajlıdır; fakat içerdiği antikoagülanlar nedeniyle interferansa sebep olması açısından dezavantajlıdır (66). Ayrıca serumda fibrin kafesi içinde hücrelerinin mekanik basınca maruz kalarak parçalanması (hemoliz) açısından plazma örnekleri avantajlıdır (67).

Kanın hücresel elemanları; 3 başlık altında incelenebilir :

2.3.1 RBC

RBC'ler, diğer kan hücreleri gibi kemik iliğinde bulunan pluripotent kök hücreden köken almaktadır. Bu hücreden oluşan ortak miyeloid progenitör (CFU-GEMM), megakaryosit/RBC serisine sınırlı progenitör (CFU-MegE)'ü oluşturur. CFU-MegE hücreleri önce *burst-forming unit-erythrocyte (BFU-E)* ve ardından *colony forming unit erythrocyte (CFU-E)* hücrelerini meydana getirir. Kemik iliğinde en erken ayırt edilebilen eritroid prekürsörü pronormoblasttır ve eritroid prekürsörlerinin en büyüğüdür. Pronormoblastlar, mitoz bölünme sonrasında bazofilik normoblastlara dönüşür. Ardından Hb üretiminin

gözlenebildiği polikromatofilik normoblast ve takiben ortokromatik normoblast meydana gelir. Bu evreden sonra mitoz bölünme görülmez (68). Hücre çekirdeğinin dışarı atılması ile birlikte retikülosit meydana gelir. Retikülositin mitokondri ve ribozomlarını kaybetmesiyle dolaşımdaki kan hücrelerinin büyük çoğunluğunu oluşturan olgun RBC'ler meydana gelir (69).

Normal insan RBC'i 7,5-8,7 μm çapa sahip bikonkav disk şeklindedir. Şekillerinden dolayı ışık mikroskobunda hücrenin merkezi çevresine göre daha soluk boyanmış olarak görülmektedir. Çapları hücre yaşıyla birlikte azalmaktadır. Hücreler 90 fL ortalama hacme ve yaklaşık 136 μm yüzey alanına sahiptir. Hücre membranı 150 fL hacminde bir küreye dönüşmeye ve 2.8 μm çapında bir kapillere girmeye izin verecek niteliktedir (70).

RBC, kompleks bir hücredir. Hücre membranı proteinler ve lipidlerden meydana gelir. Hücre içeriği ise, 120 günlük yaşam süresini metabolik olarak idame ettirecek ve hücre içinde bulunan Hb'nin fonksiyonunu sürdürecektir (71). RBC'nin en önemli bileşenlerinden biri olan Hb bir hemoproteindir ve başlıca görevi oksijeni akciğerlerden dokulara taşımaktır. Kandaki referans aralığı sağlıklı erişkin erkeklerde 14-17,5 g/dL iken sağlıklı erişkin kadınlarda 12,3-15,3 g/dL'dir (72). Hb; 6,4 nm çapa ve yaklaşık 64500 Da ağırlığa sahip globüler bir proteindir (73). Hb molekülü, iki çift polipeptit zinciri (globinler)'nden oluşmaktadır ve her biri bir ferröz demir atomu içeren 4 adet prostetik hem grubuna sahiptir. Her bir polipeptit zincirinin oluşturduğu cebe bir adet hem grubu yerleşmiştir. Hem grubu oksijen veya karbondioksiti geri dönüşümlü olarak bağlar. Hb molekülü tamamen doymuş hale geldiğinde gram Hb başına 1,34 mL oksijen taşır. Oksijen basıncının 100 mm Hg olduğu akciğer kapiller damarlarında Hb'nin %95-98'i oksijenle bağlıdır. Oksijen basıncının 20 mm Hg gibi düşük düzeyde olduğu dokularda ise oksijen kolaylıkla dokulardan ayrılır ve oksijenin %30'undan azı bağlı olarak kalır (72).

RBC'lerin kandaki referans aralığı sağlıklı erişkin erkeklerde 4520000-5900000 adet/ μL iken sağlıklı erişkin kadınlarda 4100000-5100000 adet/ μL 'dir. RBC'ler, dolaşım ömrünün büyük bir kısmını kapiller damarlarda geçirir. Bu hücreler 100-120 günlük ömürleri boyunca yaklaşık 250 km yol katetmektedir. RBC'nin uzun ömrü, hücre membranının hücre içeriği çevresinde rotasyon yapabilmesi özelliğiyle mümkün olur. RBC membranının bu yeteneği, membran iskelet proteinlerinin fiziksel düzenlenme şekliyle ilgilidir. Bu düzenlenme aynı zamanda RBC'nin dinlenme halindeki bikonkav şeklinin de nedenidir (70).

RBC membranı dolaşımdayken zedelendiği takdirde damar içinde hücre ortadan kaldırılır. Normalde RBC'nin bu şekilde ölümü daha az sıklıkta gerçekleşir. Daha sıklıkla RBC'nin yaşamı dalak sinüzoidlerinde bir makrofaj tarafından sonlandırılır. Makrofajlar, hasarlanmış olan RBC'leri bazı hücre yüzey değişiklikleri ve/veya azalmış deformabilitelerinden ayırt edebilir (74). Normal şartlarda saniyede yaklaşık üç milyon RBC dolaşımdan temizlenmektedir (68).

RBC'lerin başlıca fonksiyonları; oksijeni dokulara taşımak ve doku metabolizması sonucu meydana gelen karbondioksit ve protonların uzaklaştırılmasıdır (75).

2.3.2 WBC

Kemik iliğinde pluripotent hematopoietik kök hücreden CFU-GEMM ve ortak lenfoid progenitor meydana gelir. Nötrofil ve monositler için ortak progenitor olan CFU-GM hücresinden ise granülosit progenitor hücresi (CFU-G) ve monosit progenitor hücresi (CFU-M) oluşur. CFU-G ve CFU-M hücreleri, granülosit ve monosit koloni uyarıcı faktörlerin etkisi ile sırasıyla miyeloblastlara ve monoblastlara dönüşür. CFU-GEMM hücresinden ayrıca, eozinofillerin köken aldığı eozinofil progenitor hücresi (CFU-Eo) ve bazofillerin köken aldığı bazofil progenitor hücresi (CFU-Baso) da meydana gelmektedir (68).

Kemik iliğindeki ortak lenfoid progenitor hücreden ise T lenfosit/*natural killer* ve B lenfosit prekürsörleri meydana gelir. B lenfositlerin gelişimi kemik iliğinde gerçekleşirken, T lenfositler timusta olgunlaşmaktadır (68).

WBC'lerin kandaki referans aralığı sağlıklı erişkinlerde 4400-11300 adet/ μ L'dir. Normal koşullarda kanda bulunan WBC'ler; nötrofiller, eozinofiller, bazofiller, monositler ve lenfositlerdir (72). Bu hücreler polimorfonükleer WBC (PMNL) ve mononükleer WBC'ler olmak üzere iki ana başlık altında incelenebilir :

2.3.2.1 PMNL (Granülositler)

2.3.2.1.1 Nötrofiller (Polimorfonükleer Nötrofilik WBC'ler; Segmente Nötrofilik Granülositler)

Kemik iliğinde oluşan ve mikroskop ile tanınabilen ilk nötrofil prekürsörü olan miyeloblast; sırasıyla promiyelosit, miyelosit, metamiyelosit, bant evrelerinden geçerek segmente nötrofili oluşturur (76).

Nötrofiller, ortalama 12 µm çapında olup monosit ve eozinofillerden küçük, bazofillerden hafif büyük hücrelerdir. Normal nötrofillerin çekirdekleri, ortalama üç loba sahip olmakla birlikte, lob sayısı ikiden beşe kadar değişebilmektedir. Nötrofillerin sitoplazmalarında Wright boyası ile boyanabilen küçük granüller bulunur. Sitoplazmadaki granüllerin üçte ikisi spesifik granüllerken, üçte biri azurofilik granüllerdir (72). Promiyelosit evresinde oluşan azurofilik granüller; lizozomal enzimler (örneğin; asit hidrolaz:asit fosfataz, beta glukuronidaz), MPO, elastaz, arilsülfataz ve katyonik antibakteriyel proteinler, diğer enzim ve proteinleri içerir. Miyelosit evresinde oluşan spesifik granüller ise lizozim, laktoferrin, kollagenaz, plazminojen aktivatörü, aminopeptidaz ve B1 vitamini bağlayıcı protein, diğer enzim ve proteinleri içerir (68).

Olgun nötrofiller, WBC'lerin ortalama %56'sını oluşturmaktadır (72). Bu hücreler, kan dolaşımına verilmeden önce kemik iliğinde depolanır. Dolaşımdaki nötrofiller ise kanda yaklaşık 7 günlük bir yarılanma süresine sahiptir. Toplam kan nötrofil havuzu, vasküler boşluklardaki tüm nötrofilleri kapsar. Bunların bir kısmı dolaşımda serbest haldeyken (dolaşan havuz) diğer kısmı küçük damarların endotel duvarı boyunca ilerlemekte veya geçici olarak akciğerin alveolar kapiller damarlarında sekestre olmaktadır (marjinal havuz). Dokulara geçen nötrofiller, hücre ölümü ya da gastrointestinal yolda kaybedilmeden önce olasılıkla bir veya iki gün bulunduğu dokuda fonksiyon gösterir (76). Nötrofilin dokulara göçü, nötrofiller ve endotel hücreleri üzerinde bulunan selektin ailesinin adhezyon molekülleri ve onların ilgili ligandlarına bağlıdır (68).

Nötrofiller, fagositoz ve bakterisidal aktivite fonksiyonlarına sahiptir (68).

2.3.2.1.2 Eozinofiller (Eozinofilik Granülositler)

Eozinofiller, kemik iliğinde üretilmektedir. İn vitro kültür çalışmaları, eozinofiller için CFU-GM, CFU-G ve CFU-M'den ayrı bir CFU-Eo bulunduğunu göstermiştir. Eozinofilik seriye ait tanınabilen ilk hücre olan myelositin prekürsörü olan miyeloblast, her ne kadar nötrofil, monosit ve bazofilinkinden morfolojik olarak ayırt edilemese de büyük olasılıkla farklı bir miyeloblasttır. Nötrofillere benzer şekilde; miyelosit evresini takiben sırasıyla metamiyelosit, bant ve son olarak eozinofil meydana gelir (68).

Eozinofiller, ortalama 13 µm çaplı hücrelerdir. Bu hücrelerin yapısı, nötrofillere benzemekle birlikte, sitoplazmaları nötrofilik granüller yerine, onlardan daha büyük olan, asit boyalara güçlü afinite gösteren oval veya yuvarlak granüller içerir (72). Ayrıca eozinofilin

çekirdeğinin lob sayısı nötrofilinkinden daha azdır. Eozinofillerin sahip olduğu olgun granüller 2 çeşittir: Merkezinde yoğun kristaloid bir çekirdek ve bu çekirdeğin içinde bulunduğu daha az yoğun bir matriksten oluşan büyük granüller (en büyüğü 0,5-1,5) ve kristaloid içermeyen daha küçük granüller (0,1-0,5 um). Bu eozinofil spesifik granüller, kristaloid çekirdeklerinde *major basic protein* (MBP) içerir ve bu protein parazitlere ve hücrelere toksik etki gösterir, heparini nötralize eder ve bazofillerden histamin salınımını uyarır. Granülün matriksi ise asit hidrolaz, peroksidaz, fosfolipaz ve katepsin içerir. Bu spesifik granüller, ayrıca, eozinofil katyonik protein (ECP), *eosinophil derived-neurotoxin* (EDN) ve eozinofil peroksidaza sahiptir. Daha küçük granüller ise, arilsülfataz ve büyük granüllere benzer şekilde asit fosfataz ve peroksidaz içerir. Eozinofildeki peroksidaz, nötrofil ve monositlerde bulunan peroksidazdan farklıdır. Ayrıca eozinofil, alkalen fosfataz ve muramidaz içermemektedir (68).

Eozinofiller, sağlıklı erişkinlerde kandaki WBC'lerin ortalama %3'ünü oluşturur (72). Bu hücreler, kemik iliğinden kan dolaşımına çıktıktan sonra dolaşımda yaklaşık olarak 18 saatlik bir yarılanma süresine sahiptir. Eozinofiller, esas olarak doku yerleşimli hücrelerdir. Kandaki her bir eozinofile karşılık dokuda 100 adet eozinofil bulunduğu tahmin edilmektedir (77).

Eozinofiller, fagosit olarak görev yapar ve inflamatuvar cevapları düzenler. Helmintleri güçlü oksidanlar üreterek ve katyonik proteinler salgılayarak yok eder. Özellikle alerjik reaksiyonlar, astım ve bazı miyokardiyal hastalıklarda rol oynar. Eozinofiller, yabancı partikülleri ve antijen-antikor komplekslerini fagosit etmeyle birlikte tek görevleri bu değildir. Eozinofilin diğer bir önemli görevi, hipersensitivite ve inflamatuvar reaksiyonları azaltmaktır. Doku mast hücreleri ve bazofillerin degranülasyonunun ardından meydana gelen reaksiyonları eozinofillerin modüle ettiği kanıtlanmıştır (68).

2.3.2.1.3 Bazofiller (Bazofilik Granülositler)

Bazofiller, hematopoietik prekürsörlerden köken almakta ve olasılıkla diğer granülosit ve monositlerle ortak bir prekürsörden meydana gelmektedir. Miyeloblastı andıran bir hücreden tanınabilen ve spesifik bazofilik granüllere sahip olan ilk bazofil hücresi olan bazofil myelosit oluşmaktadır. Nötrofil oluşumundaki ara evreler bazofiller için kolaylıkla tanımlanamamıştır. Son olarak büyük koyu kırmızı-mor granülleri ile olgun bazofil meydana gelmektedir (68).

Bazofiller, genel olarak, nötrofillere benzer fakat çekirdekleri daha az segmentli (çoğunlukla sadece girintili veya kısmen lobüle) olup granülleri bazik boyalara güçlü afinite gösteren daha büyük granüllerdir (72). Bazofil granülleri; histamin, heparin ve peroksidaz içermektedir. Bazofiller, histamin ve *eosinophil chemotactic factor of anaphylaxis (ECF-A)* sentezler ve depolar. Ayrıca uyarıldıklarında *slow-reacting substance of anaphylaxis (SRS-A)* ve olasılıkla *PLT activating factor (PAF)* sentezler ve salgılar, fakat onları depo etmez. Glikojen, granüllerin etrafında bol miktarda bulunur (68).

İnsan bazofili, kanda en az bulunan granülosit tipidir. Bazofiller, olgun hücreler şeklinde dolaşımda bulunur ve kandaki WBC'lerin %0.5'ini oluşturur (72). Bu hücreler, dokulardaki özellikle immünolojik veya inflamatuvar cevap bölgelerine geçebilir fakat dokulara yerleşmez. Bazofiller, kısa bir yaşam süresine sahiptir ve granülositik özelliklerini dokulara göç ettikten sonra da sürdürür (78).

Bazofiller, alerjik astım gibi akut hipersensitivite reaksiyonlarında rol oynamaktadır. IgE, kolaylıkla bazofil membranındaki reseptörlerine bağlanır ve spesifik bir antijen membrana bağlı IgE ile etkileşime girdiğinde, granüllerden akut hipersensitivitenin mediatörleri (örneğin; histamin, SRS-A, PAF, heparin, ECF-A) salınır. Bazofiller, ayrıca, bazı gecikmiş hipersensitivite reaksiyonları ve farklı bir degranülasyon cevabının meydana geldiği kontakt alerjiler gibi kutanöz bazofil hipersensitivitesi ile ilişkilidir (68).

2.3.2.2 MNL (Agranülositler)

2.3.2.2.1 Monositler

Monositler, nötrofillerin de progenitörü CFU-GM hücresinden köken almaktadır. Bu hücrenden monosit progenitör hücresi olan CFU-M meydana gelmekte ve o da monoblasta dönüşmektedir. Kemik iliğinde morfolojik olarak monoblastı miyeloblasttan ayırt etmek mümkün değildir. Bu serideki tanımlanabilen ilk hücre promonosittir. Ardından oluşan monosit, biraz daha küçüktür ve hem kemik iliğinde, hem de kanda bulunur. Kandan dokuya geçen monositler ise makrofajlara dönüşür. Makrofajlar, vücuttaki tüm dokularda bulunmakla birlikte en fazla barsak, karaciğer, kemik iliği ve dalakta bulunur (68). “Mononükleer fagositik sistem”, kemik iliği monoblast ve promonositleri, kan monositleri ve dokudaki serbest veya sabit olarak bulunan makrofajları içermektedir (79).

Monositler, scanning elektron mikroskobu ile incelendiğinde belirgin yüzey dalgalanmaları ve kabarcıkları içeren küre biçiminde hücrelerdir (79). Monosit, normal kanın

en büyük hücresidir. Bir RBC'nin yaklaşık 2-3 katı çapa sahiptir (14-20 µm) fakat daha küçük monositlerle de karşılaşılabilir. Kısmen lobüle ve at nalına benzeyen bir çekirdeği vardır (72). Sitoplazmalarında bol miktarda küçük azurofilik granüller bulunur. Azurofilik granüller; asit hidrolaz, arilsülfataz, nonspesifik esteraz ve peroksidaz içermektedir. Monositlerde birden fazla granül tipi bulunabilir. Hücre olgunlaştıkça, peroksidaz aktivitesi azalmakta, asit hidrolaz, arilsülfataz, nonspesifik esteraz aktivitesi artmaktadır (68). Monositler, dokulara geçip makrofajlara dönüştüklerinde, hücre hacimleri ve sitoplazmalarındaki granül miktarı artmaktadır (79).

Monositler, WBC'lerin ortalama %4'ünü oluşturur (72). Bu hücreler, dolaşıma girdikte sonra 8,4 saatlik bir yarılanma ömrüne sahiptir. Kan monositleri ise, 1:3,5 oranında dolaşan monosit havuzu ve marjinal monosit havuzunu meydana getirmektedir. Artmış talep durumunda, monosit üretimi hızlanabilir ve olgunlaşmamış monositler kan dolaşımına çıkabilir. Monositler, kandan ayrıldıktan sonra, aylarca doku makrofajı olarak görev yapar (68).

Monositler, hareketli hücrelerdir ve sitoplazmaları birçok mitokondri, mikrotubul ve mikrofilament içerir. Bu hücreler, inflamasyon ve kemotaktik uyarıya aktif diapedez ile damarlardan inflamasyon odağına geçerek cevap verir ve burada daha fazla fagositoz kapasitesine ve hidrolitik enzime sahip olan makrofajlara dönüşür (79). Mononükleer fagositik sistem; mikobakteriler, mantarlar, bakteriler, protozoalar ve virüslere karşı vücut savunmasında önemli rol oynar. Bu sistem, hem sıvısal ve hem de hücresel bağışıklığın tamamlayıcı bir bileşenidir. Hücreler, antijenleri işler ve antijenin veya antijenik bilginin lenfositlere iletilmesinde görevlidir. Ayrıca birçok lenfokin ve monokine cevap verir ve hücre aracılı immun yanıtta efektör hücre olarak rol alır. Monositler ve makrofajlar, antikor bağımlı hücresel sitotoksitede fonksiyon gösterir. Çeşitli malign hücreleri öldürme yeteneğine sahiptir. Makrofajlar, yaşlı hücreleri ve hücre artıklarını fagositoz ve sindirim yoluyla uzaklaştırır. Makrofajlar; enzimler, kompleman bileşenleri, bağlayıcı proteinler, pıhtılaşma faktörleri, sitokinler ve büyüme faktörleri, kemotaktik faktörler, anjiyogenez faktörleri ve biyolojik olarak aktif lipidler gibi birçok molekül sentez eder ve salgılar. Bu nedenle, bu sistem, konak savunması, hematopoez kontrolü ve vücut içi çevrenin kontrolünü sağlamak gibi birçok fonksiyona sahiptir (68).

2.3.2.2.2 Lenfositler

Lenfositler, diğer WBC'lerden morfolojik olarak kolaylıkla ayırt edilebilen heterojen bir hücre grubudur. Bu hücreler T lenfosit, B lenfosit ve *natural killer (NK)* hücreleridir ve bu üç lenfosit alt grubu aynı morfolojiye sahiptir. Bununla birlikte, B lenfositler plazma hücrelerine dönüşebilmektedir ve plazma hücreleri diğerlerinden farklı bir morfolojiye sahiptir (80).

Her üç lenfosit alt grubu, ortak lenfoid progenitor hücreden köken almaktadır. Ardından bu hücre T/NK prekürsörü ve B lenfosit prekürsörü meydana getirmekte ve bu prekürsörlerden de ilgili hücre serileri oluşmaktadır. Anlaşıldığı gibi, T lenfosit ve NK ortak bir prekürsörden, B lenfosit ise farklı bir prekürsörden köken almaktadır. Fetal hayat boyunca T hücrelerinin olgunlaşması ve seçimi öncelikli olarak timusta gerçekleşirken, B hücrelerinin kemik iliği ve periferik lenfoid organlarda meydana gelir (68).

İlk tanınabilen B hücresi progenitor B hücresi (pro-B hücresi) olup sitoplazmik veya yüzeye bağlı immunoglobulin içermez. Bu hücre, gen yeniden düzenlenmesi ile immunoglobulin üretebilen pre-B hücresine dönüşür. Pre-B hücreleri ise yüzeye bağlı immunoglobulin eksprese edebilen olgun naif B lenfositleri meydana getirir. Olgun B lenfositler; primer lenfoid folliküllerde, follikülün manto bölgesinde ve dolaşımda bulunmaktadır. Farklılaşmanın ikinci aşamasında B hücreleri antijenle etkileşime girer, T lenfosit ve makrofajların varlığında değişime uğrar. Bu olay, lenfoid follikülün germinal merkezinde meydana gelmektedir. Sonuçta immunoglobulin salgılayan plazma hücrelerine ya da aynı antijenle karşılaştığında oluşan hızlı humoral yanıtı sağlayan *memory* hücrelerine dönüşür (68).

T lenfositlerin farklılaşması için timusun mikroçevresine ihtiyacı vardır. Kemik iliğinden ya da fetal karaciğerden köken alan progenitor T hücreleri (pro-T hücreleri), T hücre reseptörü (TCR) gen düzenlenmesinin gerçekleştiği ve dolaşıma verilmek üzere fonksiyonel olarak olgun T lenfositlerin olduğu timusa ve periferik veya sekonder lenfoid organlara göç eder. Olgun T lenfositler, timusun medullasında pre-T hücrelerinden meydana gelir. T hücrelerinin olgunlaşma süreci komplekstir. Bu aşamalar üç evrede incelenebilir. Öncelikler Pro-T hücreleri, kemik iliği veya karaciğerden timusun korteksine göç eder. İkinci aşamada, bu hücreler subkapsüler korteksten iç kortekse ve ardından da medullaya göç eder. Bu süreç boyunca, yabancı antijenleri tanıma yeteneği olan T lenfositler kalır ve vücudun kendi antijenini tanıyanlar ortadan kaldırılır (68).

NK hücreleri timusta gelişebilmekle birlikte, bu hücrelerin farklılaşması için timik çevreye ihtiyacı yoktur. NK hücreleri sekonder lenfoid dokular ve kemik iliğinde de gelişebilmektedir (68).

Lenfositler, genel olarak, spesifik sitoplazmik granülleri olmayan hücrelerdir. Küçük lenfositler, yaklaşık olarak RBC boyutundadır ya da biraz daha büyüktür (6-10 μm). Tipik bir lenfosit, sınırları belirgin genellikle yuvarlak bir adet çekirdeğe sahiptir. Çekirdek bazen bir tarafından girintili olabilir. Büyük lenfositler ise, 12-15 μm çapında, daha az yoğun boyanan bir çekirdeğe, daha fazla sitoplazmaya sahip hücrelerdir. Özellikle çocukların kanında olmak üzere kanda sıklıkla bulunur ve monositlerden ayrımı güç olabilir. Büyük lenfositlerin üçte birinin sitoplazmasında birkaç kırmızı-mor granül bulunur. Bu granüller, nötrofilin sitoplazmasındakilerden daha büyüktür. Boyut olarak küçük ve büyük lenfositler arasında bulunan pek çok hücre vardır ve aslında küçük, büyük lenfositler ve blast formlar birbirlerine dönüşebilmektedir. Bu nedenle lenfositleri küçük ve büyük olarak sınıflamak anlamlı değildir (72). Lenfosit sitoplazmasında fosforilaz, asit hidrolaz, nükleaz ve mitokondriyal enzimler gibi birçok enzim bulunur. Peroksidaz reaksiyonları, lenfositlerde negatiftir (80). Plazma hücreleri, bol sitoplazmaya, ekzantrik yerleşimli yuvarlak bir çekirdeğe ve çekirdeğe komşu berrak bir zona sahiptir (68). NK hücreleri ise baskın olarak büyük granüler lenfositlerdir (81).

Lenfositler, erişkinlerde tüm WBC'lerin ortalama %34'ünü oluşturur (72). Kanda dolaşan lenfositlerin büyük çoğunluğu T lenfositlerdir ve aylardan yıllara kadar değişen yaşam sürelerine sahiptir. B hücreleri daha ufak bir popülasyonu (lenfositlerin %10-20'si) oluşturur ve olasılıkla günlerle ölçülebilen kısa yaşam sürelerine sahiptir (68).

B lenfositler ve plazma hücreleri, glikoprotein yapıdaki immunoglobulinleri üretir ve bu moleküllerin ana fonksiyonu antijen bağlamak olduğundan reseptörler olarak nitelendirilebilir. Bir kişi, her biri farklı antijen bağlama spesifitesine sahip 10-100 milyon farklı immunoglobulin molekülü sentezleyebilir. Humoral immun sistemdeki bu büyük çeşitlilik, normal şartlarda çevremizde doğal olarak bulunmayan sentetik moleküller de dahil olmak üzere birçok maddeye karşı spesifik antikorlar oluşturmayı sağlar. Antikorum antijene bağlanması, kompleman aktivasyonu ve/veya immun komplekslerin WBC'lerde bulunan reseptörlere bağlanması gibi biyolojik açıdan önemli işlevlerin meydana gelmesini sağlar. Bu işlevlerin sonucu olarak da yabancı madde parçalanır ve temizlenir (82).

İmmunoglobulinlerden farklı olarak, T hücre reseptörleri, genellikle peptidler olmak üzere antijenlerin ufak parçalarını tanır. Bu antijenik parçalar, diğer bir hücrenin *major histocompatibility complex (MHC)* moleküllerinin peptid bağlayan bir bölgesine yerleşmiştir. T hücresi, immün tanıma için diğer hücre ile arasında intrasellüler etkileşimlere gereksinim duymaktadır ve bu diğer hücre bazen antijen sunan hücre olarak adlandırılmaktadır. T hücresinin cevabı, T hücre reseptörünün bağlanmasıyla meydana gelen sinyalin yoğunluğuna bağlıdır. Ayrıca, bu sinyal, antijen sunan hücrenin membranında bulunan yardımcı moleküllerin diğer T hücre reseptörlerine eş zamanlı olarak bağlanmasıyla modifiye olmaktadır. Bu nedenle, T hücrenin immün tanınması, immün aktivasyon ve T hücre çoğalmasından spesifik T hücre toleransı ve/veya programlanmış hücre ölümüne kadar geniş bir aralıkta sonuçlanabilir (83). T hücreleri, genel olarak, hücre aracılı sitotoksik reaksiyonlardan, gecikmiş hipersensitiviteden sorumlu olup immün cevabı düzenleyen sitokinler üretir ve B hücreleri için *helper* aktivitesi gösterir (84).

NK hücreleri, dış uyarana önceden sensitize olması gerekmeden karşılık verme yeteneğine sahip olduğundan, enfeksiyöz mikroorganizmalara veya bazı durumlarda neoplastik hücrelerin varlığına hızlı bir şekilde tepki verebilir. Bu hücreler, fagositik hücrelerle birlikte doğuştan gelen veya doğal savunmanın efektörleridir. Ayrıca bu hücreler, erken immün cevap boyunca enfeksiyöz ajanlarla ve antijenlerle etkileşime girerek, antijen sunan hücreler, B ve T hücrelerinin fonksiyonları üzerinde hem uyarıcı hem de inhibe edici etkileri vardır. NK hücrelerinin hematopoezde de düzenleyici etkilere sahiptir (81).

2.3.3 PLT

PLT'ler, RBC'lerle ortak progenitor hücre olan *colony forming unit- megakaryocyte-erythroid (CFU-MegE)*'den meydana gelen *colony forming unit- megakaryocyte (CFU-Meg)* progenitor hücresinden köken alır. Bu hücrenden ise bu seriye ait tanınabilen ilk hücre olan megakaryoblast meydana gelir. Sırasıyla; promegakaryosit ve granüler megakaryosit evrelerinin ardından olgun megakaryosit oluşur. Megakaryosit gelişimi, nükleer bölünmenin olduğu ve sitoplazmik bölünmenin gerçekleşmediği endomitozla karakterizedir. Bu nedenle megakaryositler loblu bir nukleusa sahiptir (68).

PLT oluşumu, kompleks bir süreçtir. Megakaryositler, invajine olmuş yüzey membranı oluşturur. Bunun amacı, *proplatelet* olarak adlandırılan megakaryositlerin oluşturduğu

dallanan pseudopodal çıkıntılar için membran rezervi oluşturmaktır. *Proplatelet* oluşumunda ve granül ve organel bileşenlerinin bu yapılara taşınmasında mikrotubul aktivitesi önemli rol oynamaktadır. PLT'ler, bu yapıların uç kısımlarından oluşturulup mikrotubul aktivitesi ile megakaryositten salınır (68). Dolayısıyla, PLT'ler çekirdek içermeyen hücre parçacıklarıdır (85).

Ortalama PLT çapı bireyler arasında farklılık göstermekle birlikte yaklaşık 1,5-3,0 µm arasında değişmektedir. Oval veya yuvarlak şekilli ve Wright boyasıyla kırmızı-mor granüller içeren yapılardır. PLT'ler, α-granüller ve “dense granüller” olmak üzere iki çeşit granül içerir. α-granüller, PLT'de en fazla bulunan (PLT başına 50-70) granüllerdir. Bu granüller; β-TGB, *PLT faktör 4 (PF4)*, proteoglikan, *von Willebrand factor (vWF)*, multimerin ve faktör V içermektedir. Dense granüllerde ise yüksek miktarda kalsiyum, serotonin, adenosin difosfat (ADP) ve adenosin trifosfat (ATP) bulunmaktadır. Bu granüller ayrıca, pirofosfat, guanozin difosfat (GDP) ve magnezyum da içermektedir (85).

PLT'lerin kandaki referans aralığı sağlıklı erişkinlerde 172000 – 450000 adet/µL'dir(72). Yeni salınan PLT'ler; daha büyük, metabolik olarak daha aktif ve hemostatik açıdan daha etkilidir. PLT'ler dolaşımda sabit bir konsantrasyonda bulunur (275000 adet/µL). Herhangi bir zamanda PLT'lerin üçte ikisi dolaşımdayken üçte biri dalakta bulunur. PLT'ler dolaşımda 8-10 günlük bir yaşam süresine sahiptir (68).

PLT'ler, kan damarlarının bütünlüğünün sürdürülmesinde, zedelenen kan damarlarından kan kaybını önlemek için hemostatik tıkaçların oluşturulmasında ve plazma faktörlerinin pıhtılaşma işlevinin desteklenmesinde görevlidir (68). PLT pıhtılaşma aktivitesi; PLT yüzeyindeki negatif yüklü fosfolipidlerin açığa çıkarılması, PLT mikropartiküllerinin üretimi, PLT faktör V'in salınması ve aktivasyonu ve olasılıkla aktive olmuş pıhtılaşma faktörleri için reseptörlerin açığa çıkarılmasından kaynaklanır. PLT aktivasyonu ile birlikte, membran ve PLT içi iskeletin kompleks reorganizasyonu ile PLT'ler şekil değiştirir. Ayrıca; α-granüller, *dense body*'ler ve lizozomal içerik dış ortama salınır. Aktivasyon süreci, arasında ADP, epinefrin, trombin, kollajen, tromboksan A2, vazopressin, serotonin, PAF, lizofosfatidik asit, sfingozin-1-fosfat ve fosfoinozid metabolizması, trombospodin gibi agonistler ve arasıdonik asit salınımı ve tromboksan A2 oluşumu, birçok hedef proteinin fosforillenmesi gibi sinyal transdüksiyon yolları için reseptörler gerektirir. PLT aktivasyonu ile birlikte hücre içi kalsiyum artar ve bu artış daha sonra aktivasyona katkıda bulunur. PLT aktivasyonu;

glikoprotein IIb-IIIa reseptöründe konformasyonel değişiklik ve PLT aggregasyonu ile sonuçlanır (85).

Tüm bu kan hücrelerine ve onlarla ilişkili parametrelere ait ortalama değerler ve referans aralıkları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1 : Kan sayımı parametreleri ortalama değerleri ve referans aralıkları (72).

Parametre	Kadın	Erkek
WBC sayısı, adet/ μ L kan	7800 (4400 - 11300)	
RBC sayısı, adet/ μ L kan	5210000 (4520000 - 5900000)	4600000 (4100000 - 5100000)
Hb, g/dL kan	15,7 (14,0 - 17,5)	13,8 (12,3 - 15,3)
Hematokrit (HCT), (%)	46 (41,5 - 50,4)	40,2 (35,9 - 44,6)
Ortalama RBC hacmi (MCV), fL/RBC	88,0 (80,0 - 96,1)	
Ortalama RBC Hb’i (MCH), pg/RBC	30,4 (27,5 - 33,2)	
Ortalama RBC Hb konsantrasyonu (MCHC), g/dL RBC	34,4 (33,4 - 35,5)	
RBC dağılım genişliği, %Coefficient of variation (CV)	13,1 (11,6 - 14,6)	
PLT sayısı, adet/ μ L kan	311000 (172000 - 450000)	

2.4 HEMOLİZ

Hemoliz in vivo ve in vitro olmak üzere iki başlık altında incelenebilir :

2.4.1 İn Vivo Hemoliz

İn vivo hemoliz, vücutta gerçekleşen hemolizdir ve dolaşımda gerçekleşirse intravasküler, dolaşım dışında gerçekleşirse ekstravasküler hemoliz olarak adlandırılır (86).

Normalde yaşam süresini tamamlayan RBC’lerin yıkımı ekstravasküler ve intravasküler olmak üzere iki şekilde meydana gelir. Ekstravasküler yıkım, normalde RBC’lerin yıkımında baskın olan tiptir ve özellikle dalak ve karaciğerdeki makrofajlar tarafından gerçekleştirilmektedir (74). İntravasküler yıkım ise, daha az sıklıkta görülür ve RBC membranlarının dolaşım sırasında parçalanmasıyla meydana gelir (8,74).

Bazı hastalıklarda RBC'lerin yaşam süresi kısalmır, kemik iliği yıkılan hücrelerin yerini dolduramaz ve bu durum anemi ile sonuçlanır. Hemolitik anemi adı verilen bu hastalık grubunda RBC'ler, makrofajlar tarafından ekstravasküler olarak yıkılabilir (ekstravasküler hemoliz) ya da daha az sıklıkla membranları dolaşım sırasında parçalanır (intravasküler hemoliz) (8). Hemolitik anemilere neden olan 200'den fazla neden tanımlanmıştır. Bu nedenler genel olarak RBC membran defektleri, anormal Hb'ler, RBC'nin enzimatik defektleri, RBC'lerin immün yıkımı, ilaçların neden olduğu toksik ve immün etkiler, mekanik hasar ve hipersplenizmi içermektedir (17).

İn vivo hemolize yol açan başlıca nedenler Tablo 2'de özetlenmektedir :

Tablo 2 : İn vivo hemolize yol açan başlıca nedenler (17).

Kalıtsal hemolitik anemiler

1. Hb üretim bozuklukları
 - a. Talassemiler
 - b. Orak hücreli anemi
2. RBC membranı üretim bozuklukları
 - a. Herediter sferositoz
 - b. Herediter eliptositoz
 - c. Paroksizmal nokturnal hemoglobinüri
3. RBC metabolizması bozuklukları
4. Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz eksikliği
5. Pirüvat kinaz eksikliği

Kazanılmış hemolitik anemiler

1. İmmun-aracılı nedenler
 - a. Mycoplasma pneumonia enfeksiyonu (soğuk aglutinin hastalığı)
 - b. Otoimmün hemolitik anemi
 - c. Otoimmün hastalıklar (sistemik lupus eritematozus ve kronik lenfositik lösemi)
 2. Hipersplenizm
 3. Yanıklar
 4. Enfeksiyonlar
 - a. Malaria
 - b. Babesiosis
 - c. Clostridium
 5. Dolaşımda meydana gelen mekanik hasar
 - a. Yaygın intravasküler koagülasyon
 - b. Hemolitik üremik sendrom
 - c. Trombotik trombositopenik purpura
 - d. Prostetik kalp kapakları
 - e. HELLP sendromu (hemoliz, karaciğer enzim yüksekliği ve PLT düşüklüğü)
 6. Farklı kan grubundan kan transfüzyonu
 7. İlaçlar, toksinler ve diğer nedenler
-

Hemolitik sürecin klinik önemi, hemoliz başlangıcının ani olup olmaması ve RBC yıkımının derecesi ile ilişkilidir. Hafif hemolizi olan hastalar asemptomatik olabilirken, ciddi olgularda anemi hayatı tehdit edici olabilir ve bu tabloya dispne, anjina ve pulmoner dekompanzasyon eşlik edebilir (17).

2.4.2 İn Vitro Hemoliz

Örneğin alınmasından analizine kadar olan süreçte meydana gelen çeşitli preanalitik nedenlerden kaynaklanan hemoliz in vitro hemoliz olarak adlandırılmaktadır (10). İn vitro hemoliz, hem yatan hem de ayakta hastalardan acil ve rutin olarak gelen uygunsuz örneklerin en önde gelen sebebidir (2,7,38,41).

Biyolojik nedenlerin aksine, in vitro hemoliz örneğin alınma, taşınma ve işlenmesi sırasında meydana geldiğinden dolayı çoğu durumda önlenemezdir (10). İn vitro hemolizin olası nedenleri Tablo 3'te özetlenmektedir:

Tablo 3 : İn vitro hemolizin olası nedenleri (17).

1. Hastaya bağlı nedenler

- a. Frajil veya zor venler
- b. Ven bölgesinin elverişsiz olması
- c. Hematom, lenfödem ve travma bölgelerinden kan alımı

2. Kanı alan kişiye bağlı nedenler

- a. Kan alma becerisinin yetersiz olması
- b. Doğru kan alma uygulamaları ile ilgili bilgi yetersizliği

3. Örnek alımı ile ilgili nedenler

- a. Uzamış turnike uygulaması (örneğin; >3 dakika)
- b. Antiseptik çözeltilerin kan alma bölgesinden yeterince uzaklaştırılmaması
- c. Vene başarısız ve/veya tekrarlayan girişimler
- d. Küçük çaplı iğnelerin kullanılması (örneğin; <22 gauge)
- e. Uygun olmayan gereçlerle kan alımı
- f. Kan alma sırasında kullanılan sistem içinde kanın kısmi tıkanıklık yaratması ve/veya pıhtılaşması
- g. Travmatik kan alımı
- h. Kan alımı sırasında venin kaçırılması
- i. Tüpün gereğinden az ya da fazla doldurulması

4. Örnek işlenmesi ile ilgili nedenler

- a. Katkı maddesi içeren tüplerin uygunsuz şekilde karıştırılması (örneğin; antikoagülan içerenler)
- b. Tüpün şiddetli bir şekilde çalkalanması
- c. Enjektör ile alınmış kanın primer tüpe tazyikli bir şekilde aktarımı

5. Örneğin taşınması ile ilgili nedenler

- a. Uygun olmayan taşıma yöntemi (örneğin; pnömotik tüplerin kullanımı veya kuryeler)
- b. Uygun olmayan taşıma koşulları (sıcaklık, süre, nem)
- c. Gecikmiş santrifügasyon

6. Örneğin işlemlenmesi ile ilgili nedenler

- a. Uygun olmayan santrifügasyon koşulları (hız, süre ve sıcaklık)
- b. Serum veya plazma ile hücreler arasındaki bariyerin zayıf olması
- c. Santrifügasyon sonrası örneğin tekrar döndürülmesi

7. Örneğin saklanması ile ilgili nedenler

- a. Uygun olmayan saklama koşulları (örneğin; süre ve sıcaklık)
 - b. Tam kan örneklerinin dondurulup çözülmesi
-

Tablo 3'te de görüldüğü gibi, in vitro hemolize yol açan etkenler, hasta başında başlamakta ve örneğin analizine kadar olan süreç boyunca devam etmektedir (10). Listelenen nedenler arasında hemolize yol açanların çoğu laboratuvarın kontrolünün dışında gerçekleşmekle birlikte, uygunsuz örnekler ve yanlış test sonuçlarından hatalı bir şekilde laboratuvarlar sorumlu tutulmaktadır (8,37).

2.4.3 Hemolize Yol Açan Nedenler

2.4.3.1 Kan Alımı İle İlişkili Hemoliz Nedenleri

Özellikle RBC'ler olmak üzere tüm kan hücreleri fragil hücrelerdir ve mekanik travma, ozmotik şok (izotonik olmayan sıvılara maruziyet), düşük ve yüksek sıcaklıklara (örneğin; laboratuvara taşınma aşaması) maruz kaldıklarında parçalanmaya eğilimlidirler. Dolayısıyla kan alımı sırasında travmatize olan ven, ilk tüpe alınan kanın hemolizli olmasına yol açabilir fakat ardından örnek alınan tüplerde böyle bir sorun yaşanmaz. Ayrıca hızlı aspirasyon da iğne boyunca meydana gelen fiziksel kuvvetler ve türbülans nedeniyle hemolize neden olmaktadır. Antekübital bölge dışında bulunan venler (örneğin; el venleri), hassas ve kolaylıkla travmatize olduğundan bu bölgelerden elde edilen örneklerin hemolizli olma ihtimali daha yüksektir (8).

Kan alım işlemi sırasında antiseptik amaçlı kullanılan alkol kurumadan örneğin alınması da diğer bir hemoliz nedenidir. Bu durum, alkolün RBC membranına yapışarak hücrenin parçalanmasına neden olmasından kaynaklanmaktadır (8,87).

Kan alınan tüplerin eksik doldurulması, hemolize neden olan faktörlerdendir. Buradaki mekanizma, özellikle EDTA olmak üzere tüpte bulunan katkı maddelerinin örneğin azlığından dolayı yüksek konsantrasyona ulaşması ve RBC membranının yırtılmasına yol açmasıdır (10). Yanlış tüpe kan alımı da kimyasal ve fiziksel etkilerden dolayı hemolize neden olabilmektedir (8).

Kan alımı sırasında karşılaşılan başka bir hemoliz sebebi, uzun süre (örneğin 3-5 dakika üzerinde) turnike uygulanmasıdır (8). Saleem ve arkadaşları yaptıkları çalışmada turnike süresinin bir dakikanın üzerinde olmasının hemolizle ilişkili olduğunu öne sürmüşlerdir (88). Oluşan uzamış venöz stazın hemolize nasıl yol açtığı tam olarak bilinmemekle birlikte, hemokonsantrasyon ve hücre içindeki su dengesinde değişikliğe neden olarak RBC ve PLT'lerin parçalanmasına yol açabileceği tahmin edilmektedir. Turnike kullanımına bağlı

olmaksızın yumruk sıkılıp açılması da RBC'lerin hasarlanmasına neden olarak hemolize yol açabilmektedir (8).

Kan alımı sırasında kullanılan gereçler de bu konuda önem taşımaktadır. Vakumlu tüp sistemleri, laboratuvar analizi için iyi kalitede örneklerin elde edilmesi açısından kullanışlı gibi görünmektedir (8,89–91). Bununla birlikte; intravenöz kateterler, enjektörler, küçük çaplı iğneler ve kelebek setler gibi gereçlerle kan alımı hemolize yol açmaktadır. İntravenöz kateteri olan hastaların kateterlerinden kan alımı; hasta ve kan alan kişi açısından daha güvenli olması, ek maliyet gerektirmemesi, hasta konforu açısından daha uygun olması gibi nedenlerden dolayı tercih edilmektedir (8). Özellikle acil servislerde zaman kazandırmasından dolayı intravenöz kateterden kan alımı hastaya kateter ilk olarak takıldığında gerçekleştirilmektedir (92). Bununla birlikte, bu gereçler ile kan alımının hemolize neden olduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir (93–96). Bundan sorumlu tutulan başlıca mekanizma, biaksiyal gerilim eşiğinin aşılmasıdır. Bu durum ise hücre membranının porlarından hücre içeriğinin dışarı kaçışı ya da membranın parçalanmasıyla sonuçlanır. Ayrıca, kanın bu araçların içinde farklı çaplardan ve açılardan geçişinden kaynaklanan türbülans da hemoliz oluşumunda rol almaktadır. Bu kateterlerden elde edilen hemolizli örnekler ise; tekrarlayan kan alımlarına, tedavide gecikmelere, hasta memnuniyetinin azalmasına ve bakım maliyetlerinin artmasına neden olabilmektedir. Kan alırken kullanılan enjektörler, ven içine uygulanan vakum ya da basıncı kontrol edebilme imkanı sağlaması başlıca avantajıdır (8). Bununla birlikte, bu gereçler kullanılırken uygulanan aşırı vakum ve pistonuna uygulanan fazla güç, makaslama kuvvetleri oluşturmakta ve hemolize neden olmaktadır (89,90). Bu gereçlerin, hemolize neden olduğu vakumlu tüp sistemleri ile karşılaştırıldığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (89–91). Kan alımında enjektörler, intravenöz kateterler gibi gereçlerle kullanılan iğneler, *gauge* birimine göre derecelendirilmektedir ve bu değer iğnenin iç çapı ile ters orantılıdır (97). İğne çapının küçük olması, kanı büyük bir kuvvetle küçük bir delikten geçmeye zorladığından hemolize neden olabilmektedir (98). Lippi ve arkadaşları, 25-*gauge* veya altı olan iğnelerle kan alımı ile hemolizle ilişkili olan potasyum ve diğer analitlerin artışı arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptamışlardır (99,100). Bu yazarlar, 25-*gauge* veya altı gibi küçük çaplı iğnelerin yenidoğanlar ve venöz giriş sorunu olan hastalar için kullanılmasını önermektedirler (99). Büyük çaplı iğneler (örneğin 18 *gauge*'tan büyük)'in kullanımı da venin hasarlanmasına yol açabilmesi ve fazla miktarda kanın tüpe daha hızlı ve kuvvetli girebilmesinden dolayı

hemolize neden olabilmektedir (8,98). Bu nedenle kan alımı için standart gauge iğnelerin (örneğin; 19-gauge ve 21-gauge arası) kullanımı önerilebilir. Kan alımında kullanılan kelebek setler, esnek plastik kanatlara takılı bir iğne ve bu kanatların arka tarafından uzanan bir boru sistemine sahip gereçlerdir (8). İğneleri ince olduğundan (21-gauge veya 23-gauge) pediatrik veya küçük ve frajil venleri olan hastalarda tercih edilmektedir (97). Fakat bu gereçlerin pahalı olması ve tüpün yeterince doldurulamaması, hemoliz gibi nedenlerle laboratuvar analizi açısından uygunsuz örneklerle yol açması dezavantajları arasındadır (8). Lippi ve arkadaşları bu gereçlerle klasik iğneleri karşılaştırdıkları çalışmalarında birkaç test sonucunda anlamlı bir farklılık tespit etmekle birlikte iki yöntem arasında hemoliz açısından istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık saptamamışlar ve belli durumlarda uygun bir teknik kullanıldığında kelebek setlerin klasik iğnelere güvenilir bir alternatif olabileceği sonucuna varmışlardır (100).

Kan örneğini alan kişinin becerisi ve kan alma konusundaki eğitim düzeyi de bu konuda etkili bir faktördür (90,101,102). Ong ve arkadaşları, yaptıkları çalışmalarında kan alma eğitimi sonrasında hemoliz oranlarının azaldığını ortaya koymuşlardır (102).

Kan örneğinin enjektörden direkt olarak tüpe aktarımı da hemolize neden olabilmektedir (8,89,101). Bunun nedeni, pistonu uygulanan fazla güç nedeniyle kanın tüp içine kuvvetli bir şekilde girmesidir (8,101). Örneğin katkı maddesi içeren tüpe alınmasının ardından çalkalanması veya kuvvetli bir şekilde karıştırılması da hemolize yol açmaktadır (10,15,98,101). Doğru yöntem, tüpün yumuşak bir şekilde 8-12 kez alt üst edilmesidir (98,101).

2.4.3.2 Kan Örneğinin Taşınması ve Saklanması İle İlişkili Hemoliz Nedenleri

Uygun örnek taşınması, laboratuvar test sonucunun doğru ve zamanında elde edilmesinde büyük önem taşımaktadır. Örnek taşınmasında etkili olan sıcaklık, nem gibi faktörler, özellikle örneğin santrifüj edilmemiş olarak ve uzun mesafe ve/veya çok uzun süre taşındığı durumlarda kritiktir (8).

Örnek taşınması sırasında meydana gelen in vitro hemolizle ilişkili sorunların çoğu tam kan örneklerinin uzun mesafe taşınması sırasında meydana gelmektedir. Bunun nedeni, serum veya plazmanın kan hücreleri ile temasının hemolizi tetikleyebilmesidir (8).

Örnek taşınması sırasında meydana gelen diğer bir hemoliz nedeni ise örneğin maruz kaldığı mekanik travmadır. Bu durum özellikle örneklerle temasın arttığı durumlarda şiddetlenmektedir (8).

Örneklerin laboratuvara ulaştırılmasında kullanılan pnömotik tüp sistemlerinin test istemi ile test sonucunun çıkması arasındaki süreyi kısalttığı bilinmektedir (103,104). Bu sistemlerin örnek kalitesini etkilemediğini gösteren çeşitli çalışmalar mevcuttur (104–106). Bununla birlikte, bu sistemlerin kullanımının hemolize neden olduğunu gösteren çalışmalar da bulunmaktadır (107–110). Meydana gelen hemolizden sistemdeki açılanmalar, ani hızlanma ve yavaşlama, tüpün kısmen dolu olması gibi faktörler sorumlu tutulmaktadır (8,111). Farklı laboratuvarların farklı pnömotik sistem yapılandırması ve farklı örnek tiplerini kullanmalarından dolayı her laboratuvarın örneklerin hemoliz seviyelerini değerlendirmesi önerilmektedir (107,108).

Kan örneğindeki in vitro hemoliz, örneğin uzun süre veya uygun olmayan koşullarda (örneğin; çok sıcak veya çok soğuk) saklanması durumunda da meydana gelebilmektedir (8,66,98). Özellikle serum veya plazmanın uzun süre RBC'lerle temas ettiği durumlar hemolizle sonuçlanabilmektedir. Kan tüplerinin direkt olarak buzla veya soğuk jel paketleriyle teması da hemolize neden olabilmektedir. Hemolizden kaçınmak için tam kan örneklerine kesinlikle dondurup çözme işlemi uygulanmamalıdır (8,15,66).

2.4.3.3 Örneğin İşlenmesi İle İlişkili Hemoliz Nedenleri

Laboratuvara ulaşan antikoagülan madde içeren tüpler santrifüj edilerek plazma, içermeyenler santrifüj edilerek serum elde edilir. Plazma eldesi için herhangi bir bekleme süresine gerek olmazken, serum örneklerinin pıhtılaşması için santrifüj edilmeden önce 30 dakika beklenmelidir. Pıhtılaşma aktive edildiği takdirde bu süre daha kısadır (66). Kan örneğinin pıhtılaşma tamamlanmadan santrifüj edilmesi ya da antikoagülan tedavi alan hastaların kısmen pıhtılaşmış örneklerinin santrifüj edilmesi in vitro hemolize neden olmaktadır (15). Heparinle kontamine düz tüpe alınmış olan örnekler de, pıhtılaşmanın tamamlanamamasından dolayı hemolize yol açabilmektedir (8).

Santrifüj işleminin gecikmesi de bilinen in vitro hemoliz nedenlerinden biridir (112,113). Hücre membran bütünlüğünü bozabilmekte ve yanlış test sonuçlarına neden olabilmektedir (113,114).

Santrifüj hızının yüksek olması da hemolize neden olmaktadır. Bu durum büyük *gravity* (g) kuvvetlerine maruz kalındığında meydana gelen mekanik stresten kaynaklanmaktadır (115).

Tüpün içinde bulunan jel gibi mekanik bariyerlerin bütünlüğünün bozuk olması da tekrar santrifüj edilen örneklerde hücrelerin seruma geri kaçmasına ve dolayısıyla santrifüj sırasında parçalanmasına neden olabildiğinden hemolize yol açabilmektedir (8).

2.4.4 Hemolizin Laboratuvar Bulguları

İn vitro hemoliz, in vivo hemolize göre daha sık görülmekle birlikte in vivo hemoliz patolojik kökenli olması ve laboratuvar sonuçlarının hastalığın tanı, tedavi ve izlemi için gerekli olmasından dolayı önem taşımaktadır (15). Bu nedenle, in vivo hemoliz şüphesi olan olguların örneklerinin reddi, tıbbi kötü uygulamadır ve ölümle sonuçlanabilmektedir (15,116).

Bir hemolitik sendromdan şüphelenildiğinde, haptoglobin düşüşü ve laktat dehidrogenaz (LDH), indirekt bilirubin, retikülosit indeksi artışı hemolizin derecesine bağlıdır. Şiddetli hemolizde LDH, indirekt bilirubin ve haptoglobindeki değişiklikler 24 saat içinde gerçekleşir. Bununla birlikte, retikülosit indeksindeki değişiklik en erken iki gün sonra meydana gelir (15).

Kan hücrelerinden salınan ve intrasellüler konsantrasyonları ekstrasellüler konsantrasyonlarından 10 kat yüksek olan bileşenlerin serum konsantrasyonları, in vivo ve in vitro hemolizde önemli ölçüde artabilmektedir. Özellikle potasyum, LDH ve Aspartat transaminaz (AST) seviyeleri artmaktadır (15,66). Hemoliz durumunda serumla plazma arasında farklılık olan bileşenler parçalanmış kan hücrelerinden (özellikle PLT'lerden) kaynaklanmaktadır. Potasyum, nöron spesifik enolaz ve asit fosfataz bunlara örnek olarak verilebilir (14,15,66).

Plazma haptoglobin azalması, hemoliz bölgesinden bağımsız olarak in vivo RBC parçalanmasının hızlı tanınmasında güvenilir bir belirteç olarak görülmektedir. Diğer olası belirteçlerden farklı olarak haptoglobin seviyeleri in vitro hemolizden etkilenmemektedir. Bunun nedeni, RBC yıkımı sonrasında dolaşımda meydana gelen haptoglobin-Hb komplekslerinin monositler ve doku makrofajları tarafından *Cluster of Differentiation 163* (CD163) reseptörleriyle hızlıca dolaşımdan uzaklaştırılmasıdır. Haptoglobin, çoğu klinik

kimya cihazında ölçülebilmektedir ve bu nedenle hem acil hem de rutin uygulama için uygundur. Dolayısıyla in vivo hemolizin in vitro hemolizden ayrımı gerektiği durumlarda laboratuvarda analizi yapılabilen değerli bir belirteçtir. Haptogloblin ölçümünde önemli bir nokta, bazı immunolojik yöntemlerin haptogloblin-Hb kompleksi ile serbest haptogloblini ayırt edebilme yeteneğinin farklılık göstermesidir. Ayrıca, haptogloblin akut faz reaktanı olduğundan, eşlik eden enfeksiyonlar, diğer reaktif durumlar ve kronik hemoliz doğru bir şekilde dışlanmalıdır (8).

Retikülositoz hemolitik anemilerde sık görülmekle birlikte spesifik değildir. Çünkü RBC üretiminin artışı, kan kaybı veya demire kemik iliği yanıtı, B12 vitamini ve folik asit eksiklikleri ile ilişkilidir. Ayrıca kemik iliği baskılanmış olan hastalarda süregelen şiddetli hemolize rağmen referans aralığa yakın olabilmektedir. Yüksek MCH ve MCHC değerleri, sferositozu akla getirebilmektedir. Serum LDH artışı hemolizde yaygındır fakat hemolize spesifik değildir. Bu enzim, vücudun her yerinde bulunur ve vücudun herhangi bir yerinde bulunan iskemik veya neoplastik hücrelerden de salınır. LDH-1 ve LDH-2 izoenzimleri RBC yıkımına daha spesifiktir fakat bu izoenzimler hasarlanmış miyokarddan da salınır. İn vivo hemolizli hastalarda indirekt bilirubin artışı gözlenir fakat bu parametrenin artması, *Gilbert* sendromunun tanısında da önemli bir özelliktir (8).

İdrarda Hb varlığı, intravasküler hemolizde meydana gelir ve bu durum fHb konsantrasyonu kanda dolaşan haptogloblin kapasitesini aştığında ortaya çıkar. Hemogloblinüri koyu renkli bir idrara neden olur; fakat porfiri, miyogloblinüri gibi başka durumlar da bu görüntüye yol açabilir (8).

Birlikte ele alındığında; yüksek LDH ve düşük haptogloblin, hemoliz tanısında ve in vivo ve in vitro hemolizin ayırt edilmesinde en etkili ve yaygın testlerdir (8). Ayrıca Blank ve arkadaşları, artmış LDH aktivitesi ile referans aralıktaki potasyum değerlerinin öncelikli olarak in vivo hemolizi gösterdiğini öne sürmüştür (21). İntravasküler hemoliz sırasında kan hücrelerinden salınan potasyum genel olarak tüm vücut sıvılarına dağılır ve bu durum hemoliz nedeniyle kana salınan potasyumun artan konsantrasyonunu bu şekilde azaltır. Böbrekler de potasyum fazlalığını erken dönemde uzaklaştırır. LDH ise, daha büyük bir molekül olduğundan vasküler boşlukta daha uzun süre kalır ve klirensi daha yavaştır (8,21).

İN vivo hemolizden şüphelenildiği durumlarda, klinik öykü, fizik muayene, periferik kan yayması ve tam kan sayımı gibi laboratuvar analizleri hemolizin etyolojisini saptamak

için gereklidir. Tam kan sayımı, anemi ve WBC anormalliklerinin tanısında yardımcı olur, PLT sayısı ise altta yatan bir enfeksiyonu veya hematolojik bir maligniteyi dışlayabilir, çünkü hemolitik anemilerde PLT sayısı genellikle referans aralık içindedir. Trombositopeni; sistemik lupus eritematozus, kronik lenfositik lösemi, ve mikroanjiyopatik anemide meydana gelebilir (8). Periferik kan yaymasında hemolizi akla getiren bulgular; poikilositoz, orak hücreler, şistozitler ve sferositlerdir (86). Bu tetkikle ayrıca hemolizle ilişkili altta yatan bir hematolojik malignite (örneğin, kronik lenfositik lösemi) ortaya konabilir (8).

RBC indeksleri de tanıda yararlıdır. MCV ve MCH'nin düşük seviyeleri, kronik intravasküler hemoliz sonucu meydana gelebilen mikrositer hipokrom anemi ile ilişkilidir. Yüksek MCV ise genellikle megaloblastik anemi ve karaciğer hastalıklarından kaynaklanan makrositik anemi ile ilişkilidir. Direkt Coombs testi, otoimmün hemolitik anemisi olan hastalarda genellikle pozitifdir fakat olguların %10'una kadar negatif olabilir (8).

2.4.5 Klinik Biyokimyada Hemolizin Neden Olduğu İnterferansın Mekanizmaları

Hemolizli örneklerdeki interferans, Hb ve diğer intrasellüler içeriğin çevre sıvıya geçmesine dayanır. Burada, üç interferans mekanizması rol oynamaktadır: (a) Analitlerin intrasellüler ve ekstrasellüler konsantrasyon farklarından kaynaklanan interferans, (b) Kimyasal interferans ve (c) Spektrofotometrik interferans (8).

2.4.5.1 Analitlerin İnterasellüler ve Ekstrasellüler Konsantrasyon Farklarından Kaynaklanan İnterferans

Bir analit, kan hücresi içinde daha yüksek konsantrasyonda ise hücre içeriğinin plazmaya karışması ile konsantrasyonu artar; daha düşük konsantrasyonda ise plazma dilüe olarak konsantrasyonu düşer (117).

Kan hücrelerinden salınan ve intrasellüler konsantrasyonları ekstrasellüler konsantrasyonlarından 10 kat yüksek olan bileşenlerin serum konsantrasyonları, in vivo ve in vitro hemolizde önemli ölçüde artabilmektedir. Özellikle potasyum, LDH ve AST seviyeleri artmaktadır (15,66). Hemolizde meydana gelen magnezyum ve fosfor düzeylerindeki artış da intrasellüler konsantrasyonlarının ekstrasellülerlere göre çok daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır. Bununla birlikte, magnezyumun intrasellüler konsantrasyonu plazma değerinden yaklaşık 3 kat fazla olduğundan klinik olarak anlamlı bir etki oluşturabilmesi için

hemoliz şiddetinin fazla olması gerekmektedir (118). RBC'ler, yüksek konsantrasyonlarda organik fosfat esterleri içermektedir ve hemoliz durumunda bu esterler plazma fosfatazları tarafından hidroliz edildiğinden hemolizli örneklerde inorganik fosfat konsantrasyonları artmaktadır (8).

Demir ile ilgili hemoliz interferansı konusu ilginçtir ve sorun teşkil etmektedir. Bir mikromol Hb monomeri bir mikromol demir içermektedir. Dolayısıyla hemolizli örnekte yüksek miktarda fHb'nin bulunduğu durumda demir seviyesinde fazla artış beklenmektedir. Bilinmeyen nedenlerle bazı demir ölçüm yöntemleri bu tür bir biasa diğerlerinden daha az sensitiftir ve zaman zaman negatif bir bias bile göstermektedir. Grafmeyer ve arkadaşları, bu durumun reaksiyon ortamının pH'sı, kullanılan deterjan ve spektral interferansla ilişkili olabileceğini belirtmişlerdir. Özellikle demir Hb molekülünden salınmadığı takdirde interferans optiktir ve örnek körü kullanılarak ortadan kaldırılabilir. Aksine, demir Hb moleküllerinden salındığı durumda ise meydana gelen interferans demir seviyesinin artmasıyla sonuçlanmaktadır (118).

Hb'nin bir protein olmasından dolayı, hemolizli örneklerde serbest formda bulunduğundan total protein seviyelerinde artışa neden olmaktadır (8,15).

RBC'ler kanda en fazla sayıda bulunan hücre olduğu için hemolizde RBC'lerin katkısının önemli olduğu bilinmektedir ve hatta hemoliz eritrosit lizisi ile özdeşleştirilmektedir (10–12). Hemoliz durumunda serumla plazma arasında farklılık olan bileşenler parçalanmış kan hücrelerinden (özellikle PLT'lerden) kaynaklanmaktadır. Potasyum, nöron spesifik enolaz ve asit fosfataz bunlara örnek olarak verilebilir (14,15,66).

Bu interferans mekanizması kullanılan yöntemle ilişkili olmadığından, bu şekilde meydana gelen interferans etkisinin dışlanması mümkün değildir (8).

2.4.5.2 Kimyasal İnterferans

Kan hücrelerinin bileşenleri, direkt veya indirekt olarak analitlerin ölçümünü interfere edebilir (119). Hemolizin neden olduğu kimyasal interferans, esas olarak Hb moleküllerinin pseudoperoksidaz aktivitesinden kaynaklanmaktadır (14,15,17). Bu etkisini özellikle bilirubin ölçümünde göstermektedir (bilirubinin saptanmasında deazotizasyonun inhibisyonu) (120). Reaksiyon boyunca pH değiştikçe Hb, hematin ya da methemoglobine dönüşebilir ve ölçülmüş olan bilirubin, Hb peroksidaz tarafından ortadan kaldırılabilir. Bu nedenle

Jendrassik-Gróf yöntemi kullanılarak yanlış düşük bilirubin sonuçları tipik olarak gözlenir, çünkü Hb'nin pseudoperoksidaz aktivitesi azo boyasının oluşumunu inhibe eder (inhibisyon tipik olarak serum veya plazma serbest fHb konsantrasyonu 80 mg/dL'yi aştığında gözlenir) (8,117). Yenidoğan topuk kanı örneklerinde, normal yenidoğan bilirubin konsantrasyonlarında pozitif bias, orta ve yüksek yenidoğan bilirubin konsantrasyonlarında ise negatif bias rapor edilmiştir (120).

Yüksek Hb konsantrasyonları ürik asidin düşük ölçülmesine neden olmaktadır (15). Ürikaz-katalaz yöntemi (*Kageyama* reaksiyonu), interferansa ürikaz-peroksidaz yönteminden daha fazla açıktır (14,15). Ayrıca, zincirleme enzim (esterazlar) aktivite ölçümünde pH'ı değiştirerek interferansa neden olabilir (117).

RBC'ler, Hb yanında birçok yapısal protein, enzim, lipid ve karbohidrat içermektedir (71). Biyokimyasal interferans, Hb dışındaki bu intrasellüler bileşenlerden de kaynaklanabilir (6,14,18). RBC'lerden kaynaklanan adenilat kinaz nedeniyle meydana gelen kreatin kinaz (CK) aktivitesindeki artış buna bir örnektir (6,15,119). RBC'lerden salınan adenilat kinaz, özellikle reaksiyon karışımında adenilat kinaz inhibitörlerinin yetersiz olduğu durumda, CK ve *creatine kinase muscle-brain fraction (CK-MB)* aktivitelerinde artışa neden olmaktadır (15,119). Bu nedenle birçok ticari CK kiti, adenilat kinaz inhibitörleri olarak adenosin monofosfat (AMP) ve/veya diadenozinpentafosfat içerir (121).

Kimyasal interferans, kullanılan reaktiflerle ilişkili olma eğilimindedir. Bu nedenle kimyasal interferans, ancak ilgili reaktifin değiştirilmesi ile önlenabilir (14).

Özellikle yoğun hemolizi olan örneklerde; farklı interferans mekanizmalarının birlikte etkili olabileceği, aynı yönde olmayan biaslara yol açabileceği ve bu durumda biasın yönü ve büyüklüğünün öngörülmesinin sıklıkla mümkün olmadığı akılda tutulmalıdır (8).

2.4.5.2.1 Spektrofotometrik (Spektral, Optik) İnterferans

Spektrofotometrik interferans, kan hücrelerinin bileşenlerinin, ölçüm dalga boyunda absorbans oluşturmamasından kaynaklanır. Bu tür interferans, optik absorbans artışı veya *blank* değerindeki değişimden kaynaklanmakta ve özellikle Hb'nin yüksek absorbans gösterdiği dalga boyları olan 415, 540, 570 nm'de ölçümü yapılan laboratuvar testlerini etkilemektedir (5,14,15,19,23,117,118,122). Hb spektrumun bu bölgesinde önemli miktarda absorbsiyona neden olduğundan, bu dalga boyları boyunca spektrofotometrik ölçüm kullanan yöntemler

hemolizden olumsuz olarak etkilenecektir (117). Hb'nin rengi kendi dalga boyunda absorpsiyonu artırır ya da blank değerini değiştirir. Bu nedenle sonucun Hb tarafından belirgin şekilde düşürülmesi veya yükseltilmesi yöntem ve analit konsantrasyonuna bağlıdır (66).

Hb, 415 nm (*Soret* piki)'de güçlü ve 530-600 nm aralığında daha az bir absorpsiyon gösterir ve bu aralıkta 540 nm ve 570 nm'de olmak üzere iki adet pik daha verir. Ölçümleri bu dalga boylarını kapsayan enzimatik ölçüm yöntemlerini güçlü bir şekilde interfere edebilir. Hb'nin yapısı reaksiyon ortamından etkilenebilir: Asit ortamda çökebilir ve alkali ortamda hematine dönüşebilir, redükte olabilir, methemoglobin veya hatta karboksihemoglobin veya sulfohemoglobini oluşturabilir ve bu maddelerin hepsi farklı spektrumlara ve çeşitli interferans paternlerine sahiptir (118). Örneğin, Hb oksidasyona uğrayıp methemoglobine dönüştüğünde 340 nm'deki absorbans düşer (123). Bununla birlikte, spektrofotometrik interferans neredeyse lineerdir ve serum ve plazmadaki fHb'nin nihai konsantrasyonuna bağlıdır ve bu da Hb konsantrasyonunu ile uyumlu bir artış trendi izleyerek AST, alanin transaminaz (ALT), CK ve LDH gibi bazı enzimlerin olduğundan yüksek saptanmasına neden olur. Bilirubin, demir, lipaz ve gama glutamil transferaz (GGT) ölçümlerindeki bu tür interferanstan çoğunlukla fHb'nin reaktiflerle kimyasal reaksiyonunda meydana gelen spektral çakışma sorumlu tutulurken, alkalen fosfataz (ALP)'ninki ise alkali ortamda oluşan reaksiyon boyunca Hb'nin denatüre olmasına bağlanmıştır (122).

Bu interferans mekanizmasının neden olduğu etki, uygun *blank* 'leme, deproteinizasyon veya *end-point* reaksiyon yerine kinetiği tercih etme şeklinde ya da spektrofotometrik yöntem dışında bir yöntem seçimi ile dışlanabilir (14).

2.4.6 Klinik Laboratuvarlarda Hemolizli Örneklerin Sıklığı

Klinik laboratuvara gelen örneklerde hemoliz, örnek kalitesini bozan başlıca sorundur. Hemolizli örnekler, klinik laboratuvara gönderilen örneklerin yaklaşık %3'ünü ve kabul edilen uygunsuz örneklerin ise yaklaşık %39-69'unu oluşturmaktadır (7).

Bu alandaki temel çalışmalardan biri, College of American Pathologists tarafından yürütülmüştür (41). Bu çalışma, 453 laboratuvar ve 10709701 örnekle gerçekleştirilmiştir. Örneklerin %0,35'i (37208 örnek) analiz öncesi reddedilmiştir. En sık red nedeninin hemoliz

olduğu saptanmış ve ikinci en sık red nedeni olan yetersiz örnek miktarından 5 kat daha fazla olduğu tespit edilmiştir.

“*European Preanalytical Scientific Committee*”, “*IFCC Working Group on Patient Safety*” işbirliği ile klinik kimya laboratuvarlarında hemolizli örneklerin prevalansı ve yönetimi ile ilgili bir anket hazırlamıştır ve bu çalışmaya dünya çapında 391 laboratuvar katılmıştır. Bu laboratuvarların %58’inin laboratuvarlarına gelen hemolizli örneklerin sıklığını ve hangi birimden geldiğini sistematik olarak izlediği tespit edilmiştir. Yapılan değerlendirme sonucunda bu laboratuvarlara gelen hemolizli örnek sıklığı; laboratuvarların %39’unda %1-3 arasında, %28’inde %1’in altında, %21’inde %3-6 arasında, %8’inde %5-10 arasında ve %2’sinde %10-20 arasında ve yine %2’sinde %20’nin üzerinde saptanmıştır. Hemolizli örneklerin en sık geldiği birimin ise %53’lük oranla acil servisler olduğu, ardından %16’lık oranla pediatri bölümü, %7’lik oranla yoğun bakım ünitelerinin geldiği tespit edilmiştir (124). Klinik laboratuvara gelen örneklerde hemolizin, standardize prosedürlerin uygulanmasının zor olduğu, yoğun çalışılan, çok kişinin çalıştığı ve örnek alma zorluğunun yaşandığı birimlerinden kaynaklanan sorun olduğunu gösteren bu bulgulara benzer olarak, Lippi ve arkadaşları da bir yıl boyunca yürüttükleri ve 150516 örnekle gerçekleştirdikleri çalışmalarında, laboratuvara ulaşan hemolizli örneklerin prevalansını %5,6 olarak saptamış; bu örneklerin %8,8’inin acil servisten geldiğini, onu %8,5’luk oranla pediatri bölümünün izlediğini tespit etmişlerdir (125).

2.4.7 Örneklerdeki Hemolizin Varlığının ve Miktarının Saptanması

Örneklerde hemolizin saptanması önem taşımaktadır. Bunun nedeni; örnekteki hemolizin in vivo hemolizden kaynaklanan ve doktorun acil olarak bilgilendirilmesini gerektiren hayatı tehdit edebilen bir hastalığa işaret edebilmesi, in vitro hemolizin güvenilir olmayan laboratuvar test sonuçlarına yol açması ve hastabaşı cihazların verdiği farklı sonuçların tespit edilmemiş hemolizden kaynaklanabileceğidir. Bundan dolayı, toplam test sürecinin kalitesine ilişkin üzerinde en çok durulan konu bu örneklerin laboratuvar personeli tarafından tanınmasıdır (8).

Günümüz teknolojisi ile örnek santrifüj edilene kadar hemolizin değerlendirilmesi mümkün değildir (8). Santrifüj yoluyla hücrelerinden ayrılmış örneklerde hemolizin saptanmasında fHb varlığına dayanan iki yöntem kullanılmaktadır:

2.4.7.1 Görsel Değerlendirme

Hücre dışına çıkan Hb, serum veya plazmaya pembeden kırmızıya kadar değişen bir renk vermektedir. Hemoliz, fHb konsantrasyonu 30 mg/dL'yi aştığında görülebilir hale gelmektedir (10,17). Serum veya plazmanın rengi, çeşitli fotoğraflar, renk kartelalarına veya renkli diagramlar gibi gereçler referans olarak kullanılarak değerlendirilir. Buna göre genellikle hemoliz yarı kantitatif olarak sınıflandırılarak örneklerdeki hemoliz miktarı değerlendirilir (126–128).

Hemolizin görsel olarak değerlendirilmesi kolay ve maliyetsiz bir değerlendirme yöntemi olmakla birlikte zaman alan, son derece göreceli, standardize olmayan bir yöntemdir ve olası bir hata kaynağıdır (126).

Görsel değerlendirmenin hemolizin saptanmasında güvenilir bir yöntem olmadığı çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (26,126–128). Glick ve arkadaşlarının turbidite, ikter ve hemolizin görsel değerlendirmesi ile ilgili yaptığı bir çalışmada, serumlara bilinen konsantrasyonlarda interferant eklenmiş, interferans “0” (interferant içermeyen), eser miktarda, +1, +2, +3, +4 ve +5 şeklinde derecelendirilmiş, bunları renkli fotoğraflarla eşleştirmiş ve bu fotoğraflara bakarak eğitimli ve deneyimli personel tarafından sınıflandırılması istenmiştir. Görsel değerlendirmenin doğruluğunu saptamak amacıyla örneklerdeki Hb, bilirubin ve trigliserid miktarları ölçülmüştür. Renkli fotoğraflar gibi bir kıyaslama noktası olmasına rağmen eğitimli personelin dahi doğru bir derecelendirme yapamadığını ortaya koymuşlardır (127). Hawkins, hemolizin görsel değerlendirmesi ile otomatize hemoliz indeksini karşılaştırdığı bir çalışmada, hemolizi fotoğraflarla hafif (Hb konsantrasyonu 1 g/L), orta (Hb konsantrasyonu 2-5 g/L) ve şiddetli (Hb konsantrasyonu 5 g/L) şeklinde derecelendirmiş, bu fotoğraflara göre laboratuvar personeli tarafından serum ve plazma örnekleri sınıflandırılmış ve bu değerlendirme otomatize hemoliz indeksi ölçümü ile karşılaştırılmıştır. Çalışmada en sık olarak hafif hemolizli örneklerin gözden kaçtığı saptanmış ve bu çalışma da hemolizi görsel olarak değerlendirmenin güvenilir bir yöntem olmadığı ortaya konmuştur (128).

2.4.7.2 Analitik Değerlendirme

2.4.7.2.1 fHb Konsantrasyonu Ölçümü

Serbest serum veya plazma fHb ölçümü; direkt optik teknikler (örneğin; oksihemoglobinin 415nm, 541 nm ve 577 nm'deki absorbans piklerine dayalı miktar ölçümü),

kimyasal eklenen yöntemler (Hb'nin siyanmethemoglobin gibi kimyasallarla karıştırıldığında renkli bir reaksiyon ürünü oluşturduğu ölçüm yöntemleri) ve immunonefelometri ile gerçekleştirilebilmektedir (129,130). CLSI'nın önerdiği yöntem, *Drabkin* yöntemi olarak da bilinen hemiglobinsiyanid yöntemidir (131). Bu yöntem, alkali potasyum siyanid varlığında Hb ve türevlerinin (normalde kanda çok düşük konsantrasyonda bulunan bir pigment olan sulfohemoglobin dışında) methemoglobine oksidasyonuna dayalıdır. Oluşan methemoglobin, potasyum siyanid ile 540 nm'de en yüksek absorbanza sahip olan siyanmethemoglobin oluşturmak üzere reaksiyona girer. 540 nm'de ölçülen renk yoğunluğu, toplam Hb konsantrasyonu ile orantılıdır (8,132). Hb'nin heterojen doğası nedeniyle, *Drabkin* reaktifi halen tüm diğer yöntemlerin test edilmesi için kullanılmaktadır (8).

fHb ölçümü, kantitatif değerlendirme sağlamakla birlikte klinik laboratuvarlar açısından her cihaz için uygulanabilir olmaması, *turn around time* artışı gibi nedenlerle pratik olmayan ve maliyetli bir değerlendirme yöntemidir (8).

2.4.7.2.2 Hemoliz İndeksi Ölçümü

Birçok laboratuvar, örnekteki hemoliz miktarını tutarlı olarak saptamak amacıyla Hb tayinine dayanan otomatize spektrofotometrik ölçümlerin kullanımını benimsemiştir (11). Hemoliz indeksi olarak bilinen bu ölçüm, sıklıkla 405 - 700 nm arasında spektrofotometrik ve bikromatik olarak gerçekleştirilmektedir (1). Hemoliz indeksi, hemolizli örneklerin analiz için uygun olup olmadığını belirleme konusunda laboratuvara yardımcı olmaktadır (11). Çoğu durumda cihazlar kalitatif, yarı kantitatif veya kantitatif bir sonuç vermekte ve bu sonuç üretici, cihaz veya ölçülen analite özgü ikaz değerleri ile karşılaştırılarak örneğin analiz edilip edilmeyeceğine karar verilebilmektedir (1,133). Bu işlemin amacı örneğin durumuyla ilgili bilgi sahibi olmaktır. Kullanıcı interferansın uyarı vereceği değerleri ayarlayabilmekte ve interferansı raporlamak açısından çalışma modunu kendi ihtiyaçlarına göre özelleştirebilmektedir. Bu teknolojinin uygulanmasının faydaları arasında görsel değerlendirmenin sınırlılıklarının aşılabilmesi ve görsel değerlendirme ile saptanması zor olan ve gözden kaçabilen hafif hemolizli örneklerin (yaklaşık 60 mg/dL fHb içeren örnekler) tespit edilebilmesi yer almaktadır (1). Ayrıca nesnel, yarı kantitatif, ucuz, otomasyona uygun ve hızlı bir yöntemdir. Bununla birlikte, hemoliz indeks ölçümünün farklı üretici ve cihazlar açısından standardizasyonu ve uyumlu hale getirilmesi önerilmektedir (1,133).

Jeffery ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada erişkinlerde ve yeni doğanlarda hemolizin görsel değerlendirilmesi ile hemoliz indeksini karşılaştırmış ve neonatal örneklerdeki ikterin hemolizin görsel değerlendirme ile tespitini azalttığını saptamışlardır. Bulgularına dayanarak, otomatize hemoliz indeks ölçümünün özellikle yenidoğan popülasyonunda kullanılmasını önermektedirler (26).

Hemoliz indeksi ölçümü, aynı zamanda laboratuvar içinde farklı personellerden kaynaklanan değişkenliği ortadan kaldırmakta ve standardizasyonu sağlamaktadır (1). Simundic ve arkadaşları; lipemik, ikterik ve hemolizli örneklerde görsel değerlendirme ve hemoliz indeksini karşılaştırdıkları çalışmalarında, görsel değerlendirme konusunda personeller arasındaki uyumsuzluğu vurgulamış ve bu yöntemin güvenilir olmadığı ve otomatize indeks ölçümünün gerekli olduğu sonucuna varmışlardır (126).

İndeks ölçümüne ilişkin bir diğer konu, toplam test sürecindeki yeri ile ilgilidir. İlerleyen otomasyon ve entegrasyonun bir sonucu olarak preanalitik modüller analitik sistemlere entegre edilmekte ve bu durum örneğin işlenmesi öncesi kontrolü açısından bir engel oluşturmaktadır. Bu nedenle toplam laboratuvar sürecindeki bu gelişmelerin interferansların tespitinde otomatize indeks ölçümü gibi sistematik değerlendirmeyi gerektirdiği vurgulanmaktadır (126).

Örneklerdeki hemolizin varlığını ve miktarını saptama yöntemleri ve özellikleri Tablo 4'te özetlenmiştir:

Tablo 4 : Örneklerdeki hemolizin varlığını ve miktarını saptama yöntemleri ve özellikleri.

Özellikler	Görsel değerlendirme	Analitik değerlendirme	
		fHb	Hemoliz indeksi
Prensibi	Renk değişimi	Hb ölçümü	Renk ölçümü
Yöntem	Görsel renk karşılaştırma	Spektrofotometrik veya nefelometrik	Spektrofotometrik
Avantajları	Maliyetsiz	Nesnel Kantitatif Otomatize Emeksiz Hızlı Standardize	Nesnel Kalitatif, yarıkantitatif veya kantitatif Düşük maliyetli veya maliyetsiz Otomatize Emeksiz Hızlı
Dezavantajları	Zaman alan Emekli Standardize değil	Maliyetli	Standardize değil

2.4.8 Örneklerdeki Hemoliz Miktarının Sınıflandırılması

Hemoliz, serum veya plazmaya pembeden kırmızıya kadar değişen bir renk verir ve fHb düzeyi genellikle 30-60 mg/dL'yi aştığında görünür hale gelir. İkterik örneklerde görsel değerlendirmenin limiti daha yüksek olabilir (10,14,17).

Hemolizin varlığını ve miktarını değerlendirmek için plazma veya serum örneklerinde fHb'nin kantitatif ölçümü yapılabilir. Plazma ve serum için fHb'nin üst referans limiti sırasıyla 2 ve 5 mg/dL'dir (8).

Laboratuvar pratiğinde hemolizli örneklerin serum veya plazmasındaki fHb'nin konsantrasyonuna göre sınıflandırılması en uygun yöntemdir (Tablo 5).

Tablo 5 : Örneklerde hemoliz miktarının sınıflandırılması (10,17).

Sınıflandırma	fHb (mg/dL)	Örnek görünümü
Hemoliz yok	≤ 5	Sarı
Çok hafif hemoliz	$\geq 5 - 30$	Sarı – açık pembe
Hafif hemoliz	$\geq 30 - 60$	Pembe
Aşıkam hemoliz	$\geq 6 - 300$	Açık kırmızı
Aşırı hemoliz	≥ 300	Kırmızı - kahverengi

2.4.9 Hemoliz Sorununun Çözümü

2.4.9.1 Örneklerde Hemoliz Oluşumunun Önlenmesi

Güvenilir laboratuvar sonuçlarının sağlanabilmesi için laboratuvar evrelerinin devamlı olarak izlenmesi ve oluşan hatalara karşı önlemlerin alınarak kalitenin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu evredeki yaş, cinsiyet gibi fizyolojik değişkenler kontrol edilemezken; örnek alımı ve işlenmesi gibi örnek ile ilgili değişkenler kontrol edilebilir (134). Dolayısıyla, preanalitik evrede oluşan laboratuvar test sonuçlarını etkileyen hataların çoğu, mümkün olan preanalitik değişkenlerin kontrol edilmesi veya standardize prosedürlerin uygulanmasıyla önlenabilir. Bu bakış açısıyla; preanalitik evre ile ilgili çeşitli öneri, kılavuz ve standartlar geliştirilmiştir (66,135–138). İçlerinden Guder ve arkadaşlarının yayınladığı öneriler; spesifik olarak hemoliz, ikter, lipemi gibi interferantlar ile ilişkilidir (135).

2.4.9.2 Örneklerden Hemolizin Giderilmesi

Örneklerden interferantların eliminasyonu interferans sorunu çözümünde bir yoldur (6). Fakat hemoliz interferansı çeşitli mekanizmalarla meydana gelmiş komplike bir interferans olduğundan örneklerden hemolizi elimine etmek mümkün değildir (8).

2.4.9.3 Hemolizli Örnek Test Sonuçlarının Verilmemesi veya Kontrollü Bir Şekilde Verilmesi

Hemolizli örnek saptandığında bundan sonraki aşama için iki farklı yaklaşım uygulanabilir: Sonucun kontrollü bir şekilde verilmesi ya da sonucun verilmemesi.

2.4.9.3.1 Test Sonucunun Kontrollü Bir Şekilde Verilmesi

2.4.9.3.1.1 Test Sonucundaki Hatanın Düzeltilmesi

Birçok analit, hemolizden kaynaklanan interferans etkisine maruz kalmakla birlikte, en yaygın olarak hemolizin potasyum sonuçları üzerine olan etkisi değerlendirilmiştir. Potasyum ölçümlerinin sıklığı ve hipokalemi veya hiperkaleminin yanlış tanısının ciddi sonuçları, hemolizli örnekler açısından çeşitli seçenekler araştırılmasına sebep olmuştur (24). Bazı çalışmalar, ölçülen potasyum konsantrasyonları üzerinde *in vitro* hemolizin etkisini hesaplamak için düzeltme faktörlerinin kullanımını desteklemektedir (19,25–27).

Hemolizli örneklerde Hb ve potasyum arasındaki ilişkinin lineer olduğu daha önce yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (22). Serum ve RBC'ler arasındaki relatif dağılıma dayanan formüller, serum Hb ölçümü aracılığıyla hemolizin etkisinin kantitatif düzeltilmesinin bir yolu olarak önerilmiştir (13,19). Bu düzeltme faktörleri, Hb konsantrasyonu ile relatif serbest serum Hb konsantrasyonunda potasyumda gözlenen bias arasındaki lineer regresyon analizinden elde edilen eğimin çarpımı ile elde edilmiştir (19,25). Brescia ve arkadaşları, RBC'lerdeki ortalama Hb konsantrasyonu (MCHC)'nun kişiler arasında değişiklik gösterdiğini, bu nedenle hemoliz sonucunda kana salınan Hb miktarının da farklı olacağını ve salınan total potasyumu ortak düzeltme faktör kullanımı ile ilişkilendirmenin güç olacağını öne sürmüş ve düzeltme formülünde her birey için MCHC'nun kullanılarak saptanan hemolizli örneklerdeki potasyum sonuçlarının doğruluğunu değerlendirmiştir. Bu çalışmalarında *in vitro* hemolizden kaynaklanan hiperkalemi için tekrar örnek alımı ve analizinin gerekli olmayabileceği sonucuna varmışlardır (27).

Düzeltilme faktörleri, hastalardaki gerçek potasyum konsantrasyonlarını değerlendirme olanağı sağlamakla birlikte önerilen düzeltme faktörleri arasındaki değişkenlik korkutucudur (8,24). Önceki çalışmalarda öne sürülen çeşitli formüller Tablo 6'da gösterilmektedir.

Tablo 6 : Hemolizli örneklerdeki potasyum konsantrasyonlarını düzeltmek için önerilen bazı formüller (13,25–27,139,140).

Formüller
Düzeltilmiş potasyum (mEq/L) = fHb (mg/dL) × 0,00319 (%95 CI, 0,00290 – 0,00349)
Düzeltilmiş potasyum (mmol/L) = Ölçülen potasyum (mmol/L) – [Hemoliz indeksi (g/L) × 0,004]
Düzeltilmiş potasyum (mmol/L) = Ölçülen potasyum (mmol/L) – [Hemoliz indeksi (µmol/L) × 0,01]
Düzeltilmiş potasyum (mmol/L) = Ölçülen potasyum (mmol/L) – [fHb (mg/dL) × 0,0032]
Düzeltilmiş potasyum (mmol/L) = Ölçülen potasyum (mmol/L) – (Hemoliz indeksi artışı (g/L) × 0,14)
RBC'lerden salınan potasyum (mEq/L) = [RBC içi potasyum konsantrasyonu (mEq/L) / MCHC (g/dL)] × fHb

Formüller arasındaki bu heterojeniteye neden olabilecek faktörler; in vitro hemolizi oluşturmak için kullanılan yöntem, RBC/Hb konsantrasyonundaki bireyler arası değişkenlik ve RBC yaşının intrasellüler potasyum konsantrasyonu üzerine etkisidir (24,28,29).

Ayrıca; in vivo hemoliz durumlarında potasyum düzeyleri gerçekte arttığından, bu durum dışlanana dek bu düzeltme faktörlerinin kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir (139).

Dolayısıyla, önerilen düzeltme faktörlerinin gerçek potasyum sonuçlarını öngörmek için kullanılmasının uygun olmayabileceği ve hasta güvenliğini tehdit edebileceği belirtilmektedir (24,28).

Literatürde LDH, direkt bilirubin, GGT, ALP gibi başka biyokimyasal testler için düzeltme faktörlerinin kullanımını öneren yayınlar da bulunmaktadır (19,139,141).

2.4.9.3.1.2 Test sonucunun açıklayıcı bir yorumla birlikte verilmesi

Hemolizli örneklerle ait test sonuçlarının hemoliz nedeniyle reddi, hasta güvenliğini tehlikeye atacak şekilde tanıda gecikmelere neden olabilmekte; hastadan tekrar kan alınması gerektiği durumlar ise artmış iş yükü ve laboratuvarlar için artmış maliyet anlamına gelmektedir. Bu nedenle, test sonuçlarını tamamen reddetmek ya da matematiksel olarak sonucu düzeltmek yerine uygulanabilecek diğer bir yaklaşım, sonucun açıklayıcı bir yorum ile birlikte verilmesidir. Bu yorum, basitçe sonucun hemolizli bir örnekten elde edildiği ve analitik ve biyolojik interferanstan ötürü hatalı olabileceğinin belirtilmesi şeklinde ya da

hemolizin derecesine göre örneğin hemolitik indeksten hesaplanarak öngörülen olası analit konsantrasyon aralığının verilmesi şeklinde olabilir (8).

Bu yaklaşımın ve durumu bildirir bir açıklamayla hekimin durumu hızlı bir şekilde farketmesi ve doktorun aranmasıyla zaman kaybedilmemesi gibi pratik açıdan yararları olmakla birlikte bazı kusurları da bulunmaktadır (10). *In vitro* hemolizli örnekler, laboratuvara ulaşan tüm hemolizli örneklerin %98'e kadarını oluşturabildiğinden kliniklere ulaşan laboratuvar verilerinin büyük çoğunluğu hatalı olacaktır (10,89). Bununla birlikte, Dünya Sağlık Örgütü (WHO), *Italian Society of Clinical Biochemistry and Molecular Biology (SIBioC)* ve *Italian Society of Laboratory Medicine (SIMeL)*'in uygunsuz örneklerden elde edilen test sonuçlarının verilmemesi ile ilgili kesin önerileri bulunmaktadır (66,142). Ayrıca, uygunsuz örneklerden elde edilen ve laboratuvar tarafından raporlanan sonuçlar sürekli olarak Laboratuvar Bilgi Sistemi (LBS)'nde bulunacak ve hasta sonuçlarının kıyaslanması açısından kliniğe güvenilir olmayan hatta olası yanlış sonuçların yansıtılmasına neden olacaktır (8). Bu yaklaşımın diğer bir sakıncası, acil servis ve yoğun bakımlar gibi faaliyetlerin yoğun ve kritik olduğu yerlerde bu yorumların gözden kaçabilmesidir. Dolayısıyla direkt olarak bildirim olasılıkla daha etkili olacaktır (10).

2.4.9.3.2 Test Sonucunun Verilmemesi

In vitro hemoliz, birçok laboratuvar testini interfere ederek test sonuçlarında biasa neden olduğundan, hemolizin derecesine göre etkilenen tüm test sonuçlarının reddedilmesi uygun görünmektedir (17). Belirtilen analitik ve klinik nedenlerden ötürü matematiksel düzeltme veya etkilenen sonucun bir yorumla verilmesi seçeneklerinden kaçınılmalıdır (8,10,17). WHO da etkilenen sonucun verilmemesini desteklemektedir (66).

Hemolizli örneklerde sonuç reddi, testler çalışılmadan önce örneğin bütünüyle reddi şeklinde ya da analizin gerçekleştirilmesinin ardından hemolizin derecesine göre sadece etkilenen test sonuçlarının reddi şeklinde yapılabilir (8). Test sonucu reddedildiğinde, laboratuvar personelinin tekrar örnek istemesi gerekmektedir (17). Tekrar örnek istenmesi, ikinci gelen örnekle ilk örneğin hemoliz indekslerinin karşılaştırılmasını mümkün kılar ve böylelikle *in vivo* hemoliz olasılığını doğrulama veya reddetme olanağı sağlar (8). Bunun önemi, hemolitik anemi gibi hayatı tehdit edebilen bir patolojiden şüphelenildiğinde durumun hızlıca fark edilmesi ve klinisyenin konuyla ilgili bilgilendirilmesinin büyük önem taşımasıdır (8,116). Bu da, laboratuvar ile klinisyen arasında kurulmuş olan iyi iletişim varlığında

mümkündür. Bu sayede in vivo hemolizin güvenli ve hızlı bir şekilde dışlanması sağlanabilir. Hekim konuyla ilgili bilgilendirilirken, hemolizin derecesine bağlı olarak etkilendiği tespit edilen test sonuçları reddedilerek yeni örnek isteminde bulunulmalıdır. Test sonucunun yerine hemolizin derecesine göre (örneğin; “hafif hemolizli”) açıklayıcı bir yorum yazılabilir (8).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1 ARAÇ ve GEREÇLER

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 7’de, kitler ise Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 7 : Çalışmada kullanılan cihazlar.

Cihaz Adı	Marka	Model
Tam kan sayım otoanalizörü	Beckman Coulter	LH 780
Biyokimya otoanalizörü	Beckman Coulter	AU5800
İmmunotetik otoanalizörü	Abbott	Architect i1000
ELISA plak okuyucu	BioTek	ELx800
ELISA plak yıkayıcı	BioTek	ELx50
Mikroplate shaker	Labnet	Vortemp56
Shaker	Stuart	Gyro-rocker SSL3
Vorteks cihazı	Stuart	SA8
Saf su cihazı	Millipore	Elix3, Milli Q
Derin dondurucu	Thermo	705
Santrifüj cihazı	Nüve	NF800R (<i>falcon</i> tüpü için)
	Heraeus (Thermo)	Biofuge stratos (mikrosantrifüj tüpü için)
	Heraeus (Thermo)	Cryofuge 6000i (kan torbası için)
Otomatik pipetler	Eppendorf	Research Plus
Kan bileşeni seperatörü	Fresenius	Compomat G4

Tablo 8 : Çalışmada kullanılan kitler.

Kit Adı	Yöntem	Katalog Numarası	Marka
β-TGB ELISA	Enzim İmmunoassay	CSB-E07886h	CUSABIO
MPO ELISA	Enzim İmmunoassay	BC-1129	Biocheck
Plazma fHb	TMB, kolorimetrik	C462-0A	Catachem
LDH	Spektrofotometrik	OSR6128	Beckman Coulter
Potasyum	İyon Selektif Elektrod	OSR66320	Beckman Coulter
AST	Fotometri	OSR6209	Beckman Coulter
Demir	Fotometri	OSR6286	Beckman Coulter
CK	Fotometri	OSR6279	Beckman Coulter
Magnezyum	Fotometri	OSR6189	Beckman Coulter
Total Protein	Fotometri	OSR6232	Beckman Coulter
Total Kolesterol	Fotometri	OSR6216	Beckman Coulter
İnorganik fosfor	Fotometri	OSR6222	Beckman Coulter
Glukoz	Fotometri	OSR6221	Beckman Coulter
Kalsiyum	Fotometri	OSR61117	Beckman Coulter
Kan Üre Azotu (BUN)	Fotometri	OSR6234	Beckman Coulter

3.2 OLGULARIN SEÇİMİ ve ÖRNEKLERİN TOPLANMASI

Çalışmaya; Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi Kan Bağış Formu’ndan yararlanılarak hazırlanmış olan Bilgilendirilmiş Onam Formu’nda yer alan kan donörü kriterlerini karşılayan ve biyokimya, tam kan sayımı, retikülosit sayımı ve seroloji test sonuçları herhangi bir patoloji düşündürmeyen 18-55 yaş arası sağlıklı gönüllüler dahil edildi.

Çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Araştırmalar Etik Kurulu’ndan etik kurul onayı alındıktan sonra başlatıldı (Ek 1). Çalışmaya katılan tüm bireyler yazılı olarak bilgilendirilip imzalı onam formları alındı (Ek 2).

Çalışmaya katılan 10 bireyden saf hücre süspansiyonu elde edilmesi için 1’er ünite antikoagülan olarak “Sitat-Fosfat-Dekstroz-Adenin (CPDA)” içeren kan torbasına ve 3 bireyden serum havuzu hazırlanması için 1’er ünite antikoagülsüz kan torbasına tam kan alındı. Kan alımı, Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi’nde yapılan rutin bir uygulama olarak, bir adet düz tüpe ve bir adet tripotasyum etilendiamin tetraasetik asit

(K₃EDTA) içeren tüpe yapıldı. Kan örneklerinin analizi Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi. Düz tüpten elde edilen serumdan biyokimya testleri [sodyum, potasyum, klor, magnezyum, AST, ALT, CK, GGT, LDH, ALP, inorganik fosfor, kreatinin, glukoz, BUN, kalsiyum, total protein, albümin, globulin, ürik asit, total bilirubin, direkt bilirubin, demir, total demir bağlama kapasitesi, doymamış demir bağlama kapasitesi, total kolesterol, trigliserit, düşük yoğunluklu lipoprotein kolesterol (LDL-Kol), HDL-Kol], hepatit belirteçleri [hepatit B yüzey antijeni (HbsAg) ve hepatit C antikoru (Anti-HCV)], *Human Immunodeficiency Virus* antikoru (Anti-HIV) ve sifiliz antikorları (Anti-Treponema Pallidum IgM ve IgG)] çalışıldı. K₃EDTA içeren kan örneğinden ise tam kan sayımı ve retikülosit sayımı gerçekleştirildi. Test sonuçları herhangi bir patoloji düşündürmeyen bireylerin kan örnekleri çalışmaya dahil edildi.

3.3 ÇALIŞMANIN BASAMAKLARI

Çalışmanın basamakları Şekil 2'de özetlenmiştir.

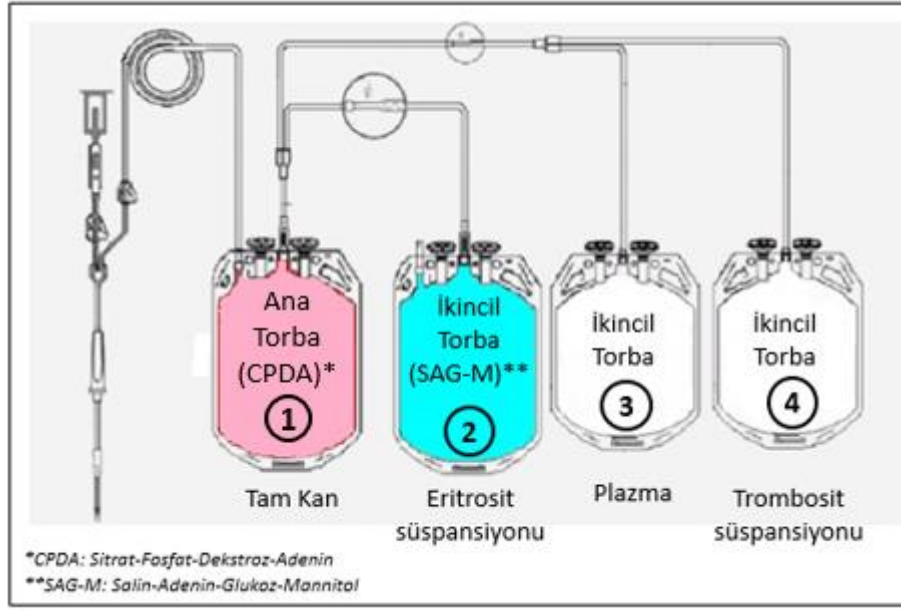


Şekil 2 : Çalışmanın basamakları.

3.3.1 İnterferantın Hazırlanması

3.3.1.1 Kan Alımı

Çalışmaya katılan ve test sonuçları herhangi bir patoloji düşündürmeyen 10 bireyden Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'nde farklı günlerde 1'er ünite (450 mL) tam kan alındı. Kan alımı için, antikoagülan olarak CPDA içeren filtresiz Compoflex 4'lü kan torba sistemleri (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Germany) kullanıldı (Şekil 3). Kan alımı, tüm bireylerde 10 dakika içinde tamamlandı.



Şekil 3 : 4’lü kan torba sistemi ve içerikleri.

3.3.1.2 Hücre Ayrımlanması

Alınan kan örnekleri, yaklaşık 1,5 saat 45 derece açılı duracak şekilde dinlendirildikten sonra 350 g’de 15 dakika frensiz modda santrifüj edildi. Ardından; kan örnekleri, rutin uygulamada kullanılmakta olan optik yöntem kullanan yarı otomatize kan bileşeni seperatörü Compamat G4 (Fresenius Hemocare Inc, Redmond, Washington) ile kanın alındığı antikoagülanlı ana torbadan antikoagülan içermeyen bir torbaya plazma, “Salin-Adenin-Glukoz-Mannitol” (SAG-M) içeren torbaya ise RBC süspansiyonu olacak şekilde kısmen aktarıldı. Plazma içeren torba atıldı. Ana torbada kalan örnek ise homojenize edildikten sonra yaklaşık 1,5 saat asılı bir şekilde dinlendirildi. Sonrasında 35 g’de 6 dakika frensiz modda santrifüj edildi ve tekrar kan bileşeni seperatörü kullanılarak ayrı bir antikoagülanlı torbaya PLT süspansiyonu şeklinde aktarıldı ve torbada kalan WBC’den zengin artık kısım da WBC eldesi için ayrıldı.

Hücre ayrımının bundan sonraki basamakları aynı gün içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda gerçekleştirildi.

WBC ayrılması için, 15 mL’lik *falcon* tüplerine 3’er mL *Histopaque 1119* konuldu. Üzerlerine torbada kalan WBC’den zengin artık kısımdan 3’er mL, *Histopaque 1119* ile karışmayacak şekilde dikkatlice tabakalandırıldı. Tüpler 700 g’de 30 dk frensiz modda

santrifüj edildi. Ardından tüplerde santrifüj sonrasında altta yerleşmiş olan RBC paketi ile üstteki plazma arasında kalan *Histopaque 1119* tabakası içinde meydana gelen bulutsu tabaka (*buffy coat*), mikropipet yardımıyla başka bir tüpe aktarılarak, WBC'ler süspansiyon şeklinde elde edildi.

3.3.1.3 Hücre Saflaştırılması

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'nde elde edilen RBC süspansiyonu yerçekimi (gravite) filtrasyonu yöntemiyle 2 kez, PLT süspansiyonu ise 1 kez laboratuvar tipi WBC filtresinden geçirildi.

Hücre saflaştırılmasının bundan sonraki basamakları aynı gün içinde Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda gerçekleştirildi.

Bulutsu tabakadan elde edilen yaklaşık 15-25 mL'lik WBC'den zengin hücre süspansiyonu, 15 mL'lik iki adet *falcon* tüpüne paylaştırıldıktan sonra 200 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan PLT'den zengin plazma tüplerde 2 mL örnek kalıncaya kadar atıldı. Elde edilen 4 mL örnek tek bir tüpe alınıp 10 kez alt-üst edilerek homojenize edildi ve yıkanmak üzere 4 adet *falcon* tüpüne 1'er mL olacak şekilde porsiyonlandı.

Filtreden geçirilmiş olan PLT süspansiyonu, 2 adet 15'er mL'lik *falcon* tüpünü dolduracak şekilde aktarıldı ve tüpler 200 g'de 10 dakika santrifüj edildi. Üstte kalan PLT'den zengin plazmadan 3'er mL olarak başka bir *falcon* tüpüne aktarıldı. Toplamda elde edilen 6 mL örnek 10 kez alt-üst edilerek homojenize edildi.

3.3.1.4 Hücrelerin Yıkınması

Filtreden geçirilmiş olan RBC süspansiyonundan yaklaşık 10 mL örnek 15 mL'lik *falcon* tüpüne aktarılarak 200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Üstte kalan az bir miktar plazma, *pasteur* pipeti yardımıyla uzaklaştırıldı. Tüpte kalan RBC paketinden 2 mL başka bir *falcon* tüpüne aktarıldı ve homojenize edildi. Üzerine 10 mL serum fizyolojik eklendi. 10 kez alt üste edildi. 200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant *pasteur* pipeti yardımıyla atıldı. Bu yıkama basamakları toplamda 5 kez olacak şekilde tekrarlandı. Son santrifüj sonrası süpernatant atıldı ve RBC çökeltisi toplam hacim 4 mL olacak şekilde serum fizyolojik ile süspanse edildi. Ardından 10 kez alt-üst edilerek homojenize edildi ve 1 mL'si sayım için mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

4 adet *falcon* tüpüne 1'er mL olacak şekilde porsiyonlanmış olan WBC süspansiyonlarının üzerine 10'ar mL serum fizyolojik eklendi. 10 kez alt üste edildi. 200 g'de 10 dk santrifüj edildi. Sonrasında süpernatant tüpte 1 mL sıvı kalacak şekilde atıldı, WBC çökeltisi *pasteur* pipeti yardımıyla homojenize edildi. Bu yıkama basamakları toplamda 5 kez olacak şekilde tekrarlandı. Son santrifüj sonrası tüplerde 1.5'er mL sıvı kalacak şekilde süpernatant atıldı ve *pasteur* pipetiyle homojenize edildi. 4 tüpte bulunan örnekler birleştirildi ve 6 mL olarak elde edilen örnek, 10 kez alt-üst edilerek homojenize edildi. 1 mL'si sayım için mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

PLT'ler agrege olduğundan yıkama yapılamadı. Elde edilen 6 mL PLT süspansiyonunun 1 mL'si sayım için mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.

3.3.1.5 Hücre Süspansiyonlarının Hazırlanması

Hücre sayımları LH 780 (Beckman Coulter Inc, Miami, Florida, USA) kan sayımı otoanalizöründe yapıldı. RBC, WBC ve PLT süspansiyonları; aşağıdaki tabloda gösterilen en yüksek hücre sayısı (7. konsantrasyon seviyesi) hedefine ulaşacak şekilde serum fizyolojik kullanılarak dilüe edildi (Tablo 9). Ardından serum fizyolojik ile mikrosantrifüj tüplerinde seri dilüsyon yapıldı.

Tablo 9 : Hücre süspansiyonlarının hedef hücre sayıları.

Dilüsyon oranı	Konsantrasyon seviyesi	Hedef Hücre Sayısı (adet/ μ L)		
		RBC süspansiyonu	PLT süspansiyonu	WBC süspansiyonu
Yok	7	1600000	96000	10000
1/2	6	800000	48000	5000
1/4	5	400000	24000	2500
1/8	4	200000	12000	1250
1/16	3	100000	6000	625
1/32	2	50000	3000	312
1/64	1	25000	1500	156

Her bir hücre tipi için 7'şer konsantrasyon seviyesi şeklinde hazırlanan hücre süspansiyonları, katılan tüm bireylerin örnekleri toplanana dek derin dondurucuda -70°C'de mikrosantrifüj tüplerinde saklandı (27,143).

3.3.1.6 Hücre Süspansiyonlarının Tam Hemolizi

Hazırlanan hücre süspansiyonlarının her biri en az 1 hafta derin dondurucuda bekletildikten sonra örnekler çıkarılıp çözöldü ve tekrar dondurucuya konuldu (23,27,143). Bu işlem 1 kez daha yapıldı ve interferans deneyinin yapılacağı sabah örnekler son olarak eritildi. Bu şekilde örneklere toplamda 3 kez dondurup çözme işlemi yapıldı. Örneklerin tam hemolizi; 3 hücre tipi için, en düşük ve en yüksek hücre sayısına sahip iki örnek seçilerek sayım lamında ve Wright boyasıyla ile hazırlanan yaymanın incelenmesiyle doğrulandı.

3.3.1.7 Süpernatant Elde Edilişi

Eritilen örnekler 12000 g'de 10 dakika santrifüj edilerek hücre debrislerinin çökmesi sağlandı. Elde edilen süpernatant, interferans deneyi için hemolizat olarak kullanılmak üzere başka mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı.

3.3.2 Serum Havuzunun Hazırlanması

3.3.2.1 Kan Alımı

Çalışmaya katılan ve test sonuçları herhangi bir patoloji düşündürmeyen 3 bireyden Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Kan Merkezi'nde 1'er ünite (450 mL) tam kan alındı. Kan torbası steril anastomoz ile modifiye edilerek kanın doğrudan antikoagölansız torbaya alınması sağlandı. Kan alımı, tüm bireylerde 10 dakika içinde tamamlandı.

3.3.2.2 Serum Eldesi

Alınan kan örnekleri, yaklaşık 1,5 saat 45 derece açılı duracak şekilde dinlendirildikten sonra 1200 g'de 10 dakika frensiz modda santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üstte kalan serum *pasteur* pipeti yardımıyla bir cam erlene aktarıldı. Serum eldesi işlemi, interferans deneyinden önceki 2 günde gerçekleştirildi. Elde edilen serum örnekleri, interferans deneyi yapıncaya dek +4°C'de saklandı.

3.3.3 İnterferans Deneyi

3.3.3.1 Örnek Hazırlığı

Serum havuzu, her bir mikrosantrifüj tüpünde 950 µL olacak şekilde paylaştırıldı. Üzerlerine, farklı sayıda hücrenin parçalanmasıyla oluşturulmuş hemolizatlardan elde edilen süpernatantların her birinden 50 µL eklendi ve vortekslendi. Böylece her bir hücre tipi için 7 farklı konsantrasyonda örnek hazırlanmış oldu. Sıfırıncı konsantrasyon seviyesi için ise hemolizat yerine 50 µL serum fizyolojik eklendi ve vortekslendi. Bu örnek, her bir hücre tipi için hazırlandı. Böylelikle, sıfırıncı konsantrasyon seviyesi için 1000'er µL serum fizyolojik içeren örnek ve diğer konsantrasyon seviyeleri için 1000'er µL hemolizat içeren örnek elde edilmiş oldu. Bunun 700 µL'si biyokimya otoanalizöründe çalışma için seçilen 12 test parametresi çalışılmak üzere Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'na götürüldü. Kalan 300 µL örnek ise ikiye porsiyonlanarak MPO, β-TGB ve fHb çalışılincaya dek -70°C'de mikrosantrifüj tüplerinde saklandı.

3.3.3.2 Biyokimya Test Parametreleri ve Serum İndekslerinin Analizi

Çalışma için seçilen 12 adet biyokimya test parametresi (LDH, potasyum, AST, demir, CK, magnezyum, total protein, total kolesterol, inorganik fosfor, glukoz, kalsiyum ve BUN) ve serum indeksleri [hemoliz indeksi (HEM), ikterik indeks (ICT) ve lipemik indeks (LIP)] için ayrılan 700'er µL'lik örnekler duplike çalışılmak üzere ikiye porsiyonlandı. Tüm örneklerin analizi, AU5800 (Beckman Coulter, Inc, Miami, Florida, USA) biyokimya otoanalizöründe spektrofotometrik ve ISE yöntemleriyle magnezyum dışındaki tüm testler için tek reaktif kullanılarak gerçekleştirildi. Bu şekilde, değişik hücre tipi ve sayısına sahip örneklerden hazırlanmış olan hemolizatları içeren serum örneklerinin analizi ile her bir test parametresinden 2'şer sonuç elde edilmiş oldu.

Ölçülen 12 adet biyokimya test parametresinin ve serum indekslerinin test prensipleri aşağıdaki gibidir :

LDH : LDH, okside nikotinamid adenin dinükleotid (NAD⁺)'nın redükte nikotinamid adenin dinükleotid (NADH)'ye indirgenmesi ile eş zamanlı olarak laktatın piruvata oksidasyonunu katalize eder. NADH artışı 340 nm'de ölçülür. Bu artış, numunedeki enzim aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Potasyum : Potasyum konsantrasyonlarının ölçümü, otoanalizördeki iyon selektif elektrod (ISE) modülü ile ölçülmektedir. ISE modülünde, potasyum için kron eter membranlı

elektrotlar kullanılır. Membranlar numunedeki potasyum iyonuna özeldir. Her bir iyon için *Nernst* Denklemine göre bir elektrik potansiyeli geliştirilir. Dahili bir referansla kıyaslandığında bu elektrik potansiyeli bir voltaja ve ardından da numunenin iyon konsantrasyonuna çevrilir.

Aspartat transaminaz (AST) : AST, aspartat ve 2-okzoglutaratın transaminasyonunu katalize eder ve L-glutamat okzaloasetat oluşur. Reaksiyon karışımına piridoksal fosfat eklenmesi AST'nin maksimum katalitik etkisini garanti eder. Oksalasetat, malat dehidrojenaz tarafından L-malata indirgenirken eş zamanlı olarak NADH de NAD^{+} 'a dönüştürülür. NADH tüketimi nedeniyle absorbansta meydana gelen düşüş, 340 nm'de ölçülür ve numunedeki AST aktivitesiyle orantılıdır. Endojen piruvat, inkübasyon dönemi sırasında LDH reaksiyonu ile temizlenir.

Demir : Demir ölçümünde kromojen olarak 2,4,6-Tri-(2-piridil)-5-triazin (TPTZ) kullanılır. Asidik bir ortamda transferine bağlı demir, serbest değerlikli demir iyonları ve apo-transferin halinde parçalanır. Hidroklorik asit ve sodyum askorbat, 3 değerlikli demir iyonlarını 2 değerlikli hale indirir. 2 değerlikli demir iyonları, TPTZ ile reaksiyona girerek 600/800 nm'de bikromatik olarak ölçülebilen mavi renkli bir kompleks oluşturur. Absorbanstaki artış mevcut demir miktarıyla doğru orantılıdır.

CK : CK, kreatin ve ATP ürünlerini açığa çıkaracak şekilde kreatin fosfattan bir fosfat grubunun ADP aktarılmasını geri dönüşümlü bir şekilde katalize eder. Oluşan ATP, glukozdan glukoz-6-fosfat ve ADP üretmek için kullanılır. Bu reaksiyon, maksimum aktivite için magnezyum iyonlarını gerektiren heksokinaz tarafından katalize edilir. Glukoz-6-fosfat, nikotinamid adenindinükleotid fosfat (NADP)'in eş zamanlı olarak indirgenmesi ile birlikte meydana gelen glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH) enziminin eylemi ile okside olur ve redükte nikotinamid adenindinükleotid fosfat (NADPH) ile 6-fosfoglukonat açığa çıkar. NADPH oluşumuna bağlı olarak 340/660 nm'deki absorbans artış oranı numunedeki CK aktivitesi ile doğru orantılıdır.

Magnezyum : Magnezyum ölçümünde, magnezyum iyonlarının güçlü bir bazik çözelti içinde ksilidil mavisini ile renkli bir kompleks oluşturduğu direkt bir yöntem kullanılır. Oluşan renk 520/800 nm'de bikromatik olarak ölçülür ve numunedeki magnezyum konsantrasyonu ile orantılıdır. Kalsiyum interferansı, glikoleterdiamin-N,N,N',N'- tetraasetik asit (GEDTA) ile elimine edilir.

Total Protein : Total protein ölçümünde; alkalın çözeltideki küprık ıyonlar, en az ıkı peptid bağı ıçeren proteinler ve polipeptidlerle reaksiyona girerek mor renkli bir kompleks açığa ıkarılırlar. Kompleksin 540/660 nm'deki absorbansı, numunedeki protein konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Total Kolesterol : Total kolesterol ölçümü, enzimatik bir yöntem kullanılarak yapılmaktadır. Burada örnekteki kolesterol esterleri, kolesterol esteraz tarafından hidrolize uğratılır. Açığa ııkan serbest kolesterol, kolesterol oksidaz tarafından kolesten-3-one'ye okside edilir ve eş zamanlı olarak peroksidaz varlığında kromofor üretecek şekilde 4-aminoantipirin ve fenol ile oksidatif olarak bağlanan hidrojen peroksit açığa ııkar. Oluşan kırmızı kinonimin boyası, absorbanstaki bir artışla birlikte 540/600 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

İnorganik fosfor : İnorganik fosfor, molibdatla reaksiyona girerek bir heteropoliasit kompleksi oluşturur. Yüzey etkin madde kullanımı, protein ıçermeyen bir filtrat hazırlama ihtiyacını ortadan kaldırır. 340/380 nm'deki absorban, numunedeki inorganik fosfor konsantrasyonuyla doğru orantılıdır.

Glukoz : Glukoz ölçümünde, hegzokinaz ıçeren enzimatik yöntem kullanılır. Bu yöntemde glukoz, hegzokinaz enzimiyle glukoz-6-fosfata dönüştürülür. Ardından; glukoz-6-fosfat, G6PDH enzimi ile glukonate-6-fosfat ve NADH'a çevrilir. Fotometrik olarak 340 nm'de ölçülen NADH oluşumu glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kalsiyum : Kalsiyum ölçümü, 2,2'-(1,8-Dihidroksi-3,6-disülfonaftilen-2,7-bisazo)-bisbenzenarsonik asit (Arsenazo III) ile yoğun bir mor renkli kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona giren kalsiyum ıyonlarına (Ca^{+2}) dayanmaktadır. Bu yöntemde, Ca-Arsenazo III kompleksinin absorbansı 660/700 nm'de bikromatik olarak ölçülmektedir. Reaksiyon karışımının absorbanısında ortaya ııkan artış numunedeki kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.

Kan Üre Azotu (BUN) : Bu ölçüm prensibinde üre, su ve üreaz varlığında hidrolize olur ve amonyak ile karbon dioksit açığa ııkar. İlk reaksiyonda açığa ııkan amonyak, glutamat dehidrogenaz varlığında 2-oksoglutarat ve NADH ile birleşir ve glutamat ile NAD^+ oluşur. Birim zamanda NADH absorbanısındaki düşüş, üre konsantrasyonu ile orantılıdır.

Serum İndeksleri (HEM, LIP ve ICT) : Serum indeksleri, fotometrik olarak ölçülür ve yarı kantitatif sonuç verilir. Serum indeks ölçümünde serum örnekleri, "LIH reaktifi" ile seyreltilir ve ışık absorbsiyonu 6 dalga boyunda ölçülür. Potansiyel olarak interferans yapan

bir konsantrasyonda bir veya daha fazla kromojen varsa, ilgili işaretler oluşturulur ve bunlar yapılan analiz sonuçlarıyla birlikte rapor edilir. Bu işaretler kromatik maddenin türünü (LIP : Lipemi/bulanıklık, ICT : Bilirubin ve HEM : Hb) ve interferans yapan maddenin yaklaşık konsantrasyonunu belirler (örneğin: +, ++, ++++) (Tablo 10) .

Tablo 10 : Serum indeks işaretleri ve karşılık gelen konsantrasyonlar (144).

İşaret	Kromatik Maddenin Yaklaşık Konsantrasyonu		
	LIP (mg/dL Intralipid)	ICT (mg/dL Bilirubin)	HEM (mg/dL Hb)
N	<40	<2,5	<50
+	40 - 99	2,5 - 4,9	50 - 99
++	100 - 199	5,0 - 9,9	100 - 199
+++	200 - 299	10 - 19,9	200 - 299
++++	300 - 500	20 - 40	300 - 500
+++++	>500	>40	>500

3.3.4 Sitoliz Belirteçlerinin Analizi

Sitoliz belirteçleri olarak, ancak hücrenin parçalanmasıyla ortama boşalacak büyük moleküller olan protein belirteçler kullanıldı. Bu amaçla; RBC lizisi için rutin klinik laboratuvar uygulamasında kullanılmakta olan fHb seçildi. WBC lizisi için ise, kandaki WBC'ler içinde en yüksek orana sahip WBC alt tipi olmasından dolayı nötrofillerin içerdiği ve birçok klinik patolojide de ölçümleri yaygın olarak kullanılan MPO, potansiyel belirteç olarak seçildi. PLT lizisi için, hücre içinde bol miktarda bulunan α -granüllerin içerdiği ve PLT aktivasyon belirteci olarak birçok klinik durumda yaygın olarak kullanılan β -TGB potansiyel belirteç olarak seçildi.

3.3.4.1 MPO Ölçümü

Serum örneklerindeki MPO düzeyi ölçümü, enzim immunoassay test kiti (Biocheck Inc, Foster City, California, USA) ile gerçekleştirildi.

Test Prensipleri : MPO ölçümü, solid faz *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) prensibine dayanır. Bu test sistemi, MPO molekülü üzerinde belli bir antijenik determinanta karşı spesifik monoklonal antikor kullanır. Bu fare monoklonal anti-MPO antikorunu,

mikrokuyucuklarda solid faz immobilizasyonu için kullanılır. *Horseradish* peroksidaz ile bağlı başka bir fare monoklonal anti-MPO antikoru, enzim konjugat çözeltisinde bulunur. Test örneklerinin her iki antikorla sırasıyla reaksiyona girmesi sağlanır ve bu da MPO moleküllerinin solid faz ile enzim bağlı antikorların arasında yerleşerek sandviç formasyonu oluşturmasıyla sonuçlanır. Çalkalayıcıda oda sıcaklığında 90 dakikalık iki ayrı inkübasyon basamağının ardından, kuyucuklar bağlanmamış işaretli antikorları uzaklaştırmak için yıkama tamponu ile yıkanır. 1,2,4-trimetoksibenzen (TMB) reaktifi eklenerek 20 dakika çalkalayıcıda inkübe edilir ve bu da mavi renk oluşumu ile sonuçlanır. Renk gelişimi, rengi sarıya çeviren stop solüsyonu ile durdurulur. MPO'nun konsantrasyonu, test örneklerinin renk yoğunluğu ile direkt olarak orantılıdır. Absorbans 450 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülür.

Test İçin Gerekli Malzemeler :

Tablo 11 : MPO enzim immunoassay kiti içeriği.

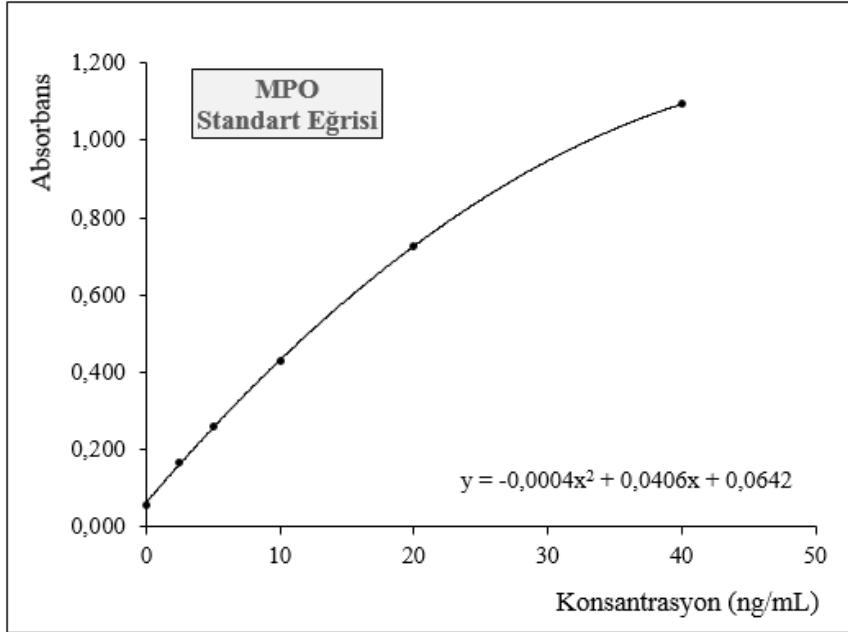
Kit İçeriği

Fare monoklonal anti-MPO antikoru ile kaplı 96 kuyucuk içeren plak
Liyofilize standart, 4 adet
Standart dilüent, 1 adet, 13 mL
Örnek dilüenti, 1 adet, 50 mL
Enzim konjugate konsantresi, 1 adet, 0,6 mL
Enzim konjugate dilüenti, 1 adet, 13 mL
Yıkama tamponu (20x), 1 adet, 50 mL
TMB reaktifi, 1 adet, 11 mL
Stop solüsyonu, 1 adet, 11 mL

Analiz Aşamaları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- Liyofilize standart 1100 µL distile su ile çözüldü ve 30 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Ardından standart dilüenti ile seri dilüsyon yapılarak 6 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı (0; 2,5; 5; 10; 20; 40 ng/mL).
- Örnekler, örnek dilüenti ile 1:2 şeklinde dilüe edildi.
- Hazırlanan 6 farklı konsantrasyonda standart ve dilüe edilmiş olan örnekler 100'er µL kuyucuklara konuldu. Standartlar, duplike olarak çalışıldı.

- Plak, 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak, 5 kez 350'şer µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara, 480 µL enzim konjugate konsantresinin 11,52 mL enzim konjugate dilüenti ile dilüe edilmesiyle oluşturulan çalışma enzim konjugat reaktifi 100'er µL eklendi.
- Plak, 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak, 5 kez 350'şer µL yıkama tamponu ile yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 100'er µL TMB reaktifi eklendi.
- Plak, karanlıkta 20 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 100'er µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- Plak, 30 saniye hafifçe çalkalandı. Tüm kuyucuklardaki mavi rengin sarı renge dönüştüğü gözlemlendi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan rengin absorbansı 15 dakika içinde plak okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.
- Örneklerdeki MPO konsantrasyonu, standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı (Şekil 4). Elde edilen değer dilüsyon katsayısı ile çarpıldı.



Şekil 4 : MPO standart eğrisi.

3.3.4.2 β -TGB Ölçümü

Serum örneklerindeki β -TGB düzeyi ölçümü, CUSABIO marka enzim immunoassay test kiti (CUSABIO Inc, Wuhan, China) ile gerçekleştirildi.

Test Prensipleri : Bu test, kantitatif sandviç enzim immunoassay tekniğini kullanmaktadır. Plak, β -TGB'e spesifik antikorlar ile kaplıdır. Standartlar ve örnekler, kuyucuklara pipetlenir ve mevcut β -TGB, immobilize antikorlar tarafından bağlanır. Bağlanmayan maddelerin uzaklaştırılmasının ardından, β -TGB'e spesifik biotin ile bağlı antikorlar, kuyucuklara eklenir. Yıkama sonrasında, avidine bağlı *Horseradish* peroksidaz kuyucuklara eklenir. Bağlanmamış avidin-enzim reaktifinin yıkama ile uzaklaştırılmasının ardından, substrat solüsyonu kuyucuklara eklenir ve ilk basamakta bağlanmış olan β -TGB miktarıyla orantılı bir renk oluşumu gerçekleşir. Renk oluşumu durdurulur ve rengin yoğunluğu ölçülür.

Test İçin Gerekli Malzemeler :

Tablo 12 : β -TGB enzim immunoassay kiti içeriği.

Kit içeriği

Reaktifler

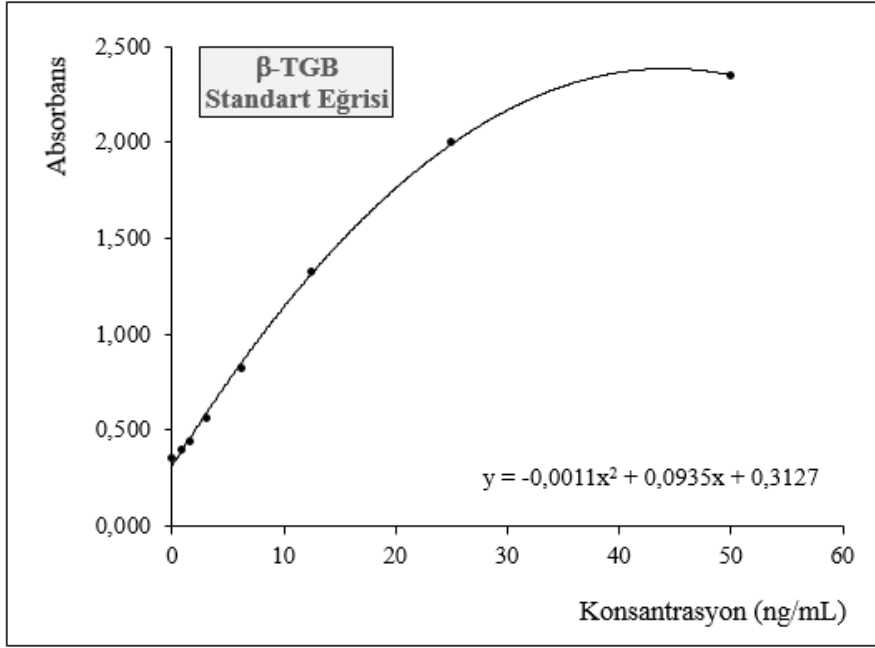
- 96 kuyucuk içeren plak
- Standart (dondurulup kurutulmuş), 2 adet
- Biotin bağlı antikor (100x), 1 adet, 120 μ L
- HRP-avidin (100x), 1 adet, 120 μ L
- Biotin bağlı antikor dilüenti, 1 adet, 15 mL
- HRP-avidin dilüenti, 1 adet, 15 mL
- Örnek dilüenti, 1 adet, 50 mL
- Yıkama tamponu (25x), 1 adet, 20 mL
- TMB substratı, 1 adet, 10 mL
- Stop solüsyonu, 1 adet, 10 mL

Analiz Aşamaları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- Standart, 6 000 rpm'de 30 saniye santrifüj edildi. Ardından, 1000 μ L örnek dilüenti ile çözüldü ve 30 dakika çalkalayıcıda bekletildi. Ardından örnek dilüenti ile seri dilüsyon

yapılarak 8 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı (0; 0,78; 1,57; 3,13; 6,25; 12,5; 25; 50 ng/mL).

- Örnekler, örnek dilüenti ile 1:2 şeklinde dilüe edildi.
- Hazırlanan 8 farklı konsantrasyonda standart ve dilüe edilmiş olan örnekler 100'er µL kuyucuklara konuldu. Standartlar, duplike olarak çalışıldı.
- Plâğın üstü kapatılarak, 2 saat boyunca 37°C sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plâğın içindeki sıvı uzaklaştırıldı.
- Tüm kuyucuklara, santrifüj sonrası kendi dilüenti ile 100 kat dilüe edilmiş olan biotin bağlı antikor 100'er µL eklendi.
- Plâğın üstü kapatılarak, 1 saat boyunca 37°C sıcaklığında inkübasyona bırakıldı.
- Plak, 90 dakika boyunca oda sıcaklığında çalkalayıcıda inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonunda plak, 3 kez 350'şer µL yıkama tamponu ile her yıkamada 2 dakika yıkama tamponu ile bekletilerek yıkandı.
- Tüm kuyucuklara, santrifüj sonrası kendi dilüenti ile 100 kat dilüe edilmiş olan HRP-avidin 100'er µL eklendi.
- İnkübasyon sonunda plak, 5 kez 350'şer µL yıkama tamponu ile her yıkamada 2 dakika yıkama tamponu ile bekletilerek yıkandı.
- Tüm kuyucuklara 90'ar µL TMB substratı eklendi.
- Plâğın üstü kapatılarak 20 dakika boyunca 37°C sıcaklığında karanlıkta inkübasyona bırakıldı.
- Tüm kuyucuklara 50'şer µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon durduruldu.
- Tüm kuyucuklarda oluşan rengin absorbansı 5 dakika içinde plak okuyucuda 450 nm'de ölçüldü.
- Örneklerdeki β-TGB konsantrasyonu, standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı (Şekil 5). Elde edilen değer dilüsyon katsayısı ile çarpıldı.



Şekil 5 : β -TGB standart eğrisi.

3.3.4.3 fHb Ölçümü

Serum örneklerindeki fHb düzeyi ölçümü, Catachem marka kolorimetrik ölçüm kiti (Catachem Inc, Oxford, İngiltere) ile gerçekleştirildi.

Tablo 13 : fHb ölçümü için gerekli malzemeler.

Gerekli malzemeler

Substrat reaktifi, 3 şişe, 25 mL : 3.3',5.5'-tetrametilbenzidin (TMB) 2,29 mmol/L; tampon; solubilizer

Aktivatör reaktif, 3 şişe, 10 mL : Hidrojen peroksit 62,5 mmol/L, stabilizer

Kalibratör, 1 şişe, 3 mL

Kontrol Level 1, 1 şişe, 3 mL

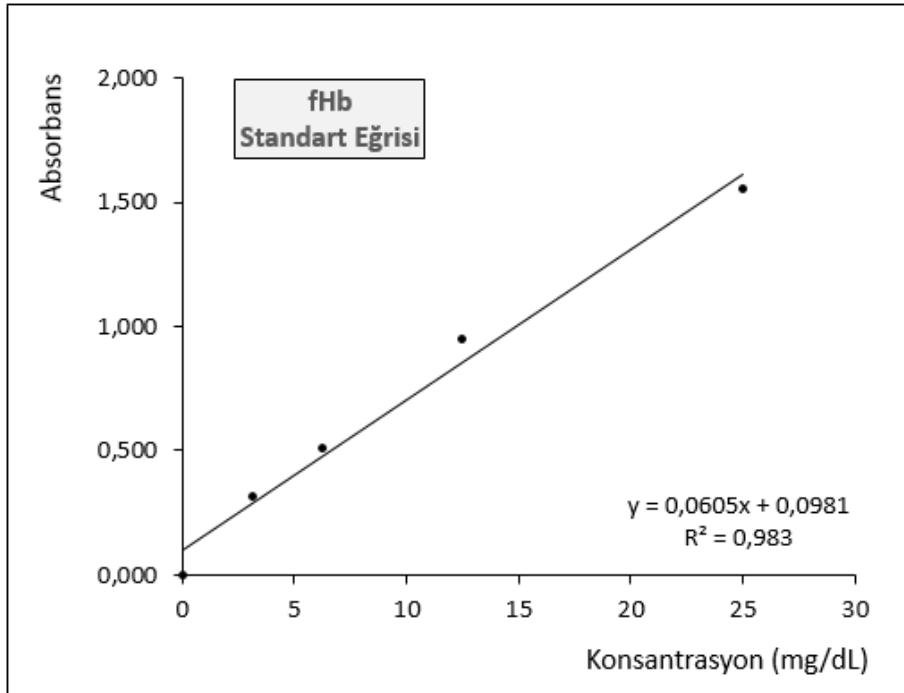
Kontrol Level 2, 1 şişe, 3 mL

96 kuyucuklu plak

Test Prensipleri : Plazmadaki fHb'i kolorimetrik olarak saptayan bu yöntem, Hb'nin peroksidaz aktivitesine dayanmaktadır. Bu yöntemde Hb, 650 nm'de maksimum absorbans gösteren kromojenik bir ürün oluşturmak üzere, hidrojen peroksit ile 3.3',5.5'-tetrametilbenzidinin oksidasyonunu aktive eder. Absorbanstaki artış, plazma örneğindeki fHb konsantrasyonu ile direkt olarak orantılıdır.

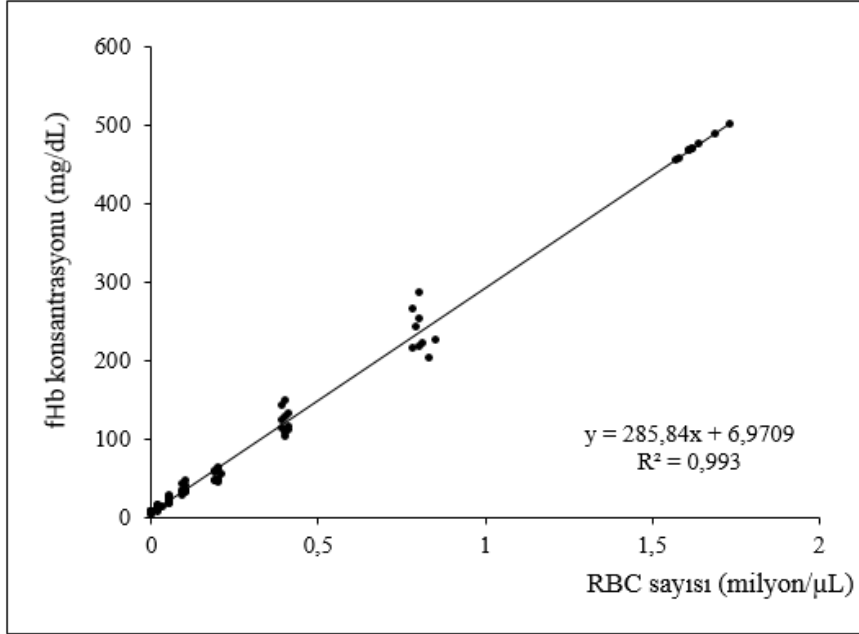
Analiz basamakları :

- Analize başlamadan önce kit içinde bulunan tüm reaktifler ve örnekler oda sıcaklığına getirildi.
- Örnekler, distile su ile 1:6 şeklinde dilüe edildi.
- Kalibratör, distile su ile seri dilüsyon yapılarak 4 farklı konsantrasyonda standartlar hazırlandı (6,25; 12,5; 25; 50 mg/dL). Kalibratör, kontroller ve reaktif körü duplike olarak çalışıldı.
- Tüm kuyucuklara 250 uL substrat reaktifi konuldu.
- Üzerlerine 3'er µL kalibratör, kontroller, dilüe örnekler ve reaktif körü için distile su ilgili kuyucuklarına konuldu.
- Ardından tüm kuyucuklara 100'er µL aktivatör reaktif eklendi.
- Plak, 1 dk 37°C'de inkübe edildi.
- Tüm kuyucuklarda oluşan rengin absorbansı 5 dakika içinde 37°C'ye ayarlanmış plak okuyucuda 650 nm'de ölçüldü.
- Örneklerdeki fHb konsantrasyonu, standart grafiğinden yararlanılarak hesaplandı (Şekil 6). Elde edilen değer dilüsyon katsayısı ile çarpıldı.



Şekil 6 : fHb standart eğrisi.

Absorbans yüksekliği nedeniyle saptanamayan son RBC konsantrasyon seviyesine ait fHb değerleri, tüm konsantrasyon seviyelerine ait ölçülmüş olan RBC sayıları ve bu sayılara karşılık gelen fHb değerleri arasındaki ilişkiden yararlanılarak çizilen grafikten elde edilen formül ile hesaplandı (şekil 7).



şekil 7 : RBC sayıları ve karşılık gelen fHb değerleri arasındaki ilişki.

3.4 İSTATİSTİKSEL ANALİZLER

İstatistiksel analizler, “SPSS for Windows 22.0” ve “Microsoft Office Excel 2013” programları kullanılarak yapıldı.

Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu “Shapiro-Wilk Testi” kullanılarak incelendi. Tanımlayıcı analizler normal dağılmayan değişkenler için ortanca kullanılarak verildi. İki grup karşılaştırmaları için, “Friedman Varyans Analizi” kullanıldı. Referans değere göre ikişerli karşılaştırmalar, “Wilcoxon İşaretili Sıralar Testi” kullanılarak yapıldı. Tüm testler için anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 AYRIMLANMIŞ HÜCRE HEMOLİZATLARI HAZIRLIĞININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Hemoliz interferansı deneysel modelinde; interferant hazırlanmasında kritik olan hücre saflaştırılması, hücre süspansiyonlarının hazırlanması ve tam hemolizin sağlanması basamaklarında hedeflere ulaşılma durumları değerlendirildi.

4.1.1 Hücre Saflaştırılmasının Değerlendirilmesi

Ayrımlanmış hücre süspansiyonlarının tam kan sayımı ile saptanan bileşimleri Tablo 14-16'da yer almaktadır. İlgili hücre tiplerine ait tablolarda hücre sayısı, her bir konsantrasyon seviyesi için ortanca olarak verilmiştir. Yüzde değerler ise; her bir konsantrasyon seviyesi için her hücre tipinin ortanca değerinin, o konsantrasyon seviyesi için süspansiyonların içerdiği tüm hücrelerin ortancalarının toplamına oranlanmasıyla hesaplanmıştır.

Tablo 14 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki RBC süspansiyonlarının bileşimleri.

Konsantrasyon Seviyesi	RBC sayısı (Ortanca) (adet/ μ L)	RBC yüzdesi (%)	WBC yüzdesi (%)	PLT yüzdesi (%)
0	0	0	0	0
1	20000	95,2	0	4,8
2	50000	98,0	0	2,0
3	100000	99,0	0	1,0
4	200000	99,5	0	0,5
5	400000	99,8	0	0,2
6	800000	99,9	0	0,1
7	1620000	99,9	0	0,1

Tablo 15 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki WBC süspansiyonlarının bileşimleri.

Konsantrasyon Seviyesi	WBC sayısı (Ortanca) (adet/μL)	WBC yüzdesi (%)	RBC yüzdesi (%)	PLT yüzdesi (%)
0	0	0	0	0
1	100	9,1	0	90,9
2	200	16,7	0	83,3
3	350	14,9	0	85,1
4	800	21,1	0	78,9
5	1900	11,2	59,2	29,6
6	4700	20,7	44,1	35,2
7	10500	23,1	44,0	33,0

Tablo 16 : Seri konsantrasyon seviyelerindeki PLT süspansiyonlarının bileşimleri.

Konsantrasyon Seviyesi	PLT sayısı (Ortanca) (adet/μL)	PLT yüzdesi (%)	RBC yüzdesi (%)	WBC yüzdesi (%)
0	0	0	0	0
1	2000	97,6	0	2,4
2	4000	100,0	0	0
3	6000	100,0	0	0
4	12000	99,6	0	0,4
5	23000	100,0	0	0
6	44500	99,8	0	0,2
7	90000	99,9	0	0,1

Tablolarda görüldüğü gibi, çalışmamızdaki 3 hücre tipinin ayrı ayrı etkilerinin belirlenmesi amacına uygun olarak ve kan merkezindeki kan ayırlama yönteminin de kısıtlılıkları göz önünde bulundurularak hedeflediğimiz %95 saflığa RBC ve PLT süspansiyonlarında ulaşılmasına rağmen; WBC süspansiyonlarında ulaşılammıştır (Tablo 14-16). RBC süspansiyonlarında WBC kontaminasyonu saptanmazken, PLT kontaminasyonu saptandı (<1600 adet/ μ L) (Tablo 14). PLT süspansiyonlarında ise RBC kontaminasyonu saptanmazken, WBC kontaminasyonu saptandı (<90 adet/ μ L) (Tablo 16).

4.1.2 Hücre Süspansiyonlarının Hazırlığının Değerlendirilmesi

Hemoliz öncesi seri dilüsyonla hazırlanan hücre süspansiyonlarının hücre sayıları, tam kan sayımı ile saptandı. Ayrımlanmış hücre süspansiyonlarının tam kan sayımı ile saptanan bileşimleri Tablo 14-16’da yer almaktadır.

Hemoliz sonrası RBC süspansiyonlarının konsantrasyon seviyeleri, içerdiği fHb konsantrasyonlarına göre de değerlendirildi. Buna göre Beckman AU5800 otoanalizörüne ait hemoliz indeks aralıklarını içeren tabloda görüldüğü gibi; RBC0, RBC1, RBC2 ve RBC3’e ait fHb konsantrasyonları, otoanalizörün normal kabul ettiği aralıkta bulunmaktadır. RBC4 “+”, RBC5 “++”, RBC6 “+++” ve RBC7 “++++” ile gösterilen indeks aralıklarına karşılık gelmektedir. Bununla birlikte, otoanalizörün 500 mg/dL üstündeki fHb değerleri için “+++++” ile belirtilen en yüksek indeksine karşılık gelen RBC süspansiyonu bulunmamaktadır (Tablo 17).

Tablo 17 : Farklı RBC konsantrasyon seviyelerinin içerdiği fHb konsantrasyonlarının ortanca değerleri ve bunların karşılık geldiği Beckman AU5800 otoanalizörüne ait hemoliz indeks işaret ve aralıkları.

Hemoliz İndeksi		RBC0 fHb (mg/dL)	RBC1 fHb (mg/dL)	RBC2 fHb (mg/dL)	RBC3 fHb (mg/dL)	RBC4 fHb (mg/dL)	RBC5 fHb (mg/dL)	RBC6 fHb (mg/dL)	RBC7 fHb (mg/dL)
İşaret	fHb (mg/dL)								
N	(<50)	8,199	13,218	23,459	34,529	-	-	-	-
+	(50 – 99)	-	-	-	-	52,622	-	-	-
++	(100 – 199)	-	-	-	-	-	120,897	-	-
+++	(200 – 299)	-	-	-	-	-	-	226,236	-
++++	(300 – 500)	-	-	-	-	-	-	-	470,248
+++++	(>500)	-	-	-	-	-	-	-	-

4.1.3 Tam Hemolizin Değerlendirilmesi

Ayrımlanan hücre süspansiyonlarının ardışık üç kez dondurma ve çözme işlemi sonrası tam olarak hemolizi; 3 hücre tipi için en düşük ve en yüksek hücre konsantrasyonunda olacak şekilde seçilen örneklerde, Neubauer sayım lamında ön inceleme sonrası Wright boyası ile hazırlanan yaymanın mikroskopik incelemesinde de intakt hücre saptanmadı.

4.2 AYRIMLANMIŞ HÜCRELERİN LİZİSİNİN BİYOKİMYASAL TEST PARAMETRELERİ ÜZERİNDEKİ ETKİSİNE İLİŞKİN BULGULAR

Hemolizin biyokimyasal test parametreleri üzerindeki etkisi, hemolizat içeren 7 konsantrasyon seviyesinin serum fizyolojik içeren sıfırcı konsantrasyon seviyesi ile karşılaştırılmasıyla değerlendirildi. Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının biyokimyasal test parametreleri üzerindeki etkisi, Tablo 18’de ve grafiklerde (Şekil 8-19) yüzde değişim şeklinde gösterildi ve yüzde değişim değerleri, %Bias sınırıyla karşılaştırıldı. Ayrıca; Tablo 18’de her süspansiyonun ilgili hücre tipine ait hücre sayısı, her konsantrasyon seviyesi için ortanca değerleri ile ve RBC süspansiyonlarına ait fHb konsantrasyonları da yine ortanca şeklinde verildi. Tablo 19’da ise; analitik ve klinik açıdan hücre lizisinin neden olduğu anlamlı değişimlerin eşik değerlerinin karşılık geldiği süspansiyonların ilgili hücre sayıları ortanca olarak ve RBC’ler için ayrıca fHb konsantrasyonları mg/dL olarak verildi. Burada, sözü edilen analitik eşik, istatistiksel olarak anlamlı değişimin başladığı; klinik eşik ise %Bias sınırının aşıldığı konsantrasyon seviyeleridir. %Bias sınırları, “*Analytical Quality Commision from the Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC)*”nin hazırladığı geniş çaplı bir veritabanı çalışmasından alınmıştır (145).

Tablo 18 : Her bir konsantrasyon seviyesi için 12 adet biyokimyasal test parametresinin yüzde değişimi ve her bir parametre için %Bias sınırları.

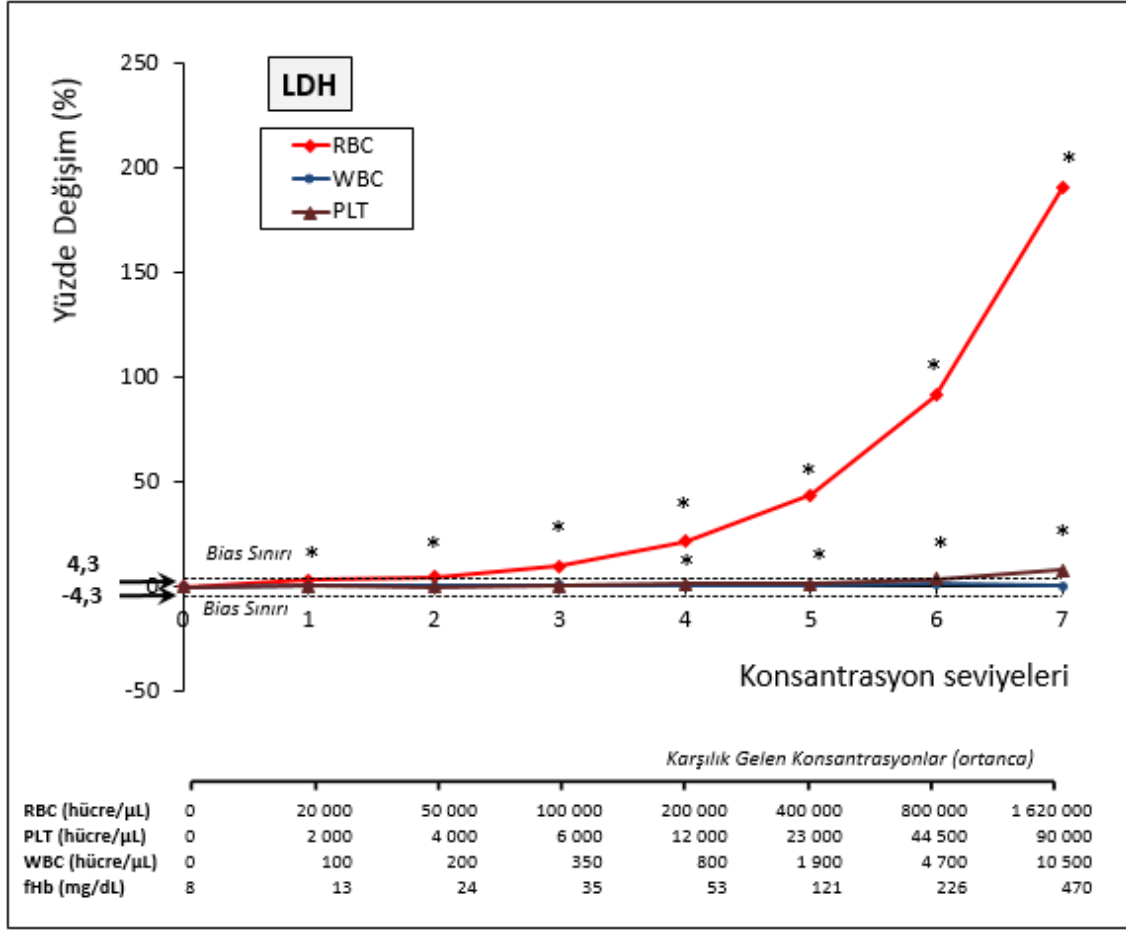
		Ortanca değerler								Bias sınırı (%)
Konsantrasyon seviyesi		0	1	2	3	4	5	6	7	
fHb (mg/dL) (ortanca)	RBC	8,20	13,22	23,46	34,53	52,62	120,90	226,24	470,25	-
Hücre sayıları (adet/ μ L) (ortanca)	RBC	0	20000	50000	100000	200000	400000	800000	1620000	-
	WBC	0	100	200	350	800	1900	4700	10500	-
	PLT	0	2000	4000	6000	12000	23000	44500	90000	-
LDH (%Değişim)	RBC	0,0	+3,2*	+4,8*	+10,0*	+21,9*	+43,9*	+91,5*	+190,5*	±4,3
	WBC	0,0	+0,3	+0,3	+1,0	+0,3	+0,7	+1,3	+0,3	
	PLT	0,0	+0,3	-0,2	+0,3	+1,3*	+1,6*	+3,8*	+7,9*	
Potasyum (%Değişim)	RBC	0,0	+0,1	+0,6	+1,3*	+1,9*	+4,9*	+9,7*	+19,7*	±1,8
	WBC	0,0	+0,1	+0,1	0,0	+0,1	-0,1	+0,3	+0,6	
	PLT	0,0	-0,1	-0,1	-0,2	-0,1	+0,1	+0,1	+1,0*	
AST (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	+0,1	+8,6*	+8,6*	+22,5*	+35,1*	+74,3*	±5,4
	WBC	0,0	-2,6	0,0	0,0	+2,8	+2,9	+8,3	+15,4*	
	PLT	0,0	+2,9	+1,4	0,0	+2,7	0,0	+2,9	+5,7	
Demir (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	+0,5	0,0	-0,5	0,0	0,0	-1,1*	±8,8
	WBC	0,0	+0,3	+0,3	0,0	-0,2	-0,3	-0,5	0,0	
	PLT	0,0	-0,5	+0,5	+0,3	+0,5	-0,3	+0,3	+1,1	
CK (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	-0,2	0,0	0,0	+2,4	+6,4*	+13,5*	±11,5
	WBC	0,0	-0,5	+0,2	-0,2	-1,0	-0,7	0,0	0,0	
	PLT	0,0	+0,5	+0,5	+0,7	+1,4	+0,7	0,7	+1,7	
Magnezyum (%Değişim)	RBC	0,0	-0,3	0,0	+0,6	+0,9*	+1,9*	+4,4*	+9,4*	±1,8
	WBC	0,0	-0,3	0,0	-0,3	-0,3	-0,3	-0,6	0,0	
	PLT	0,0	0,0	+0,6	0,0	0,0	+0,6	+0,3	+0,6	
Total protein (%Değişim)	RBC	0,0	+0,1	0,0	+0,3	+0,6	+0,9*	+1,9*	+3,3*	±1,2
	WBC	0,0	0,0	-0,1	-0,1	0,0	0,0	+0,3	+0,1	
	PLT	0,0	0,0	-0,1	+0,2	-0,2	0,0	+0,5*	+1,5*	
Total kolesterol (%Değişim)	RBC	0,0	+0,3	+0,5	+0,5	+1,6*	+2,2*	+4,0*	+7,9*	±4,1
	WBC	0,0	+0,3	+0,2	+0,2	+0,3	+0,5	+0,6	0,0	
	PLT	0,0	0,0	+0,2	0,0	+0,5	+0,3	+0,5	+1,1*	
İnorganik fosfor (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	0,0	0,0	+1,9*	+3,7*	+7,4*	+18,5*	±3,2
	WBC	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
	PLT	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	+1,9*	+3,7*	
Glukoz (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	+0,3	0,0	+0,6	-0,6	-0,6	-0,6	±2,5
	WBC	0,0	0,0	+0,3	+0,3	+0,3	0,0	+0,6	+0,6	
	PLT	0,0	+0,6	+1,3	+1,0*	+1,9*	+1,9*	+2,9*	+4,9*	
Kalsiyum (%Değişim)	RBC	0,0	0,0	0,0	-0,2	+0,2	+0,1	0,0	0,0	±0,8
	WBC	0,0	+0,2	+0,3	+0,4	+0,4	+0,4	+0,4	+0,1	
	PLT	0,0	+0,1	+0,2	0,0	+0,1	-0,2	+0,1	+0,4	
BUN (%Değişim)	RBC	0,0	-0,2	+0,2	+0,2	+1,2	+1,2	+1,9	+2,8	±5,5
	WBC	0,0	0,0	0,0	+0,5	0,0	-0,7	0,0	+0,9	
	PLT	0,0	+0,5	-0,5	-0,2	+0,2	+1,2	0,0	+1,6	

* : p < 0,05 (Sıfırcı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzey)

Tablo 19 : Hücre lizisinin biyokimyasal testlere analitik ve klinik açıdan anlamlı etkilerinin başladığı eşik değerler.

Test Parametreleri		RBC			WBC			PLT	
		Analitik eşik	Klinik eşik		Analitik eşik	Klinik eşik		Analitik eşik	Klinik eşik
LDH	Konsantrasyon Seviyesi	1	2		-	-		4	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	20 000	50 000		-	-		12000	-
	fHb (mg/dL)	13,22	23,46		-	-		-	-
Potasyum	Konsantrasyon Seviyesi	3	4		-	-		7	7
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	100000	200000		-	-		90000	90000
	fHb (mg/dL)	34,53	52,62		-	-		-	-
AST	Konsantrasyon Seviyesi	3	3		7	7		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	100000	100000		10500	10500		-	-
	fHb (mg/dL)	34,53	34,53		-	-		-	-
Demir	Konsantrasyon Seviyesi	7	-		-	-		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	1620000	-		-	-		-	-
	fHb (mg/dL)	-	-		-	-		-	-
CK	Konsantrasyon Seviyesi	6	7		-	-		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	800000	1620000		-	-		-	-
	fHb (mg/dL)	226,24	470,25		-	-		-	-
Magnezyum	Konsantrasyon Seviyesi	4	5		-	-		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	200000	400000		-	-		-	-
	fHb (mg/dL)	52,62	120,90		-	-		-	-
Total protein	Konsantrasyon Seviyesi	5	6		-	-		6	7
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	400000	800000		-	-		44500	90000
	fHb (mg/dL)	120,90	226,24		-	-		-	-
Total kolesterol	Konsantrasyon Seviyesi	4	7		-	-		7	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	200000	1620000		-	-		90000	-
	Hb (mg/dL)	52,62	470,25		-	-		-	-
İnorganik fosfor	Konsantrasyon Seviyesi	4	5		-	-		6	7
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	200000	400000		-	-		44500	90000
	fHb (mg/dL)	52,62	120,9		-	-		-	-
Glukoz	Konsantrasyon Seviyesi	-	-		-	-		3	6
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	-	-		-	-		6000	44500
	fHb (mg/dL)	-	-		-	-		-	-
Kalsiyum	Konsantrasyon Seviyesi	-	-		-	-		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	-	-		-	-		-	-
	fHb (mg/dL)	-	-		-	-		-	-
BUN	Konsantrasyon Seviyesi	4	-		-	-		-	-
	Hücre sayısı (adet/ μ L)	200000	-		-	-		-	-
	fHb (mg/dL)	-	-		-	-		-	-

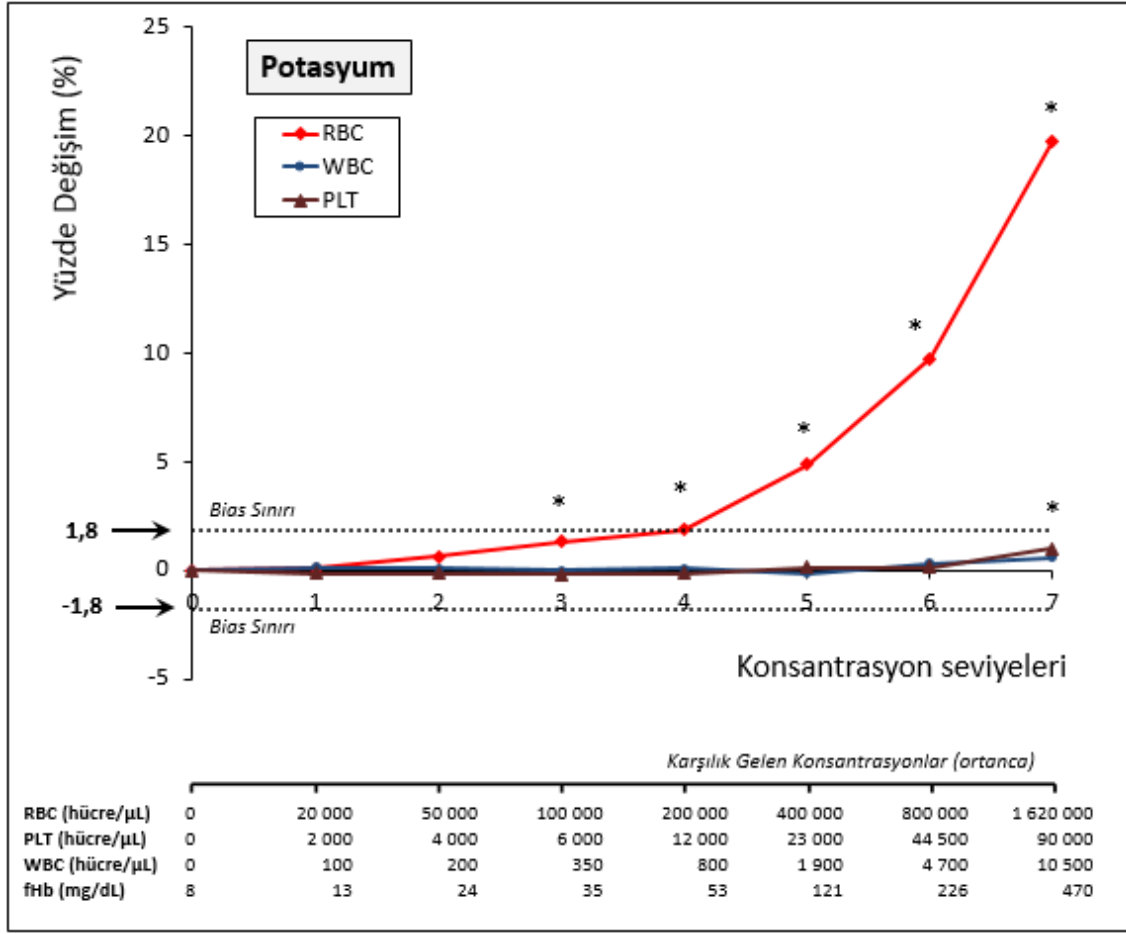
Grafiklerdeki %Bias sınırı, x eksenine paralel kesikli çizgiler (-----) ile gösterilmiştir.



Şekil 8 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının LDH test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfırcı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

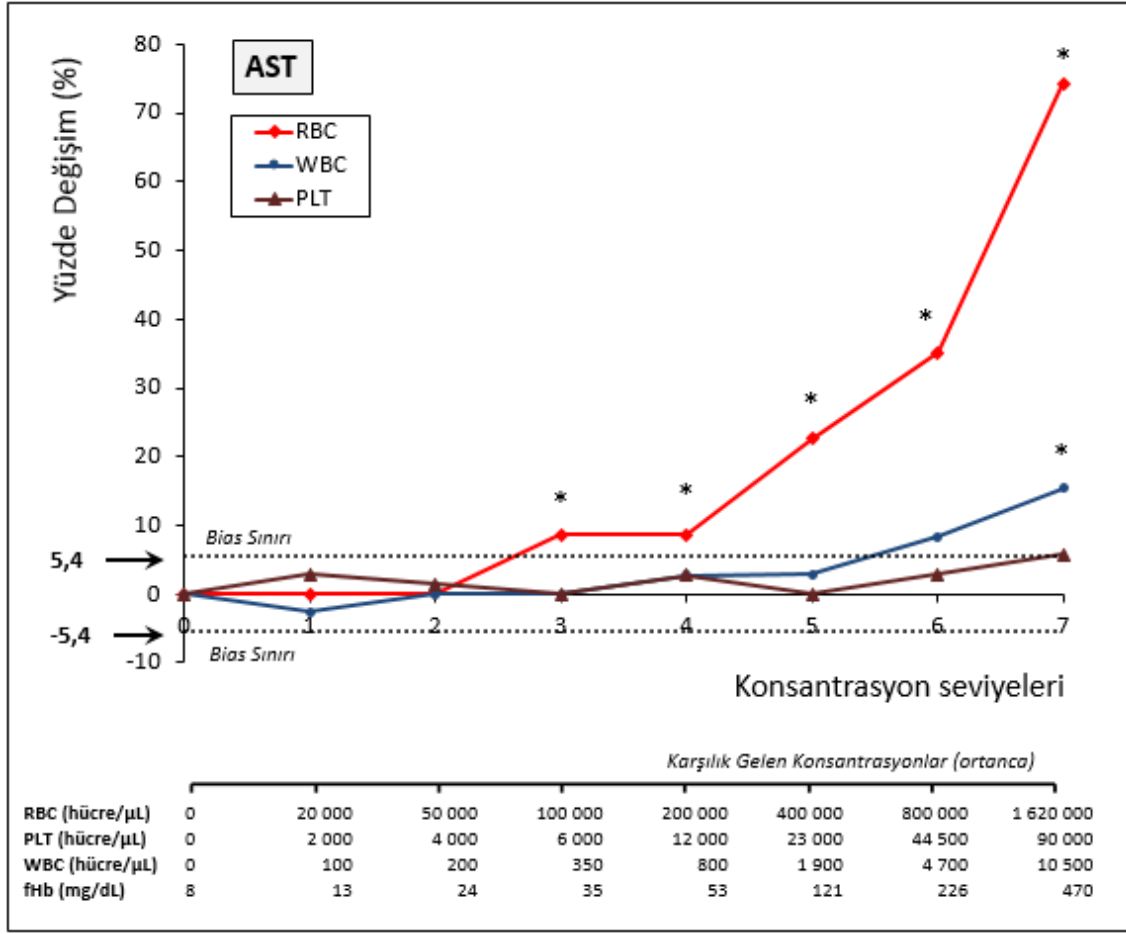
Şekilde, RBC ve PLT süspansiyonlarının LDH test sonuçlarını artırıcı yönde etki ettiği, WBC süspansiyonlarının ise böyle bir etkisinin olmadığı görülmektedir. Grafikte, LDH düzeylerinin, RBC süspansiyonlarının 1. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı ve 2. konsantrasyon seviyesinde ise %Bias sınırını aştığı izlenmektedir. Bununla birlikte, LDH değerleri, PLT süspansiyonlarının 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak artmaya başlamış ve 7. konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırını aşmıştır.



Şekil 9 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının potasyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesi göre anlamlılık düzeyi)

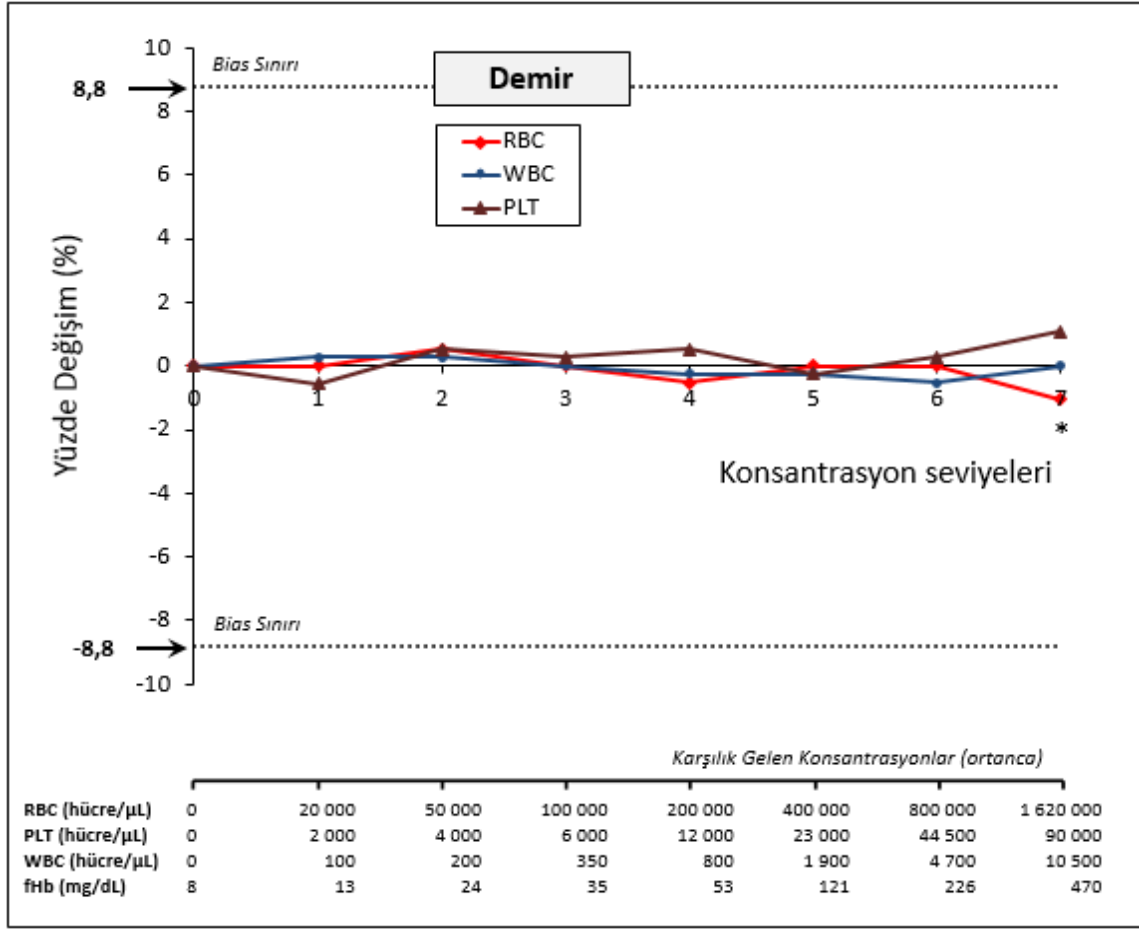
Grafik incelendiğinde; RBC süspansiyonlarının potasyum değerlerini artırıcı yönde etki ettiği, PLT süspansiyonlarının ise sadece son konsantrasyon seviyesinde böyle bir etki gösterdiği görülmektedir. WBC süspansiyonları, ise son konsantrasyon seviyesinde hafif bir artışa neden olmakla birlikte, bu artış anlamlı değildir. Grafikte, potasyum düzeylerinin, RBC süspansiyonlarının 2. konsantrasyon seviyesinden itibaren artmaya başladığı, bununla birlikte artışların 3. konsantrasyon seviyesinden itibaren istatistiksel olarak anlamlı olduğu gözlenmektedir. Bu artış, RBC süspansiyonlarının 4. konsantrasyon seviyesinde %Bias değerini geçmiştir. PLT süspansiyonlarının 7. konsantrasyon seviyesi potasyum test sonuçlarında anlamlı bir artışa neden olmuş, fakat bu konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırını aşmamıştır.



Şekil 10 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının AST test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

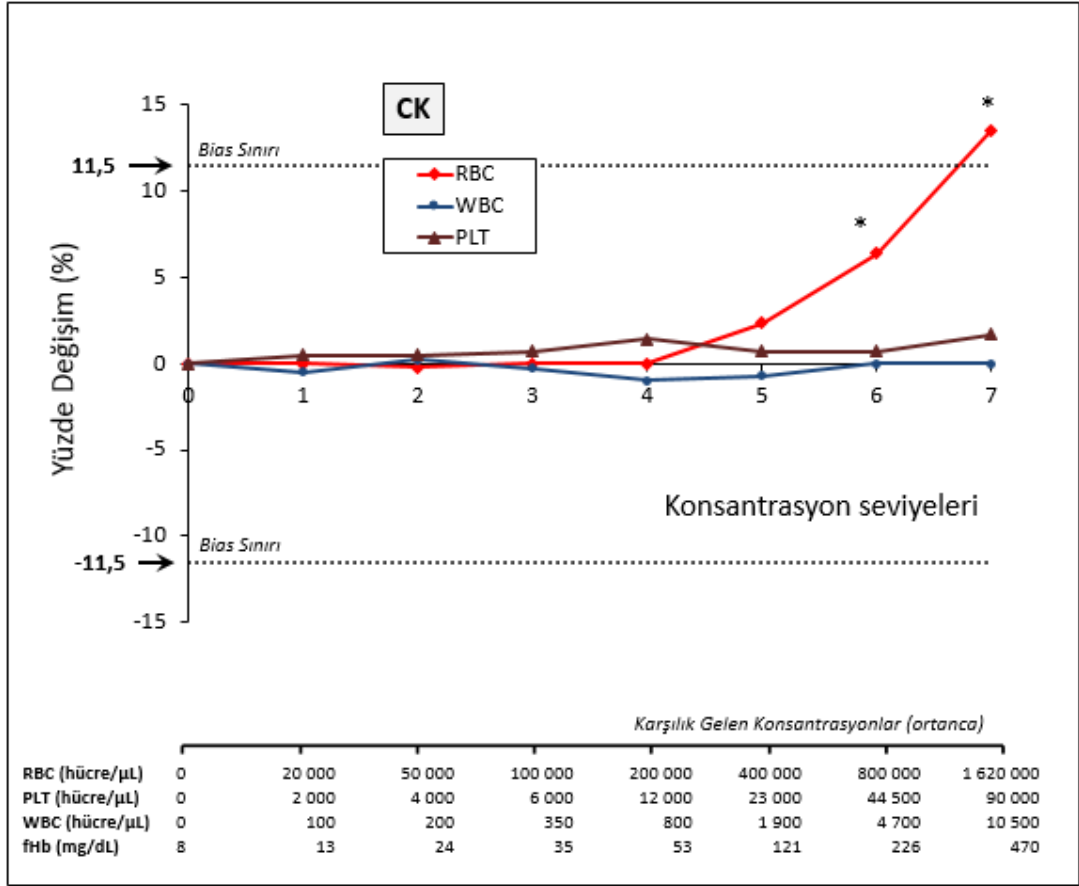
Şekilde; RBC ve WBC süspansiyonlarının AST test sonuçlarını artırıcı yönde etki gösterdiği izlenmektedir. PLT süspansiyonlarının ise sonuçlarda bir dalgalanma meydana getirdiği fakat bu dalgalanmanın hiçbir düzeyde anlamlı olmadığı görülmektedir. Grafikte, AST düzeylerinin, RBC süspansiyonlarının 3. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak artmaya başladığı ve yine bu konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırını aştığı görülmektedir. WBC süspansiyonlarının, AST değerlerini artırıcı etkisi 4. konsantrasyon seviyesinde başlamış olup sadece son konsantrasyon seviyesinde bu artış anlamlıdır ve %Bias sınırını aşmıştır.



Şekil 11 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının demir test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfırıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

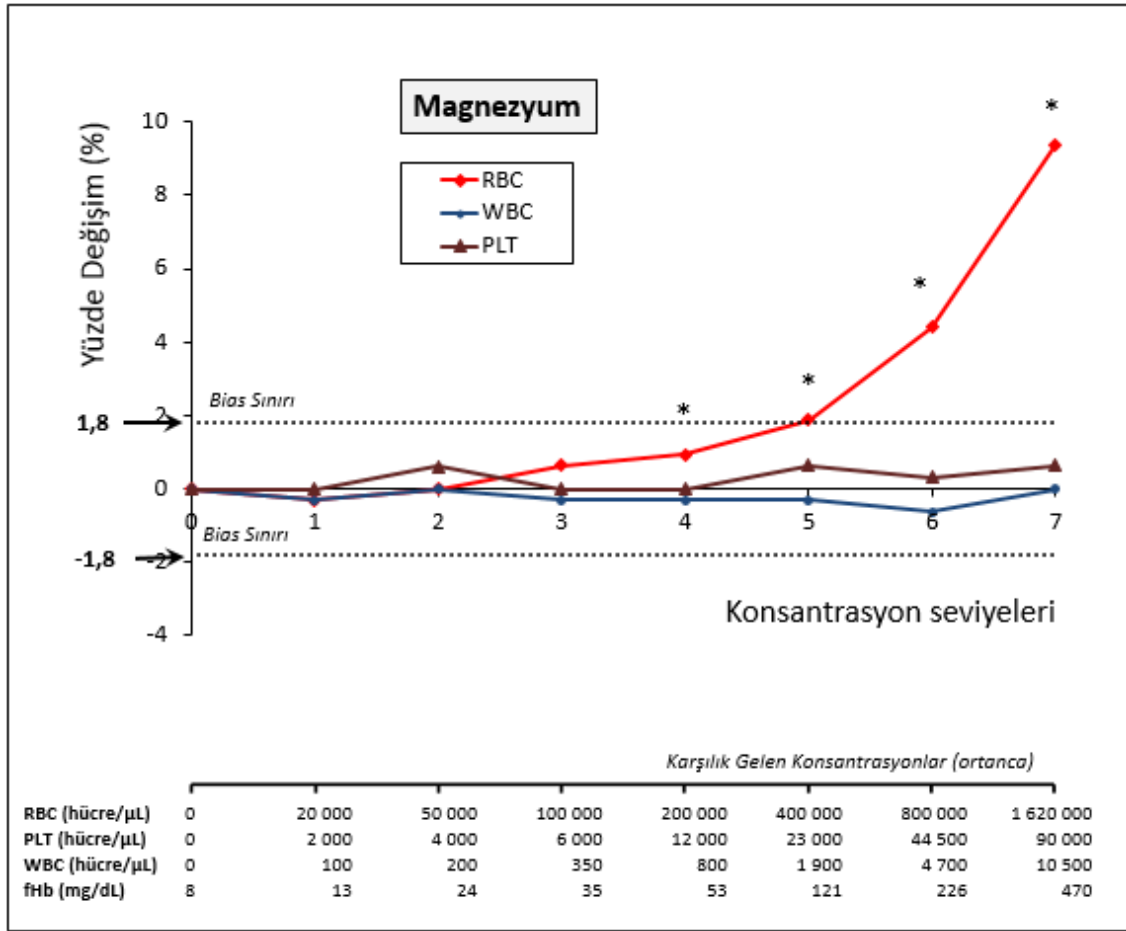
Şekilde; RBC süspansiyonlarının son konsantrasyon seviyesinde demir düzeylerini anlamlı olarak düşürdüğü görülmektedir. Bununla birlikte, bu etki %Bias sınırını geçmemiştir. PLT süspansiyonlarının ise yine son konsantrasyon seviyesinin demir düzeylerini artırıcı yönde etki gösterdiği, bununla birlikte bu artışın anlamlı olmadığı izlenmektedir. WBC süspansiyonları ise, demir test sonuçları üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir.



Şekil 12 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının CK test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfırcı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

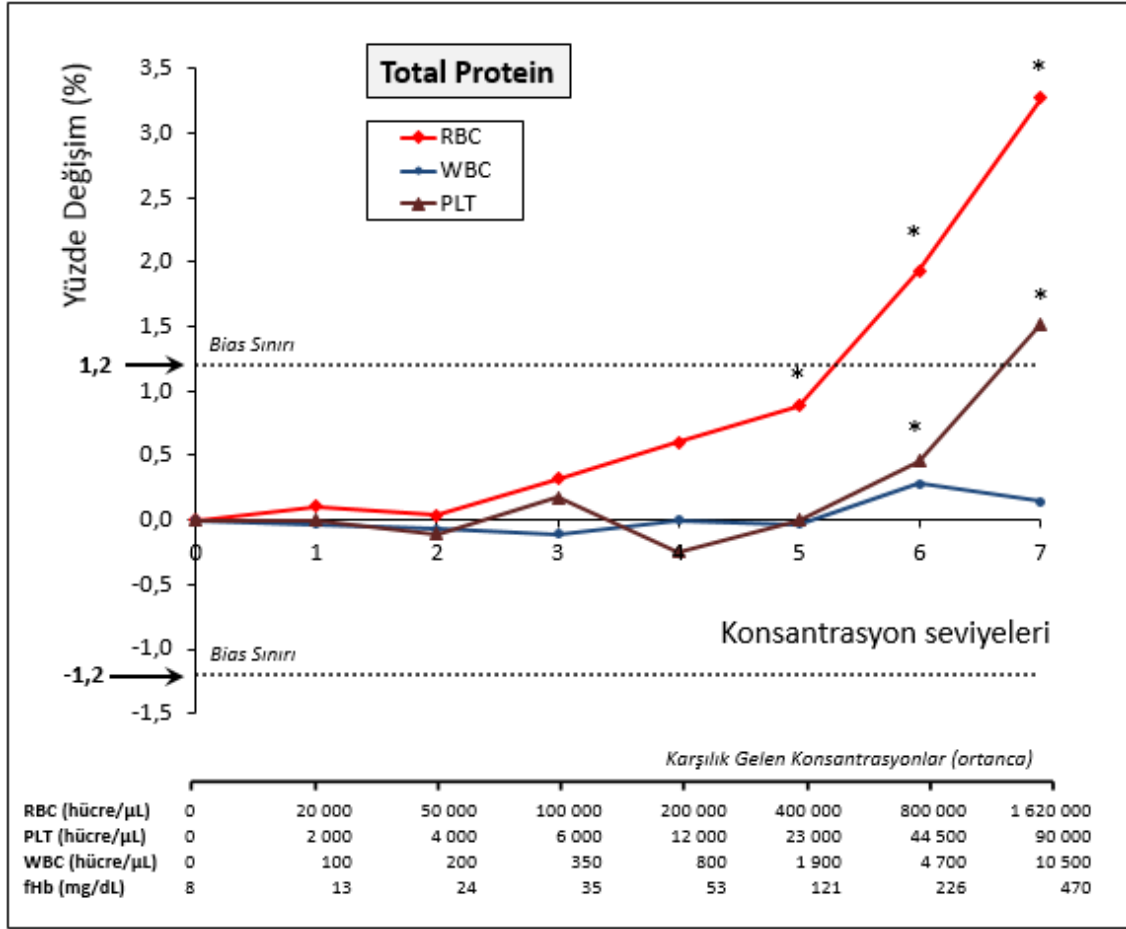
Grafik incelendiğinde; RBC süspansiyonlarının CK test sonuçlarını artırıcı yönde etki gösterdiği, PLT süspansiyonlarının ise sonuçlarda bir dalgalanma meydana getirdiği fakat bu dalgalanmanın hiçbir düzeyde anlamlı olmadığı görülmektedir. Grafikte, CK düzeylerinin, RBC süspansiyonlarının 5. konsantrasyon seviyesinden itibaren artmaya başladığı ve artışın, 6. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olduğu izlenmektedir. Bununla birlikte; bu artırıcı etki 7. RBC konsantrasyon seviyesinde %Bias değerinin aşılmasına neden olmuştur. WBC süspansiyonları ise, CK düzeyleri üzerinde herhangi bir etki yapmamıştır.



Şekil 13 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının magnezyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

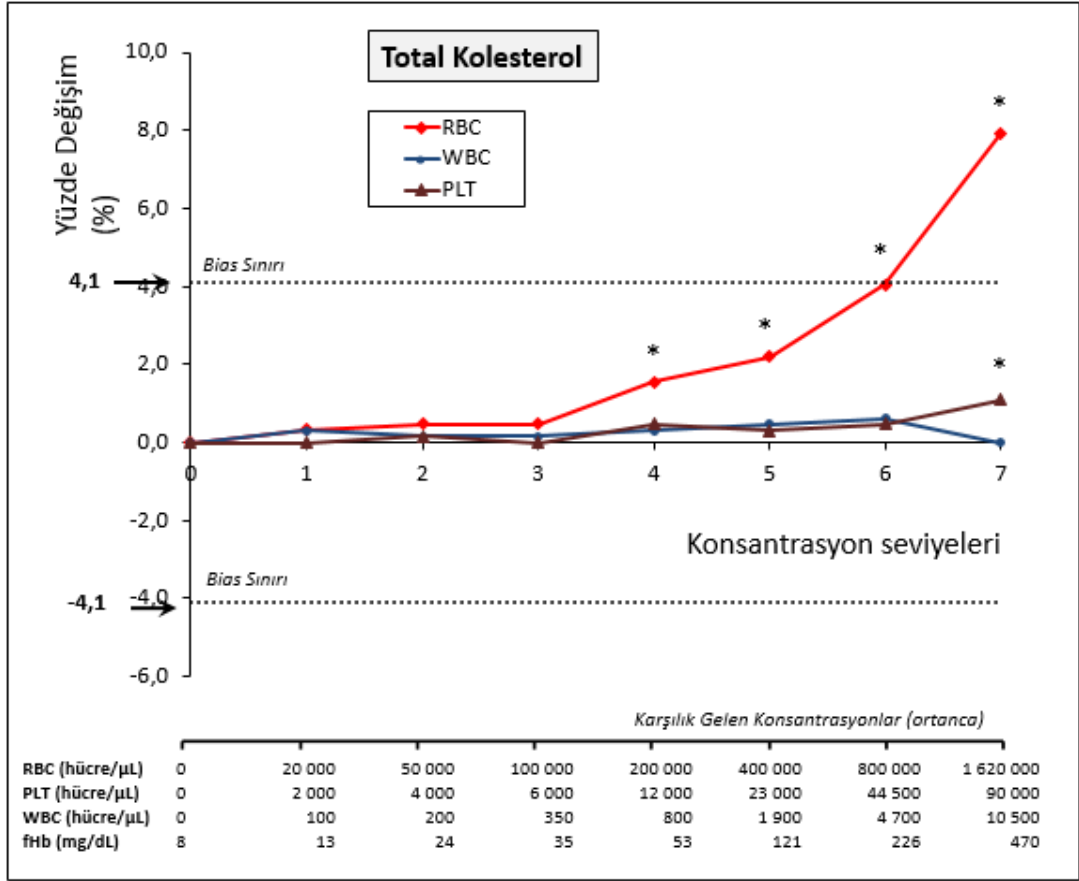
Şekilde; RBC süspansiyonlarının magnezyum düzeylerini artırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. Magnezyum düzeyleri 3. konsantrasyon seviyesinde artmaya başlamış, bu artış 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı hale gelmiştir. Bu artırıcı etki, 5. RBC konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırının aşılmasına neden olmuştur. WBC ve PLT süspansiyonları ise magnezyum test sonuçları üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir.



Şekil 14 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının total protein test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

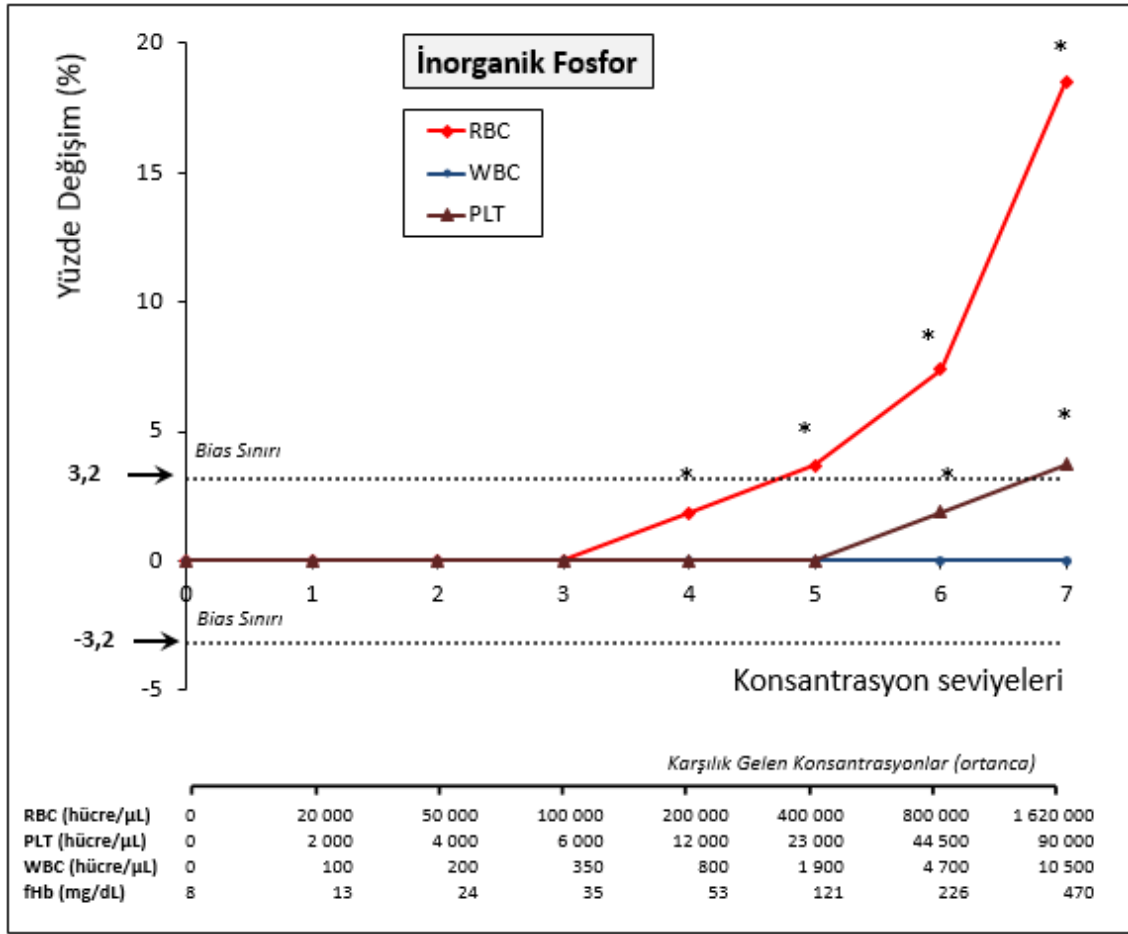
Grafikte görüldüğü gibi, RBC ve PLT süspansiyonları total protein düzeylerine artırıcı yönde etki göstermiştir. RBC süspansiyonlarının etkisi 3. konsantrasyon seviyesinde başlamış, bu etki 5. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı hale gelmiştir. PLT süspansiyonları ise total protein düzeylerini 6. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak arttırmıştır. %Bias sınırı, RBC'lerin 5., PLT'lerin ise 7. konsantrasyon seviyesinde aşılmıştır. WBC süspansiyonları ise total protein test sonuçlarını 6. konsantrasyon seviyesinde hafifçe arttırmış olmakla birlikte bu etki anlamlı değildir.



Şekil 15 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının total kolesterol test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

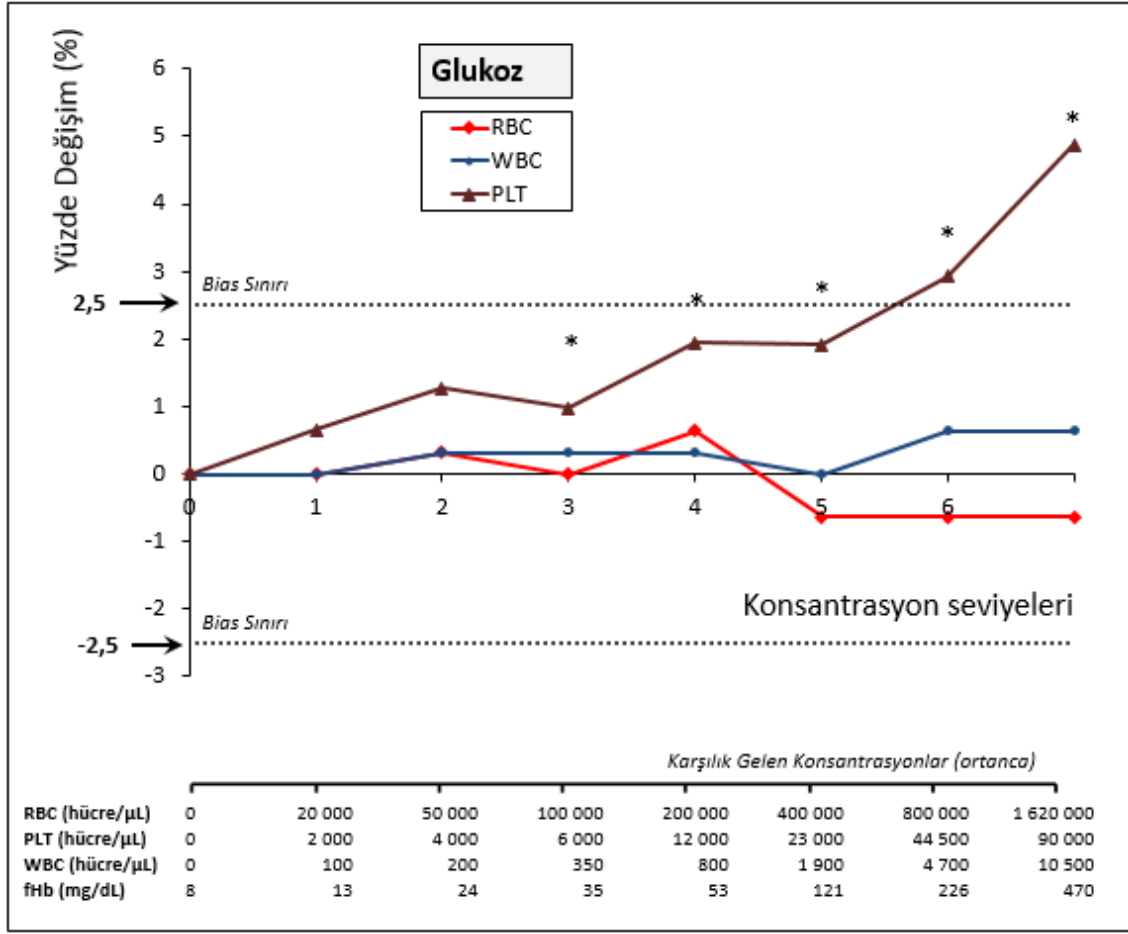
Şekilde, RBC, WBC ve PLT süspansiyonları total kolesterol düzeylerine artırıcı yönde etki etmiştir. RBC süspansiyonlarının etkisi 1. konsantrasyon seviyesinde başlamış, bu etki 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı hale gelmiştir. PLT süspansiyonları ise, total kolesterol düzeylerini 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren artırmaya başlamakla birlikte bu artış son konsantrasyon seviyesinde anlamlı hale gelmiştir. WBC süspansiyonlarının artırıcı etkisi 4. konsantrasyon seviyesinde başlamış, son konsantrasyon seviyesinde bu etki kaybolmuştur. Fakat hiçbir konsantrasyon seviyesinde bu etki anlamlı değildir. %Bias sınırı açısından bakıldığında, bu sınırın RBC süspansiyonlarının 7. konsantrasyon seviyesinde aşıldığı, PLT süspansiyonlarının ise hiçbir düzeyde bu sınırı aşmadığı görülmektedir.



Şekil 16 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının inorganik fosfor test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

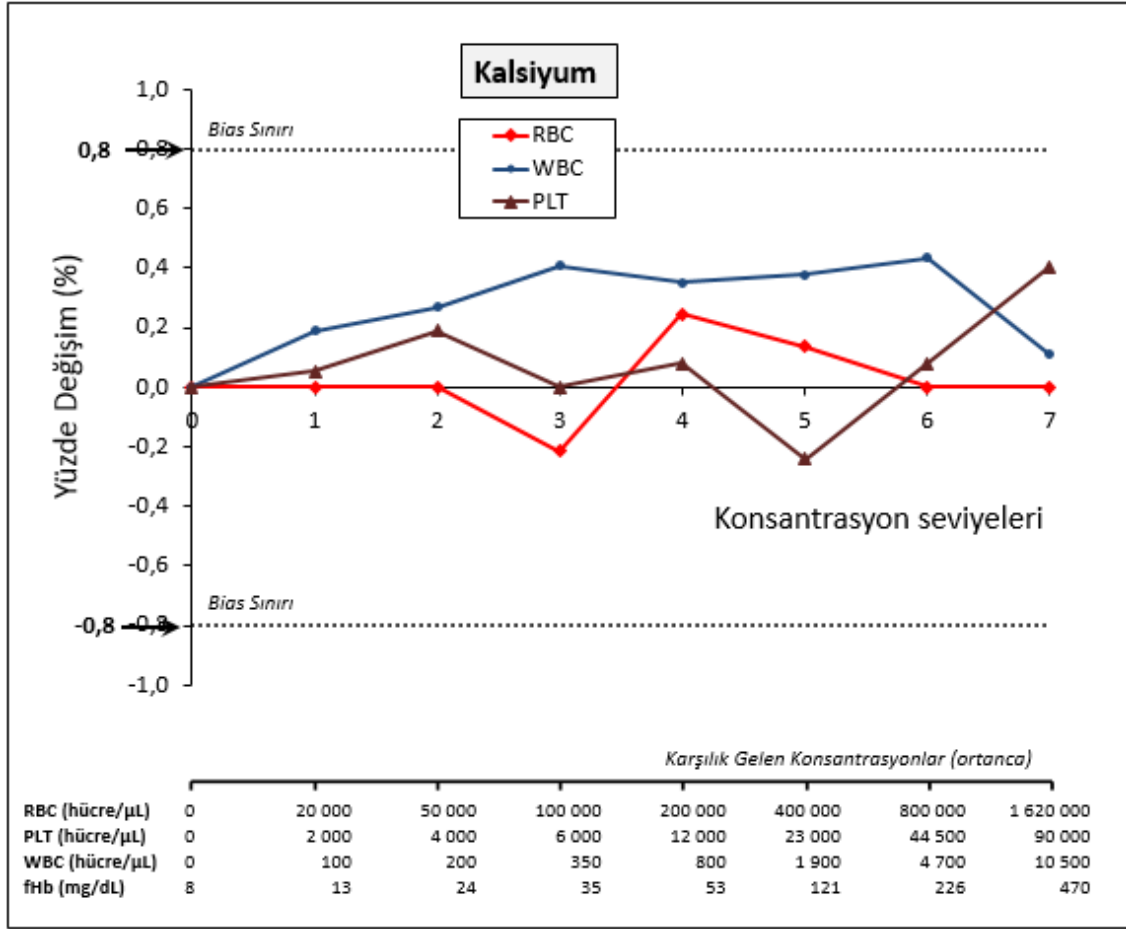
Grafikte görüldüğü gibi, RBC ve PLT süspansiyonları inorganik fosfor düzeyleri üzerinde artırıcı etki göstermiştir. RBC süspansiyonları inorganik fosfor düzeylerini 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak arttırmaya başlamış ve bu artış 5. konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırının aşılmasına neden olmuştur. PLT süspansiyonları ise 6. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı olarak arttırmaya başlamıştır ve 7 konsantrasyon seviyesinde %Bias değerini aşmıştır. WBC süspansiyonları ise inorganik fosfor test sonuçları üzerinde herhangi bir etki göstermemiştir.



Şekil 17 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının glukoz test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

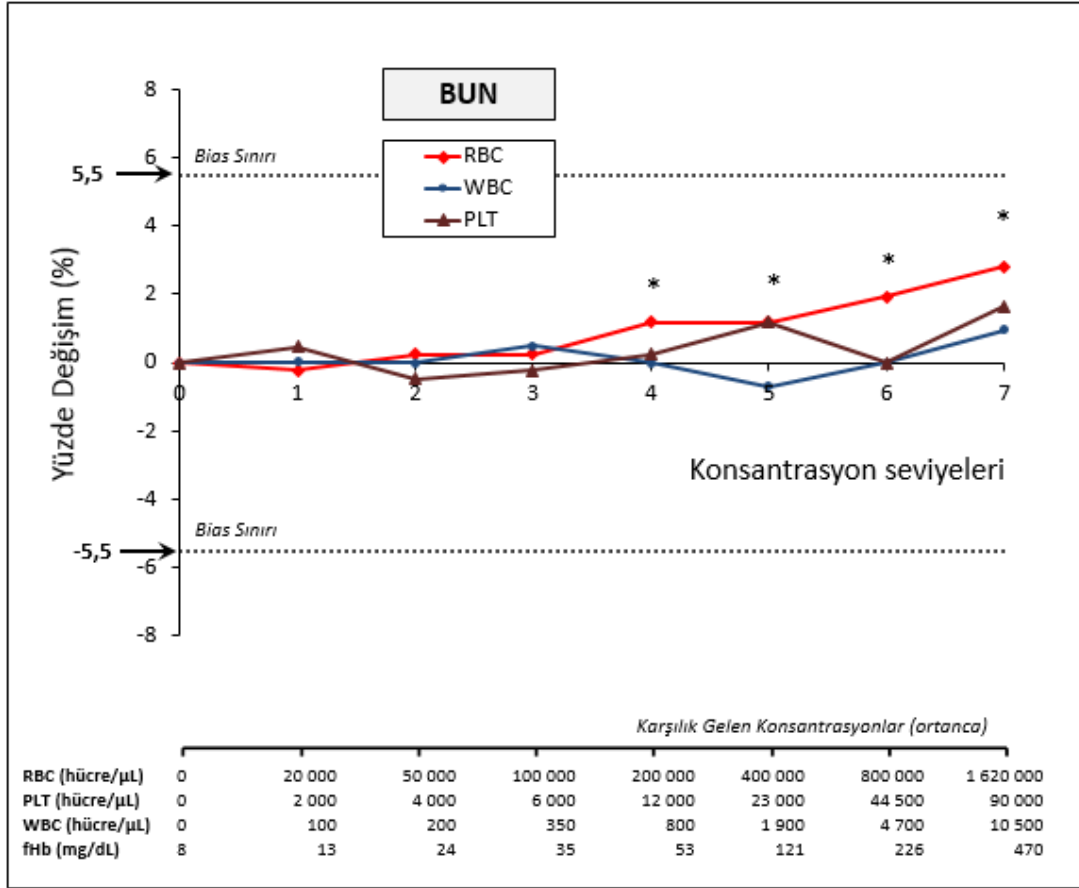
Şekilde, WBC ve PLT süspansiyonlarının glukoz düzeylerine artırıcı yönde etki ettiği görülmektedir. PLT süspansiyonlarının etkisi 1. konsantrasyon seviyesinde başlamış, bu etki 3. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı hale gelmiştir. Bu artırıcı etki, 6. konsantrasyon seviyesinde %Bias değerinin aşılmasına neden olmuştur. WBC süspansiyonları ise, glukoz düzeylerini 2. konsantrasyon seviyesinden itibaren artırmaya başlamış, bu etki 5. konsantrasyon seviyesinde kaybolmuş ve ardından düzeyler tekrar artmıştır. Bununla birlikte, WBC süspansiyonlarının bu etkisi hiçbir düzeyde anlamlı değildir. Fakat hiçbir konsantrasyon seviyesinde bu etki anlamlı değildir. Grafikte, RBC süspansiyonlarının glukoz test sonuçları üzerinde dalgalanma meydana getirdiği, bu etkinin 5. konsantrasyon seviyesinden itibaren düşürücü yönde olduğu görülmektedir. Bununla birlikte, RBC süspansiyonlarının bu etkisi hiçbir düzeyde anlamlı değildir.



Şekil 18 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının kalsiyum test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

Grafikte görüldüğü gibi, WBC süspansiyonları kalsiyum düzeylerinde arttırıcı yönde etki etmiş olup bu etki hiçbir düzeyde anlamlı değildir. RBC ve PLT süspansiyonları ise test sonuçlarında bir dalgalanma meydana getirmiş olup bu etkiler de anlamlı değildir.



Şekil 19 : Hemolize uğratılan RBC, WBC ve PLT süspansiyonlarının BUN test sonuçları üzerindeki etkisinin yüzde değişim şeklinde gösterimi.

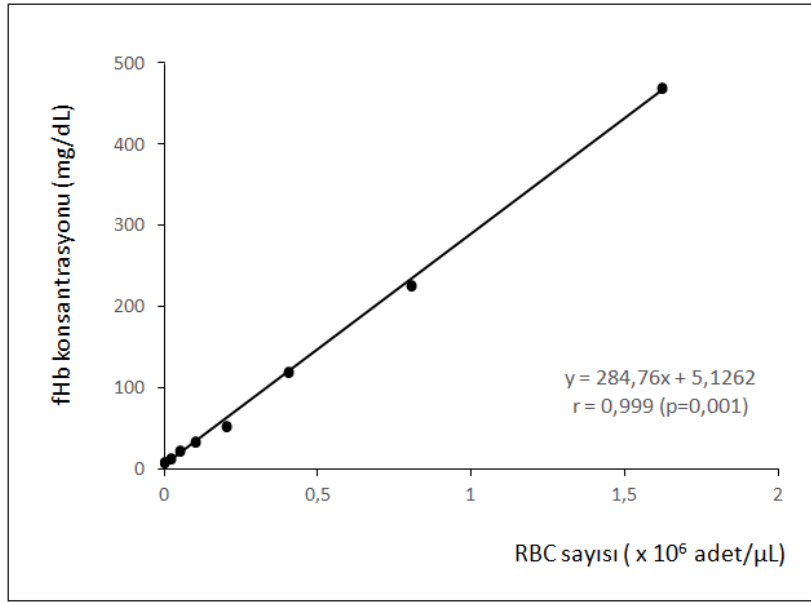
* : $p < 0,05$ (Sıfıncı konsantrasyon seviyesine göre anlamlılık düzeyi)

Şekilde, RBC ve PLT süspansiyonları BUN test sonuçları üzerinde artırıcı yönde etki göstermiştir. RBC süspansiyonlarının etkisi ile BUN düzeyleri ilk konsantrasyon seviyesinde hafifçe düşmüş olmakla birlikte, 2. konsantrasyon seviyesinden itibaren artmaya başlamış, bu artış 4. konsantrasyon seviyesinden itibaren anlamlı hale gelmiştir. PLT süspansiyonları ise; ilk üç konsantrasyon seviyesinde BUN düzeylerinde dalgalanma meydana getirmiş, 4. ve 5. konsantrasyon seviyelerinde artırıcı etki yapmış, bu etki 6. konsantrasyon seviyesinde kaybolmuş ve ardından tekrar arttırmıştır. Bununla birlikte PLT süspansiyonlarının etkisi hiçbir düzeyde anlamlı değildir. WBC süspansiyonları da test sonuçları üzerinde dalgalanma meydana getirmekle birlikte, bu etki bazı konsantrasyon seviyelerinde belirgindir. Bu etkiler, 3. ve 7. konsantrasyon seviyesinde artırıcı yöndeyken, 5. konsantrasyon seviyesinde düzeylerin düşmesine neden olmuştur. Fakat hiçbir konsantrasyon seviyesinde bu etkiler anlamlı değildir.

4.3 AYRIMLANMIŞ HÜCRELERİN LİZİS BELİRTEÇLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.3.1 RBC Lizisinin Belirteci Olan fHb'nin Değerlendirilmesi

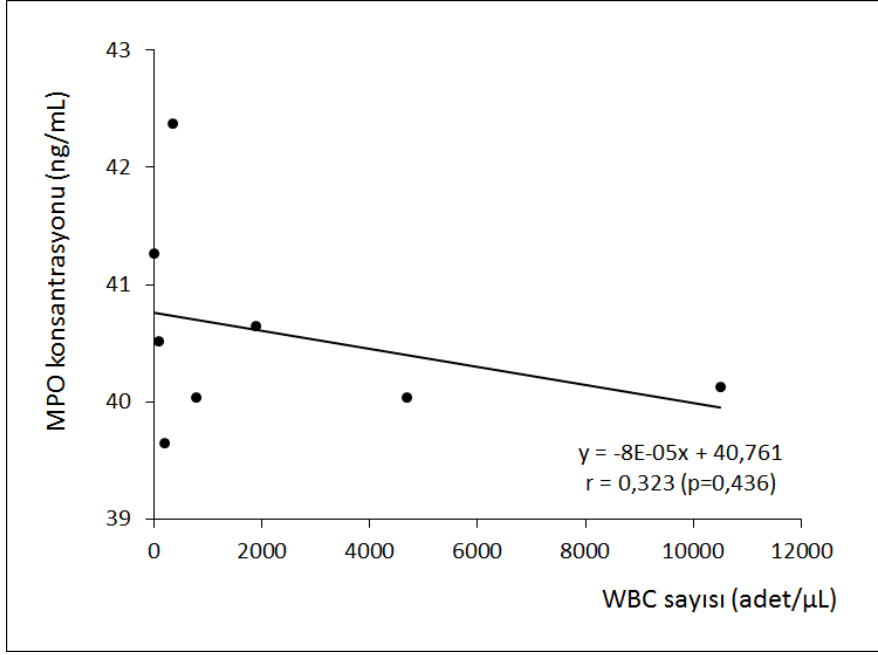
RBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile fHb arasındaki ilişkinin anlamlı olduğu saptandı ve bu ilişkiyi değerlendirmek için çizilen grafikte RBC sayısı ile fHb arasında pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon olduğu gözlemlendi ($r = 0.999$, $p=0.001$) (Şekil 20).



Şekil 20 : RBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile fHb arasındaki ilişki.

4.3.2 WBC Lizisinin Potansiyel Belirteci Olan MPO'nun Değerlendirilmesi

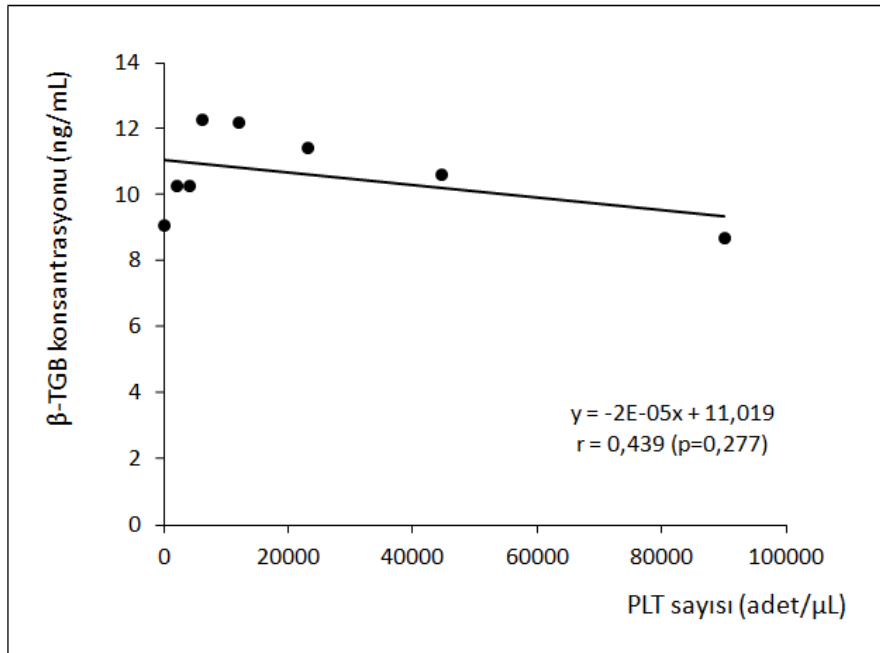
WBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile MPO arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($r=0,323$; $p=0,436$) (Şekil 21).



Şekil 21 : WBC süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile MPO arasındaki ilişki.

4.3.3 PLT Lizisinin Potansiyel Belirteci Olan β -TGB'nin Değerlendirilmesi

PLT süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile β -TGB arasında anlamlı bir ilişki saptanmadı ($r=0,439$; $p=0,277$) (Şekil 22).



Şekil 22 : PLT süspansiyonlarının içerdiği hücre sayısı ile β -TGB arasındaki ilişki.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hemolizli örnekler, klinik laboratuvar uygulamasında en sık saptanan preanalitik hata kaynaklarıdır. Hemoliz, klinik laboratuvarlara gönderilen tüm rutin örneklerin ortalama %3'ü ve kabul edilen tüm uygunsuz örneklerin %39-69'undan sorumludur (7). İn vivo olarak meydana gelebilmesine rağmen; klinik laboratuvarların karşılaştığı başlıca sorun örnek alımını ve sonrasını içeren preanalitik evrede meydana gelen in vitro hemolizdir (5).

Hemolizli örneklerden kaynaklanan interferans, Hb ve diğer intrasellüler içeriğin ekstrasellüler sıvıya boşalmasına dayanır. Burada, üç interferans mekanizması rol oynamaktadır: (a) analitlerin intrasellüler ve ekstrasellüler konsantrasyon farklarından kaynaklanan interferans, (b) kimyasal interferans ve (c) spektrofotometrik interferans (8). Bu temel mekanizmalarla oluşan hemolizin sebep olduğu interferansın laboratuvar test sonuçlarına etkisi çok değişken olabilmektedir (19–23). Hemolize sebep olan etkenler ve bunlarla ilgili alınması gereken önlemler konusunda çok sayıda araştırma yapılmış olmasına rağmen, test sonuçlarında hemolize bağlı oluşan bu değişkenliğin olası mekanizmaları yeterince araştırılmamıştır.

Hemolizin tanımı ile ilgili bir fikir birliği bulunmamaktadır. Bazı yazarlar hemolizi sadece RBC'ler ile sınırlamaktadır (eritroliz) (10–12). Diğerleri ise tüm kan hücrelerinin parçalanması, yani pansitoliz anlamında kullanılmaktadırlar (9,13–16). Bununla birlikte, hemolize WBC ve PLT'lerin katkıda bulunduğundan bahseden yazarlar da bulunmaktadır (15,16,146). Hacimleri, sayıları ve bileşimleri RBC'lerden farklı olan bu hücrelerin de biyokimyasal test sonuçlarına etki edebileceği akılda tutulmalıdır (68,80,85).

Birçok klinik laboratuvar, örnekteki hemoliz miktarını tutarlı olarak saptamak amacıyla subjektif bir yöntem olan görsel değerlendirme yerine, hemoliz indeksi adı verilen otomatize spektrofotometrik ölçümleri kullanmaktadır (11). Fakat; sadece örnekteki fHb varlığına dayanan semikantitatif bu testin, hemoliz interferansının saptanmasında RBC'ler dışındaki kan hücrelerinin etkisini yansıtmayacağı da öngörülebilir.

Potasyum ölçümlerinin sıklığı ve kandaki denge bozukluklarının (hipokalemi veya hiperkalemi) yanlış tanısının ciddi sonuçları nedeniyle hemolizli örneklerde potasyum sonuçlarına yaklaşım açısından çeşitli seçenekler araştırılmıştır. Hemolizli örneklerle ait test sonuçlarının reddi, tanıda gecikmelere neden olarak hasta güvenliğini tehlikeye atabilmekte; hastadan tekrar kan alınması ise artmış iş yükü ve laboratuvarlar için artmış maliyet

getirmektedir (8). Bu nedenle; bazı çalışmalar, ölçülen potasyum konsantrasyonları üzerinde in vitro hemolizin etkisini hesaplamak için düzeltme faktörlerinin kullanımını desteklemektedir (19,25–27). Bununla birlikte, önerilen düzeltme faktörleri arasındaki değişkenlik korkutucudur (8,24). Ayrıca; in vivo hemoliz durumlarında da potasyum düzeyleri gerçekte arttığından, bu durum dışlanana dek bu düzeltme faktörlerinin kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir (139). Literatürde benzer şekilde LDH, direkt bilirubin, GGT, ALP gibi başka biyokimyasal testler için düzeltme faktörlerinin kullanımını öneren yayınlar da bulunmakla birlikte rutin uygulamada kullanım yeri bulamamıştır (19,139,141). Test sonuçlarındaki hatayı düzeltmesi hedeflenen bu faktörlerin kullanımındaki başarısızlığın zemininde de, hemolizin oluşturduğu interferansın laboratuvar test sonuçlarına etkisinin değişken olması yatıyor olabilir.

Bu araştırmanın amacı, hemolizin biyokimyasal testlere etkisindeki değişkenliğin bir sebebi olarak düşünülen, hemolize uğrayan hücre tipi ve sayısının etkisini ortaya koymaktır. Bunun için bu çalışmada; serum örneklerine in vitro hemolize uğratılmış olan farklı tip ve sayıda ayrımlanmış hücrelerden oluşturulmuş hemolizatlar eklenerek, hemolizin bazı biyokimyasal test sonuçları üzerindeki etkisi deneysel bir modelle incelenmiştir. Hemolizatların hücre ayrılması ve saflaştırılması sonrası elde edilmiş hücre süspansiyonlarından oluşturulmuş olması nedeniyle özgün bir değere sahiptir. Ayrıca; serum örneğinde, in vitro hemoliz miktarının saptanması için fHb'den farklı potansiyel belirteçlerin ortaya konması da hedeflenmiştir.

Bu çalışmada; ayrımlanmış ve olabildiğince saflaştırılmış RBC, WBC ve PLT'lerden elde edilen hücre süspansiyonlarının hemolizinin 12 biyokimyasal test sonuçlarına etkisi incelendi. Literatürde ayrımlanmış hücre hemolizatlarının kullanıldığı interferans çalışması bulunmamaktadır. Dimeski ve arkadaşları, tarafından yapılan çalışmada potasyum test sonuçları üzerinde kan hücrelerinin ayrı ayrı etkilerini değerlendirmek için 41 kişiden lityum heparinli tam kan örnekleri alınmıştır (13). Bu örneklerin RBC, WBC, PLT sayıları ve Hb değerleri kan sayım otoanalizöründe saptanmıştır. Örneklerin RBC sayılarının 2420000 - 6770000 adet/ μ /L, WBC sayılarının 3000 – 300000 adet/ μ /L ve PLT sayılarının 31000 – 710 000 adet/ μ /L aralığında olduğu tespit edilmiş ve Hb aralığı 8- 17,3 g/dL olarak saptanmıştır. Ardından; kan örnekleri 21 *gauge*'luk iğneden geçirilerek 1'i hemolizsiz olmak üzere 5 farklı konsantrasyonda fHb içeren plazma örneği elde edilmiş ve bu örneklerin potasyum ile hemoliz indeksleri ölçülmüştür. Sonrasında hemoliz indeks birimi başına potasyum

düzeylerinin değişimi hesaplanmış ve bu değerlerin hücre sayısına karşı grafikleri çizilmiştir. Buradan yola çıkarak araştırmacılar; PLT'lerin potasyum düzeylerinin artışına katkısının az olduğunu, WBC sayısındaki belirgin yüksekliklerin ise potasyum düzeylerinin artışına katkıda bulunabileceğini öne sürmüşlerdir. Bizim çalışmamızda saflaştırma aşamasında hedeflediğimiz WBC sayılarına ulaşmış olmakla birlikte süspansiyonlarının diğer hücrelerle yüksek oranda kontamine olması nedeniyle net bir sonuç elde edemedik. Herhangi bir interferansa yol açmayacak şekilde farklı saflaştırma işlemleri denenerek çok daha saf ve hatta alt fraksiyonlarına ayrılmış WBC süspansiyonları elde edilebildiğinde belki de bu etki net bir şekilde gösterilebilir. Diğer taraftan, yüksek saflıkta elde ettiğimiz PLT süspansiyonlarının yaklaşık 90000 adet/ μ L PLT'nin lizisi durumunda potasyum düzeyleri üzerinde artırıcı etkiye yol açtığını ve dolayısıyla bunun da ancak PLT sayılarının 1000000 adet/ μ L'nin üzerine çıktığı trombositoz durumlarında söz konusu olabileceğini saptamakla birlikte, süspansiyonlar derin dondurucuya kaldırılana kadar geçen süre boyunca PLT içindeki potasyumun dışarı sızmasından kaynaklanan bir kayıp da olabileceği akılda tutulmalıdır (147).

Çalışmamızda, hemolizin test sonuçları üzerindeki etkisi, sonuçların serum fizyolojik eklenmiş bazal hemolizsiz serum değerlerine göre yüzde değişimi hesaplanarak değerlendirildi. Bu değerlendirmede, yüzde değişimin istatistiksel olarak anlamlı değişim gösterdiği **analitik eşik** seviyeler ve %Bias sınırı da dikkate alınarak saptanan klinik açıdan anlamlı **klinik eşik** seviyeler tespit edildi (144) (Tablo 19). %Bias sınırları, “*Analytical Quality Commision from the Spanish Society of Clinical Chemistry and Molecular Pathology (SEQC)*”nin hazırladığı ve birey-içi ve bireyler-arası biyolojik varyasyonun da değerlendirildiği geniş çaplı bir veritabanı çalışmasından alınan değerlerdir(145)(Şekil 8-18). Bu değerler, Westgard'ın 2014 yılında güncelleyip yayınladığı %Bias değerleriyle çok büyük benzerlik göstermektedir (148). 12 biyokimyasal test parametresinin; her hücre tipi ve konsantrasyon seviyesi için hesaplanan ve istatistiksel olarak anlamlı bulunan yüzde değişim değerleri, %Bias sınırıyla karşılaştırıldı ve klinik olarak anlamlı değişime yol açan konsantrasyon seviyeleri tespit edildi. Hemolizin etkisi açısından kabul edilebilir sınırlar, geleneksel olarak analit sonucunun bazale göre %10 değişimi şeklinde kabul edilmiştir (4). Bununla birlikte; bu sınırın analitin biyolojik varyasyonu da dikkate alınarak belirlenmesi daha uygun bir yaklaşım olabilir (149). Lippi ve arkadaşları, bu yaklaşımı önermektedir (10,142).

Köseoğlu ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, hemolizin 25 adet biyokimyasal test sonucu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada, heparinli tüpe alınan kan örnekleri 21 *gauge*'luk iğneden geçirilerek mekanik olarak hemolize uğratılmış ve 5 farklı seviyede fHb içeren plazma örnekleri elde edilmiştir [Grup I : 0-10 mg/dL (hemolizsiz), Grup II : 10-50 mg/dL (çok hafif hemolizli), Grup III : 51-100 mg/dL (hafif hemolizli), Grup IV : 101-250 (orta hemolizli), Grup V : 250-450 (şiddetli hemolizli)] (150). Grupların fHb konsantrasyonlarının ortancaları ise sırasıyla; 2, 27, 75, 127 ve 334 mg/dL olarak verilmiştir. Ayrıca, çalışmamızdaki ile benzer olan Olympus AU2700 (Beckman Coulter, Inc, Miami, Florida, USA) otoanalizörüyle analizler gerçekleştirilmiş ve bizimle aynı şekilde firmanın orijinal reaktifleri kullanılmıştır. AST ve magnezyum dışında; bizim kullandığımız yöntemlerle gerçekleştirilmiştir. %Bias sınırları olarak da çalışmamızdaki aynı değerler kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları testler açısından karşılaştırıldığında; **LDH** düzeylerindeki yüzde değişim “çok hafif hemolizli” gruptan (Grup II) başlayarak anlamlı olarak artmış ve hatta bu seviyeden itibaren %Bias sınırını aşmıştır; fakat bu düzeydeki hemoliz miktarı (fHb=27 mg/dL), çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (1. konsantrasyon seviyesi, fHb =13,22 mg/dL) daha yüksektir (Tablo 18, Şekil 8) ve bizim %Bias sınırını aştığı düzeyden (2. konsantrasyon seviyesi, fHb=23,46 mg/dL) daha geçtir. Ayrıca; en yüksek hemoliz seviyesinin olduğu “şiddetli hemolizli” grup (Grup V, fHb=334 mg/dL)’un LDH düzeylerinde %371,6 artış meydana gelmiştir; fakat bu düzeydeki LDH değişimi, çalışmamızdaki en yüksek RBC hemoliz seviyesindeki (7. konsantrasyon seviyesi, fHb=470 mg/dL) LDH değişimi olan %190’dan daha yüksektir. (Tablo 18). PLT süspansiyonlarının da, 4. konsantrasyon seviyesinden (PLT=12000 adet/ μ L) itibaren LDH sonuçları üzerinde artırıcı yönde etki göstermesi bu artışa katkıda bulunduğunu düşündürmektedir (Tablo 18-19, Şekil 8). Hatta 7. konsantrasyon seviyesinden (PLT=90000 adet/ μ L) itibaren %Bias sınırını aşmaktadır (Tablo 18-19, Şekil 8). Buna göre; PLT sayısının aşırı arttığı (>1 milyon/ μ L) miyeloproliferatif hastalıklarda, LDH test sonuçlarındaki artışa trombosit parçalanmasının ciddi katkı yapabileceği ve RBC’lerin katkısına gerek kalmadan %Bias sınırının aşılmasına yol açabileceği öngörülebilir. **Potasyum** düzeylerindeki yüzde değişim “çok hafif hemolizli” gruptan (Grup II) başlayarak anlamlı olarak artmış ve hatta bu seviyeden itibaren %Bias sınırını aşmıştır. Fakat bu düzeydeki hemoliz miktarı (fHb=27 mg/dL), çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (3. konsantrasyon seviyesi, fHb =34,53 mg/dL) daha düşüktür ve çalışmamızdaki %Bias sınırını

aştığı düzeyden (4. konsantrasyon seviyesi, fHb=52,62 mg/dL) daha erkendir (Tablo18-19, Şekil 9). PLT süspansiyonları da, 7. konsantrasyon seviyesinden (PLT=90000 adet/ μ L) itibaren potasyum sonuçlarını anlamlı düzeyde arttırmış ve fakat %Bias sınırını aşmamıştır (Tablo18-19, Şekil 9). **AST** düzeylerindeki yüzde değişim “çok hafif hemolizli” gruptan (Grup II) başlayarak anlamlı olarak artmış ve hatta bu seviyeden itibaren %Bias sınırını aşmıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı (fHb=27 mg/dL), çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı ve aynı zamanda %Bias sınırının aşıldığı düzeyle (3.konsantrasyon seviyesi, fHb =34,53 mg/dL) oldukça benzerlik göstermektedir. Bununla birlikte, AST ölçümleri açısından yöntemsel farklılık olduğu da dikkate alınmalıdır (Tablo 18-19, Şekil 10). WBC süspansiyonları da, 7. konsantrasyon seviyesinden (WBC=10500 adet/ μ L) itibaren AST sonuçlarını anlamlı düzeyde arttırmış ve sonuçlar bu düzeyde %Bias sınırını aşmıştır. Fakat; AST testi için son konsantrasyon seviyesinde WBC’lerin sonuçları artırıcı yönde anlamlı bir etkiye sahip olduğu gösterilmekle birlikte, düşük konsantrasyon seviyelerinden itibaren AST’yi artırıcı etkisi saptanmış olan ve son WBC konsantrasyon seviyesini %44 gibi yüksek bir oranla kontamine eden RBC’lerin varlığı nedeniyle %15,4 oranındaki bu artışı WBC’lere atfetmek doğru olmayacaktır (Tablo 18-19, Şekil 10). PLT süspansiyonlarının ise, AST sonuçlarına etkisi görülmemektedir. **Demir** düzeylerinde hiçbir seviyede anlamlı bir etki saptanmamışken, çalışmamızda 7. RBC konsantrasyon seviyesinde (fHb= 470,25 mg/dL) %Bias sınırını aşmayan anlamlı bir düşüş saptandı (Tablo 18-19, Şekil 11). PLT’lerin ise, demir düzeylerine anlamlı bir etki yapmadığı görüldü (Tablo 18-19, Şekil 11). **CK** düzeylerindeki yüzde değişim “hafif hemolizli” gruptan (Grup III, fHb=75 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak artmış ve “orta hemolizli” gruptan (Grup IV, fHb=127 mg/dL) başlayarak %Bias sınırını aşmıştır. Bununla birlikte; araştırmacıların yüzde değişim sonuçlarına bakıldığında Grup IV ve Grup V’e karşılık gelen yüzde değişimler sırasıyla %20,1 ve %16,7’dir ve bir dalgalanma söz konusudur. Fakat bu düzeydeki hemoliz miktarları, çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (6. konsantrasyon seviyesi, fHb = 226,24 mg/dL) daha düşüktür ve %Bias sınırını aşmaya başladığı düzeyden (7. konsantrasyon seviyesi, fHb=470,25 mg/dL) daha erkendir (Tablo 18-19, Şekil 12). PLT’lerin ise CK düzeylerine anlamlı bir etki yapmadığı görüldü. Bununla birlikte; PLT süspansiyonlarının yıkanamamış olmasından dolayı CPDA antikoagülanıyla kontaminasyon gerçekleşmiş olabileceğinden yola çıkarak, CK testinin ölçümünün magnezyum iyonları gerektirmesi ve antikoagülanın içindeki sitratın bu iyonları bağlayıp CK

sonuçlarının artmasını engellemiş olabileceği düşünülebilir (147). **Magnezyum** düzeylerindeki yüzde değişim incelendiğinde, “şiddetli hemolizli” grup (Grup V, fHb=334 mg/dL)’ta %Bias değerini aşan anlamlı bir artış saptamışken, çalışmamızda 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=52,62 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak artmış ve 5. RBC konsantrasyon seviyesinden başlayarak (fHb=226,24 mg/dL) %Bias sınırını aşmıştır (Tablo 18-19 Şekil 13). Etkinin başladığı fHb konsantrasyonunun farklı olmasının nedenlerinden biri yöntemsel farklılık olabilir. Ayrıca; PLT’lerin ise magnezyum düzeylerine anlamlı bir etki yapmadığı görülmüştür. Fakat, PLT’lerin yıkanamamasından dolayı, antikoagülan olarak kullanılmış olan CPDA’nın kontaminasyonu nedeniyle içerdiği sitrattan dolayı magnezyum iyonlarını şelatlayıp PLT süspansiyonlarının sonuçlarda anlamlı etki yapmasını engellemiş olabileceği akılda tutulmalıdır. **Total protein** düzeylerindeki yüzde değişim “şiddetli hemolizli” gruptan (Grup V, fHb=334 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak artmış ve %Bias sınırını aşmıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı, çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (5.konsantrasyon seviyesi, fHb =120,9 mg/dL) daha yüksek (Tablo 18-19, Şekil 14) ve çalışmamızdaki %Bias sınırını aştığı düzeyden (6. konsantrasyon seviyesi, fHb=226,24 mg/dL) daha geçtir (Tablo18-19, Şekil 14). Çalışmamızda test sonuçlarının daha düşük seviyelerde etkilendiği saptanmakla birlikte, her iki çalışmada da bu testin en yüksek fHb konsantrasyonlarında (Grup V ve RBC’nin 7. konsantrasyon seviyesi) %3 civarında etkilendiği görülmüştür (Tablo18-19, Şekil 14). PLT süspansiyonları da, 6. konsantrasyon seviyesinden (PLT=44500 adet/ μ L) itibaren total protein sonuçlarını anlamlı düzeyde arttırmış ve 7. konsantrasyon seviyesinden (PLT=90000 adet/ μ L) itibaren bu düzeyde %Bias sınırını aşmıştır. Trombositoz gibi PLT sayısının arttığı durumlarda bu hücrelerin total protein düzeyleri üzerinde etki yapabileceği öngörülebilir. **Total kolesterol** düzeylerindeki yüzde değişim, “hafif hemolizli” gruptan (Grup III, fHb=75 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak artmış ve “şiddetli hemolizli” grup (Grup V, fHb=334 mg/dL)’ta %Bias sınırını aşmıştır. Araştırmacıların anlamlı artışı saptadıkları hemoliz seviyesi, çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (4. konsantrasyon seviyesi, fHb=52,62 mg/dL) daha yüksektir (Tablo 18-19, Şekil 15). Araştırmacıların %Bias sınırını aştıkları hemoliz seviyesi de, çalışmamızdaki düzeyden (7. konsantrasyon seviyesi, fHb=470,25 mg/dL) daha erkendir (Tablo18-19, Şekil 15). Çalışmamızda test sonuçlarının daha yüksek seviyede klinik açıdan etkilenmeye başladığı saptanmakla birlikte, her iki çalışmada da en yüksek fHb konsantrasyonlarına sahip

seviyelerde %Bias sınırının aşıldığı görülmektedir (Tablo 18-19, Şekil 15). PLT süspansiyonlarının da, 7. konsantrasyon seviyesinden (PLT=90000 adet/ μ L) itibaren arttırıcı bir etkisinin saptanmış olması, PLT sayısının çok arttığı hastalıklarda yanlış yüksek sonuçlara katkıda bulunabilir. **İnorganik fosfor** düzeylerindeki yüzde değişim “hafif hemolizli” gruptan (Grup III, fHb=75 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak artmıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı, çalışmamızdaki RBC süspansiyonlarında anlamlı artışın başladığı düzeyden (4.konsantrasyon seviyesi, fHb =52,62 mg/dL) daha yüksektir (Tablo 18-19, Şekil 16). Araştırmacılar, “orta hemolizli” grup (Grup IV, fHb=127 mg/dL)’tan itibaren %Bias sınırının aşıldığını saptamış olup bu düzey çalışmamızdaki %Bias sınırının aşıldığı seviye (5. konsantrasyon seviyesi, fHb=120,9 mg/dL) ile benzerdir. (Tablo18-19, Şekil 16). PLT süspansiyonları da, 6. konsantrasyon seviyesinden (PLT=44500 adet/ μ L) itibaren inorganik fosfor sonuçlarını anlamlı düzeyde arttırmış ve 7. konsantrasyon seviyesinde (PLT=90000 adet/ μ L) %Bias sınırını aşmıştır. Fakat bu durum, antikoagülan olarak kullanılan ve fosfat içeren CPDA’nın yıkanmamış PLT süspansiyonlarını kontamine etmesinden kaynaklanabilir. **Glukoz** düzeylerindeki yüzde değişim “çok hafif hemolizli” gruptan (Grup II, fHb=27 mg/dL) başlayarak anlamlı olarak düşmüş ve “şiddetli hemolizli” gruptan (Grup V, fHb=334 mg/dL) başlayarak %Bias sınırını aşmıştır. Fakat çalışmamızda RBC süspansiyonlarının glukoz test sonuçlarına anlamlı bir etkisi olmadığı saptanmıştır (Tablo 18, Şekil 17). PLT süspansiyonlarının da, 3. konsantrasyon seviyesinden (PLT=6000 adet/ μ L) itibaren glukoz sonuçlarını anlamlı düzeyde arttırmış ve 6. konsantrasyon seviyesinde (PLT=44500 adet/ μ L) %Bias sınırını aşmıştır (Tablo 18-19, Şekil 17). Bu duruma, PLT süspansiyonlarının yıkanamamasından dolayı antikoagülan olarak kullanılan ve dekstroze içeren CPDA’nın kontaminasyonu yol açmış olabilir. Üstelik, CPDA’nın içinde magnezyum iyonlarını şelatlayıcı etkisi bulunan sitratın varlığı, magnezyum gerektiren ve glukoz ölçümünde kullanılan hekzokinaz enziminin aktivitesinde düşmeye neden olup glukoz düzeylerinin daha yükseğe çıkmasını engellemiş olabilir. **Kalsiyum** düzeylerinde çalışmamızla benzer şekilde, herhangi bir etkilenme saptanmamıştır (Tablo 18-19, Şekil 18). Bununla birlikte; PLT’lerin yıkanamamasından dolayı, antikoagülan olarak kullanılmış olan CPDA’nın kontaminasyonu nedeniyle içerdiği sitratın kalsiyum iyonlarını bağlayarak sonuçlarda PLT süspansiyonları açısından anlamlı bir değişmeyi engellemiş olabileceği de ihtimal dahilindedir. **BUN** düzeylerinde araştırmacılar, hiçbir seviyede anlamlı bir etki saptamamıştır. Bizim çalışmamızda ise, 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb= 52,62 mg/dL) itibaren düzeyler

anlamli olarak artmaya başlamış, fakat hiçbir seviyede %Bias sınırını aşmamıştır (Tablo 18-19, Şekil 19). PLT'lerin ise bu test üzerinde herhangi bir etkisi saptanmamıştır (Tablo 18-19, Şekil 19).

Köseoğlu ve arkadaşlarının çalışmasına benzer bir çalışmayı da Lippi ve arkadaşları gerçekleştirmiştir (23). Bu çalışmada araştırmacılar; hücreleri hemoliz etmek için, katkı maddesi içermeyen tüplere alınan kanları 1 gece -70°C'ye ayarlanmış derin dondurucuda bekletmiş ve sabah çözmüştür. Bu açıdan çalışmamızla benzerlik göstermektedir. Araştırmacılar; böylece, 12 sağlıklı gönüllüden 1'er adet hemolizsiz örnek ve 8'er adet farklı fHb konsantrasyonu (16, 30, 60, 130, 260, 510, 1030, 2060 mg/dL) içeren örnek elde etmişlerdir. Test parametrelerinin ölçümleri, Roche/Hitachi Modular System P (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)'de gerçekleştirilmiş ve ardından fHb içeren örneklerin test sonuçlarının, hemolizsiz örneğin sonuçlarına göre yüzde değişim miktarlarını saptamışlardır. Çalışmamızdan farklı olarak, sonuçlar "ortalama $\pm$ standart sapma" şeklinde verilmiştir. Klinik olarak anlamlı seviyeler, çalışmamızla aynı %Bias sınırları kullanılarak değerlendirilmiştir. Bu çalışma ile ortak 10 adet biyokimyasal test parametremiz bulunmaktadır ve bu testlerin ölçümünde LDH, demir, magnezyum ve kalsiyum testleri dışında çalışmamızla aynı yöntem kullanılmıştır. Bu çalışmanın sonuçları testler açısından karşılaştırıldığında; **LDH** düzeylerindeki yüzde değişim miktarı 16 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamış ve yine bu seviyeden itibaren %Bias sınırını aşmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde; RBC süspansiyonlarının en düşük hemolizli olan 1. konsantrasyon seviyesinden (fHb=13,22 mg/dL) itibaren anlamlı olarak artmaya başlamakla birlikte %Bias sınırı 2. RBC konsantrasyon seviyesinde (fHb=23,45 mg/dL) aşılmaktadır ve bu değer araştırmacılarınkinden biraz daha geçtir (Tablo 18-19, Şekil 8). Ayrıca; çalışmamızdaki en yüksek hemoliz seviyesine yakın olan örnek (fHb=510 mg/dL), test sonuçlarının ortalama %259 artışına neden olmuşken, çalışmamızda son fHb konsantrasyonunda (fHb=470,25 mg/dL) bu artış daha düşüktür (%190,5). (Tablo 18-19, Şekil 8). LDH testi açısından bakıldığında iki çalışma arasında yakın sonuçlar saptanmış olmakla birlikte, kullanılan ölçüm yöntemlerinin farklılığı göz önünde bulundurulmalıdır. PLT süspansiyonlarının da, 4. konsantrasyon seviyesinden (PLT=12000 adet/ μ L) itibaren LDH sonuçları üzerinde artırıcı yönde etki göstermesi bu artışa katkıda bulunduğunu düşündürmekle birlikte; bu etki, aradaki farkı açıklayacak düzeyde değildir (Tablo 18-19, Şekil 8). Ayrıca; 7. konsantrasyon

seviyesinden (PLT=90000 adet/ μ L) itibaren %Bias sınırının aşılması dolayısıyla, trombositoz durumlarında LDH test sonuçlarındaki artışa trombosit parçalanmasının katkısının yüksek olabileceği ve RBC'lerin katkısına olmaksızın %Bias sınırının aşılmasına yol açabileceği öngörülebilir. **Potasyum** düzeylerindeki yüzde değişim LDH testine benzer şekilde 16 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı çalışmamızda anlamlı değişimin başladığı 3. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=34,53 mg/dL) daha düşüktür (Tablo18-19, Şekil 9). %Bias sınırı ise, 30 mg/dL'lik fHb değerine sahip örnekte aşılmışken, çalışmamızda bu sınır daha geç olarak 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=52,62 mg/dL) itibaren aşmaktadır (Tablo18-19, Şekil 9). Çalışmamızdaki bulgulara göre, 7. PLT konsantrasyon seviyesi (PLT=90000 adet/ μ L) potasyum sonuçları üzerinde artırıcı yönde etki gösterdiğinden trombositoz durumlarında, in vitro hemolizli örneklerde RBC lizisinin neden olacağı potasyum test sonuçlarında artışa katkı yapabilir (Tablo18-19, Şekil 9). **AST** düzeylerindeki yüzde değişim, LDH ve potasyum testlerine benzer şekilde 16 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamış ve %Bias sınırı, 30 mg/dL fHb değerine sahip örnekte aşılmıştır. Çalışmamızda ise; AST düzeyleri, daha yüksek bir seviyeden, 3. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb = 34,53 mg/dL) itibaren artmaya başlamış ve yine bu konsantrasyon seviyesinde %Bias sınırını aşmıştır ve bu değer araştırmacılarıinki ile benzerdir (Tablo 18-19, Şekil 10). PLT'lerin ise AST düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkisi olmadığı saptandı (Tablo 18-19, Şekil 10). **Demir** düzeyleri, 60 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır ve %Bias sınırı, 510 mg/dL fHb değerine sahip örnekte aşılmıştır. Çalışmamızda ise; 7. RBC konsantrasyon seviyesinde (fHb=470,25 mg/dL) %Bias değerini aşmayan anlamlı bir düşüş saptandı (Tablo 18-19, Şekil 11). PLT'lerin ise, demir düzeylerine anlamlı bir etki yapmadığı görüldü (Tablo 18-19, Şekil 11). Bu bulgular; kullanılan yöntemin, hemolizin test sonucu üzerinde meydana getireceği etki açısından ne kadar önemli olduğunu ve bu etkinin ne kadar farklılık gösterebileceğini ortaya koymaktadır. Dolayısıyla, tek bir otoanalizör ve reaktifin kullanıldığı çalışmalardan elde edilen veriler bütüne genellenemez ve rutin uygulamada her laboratuvar kendi sınırlarını tespit etmelidir (23). **CK** düzeylerindeki yüzde değişim; LDH, potasyum ve AST testlerine benzer şekilde 16 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır. Çalışmamızda ise; bu artış, çok daha geç olan bir seviyede, 6. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=226,24 mg/dL) itibaren başlamıştır (Tablo18-19, Şekil 12). %Bias sınırı

ise, 130 mg/dL'lik fHb değerine sahip örnekte aşılmışken, çalışmamızda bu sınır, daha geç olarak, 7. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=470,25 mg/dL) itibaren aşmaktadır (Tablo18-19, Şekil 12). Ayrıca; en yüksek hemoliz seviyemize yakın olan örnek (510 mg/dL fHb), test sonuçlarının ortalama %56 artışına neden olmuşken, çalışmamızdaki son fHb konsantrasyonunda (fHb=470 mg/dL) bu artış daha düşüktür (%13,5) (Tablo18-19, Şekil 12). Aynı yöntem kullanılmakla birlikte; çalışmamızdaki CK sonuçları araştırmacılarınkine kıyasla daha az etkilenmiştir. PLT'lerin ise, bu test üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı saptanmakla birlikte, antikoagülan (CPDA) kaynaklı bir etkinin sonuçlarda meydana gelebilecek olası bir etkiyi engellemiş olabileceği göz önünde bulundurulmalıdır (Tablo18-19, Şekil 12). **Magnezyum** düzeylerindeki yüzde değişim, 130 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı çalışmamızda anlamlı değişimin başladığı 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=52,62 mg/dL) daha yüksektir (Tablo18-19, Şekil 13). %Bias sınırı ise, 260 mg/dL'lik fHb değerine sahip örnekte aşılmışken, çalışmamızda bu sınır daha erken olarak 5. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=52,62 mg/dL) itibaren aşmaktadır (Tablo18-19, Şekil 13). Bulgular değerlendirildiğinde, kullandığımız magnezyum yönteminin hemolizden daha fazla etkilendiği görülmektedir. Magnezyum testine PLT'lerin etkisi saptanmamakla birlikte, antikoagülan (CPDA) kontaminasyonunun sonuçlarda anlamlı etki yapmasını engellemiş olabileceği akıldan tutulmalıdır. **İnorganik fosfor** düzeylerindeki yüzde değişim; 260 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır. Çalışmamızda ise; bu artış, çok daha düşük olan bir seviyeden, 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb = 52,62 mg/dL) itibaren başlamıştır (Tablo18-19, Şekil 16). %Bias sınırı ise, 510 mg/dL'lik fHb değerine sahip örnekte aşılmışken, çalışmamızda bu sınır, yine çok daha erken olarak, 5. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=120,9 mg/dL) itibaren aşmaktadır (Tablo18-19, Şekil 16). Aynı yöntem kullanılmakla birlikte; bu bulgular, inorganik fosfor testinin, araştırmacılarınkine kıyasla hemolizden daha fazla etkilendiğini göstermektedir. **Glukoz** düzeylerindeki yüzde değişim, çalışmamızda yer almayan 1030 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekte anlamlı bir düşürücü etki tespit edilmiş, fakat hiçbir konsantrasyonda %Bias sınırını aşılmamıştır. Çalışmamızda ise, kullandığımız fHb konsantrasyon aralığı dikkate alındığında, hiçbir RBC konsantrasyon seviyesinde anlamlı bir etki görülmemiştir (Tablo 18-19, Şekil 17). Daha yüksek konsantrasyonda RBC hemolizati içeren örnekler kullanıldığında düşürücü etkinin görülmesi olasıdır. **Kalsiyum** test sonuçları

değerlendirildiğinde ise, çalışmamızla benzer şekilde herhangi bir etkilenme saptanmamıştır (Tablo18-19, Şekil 18). Bununla birlikte, CPDA'nın kontaminasyonu nedeniyle içerdiği sitratın kalsiyum iyonlarını bağlayarak sonuçlarda PLT süspansiyonları açısından anlamlı bir etkiyi engellemiş olabilir. **BUN** düzeylerindeki yüzde değişim, 260 mg/dL fHb örnekten itibaren anlamlı olarak artmaya başlamıştır. Bu düzeydeki hemoliz miktarı çalışmamızda anlamlı değişimin başladığı 4. RBC konsantrasyon seviyesinden (fHb=52,62 mg/dL) daha yüksektir (Tablo18-19, Şekil 19). %Bias sınırı ise, çalışmamızda bulunmayan 2060 mg/dL'lik fHb değerine sahip örnekte aşılmışken, çalışmamızda hiçbir seviyede %Bias sınırı aşılmamıştır (Tablo18-19, Şekil 19). Bununla birlikte; 510 mg/dL fHb konsantrasyonuna sahip örnekte artış ortalama %3 civarındayken, çalışmamızdaki buna yakın olan 7. RBC konsantrasyon seviyesinde (fHb = 470,25) bu değer %2,8'dir. Daha yüksek konsantrasyonda RBC hemolizati içeren örnekler kullanıldığında %Bias sınırının da aşılması ihtimal dahilindedir.

Hemoliz indeksleri açısından bulgularımız değerlendirildiğinde; firmanın verilerine göre, LDH, potasyum, AST ve demir testlerinin “+” (50-99 mg/dL fHb)'te, CK ve magnezyum testlerinin “++” (100-199 mg/dL fHb)'te, total protein ve total kolesterol testlerinin “+++” (200-299 mg/dL fHb)'te, inorganik fosfor ve glukoz testlerinin “++++” (300-500 mg/dL fHb)'te, kalsiyum ve BUN testlerinin “+++++” (>500 mg/dL fHb)'te klinik olarak anlamlı bir etkilenme gerçekleşmektedir ve rutin klinik laboratuvar uygulamamızda sonuç onayı sırasında bu eşik seviyeleri kullanılmaktadır. Bununla birlikte; LDH ve AST testlerinin, firmanın normal olarak kabul ettiği hemoliz indeks düzeyinde (<50 mg/dL fHb) etkilenmeye başladığı görülmektedir (Şekil 8,10; Tablo 18). Daha önce sözü edilen iki çalışma da bu bulguyu desteklemektedir (23,150). LDH testinin 12000 PLT lizisi durumunda anlamlı olarak etkilendiği de göz önünde bulundurulduğunda (PLT süspansiyonlarının 4. konsantrasyon seviyesi), yoğun hemolizli örneklerde bu testin çalışmamızda saptadığımızdan daha düşük fHb konsantrasyonunda %Bias sınırını aşıp klinik açıdan anlamlı fark yaratabileceği öngörülebilir (Tablo 18-19, Şekil 8). Potasyum testi açısından, firmanın verileri ile çalışmadaki bulgularımız oldukça benzerdir. Çalışmamızda testin 52,62 mg/dL fHb içeren 4. RBC konsantrasyon seviyesinde klinik olarak etkilendiğini saptanmış ve benzer şekilde firma da klinik olarak etkinin başladığı sınırı, 50-99 mg/dL fHb aralığını temsil eden “+” indeks olarak vermiştir (Tablo 18-19, Şekil 9). Bununla birlikte; çalışmamızda, testin 90000 PLT'nin lizisinin gerçekleştiği konsantrasyon seviyesinde test sonuçlarında anlamlı bir artış

saptandığından, trombositoz durumlarında bu eşik değerinin düşebileceği ve firmanın verilerine göre normal olan seviyeye inebileceği öngörülebilir (Tablo 18-19, Şekil 9). Demir sonuçları değerlendirildiğinde ise bulgular büyük farklılık göstermektedir. Firma; bu testin 50-99 mg/dL fHb aralığında klinik açıdan etkilendiğini belirtmekteyken çalışmamızda test edilen 470 mg/dL’lik konsantrasyonda dahi sınırı aşmamıştır (Tablo 18-19, Şekil 11). CK testine bakıldığında da bulgularımız firmanın verilerinden farklıdır. Firmanın verilerine göre bu test, “++” (100-199 mg/dL Hb)’te klinik açıdan fark oluşturmaktayken, çalışmamızda saptanan değer 470,25 mg/dL fHb içeren 7. RBC süspansiyonuna karşılık gelmektedir (Tablo 18-19, Şekil 12). Magnezyum testi değerlendirildiğinde, bu testin 120,9 mg/dL fHb konsantrasyonunda klinik açıdan etkilendiği saptanmıştır ve bu bulgu firmanın bu test için verdiği aralığa uymaktadır (Tablo 18, Şekil 13). Aynı şekilde, total protein test bulguları da firmanın verileriyle benzerlik göstermektedir. Çalışmamızda, 226,24 mg/dL fHb konsantrasyonunda sınır aşılmışken, bu değer firmanın “++++” indeksine karşılık gelen 200 – 299 mg/dL fHb konsantrasyon aralığı içindedir (Tablo 18, Şekil 14). Bununla birlikte; çalışmamızda, PLT süspansiyonlarının 6. konsantrasyon seviyesinin (PLT=44500 adet/ μ L) test üzerinde anlamlı bir etkisi olduğu ve 7. konsantrasyon seviyesinde de tek başına %Bias sınırını aşacak derecede test sonuçlarını etkilediği saptanmış olup, trombositoz durumlarında bu testin daha düşük bir fHb konsantrasyonunda klinik olarak anlamlı bir farka yol açabileceği düşünülebilir (Tablo 18, Şekil 14). Total kolesterol testi ile ilgili bulgular, firmanın verilerinden farklılık göstermektedir. Çalışmamızda RBC süspansiyonlarının son konsantrasyon seviyesinde (fHb=470 mg/dL) klinik açıdan anlamlı fark oluşmuşken, firma bu testin 200–299 mg/dL fHb konsantrasyon aralığında klinik olarak etkilendiğini belirtmektedir (Tablo 18-19, Şekil 15). İnorganik fosfor testi açısından aksi bir durum söz konusudur. Bu test için çalışmamızda 120,9 mg/dL fHb konsantrasyonuna karşılık gelen RBC süspansiyonlarının 5. konsantrasyon seviyesinde klinik açıdan anlamlı değişim tespit edilmişken, firmanın verilerine göre test daha yoğun hemoliz durumunda (300 - 500 mg/dL fHb) bu şekilde etkilenmektedir (Tablo 18-19, Şekil 16). Firma glukoz testi için de aynı aralığı vermiş olup, çalışmamızda en üst RBC konsantrasyon seviyesinin fHb değeri olan 470 mg/dL’ye kadar test üzerinde RBC’lerin anlamlı bir etkisi saptanmadı (Tablo 18-19, Şekil 18). Kalsiyum testi açısından değerlendirildiğinde; firma bu testin 500 mg/dL’nin üstündeki fHb konsantrasyonlarında klinik olarak etkilendiğini belirtmiş ve çalışmamızda benzer şekilde test ettiğimiz fHb değeri olan 470 mg/dL’ye kadar test üzerinde gerek analitik gerekse klinik

açından anlamlı herhangi bir etki saptanmamıştır. BUN testi açısından bulgular değerlendirildiğinde, firmanın verilerine göre bu test 500 mg/dL'nin üstündeki fHb konsantrasyonlarında klinik olarak etkilenmektedir. Çalışmamızda da benzer şekilde, en üst RBC konsantrasyon seviyesinin fHb değeri olan 470 mg/dL'ye kadar klinik açıdan anlamlı fark yaratacak bir etki saptanmamıştır (Tablo 18-19, Şekil 19). Hemoliz indeks bulguları değerlendirilecek olursa; potasyum, magnezyum, total protein, kalsiyum ve BUN testlerinde firma ile uyumlu bulgular saptanmış olmakla birlikte diğer 7 test firmanın verileriyle uyuşmamaktadır. Çalışmamızın yöntemi göz önünde bulundurulduğunda; hücrelerin ayrı ayrı etkilerini saptama amacımıza yönelik olarak, fHb sonuçlarının yüksek saflıkta RBC içeren süspansiyonlara ait olması, indeks değerleri açısından sonuçların birebir karşılaştırılabilirliğini engellemektedir. Bunun nedeni, diğer hücrelerin dilüsyon gibi olası ve miktarı öngörülemeyen etkilerinin dışlanmış olmasıdır. Bu durum, karşılaştırma yaptığımız tüm diğer çalışmalar için de geçerlidir. Literatürdeki konuyla ilgili çalışmalar incelendiğinde, aslında çalışmaların kendi arasında da karşılaştırılabilirliği azdır. Bunun nedenlerinden biri, hemolizat hazırlama yöntemi açısından çalışmaların büyük farklılıklar göstermesidir. Hemolizatları; bazı araştırmacılar mekanik yöntemle, bazıları dondurup çözme yöntemiyle, bazıları ise ozmotik şok yöntemiyle oluşturmuş, bir kısmı örneklerin direkt olarak kendisini kullanmış, diğerleri ise hemolizatları serum veya plazmaya farklı dilüsyon oranlarına yol açacak şekilde eklemiştir (23,25–27,122,150). Bizim de çalışmamızda 1/20 hemolizat oranını kullanmamızın nedeni dilüsyonel etkiyi en aza indirebilmektir (151). Çalışmaların karşılaştırılabilirliğinin az olmasının diğer nedenleri ise, kullanılan otoanalizörlerin ve yöntemlerin farklılık göstermesidir. Üstelik; Grafmeyer ve arkadaşları; hemoliz, ikter ve lipeminin 20 farklı otoanalizör kullanarak 20 biyokimyasal test parametresi üzerindeki etkisini incelemişler ve yöntem farklılıklarının olduğu kadar yöntemin cihaza nasıl adapte edildiğinin de önem taşıdığını vurgulamışlardır (118).

Ji ve arkadaşları; birlikte çalıştıkları firmanın indeks önerileri ile kendi sonuçlarını karşılaştırmıştır (152). Araştırmacılar; lityum heparinli tüplere aldıkları kanı santrifüj ettikten sonra plazmayı uzaklaştırıp çöken hücre paketini önce serum fizyolojik ile yıkamış ve ardından distile su ile süspanse edip dondurup çözmüşlerdir. Hazırlanan hemolizatlar, oluşturulan plazma havuzuna farklı seviyelerde eklenmiş ve analizler Roche Cobas 6000 otoanalizöründe gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde; araştırmacılar, kendi bulguları ile firmanın verileri arasında güçlü bir korelasyon saptamış olmakla birlikte, bazı

biyokimyasal test sonuçlarının indeks değerinden daha düşük seviyede, bazılarının ise daha yüksek seviyede etkilendiğini saptamışlardır. Çalışmamıza benzer şekilde inorganik fosforun klinik olarak etkilenme düzeyini indeksten daha düşük bir seviyede saptamışlarken, CK düzeyini de yine çalışmamıza benzer şekilde indeksten daha yüksek bir seviyede saptamışlardır. Steen ve arkadaşlarının yaptığı başka bir çalışmada; araştırmacılar, benzer şekilde firmanın verdiği eşik değerleri ile kendi tespit ettikleri değerleri karşılaştırmıştır (122). Hemolizat, ozmotik şok yöntemiyle hazırlanmış; serum havuzlarına %10 oranında eklenmiş ve Beckman LX20 otoanalizöründe analizler gerçekleştirilmiştir. Çalışma, aynı otoanalizörü kullanan 4 farklı laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Hemolizin etkisi açısından analiz ettikleri 29 adet biyokimyasal test parametresinden 12'sinin anlamlı derecede etkilendiğini ve eşik değerleri ile kendi tespit ettikleri değerler arasında hemolizli örnekler açısından çok güçlü bir korelasyon olduğunu saptamışlardır. Bu çalışmada hemoliz indeksi 11 seviye (0-10) iken çalışmamızda 6 (0-5) seviye bulunmaktadır. Dolayısıyla, hemoliz indekslerinin kullanımında büyük farklılıklar vardır. Bu farklılıklara birçok faktör neden olmaktadır. Bunlar; örnek hacmi, kullanılan dilüent ve hacmi, okuma dalga boyları, hesaplamalar, raporlama şekli (örneğin; çalışmamızda olduğu gibi +, ++ şeklinde veya g/L, $\mu\text{mol/L}$ gibi fHb konsantrasyonları olarak)'dir. Bu nedenle, indekslerin birbirine uyumlu hale getirilmesi gerekmektedir (149).

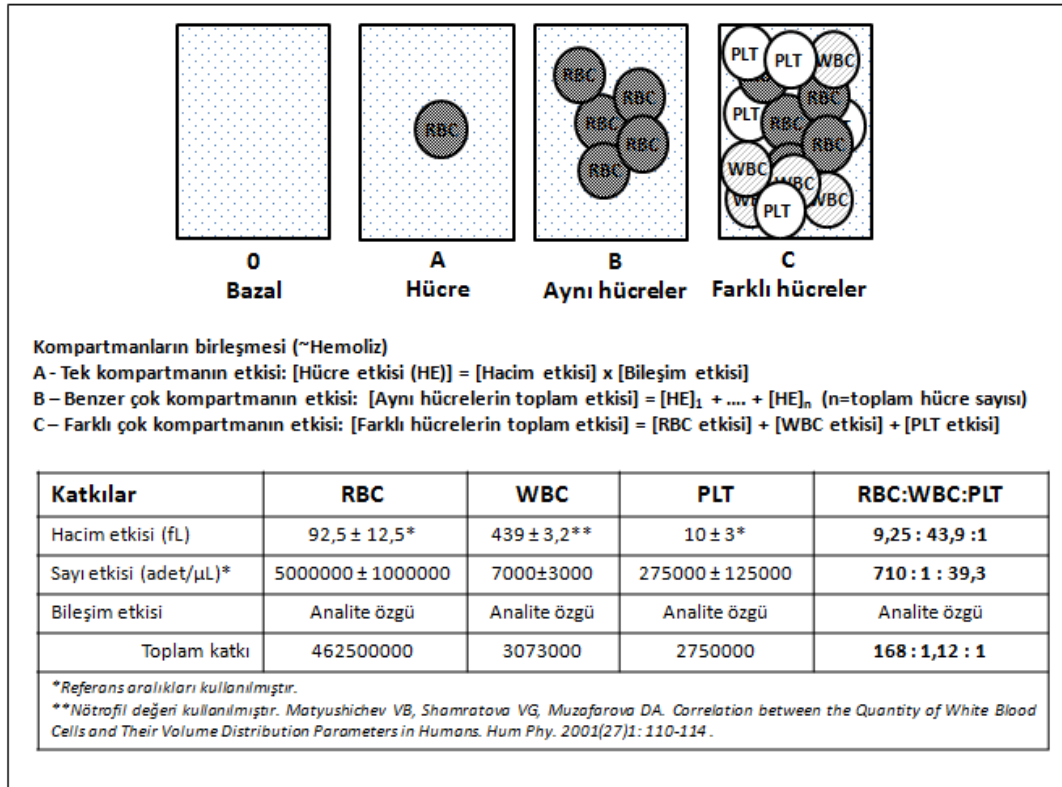
Hemoliz indekslerinden ve fHb ölçümlerinden yola çıkarak özellikle potasyum olmak üzere bazı biyokimyasal test parametreleri için düzeltme faktörlerinin kullanımını destekleyen çalışmalar bulunmaktadır (19,25–27,139,141,153). Bununla birlikte; daha önce sözü edildiği gibi, hemoliz indekslerinin standardize olmaması, kullanılan yöntemlerin farklılığı gibi etkenler, önerilen formüllerin cihaza ve yönteme kısıtlı kalmasına ve diğer yöntem ve cihazlara genellenememesine neden olmaktadır. Lippi ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, 12 farklı hasta örneğinde test ettikleri birçok parametrede öngörülemeyen ve analite özgü varyasyonlar saptamışlardır (23). Bu araştırmacılar; düzeltme faktörlerinin kullanımını desteklememekte, hemolizli örneklerde klinisyenin *in vivo* hemoliz açısından uyarılıp tekrar örnek istenmesinin en uygun yaklaşım olduğunu savunmaktadır. Düzeltme faktörlerinin kullanımını öneren araştırmacılardan Jay ve arkadaşları, hücre içi analit konsantrasyonlarındaki bireylerarası farklılıkların düzeltme faktörlerinin belirlenmesinde değişkenliğe neden olabileceğini belirtmiş ve bu alanın araştırılması gerektiğini vurgulamıştır (19). Hawkins ve arkadaşları da, 100 hasta örneği ile gerçekleştirdikleri çalışmalarında,

potasyum/fHb oranı açısından bireylerarası farklılıkları ortaya koymuş ve potasyum testi için öne sürülen düzeltme faktörlerinin kullanımını önermemişlerdir (28). Ayrıca; kan alımı sırasında da meydana gelen makaslama gerilimi (*shear stress*)'nin hücrenin parçalanma eşiğinin çok daha altındayken, gerilimin gücüyle orantılı olarak RBC'den potasyum kaybının gerçekleştiği saptanmıştır (154). Bu gerilimin kan alımı sırasında, RBC'de sadece küçük iyonların geçebileceği porların açılmasına neden olabileceği ve Hb gibi büyük moleküllerin bu porlardan geçemeyeceği bildirilmiş ve dolayısıyla fHb'nin potasyumun öngörülmesi açısından uygun bir belirteç olamayacağı şeklinde yorumlanmıştır (24,155). Mansour ve arkadaşları ise; literatürde çok sayıda farklı düzeltme faktörünün önerilmiş olduğuna dikkat çekmişler, çalışmaların sınırlı sayıda sağlıklı gönüllüden alınan örnekler ya da havuzlanmış örnekler ile yapılmasının da hastane popülasyonunu yansıtmayabileceğini belirtmişlerdir. Ayrıca; kullanılan özellikle dondurup çözme, ozmotik şok gibi hemolizat hazırlama yöntemlerinin retikülosit, PLT ve WBC gibi hücrelerin neredeyse tamamının harap olmasına neden olduğundan, gerçekte olan in vitro hemolizi yansıtmayacağını vurgulamışlardır. Çalışmamızda parçalanan hücre sayısı ile analit konsantrasyonu ilişkisini kurabilmek için hücrelerin tam hemolizini hedeflediğimizden, dondurup çözme yöntemini kullandık. Ozmotik şok yöntemi kullanılması durumunda; hemolizatların dilüe olmasıyla gerek hücre sayıları gerekse fHb konsantrasyonu açısından büyük bir kayıp olacağından bu yöntemi tercih etmedik. Homojenizatör, boncuk gibi mekanik veya kimyasal yöntemleri de, kullanılmaları durumunda interferans deneyi için kontaminasyon oluşturacağından tercih etmedik.

Bu araştırmada amacımız, hemoliz etkisindeki bu değişkenliğin diğer bir ayağı olarak gördüğümüz hücre tipi ve sayısının etkisini ortaya koymaktır. Çalışmamızda WBC süspansiyonları hedeflenen saflıkta elde edilemediğinden net bir sonuç alınamamakla birlikte PLT'lerin bazı biyokimyasal test parametreleri üzerinde etkiye neden olduğu saptanmıştır. Bu konuyla ilgili WBC'lerin daha saf elde edilebildiği ve hatta alt fraksiyonlarına ayrılabilirdiği daha fazla sayıda örnek içeren çalışmalara ihtiyaç vardır.

Hemolizde; hücrelerin hacim, bileşim ve sayı etkisi şeklinde üç farklı katkısı olduğundan yola çıkılarak bir teorik modelleme gerçekleştirildi. Değişik tipteki hücrelerin hacim etkisi değerlendirildiğinde en küçük hücre PLT'ye göre RBC'nin 9,25 kat, WBC'nin 43,9 kat hacim etkisi olduğu; sayısal etkisi değerlendirildiğinde en az sayıdaki hücre WBC'ye göre RBC'nin 710 kat, PLT'nin 39,3 kat sayı etkisi olduğu söylenebilir. Fakat her iki etkinin toplam katkısı değerlendirildiğinde en az katkısı olan PLT'ye göre RBC'nin 168 kat, PLT'nin

1,12 kat toplam katkısı olduğu saptanır. Hemolizin biyokimyasal testler üzerine etkisindeki değişkenliğin temel mekanizmasını; önce bir hücreden, sonra aynı ve son olarak farklı hücre tiplerinin kompartmanlarının birleşmesindeki hacim, sayı ve burada modellemeye dahil edilmeyen ama her analite göre farklı olan bileşim etkisindeki değişim oluşturmaktadır. Hemolizde hücre kompartmanlarının birleşmesinin teorik modellemesi Şekil 23'te gösterilmiştir :



Şekil 23 : Hemolizde hücre kompartmanlarının birleşmesinin teorik modellemesi.

Klinik laboratuvarlarda rutin uygulamada hemolizin saptanması için belirteç olarak kullanılan fHb açısından bulgular değerlendirildiğinde, fHb miktarının parçalanmış RBC sayısı ile pozitif yönde çok güçlü bir korelasyon gösterdiği saptandı (Şekil 20). Bununla birlikte; potansiyel belirteç olabileceğini öngördüğümüz WBC lizisi için MPO ve PLT lizisi için β-TGB molekülleri açısından anlamlı bir ilişki saptanmadı (Şekil 21 ve 22). İlgili hücrelerin bu molekülleri içermesine rağmen; bu duruma, serum matriksinde belirteç ölçüm yöntemlerinin performanslarının uygun olmaması ya da dondurup çözme işleminin proteinin

üç boyutlu yapısını bozarak antijenik tanınabilirliği etkilemesi yol açmış gibi görünmektedir. Bu açıdan, ölçüm yöntemlerinin performansını ortaya koyan daha ileri belirteç çalışmalarına ihtiyaç vardır.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Bunlardan biri, WBC süspansiyonlarının yeterince saflaştırılamamış olmasıdır. Dolayısıyla, WBC'nin biyokimyasal test parametreleri üzerindeki etkisi net bir şekilde değerlendirilememiştir. Çalışmanın diğer bir kısıtlılığı, PLT süspansiyonlarının yıkanamamasıdır. Bu nedenle antikoagülan (CPDA) kontaminasyonu meydana gelmiş ve glukoz, inorganik fosfor, magnezyum, kalsiyum ve CK testleri değerlendirmeye alınamamıştır. Bir kısıtlılık da, 7. RBC konsantrasyon seviyelerinin fHb konsantrasyonlarının ölçülememiş olması nedeniyle bu değerlerin hesaplanarak elde edilmesidir. Ayrıca, çalışmamızdaki fHb aralığında anlamlı bir etki saptanmamış olan kalsiyum testinin 500 mg/dL'nin üzerindeki fHb konsantrasyonlarında değerlendirilmesi gerekmektedir. Başka bir kısıtlılık, MPO ve β -TGB belirteçlerinin ölçümü ile ilgilidir. Örnekler 1 kez çalışılmıştır ve olasılıkla bu yöntemlerin serum matriksindeki performansları uygun olmaması ya da hemolizat hazırlama sırasında dondurup çözme yöntemi kullanılmış olmasından dolayı anlamlı bir sonuç elde edilememiştir. Diğer bir kısıtlılık, biyokimyasal parametrelerin triplike olarak değil duplike olarak ölçülmüş olmasıdır. Bununla birlikte, dublike ölçümler arasındaki fark istatistiksel olarak değerlendirilmiş, anlamlı bulunmayıp ortalamaları alınmıştır. Ayrıca, örnek sayısının da artırılması, istatistiksel olarak daha güçlü sonuçların elde edilmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak;

- RBC sayısı ile hemolizden etkilenen parametreler arasındaki ilişki net bir şekilde ortaya konmuştur. Hemoliz indeksleri için üreticinin belirlediği eşik değerler ile karşılaştırmada ise; metodolojik nedenlerden dolayı farklılıklar saptanmıştır.
- PLT sayısı, bazı biyokimyasal parametreleri anlamlı olarak etkilemekte, bu etki LDH için trombosit sayısı referans aralığının içinde olan bireylerde dahi ortaya çıkabilecek düzeydedir. PLT sayısının total protein ve LDH üzerindeki etkisi, trombositozu olan bireylerde RBC lizisi olmaksızın klinik olarak anlamlı farklılığa yol açabilir.

- İleriye yönelik hemoliz mekanizmasının anlaşılmasını sağlayan bu tür araştırmalar, klinik laboratuvarlarda sık görülen bu interferansın çözümünde önemli ipuçları sağlayacaktır.
- Ayrıca bu araştırmada ortaya konulamayan, farklı hücre hemolizini yansıtabilecek belirteçlerin keşfi de ileriye yönelik gelişmeye açık bir alan olarak görünmektedir.

6. KAYNAKLAR ve EKLER

6.1 KAYNAKLAR

1. Lippi G, Luca Salvagno G, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, et al. Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. Clin Chem Lab Med. 2009 Jan;47(8):934–9.
2. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem. 2007 Jul;53(7):1338–42.
3. Lippi G. Governance of preanalytical variability: travelling the right path to the bright side of the moon? Clin Chim Acta. 2009 Jun;404(1):32–6.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). CLSI document EP7-A2: Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-2nd ed. vol. 25, no. 27.2005.
5. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. Clin Chem. 1994 Nov;40(11 Pt 1):1996–2005.
6. Dimeski G. Interference testing. Clin Biochem Rev. 2008 Aug;29 Suppl 1:S43–8.
7. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. Clin Chem Lab Med. 2007 Jan;45(6):720–7.
8. Lippi G, Cervellin G, Favalaro EJ, Plebani M. In Vitro and In Vivo Hemolysis: An Unresolved Dispute in Laboratory Medicine. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH & Co. KG; 2012. 7-8 p.
9. Hawkins R. “Hemolysis”--toward clearer terminology. Arch Pathol Lab Med. 2010 Aug;134(8):1104; author reply 1104.
10. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med. 2008 Jan;46(6):764–72.
11. Snyder JA, Rogers MW, King MS, Phillips JC, Chapman JF, Hammett-Stabler CA. The impact of hemolysis on Ortho-Clinical Diagnostic’s ECI and Roche’s elecsys immunoassay systems. Clin Chim Acta. 2004 Oct;348(1-2):181–7.
12. McGrath JK, Rankin P, Schendel M. Let the data speak: decreasing hemolysis rates through education, practice, and disclosure. J Emerg Nurs. 2012 May;38(3):239–44.
13. Dimeski G, Clague AE, Hickman PE. Correction and reporting of potassium results in haemolysed samples. Ann Clin Biochem. 2005 Mar;42(Pt 2):119–23.

14. Guder WG. Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986 Feb;24(2):125–6.
15. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *The electronic Journal of the International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine.* Vol. 13. No. 4.
16. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. *Samples: From the Patient to the Laboratory: The impact of preanalytical variables on the quality of laboratory results.* 3rd ed. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2003. 80 p.
17. Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. *Crit Rev Clin Lab Sci.* Jan;48(3):143–53.
18. Joshi S, Vaitkute R, Jeffery J, Ayling RM. Haemolysis in neonatal blood samples: a survey of practice. *Ann Clin Biochem.* 2007 Mar;44(Pt 2):178–81.
19. Jay DW, Provasek D. Characterization and mathematical correction of hemolysis interference in selected Hitachi 717 assays. *Clin Chem.* 1993 Sep;39(9):1804–10.
20. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. *Clin Chem.* 1978 Nov;24(11):1966–70.
21. Blank DW, Kroll MH, Ruddel ME, Elin RJ. Hemoglobin interference from in vivo hemolysis. *Clin Chem.* 1985 Sep;31(9):1566–9.
22. Yücel D, Dalva K. Effect of in vitro hemolysis on 25 common biochemical tests. *Clin Chem.* 1992 Apr;38(4):575–7.
23. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006 Jan;44(3):311–6.
24. Mansour MMH, Azzazy HME, Kazmierczak SC. Correction factors for estimating potassium concentrations in samples with in vitro hemolysis: a detriment to patient safety. *Arch Pathol Lab Med.* 2009 Jun;133(6):960–6.
25. Owens H, Siparsky G, Bajaj L, Hampers LC. Correction of factitious hyperkalemia in hemolyzed specimens. *Am J Emerg Med.* 2005 Nov;23(7):872–5.
26. Jeffery J, Sharma A, Ayling RM. Detection of haemolysis and reporting of potassium results in samples from neonates. *Ann Clin Biochem.* 2009 May;46(Pt 3):222–5.
27. Brescia V, Tampoia M, Mileti A. Evaluation of Factitious Hyperkalemia in Hemolytic Samples: Impact of the Mean Corpuscular Hemoglobin Concentration. *Lab Med.* 2009 Apr 1;40(4):224–6.

28. Hawkins R. Variability in potassium/hemoglobin ratios for hemolysis correction. *Clin Chem*. 2002 May;48(5):796.
29. Romero PJ, Romero EA, Winkler MD. Ionic calcium content of light dense human red cells separated by Percoll density gradients. *Biochim Biophys Acta*. 1997 Jan 14;1323(1):23–8.
30. Lundberg GD. How clinicians should use the diagnostic laboratory in a changing medical world. *Clin Chim Acta*. 1999 Feb;280(1-2):3–11.
31. Wagar EA, Yuan S. The laboratory and patient safety. *Clin Lab Med*. 2007 Dec;27(4):909–30, viii – ix.
32. Hawkins R. Managing the pre- and post-analytical phases of the total testing process. *Ann Lab Med*. 2012 Jan;32(1):5–16.
33. Laposata M, Dighe A. “Pre-pre” and “post-post” analytical error: high-incidence patient safety hazards involving the clinical laboratory. *Clin Chem Lab Med*. 2007 Jan;45(6):712–9.
34. Stroobants AK, Goldschmidt HMJ, Plebani M. Error budget calculations in laboratory medicine: linking the concepts of biological variation and allowable medical errors. *Clin Chim Acta*. 2003 Jul 15;333(2):169–76.
35. Plebani M, Ceriotti F, Messeri G, Ottomano C, Pansini N, Bonini P. Laboratory network of excellence: enhancing patient safety and service effectiveness. *Clin Chem Lab Med*. 2006 Jan;44(2):150–60.
36. Kalra J. Medical errors: impact on clinical laboratories and other critical areas. *Clin Biochem*. 2004 Dec;37(12):1052–62.
37. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem*. 2010 Mar;47(Pt 2):101–10.
38. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem*. 2002 May;48(5):691–8.
39. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. *Clin Chem*. 1997 Aug;43(8 Pt 1):1348–51.
40. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6 - month monitoring. *BMC Clin Pathol*. 2001 Jan;1(1):5.
41. Jones BA, Calam RR, Howanitz PJ. Chemistry specimen acceptability: a College of American Pathologists Q-Probes study of 453 laboratories. *Arch Pathol Lab Med*. 1997 Jan;121(1):19–26.

42. Kazmierczak SC, Catrou PG. Analytical interference: More than just a laboratory problem. *American Journal of Clinical Pathology*. 2000;113(1):9–11.
43. IUPAC. *Compendium of Chemical Terminology (The Gold Book)*. 2nd ed. McNaught AD, Wilkinson A, editors. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1997.
44. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Scientific Committee, Clinical Section. Expert Panel of Drug Effects in Clinical Chemistry (EPDECC). IFCC Document stage 2. draft 3. 1983.
45. Pesce AJ, Kaplan LA. Interferences in Chemical Analysis. In: Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC, editors. *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2003. p. 427–38.
46. Young DS, Thomas DW, Friedman RB, Pestaner LC. Effects of Drugs on Clinical Laboratory Tests. *Clin Chem*. 1972 Oct 1;18(10):1041–303.
47. Dimeski G, Carter A. Magnesium contamination from Terumo blood collection tubes. *Clin Chem*. 2006 Aug;52(8):1612–4.
48. Bowen RAR, Chan Y, Ruddel ME, Hortin GL, Csako G, Demosky SJ, et al. Immunoassay interference by a commonly used blood collection tube additive, the organosilicone surfactant silwet L-720. *Clin Chem*. 2005 Oct;51(10):1874–82.
49. Dimeski G, Cheung K, Ormiston B. Interference from bicarbonate reagent in magnesium measurements on the BM/Hitachi 747. *Clin Chem*. 1994 May;40(5):851–2.
50. Calam RR, Cooper MH. Recommended “order of draw” for collecting blood specimens into additive-containing tubes. *Clin Chem*. 1982 Jun;28(6):1399.
51. Fukugawa Y, Ohnishi H, Ishii T, Tanouchi A, Sano J, Miyawaki H, et al. Effect of carryover of clot activators on coagulation tests during phlebotomy. *Am J Clin Pathol*. 2012 Jun;137(6):900–3.
52. Terence G. Hall, Inese Smukste, Karen R. Bresciano, Yunxia Wang DM and RES. Identifying and Overcoming Matrix Effects in Drug Discovery and Development. In: Prasain J, editor. *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. Rijeka/Shanghai: InTech; 2012. p. 389–420.
53. Rej R. Accurate enzyme activity measurements. Two decades of development in the commutability of enzyme quality control materials. *Arch Pathol Lab Med*. 1993 Apr;117(4):352–64.
54. Kroll MH, Chesler R, Elin RJ. Effect of lyophilization on results of five enzymatic methods for cholesterol. *Clin Chem*. 1989 Jul;35(7):1523–6.

55. Kroll MH, McCudden CR. Endogenous Interferences in Clinical Laboratory Tests: Icteric, Lipemic and Turbid Samples. Berlin/Boston: Walter de Gruyter GmbH; 2013. 36 p.
56. Dimeski G, Mollee P, Carter A. Effects of hyperlipidemia on plasma sodium, potassium, and chloride measurements by an indirect ion-selective electrode measuring system. *Clin Chem*. 2006 Jan;52(1):155–6.
57. Witte DL, Brown LF, Feld RD. Effects of bilirubin on detection of hydrogen peroxide by use of peroxidase. *Clin Chem*. 1978 Oct;24(10):1778–82.
58. Knapp ML, Hadid O. Investigations into negative interference by jaundiced plasma in kinetic Jaffé methods for plasma creatinine determination. *Ann Clin Biochem*. 1987 Jan;24 (Pt 1):85–97.
59. Watkins RE, Feldkamp CS, Thibert RJ, Zak B. Interesting interferences in a direct serum creatinine reaction. *Microchem J*. 1976 Dec 1;21(4):370–84.
60. Pantanowitz L, Horowitz GL, Upalakalin JN, Beckwith BA. Artifactual hyperbilirubinemia due to paraprotein interference. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Jan;127(1):55–9.
61. Dimeski G, Carter A. Rare IgM interference with Roche/Hitachi Modular glucose and gamma-glutamyltransferase methods in heparin samples. *Clin Chem*. 2005 Nov;51(11):2202–4.
62. Dimeski G, Barnett RJ. Effects of total plasma protein concentration on plasma sodium, potassium and chloride measurements by an indirect ion selective electrode measuring system. *Crit Care Resusc*. 2005 Mar;7(1):12–5.
63. Barrett KE, Barman SM, Boitano S, Brooks HL. Blood as a Circulatory Fluid & the Dynamics of Blood & Lymph Flow. 24th ed. Ganong's Review of Medical Physiology. New York: McGraw-Hill Companies; 2012. 555-586 p.
64. Bodi V, Sanchis J, Morales JM, Marrachelli VG, Nunez J, Forteza MJ, et al. Metabolomic profile of human myocardial ischemia by nuclear magnetic resonance spectroscopy of peripheral blood serum: a translational study based on transient coronary occlusion models. *J Am Coll Cardiol*. 2012 May 1;59(18):1629–41.
65. Quehenberger O, Armando AM, Brown AH, Milne SB, Myers DS, Merrill AH, et al. Lipidomics reveals a remarkable diversity of lipids in human plasma. *J Lipid Res*. 2010 Nov;51(11):3299–305.
66. World Health Organization. Use of anticoagulants in diagnostic laboratory: stability of blood, plasma and serum samples. Geneva: WHO, 2002.
67. El Messaoudi S, Rolet F, Mouliere F, Thierry AR. Circulating cell free DNA: Preanalytical considerations. *Clin Chim Acta*. 2013 Sep 23;424:222–30.

68. Mathur SC, Schexneider KI, Hutchison RE. Hematopoiesis. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 536–56.
69. Prchal JT. Production of Erythrocytes. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 393–405.
70. Bull BS. Morphology of the Erythron. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 369–87.
71. Beutler E. Composition of the Erythrocyte. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 387–93.
72. Vajpayee N, Graham SS, Bem S. Basic Examination of Blood and Bone Marrow. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 509–35.
73. Higgins T, Beutler E, Doumas BT. Hemoglobin, Iron, and Bilirubin. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. St. Louis: Elsevier Saunders; 2006. p. 1165–208.
74. Beutler E. Destruction of Erythrocytes. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 405–11.
75. Murray RK. Red & White Blood Cells. In: Murray RK, Granner DK, Rodwell VW, editors. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 27th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 617–32.
76. Smith W. Production Distribution, and Fate of Neutrophils. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 855–63.
77. Wardlaw A. Eosinophils and Their Disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 863–79.
78. Galli SJ, Metcalfe DD, Arber DA, Dvorak AM. Basophils and Mast Cells and Their Disorders. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 879–99.
79. Douglas SD, Ho W-Z. Morphology of Monocytes and Macrophages. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 961–71.

80. Baird SM. Morphology of Lymphocytes and Plasma Cells. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 1023–31.
81. Trinchieri G, Lanier LL. Functions of Natural Killer Cells. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 1077–83.
82. Kipps TJ. Functions of B Lymphocytes and Plasma Cells in Immunoglobulin Production. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 1051–65.
83. Kipps TJ. Functions of T Lymphocytes and T Cell Receptors for Antigen. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 1065–77.
84. Kipps TJ, Carson DA. Composition and Biochemistry of Lymphocytes and Plasma Cells. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 1031–9.
85. Parise L V, Smyth SS, Shet AS, Collier BS. Platelet Morphology, Biochemistry, and Function. In: Lichtman MA, Beutler E, Seligsohn U, Kaushansky K, Kipps TO, editors. *Williams Hematology*. 7th ed. New York: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 158–1665.
86. Elghetany MT, Banki K. Erythrocytic Disorders. In: McPherson RA, Pincus MR, editors. *Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*. 22nd ed. Philadelphia: Elsevier Saunders; 2011. p. 557–600.
87. Ohmiya Y, Nakai K. Interaction of benzyl alcohol with human erythrocytes. *Jpn J Pharmacol*. 1978 Jun;28(3):367–73.
88. Saleem S, Mani V, Chadwick MA, Creanor S, Ayling RM. A prospective study of causes of haemolysis during venepuncture: tourniquet time should be kept to a minimum. *Ann Clin Biochem*. 2009 May;46(Pt 3):244–6.
89. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*. 2000 Feb;46(2):306–7.
90. Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in Serum Samples Drawn by Emergency Department Personnel versus Laboratory Phlebotomists. *Lab Med*. 2002;33(5):378–80.
91. Ashavaid TF, Dandekar SP, Keny B, Bhambhwani VR. Influence of blood specimen collection method on various preanalytical sample quality indicators. *Indian J Clin Biochem*. 2008 Apr;23(2):144–9.

92. Dugan L, Leech L, Speroni KG, Corriher J. Factors affecting hemolysis rates in blood samples drawn from newly placed IV sites in the emergency department. *J Emerg Nurs.* 2005 Aug;31(4):338–45.
93. Halm MA, Gleaves M. Obtaining blood samples from peripheral intravenous catheters: best practice? *Am J Crit Care.* 2009 Sep;18(5):474–8.
94. Barnard EBG, Potter DL, Ayling RM, Higginson I, Bailey AG, Smith JE. Factors affecting blood sample haemolysis: a cross-sectional study. *Eur J Emerg Med.* 2014 Aug 2;
95. Lowe G, Stike R, Pollack M, Bosley J, O'Brien P, Hake A, et al. Nursing blood specimen collection techniques and hemolysis rates in an emergency department: analysis of venipuncture versus intravenous catheter collection techniques. *J Emerg Nurs.* Elsevier; 2008 Feb 2;34(1):26–32.
96. Grant MS. The effect of blood drawing techniques and equipment on the hemolysis of ED laboratory blood samples. *J Emerg Nurs.* 2003 Apr;29(2):116–21.
97. Bowen RAR, Hortin GL, Csako G, Otañez OH, Remaley AT. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. *Clin Biochem.* 2010 Jan;43(1-2):4–25.
98. Bush V, Mangan L. The Hemolyzed Specimen: Causes, Effects, and Reduction. *LabNotes.* 2003;13(1):1–7.
99. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Cesare Guidi G. Influence of the needle bore size used for collecting venous blood samples on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med.* 2006 Jan;44(8):1009–14.
100. Lippi G, Salvagno GL, Brocco G, Guidi GC. Preanalytical variability in laboratory testing: influence of the blood drawing technique. *Clin Chem Lab Med.* 2005 Jan;43(3):319–25.
101. Fang L, Fang S-H, Chung Y-H, Chien S-T. Collecting factors related to the haemolysis of blood specimens. *J Clin Nurs.* 2008 Sep;17(17):2343–51.
102. Ong MEH, Chan YH, Lim CS. Reducing blood sample hemolysis at a tertiary hospital emergency department. *Am J Med.* 2009 Nov;122(11):1054.e1–6.
103. Guss DA, Chan TC, Killeen JP. The impact of a pneumatic tube and computerized physician order management on laboratory turnaround time. *Ann Emerg Med.* 2008 Feb;51(2):181–5.
104. Fernandes CMB, Worster A, Eva K, Hill S, McCallum C. Pneumatic tube delivery system for blood samples reduces turnaround times without affecting sample quality. *J Emerg Nurs.* 2006 Apr;32(2):139–43.

105. Kratz A, Salem RO, Van Cott EM. Effects of a pneumatic tube system on routine and novel hematology and coagulation parameters in healthy volunteers. *Arch Pathol Lab Med*. 2007 Feb;131(2):293–6.
106. Pragay DA, Edwards L, Toppin M, Palmer RR, Chilcote ME. Evaluation of an improved pneumatic-tube system suitable for transportation of blood specimens. *Clin Chem*. 1974 Jan;20(1):57–60.
107. Sodi R, Darn SM, Stott A. Pneumatic tube system induced haemolysis: assessing sample type susceptibility to haemolysis. *Ann Clin Biochem*. 2004 May;41(Pt 3):237–40.
108. Böckel-Frohnhofer N, Hübner U, Hummel B, Geisel J. Pneumatic tube-transported blood samples in lithium heparinate gel separator tubes may be more susceptible to haemolysis than blood samples in serum tubes. *Scand J Clin Lab Invest*. 2014 Oct;74(7):599–602.
109. Kara H, Bayir A, Ak A, Degirmenci S, Akinci M, Agacayak A, et al. Hemolysis associated with pneumatic tube system transport for blood samples. *Pakistan J Med Sci*. 2014 Jan;30(1):50–8.
110. Stair TO, Howell JM, Fitzgerald DJ, Bailey SC, Bastasch MD. Hemolysis of blood specimens transported from ED to laboratory by pneumatic tube. *Am J Emerg Med*. 1995 Jul;13(4):484.
111. Steige H, Jones JD. Evaluation of pneumatic-tube system for delivery of blood specimens. *Clin Chem*. 1971 Dec;17(12):1160–4.
112. Arndt T, Kropf J. A prolonged time interval between blood sample collection and centrifugation causes an increase in serum carbohydrate-deficient transferrin. *Med Sci Monit*. 2002 Feb;8(2):BR61–4.
113. Boyanton BL, Blick KE. Stability studies of twenty-four analytes in human plasma and serum. *Clin Chem*. 2002 Dec;48(12):2242–7.
114. Tanner M, Kent N, Smith B, Fletcher S, Lewer M. Stability of common biochemical analytes in serum gel tubes subjected to various storage temperatures and times pre-centrifugation. *Ann Clin Biochem*. 2008 Jul;45(Pt 4):375–9.
115. Mensel B, Wenzel U, Roser M, Lüdemann J, Nauck M. Considerably reduced centrifugation time without increased hemolysis: evaluation of the new BD Vacutainer SSTTMII Advance. *Clin Chem*. 2007 Apr;53(4):794–5.
116. Ismail A, Shingler W, Seneviratne J, Burrows G. In vitro and in vivo haemolysis and potassium measurement. *BMJ*. 2005 Apr 23;330(7497):949.
117. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1986 Feb;24(2):127–39.

118. Grafmeyer D, Bondon M, Manchon M, Levillain P. The influence of bilirubin, haemolysis and turbidity on 20 analytical tests performed on automatic analysers. Results of an interlaboratory study. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1995 Jan;33(1):31–52.
119. Szasz G, Gerhardt W, Gruber W, Bernt E. Creatine kinase in serum: 2. Interference of adenylate kinase with the assay. *Clin Chem.* 1976 Nov;22(11):1806–11.
120. Van der Woerd-de Lange JA, Guder WG, Schleicher E, Paetzke I, Schleithoff M, Wieland OH. Studies on the interference by haemoglobin in the determination of bilirubin. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983 Jul;21(7):437–43.
121. Greenson JK, Farber SJ, Dubin SB. The effect of hemolysis on creatine kinase determination. *Arch Pathol Lab Med.* 1989 Feb;113(2):184–5.
122. Steen G, Vermeer HJ, Naus AJM, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CHH. Multicenter evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin and lipids on Synchron LX-20 assays. *Clin Chem Lab Med.* 2006 Jan;44(4):413–9.
123. Da Fonseca-Wollheim F. Haemoglobin interference in the bichromatic spectrophotometry of NAD(P)H at 340/380 nm. *Eur J Clin Chem Clin Biochem.* 1993 Sep;31(9):595–601.
124. Lippi G. Haemolysis: causes, affects, prevalence, measurement & solutions in pathology. *Clin Chem Lab Med.* 2009;47:S77–105.
125. Lippi G, Salvagno GL, Favaloro EJ, Guidi GC. Survey on the prevalence of hemolytic specimens in an academic hospital according to collection facility: opportunities for quality improvement. *Clin Chem Lab Med.* 2009 Jan;47(5):616–8.
126. Simundic A-M, Nikolac N, Ivankovic V, Ferenec-Ruzic D, Magdic B, Kvaternik M, et al. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med.* 2009 Jan;47(11):1361–5.
127. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. *Clin Chem.* 1989 May;35(5):837–9.
128. Hawkins R. Discrepancy between visual and spectrophotometric assessment of sample haemolysis. *Ann Clin Biochem.* 2002 Sep;39(Pt 5):521–2.
129. Malinauskas RA. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. *Artif Organs.* 1997 Dec;21(12):1255–67.
130. Lammers M, Gressner AM. Immunonephelometric quantification of free haemoglobin. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1987 Jun;25(6):363–7.

131. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). NCCLS Document H15-A3: National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). NCCLS Document H1-A5: Tubes and additives for venous blood specimen collection; Approved standard. vol. 20, .
132. Drabkin DL, Austin JH. SPECTROPHOTOMETRIC STUDIES. II. PREPARATIONS FROM WASHED BLOOD CELLS; NITRIC OXIDE HEMOGLOBIN AND SULFHEMOGLOBIN. J Biol Chem. 1935 Dec 1;112(1):51–65.
133. Lippi G, Avanzini P, Campioli D, Da Rin G, Dipalo M, Aloe R, et al. Systematical assessment of serum indices does not impair efficiency of clinical chemistry testing: a multicenter study. Clin Biochem. 2013 Sep;46(13-14):1281–4.
134. Narayanan S, Guder WG. Preanalytical variables and their influence on the quality of laboratory results. eJIFCC Vol. 13. No. 1.
135. Guder WG, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H, et al. The Haemolytic, Icteric and Lipemic Sample Recommendations Regarding their Recognition and Prevention of Clinically Relevant Interferences. J Lab Med. 2000;24(8):357–64.
136. DIN ISO 6710. Single use containers for venous blood specimen collection. Berlin: Beuth Verlag, 1996.
137. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). NCCLS Document C27-A: Blood gas preanalytical considerations: specimen collection, calibration and controls; Approved guideline. vol. 13, no. 6. 1993.
138. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). NCCLS Document H1-A5: Tubes and additives for venous blood specimen collection; Approved standard. vol. 23, no. 33. 2003.
139. Vermeer HJ, Steen G, Naus AJM, Goevaerts B, Agricola PT, Schoenmakers CHH. Correction of patient results for Beckman Coulter LX-20 assays affected by interference due to hemoglobin, bilirubin or lipids: a practical approach. Clin Chem Lab Med. 2007 Jan;45(1):114–9.
140. Shepherd J, Warner MH, Poon P, Kilpatrick ES. Use of haemolysis index to estimate potassium concentration in in-vitro haemolysed serum samples. Clin Chem Lab Med. 2006 Jan;44(7):877–9.
141. Greene DN, Holmes DT, Lin M-J, Liang JY, Lorey TS, Schmidt RL. Development of an equation to correct for hemolysis in direct bilirubin measurements. Clin Chim Acta. 2014 Mar 15;429:194–7.
142. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, et al. Recommendations for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med. 2007 Jan;45(6):728–36.

143. Lippi G, Musa R, Aloe R, Mercadanti M, Pipitone S. Influence of temperature and period of freezing on the generation of hemolysate and blood cell lysate. *Clin Biochem.* 2011 Oct;44(14-15):1267–9.
144. Beckman Coulter Inc, LIH testing on the AU5800 chemistry analyzer document, California, 2012.
145. Ricós C, Alvarez V, Cava F, García-Lario J V, Hernández A, Jiménez C V, et al. Current databases on biological variation: pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest.* 1999 Nov;59(7):491–500.
146. Baer DM, Ernst DJ, Willeford SI, Gambino R. Investigating elevated potassium values. *MLO Med Lab Obs.* 2006 Nov;38(11):24, 26, 30–1.
147. Dimeski G, Badrick T, John AS. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences--a review. *Clin Chim Acta.* 2010 Mar;411(5-6):309–17.
148. Westgard JO. Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from biologic variation, <http://www.westgard.com/biodatabase1.htm>.
149. Dolci A, Panteghini M. Harmonization of automated hemolysis index assessment and use: Is it possible? *Clin Chim Acta.* 2014 May 15;432:38–43.
150. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis interferences on routine biochemistry parameters. *Biochem medica.* 2011 Jan;21(1):79–85.
151. Meites S. Letter: Reproducibly simulating hemolysis, for evaluating its interference with chemical methods. *Clin Chem.* 1973 Nov;19(11):1319.
152. Ji JZ, Meng QH. Evaluation of the interference of hemoglobin, bilirubin, and lipids on Roche Cobas 6000 assays. *Clin Chim Acta.* 2011 Aug 17;412(17-18):1550–3.
153. Zou J, Nolan DK, LaFiore AR, Scott MG. Estimating the effects of hemolysis on potassium and LDH laboratory results. *Clin Chim Acta.* 2013 Jun 5;421:60–1.
154. Ney PA, Christopher MM, Hebbel RP. Synergistic effects of oxidation and deformation on erythrocyte monovalent cation leak. *Blood.* 1990 Mar 1;75(5):1192–8.
155. Kinoshita K, Tsong TT. Hemolysis of human erythrocytes by transient electric field. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 May;74(5):1923–7.

6.2 EKLER

EK 1 : ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU KARAR FORMU									
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2013/13-01		Tarih: 17.06.2013						
	Yard.Doç.Dr.Tuncay KÜME'nin sorumlusu olduğu "In Vitro Hemoliz Sürecinde Etkilenen Hücre Tipi ve Sayısının Bazı Rutin Biyokimyasal Test Sonuçları Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, bilimsel ve etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.								
	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALARI ETİK KURULU								
	ÇALIŞMA ESASI		Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ							
Unvanı/Adı/Soyadı	Kurumu	Uzmanlık Alanı	Cinsiyet		Araştırma ile ilişkisi		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Ayşegül YILDIZ	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	Katılmış
Öğr.Gör.İskender İNCE	Biyofarmasötik ve Farmakokinetik	Ege Üniversitesi İlaç ve Farmakokinetik Arş-Uyg.Merk.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Yeni Doğan)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Prof.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji A.D.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Prof.Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları (Gastroenteroloji)	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Prof.Dr.Erol TAVMERGEN	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	Katılmış
Prof.Dr.Şule KALKAN	Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Prof.Dr.A.Necati GÖKMEN	Anesteziyoloji ve Reanimasyon	Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	ANLI
Doç.Dr.Taner DAĞCI	Fizyoloji	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	Katılmış
Doç.Dr.Pembe KESKİNOĞLU	Biyoistatistik	DEU Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim A.D	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Doç.Dr.Erdem YAKA	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji A.D	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
Yard.Doç.Dr.Serdar NART	Hukuk	DEU Hukuk Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza
İhsan ÇELİKDEMİR	75.Yıl Özel İlköğretim Okulu Md. Yard.	Sağlık Mesleği Mensubu Olmayan Üye	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐	İmza

* :Toplantıda Bulunma

EK 2 : BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ ONAM FORMU

Bu araştırmada; kan alımı sırasında veya sonrasında oluşan kan hücrelerindeki parçalanmanın, hücre tipine ve sayısına bağlı olarak laboratuvar sonuçlarını nasıl etkilediğini saptamayı planlıyoruz. Bu amaçla sizden rutin biyokimya ve seroloji (1 tüp) ve hemogram (1 tüp) taraması sonrasında sonuçlarınız referans aralıklarda bulunduğu takdirde 1 ünite tam kan örneğinizi bu araştırmaya yardımcı olmak üzere kullanmak için izninizi istiyoruz.

Kan alma işlemi sırasında birlikte olacağız; ama sonrasında meydana gelebilecek herhangi bir zarar durumunda Dr. Burcu ÜNLÜ'ye 0 505 4539156 ya da 0 232 4122559 no'lu telefonlardan ulaşip yardım isteyebilirsiniz.

Bu çalışma sırasında uygulanacak testlerin ve araştırma ile ilgili gerçekleştirilecek diğer işlemlerin masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödettirilmeyecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddetme ya da araştırma başladıktan sonra devam etmeme hakkına sahipsiniz. Bu çalışmaya katılmanız daha sonraki tıbbi bakımlarınızı etkilemeyecektir. Araştırmacı da sizin rızanıza bakmadan, araştırma koşullarına uymayan örneğinizi araştırma dışı bırakma hakkına sahiptir.

Bu çalışmada yer aldığınız süre içerisinde kayıtlarınızın yanı sıra ilişkili sağlık kayıtlarınız kesinlikle gizli kalacaktır. Bununla birlikte kayıtlarınız kurumun yerel etik kurul komitesine ve Sağlık Bakanlığı'na açık olacaktır. Hassas olabileceğiniz kişisel bilgileriniz yalnızca araştırma amacıyla toplanacak ve işlenecektir. Çalışma verileri herhangi bir yayın ve raporda kullanılırken bu yayında isminiz kullanılmayacak ve veriler izlenerek size ulaşılmayacaktır. Alınan örnekler bu çalışma dışında kullanılmayacak, çalışma sonrasında imha edilecektir.

Aşağıda araştırmamız için çoğu kan merkezlerinde de sorulan soruları yanıtlamanız gereklidir.

Vereceğiniz tüm yanıtlar ve size ait bilgiler kesinlikle gizli tutulacaktır.

	EVET	HAYIR
1- Son 8 saat içerisinde yemek yediniz mi?.....	☐	☐
2- Son 48 saat içerisinde her hangi ilaç kullandınız mı?.....	☐	☐
3- Son 1 hafta içerisinde; solunum yolu enfeksiyonu, ishal, ateşli bir hastalık geçirdiniz mi? Bu süre içerisinde dış tedavisi oldunuz mu? Antibiyotik kullandınız mı?	☐	☐
4- Son 1 ay içerisinde herhangi bir aşı oldunuz mu?.....	☐	☐
5- Son 1 ay içerisinde ilaç kullanmanızı veya tedavi olmanızı gerektirecek bir hastalığınız oldu mu?.....	☐	☐
6- Son 3 ay içerisinde kan bağışı yaptınız mı? Size kan bağışı yaptıktan sonra test sonuçlarınızda kan vermenize engel bir durum olduğu söylendi mi?	☐	☐
7- Son 3 ay içerisinde; dış tedavisi (dış çekilmesi, dış taşı temizliği, kök tedavisi) oldunuz mu?.....	☐	☐
8- Devamlı kullandığınız bir ilaç var mı?.....	☐	☐
9- Kalp hastalığı – kalp krizi, kalp yetmezliği, kalp kapak rahatsızlıkları – geçirdiniz mi?.....	☐	☐
10- Akciğer hastalığı – astım, verem (tüberküloz)- geçirdiniz mi?.....	☐	☐
11- Böbrek hastalığı, şeker hastalığı, tiroid hastalığı geçirdiniz mi?.....	☐	☐
12- Sık sık bayılma nöbetleri geçirir misiniz? Sara hastası mısınız veya bununla ilgili tedavi görüyor musunuz?.....	☐	☐
13- Sıtma (malarya) geçirdiniz mi?.....	☐	☐
14- Kanser hastalığı geçirdiniz mi?.....	☐	☐
15- Malta humması veya peynir hastalığı (brusella) geçirdiniz mi?.....	☐	☐
16- Bulaşıcı sarılık (viral hepatit) – Hepatit B, Hepatit C, Kalaazar – geçirdiniz mi?.....	☐	☐
17- Kanamalı bir hastalık veya kan hastalığı geçirdiniz mi? Bir yeriniz kesildiğinde kanınız zor mu durur? Hemofili (pıhtılaşma bozukluğu) nedeniyle faktör konsantresi kullandınız mı?.....	☐	☐

	EVET	HAYIR
18- Sebebi açıklanamayan kilo kaybı, gece terlemeleri, 10 günden fazla süren sebebi açıklanamayan ateş, deride mor lekelenmeler, ağız ve boğazda beyaz döküntüler,uzun süren iyileşmeyen öksürük ve ishal gibi rahatsızlık belirtileriniz oldu mu?.....	☐	☐
19- Damar içi bağımlılık yapıcı madde kullandınız mı? Kokain kullandınız mı?.....	☐	☐
20- Son 12 ay içerisinde size kan veya kan ürünü verildi mi? Doku veya organ nakli yapıldı mı?.....	☐	☐
21- Son 12 ay içerisinde ameliyat geçirdiniz mi? Dişle ilgili ameliyat geçirdiniz mi?.....	☐	☐
22- Son 12 ay içerisinde kulak veya cildinizin başka bir yerini deldirdiniz mi? Dövme, akapunktur yaptırdınız mı?.....	☐	☐
23- Son 12 ay içerisinde herhangi bir ortamda vücudunuza başka birine ait kan bulaşı oldu mu?.....	☐	☐
24- Son 12 ay içerisinde cinsel yolla bulaşan bir hastalık (frengi, bel soğukluğu) geçirdiniz mi ya da bu tür rahatsızlığı olan birisiyle cinsel ilişkiye girdiniz mi?.....	☐	☐
25- Son 12 ay içerisinde bulaşıcı tip sarılığı olan (B ve C tipi sarılık) veya diyalize giren birisiyle yaşadınız mı veya böyle birisiyle cinsel ilişkiniz oldu mu?.....	☐	☐
26- Son 12 ay içerisinde HIV taşıyıcısı veya AIDS olduğunu bildiğiniz biri ile cinsel ilişkiniz oldu mu?.....	☐	☐
27- Son 12 ay içerisinde bulaşıcı tip sarılığı olan (B ve C tipi sarılık) bir kişiyle yakın bir ilişki içinde oldunuz mu?.....	☐	☐
28- Son 12 ay içerisinde şüpheli bir hayvan tarafından ısırıldınız mı? Kuduz aşısı oldunuz mu?.....	☐	☐
29- Kadınlar için : Şu an hamile misiniz? Son 6 ay içerisinde düşük yaptınız mı veya kürtaj oldunuz mu?.....	☐	☐

Yukarıdaki soruları formdaki bilgilendirme yazılarını okuyarak doğru olarak yanıtladım. Kanımın araştırma amacıyla kullanılmasını ve gerekli görülecek her türlü test taramasının yapılmasını kabul ediyorum.

Gönüllünün :

Adı :

Soyadı :

Tarih :

Tel :

Adres :

İmza:

Olur Alma İşlemine Başından Sonuna Kadar Tanıklık Eden Kuruluş Görevlisinin :

Adı :

Soyadı :

Tarih :

Görevi :

İmza:

Araştırmacının :

Adı :

Soyadı :

Tarih :

Tel :

İmza: