



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TBARS-MDA ANALİZİNDE HEMOLİZİN İNTERFERANS ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Serpil TOSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Asım ÖREM

TRABZON-2016



TÜRKİYE CUMHURİYETİ
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

TBARS-MDA ANALİZİNDE HEMOLİZİN İNTERFERANS ETKİSİNİN İNCELENMESİ

Serpil TOSUN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Prof. Dr. Asım ÖREM

TRABZON-2016

ONAY

Bu Tez Yüksek Lisans Tezi Standartlarına Uygun Bulunmuştur

Prof. Dr. Süleyman Caner KARAHAN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı



Karadeniz Teknik Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisi Serpil TOSUN'un hazırladığı **"TBARS-MDA Analizinde Hemolizin İnterferans Etkisinin İncelenmesi"** başlıklı tez KTÜ Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca kapsam ve bilimsel kalite yönünden değerlendirilerek Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman Prof. Dr. Asım ÖREM



Yüksek Lisans Sınavı Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Asım ÖREM



Prof. Dr. Birgül V. KURAL



Doç. Dr. Hüseyin Avni UYDU



Tarih:/.../201...

Bu tez KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun/.../.... tarih ve ... sayılı kararıyla onaylanmıştır.

.....

Prof. Dr. Ali Osman KILIÇ

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının KTÜ Sağlık Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzu standartlarına uygun olarak yazıldığını, tezin akademik ve etik kurallara bağlı kalınarak gerçekleştirilmiş özgün bir bilimsel araştırma eserim olduğunu, tezde yer alan ve bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen tüm bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve kaynakların kaynaklar listesinde yer aldığını, tezin çalışılması ve yazımı aşamalarda patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tarih: 05.05.2016

Serpil TOSUN

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi olarak sunduğum bu çalışmada, bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, eğitim hayatım boyunca yardımlarını esirgemeyen danışman hocam sayın Prof. Dr. Asım ÖREM'e

Yüksek lisans eğitimimde büyük ve sayısız emekleri olan Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyeleri sayın Prof. Dr. Birgül KURAL, Prof. Dr. Eşref Edip KEHA, Prof. Dr. S. Caner KARAHAN, Prof. Dr. Orhan DEĞER, Prof. Dr. Yüksel ALİYAZICIOĞLU, Prof. Dr. Ahmet ALVER, Doç. Dr. Ahmet MENTEŞE'ye, Yrd. Doç. Dr. Fulya B. YÜCESAN'a ve öğretim üyesi olan Yrd. Doç. Dr. İbrahim TURAN'a,

Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki başta Arş. Gör. Serap ÖZER YAMAN'a, , Arş. Gör. Tuğba M. ŞEN'e, Arş. Gör. Sevil KÖR'e ve tüm araştırma görevlisi, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Her zaman bana destek olan, her türlü fedakârlığı ve sabrı gösteren anneme, babama ve eşime en içten dileklerle teşekkür ederim.

Serpil TOSUN

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KABUL ve ONAY	
BEYAN	
TEŞEKKÜR	
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
SİMGELER, KISALTMALAR ve FORMÜLLER DİZİNİ	xi
1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ ve AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	6
4.1. Lipid Peroksidasyonu ve Türetilmiş Aldehitlere Giriş	6
4.2. Lipid Peroksidasyonunun Biyolojik Sonuçları	7
4.3. Lipid Peroksidasyon Ürünleri	8
4.3.1. Malondialdehit	8
4.3.1.1. Enzimatik Süreçler Tarafından MDA Üretimi	8
4.3.1.2. Enzimatik Olmayan Süreçler Tarafından MDA Üretimi	10
4.3.2. MDA Metabolizması	10
4.3.3. MDA Biyomolekülleri Eklentileri	10
4.4. Laboratuvar Hata Kaynakları	12
4.5. İnterferans	12
4.5.1. Eksojen İnterferan Maddeler	13
4.5.1.1. İlaçlar	13
4.5.1.2. Katkı Maddeleri	13
4.5.1.3. Matriks Etkileri	13
4.5.2. Endojen İnterferan Maddeler	14
4.5.2.1. Lipemi	14
4.5.2.2. Hiperbilirubinemi (ikter)	14
4.5.2.3. Paraproteinemia	14
4.6. Hemoliz	15

4.6.1. Eritrositler ve Genel Özellikleri	15
4.6.2. Hemolize Örneklerin Sınıflandırılması	16
4.7. <i>İn vivo</i> Hemoliz	16
4.8. <i>İn vitro</i> Hemoliz	17
4.9. <i>İn vitro</i> Hemoliz İnterferansı	17
4.9.1. Biyolojik İnterferans	17
4.9.2. Spektral İnterferans	17
4.9.3. Kimyasal İnterferans	18
5. GEREÇ ve YÖNTEM	19
5.1. Gereç	19
5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler	19
5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	20
5.2. Metod	21
5.2.1. Deneyin Planlanması ve Çalışılması	21
5.3. Yöntem	21
5.3.1. Serum Havuzlarının Hazırlanması	21
5.3.2. Hemolizat Hazırlanması	21
5.3.3. Hemolizat İndeksinin Belirlenmesi	22
5.3.4. Malondialdehit (MDA) tayin yöntemi	22
5.4. İstatistiksel Yöntemler	24
6. BULGULAR	25
7. TARTIŞMA ve SONUÇ	28
8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER	33
8.1. Sonuçlar	33
8.2. Öneriler	33
9. EKLER	34
10. KAYNAKLAR	38
11. ETİK KURUL ONAYI	46
12. ÖZGEÇMİŞ	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
Tablo 1.	Hemolize örneklerin sınıflandırılması	16
Tablo 2.	Kullanılan cihazlar ve malzemeler	19
Tablo 3.	Kullanılan kimyasal maddeler	20
Tablo 4.	Yüksek ve düşük grupların serum MDA (Malondialdehit) düzeyleri	25
Tablo 5.	Düşük ve yüksek serum MDA düzeylerinin ortalama, standart sapma ve yüzde hata oranları	26

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
Şekil 1.	HNE, MDA ve akroleinlerin kimyasal yapıları	7
Şekil 2.	MDA oluşumu ve metabolizması	9
Şekil 3.	MDA (Malondialdehit) standart grafiği	23
Şekil 4.	Hemoliz indekse göre düşük ve yüksek serum MDA interferogramı	27



KISALTMALAR, SİMGE ve FORMÜLLER DİZİNİ

Kısaltmalar

AKRs	Aldo-Keto Redüktaz
AA	Araşidonik Asit
AP-1	Aktif Edici Protein-1
Apo B	Apolipoprotein B
AO	Aldehit Oksidaz
VLDL	Çok Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
D.BIL	Direkt Bilirubin
OxLDL	Düşük Yoğunluklu Lipoprotein
RBC	Eritrosit
GSH	Glutasyon
GSTs	Glutasyon s-transferaz
GSIS	Glikoz Uyarıcı İnsülin Salgı Adacığ
HNE	4-Hidroksi-2-Nonenal
CK	Kreatin Kinaz
LDH	Laktat Dehidrogenaz
LOOH	Lipid Hidro Peroksit
MDA	Malondialdehit
MG	Metilglioksalin
PGH₂	Prostaglandin H ₂
TXA₂	Tromboksan A ₂
T.BIL	Total Bilirubin

Formüller

CH₃COOH	Asetik Asit
H₃PO₄.12WO₃.H₂O	Fosfotungustik Asit
H₂SO₄	Sülfürik Asit
C₄H₄O₂N₂S	Tiyobarbitürik Asit

ÖZET

TBARS-Malondialdehit (MDA) Analizinde Hemolizin İnterferans Etkisinin İncelenmesi

Hemoliz, eritrositlerin hücre membranındaki hasar sonucu başta hemoglobin olmak üzere eritrositlerin içerdiği tüm materyalin içinde bulunduğu serum veya plazmaya geçmesidir. Hemoliz, serbest hemoglobin konsantrasyonun yaklaşık 15-20 mg/dL olması durumunda kan parametrelerini interfere etmeye başladığı gösterilmiştir. Hemolitik interferans serum veya plazmadaki bir analitin hemolizin etkilerine bağlı olarak analit konsantrasyonlarında meydana getirdiği istem dışı değişimdir. Özellikle spektral interferans bunlar içinde en önemlilerinden biridir. Hemoliz özellikle 540 ve 570 nm’lerde spektral inerferansa neden olmaktadır. Malondialdehit (MDA) temel araştırmalarda en çok kullanılan bir lipid peroksidasyon değerlendirme yöntemi olup 532 nm de spektrofotometrik ölçümler yapılır. Bu çalışmanın amacı; hemolizin MDA analizi üzerine olan interferans etkisinin incelenmesi ve hemoliz için MDA ölçümünü etkileyen eşik (cut off) değerinin belirlenmesidir. Sonuç olarak hala yoğun şekilde çalışmaları yapılan MDA’nın her iki serum havuzunda da (düşük ve yüksek) MDA düzeylerinin etkilendiği görülmüştür. Yüksek MDA serum düzeyinde hemoliz indeksi yaklaşık 400-450 aralığında bir değerde sapmaya neden olurken, düşük MDA serum düzeyinde bu değer yaklaşık olarak 500-600 aralığında bir değerde sapmaya neden olmuştur. Bu nedenle bu değerler ve üzeri için hata payı getirdiğinden çalışmalara dahil edilmemelidir. Ayrıca düşük serum MDA gruplarında daha yüksek interferans olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar kelimeler: Eritrosit, Hemoliz, İnterferans, Malondialdehit, Tiyobarbitürik Asit

SUMMARY

Investigation of Interference Effect of Hemolysis in TBARS-Malondialdehyde (MDA) Analysis

Hemolysis is passing of all of the material of erythrocyte membrane, especially hemoglobin, into the serum or plasma as result of erythrocyte membrane damage. It has been shown that when the hemolysis is composed of nearly 15-20 mg/dL of free hemoglobin concentration, hemolysis started to interfere blood parameter. Hemolytic interference, an analyte in serum or plasma depends on effects of hemolysis, is involuntary change which is generated in analyte concentration. Especially spectral interference is one of the most important of them. Hemolysis causes to spectral interference especially in 540 and 570 nanometer. Malondialdehyde is a lipid peroxydation assessment method is used mostly in basic research and spectrometric measuring is done in 532 nm. The aim of this study: investigation of interference effects of hemolysis on MDA analysis and identifying of threshold value for hemolysis which affect MDA measurement. As a result both MDA's serum pools (low and high) that is still studied intensely, it was observed that MDA stages were effected. Hemolysis index caused deflection at approximately between intervals of 400-450 at high MDA serum stages, this vaule caused deflection at approximately between intervals of 500-600 at low MDA serum stages. Therefore these values and above of them shouldn't be included to studies because they need tolerance. Also it was observed that there were higher interferences at low serum MDA groups.

Key Words: Erythrocyte, Hemolysis, Interference, Malondialdehyde, Thiobarbituric Acid

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Analitik süreçleri etkileyebilecek faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkün olduğu kadar giderilmesi, sonuçların doğruluğunu saptamak açısından son derece önemlidir (1). Laboratuvar test sonuçları, klinik muhakeme, karar verme ve tedavi izlemine önemli bir bilgi sağlamaktadır. Uluslararası Standardizasyon Örgütü (ISO) tarafından yayınlanan en güvenilir tanımlamaya göre, laboratuvar hatası “ testleri raporlanmış sonuçlar şeklinde düzenlemeyi ve uygun şekilde yorumlamayı engelleyen herhangi bir defekt” olarak kabul görmüştür. Klinik laboratuvar hataları, analiz öncesi (preanalitik), analiz sırası (analitik) ve analiz sonrası (postanalitik) olmak üzere üç ana grupta toplanmıştır (2). Hemoliz; sonucun güvenilirliğini etkileyen en önemli preanalitik hata kaynağındandır (2rutin). Bazı çalışmalar da hemoliz en sık numune red nedeni olarak görülmektedir (3 rutin). Hemolizli numuneler, uygun olmayan numune tanımına giren örneklerin %40-%70’ ini oluşturmaktadır ve yetersiz numune, pıhtılı numune, doğru olmayan numune gibi diğer tanımlanan nedenlerden beş kez daha fazla gözlemlenmiştir (4-5 rutin). İnterferans, bir madde veya sürecin bir tahlilin sonucunu yanlış olarak değiştirdiğinde oluşur. Bu daha fazla uygunsuz test yapılmasına, yanlış tanımlara ve hasta için istenmeyen sonuçları doğurma potansiyeli olan tedavilere neden olabilir (3). Hemoliz toplam laboratuvar numunelerinin yaklaşık %3.3’ünde görülmekte ve reddedilen numunelerin yaklaşık %60’ ını kapsamaktadır (4). Hemoliz, eritrositlerin hücre membranındaki hasar sonucu başta hemoglobin olmak üzere eritrositlerin içerdiği tüm materyalin içerisinde bulunduğu serum veya plazmaya geçmesi olarak tanımlanmaktadır. Serbest hemoglobin plazmadaki üst referans düzeyi 2 mg/dL iken, bu değer serumda 5 mg/dL olarak gözlemlenmiştir. Hemoliz, görsel olarak serbest hemoglobin konsantrasyonunun > 30 mg/dL (118 µmol/L) olması ile tanımlanır ve bu da serum ya da plazmaya pembe kırmızı bir renk verir. Hemoliz, % 0.5 oranında lizise uğramış eritrosit içeren örneklerde belirgin hale gelmektedir (5).

Hemolizin interferans etkisinin başlıca sebepleri;

1. Eritrositlerdeki hemoglobin ve diğer intrasellüler bileşenlerinin serum veya plazmaya çıkması ile bazı analitlerin düzeyinde hatalı yükselmelere veya dilüsyonel etkilere neden olan biyolojik interferans.
2. Metodla ve analiz edilecek materyalle ilgili olan spektrofotometrik interferans.

Eritrositlerden açığa çıkan kan hücre bileşenlerinin, analitik reaksiyonun kimyasalları ile etkileşimi sonucu oluşan kimyasal interferans olarak görülmektedir (6). Lipid peroksidasyonu olarak membran lipidlerindeki hasar, serbest radikaller tarafından başlatılan ve zar yapısındaki çoklu doymamış yağ asitlerinin oksidasyonunu kapsayan kimyasal bir olay olarak tanımlanmaktadır (7). Organizmada en çok görülen radikal hasarı lipid peroksidasyonu şeklinde olup, membranda doymamış yağ asitlerinden bir hidrojen çıkarılmasıyla yağ radikali oluşur. Zincir şeklindeki reaksiyonların sonunda aldehitlerin en son basamağında yer alan MDA ise lipid peroksidasyon hasarının tespitinde kullanılır (8). Serbest oksijen gruplarının dokular üzerinde oluşturduğu hasar ve bunun sonuçlarından biri olan lipid peroksidasyonu şiddetinin derecesi anlaşılması için uygulanan yöntemlerden biri malondialdehit (MDA) düzeyinin belirlenmesidir. MDA, yağ asidi oksidasyonunun spesifik ya da kantitatif bir indikatörü değildir. Fakat lipid peroksidasyonunun derecesiyle iyi ilişki gösterir. Lipid peroksidasyonu neticesinde oluşan MDA kan plazmasında kolaylıkla teşhis edilebilmektedir ve oksidatif stres ölçümlerinde de kullanılmaktadır. Bunun yanında MDA, plazmada kolayca çözünebildiğinden dolayı idrarda da görülebilmektedir (9).

Malondialdehitler, tiyobarbitürik asitlerle tepkimeye giren maddelerin kimyasal kararlılığını ölçmede yağ asitlerinin peroksidasyonu geniş çapta işaretleyici olarak kullanılır (TBARS) (10). Nötr pH'ta MDA düşük kimyasal aktiflikte enolat anyon olarak bulunur (11). Ancak nükleik asit bazlı değişik birkaç ek ile tepkime verebilir (12). MDA canlı içinde öncül aminelerle reaksiyona girip Ne-(2-propenal) lizin formuna ve lizin-lizin çaprazlamasını 1-amino-3-iminopropan ve piridil dihidropiridin tipi köprüler oluşturur (13).

Gerek klinik gerekse temel biyokimya araştırmalarında, lipid peroksidasyonu çok fazla değerlendirilen biyokimyasal yollardan biridir. Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunu değerlendirmek amacıyla yaygın olarak kullanılan testlerden biridir. MDA ile ilgili Pubmed veritabanının literatür taramasına göre 35.000'in üzerinde araştırma makalesi karşımıza çıkmakta ve bu araştırmaların yaklaşık 7.500 tanesinde kan serum örneklerinin kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca bu araştırmaların büyük bir kısmını, örnek alımının çok zor olduğu hayvan çalışmaları oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu numunelerde farklı derecelerde hemoliz görülmesi kuvvetle muhtemeldir. Hemolizin

bilinen interferans etkilerine dayanılarak yapılan literatür taramasında MDA üzerine interferans etkiyi gösteren bir çalışma görülmemektedir.

Bu çalışma ile farklı hemoliz derecelerinin serum MDA düzeyi üzerine olan interferans etkisi ortaya koyularak, araştırmacılara hangi hemoliz derecelerine sahip serum örneklerinin çalışmalarına dahil edilip edilemeyeceği konusunda bir yol gösterilebilecek, böylelikle daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşmalarına katkı sağlanabilecektir.

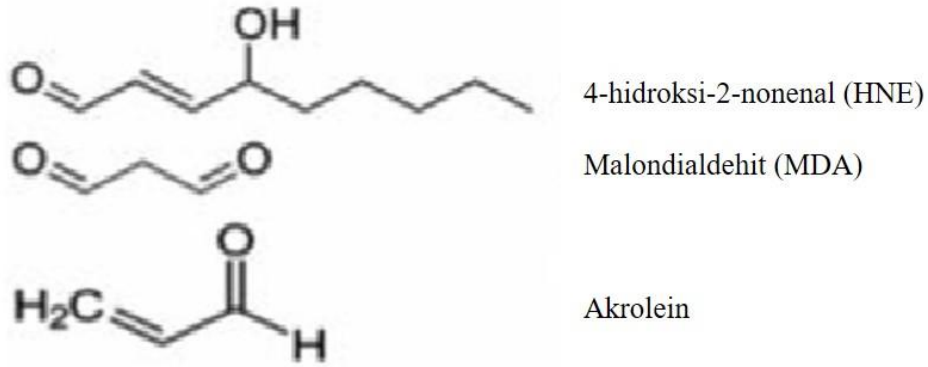


4. GENEL BİLGİLER

4.1. Lipid Peroksidasyonu ve Türetilmiş Aldehitlere Giriş

Ara reaktifler, çift taraflı lipid zarlarında çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA'lar) oksidasyonun neden olduğu oksidatif stres koşullarında ortaya çıkarak en sonunda aldehit şeklini alır. Akrolein en reaktif aldehit iken bunların yanında en verimli aldehitler 4-hidroksi-2-nonenal (HNE) ve malondialdehittir. HNE en yüksek biyolojik aktiviteyi sergileyen ve bu yüzden üzerinde en yoğun çalışılan lipoperoksidasyon ürünüdür. Fizyolojik koşullar altında malondialdehit (MDA) biraz reaktiflik gösterse bile beta-hidroksiakroleinin üstün türleri geldiğinde akrolein ve HNE'ye benzer olarak düşük pH'ta reaktifliği artar, nükleofillere 1,4 Michael tipi yaklaşım haline dönüşebilir. MDA'nın glisin ve glutatyon (GSH) ile reaksiyon vermediği ve fizyolojik koşullar altında sistein ile yavaş reaksiyona girdiği gösterilmesine rağmen (14) hücrel proteinler daha çok MDA tarafından değiştirilirler (15).

Aldehitlerin ana reaksiyonları, glutatyon S-transferazlar (GSTs) tarafından katalize edilebilen ya da kendiliğinden oluşabilen, alkollerde aldo-keto redüktazlar (AKRs) tarafından indirgenme ya da aldehit dehidrogenezleri tarafından alkol hidrogenezi ve oksidasyon asitleri glutatyona yaklaştırır. Aldehitlerin yapısı Esterbauer ve iş arkadaşları tarafından muhteşem bir şekilde incelenmiştir (14). Yüksek yoğunluklarda bütün aldehitler lipid peroksidasyonda zehirleyici rol oynar. Aldehit zehirliliği temelde bazı hücre fonksiyonlarının değişikliği boyunca daha çok hücre proteinleriyle kovalent yaklaşmanın şekline bağlıdır (16). Onların amfifilik doğası boyunca aldehitler zarlar arasında kolaylıkla yayılır ve orijinin uzağındaki çekirdek ve sitoplazmadaki herhangi bir proteinini kovalent bir şekilde değiştirebilir (17). Benzer olarak hücrenin dışında şekillenen aldehitler (iltihap ya da plazma bölgelerinde) bitişik hücrelerle hatta lipid peroksidasyonunun ilk bölgelerinde olmasalar bile reaksiyona girebilirler. Ekzojen ya da endojen aldehitler aynı zamanda çekirdek proteinleriyle reaksiyona girer böylece diğer düzenleyici elementler ya da benzer durumdaki reaksiyonlarında kullanılacak proteinler oluşturulur (18). Lipid peroksidasyonlu türetilmiş aldehitler; hücre ve aldehit yoğunluğu tarafından proteinlerin şekillerindeki hücre fonksiyonu ilişkilerinde farklı biyolojik sonuçlar ortaya çıkarabilir.



Şekil 1. HNE, MDA ve akroleinlerin kimyasal yapıları (Pizzimenti'den, 19)

Güçlü hidrofobik doğası nedeniyle HNE genelde üretildiği zarla alakalıdır fakat değişik hücresel elemanlara da nüfuz edebilir (20).

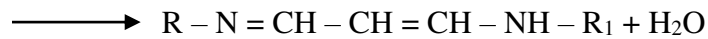
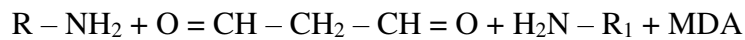
4.2. Lipid Peroksidasyonunun Biyolojik Sonuçları

Lipid peroksidasyonunun (LP) hücrede çok çeşitli zararlı etkileri vardır. Bu etkiler:

1. Membranın üç boyutlu yapısında meydana gelen değişikliklere, dolayısıyla membran bütünlüğünün bozulmasına,
2. Oluşan lipid hidroperoksitlerin ve bunların yıkılma ürünlerinin toksisitesine bağlı olmaktadır (21).

Lipid peroksidasyonuna uğrayan biyomembranlarda lipid, oksilipid ya da peroksilipid radikalleri arasında serbest radikal sonlanma reaksiyonları oluşabilir ve sonuçta lipid-lipid kovalent bağları oluşarak yapı bozulur. Membranı daha rijit hale getiren bu değişiklikler, Na/K-ATPaz gibi esansiyel membran proteinlerinin aktivitesinde değişikliklere neden olur (22).

Malondialdehit (MDA) peroksidasyon reaksiyonları sonucu oluşan kısa zincirli bi fonksiyonel bir aldehittir. İki amino grubu ile bir Schiff bazı vermek üzere reaksiyona girer:



Schiff bazı (23)

Proteinlerin bu şekilde çapraz bağlanması enzimleri inaktive eder ve seroid, lipofuksin, veya yaşlılık pigmenti gibi adlarla bilinen yüksek molekül ağırlıklı flouresan agregat oluşumuna neden olmaktadır. MDA aynı çapraz bağlanmaları fosfatidiletanolamin, fosfatidilserin veya proteinlerle yapıp membran yapısının bozulmasına neden olmaktadır. MDA'nın biyolojik moleküllerle çapraz bağ yapmasıyla oluşan Schiff bazının flouresansı, LP tayini için kullanılmaktadır (24).

4.3. Lipid Peroksidasyon Ürünleri

Lipid peroksidasyonu ya da doymamış yağların oksijenle reaksiyonu geniş bir çeşitlilikte oksidasyon ürünleri üretir. Lipid peroksidasyonunun başlıca temel ürünleri lipid hidro peroksitlerdir (LOOH). Değişik birçok aldehit tarafından ikincil ürün lipid peroksidasyonu tarafından, malondialdehit (MDA) propanal, heksanal ve 4-hidroksinenal (4-HNE) şeklinde ürünler elde edilebildiği Esterbauer ve iş arkadaşları tarafından, 80'lerde geniş bir şekilde çalışılmıştır (14, 25). MDA lipid peroksidasyonunda en mutajenik ürün olarak görünürken HNE en zehirli olanıdır (29).

4.3.1. Malondialdehit (MDA)

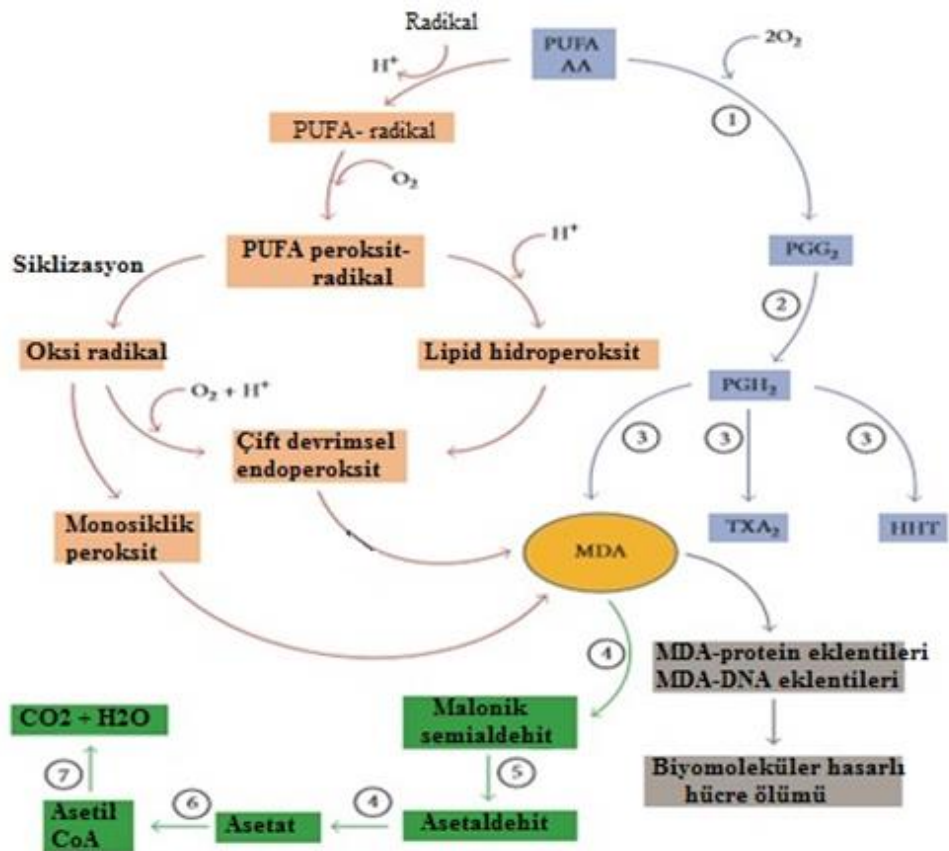
MDA enzimatik ve enzimatik olmayan süreçler yoluyla, araşidonik asit ve çoklu doymamış yağ asitlerinin (PUFA) bozunumu ile ortaya çıkan bir son üründür.

4.3.1.1. Enzimatik Süreçler Tarafından MDA Üretimi

Enzimatik süreçlerle ortaya çıkan MDA üretimi iyi bilinmektedir fakat kimyasal olarak ROS'tan (reaktif oksijen türleri) daha dengeli ve geçirgen zarlı,ve 4-HNE (4-Hidroksinonenal) ile MG'den (Metilglioksalin) daha az ağılı (zehirli) olmasına rağmen MDA'nın biyolojik işlevleri ve doza bağlı muhtemel çift rolü araştırılmamaktadır. Şu ana kadar, MDA'nın bir işaretçi ve düzenleyici gen ifadesi olarak hareket edebileceğini gösteren sadece birkaç rapor hazırlanmıştır: Yeni bir araştırma, MDA'nın bir işaretçi olarak ve çoğunlukla Wnt yoluyla glikoz uyarıcı insülin salgı adacığını (GSIS) düzenleyici olarak çalıştığını belirtmektedir. Kısmen yüksek MDA seviyesi (5 ve 10 μ M) glikoz uyarıcı salgı adacığını geliştirdi, Adenozintrifosfat (ATP) ile Adenozindifosfat (ADP) oranını ve sitozolik kalsiyum iyon seviyesini yükselterek, ve gen ifadesi ile Sp₁-Sp₃ protein seviyelerindeki reseptörleri arttırarak kolajen genleri başlatır. Histon düzenleyici enzimleri, Sp₁ ile Sp₃'ün kromatinin yeniden biçimlendirilmesinde ve gen ifadesinin düzenlenmesinde önemli transkripsiyon

faktörleri olduğunu güçlü bir şekilde ortaya koyan kromatin biçimlendirici kompleksleri içeren pek çok proteinle hem Sp₁ hem de Sp₃ etkileşime girebilir ve bu proteinleri geliştirebilir. Öte yandan, olası teröpatik (tedavi edici) değerine rağmen, enzimatik olmayan süreçlerle gerçekleşen MDA üretimi halen iyi kavranamamaktadır, çünkü bu MDA'nın stresli koşullar altında oluştuğuna, ve addüksiyon oluşumuna yol açan DNA veya proteinler gibi çoklu biyomoleküllerle yüksek seviyede tepkimeye girme kapasitesine sahip olduğuna inanılır (26, 27) ve aşırı MDA üretimi farklı patolojik durumlarla ilişkilendirilir (26, 28).

MDA canlılarda, damar daraltıcı madde olan thromboksen A₂'nin biyosentezi esnasında enzimatik süreçler tarafından yan ürün olarak üretilebilir (Şekil 2) (26, 29). TXA₂ biyolojik olarak, A₂ sentetazının hareketiyle şekillenen araşidonik asitlerin prostaglandin endoperoksit ya da prostaglandin H₂ (PGH₂) üzerindeki aktif metabolitidir. PGH₂, AA üzerindeki siklooksijenazların hareketleriyle önceden üretilir (30-32).



Şekil 2. MDA oluşumu ve metabolizması (Ayala'dan, 26)

4.3.1.2. Enzimatik Olmayan Süreçler Tarafından MDA Üretimi

Bir lipid hidroperoksit karışımı, lipid peroksidasyon süreci esnasında oluşturulur. Hidroperoksitlerin peroksil kökleri, molekül içi kök eklenmesiyle halka kapanma reaksiyonlarının çift bağ ve yeni kök oluşturmaya olanak sağlar. Halka kapanma reaksiyonundan sonra oluşan orta seviyedeki bağımsız kökler, yapısal olarak prostaglandinlere bağlı olan halkalı endoperoksitleri oluşturmak için tekrar halka kapanma reaksiyonundan geçebilirler ve MDA üretmek için bölünmeye uğrarlar. Enzimatik olmayan oksijen kök temelli reaksiyon yoluyla, MDA oluşturmak için diğer bileşimler olsun ya da olmasın, daha fazla reaksiyona maruz kalan halkalı endoperoksitlerin temel ön habercisi (prekürsör) AA'dır (Şekil 2) (26, 33, 34).

Fakat, enzimatik olmayan oksijen kök temelli reaksiyon (26, 35) yoluyla oluşturulabilen eikozanoitlerin (yağ asidi türevi bileşik), MDA'nın ve halkalı endoperoksitlerin ön habercisi olması mümkündür. Son yapılan bir araştırma ile özel durumlar altındaki enzimatik olmayan MDA oluşumu için yolları (pathway) işaret etmektedir (36).

4.3.2. MDA Metabolizması

Bir kere oluşan MDA enzimatik olarak metabolize edilebilir, hücresel ve dokusal proteinler üzerinde ya da biyomoleküler hasarlarla sonuçlanan eklentiler oluşturmak için DNA üzerinde reaksiyona geçebilir. Önceki çalışmalara göre MDA metabolizması için olası bir biyokimyasal yolun, karbondioksit kaybıyla devam eden mitokondrial aldehit dehidrojenazla oksitlenmesi asetaldehit oluşumuna yol açar, bu asetaldehitte, aldehit dehidrojenaz tarafından ve CO₂ ile H₂O tarafından oksitlendirilir (Şekil 2).

4.3.3. MDA Biyomolekülleri Eklentileri

Fizyolojik pH'ta düşük reaktifli enolate iyonu olarak bulunan çift işlevli elektrofil aldehit MDA reaktifliği pH temellidir. pH azaldığında MDA, β -hidroksiakrolin olarak oluşur ve reaktifliği artar. MDA'nın yüksek reaktifliği temel olarak, kendisini başlıca aminoasit rezidüleri (lizin, histidin, arjinin) gibi nükleofillere karşı duyarlı hale getiren elektrofilisite dayanmaktadır. Oksidatif baskı altında ve daha fazla MDA'da bulunan bir MDA metabolizması ürünü olan Asetaldehit, malondialdehit asetaldehit (MAA) eklentileri üretir. MAA yaklaşımlarının oldukça yüksek bağışıklık meydana getirdiği belirtilmektedir. MDA eklentileri/yaklaşımları biyolojik olarak önemlidir, çünkü

molekül içi veya moleküller arası protein/DNA çapraz bağını geliştirerek çapraz bağlama gibi sekonder(ikincil) zararlı tepkimelerde bulunabilirler ki bu durumda biyomoleküllerin biyokimyasal özelliklerinde derin bir değişim başlatabilir ve, yaşlanma ile kronik hastalıklar süresince birikebilir. MDA eklentileri tarafından değiştirilebilen önemli proteinler şu şekildedir:

(1) eElongasyon faktör 2 (eEF2) protein sentezi içinde mRNA boyunca ribozomun hareketini kolaylaştırır. eEF2 ile MDA eklentileri, protein sentezinin azalmasına, LP'nin artmasına katkıda bulunabilir. (2) Faktör H (FH), konak hücrelere karşı saldırıyı önlemek için kompleman etkinliğini sıkı şekilde kontrol eden sıvı içindeki alternatif yolların ana düzenleyicisidir. FH ile MDA eklentileri, canlı farelerde hem makrofajlar tarafından düzenli MDA proteinlerinin alınmasını hem de MDA uyarıcılı proinfalamatuvar etkilerini engelleyebilir. MDA eklentileri veya MAA eklentileri kompleman birleşimini geliştirebilir; oksitlenme yoluyla düzenlenen düşük yoğunluklu lipoproteinli (Ox-LDL) (3) anafilatoksin C3a (proinfalamatuvar kompleman bileşenleri) kompleman sisteminin damar tıkanıklığındaki etkinliğini kapsayan yangısal süreçlere katkıda bulunur. (4) Protein kinaz C 'nin (PKC) çoğalma, farklılaşma, yer değiştirme, iltihaplanma ve hücre iskeleti gibi süreçleri etkileyen hücre içi genetik bilgi aktarımında büyük rol oynadığı bilinmektedir (26).

MDA genellikle, en çok bilinen yol olan MDA ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyonun esas alındığı kalorimetrik deney metodu ile ölçülür. Bununla birlikte, yüksek veri akış analizi için uygun olmasına rağmen, MDA' ya spesifik reaksiyona giren bu TBA reaktif madde(TBARS) eksikliğiyle, MDA ile aynı aralıkta absorblama yapan bileşikler üretmek için TBA ile reaksiyona giren MDA dışındaki aldehytler takip edilerek ölçümü yapılır (37). Ayrıca, MDA analizi için çeşitli ticari ELİSA kitleri de temin edilebilir. Bu antikor bazlı ölçümler, özgünlüğü artırılarak iyi performans gösteren ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile MDA analizine karşın genellikle doğrudur (38).

4.4. Laboratuvar Hata Kaynakları

Tıbbi laboratuvar disiplininin amacı hekimlere ve hastalara doğru, kaliteli ve hızlı hizmet vermektir. Hataların azaltılmasındaki temel esas kullanılan sistemlerin ve yapılan işlemlerin kalitesini devamlı olarak arttırmaktır.

Total test süreci, preanalitik, analitik ve postanalitik olmak üzere üç faza ayrılmaktadır. Preanalitik faz iki alt evreye ayrılır.

1. Pre-preanalitik evre, laboratuvarın dışında gerçekleşen ve uygun test seçimi, istem yapılması, örneklerin alınması, taşınması ve laboratuvara kabulü süreçlerini içerir.
2. Konvansiyonel preanalitik evre, örneklerin analize hazır hale gelmesi: santrifüjleme, serumun/plazmanın ayrılması, dilüe edilmesi ve örneklerin uygun kısımlara gönderilmesi gibi işlemler yapılır. Bu kısım laboratuvarın kontrolü altında gerçekleşir.

Analitik evre: örneklerin analiz yapıldığı safhadır.

Postanalitik evre: analiz sonrası sonuçların hekime bildirilmesine kadar ki süreç denir (39).

Preanalitik faktörler, klinik kimya testlerinin sonuçlarındaki varyasyonların ana kaynağı olup hemoliz de bu preanalitik varyasyon sebepleri arasında sonuçların güvenilirliğini etkileyen en önemli faktörden birisidir (40). Preanalitik hata kaynaklarının çoğunda testin tanımlanmasında hata, yetersiz miktarda örnek veya örneğin yapısındaki değişikliklerden (invitro hemoliz, lipemi, ikter veya pıhtılaşma) ileri geldiği ileri sürülmüştür (41). Preanalitik aktivitelerin büyük çoğunluğu halen manuel olarak yürütülür. Bu nedenle, yoğun iş yükü ve sistemdeki bozukluklara bağlı insan kaynaklı hatalar oldukça yaygın olarak görülmektedir (42).

4.5. İnterferans

İnterferans (etkileşim), bir örnekte ölçülmek istenen bir maddenin gerçek sonucunu değiştiren ve yine o örnekte bulunan bir maddenin etkisi olarak tanımlanır. Etkilenen maddenin kaynağına bağlı olarak eskोजen ve endojen olarak iki sınıfa ayrılır.

- A. Eksojen interferan maddeler: Hastaya ait örneğe karışan maddelerden köken almaktadır. Bunlar ilaçlar, katkı maddeleri ve matrix etkileridir.
- B. Endojen interferan maddeler: Hastaya ait örnekte yer alan maddelerden oluşur. Bunlar hemoliz, lipemi, bilirubinemi ve paraproteinemiadır.

4.5.1. Eksojen İnterferan Maddeler

Eksojen interferan maddeler; sonuçlarda pozitif veya negatif bir sapmaya neden olabilir. Pozitif bir interferans, analit konsantrasyonunu daha yüksek bir seviyede gösterir, negatif interferans ise tam tersi durumu gösterir (3).

4.5.1.1. İlaçlar

Pek çok ilaç, analitin tayini ile etkileşime girmektedir. Bir hastaya herhangi bir yolla (örneğin intravenöz, oral, subcutan) verilen herhangi bir ilaç, analitik yöntemlerle interfere olmaktadır. Çoğu ilaçlar, nonpolardan iyonik olanlara dek değişen spektrumlardaki fonksiyonel grupları olan düşük molekül ağırlıklı organik bileşiklerden oluşur. Biyolojik olarak aktif olarak tasarlanan ve yüksek farmakolojik dozlarda verilen ilaçların analitlerle veya reaktiflerle etkileşime girme ihtimali daha yüksektir. İlaçların metabolitleri interferanslara sebep olabilir ve asıl ilaç kadar dikkate alınmaları gerekmektedir (43).

4.5.1.2. Katkı Maddeleri

Antikoagülasyon için yaygın olarak kullanılan maddelerin (heparin, EDTA, sitrat, oksalat) birçok analit için kullanılan yöntemlerle interfere olduğu yayınlanmıştır.

4.5.1.3. Matriks Etkileri

Örnek işlem sürecindeki değişikliklerin, sonuçlarda spesifik biyokimyasal bileşene atfedilmeyen bir neden bağlanmasından ortaya çıkar. Bu nedenle matrix etkisi, analizde elde edilen değerleri değiştiren çözeltideki değişimleri üreten maddenin hazırlanma sürecindeki ortaya çıkan herhangi bir şeydir. Bu sorun, örnek özel sürece tabi tutulunca meydana gelmektedir (40).

4.5.2. Endojen İnterferans Maddeler

4.5.2.1. Lipemi

Lipemi serum ve plazmada çıplak gözle görülebilen bulanıklık olarak tanımlanır. Lipeminin en sık gözlenen nedeni serum ve plazmada trigliserit konsantrasyonunun >300 mg/dL olmasıdır (39). Lipeminin biyokimyasal sonuçlar üzerindeki etkisini ölçüm yöntemlerine göre bazı analitler için ışık saçılımını arttırarak, bazı analitler için ise analitlerin polar (sulu) ve nonpolar (lipid) fazlarda dağılımını değiştirerek ortaya koymaktadır (44). Lipeminin ışık saçılmasına neden olmasındaki temel mekanizma şilomikronlar ve VLDL serumda süt benzeri bir bulanık yapmasına bağlıdır. Çünkü laboratuvarlarda kullanılan ölçüm yöntemlerinin çoğu belirli reaksiyon koşullarında, ölçülen örnekten yansıyan, geçen ya da absorbe olan ışık enerjisinin ölçümüne dayalı olan fotometrik ölçüm yöntemleridir (45). Aynı şekilde ışık saçılmasının nefelometri gibi ışık saçılmasına dayanan yöntemler üzerine de etkileri olduğu bilinmektedir (46). İnterferans etkisini azaltmak için numunenin yüksek hızda santrifüjü ve dillasyonu en sık kullanılan yöntemlerdendir.

4.5.2.2. Hiperbilirubinemi (ikter)

Yükselmiş bilirubin konsantrasyonları endojen interferans kaynağıdır. İnterferansın bir kısmı bilirubin spektral özelliklerinden, diğer bir kısmı ise reaktiflerle kimyasal olarak reaksiyona girme özelliklerinden ileri gelir. Spektral interferansı, 400 ile 500 nm'deki güçlü bilirubin absorpsiyonuna bağlı olmaktadır (40).

4.5.2.3. Paraproteinemia

Paraproteinler çoklu myeloma gibi hastalıkların sonucu olarak yayılabilirler. Bu proteinler serum viskozitesini artırabilir. İmmunoglobülin-G CK-BB ile kompleks oluşturabilir ve makro-CK 1 ile form oluşturur. İmmunoglobülinler LDH ve amilaz ile makro komplekslerde oluşabilir (47).

4.6. Hemoliz

Latincedeki hemo (kan) ve lizis (parçalanma) anlamına gelen hemoliz; eritrositlerin hücre membran hasarını takiben başta hemoglobin olmak üzere içerdiği tüm materyalin serum ya da plazmaya geçmesi olarak tanımlanır (5).

Hemoliz çeşitli nedenlerle oluşabilir. Hemolitik hastalıklar, kan dolaşımında görülen kan parazitleri gibi nedenlerle ortaya çıkan *in vivo* hemoliz ve ozmotik parçalanma, kompleman bağımlı hücre parçalanması, fiziksel, mekaniksel ya da kimyasal etkenler sonucu oluşan *in vitro* hemoliz şeklinde ortaya çıkar (1, 48). Yapılan çeşitli çalışmalarda hemolizin serum kimyasal parametrelerinde hatalı artış ya da azalmalara neden olduğu bildirilmiştir (48). Değişiklikler farklı mekanizmalardan kaynaklanabilmektedir. Bunlardan en yaygın görüleni eritrosit içeriğinin yayılmasıdır. Eritrositlerdeki konsantrasyonu fazla olan maddelerin konsantrasyonlarında hatalı artışlar belirlenebilir. Ayrıca eritrositten plazmaya ayrılan hemoglobin, kendi spektral absorpsiyon sınırları içinde yapılan prosedürlerde (500-600 nm) ölçümü etkilediği görülmektedir (49, 50). Kandaki hemoliz, hemoglobin konsantrasyonu 20 mg/dL den fazla olduğunda gözle görülebilir (51). Hemoliz neticesinde plazmada total protein, albümin, trigliserit, kolesterol, bilirübin, aldesterol, noradrenalin, renin, K, Ca, Mg, Fe, inorganik fosfat, aldolaz, asit fosfataz, laktat dehidrogenaz ve izositrat dehidrogenaz gibi parametrelerin konsantrasyonları belirgin bir şekilde etkilenmektedir (52).

4.6.1. Eritrositler ve Genel Özellikleri

Eritrositler (Red Blood Cell=RBC) dokulara oksijen taşıyan özelleşmiş hücrelerdir. Kan dokusunda hücresel kısmın en büyük oranını oluştururlar. Eritrositler çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedir. Bu şekli kılcal damarlardan geçerken mekanik zarar görmesini engeller. Çapları 7.5-8.7 μm kalınlıkları merkezde 0.6 μm ve kenarlarda 2.8 μm dir. Kemik iliğinde öncü hücrelerden gelişip olgunlaşmasını tamamladıktan sonra, dolaşıma salınan eritrositlerin yaşam süreleri yaklaşık 120 gündür. Hemoglobinin %34'ünü kapladığı stoplazmalarında nukleus, mitokondri, lizozomlar, ribozomlar, endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi gibi organeller yoktur (39). Eritrositlerin volümü 90 fL'dir ve yüzey alanı 136 μm^2 'dir. Eritrosit sayısı ortalama olarak erkeklerde $4.2-6.2 \times 10^{12} /\text{L}$ ve kadınlarda $3.8-5.5 \times 10^{12} /\text{L}$ civarındadır (53).

4.6.2. Hemolize Örneklerin Sınıflandırılması

Tam kan santrifüj olduğunda serum ya da plazmada tipik olarak gözle görülebilir bir kırmızılık meydana gelir. Hemoliz terimi olayın klinik mi yoksa edinsel nedenlerden mi kaynaklandığını belirlemez. İlk durumda hemoliz, *in vivo* hemoliz ya da hemolitik anemi olarak bilinen çok çeşitli medikal durumlar tarafından tetiklenmektedir. İkincil durumda ise, *in vitro* ya da sahte hemoliz olarak nitelendirilen örneğin toplanmasından analizine kadar olan süreçteki problemlerden oluşur. Tüm sebeplere rağmen laboratuvar pratiğinde hemolize örnekler tablo 1’de gösterildiği gibi serum veya plazmada serbest hemoglobin konsantrasyonuna göre sınıflandırılır.

Tablo 1. Hemolize örneklerin sınıflandırılması (Lippi’den, 54)

Sınıflandırma	Serum veya plazmadaki serbest hemoglobin	Spesmenin tahmin edilen renk durumu
Non-hemolize örnek	≤ 5 mg/dL	Sarı
Belli-belirsiz hemolize örnek	$\geq 5-30$ mg/dL	Sarıdan açık pembeye doğru
Hafif hemolize örnek	$\geq 30-60$ mg/dL	Pembeden açık kırmızıya doğru
Orta derecede hemolize örnek	$\geq 60-200$ mg/dL	Açık kırmızı
Ağır hemolize örnek	≥ 200 mg/dL	Kırmızıdan kahverengiye

Hemoliz, laboratuvara gönderilen uygunsuz örneklerin %40-70’inin reddine neden olmaktadır (55). Hemolize örneklerin çoğu (%95) hafif hemolize karakterize olup (serbest hemoglobin <30 mg/dL) ancak sadece %5’i klinik olarak fark edilebilen eşik değeri (serbest hemoglobin >30 mg/dL) aşar (56). Hemoliz *in vivo* ve *in vitro* hemoliz olarak ikiye ayrılır.

4.7. *İn vivo* Hemoliz

İn vivo hemoliz dolaşımdaki eritrositlerin prematür yıkımıyla ortaya çıkar. Kemik iliği aktivitesinin RBC miktarını kompanse edemediği hemolitik anemiye kadar ilerleyebilmektedir. *İn vivo* hemoliz ekstavasküler ve intravasküler hemoliz olmak üzere ikiye ayrılır (54). Eritrositler, özellikle karaciğer ve dalaktaki makrofajlar tarafından ortadan yok edilebilir (ekstavasküler hemoliz) veya daha nadir olarak dolaşımdayken membranları hasara uğrayıp yıkılabilir (intravasküler hemoliz) (53).

4.8. *İn vitro* Hemoliz

İn vitro hemoliz, kan örneklerinin alınması, laboratuvara ulaştırılması, işlenmesi ve depolanması esnasında meydana gelebilecek hatalardan dolayı ortaya çıkmaktadır (57).

4.9. *İn vitro* Hemoliz İnterferansı

Uluslararası Klinik Biyokimya ve Tıbbi Laboratuvarlar Federasyonu (IFCC) şu tanımlamayı yapmaktadır. "Analitik interferans örnek bileşenlerin neden olduğu, ölçüm sisteminde kendiliğinden bir sinyal üretmeyen sistematik ölçüm hatasıdır" (58). *İn vitro* hemoliz kan hücrelerinin (eritrosit, lökosit, trombosit) hasarından dolayı çok çeşitli bileşenler serum ya da plazmaya salınarak interferans çeşitliliğine neden olurlar. Hemoliz nedeniyle gelişen interferans, serbest hemoglobinin örnekteki final konsantrasyonuna direkt olarak bağlıdır (59). *İn vitro* hemoliz interferansı üç şekilde ortaya çıkmaktadır.

4.9.1. Biyolojik İnterferans

İntrasellüler alan ekstrasellüler alana göre daha yüksek olan eritrositlerin hücresel komponentleri, hemoliz esnasında plazma ya da serumda artışa neden olur. Örneğin laktat dehidrogenaz (LDH), aspartat aminotransferaz (AST), potasyum, magnezyum, fosfatın plazmadaki aktivitesi veya konsantrasyonlarında artış gözlenir (39). LDH'nın hücre içi miktarı plazmadan 160 kat, potasyum 22 kat ve magnezyum ise 3 kat daha yüksek olmasından dolayı hemolizde sürekli hatalı yüksek değerler ortaya koyar (40).

Eritrositler yüksek konsantrasyonlarda organik fosfat esterleri içerirler ve bu esterler serum fosfatazlarıyla hidrolize olduğundan hemolize örneklerde inorganik fosfat konsantrasyonu artış gösterir (59). Hemoglobin bir protein olduğundan dolayı, hemolize örneklerdeki serbest formunun varlığı, total protein test sonuçlarında artışa neden olabilmektedir (53).

4.9.2. Spektral İnterferans

Bu, eklenen absorbanlar yasasına dayanmaktadır. Test için kullanılan dalga boylarında absorbe olan bütün maddeler ölçülen konsantrasyonda artışa sebep olmaktadır (60). Hemoglobin 340 nm civarında absorbe olmaya başlar ve böylece NADH ve NADPH'nın absorban özelliklerine dayanan yöntemleri etkiler (40, 61).

Hemoglobin karakteristik dalga boyu olan 415 nm ışığı çok kuvvetli absorbe eder (Soret piki). 530 ve 600 nm'ler arasında daha düşük, 540 ve 570 nm de iki pik daha yapmaktadır. Bu yüzden de bu dalga boylarındaki ölçümler büyük çapta etkileşime neden olur. Spektral interferanslar, analitik reaksiyon sırasında kimyasal değişime uğramazken yapılan fotometrik ölçümlerde (özellikle 415, 540, 570 nm de) analitinkine benzer cevap oluşumuna neden olurlar. Örneğin, alanin aaminotransferaz (ALT), kreatinin, kreatin kinaz (CK), demir, lipaz, üre.

4.9.3. Kimyasal İnterferans

Kan hücre bileşenleri, analitik reaksiyonun kimyasalları ile reaksiyona girerek analitin ölçümünde doğrudan ya da dolaylı interferansa sebep olur. Reaktif solüsyonlarındaki çeşitli anormal maddelerin varlığı, ürünlerin bazılarını tüketerek reaksiyonu farklı derecelerinde interferans ortaya çıkartırlar. Hemolize örneklerde meydana gelen artmış CK konsantrasyonları, reaksiyon şartları altında tamamen inhibe olmayan intrasellüler adenilat kinazın açığa çıkmasını sürdürerek iyi bilinen kimyasal bir interferans olarak açıklanmaktadır. Hemolize örneklerde meydana gelen artmış bilirubin konsantrasyonları reaksiyon süresince pH değiştiğinde hemoglobin hematine veya methemoglobine dönüşmektedir ve ölçülmekte olan bilirubinde, hemoglobin peroksidaz tarafından yıkıma uğratılmaktadır (62).

Hemoliz indeksi preanalitik kalitenin bir ölçüsü olarak kullanılabilir (54). Farklı üretici firmalar arasında yöntem açısından değişiklikler bulunabilir, ancak genel olarak tümü mg/dL birimine karşılık gelen hemoliz ünitesindeki hemoglobin konsantrasyonu şeklinde bildirilen indekse dayanır (5).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Gereç

5.1.1. Kullanılan Cihazlar ve Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan cihazlar ve malzemeler Tablo 2’da verilmiştir.

Tablo 2. Kullanılan cihaz, malzemeler ve üretici firmalar

Kullanılan Cihazlar ve Malzemeler	Üretici Firma
Biyokimya Otoanalizör	Vitros 5 1 FS
Santrifüj	Beckman Coulter Allegra 64R
Santrifüj	Eppendorf Centrifuge 5810)
Mikropleyt okuyucu	Molekuler Divices
Derin dondurucu	Forma -86°C ULT Freezer
Hassas analitik terazi	Metler Toledo AB 204-S
pH metre	Hanna Instruments
Vorteks	Nüve, NM 110
Etüv	Gallenkamp
Magnetik karıştırıcı	Ikamag RH
Otomatik pipet, 10-100 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet, 100-1000 µL	Eppendorf Research
Otomatik pipet, 500-5000 µL	Eppendorf Research
Deney tüpleri	SH&GLASS
Saf su cihazı	Aquatron 4 AD
Mikropleyt okuyucu	VERSA max

5.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler Tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3. Kullanılan kimyasal maddeler ve üretici firmalar

Kullanılan Kimyasal Maddeler	Üretici firma
Asetik asit (CH_3COOH)	Merck
Tiyobarbitürik asit ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_2\text{N}_2\text{S}$)	Sigma
Fosfotungustik asit ($\text{H}_3\text{PO}_4.12\text{WO}_3.\text{H}_2\text{O}$)	Sigma
Sülfürik asit (H_2SO_4)	Merck

5.2. Metod

5.2.1. Deneyin Planlanması ve Çalışılması

Bu çalışma Karadeniz Teknik Üniversitesi Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında, 2015-07 nolu etik kurul onayı ile gerçekleştirildi. Bu çalışma prospektif olan bir araştırmadır. Bu çalışma CLSI (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü “Clinical and Laboratory Standards Institute”) tarafından tanımlanmış **EP7A** ve IFCC (Uluslararası Klinik Kimya Federasyonu “International Federation for Clinical Chemistry”) **C56-A** protokollerine göre gerçekleştirildi.

5.3. Yöntem

5.3.1. Serum Havuzlarının Hazırlanması

Sağlıklı 3 kişiden alınan kan örneklerinden normal seviye serum havuzu oluşturuldu ve bu serum havuzundan hemolizat hazırlandı. Hastane laboratuvarına gelen ve işlemi bitmiş numunelerden rastgele örnekler seçilip MDA (Malondialdehit) düzeyleri tespit edildi ve bunlardan 8 mL düşük MDA düzeyli serum havuzu ile 8 mL yüksek MDA düzeyli serum havuzu olmak üzere toplam 16 mL serum havuzu hazırlandı. Hazırlanan serum havuzları aligotlara bölünerek, - 80 °C’de derin dondurucuda saklandı.

5.3.2. Hemolizat Hazırlanması

Lippi ve ark. uyguladıkları yöntem modifiye edilerek hemolizat hazırlandı (42). Sağlıklı gönüllüden toplam 6 mL EDTA’lı tüpe alınan kan örneği 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip, hücre ve plazma kısmı ayrıldı. Dipte kalan hücre paketi 8 ml serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve her yıkama işlemi sonrası 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilerek süpernatant kısım atıldı. Son yıkamayı takiben santrifüj sonrası üste kalan sıvı ortam uzaklaştırıldıktan sonra yıkanmış eritrosit paketi üzerine alınan sıvı miktarına eşit hacimde distile su ilave edildi. Distile su ilave edilen hücre paketi, - 20°C’de derin dondurucuda 30 dakika bekletilmesi sonucu, eritrositlerin patlayarak hemoliz olması sağlandı. Daha sonra 3000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilip üstte kalan hemolizat kısmı alındı (63) ve hemen hemolizatın hemoliz indeks değeri Vitros Fusion 5.1 FS otoanalizör sisteminde tespit edildi. Vitros Fusion 5.1 FS otoanalizör sistemi (Ortho Clinical Diagnostics) için rapor edilebilir hemoliz aralığı 15(20)-1000

aralığındadır. Serum/plazma, CSF bakılabilir fakat dilusyonlu ve ön çalışmalı numunelere bakılmaz. Cihaz 475-700 dalga boyu aralığında spektrofotometrik olarak ölçüm yapar.

5.3.3. Hemolizat İndeksinin Belirlenmesi

Hazırlanmış olan hemolizattan her bir serum havuzuna HI'i 900, 500, 250, 125, 68, 34 olacak şekilde sırasıyla 100 µL hemolizat eklendi. Her iki serum havuzu için 1500 µL seruma 100 µL hemolizat eklenerek hemoliz indeksi 900 bulundu. Bu serum parametreleri aynı gün ardışık üçer kez çalışıldı.

5.3.4. Malondialdehit (MDA) Tayin Yöntemi

Serum örneklerinde malondialdehit miktarı, Yagi (1984) tarafından geliştirilen TBARS (Tiobarbituric Acid Reactive Substance) methodu kullanılarak tayin edildi (64). Lipid peroksidasyon ürünü (MDA) ile tiyobarbitürik asit (TBA) arasındaki reaksiyon sonucu oluşan kırmızı renk spektrofotometrik olarak ölçüldü. TBA ile reaksiyona girerek aynı rengi veren suda çözünür maddeleri uzaklaştırmak için serum lipidleri proteinle birlikte fosfotungistik asit/sülfirik asit sistemiyle çöktürüldü.

Çözeltilerin Hazırlanması

Sülfirik asit (H_2SO_4) Çözeltisinin Hazırlanması, 22.8 M: %98'lik H_2SO_4 'den 228 µL alınıp 100 mL'ye saf su ile tamamlandı.

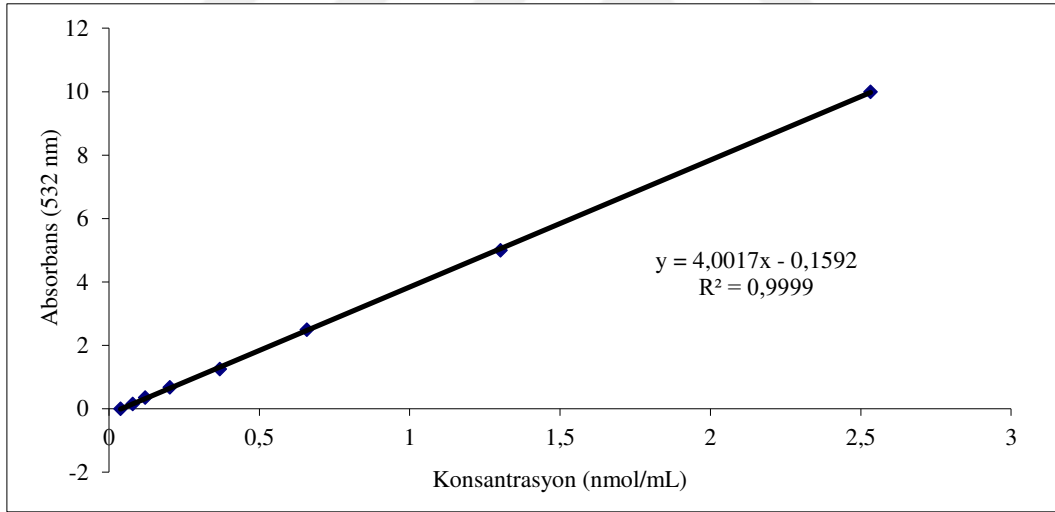
Tiyobarbitürik Asit (TBA) Çözeltisinin Hazırlanması: 0.67 g TBA tartılıp 50 mL kadar saf su ile çözüldü. Manyetik bar ile karıştırıldıktan sonra ısıtılıp çözünmesi sağlandı. Soğuduktan sonra 50 mL asetik asit (CH_3COOH) ilave edildi.

Fosfotungustik Asit ($H_3PO_4.12WO_3.H_2O$) Çözeltisinin Hazırlanması: 1 g fosfotungustik asit tartılıp 9 mL kadar saf su ile çözüldü.

Standart Hazırlığı: 1 mmol 1, 1, 3, 3-tetrametoksipropan 100 mL 0.01 M HCl içinde 50 °C' de 1 saat inkübe edildi ve bu bileşiğin hidrolizi sonucu oluşan MDA çözeltisinden 10, 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312, 0.156 nmol/mL çalışma standartları hazırlandı. Elde edilen sonuçlarla standart grafiği çizildi.

Deneyin Yapılışı:

1. Bir deney tüpüne 150 µL serum 1.2 mL H_2SO_4 ve 150 µL fosfotungistik asit eklendi, iyice karıştırıldıktan sonra 5 dakika bekletildi.
2. Karışım 1500 g' de 10 dk. santrifüj edildi ve üst faz atıldı.
3. Geriye kalan çökelek üzerine 2 mL saf su eklendi ve yeniden çözününceye kadar vortekslendi.
4. Tüpe 500 µL TBA eklendi ve 1 saat 100 °C' de inkübe edildi.
5. İnkübasyonun ardından tüpler 1000 g' de 10 dk. santrifüjlendi.
6. Üstteki berrak kısım alınarak 532 nm dalga boyunda absorbanslar okundu.
7. Standart grafiğinden yararlanılarak serum MDA miktarı nmol MDA/mL olarak belirlendi (Şekil 3).



Şekil 3. MDA standart grafiği

5.4. İstatistiksel Yöntemler

Her gruba ait değerler, aritmetik ortalama ve standart sapma ($X \pm SD$) olarak ifade edildi. Parametrelerin normal dağılıma uygunluğu “Kolmogorov-Smirnov” testi ile kontrol edildi. Normal dağılıma uyan parametreler “student t” testi ile değerlendirildi. $p \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

Metodun analitik hassasiyeti yüzde varyasyon katsayısı (%CV) hesaplanarak ifade edildi.

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

$$\%TH = 1.96 \times CV + (BIAS)$$

BIAS hesabı yapılmadığından dolayı yüzde toplam hata (%TH) hesaplanırken $3 \times \%CV$ alındı.

6. BULGULAR

Yüksek ve düşük gruba ait serum MDA düzeylerinin ortalama ve standart sapma değerleri tablo 4’de gösterilmiştir. Yüksek ve düşük grubun serum MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ($p=0.001$).

Tablo 4. Yüksek ve düşük gruplara ait serum havuzlarının MDA (Malondialdehit) düzeyleri

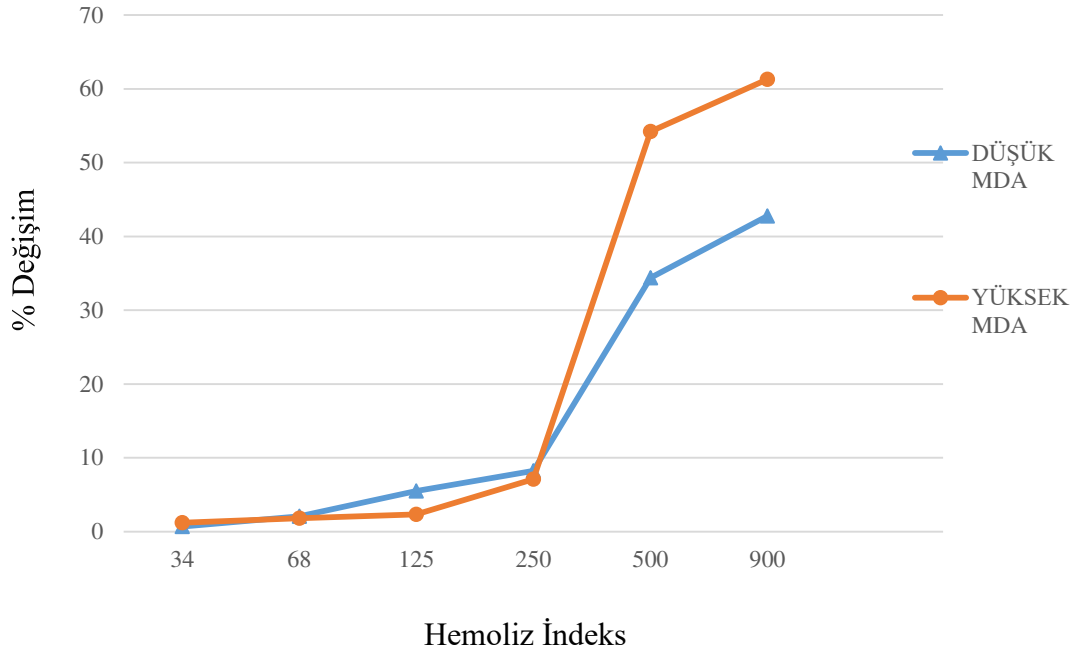
	Yüksek grup (n=7)	Düşük grup (n=7)	p
MDA, nmol/mL	0.985 ± 0.005	0.145 ± 0.007	0.001*

*: student-t testi

Tablo 5’de düşük ve yüksek serum MDA düzeyleri hemolitik indeks dağılımına göre; ortalama, standart sapma ve yüzde hata cinsinden hesaplanmıştır. MDA ölçümünde n=7 sayısı için düşük serum MDA grubunda %13, yüksek serum MDA grubunda ise %16’lık CV değerleri hesap edilmiştir. Bu hesaba göre yüzde hata oranları total hata ile karşılaştırıldığında yüksek MDA serum düzeyinde hemoliz indeksi yaklaşık 400-450 aralığında bir değerde sapmaya neden olurken, düşük MDA serum düzeyinde bu değer yaklaşık olarak 500-600 aralığında bir değerde sapmaya neden olduğu bulunmuştur.

Tablo 5. Düşük ve yüksek serum MDA düzeylerinin ortalama, standart sapma ve yüzde hata oranları.

			Ortalama ± Standart sapma (% hata)					
			Hemolitik indeks (HI)					
	% TH	Serum havuzu	34	68	125	250	500	900
Düşük MDA nmol/mL	% 39	0.145±0.007	0.146±0.020 (0.68)	0.148±0.022 (2.06)	0.153±0.002 (5.51)	0.157±0.001 (8.2)	0.195±0.007 (34.4)	0.207±0.020 (42.75)
Yüksek MDA nmol/mL	% 48	0.985±0.006	0.997±0.001 (1.21)	1.003±0.048 (1.82)	1.008±0.050 (2.33)	1.055±0.008 (7.1)	1.519±0.014 (54.21)	1.589±0.028 (61.3)



Şekil 4. Hemoliz indekse göre düşük ve yüksek serum MDA interferogramı

Şekil 6'da de görüldüğü gibi her iki serum havuzunda da MDA serum düzeylerinde hemoliz indeks değeri arttıkça MDA seviyesinde de artma bulunmuştur.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Malondialdehit (MDA), lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olup, oksidatif hasar düzeyini belirlemede kullanılır (65, 66). Önemli serbest oksijen radikallerinden olan süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil iyonlarının (OH^-) fosfolipidler ve yağ asitleri ile birleşmeleri sonucu aldehitleri de içine alan çok sayıda yapı meydana gelmektedir. Bu durum lipid peroksidasyonunun göstergesidir (67). Lipid peroksidasyonu, hücre membranında hasar oluşturarak, hücrenin geçirgenliğini etkiler. Bu olay hücre içinde aşırı derecede Ca^{+2} birikimine sebep olur. Bu olay hücre membranı disfonksiyonu ve buna bağlı olarak hücre şişmesi ve hücre ölümü ile son bulur (68). Bunun yanı sıra hücre içinde bulunan lipid peroksitler ve MDA gibi ikincil metabolitler dolaşım yoluyla diğer dokularda hasar meydana gelmesine neden olabilir (69). Hücrede en fazla bulunan lipid peroksidasyon ürünü MDA'dır. MDA, normal fizyolojik koşullarda aminoasitler ve proteinlerle reaksiyona girebilmektedir. MDA, memeli hücrelerde ve insanlarda mutajenik karakterde iken, fare ve ratlarda ise karsinojeniktir (70).

MDA tayini için pek çok yıldır lipid peroksidasyonunda omega-3 ve omega-6 yağ asitleri kullanılmaktadır çünkü bu yağ asitleri tiyobarbitürik asit ile kolayca reaksiyon verebilmektedir (60). MDA tiyobarbitürik asitlerle tepkimeye giren maddeler yüzünden $\omega 3$ ve $\omega 6$ yağ asitlerinin lipid peroksidasyonu için yıllarca yaygın olarak uygun bir biyomarker olarak kullanılmıştır (TBA) (71, 72). TBA testi TBA'nın MDA karşısındaki reaktifliğini kromojen floresenti şiddetli bir şekilde kırmızı yayılımı ile akmasıyla doğrulanır; bu test ilk olarak gıda kimyacıları tarafından yağların otooksidatif indirgenmesini ölçmek için kullanılmıştır. Ancak, tiyobarbitürik asit reaktif maddeler testi (TBARS) *in vivo* örneklerden MDA ölçümü nonspesifik olduğu için TBARS kullanımı üzerine önemli tartışmalara yol açmıştır. Gaz kromatografisi, kütle spektrometrisi (GC-MS / MS) ve sıvı kromatografi spektrometrisi (LC-MS / MS) ya da çeşitli strateji türevleri gibi çeşitli teknolojiler serbest ve toplam MDA'nın belirlenmesi için, son on yıl içinde geliştirilmiştir (73).

Literatürde MDA ile ilgili tarama yapıldığında 35000'in üzerinde makale karşımıza çıkmakta ve bu makalelerin yaklaşık 7500 tanesinde kan serum örneklerinin kullanıldığı görülmektedir. Ayrıca bu makalelerin büyük bir kısmını, örnek alımının çok

zor olduğu hayvan çalışmaları oluşturmaktadır. Dolayısıyla bu numunelerde farklı derecelerde hemoliz görülmesi kuvvetle muhtemeldir. Hemolizin bilinen interferans etkilerine dayanarak yapılan literatür taramasında MDA zerine interferans etkiyi gösteren bir çalışma mevcut değildir. Bu bakımdan çalışmamız literatürde bir ilk olarak bundan sonraki çalışmalara öncülük sağlayacaktır.

Çalışmamızda serum MDA düzeyleri TBA testi en pratik yol olduğundan ve interfere edici özelliğinden dolayı tez çalışması yapılarak değerlendirilmiştir. Literatürdeki çalışmaların çoğu da TBA testi ile değerlendirilmiştir. Böylelikle yaptığımız bu çalışma daha geniş bir uygulama alanını kapsamış olacaktır. Bu alışma ile farklı hemoliz serum MDA düzeyi üzerine olan interferans etkisi ortaya koyularak, araştırmacılara hangi hemoliz derecelerine sahip serum örneklerinin çalışmalarına dahil edilip edilemeyeceği konusunda bir yol gösterilebilecek, böylece daha doğru ve güvenilir sonuçlara ulaşmalarına katkı sağlanabilecektir.

Literatürde hemolizin MDA'yı etkilediği çalışmalar mevcut olmakla birlikte çalışmamızda da hemolizin interferans etkisi grlmştir. Weinstein ve ark. (74) yapmış oldukları çalışmada hemodiyaliz hastalarında diyaliz suyuna kloramin eklenmesiyle eritrosit membranının oksidasyonundan dolayı hemolize yol açtığını göstermişlerdir. Bu çalışmanın sonucu olarak, hemodiyaliz hastalarının MDA seviyeleri kontrol grubundan daha yüksek olduğunu ve diyalizle tedavi edilen hastaların yılları ve MDA seviyeleri arasında pozitif bir kolerasyon olduğu gözlemlemişlerdir.

Lee ve ark. (75) yapmış oldukları çalışmada ise 4 ve 8 saat inkübasyon arasında 540 m benzopiren ve 300 m adriamisin ile muamele edilmiş eritrositlerde hemolize sebep olduğunu göstermişlerdir. Hemolizin olmasıyla birlikte lipid peroksidasyonuna yol açarak MDA seviyelerinde önemli bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir.

Marjani ve ark. (76) yapmış oldukları çalışmada 35 günlük süre içerisinde tek günlerde bekleme süresine bağlı olarak bekletilmiş plazmada lipid peroksidasyonuna, eritrosit SOD ve GPx enzim aktivitelerindeki değişikliği belirlemişlerdir. Saklanma zamanına bağlı olarak hemolizin oluşmasıyla beraberinde plazma MDA seviyelerinde bir artış olduğunu gözlemlemişlerdir. Li ve ark. (77) yapmış oldukları çalışmada ise sadece askorbik asidin hemolize yol açtığını ve hemin varlığında da lipid peroksidasyonuna yol açtığı sonucuna varmışlardır.

TBARS-MDA analizinde hemoglobinden kaynaklı 532 nm dalga boyunda spektral interferans olduğu bilinmekte olup (40, 42), hemolizinde bu dalga boyuna yakın spektral interferans yaptığı bilinmektedir.

Yapılan literatür çalışmalarında klinikte birçok çeşitli hastalıklarda serum, plazma ve doku MDA'larına bakıldığı görülmektedir. Fakat çalışmaların hiçbirinde hemolizin interferans etkisi göz önüne alınarak hemoliz indeksinden bakılmamış ve sonuçlar üzerindeki etkisi değerlendirilmemiştir. TBARS metoduyla yapılan çalışmalarda serum MDA (nmol/mL) kontrol seviyelerini Turhan ve ark. (78) 0.91 ± 0.26 Smriti ve ark. (79) 0.95 ± 0.13 Lodh ve ark. (80) 0.98 ± 0.55 olarak bulmuşlardır. Çalışmalardaki serum MDA (nmol/mL) kontrol seviyeleri çalışmamızda bulduğumuz yüksek serum MDA (nmol/mL) havuzuyla 0.95 ± 0.006 ile uyumluluk göstermektedir.

Fakat Lorente ve ark. (81) yapmış olduğu çalışmadaki serum MDA kontrol seviyesi 1.06 (0.72-1.51) bizim çalışmamızdaki yüksek serum MDA grupları ile kıyaslandığında hemoliz indeksi yaklaşık 500-600 aralığına denk geldiği için hata getirme olasılığının sonuçları değiştirebileceği düşünülmektedir.

Ayrıca yine yapılan diğer çalışmalarda da serum MDA (nmol/mL) kontrol seviyelerini Lorente ve ark. (82) 1.11 (0.79-1.51) Yaghoubi ve ark. (83) 4.82 ± 1.41 serum MDA seviyeleri çalışmamızda yüksek MDA serum grupları ile kıyaslanınca hemoliz indeksi yaklaşık 500-600 aralığı ve üzerine geldiğinden sonuçları değiştireceği için tartışılabilir duruma geldiği düşünülmektedir.

Ancak HPLC yöntemi ile yapılacak çalışmalar, hemoliz indeksinin etkilediği farklı MDA seviyelerini daha hassas bulacağından güvenilirliği arttıracaktır. Bununla birlikte HPLC ile yapılacak çalışmalarda da baz alınması gereken hemoliz değerlerini göstermesi açısından yardımcı olacaktır. Böylelikle MDA tayininde hemoliz açısından gerekli örnek kalitesi, kantitatif olarak literatüre sunulmuş olacaktır.

Pilz ve ark. (84) yapmış olduğu çalışmada eritrositlerde MDA düzeyi yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi ve Tiyobarbitürik asit yani TBA yöntemleri kullanılarak iki yöntem arasındaki MDA seviyelerinin 100 kat farklı olduğunu bulmuştur. Bunun nedenini de ısıtma safhası sırasında MDA'ya benzer

malzemelerin yapay şekli ya da MDA'yla TBA'nın reaksiyonlarının özgüllüklerinin eksikliğinden kaynaklanabilir olduğunu düşünmüşler.

Yapılan bir başka çalışmada da (85) HPLC ve TBA ile plazma ve dokudaki toplam MDA değerleri ölçülerek sonuçlar karşılaştırılmıştır. Çalışmada gün boyunca ve günler arasında HPLC ile MDA ölçümünde istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir. Ancak TBA yönteminde MDA seviyeleri arasında üç kat kadar önemli bir fark bulunmuştur. Sonuç olarak HPLC yöntemi ile MDA seviyesi ölçümü daha kesin ve hassas değerlendirme sağlamaktadır.

Ksenobiyotikler eritrosit içinde serbest radikallere oksidize olarak eritrosit membranında hemolize yol açar. Hemoliz sonucu bir prooksidan rolü oynayan demir salınır ve diğer toksik etkiler indüklenir (86). Oksidatif olarak modifiye olan hemoglobinden demir salınımı H_2O_2 ya da lipid peroksitler gibi şiddetli oksitleyicilerin varlığında artışa neden olur. Çünkü demir iyonları redoks katalisti olarak önemli rol oynamaktadır (87). Pazar'ın (88) yapmış olduğu çalışmasında hemolizle oluşturulmuş deneysel hiperbilirubinemi sıçan modelinde beyin dokusundan alınan örneklerde malondialdehit düzeyinin arttığı gözlemlenmiştir.

Çalışmamızda sağlıklı 3 kişiden alınan kan örneklerinden normal seviye serum havuzu oluşturuldu ve bu serum havuzundan hemolizat hazırlandı. Ayrıca hastane laboratuvarına gelen ve işlemi bitmiş serum numunelerinden rastgele örnekler seçilip MDA (Malondialdehit) seviyeleri tespit edildi. Bunlardan da düşük ve yüksek MDA'ya sahip 8 ml'lik iki havuz oluşturuldu. Her iki serum havuzu için 1500 μ L serum 100 μ L hemolizat eklenerek hemoliz indeksi 900 bulundu. Daha sonra her bir grubun serum havuzuna hemoliz indeksi 900, 500, 250, 125, 68, 34 olacak şekilde 100 μ L hemolizat eklendi. Hemolizat ekli halinin tekrar MDA (Malondialdehit) düzeylerine bakıldı. Son olarak hemolizat ekli MDA ile saf olan yani hiç hemolizat eklenmemiş olan düşük ve yüksek seviyedeki MDA düzeylerine ilişkin kıyaslama yapıldı. Ayrıca serum MDA ölçümünde n=7 sayısı için düşük ve yüksek serum MDA gruplarında % CV değerleri hesap edilmiştir.

Sonuç olarak hala yoğun şekilde çalışmaları yapılan MDA'nın her iki serum havuzunda da (düşük ve yüksek) MDA düzeylerinin etkilendiği görülmüştür. Yüksek MDA serum düzeyinde hemoliz indeksi yaklaşık 400-450 aralığında bir değer

sapmaya neden olurken, düşük MDA serum düzeyinde bu değer yaklaşık olarak 500-600 aralığında bir değerde sapmaya neden olmuştur. Bu nedenle bu değerler ve üzeri için hata payı getirdiğinden çalışmalara dahil edilmemelidir. Ayrıca düşük serum MDA gruplarında daha yüksek interferans olduğu gözlemlenmiştir.



8. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

8.1 Sonuçlar

1. Her iki serum havuzunda da (düşük ve yüksek) MDA serum düzeylerinde hemoliz indeksi arttıkça MDA seviyesinde de artma gözlemlendi. Yüksek MDA serum düzeyinde hemoliz indeksi yaklaşık 400-450 aralığında bir değerde sapmaya neden olurken, düşük MDA serum düzeyinde bu değer yaklaşık olarak 500-600 aralığında bir değerde sapmaya neden olmuştur.

2. Düşük serum MDA gruplarında daha yüksek interferans olduğu sonucuna varılmıştır.

8.2 Öneriler

1. Bundan sonraki yapılacak çalışmalar için düşük serum MDA gruplarında hemoliz indeksi (HI) cutt-off değer 400-450, yüksek serum MDA gruplarında hemoliz indeksi (HI) cutt-off değer 500-600 ve üzeri hata getirdiği için çalışmalara dahil edilmemesi önerilir.

2. Yüksek serum MDA gruplarında 250-500 aralığı için ayrı hemoliz indeksi hesap edilerek, daha net sonuçlara ulaşılması açısından öngörülmektedir.

3. MDA ölçüleceği zaman eğer imkanlar mümkünse hemoliz indeksinden etkilenmeyen metodlar seçilmelidir. HPLC yöntemi lipid peroksidasyonunda geleneksel spektrofotometrik yöntemden (TBA) daha kesin ve hassas değerlendirme sağlamakta olduğundan bu yöntemin kullanılması daha doğru sonuç verecektir.

9. EKLER

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

T.C.
KARADENİZ TEKNİK ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ ETİK KURULU
ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU
HASTA/ DENEĞİN AYDINLATILMIŞ ONAMI

**Araştırmanın Adı: TBARS-Malondialdehit (MDA) Analizinde Hemolizin
İnterferans Etkisinin İncelenmesi**

**ARAŞTIRMANIN ADI: TBARS MALONDİALDEHİT (MDA) ANALİZİNDE
HEMOLİZİN İNTERFERANS ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Yaygın olarak çalışılan lipid peroksidasyonu parametresinin MDA ölçümü üzerinde hemolizin etkilerini ortaya koymak ve hemoliz için MDA ölçümünü etkileyen eşik (cut off) değerinin belirlenmesidir.

NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAKTIR?

KTÜ Tıp Fakültesi Farabi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Rutin Laboratuvar'ına gelen ve işlemi bitmiş numunelerden rastgele örnekler seçilip her birinden toplamda 6ml EDTA'lı tüpe kan örneği alınacaktır.

SORUMLULUKLARIM NEDİR?

Araştırma ile ilgili olarak hastanın herhangi bir sorumluluğu yoktur. (örn. uygulama süresi boyunca hiçbir ilaç kullanmama ancak zorunlu olarak ilaç almak durumunda kalındığında mutlaka sorumlu araştırmacıyı bilgilendirme, uygulanan araştırma şemasına özen gösterme, araştırmacının önerilerine uyma

v.b.). Bu koşullara uymadığınız durumlarda araştırmacı sizi uygulama dışı bırakabilme yetkisine sahiptir.

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Buradan çıkacak sonuçların hasta yararına olacak şekilde çalışma kriterlerine eklenilmesi ve bundan

sonraki çalışmalarda yüksek lisans ve doktora tezlerine referans olacağı düşünülmektedir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Hastanın rutin işlemleri için kan verme sırasında 6 mL ek kan verme dışında hiçbir ek işlem olmayıp, bunun da hiçbir tıbbi riski yoktur.

DİĞER TEDAVİLER NELERDİR?

Yok.

HERHANGİ BİR ZARARLANMA DURUMUNDA ÜKÜMLÜLÜK/SORUMLULUK KİMDEDİR VE NE YAPILACAKTIR?

Hastaya herhangi bir zarar verilmesi mümkün değildir.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Hastadan bir seferde kan alınıp bunun hastanın tedavi süreciyle ilişkisi olmadığından acil bir durum oluşmayacaktır. Fakat çalışma için, Prof. Dr. Asım ÖREM sorumludur.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Yok.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Hayır.

ARAŞTIRMAYA KATILMAYI KABUL ETMEMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz. Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilecektir

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

KATILMAMA İLİşKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAğLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 2 sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

9.1. Ek 1. Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu (Devam)

VELAYET VEYA VESAYET ALTINDA BULUNANLAR İÇİN VELİ VEYA VASİNİN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİ DIŞINDAN YETKİN BİR HEKİM		İMZASI
ADI & SOYADI		
TARİH		

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

10. KAYNAKLAR

1. Türkmen HY, Serdar MA, Haşimi A, Cihan M, Kurt İ, Akman Ş, Kutluay T, Erbil MK (2007). Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması. *Gülhane Tıp Dergisi* 49: 5-10.
2. Lippi G, Banfi G, Buttarello M, Ceriotti F, Daves M, Dolci A, Caputo M, Giavarina D, Montagnana M, Miconi V, Milanese B, Mosca A, Morandini M, Salvagno GL (2007). Recommendation for detection and management of unsuitable samples in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 45(6): 728-736.
3. Dimeski G (2008). Interference testing. *Clin Biochem Rev* 29 Suppl 1: 43-48.
4. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC (2006). Interference of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 44 (3): 311-316.
5. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M (2008). Hemolysis an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. *Clin Chem Lab Med* 46(6): 764-772.
6. Lippi G, Salvagno GL, Blanckaert N, Giavarina D, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M (2009). Multicenter evaluation of the hemolysis index in automated clinical chemistry systems. *Clin Chem Lab Med* 47(8): 934-939.
7. Revan S (2007). Farklı dayanıklılık ve atremanların oksitadif stres oluşumu ve antioksidan düzeyleri üzerine etkisinin araştırılması. Gazi Üniversitesi. ANKARA.
8. Güven A (2005). Kaz karaciğerinde karbontetraklorür ve etil alkol ile oluşturulan doku hasarında GSH, GST ve Se düzeylerinin araştırılması. Kafkas Üniversitesi. KARS.
9. Akkuş D (1995). Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. 1.Baskı, Mimoza Yayınları, Konya.
10. Negre-Salvayre A, Auge N, Ayala V, Basaga H, Boada J, Brenke R, et al. (2010). Pathological aspects of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 44: 1125–1171.

11. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991). Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Radic Biol Med* 11: 81–128.
12. Marnett LJ (1999). Lipid peroxidation-DNA damage by malondialdehyde. *Mutat Res* 424: 83–95.
13. Uchida K (2000). Role of reactive aldehyde in cardiovascular diseases. *Free Radic Biol Med* 28, 1685–1696.
14. Stevens JF, Maier CS (2008). Acrolein: sources, metabolism, and biomolecular interactions relevant to human health and disease. *Mol Nutr Food Res* 52: 7–25.
15. Chio KS, Tappel AL (1969). Synthesis and characterization of the fluorescent products derived from malonaldehyde and amino acids. *Biochemistry* 8: 2821–2826.
16. Grimsrud PA, Xie H, Griffin, T J, Bernlohr DA (2008). Oxidative stress and covalent modification of protein with bioactive aldehydes *J Biol Chem* 283: 21837–21841.
17. Negre-Salvayre A, Vieira O, Escargueil-Blanc I, Salvayre R (2003). Oxidized LDL and 4-hydroxynonenal modulate tyrosine kinase receptor activity *Mol Aspects Med* 24: 251–261.
18. Jacobs AT, Marnett LJ (2010). Systems analysis of protein modification and cellular responses induced by electrophile stress *Acc Chem Res* 43: 673–683.
19. Pizzimenti S, Ciamporcero E, Daga M, Pettazzoni P, Arcaro A, Cetrangolo G, Minelli R, Dianzani C, Lepore A, Gentile F, Barrera G (2013). Interaction of aldehydes derived from lipid peroxidation and membrane proteins. *Membrane Phys Memb Biophy Volume 4, Article 242*.
20. Butterfield DA, Stadtman ER (1997). Protein oxidation processes in aging brain. *Adv Cell Aging Gerontol* 2: 161–191.
21. Poli G, Dianzani MU, Cheeseman KH, Siater TF, Long J, Esterbauer H (1985). Separation and Characterization of the Aldehydic Products of Lipid Peroxidation Stimulated by Carbon Tetrachloride or ADP-Iron in Isolated Rat Hepatocytes and Rat Liver Microsomal Suspension. *Biochem J* 227: 629-638.

22. Floyd RA (1990). Role of Oxygen Free Radicals in Carcinogenesis and Brain ischemia FASEB J 4: 2587-2597.
23. Giray B (1993). İnsektisitlerin Lipid Peroksidasyonu Yapıcı Etkileri ve Bu Etkinin Kalsiyum Kanal Blokörleri ve Ksantin Oksidaz İnhibitörleri ile Değiştirilmesi. Bilim Uzmanlığı Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.
24. Horton AA, Fairhurst S (1987). Lipid Peroxidation and mechanisms of Toxicity. CRC Crit Rev Toxicol 18: 27-79.
25. Esterbauer H, Cheeseman KH, Dianzani MU (1982). Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe²⁺ in rat liver microsomes. Biochemical Journal 208(1): 129–140.
26. Ayala A, Muñoz MF, Argüelles S (2014). Lipid Peroxidation: Production, Metabolism, and Signaling Mechanisms of Malondialdehyde and 4-Hydroxy-2-Nonenal. Oxi Med Cell Long 2014: 1-31.
27. Luczaj W, Skrzydlewska E (2003). DNA damage caused by lipid peroxidation products. Cell Mol Bio 8(2): 391-413.
28. Paggiaro PL, Bartoli ML, Norvellietal F (2011). Malondialdehyde in exhaled breath condensate as a marker of oxidative stress in different pulmonary diseases. Medit Inflamm 2011: 1-7.
29. Hecker M, Ullrich V (1989). On the mechanism of prostacyclin and thromboxane A₂ biosynthesis. J Biol Chem 264(1): 141-150.
30. Masseyand KA, Nicolaou A (2011). Lipidomics of polyunsaturated fatty-acid-derived oxygenated metabolites. Bioch Soc Trans 39(5): 1240–1246.
31. Ricciotti E, FitzGerald GA (2011). Prostaglandins and inflammation. ATVB 31(5): 986–1000.
32. Ekambaram P, Lambiv W, Cazzolli R, Ashton AW, Honn KV (2011). The thromboxane synthase and receptor signaling pathway in cancer: an emerging paradigm in cancer progression and metastasis. Cancer Metast Rev 30(3-4): 397–408.
33. Yin H, Xu L, Porter NA (2011). Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. Chem Rev 111(10): 5944-5972.
34. Milne GL, Yin H, Morrow JD (2008). Human biochemistry of the isoprostane pathway. J Biol Chem 283(23): 15533-15537.

35. Gao L, Zackert WE, Hasford JJ, et al. (2003). Formation of prostaglandins E2 and D2 via the isoprostane pathway. A mechanism for the generation of bioactive prostaglandins independent of cyclooxygenase. *J Biol Chem* 278(31): 28479–28489.
36. Onyango AN, Baba N (2010). New hypotheses on the pathways of formation of malondialdehyde and isofurans. *Free Radical Bio Med* 49(10): 1594–1600.
37. Meagher EA, FitzGerald GA (2000). Indices of lipid peroxidation in vivo: strengths and limitations, *Free Radical Bio Med* 28: 1745–1750.
38. Bevan RJ, Durand MF, Hickenbotham PT, Kitas GD, Patel PR, Podmore ID, Griffiths HR, Waller HL, Lunec J (2003). Validation of a novel ELISA for measurement of MDA-LDL in human plasma, *Free Radical Bio Med* 35: 517–527.
39. Kamburoğlu S (2013). Klinik Biyokimya Otoanalizörlerinde Hemoliz İndeks Kullanımı. Uzmanlık Tezi Tıp Fak KTÜ.
40. Kroll MH, Elin JR (1994). İnterference with clinical laboratory analyses. *Clin Chem* 40(11), 1996-2005.
41. Lippi G, Guidi GC, Mattiuzhi C, Plebani M (2006). Preanalytical variability: the dark side of the moon in laboratory testing. *Clin Chem Lab Med* 44(4): 358-365.
42. Plebani M, Lippi G (2009). Hemolysis index: quality indicator or criterion for sample rejection? *Clin Chem Lab Med* 47(8): 899-902.
43. Benet LZ, Sheiner LB (1985). Pharmacokinetics: the Dynamics of drug absorption, distribution and elimination. İn: Gilman AG, Goodman LS, Rall TW, Murad F. Goodman and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, Newyork. Macmillan 13-22.
44. Lacher DA, Elsea AR (1986). Effect of a lipid-clarifying reagent on result of Beckman ASTRA methods. *Clin Chem* 32(2): 394.
45. Özer C, Topkaya Ç, Belçik İnal B, Tonbaklar Bilgi P, Aral H, Güvenen G (2011) Glukoz oksidaz yöntemine lipeminin etkisi. *İstanbul Tıp Dergisi* 12(2): 61-64.
46. Sampson M, Ruddel M, Elin RJ (1994). Effect of specimen turbidity and gliserol concentration on nine enzymatic methods for triglyceride determination. *Clin Chem* 40(2): 221-226.
47. Pudek MR, Nanji AA (1983). Antibody interference with biochemical tests and its clinical significance. *Clin Biochem* 16: 275-80.

48. Barbara LL, Richard DA, William P, Ladean PS (1990). The effect of haemolysis on certain canine serum chemistry parameters, *Laboratory Animals* 24: 32-35.
49. Moreno P, Ginel PJ (1999). Effects of haemolysis, lipemia and bilirubinaemia on prothrombin time, activated partial thromboplastin time and thrombin time in plasma samples from healthy dogs, *Research in Veterinary Science* 67: 273-276.
50. Ceron JJ, Eckersall PD, Subiela MS (2005). Acute phase proteins in dogs and cats: current knowledge and future perspectives, *Veterinary Clinical Pathology* 34(2): 85-99.
51. Yücel M, Tokalak İ, Kulaksızoğlu S, Arat Z (2005). CK-MB aktivitesi ve hemoliz: İnterferans nerede başlar, *Türk Biyokimya Dergisi* 30(3): 216-219.
52. Tiftik AM (1996). *Klinik Biyokimya*, Mimoza Basımevi 1.baskı, Konya.
53. Lippi G, Cervellin G, Favaloro E, Plebani M (2012). *İn vitro and İn vivo Hemolysis*.
54. Lippi G, Plebani M, Somma S, Cervellin G (2011). Hemolyzed specimens: a major challange for emergency departmens and clinical laboratories. *Critical reviews in clinical laboratory sciences* 48(3): 143-153.
55. Söderberg J, Jansson PA, Wallin O, Grankvist K, Hultdin J (2009). Haemolysis index: - An estimate of preanalytical quality in primary healty care. *Clin Chem Lab Med* 47(8): 940-944.
56. Carrara P, Servidio G, Plebani M (2000). Haemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challange? *Clin Chem* 46(2): 306-307.
57. Guder WG, Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt YM, Töpfer G, Wisser H, Zawta B (2000). The haemolytic, icteric and lipemic sample recommendations regarding their recognition and prevention of clinically relevant interferences. *J Lab Med* 24 (8): 357-364.
58. Büttner J, Borth R, Boutwell JH, Broughton PMG, Bowyer RC (1976). IFCC provisional recommendation on quality control in clinical chemistry. *J Clin Chem Biochem* 14(6): 265-275.
59. Sontanng O (1986). Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. *J Clin Chem Clin Biochem* 24(2): 127-139.

60. Cheeseman E, Cheeseman KH (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology* 186: 407–421.
61. Guder WG (1986). :Haemolysis as an influence and interference factor in clinical chemistry. *J. Clin Chem Clin Biochem* 24(2): 125-126.
62. Algaciras-Schimmich A, Cook WJ, Milz TC, Saenger AK, Karon BS (2007). Evaluation of hemoglobin interference in capillary heel-stick samples collected for determination of neonatal bilirubin. *Clin Biochem* 40(16-17): 1311-1316.
63. Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Brocco G, Guidi GC (2006). Interference of hemolysis on routine clinical chemistry testing. *Clin Chem Lab Med* 44 (3): 311-316.
64. Yagi K (1984). Assay of blood plasma or serum. *Methods Enzymol* 109: 328-331.
65. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P (1997). Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. *Clin Chem* 43, 1209-1214.
66. Okutan H, Savas C, Delibas N (2004). The antioxidant effect of melatonin in lung injury after aortic occlusion-reperfusion. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 3: 519-522.
67. Kaklıkkaya İ, Menteşe Ü, Koramaz İ, Altun G, Menteşe A, Çakıroğlu Y, Özcan F (2010). Deneysel iskemi reperfüzyon modelinde, etil pirüvat uygulamasının sonuçları. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 18: 310-314.
68. Kaçmaz A, Polat A, User Y, Tilki M, Özkan S, Şener G (2004). Octreotide improves reperfusion-induced oxidative injury in acute abdominal hypertension in rats. *J Gastrointest Surg* 8: 113-119.
69. Suhail M, Suhail S, Gupta BK, Bharat V (2009). Malondialdehyde and antioxidant enzymes in maternal and cord blood, and their correlation in normotensive and preeclamptic women. *J Clin Med Res* 1: 150-157.
70. Sezginer SS (2016). Sığır tüberkülozunda malondialdehit ve superoksit dismutaz'ın immunohistokimyasal olarak değerlendirilmesi. Yüksek Lisans Tezi, Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Burdur.

71. Esterbauer H, Cheeseman KH, (1990). "Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Method Enzymol* 186: 407–421.
72. Pryor WA (1989). "On the detection of lipid hydroperoxides in biological samples," *Free Radical Bio Med* 7(2): 177–178.
73. Giera M, Lingeman H, Niessen WMA (2012). Recent advancements in the LC- and GC-based analysis of malondialdehyde (MDA): a brief overview. *Chromatographia* 75(9-10): 433–440.
74. Weinstein T, Chagnac A, Korzets A, Baaz M, Ori Y, Herman M, Malachi T, Gafter U (2000). Haemolysis in haemodialysis patients: evidence for impaired defence mechanisms against oxidative stress. *Nephrol Dial Transpl* 15: 883-887.
75. Lee SK, Lee MB (1997). Oxidation of erythrocyte protein and lipid, and hemolysis in rabbit red blood cells treated with benzo(a)pyrene or adriamycin. *J Toxicology Env Heal* 51: 557-569.
76. Marjani A, Moradi A, Ghourcaie AB (2007). Alterations in Plasma Lipid Peroxidation and Erythrocyte Superoxide Dismutase and Glutathione Peroxidase Enzyme Activities During Storage of Blood. *Asian J Biochem* 2 (2): 118-123.
77. Li SD, Su YD, Li M, Zou (2006). Hemin-mediated Hemolysis in Erythrocytes: Effects of Ascorbic Acid and Glutathione. *Acta Bioch Bioph Sin* 38(1): 63–69.
78. Turhan N , Çelik H, Candan, Duvan Cİ, Onaran Y, Aydın M , Armutcu F (2012). Investigation of oxidative balance in patients with dysmenorrhea by multiple serum markers. *J Turk-Ger Gyne Assoc* 13: 233-236.
79. Smriti K, Pai KM, Ravindranath V, Pentapati KC (2016). Role of salivary malondialdehyde in assesment of oxidative stress among diabetics. *Journal of oral biology and craniofacial research* 6: 41-44.
80. Lodh M, Goswami B, Gupta N, Patra SK, Saxena A (2012). Assessment of oxidative stress and inflammatory process in patients of multiple myeloma. *Ind J Clin Biochem* 27(4):410–413.
81. Lorente L, Rodriguez ST, Sanz P, González PA, Díaz D, Moreno AM, Borja E, Martín MM, Jiménez A, Barrera MA (2016). Association between pre-transplant serum malondialdehyde levels and survival one year after liver transplantation for hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 17(500): 1-10.

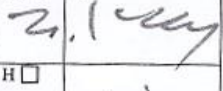
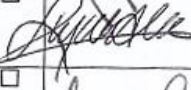
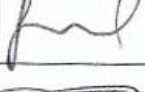
82. Lorente L, Martin MM, Gonzalez PA, Ramos L, Argueso M, Violan JS, Ruiz MR, Jimenez A (2015). Serum malondialdehyde levels in patients with malignant middle cerebral artery infarction are associated with mortality. PLOS ONE 10(5): 1-9.
83. Yaghoubi A, Ghojzadeh M, Abolhasani S, Alikhah H, Khaki-Khatibi F (2015). Correlation of serum levels of vitronectin, malondialdehyde and hscrp with disease severity in coronary artery disease. J Cardiovasc Thorac Res 7(4): 113-117.
84. Pilz J, Meineke I, Gleiter CH (2000). Measurement of free and bound malondialdehyde in plasma by high-performance liquid chromatography as the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative. J Chromato B 742(200): 315-325.
85. Tüközkan N, Erdamar H, Seven I (2006). Measurement of total malondialdehyde in plasma and tissues by high-performance liquid chromatography and thiobarbituric acid assay. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, ANKARA. Fırat Tıp Dergisi 11(2): 88-92.
86. Everse J, Hsia N (1997). The toxicities of native and modified hemoglobins. Free Radic Biol Med. 22: 1075-1099.
87. Gutteridge JM (1986). Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. FEBS Lett 201: 291-295.
88. Sıçanlarda hemolize bağlı hiperbilirubinemi modelinde bilirubin nörotoksitesitesi ve melatoninin nöron koruyucu etkisi. Tıpta Uzmanlık Tezi. Marmara Üniversitesi.

11. ETİK KURUL ONAYI

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 6	Tarih: 02/03/2015
Prof.Dr.Asım ÖREM'in sorumluluğunda yürütülen Yük.Lis.Öğr.Serpil ÇALIŞ'a ait "Malondialdehit (MDA) Analizinde Hemolizin İnterferans Etkisinin İncelenmesi" başlıklı 2015/7 no.lu ve yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma/tez başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, gerçekleştirilmesinde etik sakınca bulunmadığına; toplantıya katılan etik kurul üyelerinin oy birliği ile karar verilmiştir.		

KTÜ TIP FAKÜLTESİ BİLİMSEL ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU	
ÇALIŞMA ESASI	Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Faruk AYDIN

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		İlişki *		Katılım **		İmza
Prof.Dr.Faruk AYDIN Başkan:	Tıbbi Mikrobiyoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☐	H ☒	İZİNLI
Prof.Dr.Gamze ÇAN Başkan Yrd.	Halk Sağlığı	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S.Caner KARAHAHAN Üye:	Tıbbi Biyokimya	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.S. Murat KESİM Raportör:	Farmakoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof.Dr.Yılmaz BÜLBÜL Üye:	Göğüs Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Murat LİVAOĞLU Üye:	Plastik, Rekons. ve Estetik Cer	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Şafak ERSÖZ Üye:	Patoloji	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr. Evrim ÖZKORUMAK Üye:	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç.Dr.Murat ÇAKIR Üye:	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	KTÜ Tıp Fakültesi	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

* :Araştırma ile İlişki
** :Toplantıda Bulunma

12. ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, Adı: TOSUN, Serpil

Uyruğu: T.C

Doğum tarihi ve yeri: 01/01/1988 Vakfıkebir/ TRABZON

Medeni hali: Evli

Telefon: 0462 3777867

E-Posta: serpil_3229@hotmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Derece	Mezun Olduğu Kurumun Adı	Mezuniyet Yılı
Lisans	Kafkas Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü	2011
Lise	Vakfıkebir Lisesi	2005

YABANCI DİL

Türkçe, İngilizce

HOBİLER

Yüzme, Doğa yürüyüşü