

T.C.  
EGE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İN VİTRO HEMOLİZİN  
SERUM BİYOKİMYASAL  
DEĞERLERİNE ETKİSİ

Biyokimya (Eczacılık) Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ecz.Ayfer KAHRAMAN

Danışman Öğretim Üyesi: Prof.Dr. Aysen KARAN

İZMİR - 1987

Bu tezin hazırlanması sırasında bilgi ve yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım, saygıdeğer hocam Prof.Dr. Aysen KARAN'a teşekkürlerimi belirtmek isterim. Ayrıca, çalışma materyalinin sağlanması konusunda E.Ü.Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Anabilim Dalı yönetici ve görevlilerine de göstermiş oldukları ilgi ve yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

## İ Ç İ N D E K İ L E R

Sayfa

### BÖLÜM I

GİRİŞ ve AMAÇ . . . . .	1
GENEL BİLGİLER . . . . .	3
I.1. Klinik laboratuvar testlerini etkileyen faktörler . . . . .	3
I.2. Hemoliz . . . . .	4
I.2.1. İn vivo hemoliz . . . . .	4
I.2.2. İn vitro hemoliz . . . . .	6
I.3. İn vitro hemolizin test sonuçlarına etkisi . . . . .	10
I.4. Analiz edilen serum parametreleri hakkında genel bilgiler . . . . .	19
I.4.1. Total asit fosfataz . . . . .	19
I.4.1.1. Total asit fosfataz aktivite ölçüm yöntemleri . . . . .	21
I.4.1.2. Serumda total asit fosfataz aktivitesinin arttığı durumlar .	24

	<u>Sayfa</u>
I.4.2. Laktat dehidrogenaz . . . . .	25
I.4.2.1. Laktat dehidrogenaz aktivite ölçüm yöntemleri . . . . .	27
I.4.2.2. Serum LDH aktivitesinin arttığı durumlar . . . . .	28
I.4.3. Total kolesterol . . . . .	29
I.4.3.1. Serum kolesterol tayin yöntemleri . . . . .	31
I.4.3.2. Serum total kolesterolünün arttığı durumlar . . . . .	35
I.4.3.3. Serum total kolesterolünün azaldığı durumlar . . . . .	35
I.4.4. Total bilirubin . . . . .	36
I.4.4.1. Serum bilirubin tayin yöntemleri	37
I.4.4.2. Serum total bilirubinin arttığı durumlar . . . . .	41

## BÖLÜM II

GEREÇ ve YÖNTEM . . . . .	43
II.1. Kullanılan maddeler . . . . .	43
II.2. Kullanılan aletler . . . . .	43
II.3. Çalışma materyali olan serumun sağlanması . . . . .	44
II.4. Serum örneklerine hemolizat katılması	44
II.4.1. Hemolizat (hemolize edilmiş eritrosit) hazırlanması . . . . .	45
II.4.2. Hemolizli serum örneklerinin hazırlanması . . . . .	45

	<u>Sayfa</u>
II.5. Yöntemler . . . . .	46
II.5.1. Hb miktar tayini yöntemi . . . . .	46
II.5.1.1. Hb miktar tayininde	
kullanılan çözeltiler . . . . .	46
II.5.1.2. Hb standart eğrisinin çizimi	47
II.5.1.3. Deneyin yapılışı . . . . .	47
II.5.2. Serum total asit fosfataz	
aktivitesinin ölçülmesi . . . . .	48
II.5.2.1. Total asit fosfataz aktivite	
tayin yöntemi . . . . .	48
II.5.2.2. Total asit fosfataz aktivite	
tayininde kullanılan	
çözeltiler . . . . .	49
II.5.2.3. Deneyin yapılışı . . . . .	49
II.5.2.4. Serum total asit fosfataz	
aktivite hesabı . . . . .	50
II.5.3. Serum laktat dehidrogenaz aktivite	
ölçümü . . . . .	50
II.5.3.1. Serum laktat dehidrogenaz	
aktivite tayin yöntemi . . . . .	50
II.5.3.2. LDH aktivite tayininde	
kullanılan çözeltiler . . . . .	50
II.5.3.3. LDH standart eğrisinin çizimi	51
II.5.3.4. Deneyin yapılışı . . . . .	52
II.5.4. Serum total kolesterol miktar tayini	52
II.5.4.1. Serum total kolesterol miktar	
tayini yöntemi . . . . .	52

II.5.4.2. Serum total kolesterol miktar tayininde kullanılan çözeltiler	53
II.5.4.3. Deneyin yapılışı . . . . .	53
II.5.4.4. Serum total kolesterol miktarının hesaplanması . . .	54
II.5.5. Serum total bilirubin miktar tayini	54
II.5.5.1. Serum total bilirubin miktar tayini yöntemi . . . . .	54
II.5.5.2. Serum total bilirubin miktar tayininde kullanılan çözeltiler	54
II.5.5.3. Total bilirubin standart eğrisinin çizilmesi . . . . .	55
II.5.5.4. Deneyin yapılışı . . . . .	55
II.5.5.5. Serum total bilirubin miktarının hesaplanması . . .	56
II.6. Sonuçların istatistik değerlendirmesi	56

### BÖLÜM III

BULGULAR . . . . .	57
III.1. Hb tayinleri ve hemolize ait bulgular	57
III.1.1. Hb standart eğrisi . . . . .	57
III.1.2. Hemolizat katılmış serum örneklerinde Hb tayini . . . . .	58
III.1.3. Kalitatif olarak hemoliz şiddetinin belirlenmesi . . . . .	60
III.2. Analiz edilen serum bileşenlerine ait bulgular . . . . .	61

III.2.1. Serum total asit fosfataz aktivitesi bulguları . . . . .	61
III.2.2. Serum LDH aktivitesi bulguları .	64
III.2.3. Serum total kolesterol ölçümüne ilişkin bulgular . . . . .	66
III.2.4. Serum total bilirubin ölçümüne ilişkin bulgular . . . . .	68
II.2.4.1. Serum total bilirubin standart eğrisi . . . . .	69

#### BÖLÜM IV

TARTIŞMA ve SONUÇ . . . . .	72
IV.1. Hemolizli serum örneklerinin hazırlanışına ilişkin tartışma . . . . .	72
IV.2. Seçilen serum parametrelerine ilişkin tartışma . . . . .	75
IV.2.1. Total asit fosfataz bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma . . . . .	75
IV.2.2. Serum LDH bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma . . . . .	78
IV.2.3. Serum total kolesterol bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma . . . . .	80
IV.2.4. Serum total bilirubin bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma . . . . .	82

	<u>Sayfa</u>
IV.3. Sonuç . . . . .	84
ÖZET . . . . .	86
ÖZET (YABANCI DİLDE) . . . . .	88
KAYNAKLAR . . . . .	90





## B Ö L Ü M I

### G İ R İ Ő ve A M A Ç

Klinik biyokimya laboratuvarlarında uygulanan analiz yöntemleri; klinik bulguları doğrulamayı, tanıya akılcı biçimde ulaşmayı, uygun tedavi yöntemini belirlemeyi ve tedavi sırasındaki gelişmeleri sağlıklı bir şekilde izlemeyi amaçlar.

Bu yöntemlerin yüksek bir doğruluk düzeyine sahip olmaları istenir. Pek çok sayıdaki laboratuvar yöntemlerinden amaca uygun olarak yararlanmak ancak alınan sonuçların güvenilir bir şekilde değerlendirilmiş olması ile mümkündür. Bu nedenle sonuçları olumsuz yönde etkileyen faktörlerin önceden bilinmesinde yarar vardır (8,36).

Bu çalışmada seçtiğimiz dört serum parametresi için İzmir yöresinde bulunan hastanelerde uygulandığı saptanan klinik analiz yöntemleri kullanılarak in vitro hemolizin, bu parametrelere etkisi kantitatif olarak incelenmiştir. İn vitro hemoliz, 151, 186, 246, 616 ve 916 mg/L konsantrasyonlarda Hb sağlayacak şekilde serum örneklerine hemolizat katılarak kontrollü olarak oluşturulmuştur. Kontrollü olarak oluşturulan in vitro hemoliz kalitatif olarak da (0-4+)

değerlendirilerek aralarında ilişki kurulmaya çalışılmıştır.

Hemolizli olarak hazırlanan bu serumlarda iki enzimatik test yöntemi (total asit fosfataz, laktat dehidrogenaz) ile total kolesterol ve total bilirubin tayinleri yapılmıştır.

Bu çalışmada, yöremizdeki hastanelerde uygulanmakta olan bazı klinik biyokimya yöntemleri kullanılarak seçilen serum parametrelerine in vitro hemoliz etkisinin boyutlarının saptanması ve bulgularımız ile rutin çalışmalarda karşılaşılan hemoliz şiddeti arasında ilişki kurulabilmesi amaçlanmıştır.

## B Ö L Ü M I

### GENEL B İ L G İ L E R

#### I.1. Klinik laboratuvar testlerini etkileyen faktörler (8,9,36):

Biyolojik test materyalinin analizi, materyal içindeki organik bileşiklerin fonksiyonel gruplarının varlığına, bu bileşiklerin separasyonuna veya iyonların ölçülmesine dayanır. Bu analizlerin çeşitli şekillerde ve düzeylerde bazı faktörler tarafından etkilenmesiyle alınan sonuçların hatalı ve amacından sapmış olmasına yol açar.

Testlerin tanı koymadaki özgüllüğünü etkileyen faktörleri aşağıda belirtilen gruplar altında toplamak mümkündür.

1- Analiz materyalinin nitel veya nicel özelliklerini bozarak test sonuçlarını etkileyen faktörler: Antikoagülan ve koruyucular, hemoliz, lökoliz veya ikter, analiz materyalindeki bileşenlerin stabilitesi.

2- Analiz materyalinin kontaminasyonuna neden olarak test sonuçlarını etkileyen faktörler: Deterjan artıkları, cam malzeme veya plastiklerden kaynaklanan kontaminasyonlar,

materyalin sağlanması sırasında ciltten (deriden) gelen kontaminasyon ve paranteral olarak uygulanmış ilaç vb. bileşikler.

3- Doğrudan fizyolojik etkilerle test sonuçlarını etkileyen faktörler: Ritmik değişiklikler (gece, gündüz, mevsimler gibi), pozisyona bağlı değişiklikler (yatak istirahati vb. gibi), izlenen diyet ve kullanılan ilaçlarla ilgili metabolik değişiklikler.

4- Dolaylı fizyolojik etkilerle test sonuçlarını etkileyen faktörler: Diyagnostik manipülasyon-cerrahi travma, damar içi enjeksiyonlar, opiatlar, narkotikler, anestezi, kas aktivitesi, psikolojik durum, oral kontraseptifler ve endojen metabolitler.

Çalışma konumuz *in vitro* hemolizin test sonuçları üzerindeki etkisi olduğu için sayılan bu faktörlerden hemoliz hakkında ayrıntılı bilgi verilecektir.

## I.2. Hemoliz

Hemoliz, genel olarak eritrositlerin bir bileşeni olan hemoglobinin (Hb) çeşitli etki ve mekanizmalarla eritrosit dışına çıkması olarak tanımlanabilir. Bu olay organizma dışında (*in vitro*), organizma içinde (*in vivo*) oluşabilir(3).

### I.2.1. *In vivo* hemoliz:

*In vivo* hemoliz, kan dolaşımı içinde eritrositlerin bir hasarı sonucu Hb'nin doğrudan plazmaya geçmesi olayıdır.

İn vivo hemoliz genel olarak bazı hemolitik anemilerde, uygun olmayan kan perfüzyonları, bakteri-hayvan (yılan, arı, örümcek gibi) toksinleriyle zehirlenme ve eritrofa- gositoz olayları sırasında meydana gelmektedir. İn vivo hemoliz ekstravasküler veya intravasküler olmak üzere iki şekilde oluşabilir (3).

Ekstravasküler hemoliz (45): Ekstravasküler hemoliz bazı tip hemolitik anemilerde gözlenir. Genelde ekstravas- küler hemoliz karaciğer, dalak ve kemik iliği gibi retikü- loendotelial sistemde makrofajlar içinde oluşur. Örneğin, otoimmün hemolitik anemide retiküloendotelial sistem mak- rofajları  $I_g$  molekülünün Fc kısmını bağliyan reseptörlere sahip olduğu için,  $I_g$  ile kaplanmış eritrositlerin makro- fajlar tarafından tutulması sonucunda hemoliz meydana ge-lebilmektedir. Tam olarak hemoliz olmayan eritrositler membranlarının bir kısmını kaybederek sferosit şekline dö- nüşürler. Bu sferositler de daha sonra kolayca parçalanır- lar.

İntravasküler hemoliz (26,45): Bu tip hemoliz ciddi hemolitik hastalıklarda sık görülen bir durumdur. Örneğin, immün hemolitik anemilerde eritrosit yüzeyine yapışmış bulunan  $I_g$ 'ler serum komplemanını aktive ederler, aktive olarak eritrosit membranına yapışan kompleman burada delik- ler açılmasına neden olur ve eritrositlerin parçalanmasına yol açar. İntravasküler hemolizin görüldüğü diğer durumlar miyokard enfarktüsü ve kalp kapakçığı protezlerinin yol

açtığı fiziksel travma olaylarıdır. Ayrıca, ABO grup uyumsuzluğu olan kan perfüzyonlarında da intravasküler hemoliz görülmektedir. Kan dolaşımı içinde eritrositlerin monositler, nötrofiller veya sabit makrofajlar tarafından sindirilme olayı olan eritrofagositoz da da intravasküler hemoliz meydana gelebilmektedir. Eritrofagositoz, özellikle immün hemolitik anemilerde görülmekle birlikte eritrosit harabiyeti yapan bazı hastalıklarda da oluştuğu bildirilmiştir.

Intravasküler hemolizde dolaşımdaki Hb'nin fazlalığı nedeniyle haptoglobin-hemopeksin sistemlerinin doygunluğa ulaşması ile Met-Hb formu ortaya çıkmaktadır. Intravasküler hemolizin söz konusu olduğu olgularda görülen hemosiderinüri ve hemoglobinüri, intravasküler hemolizin klinik belirtileri olarak değerlendirilmektedir.

#### I.2.2. İn vitro hemoliz (5,12,21,25,45,47) :

In vitro hemoliz, eritrositlerin vücut dışında çeşitli etkenlerle zedelenmesi ve Hb'nin hücre dışına çıkması olayı olarak tanımlanabilir. İn vitro hemolize yol açan eritrosit harabiyeti aşağıda belirtilen şekillerde olabilmektedir.

Osmotik parçalanma: Eritrositler su ve iyon geçirgenliğini sağlayan yarı geçirgen bir zarla çevrilidirler. Hb'nin osmotik etkisi nedeniyle eritrositler hücre içine su almak eğilimindedirler, fakat normal koşullar altında

bu eğilim bir enerji-bağıntılı mekanizma tarafından ( $\text{Na}^+$  pompası) su ve sodyum iyonlarının hücre dışına pompalanmasıyla kontrol edilmektedir. Eğer eritrosit içine giren su miktarı pompa kapasitesinin üstünde ise veya pompalama mekanizmasında bir bozukluk varsa, hücre içeri aldığı sudan dolayı şişmeye başlar. Bu durumda eritrositin bikonkav disk şekli sferik bir hale gelir. Normal eritrositler hücre içeriklerini kaybetmeksizin orjinal hacimlerinin 1,5 veya 2 katı kadar şişebilirler. Şişme, eritrositlerin membranında geçici hasarlar meydana getirir, Hb ve diğer makromoleküllerin hücre dışına çıkmasına neden olur. Bu olaylar dizisi osmotik veya kolloid osmotik parçalanma olarak bilinmektedir. Eritrosit membranında oluşan hasarlar geridönebilir niteliktedir ve hücreler osmotik hemoliz sonrasında koşulların düzeğtilmesi ile osmotik bütünlüklerini yeniden kazanabilirler.

Normal koşullar altında eritrosit içeriğindeki sıvı % 0.9'luk sodyum klorür çözeltilisi ile izoosmotik bir dengeye ulaşır. Bu konsantrasyon değerinin üstündeki hipotonik tuz çözeltileri içinde eritrositler in vitro olarak osmotik parçalanma ile hemoliz olurlar. Normalde, % 0.44'lük sodyum klorür çözeltilisi içindeki eritrositlerde hemoliz oluşmaya başlar ve % 0.34'lük bir tuz çözeltilisi içinde eritrositlerin tamamen hemoliz olduğu görülür. Bu özelliğkten yararlanılarak çeşitli konsantrasyonlardaki tuz çözeltileri içinde değışik oranlarda meydana gelen hemoliz

değerlerinden yola çıkılmış ve eritrositler için osmotik fragilité testleri geliştirilmiştir.

Kısmi parçalanma: Kısmi parçalanma olayı, çoğunlukla eritrosit membranının bir kısmının erimesi olayı olarak tanımlanabilir. Fakat bu olay her zaman eritrosit içeriğinin kaybolması sonucunu getirmeyebilir.

İn vitro koşullarda termik olarak hasar yaratma veya uygun bir diámetro pipetinde hücreleri sıkıştırma gibi çeşitli tekniklerle eritrositlerde kısmen parçalanma yaratmak mümkündür.

Komplemana bağımlı hücre erimesi (sitolizis): İn vitro olarak komplemanların özgül eritrosit antikorlarına bağlanmasının sağlandığı durumlarda eritrosit membranının kimyasal yapısının bozulması ile eritrositlerin parçalanmasına yol açan olay komplemana bağımlı sitolizis olarak tanımlanır.

Komplemanın terminal kompleksi olarak da adlandırılan oluşum C5, C6, C7, C8 ve C9 komponentlerini içerir. Bu kompleks eritrosit membranı ile reaksiyona girer. Belirtilen komponentlerin lipid çift tabaka içine gömülmesi ile trans-membran ve proteinle çevrili porlarda yapısal ve işlevsel bir bozukluk meydana gelir. Porlardaki bu harabiyet eritrosit membranını su ve elektrolitlere karşı aşırı geçirgen bir duruma getirerek osmotik parçalanmaya neden olur. Aynı zamanda osmotik parçalanma olmaksızın da diğer eritrosit bileşenlerinin direkt olarak hücre dışına çıkışına yol açabilir.



Fiziksel veya mekanik etkiler: Aşırı soğuk veya sıcak gibi termik etkiler özellikle 64°C nin üzerindeki sıcaklıklar eritrosit membranını etkileyerek hemolize neden olur. Sıcaklığın etkisi ( $H^+$ ) iyon konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Asidik ve alkalik ortamlarda düşük sıcaklıklarda bile hemoliz olduğu halde nötr ortamlarda eritrositlerin hemolize olan direnci artar.

Radyasyon, UV ışınları ve çeşitli elektrik akımları (doğru, değişken, indüksiyon) eritrositlerin lipoid membranını parçalıyarak hemoliz oluştururlar.

Laboratuvar koşullarında analiz materyalinin elde edilmişindeki teknik hatalar, materyali ayırma ve santrifüj aşamalarındaki dikkatsizlikler, mekanik olarak kanın aşırı çalkalanması veya karıştırılması, kanın bir kaç kez dondurulup, çözülmesi veya uzun bir süre cam eşyayla teması, çeşitli kontaminasyonlar eritrositlerde fiziksel veya mekanik olarak hemolize neden olan faktörlerin en önemlileridir.

Kimyasal etkiler: Hg, Cu vb. bazı ağır metaller kloroform, eter, alkol, aseton gibi lipitleri çözen solventler, belirli  $H^+$  veya  $OH^-$  konsantrasyonuna sahip asit ve alkaliler eritrosit membranına etkiyerek hemolize yol açarlar.

Sabunlar, safra asitleri ve saponin gibi yüzey gerilimini düşüren maddeler de hemolize neden olan maddelerdir. Ayrıca, doymuş veya doymamış yağ asitleri, lesitin gibi bazı lipoitler eritrosit membranını etkileyerek daha az hemolitik etkiye sahip diğer maddelerin hemoliz yapmalarını kolaylaş-

tırarlar. Kolesterol bir lipoid olmasına rağmen bu maddelerin etkilerine engel olan bir bileşiktir.

### I.3. İn vitro hemolizin test sonuçlarına etkisi:

İn vitro hemolizde, analiz materyalinin içerdği Hb konsantrasyonuyla doğru orantılı bazı test sonuçları hemolizden pozitif veya negatif yönde etkilenmektedir. Serum örneği 20 mg/dl serum düzeyinde bir Hb konsantrasyonuna sahip olduğu zaman gözle görülebilir (visible) düzeyde hemolizli sayılır, bu konsantrasyonun 600 mg Hb/dl serum düzeyini aşması ise şiddetli derecede hemolizin göstergesi olarak kabul edilir (22,41).

İn vitro hemoliz genel olarak test sonuçlarını farklı üç mekanizma ile etkilemektedir (20).

#### 1- Eritrosit bileşenlerinin açığa çıkması:

Bazı serum bileşenlerinin eritrosit içindeki konsantrasyonları serum veya plazmaya göre çok daha yüksektir. Caraway'e göre (8), bazı bileşenlerin eritrosit/serum konsantrasyon oranları şöyledir: Laktat dehidrogenaz (LDH) için 25, asit fenil fosfataz için 67, potasyum ve magnezyum için 20, 6-fosfoglukonik dehidrogenaz için 450. Analizi istenen bileşenin eritrosit içindeki konsantrasyonu plazma veya seruma oranla daha yüksek ise hemoliz sırasında eritrositlerin parçalanması ile açığa çıkan bu bileşen, serum veya plazmayı kontamine ederek test sonuçlarını hatalı olarak pozitif yönde etkiler ve normal değerlerin sapmasına neden olur (20).

Eritrosit bileşenlerinin açığa çıkması şeklinde oluşan hemoliz özellikle serum total asit fosfataz, LDH, aldolaz, aspartat amino transferaz aktiviteleri ile potasyum, magnezyum ve inorganik fosfor (Pi) konsantrasyon değerlerini etkilemektedir (6, 20).

Eritrositler yüksek bir konsantrasyonda taşıdıkları fosfat esterlerini parçalanmaları sırasında serum içine bırakırlar, bu fosfat esterleri serumdaki fosfatazlar tarafından hidroliz edilerek (Pi) konsantrasyonunun artmasına neden olurlar. Hemolizin neden olduğu (Pi) konsantrasyon değerindeki bu yükseliş zamana bağlı olarak değişim göstermektedir; örneğin, hemolizli bir serum 5-7°C de bir süre saklanacak olursa serum (Pi) konsantrasyon değerinin her geçen gün başına 4-5 mg/dl'lik bir yükseliş gösterdiği ifade edilmiştir (8,38). Hemoliz etkisi ile serum potasyum konsantrasyon değerinin ise % g Hb başına yaklaşık 3.3 mEq/L'lik bir yükseliş gösterdiği bildirilmiştir (22).

Hemolizli serumlarda yapılan asit fosfataz aktivite ölçümlerinde hemoliz etkisinin kullanılan metoda bağlı olarak farklılıklar gösterdiği bildirilmiştir (20). Asit fosfataz aktivite ölçümlerinde kullanılan substrat (fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat) eritrosit asit fosfatazı tarafından hidroliz edildiği takdirde asit fosfataz aktivitesi hemolizden etkilenmektedir(36,46). Enzim aktivitesine substrat olarak  $\alpha$ -naftil fosfat ve timolftalein monofosfat kullanıldığında hemo-

lizin daha az etkili olduğu bildirilmiştir (16). Hemolizli serumlarda tartarata duyarlı prostatik asit fosfatazın fenil fosfat substratı kullanılarak yapılan aktivite ölçümünde hemolizden etkilenmediği saptanmıştır (6). Frank ve diğ. (16), serum asit fosfataz aktivite ölçümlerinde hemolizin metoda bağlı olarak etkili olduğunu öne sürmüşler ve prostatik asit fosfataza özđü substratlar kullanıldığı zaman asit fosfataz aktivite değerlerinde meydana gelen yükselişin ihmal edilebilir olduğunu belirtmişlerdir. Fakat aynı çalışmada p-nitrofenil fosfatın kullanıldığı metodlarda enzim aktivite değerlerindeki yükseliş hemolizsiz seruma göre dört kat daha fazla bulunmuştur.

Hemolizli serumlarda 10 mg/dl Hb konsantrasyonu başına aspartat aminotransferaz aktivite değerinin % 2, magnezyum konsantrasyon değerinin ise % 0.05 oranında bir yükseliş gösterdiği belirtilmiştir (38).

LDH eritrositlerde seruma oranla 160 kez daha yüksek bir konsantrasyonda bulunduğu için hemolizden en fazla etkilenen serum parametrelerinden biridir (20). LDH'ın eritrositlerde yüksek konsantrasyonda bulunması nedeniyle eritrositlerin ayrılması sırasında kullanılan bazı tekniklere bağlı olarak da (Vacutainer veya Corvac tüpleriyle tam kanın alınma işlemleri gibi) LDH aktivite değerlerinde önemli artışlar gözlenir (38,39). Corvac tüplerinin kullanıldığı serum ayırma işlemlerinde tüp içeriğinde yer alan ve ayırıcı (separator) olarak tanımlanan inert tiksotropik bir si-

likon jel, eritrositler ve serum arasında bir bariyer oluşturarak serumun ayrılmasını sağlar. Ayırıcı materyal bu tüpler içine santrifügasyondan önce veya sonra ilave edilebilir. Santrifügasyon öncesi ayırıcı ilave edilerek sağlanmış bir serum örneğinde yapılan LDH aktivite ölçümünde eritrositlerin hasarı ile ilişkili olarak 7.4 U/L'lik bir aktivite değer artışı saptanmıştır (39). Başka bir çalışmada ise santrifügasyondan önce ayırıcı ilave edilerek sağlanmış serum örneklerinde hemolizden kaynaklanan LDH aktivite değer artışı 13 U/L dir. Bu düzeydeki bir artışın % 0.03-0.04 hemolizat içeren bir serum örneğindeki artmış aktivite değerine eşit olduğu bildirilmiştir (23).

İn vitro hemoliz nedeni ile eritrosit bileşenlerinin açığa çıkması yoluyla test sonuçlarında meydana gelen hataların kantitatif değerlerini Caraway (8) tarafından öne sürülen bir formül ile teorik olarak hesaplamak mümkündür. Bu formülde serum hemoglobini hemolizin ölçüsü olarak kullanılır. Eritrositlerde bulunan Hb konsantrasyonu 34 g/dl eritrosit olarak kabul edilir ve böylece bir ml seruma 0.03 ml hemolizat (hemoliz edilmiş eritrosit) ilavesi ile 100 ml' de 1 g Hb içeren serum elde edilmiş olur.

Caraway formülü (8):

$$p = \frac{3h(c/s-1)}{1 + 0.03h}$$

p = % hata

h = % g serum veya plazma Hb konsantrasyonu

s = bileşenin hemolizsiz serum veya plazmadaki konsantrasyonu

c = bileşenin eritrosit içindeki konsantrasyonu

Caraway formülü kullanılarak % 0.1 g Hb içeren hemolizli bir serum örneğinde potasyum için teorik % hata 5.7 olarak bulunmuştur. Hesaplanan bu hata yüzdesi deneysel tayinlerle de uyum sağlar (8).

2- Renkli kompleks oluşumu veya protein bağlamaya dayanan analiz yöntemlerine direkt etki:

Eritrositlerin parçalanması ile serumu kontamine eden Hb, bazı serum bileşenlerinin renkli kompleks oluşumuna dayanan reaksiyonlarla tayininde renk girişimi (interferansı) yaparak analitik işlemleri direkt olarak etkilemektedir (20). Ekstraksiyon olmaksızın uygulanan bazı kolorimetrik yöntemlerde eğer bir düzeltme faktörü kullanılmıyorsa Hb'nin oluşturacağı absorbans nedeni ile önemli ölçüde hatalı sonuçlar elde edilir (38). Serumda protein, bilirubin, kolesterol, ürik asit, demir, insülin, A vitamini tayinleri hemolizden bu mekanizma ile etkilenen yöntemlere en iyi örneklerdir (12,20,38).

Serum bilirubin tayininde uygulanan diazo reaksiyonlarında, Hb ile diazo reaktifinin içeriğinde bulunan sülfanilik asit arasında ayıraç olarak kullanılan nitrik asit

için bir yarışma olasılığından söz edilir. Hemoglobinin nitrik asit tarafından methemoglobine dönüştürülmesi sonucunda oluşan bu renkli bileşik kolorimetrik analizi direkt olarak etkileyebilir ( 9). McGann ve diğ.(24), serum bilirubin tayininde kullanılan Malloy-Evelyn metodunun bir modifikasyonu olan van den Bergh reaksiyonu ile hemolizli serum içeren örneklerinde bilirubin konsantrasyon değerinin % 5-15 oranında azaldığını göstermişlerdir. Bir çalışmada serum bilirubin tayininde diazolama sırasında diazobenzen p-sülfonik asit çözeltisine Hb eklendiğinde bilirubin için gerekli olan diazo miktarının azaldığı gözlenmiş ve nihai azo pigment çözeltisinde Hb varlığı 396 nm de oksid Hb'nin  $\gamma$  -bandı ile saptanmıştır (19). Bir çalışmada serum dekonjuge bilirubin oranları çeşitli dalga boylarında spektrofotometrik olarak saptanmış ve hemolizsiz bir serum örneğinde dekonjuge bilirubin yüzdesi % 100 olarak saptanmıştır. Fakat 38 mg/dl Hb eklendiğinde bu değer % 88 ve 86 mg/dl Hb eklendiğinde ise % 62 olarak bulunmuştur (36). Serumda proteine bağlı bulunan bilirubinin diazo reaksiyonuna katılımını sağlamak amacı ile kafein, metanol gibi bileşiklerin kullanıldığı metotlarda, hemoliz farklı etkilere sahiptir (38). Jendrassik-Grof metodu ile serum bilirubin tayinlerinde hemolizsiz bir serum örneğindeki bilirubin konsantrasyonu, 0.43 mg/dl iken % 1 hemolizat taşıyan örneğin bilirubin konsantrasyonu 0.42 mg/dl olarak bulunmuştur (6). Genel olarak direkt spektrofotometrik metotlarda bir düzeltme faktörü

kullanıldığı zaman 165 mg/dl'ye kadar serum Hb konsantrasyonunun bilirubin tayinlerini etkilemediği belirtilmiştir (38).

Kolesterol tayin yöntemleri genel olarak hemolizden fazla etkilenmezler. Özellikle, ekstraksiyonun kullanıldığı kolesterol tayin metotlarında hemolizin, doğrudan tayin yöntemlerine oranla daha az etkili olduğu belirtilir (48). İzopropanol ile ekstraksiyonu takiben asidik ortamda demir-3-klorür kullanılarak hemolizli plazmada kolesterol tayini yapıldığında %(-0.82) oranında bir hata hesaplanmış ve kolesterol tayininin hemolizden fazla etkilenmediği sonucuna varılmıştır (6). Laessig ve diğ.(20), % 1 hemolizat içeren serum örneklerinde direkt metotla kolesterol konsantrasyonunu saptadığında 20 mg/dl'lik bir artış bulmuşlardır, fakat ekstraksiyon metodu ile alınan sonuçla kıyaslandığında konsantrasyonda önemli bir değişme gözlenmemiştir. Kolesterolün enzimatik olarak tayin edildiği metotlarda ise hemolizin etkisi direkt metotlara oranla çok daha azdır (38). Richmond (32), Nocardia sp.'den elde edilen kolesterol oksidaz enzimi ile kolesterol tayininde hemolizin metod üzerindeki etkisini araştırmış ve hiç Hb içermeyen bir plazma örneğinde kolesterol konsantrasyonu 145 mg/dl bulunurken 200 mg/dl Hb içeren aynı örnekte kolesterol konsantrasyonunu 141 mg/dl olarak saptamıştır.

Hb, serum total protein tayinlerinde kullanılan biüret reaktifi ile reaksiyona girer fakat direkt olarak absorbanı



etkiler. Bir mg Hb'nin 1.9 mg serum total proteinine eşdeğer bir absorbans oluşturduğu belirtilmiştir (9). Bir çalışmada hemolizli plazma örneklerinde her g Hb'nin total protein konsantrasyonunda % 1 oranında bir artışa yol açtığı saptanmıştır (6).

Serum albümin tayinlerinde bromkrezol yeşili yöntemi (BCG) kullanıldığı zaman hemolizin albümin konsantrasyonunda yüksek okumalara neden olduğu ifade edilmiştir (12,16,20). Bir çalışmada BCG yöntemiyle yapılan serum albümin tayininde her 100 mg Hb/100 ml serumun albümin konsantrasyonunda 100 mg/100 ml'lik bir artış oluşturduğu bildirilmiştir (14).

Serumda ürik asit tayininde eritrositlerin parçalanması ile açığa çıkan Hb'nin bu tayinde kullanılan fosfotungstat ile reaksiyona girerek direkt etkili olduğu gözlenmiştir. Üre tayinlerinde kullanılan Berthollet yöntemi de hemolizden etkilenir (38).

İmmünreaktif insülin tayinlerinde Hb'nin direkt etkisi nedeni ile hemoliz tarafından serum insülin konsantrasyonlarında düşük sonuçlar elde edilebileceği bildirilmiştir (38).

Serumda A vitamini veya karoten tayininde antimonklorür metodu yerine UV metodu kullanıldığı zaman serum A vitamini konsantrasyonunun Hb'nin direkt etkisi nedeni ile yüksek bulunacağı belirtilmiştir (38,41).

3- Eritrosit sıvı içeriği tarafından serum veya plazmanın seyreltilmesi:

Hemoliz olayı, eritrositlerdeki konsantrasyonu serum

veya plazmaya göre daha düşük olan bazı serum bileşenlerinin tayininde plazma veya serumun seyrelmesine yol açar (22). Fakat genel olarak hemoliz etkisi ile test materyalinde ortaya çıkan seyrelme ve bunun oluşturacağı etkiler ağır hemolitik serumlar haricinde ihmal edilebilecek bir faktör olarak kabul edilmektedir (8).

Serumun seyrelmiş olması serum bileşeninin konsantrasyonunun normalden daha düşük saptanmasına yol açabilir.  $Na^+$ ,  $Ca^{+2}$ ,  $Cl^-$ 'un eritrosit içindeki konsantrasyonu serum konsantrasyonundan daha düşüktür, bu nedenle de seyrelmeden etkilenebilecek olan parametrelere en iyi örneklerdir (22).

Serum tiroksin tayininde kullanılan radyoimmün ölçüm (RIA) ve yarışmalı proteine bağlanma (CPB) tekniklerinin hemolizden etkilendiği ve özellikle (CPB) tekniğinin hemolizin seyreltici etkisine açık olduğu belirtilmiştir (38).

Hemoliz, seyreltici bir etki ile serum pH'nı da düşürür, bu nedenle ortam pH'ına duyarlı analizlerin dolaylı olarak hemolizden etkilendiği bilinir (8).

Çalışmamızda, in vitro hemolizin etkisini kantitatif olarak saptamak üzere serum parametreleri olarak total asit fosfataz, laktat dehidrogenaz, total kolesterol ve total bilirubin seçilmiştir. Bu parametreler ve tayinlerinde kullanılan yöntemler konusundaki genel bilgiler aşağıda sunulmaktadır.

I.4. Analiz edilen serum parametreleri hakkında genel bilgiler:

I.4.1. Total Asit Fosfataz (31,34,38,41,46):

(EC 3.1.2.2: Ortofosforik Monoester Fosfohidrolaz = ACP)

Asit fosfatazlar, insanda ilk kez 1924 yılında eritrositlerde gösterilmişlerdir. 1925 Yılında idrar, 1934 yılında ise dalak ve karaciğerdeki varlıkları saptanmıştır. 1936-1942 Yılları arasında yapılan çalışmalarla asit fosfatazların klinik önemi ortaya konmuştur.

Asit fosfataz enzimleri, asit ortamda ortofosforik asit esterlerini hidroliz etme yeteneğine sahip enzimlerin bir grubunu oluşturur. Asit fosfatazların katalizlediği hidroliz sonucunda ortofosforik asit esterlerinden fosforik asit açığa çıkar ve O-P bağı kopar. Asit fosfatazlar pH 5-6 arasında optimum aktiviteye sahiptirler.

Asit fosfatazlar bütün vücut doku ve sıvılarında geniş ölçüde dağılım gösterirler. Histokimyasal çalışmalar, doku enzim aktivitesinin temel olarak glanduler epitelyunda lokalize olduğunu ve bu enzimlerin lizozomal kaynaklı olduğunu göstermiştir. Ayrıca, bazı dokularda ekstralizozomal kaynaklı asit fosfatazlar da bulunmaktadır. Asit fosfataz enzimlerinin vücutta en fazla bulunduğu dokular karaciğer, dalak, eritrositler ve trombositler, kemik iliği, prostat bezi ve süttür. Prostat, asit fosfatazın en fazla bulunduğu dokudur, buradan kaynaklanan enzim, prostatik asit fosfataz

olarak bilinir ve diğer asit fosfatazlardan antijenik özelliği ile ayrılır. Sağlıklı erkeklerin serumunda bulunan total asit fosfatazın 1/2 - 1/3'ü prostatik asit fosfatazdır. Kadın ve erkeklerin serumunda geri kalan asit fosfataz aktivitesinin trombosit, eritrosit, kemik osteoklastları ve lökositlerden kaynaklandığı belirtilmiştir.

Asit fosfatazın yedi farklı izoenzimi olduğu saptanmıştır ve bunlar özellikle retiküloendotelyal sistemde bulunurlar ve bu nedenle asit fosfataz izoenzimlerinin hematolojik tanılarda değerli katkıları söz konusu olabilmektedir. Asit fosfataz izoenzimleri poliakrilamit jel elektroforezinde elektrik alan içindeki hareket yeteneklerine göre 0, 1, 2, 3, 3b, 4, 5 şeklinde sayısal bir düzen ile gösterilirler. Asit fosfataz izoenzimlerinin bulunduğu başlıca doku ve hücreleri şu şekilde sıralayabiliriz: İzoenzim 1 bütün dokularda; izoenzim 2 prostat, granülosit, monosit ve pankreasda; izoenzim 3 lenfosit, trombosit ve diğer dokularda; izoenzim 3b ilkel kan hücrelerinde; izoenzim 4 granülosit, monosit, prostat, böbrek, akciğer, kemik, barsak ve deride; izoenzim 5 prostat, osteoklast, bazı histiositler, epiteloid ve retikulum hücrelerinde bulunmaktadırlar. Normal bir serumda izoenzim 3 ve 5 bulunur.

Bazı inhibitörler prostatik veya prostatik olmayan asit fosfataz enzimlerini inhibe ederler. Prostatik asit

fosfataz  $\downarrow$  -tartarat, eritrosit asit fosfatazı ise formaldehit ve bakır iyonları ile inhibe olur. Asit fosfatazın 2 ve 3 numaralı izoenzimleri tartarat inhibisyonuna duyarlı olduğu halde izoenzim 5 tartarat inhibisyonuna dirençlidir. Serum asit fosfatazının stabilitesinde rol oynayan en etkin faktörler pH, saklama sıcaklığı ve asit fosfataz tayininde kullanılan substratın asiditesidir. Asit fosfatazlar özellikle  $37^{\circ}\text{C}$ 'nin ve pH 7'nin üstündeki değerlerde stabil değildirler. Serum, oda sıcaklığında bir saat kaldığı takdirde total enzim aktivitesinin % 50'den fazlasını kaybetmektedir. Serum total asit fosfataz aktivitesinin  $-20^{\circ}\text{C}$  de saklandığında iki veya üç ay,  $4-10^{\circ}\text{C}$  de ise iki hafta stabil kaldığı bildirilmiştir.

I.4.1.1. Total asit fosfataz aktivite ölçüm yöntemleri (31,46):

Serum asit fosfataz aktivitesinin ölçümünde kullanılan metotlar genel olarak bir organik fosfat esterinin substrat olarak kullanılması ve bu substratın asit fosfatazlar tarafından hidrolizlenmesi ile açığa çıkan renkli ürünün kolorimetrik olarak ölçülmesi ilkesine dayanırlar. Bu amaçla serum asit fosfataz aktivitesinin ölçümünde kullanılan ilk metotlardan biri olan Bodansky metodunda substrat olarak gliserofosfat kullanılmıştır. Daha sonra King-Armstrong metodunda disodyum fenilfosfat, Bessey-Lowry metodunda ise p-nitrofenil fosfat substratları kullanılarak asit fosfataz aktivite ölçümleri yapılmıştır. Serum asit fosfataz aktivite

ölçümlerinde ftalein fosfat,  $\alpha$  -naftil fosfat,  $\beta$  -naftil fosfat, fenolftalein fosfat, timolftalein fosfat, naftol AS-B1 gibi organik fosfat esterleri de substrat olarak kullanılmaktadır. Asit fosfataz enziminin optimum pH'ı reaksiyonlarda kullanılan substrata bağlı olarak değişiklik gösterir. Bazı substratlar için hidroliz sonucunda açığa çıkan ve ölçümü yapılan hidroliz ürünleri aşağıda belirtilmiştir.

<u>Substrat</u>	<u>Ölçülen ürün</u>
$\beta$ -gliserofosfat	İnorganik fosfat(Pi)
Disodyum fenil fosfat	Fenol
Timolftalein monofosfat	Timolftalein
Fenolftalein monofosfat	Fenolftalein
p-nitrofenil fosfat	p-nitrofenil

Otomatik aletlerle yapılan serum asit fosfataz aktive ölçümlerinde timolftalein monofosfat, fenolftalein monofosfat ve p-nitrofenil fosfat substratları tercih edilmektedir.

Prostatik kaynaklı olmayan asit fosfatazlar ile prostatik asit fosfatazlar arasında substrat özgüllüğü açısından bazı farklılıklar bulunmaktadır. Fenilfosfat ve p-nitrofenil fosfat eritrosit asit fosfatazları tarafından kolayca hidroliz edilirken  $\alpha$  -naftil fosfat'ın eritrosit asit fosfatazları haricindeki bütün asit fosfatazlar tarafından hidroliz edildiği anlaşılmıştır.  $\beta$  -gliserofosfat, eritrosit fosfatazları tarafından çok yavaş hidroliz edilir, bu neden ile

$\beta$  -gliserofosfatın kullanıldığı metotlar asit fosfataz aktivite ölçümleri için çok duyarlı değildirler. Prostatik asit fosfataz aktivite ölçümlerinde substrat olarak genelde  $\beta$  -gliserofosfat, timolftalein monofosfat,  $\alpha$  -naftil fosfat kullanılmaktadır. Prostatik asit fosfataz aktivitesi bazı immünokimyasal metodlar kullanılarak da saptanabilmektedir. Bu metodların dayandığı genel ilke, prostatik asit fosfatazın çeşitli şekillerde elde edilen antiserumlar ile immün reaksiyonlara girebilmesidir. Prostatik asit fosfataz aktivitesinin ölçülebildiği immünokimyasal metodlar arasında "counterimmunolectrophoresis" (karşıt immün elektroforez), radyoimmün ölçüm , immün enzim ölçümü, katı faz ve çift antijen radyoimmün ölçümleri yer almaktadır.

Total asit fosfataz enzim aktivitesi serumda plazmaya oranla daha yüksek değerlerde bulunmaktadır. Serumda total asit fosfatazın normal değerleri yaş ve cinsiyete bağlı olarak bazı farklılıklar göstermektedir. Ayrıca total asit fosfataz enzim aktivitesi için uygulanan tayin yöntemlerine göre ünite birimleri tanımlanmıştır. Bu birimler ve yöntemlerin normal değerleri şunlardır (31):

Bodansky (1954) ve Shinowara-Jones-Reinhart (1942) üniteleri:

1 Ünite = 100 ml serumda bir saat içinde 1 mg inorganik fosforu açığa çıkaran enzim aktivitesine eşdeğerdir.

1 I.U = mikromol/dakika/L    1 I.U = Bodansky ünitesi x 5.4

Normal değer = 1.5 - 4 Bodansky ünitesi = 8 -22 I.U/L

Shinowara-Jones-Reinhart (SJR) x 5.4 = I.U

Normal değer = 2.2 - 6.5 SJR ünitesi = 15.35 I.U/L

Bessey-Lowry-Brock (1946) ünitesi:

1 Ünite = 1 ml serumda bir saatte bir mikromol p-nitrofenol açığa çıkaran enzim aktivitesine eşdeğerdir.

Bessey-Lowry-brock (BLB) ünitesi x 16.7 = I.U

Normal değer = 0.7 - 2.7 BLB ünitesi = 11.7 - 45 I.U/L

Babson (1965) ünitesi:

1 Ünite = 1 ml serumdan dakikada bir mikromol fenolftalein açığa çıkaran enzim aktivitesine eşdeğerdir.

Babson ünitesi = I.U

Normal değer = 9 - 35 I.U/L

Roy ve diğ.(1971) asit fosfataz ünitesi:

1 Ünite = Dakika/L başına bir mikromol timolftalein açığa çıkaran enzim aktivitesine eşdeğerdir.

Roy ünitesi = I.U/L veya ml U/ml

Normal değer = 0.11 - 0.60 I.U/L

I.4.1.2. Serumda total asit fosfataz aktivitesinin arttığı durumlar (34):

Total asit fosfataz enzim aktivitesindeki artışlar (hiperfosfatazemi) çeşitli faktörlerin etkisi ile ve bazı patolojik durumlarda gözlenir. Bunların başlıcaları; pros-



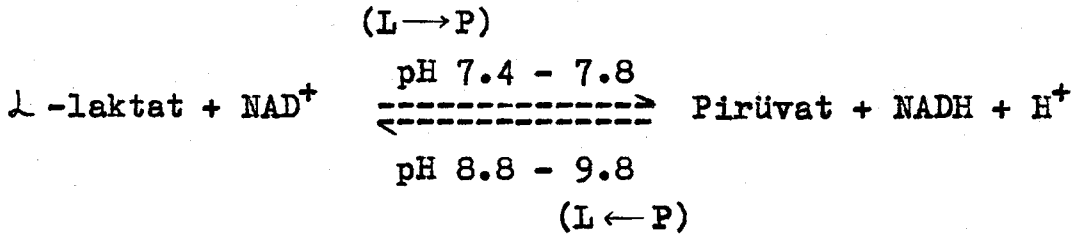
tatik masaj ve prostatik hastalıklar, çeşitli kemik hastalıkları (Paget hastalığı, osteojenik sarkom, Albright hastalığı ve osteoporozis gibi), bazı böbrek hastalıkları (kronik glomerülonefrit, gut nefropati gibi), retiküloendotelial sistem hastalıkları (Gaucher, Niemann-Pick, Hodgkin hastalıkları, retikül hücre sarkomu gibi), çeşitli karsinomlar (göğüs, mide, barsak, böbrek ve adrenal korteks karsinomları), tromboembolik rahatsızlıklar (miyokard enfarktüsü, pulmoner emboli gibi), trombosit ve eritrositlerle ilgili hastalıklardır.

Çalışmamızda serum total asit fosfataz aktivite ölçümü için esasını modifiye Bessey-Lowry-Brock metodunun teşkil ettiği kit yöntemi kullanılmıştır.

#### I.4.2. Laktat Dehidrogenaz (4,35,38,41):

(EC 1.1.1.27;  $\text{L}$ -Laktat =  $\text{NAD}^+$  oksidoredüktaz = LDH)

LDH, hidrojen transfer edici bir enzimdir, hidrojen akseptörü  $\text{NAD}^+$  varlığında  $\text{L}$ -laktatın pirüvata oksidasyonunu katalizler. Glikoliz olayının son aşamasında görülen pirüvat ve laktat arasındaki reaksiyon tersinir niteliktedir.



LDH 'in altı farklı izoenzimi bulunmaktadır. Bu izoenzimler ve alt birim kompozisyonları şöyledir: LDH-1( $H_4$ ), LDH-2 ( $H_3M$ ), LDH-3 ( $H_2M_2$ ), LDH-4 ( $HM_4$ ), LDH-5 ( $M_4$ ) ve LDH-6. LDH-6 izoenzimi LDH<sub>c</sub> olarak gösterilir ve insan postpubertal testisinde bulunur. Bu izoenzimlerin dokular-  
da dağılımı farklılıklar gösterir. Örneğin, kalp kası, böbrek korteksi ve eritrositlerde LDH-1 ve LDH-2; karaciğer, deri, iskelet kası, ince barsakda LDH-4 ve LDH-5 izoenzim-  
leri yaygındır. LDH-3 ise en fazla iskelet kasında bulunmakla birlikte karaciğer, eritrositler ve kalp kasında da bulunur. Eritrositler içindeki total LDH aktivitesinin % 44'ü LDH-2, % 42'si LDH-1, % 10'u LDH-3 ve % 4'ü LDH-4 den kaynaklanır. Normal serum % 20-40 arasında LDH-4 ve LDH-5 içerir. Fakat genelde LDH aktivitesi hemen hemen bütün hücrelerin sitoplazmasında bulunur.

LDH civa, p-kloromerküribenzoat, borat, oksalat ve oksamat ile kompetitif olarak inhibe olur. Aşırı substrat konsantrasyonları (laktat veya pirüvat) substrat inhibisyonuna yol açar.

Serum LDH stabilitesi izoenzim dağılımına bağlıdır, örneğin LDH-1 oda sıcaklığında veya  $-10^{\circ}C$  de bir ay stabil kalabildiği halde LDH-4  $-10^{\circ}C$  de iki gün içinde aktivitesini tamamen kaybetmektedir. LDH aktivite ölçümü yapılacak serumun oda sıcaklığında veya  $10-15^{\circ}C$  de saklanması ve 48 saat içinde çalışılması önerilmektedir.

I.4.2.1. Serum LDH aktivite ölçüm yöntemleri(2,7, 41):

Serum LDH aktivite ölçüm metotlarında genel olarak laktat ve pirüvat arasındaki tersinir reaksiyondan yararlanılmaktadır. Laktat ve pirüvat arasındaki tersinir reaksiyonun yönü substrat olarak laktat veya pirüvatın seçilmesine göre değişir. Substratı laktat olan reaksiyonun yönü ileriye doğru, substratı pirüvat olan reaksiyonun yönü ise geriye doğrudur. Serumda LDH aktivite ölçümünde kullanılan reaksiyonların ilkeleri Wroblewski ve La Due, Amador ve diğ., Bowers, Kingsley ve diğ., Lum ve Gambino tarafından yapılan çalışmalarla belirlenmiştir. Serum LDH aktivite ölçüm metotlarının esası, pirüvat ve laktat arasındaki tersinir reaksiyonda değişmeden kalan substrat fazlasının bir renk reaktifi ile oluşturduğu rengin alkali ortamda kolorimetrik olarak ölçülmesine dayanır.

Substratı laktat olan reaksiyonda ( $L \rightarrow P$ ) laktat  $NAD^+$  varlığında pirüvata oksitlenir ve bu reaksiyonun pH'ı 8.8 - 8.9 arasındadır. Reaksiyon pH'ı tris, pirofosfat, glisin gibi tampon çözeltiler kullanılarak ayarlanır. ( $L \rightarrow P$ ) reaksiyonlarında laktat tarafından oluşturulan substrat inhibisyonu ( $P \rightarrow L$ ) reaksiyonunda pirüvat tarafından oluşturulan inhibisyonun daha azdır. Serumda LDH aktivite ölçümü ( $L \rightarrow P$ ) reaksiyonunda tetrazolyum tuzları (iyodonitrotetrazolyum gibi) kullanılarak da yapılabilmektedir. Substratı laktat olan reaksiyonda  $NAD^+$ 'nin indirgenmesi ile oluşan NADH tetrazolyum tuzu ile bir renk verir, oluşan rengin

kolorimetrik olarak ölçümü ile pirüvata dönüşen laktat miktarı saptanmış olur.

Substrat olarak pirüvat kullanıldığı reaksiyonla serum LDH aktivite ölçümünde pirüvat LDH aktivite ölçümünde pirüvat LDH varlığında laktata indirgenir. Bu reaksiyonun pH'ı 7.4 - 7.8 arasındadır ve bu pH'ı sağlamak için tris-EDTA, tris-HCl, fosfat tamponları kullanılır. Pirüvat-laktat dönüşümü NADH'ın kullanılması ve NAD<sup>+</sup>'ye oksidasyonu ile birlikte yürür. NADH'ın NAD<sup>+</sup>'ye oksidasyonu devam ettiği sürece 339 nm de ölçülen absorbans düzeyi azalmaktadır. Ayrıca, laktata indirgenmeden kalan pirüvat miktarınının bir renk reaktifi ile (2,4-dinitrofenil hidrazin gibi) saptanarak serum LDH tayini yapmak mümkündür. Pirüvat ve 2,4-dinitrofenil hidrazin reaktifinin reaksiyon ürünü renkli fenil hidrazon bileşiğidir. Bu renkli bileşiğin alkali ortamda kolorimetrik olarak ölçülmesi ile serum LDH aktivite tayini yapılmış olur.

Serum LDH normal değerleri kadınlarda 143-292 I.U/L, erkeklerde 160-304 I.U/L olarak belirtilmiştir (15). Serum LDH normal değerleri aktivite ölçümünde kullanılan reaksiyonlara göre farklılıklar gösterir. Normal değerler; 37°C de (P→L) reaksiyonuna göre 95-200 U/L, (L→P) reaksiyonuna göre ise 35-88 U/L dir (41).

I.4.2.2. Serum LDH aktivitesinin arttığı durumlar (41,42):

Akut miyokardenfarktüsü, bazı anemiler (megaloblastik, hemolitik, pernisyöz anemi gibi), lenfoma, viral hepatit

siroz, hipoksi, lösemi, böbrek hastalıkları (özellikle böbrek enfarktüsü gibi), progressif kas distrofileri, nöromusküler rahatsızlıklar, pulmoner emboli, in vivo veya in vitro hemoliz. Ayrıca anestezikler, dikumarol, etil alkol, narkotik analjezikler, sülfonamidler gibi ilaçların alınması ile serum LDH aktivitesi yüksek değerlere ulaşır.

Çalışmamızda serum LDH tayini pirüvatın substrat olarak kullanıldığı bir kit yöntemi ile yapılmıştır.

#### I.4.3. Total Kolesterol (13,38):

Kolesterol siklopentanofenantren yapısı taşıyan bir steroldür. Kimyasal yapısında 3.karbonda bir hidroksil grubu, 5. ve 6.karbonlar arasında bir çifte bağ ve 17.karbon atomuna bağlı bir yan zincir bulunmaktadır. Kolesterol kimyasal reaksiyonlara çifte bağ ve 3.karbondaki hidroksil grubu ile girmektedir.

Kolesterol hayvansal dokularda bulunan bir bileşiktir ve hücrelerde de novo biyosentez yoluyla, özellikle karaciğer, adrenal korteks, plasenta, ovaryum, testis ve barsaklarda sentezlenir. Vücudun kolesterol havuzu de novo biyosentezle oluşan ve diyetle alınan kolesterolden kaynaklanır. Kolesterol dokular ve kanda uzun zincirli yağ asitleriyle yaptığı esterler ile palmitat, stearat, oleat, linoleat şeklinde esterleşmiş halde bulunur. Serumdaki total kolesterolün % 70-75'i esterleşmiş, % 25-30'u serbest kolesterol halindedir. Eritrositlerdeki total kolesterol

seruma göre % 10-30 daha azdır ve serbest kolesterolün ester kolesterole oranı eritrositlerde 4:1 iken bu oran serum veya plazmada 1:3 civarındadır. Kolesterol türevlerinden bazıları serumda bulunur. Kolesterol yapısındaki çifte bağın hidrojenasyonu ile oluşan kolesterol ve kaprostanol'den sadece kolestenol serum içinde bulunur. Serumdaki kolesterol, total kolesterolün % 0.4-1.4'ü kadardır. Diğer bir kolesterol türevi olan 7-dehidrokolesterolün ise serumda 5-40 mg/100 ml düzeyinde bulunduğu belirtilmiştir.

Kolesterol serum içinde ester veya serbest olarak lipoproteinler tarafından taşınmaktadır. Düşük dansiteli lipoproteinler % 65, yüksek dansiteli lipoproteinler % 32, çok düşük dansiteli lipoproteinler ise % 17 kolesterol içerir. Barsak mukoza hücrelerinde meydana gelen şilomikronların % 5 kadar kolesterol içerdiği bildirilmiştir.

Kolesterol bütün hücre yüzeyleri ve intraselüler membranların yapıtaşdır, ayrıca safra asitleri, çeşitli steroid hormonlar ve D vitamininin öncül maddesidir.

Kolesterolün başlıca yıkımı, safra asitlerine oksidasyonu şeklinde olur ve kolesterol safra veya mukoza hücreleri aracılığı ile mide-barsak kanalına atılarak metabolize edilişi tamamlanır. Kolesterolün yıkım ürünleri safra asitleri olduğu için karaciğerde fosfolipid metabolizmasındaki kronik bir rahatsızlık kolesterolce zengin safra taşlarının oluşumuna neden olmaktadır.

I.4.3.1. Serum kolesterol tayin yöntemleri(4,31,41,48):

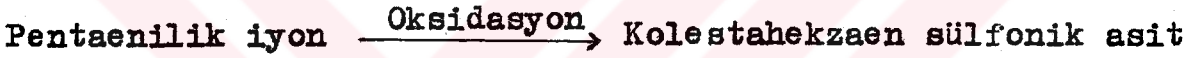
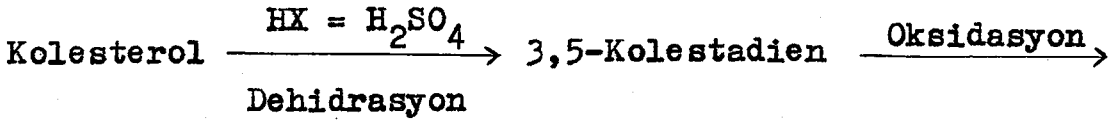
Kolesterol tayinleri için çeşitli yöntemler kullanılabilir. Bunlar gravimetrik, fotometrik, nefelometrik, kromatografik, turbidimetrik, fluorometrik ve kolorimetrik yöntemlerdir. Serum kolesterol tayini için genellikle kolorimetrik yöntemler tercih edilir ve kullanılır. Kolesterol tayin metotlarını genel olarak direkt ve indirekt metotlar şeklinde iki grup altında toplamak mümkündür.

Direkt kolesterol tayin yöntemleri:

Direkt kolesterol tayin yöntemlerinde serum veya plazmaya herhangi bir ekstraksiyon işlemi uygulanmaz ve kolesterol kimyasal veya enzimatik yollarla reaksiyona girer. Bütün kimyasal metotlarda kolesterol tipik bir alkol olarak konsantre asitlerle yükseltgenir ve renkli ürünler meydana getirir. Liebermann-Burchard (L-B), Salkowski, Zak ve Ferro-Ham metotlarında kolesterol yükseltgen ajanlarla tepkime vermektedir. Bu metotlar birbirlerinden çok küçük farklarla ayrılmaktadırlar. Liebermann-Burchard reaksiyonunda yükseltgen olarak konsantre sülfürik asit kullanılır, Zak metodunda ise bu amaçla demir tuzları kullanılmıştır.

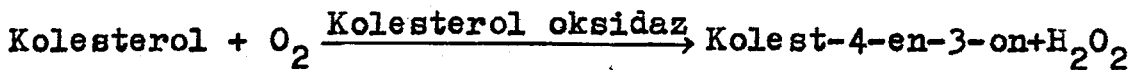
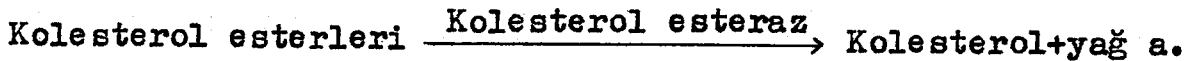
Kolesterol tayini için geliştirilen bütün metotlar büyük oranda (L-B) reaksiyonunun modifikasyonları olarak göze çarpar. Liebermann-Burchard reaksiyonunda (L-B) reaktif olarak bilinen asetikasit-asetikanhidrit-konsantre sülfürik asit karışımı kullanılır. Reaksiyon sırasında

asetik asit ve asetikanhidrit dehidre edici ajanlar ve solvent olarak, sülfürik asit ise yükseltgen olarak reaksiyona katılır. Kolesterol sülfürik asit tarafından yükseltgenince kolestapolienler ve kolestapolien karbonyum iyonları gibi renkli ürünler meydana gelir. Liebermann-Burchard reaksiyonu aşağıda gösterildiği şekilde özetlenebilir:



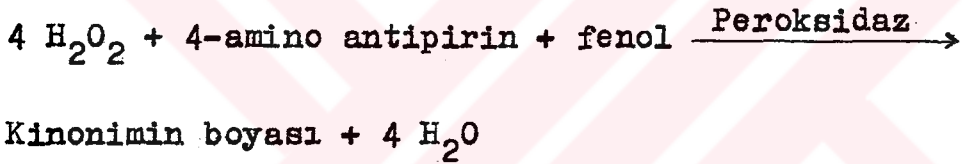
Liebermann-Burchard reaksiyonunda polienler temel renkli bileşiklerdir. Sülfürik asidin konsantrasyonuna bağlı olarak kolestapolien sülfonik asit oluşumu ile 410 nm de maksimum absorpsiyona sahip yeşil bir renk oluşturur.

Kimyasal metotların yanı sıra enzimatik olarak da direkt kolesterol tayini yapmak mümkündür. Enzimatik olarak kolesterol tayini klinik laboratuvarlarda kimyasal metotların yerini almaya başlamıştır. Kolesterolün enzimatik olarak tayini sırasında oluşan reaksiyonlar genel olarak aşağıdaki gibi gösterilebilir;





Kolesterol esterleri kolesterol esteraz enzimiyle kolesterol ve yağ asitlerine parçalanır. Açığa çıkan serbest kolesterol, oksijen ve Nocardia grubu bakterilerden izole edilen kolesterol oksidaz enzimiyle oksitlenerek kolest-4-en-3-on ve hidrojenperoksiti meydana getirir. Oluşan hidrojenperoksit bir piridin nükleotidi ile reaksiyona sokulduğunda 510 nm de absorbans gösteren bir kinonimin boyası meydana gelir. Enzimatik olarak direkt kolesterol tayininde son ürün olarak meydana gelen renkli kinonimin bileşiğinin oluşumu aşağıda gösterildiği gibidir;



#### İndirekt kolesterol tayin yöntemleri:

İndirekt kolesterol tayin yöntemlerinde serum veya plazmada bulunan ve kolesterol tayini sırasındaki kimyasal reaksiyonları etkileyebilecek bazı bileşikleri ortamdaki uzaklaştırmak amacıyla kolesterol, kısmen veya tam olarak ekstraksiyonla saflaştırılmaktadır. Kolesterolün kısmi saflaştırılması sırasında sıvı-sıvı veya sıvı-katı ekstraksiyonları uygulanır. Ekstraksiyon işlemlerinde kullanılan çözücüler petrol eteri, etanol-eter, aseton, etanol ve izopropanoldür. Bazı metotlarda ekstraksiyon aşamasından önce serumdaki kolesterol esterleri potasyum hidroksit ile saponifikasyona tabi tutulur. Kolesterolün tam olarak saflaştır-

masında serum içindeki lipoproteinler tamamen ortandan uzaklaştırılmış olur. Kolesterolün tam olarak saflaştırılması saponifikasyon ve ekstraksiyon aşamalarından sonra çeşitli çöktürücü ajanlar vasıtasıyla çöktürülerek yapılmaktadır. Kolesterol esterleri veya kolesterol ya da her ikisi birden kısmi bir saflaştırma sonrasında organik bir çözücü içinde gaz, kağıt, ince tabaka ve sıvı kolon kromatografisi gibi bazı kromatografik tekniklerle ayrılabilir.

İndirekt kolesterol tayin yöntemlerinde saflaştırma sonrasında L-B reaksiyonunun ilkeleri geçerlidir. Parekh ve Jung metodu L-B reaksiyonunun modifiye edilmiş şeklidir ve serum kolesterol tayininde serum içindeki proteinler uranilasetatla çöktürülerek kolesterol saflaştırılmaktadır. Diğer bir indirekt metot olan Abell metodunda ise, serum kolesterolü serumdan petrol eteri ekstraksiyonuyla ayrılmaktadır ve bu metotta (L-B) reaksiyonunun bir modifikasyonu sayılır.

Direkt kolesterol tayin metotlarında turbidite, lipemik, ikterik ve hemolizli serumlar ile çalışıldığında büyük ölçüde olumsuz etkileşimler meydana gelmektedir. (L-B) ve Zak metotları ve modifikasyonlarında bilirubin, reaksiyon ortamında oksitlenerek biliverdini oluşturur, biliverdin kolesterole benzer bir absorbanans gösterdiği için pozitif yönde bir hataya neden olur. Ayrıca, Zak metodu gibi demirin yükseltgen olarak kullanıldığı metotlarda klorpromazin, salisilat, A vitamini, aminopirin, tiyürasil gibi

bileşikler reaksiyonları negatif yönde hatalı olarak etkilemektedirler.

İndirekt kolesterol tayin metotlarında yukarıda belirtilen olumsuz etkileşimler çok az görülür ya da hiç görülmez.

Serum total kolesterol miktarının normal değerleri yetişkinler için 150-270 mg/dl dir (3).

#### I.4.3.2. Serum total kolesterolün arttığı durumlar (3,42):

Hiperlipoproteinemiler, hepatoselüler hastalıklar, böbrek rahatsızlıkları (glomerülonefrit, nefrotik sendrom gibi), gut, hipotiroidizm, diabetes mellitus, alkolizm, esansiyel hipertansiyon, iskemik kalp hastalıkları, hamilelik, pankreas ve prostat karsinomları, glikojen depo hastalığı, karaciğer içi ve dışı safra stazı, enfeksiyon hastalıkları, tüberküloz, ovulasyon, oral kontraseptif kullanımı ve stres serum total kolesterol değerini artıran faktörlerdir. Ayrıca, kortikosteroidler, androjenler, epinefrin ve meprobamat gibi ilaçların alınması ile serum total kolesterol değeri artabilir.

#### I.4.3.3. Serum total kolesterolünün azaldığı durumlar (42):

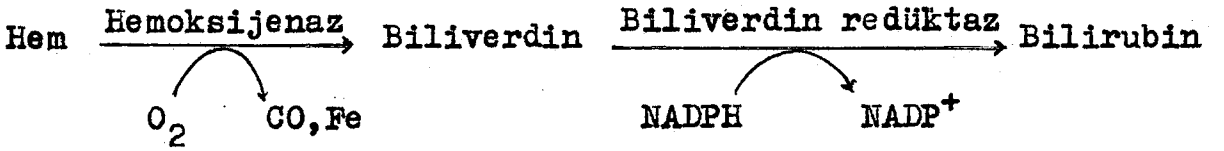
Karaciğer karsinomu, hepatoselüler nekroz, Tangier hastalığı, hipertiroidi, hemofili ve bazı anemiler, absorpsiyon ve beslenme bozuklukları, romatoid artrit, geniş yanıklar, bazı antibiyotikler (neomisin, klortetrasiklin gibi),

azotiyopirin ve kolşisin gibi ilaçların alınması serum total kolesterol değerini azaltabilir.

Çalışmamızda serum total kolesterol miktar tayini için esasını Liebermann-Burchard reaksiyonunun teşkil ettiği kit yöntemi kullanılmıştır.

#### I.4.4. Total Bilirubin (31,38,41):

Bilirubin, hemoglobin ve içeriğinde hem taşıyan miyoglobin, katalaz, peroksidaz, sitokromlar gibi diğer proteinlerin "hem" kısımlarının retiküloendoteliyal hücrelerdeki yıkım ürünüdür. Bilirubinin yaklaşık % 80'ni hemoglobin yıkımından kaynaklanmaktadır ve başta karaciğer Kupffer hücreleri olmak üzere dalak, kemik iliği, lenf nodülleri gibi retiküloendoteliyal hücreler içinde bilirubin oluşmaktadır. Retiküloendoteliyal hücreler içinde ortaya çıkan hem molekülleri hemoksijenaz enzimleri ile biliverdine dönüştürülür. Daha sonra biliverdin, biliverdin redüktaz enzimi ile indirgenerek bilirubin meydana gelmektedir.



Bilirubin, fizyolojik pH'ya yakın değerlerdeki sulu çözeltilerde zayıf bir çözünürlüğe sahip karakteristik kavuniçi renkte bir bileşiktir. Bilirubin, plazma içinde albümine bağlanarak taşınır ve bir molekül albümin iki molekül

bilirubin bağlama kapasitesine sahiptir. Albümine bağlanabilen bilirubin serbest formdadır ve dekonjuge bilirubin olarak da adlandırılır. Dekonjuge bilirubin karaciğer hücreleri içinde  $\beta$ -karboksietil yan zincirlerinden glukroniltransferaz enzimi yardımıyla glukuronik asit ile konjuge olur. Konjuge bilirubin dekonjuge şekline oranla suda çok daha fazla çözünebilme özelliğine sahiptir.

Bilirubin metabolizması sonucunda konjuge bilirubin safra içinde, safra kanalı yolu ile barsaklara geçer ve barsak flora bakterileri tarafından tekrar dekonjuge şekline dönüştürüldükten sonra ürobilinojene indirgenir. En son aşamada ise ürobilinojen oksidasyona uğrayarak ürobilin'i oluşturur. Dekonjuge bilirubin ve ürobilinojenin bir kısmı mide-barsak kanalı tarafından reabsorbe edilerek enterohepatik dolaşıma girer ve karaciğere ulaştıktan sonra yeniden safra içine salınır.

Bilirubin son derece ışığa duyarlı bir bileşiktir ve bu nedenle serum örneklerinin bir saat gün ışığına maruz bırakılması sonucunda serum total bilirubin konsantrasyonunun % 30-50 oranında azalma gösterdiği bildirilmiştir. Serum örneklerinin karanlıkta ve 4-(-20)°C de saklandığı sürece bilirubinin iki hafta kadar stabil kaldığı saptanmıştır.

#### I.4.4.1. Serum bilirubin tayin yöntemleri (10,15,28,31,38):

Serum bilirubin tayinleri genel olarak direkt spektral metotlar, diazoreaksiyonunu içeren metotlar ve diğer bazı

metotlar kullanılarak yapılmaktadır.

**Direkt spektral metotlar:**

Bilirubinun doğal sarı-kavuniçi rengi, tayini için yardımcı bir ögedir. 1919 Yılında uygulamaya konan ikterus indeksi bu ögeye dayanılarak geliştirilmiştir. İkterus indeksi testinde tuz çözeltisi ile seyreltilmiş serumun rengi gözle bakıldığında % 0.01'lik potasyum dikromat çözeltisinin rengine uyması beklenir. Serumun bu amaçla kaç kez seyreltilmiş olması gerektiği ise ikterus indeksi olarak adlandırılır. Karotenoid pigmentleri ikterus indeksini hatalı şekilde yükseltebilir. Bu test ikterin ciddiyetini saptamak amacıyla özellikle üriner safra pigmentlerinin ölçümü ile bir arada kullanılır. İkterus indeksi tam anlamıyla yeterli bir test olmadığı için kullanımı pek yaygın değildir.

Bilirubinun direkt spektrofotometrik tayininde belirli bir tampon içinde yeterince seyreltilmesi esastır ve böylece absorpsiyonu saptanır. Bilirubin konsantrasyonunun hesabı için ise, bilirubinun bilinen ekstinksiyon katsayısı kullanılır. Direkt spektrofotometrik tayinlerde hataya neden olan faktörler vardır. Bu faktörler turbidite, hemoliz ve sarı lipokrom pigmentleridir. Turbidite ve hemolizin olumsuz etkisini çeşitli yollarla önlemek mümkün iken sarı lipokromlardan ileri gelen hatayı önlemek çok güçtür. Bu nedenle direkt spektrofotometrik metotlar sadece serumlarında lipokrom içermeyen yeni doğan çocuklar için kullanışlı bulunmaktadır.

Diazo reaksiyonu içeren metotlar:

Konjuge bilirubin diazo sülfanilik asitle diazo reaksiyonu vererek kırmızı bir renk oluşturur. Fakat dekonjuge bilirubin diazo reaksiyonuna katılmaz ve bu durumda bir katalizör ilavesine gerek duyulur. Serum bilirubin tayin metotlarında proteine bağlı dekonjuge bilirubinin diazo reaksiyonuna katılımını sağlamak amacıyla proteinlerin etkisiz hale getirilmesi için yapılan işlemlerde bazı farklılıklar bulunur. Van den Bergh metodunda serum bilirubini alkol ve diazo reaktifi (sülfanilik asit ve nitröz asit) ile renk oluşturur. Bu metotta proteinlerden kaynaklanan turbiditeyi ortadan kaldırmak için doymuş amonyum sülfat çözeltisi kullanılarak proteinler çöktürülür. Bazen çöken proteinlerin üzerine istenmediği halde adsorbe olan bilirubinin diazo reaktifi ile reaksiyona girmesi güçleşir. Bilirubinin diazo reaksiyonunda oluşturduğu son ürün azobilirubindir.

Azobilirubin bir indikatör gibi davranır ve pH 0.8' den aşağı pH larda asit azomavisi oluşur. Asit azomavisi, nötral pembe azo pigmentinden daha yüksek bir molar ekstinksiyon katsayısına sahiptir.

Malloy-Evelyn metodunda serum proteinleri denatüre edilerek etkisiz hale getirilmektedir. Serum proteinlerini denatüre ederek bilirubin tayini yapılan metotların çoğu Malloy-Evelyn metodunun modifikasyonları olarak göze çarpar. Malloy-Evelyn metodunda proteinler metanol ile dena-

türe edilir. Bu metodun White-Duncan, Ducci-Watson ve Weber-Schalm tarafından modifiye edilmiş şekilleri de mevcuttur. Serum bilirubin tayin yöntemlerinde proteinleri uzaklaştırmak için uygulanan çöktürme ve denatürasyon işlemleri yanısıra protein-bilirubin arasındaki bağlar da bazı ajanlar kullanılarak kopartılır ve bilirubinin diazo reaksiyonuna girmesi sağlanır. Bu amaçla ilk kez kafein-sodyum benzoat kullanılmıştır. Daha sonraları sodyum hidroksit, asetamid, sofrasit ve tuzları, sitrik asit, alkol, dikloroanilin, anilin, brij, salisilat, üre gibi maddeler kullanılmıştır. Jendrassik-Grof metodunda seruma diazo reaktifinden önce kafein-sodyum benzoat ve sodyum asetat ilave edilerek proteine bağlı olan bilirubin (dekonjuge bilirubin) aktif hale getirilerek diazo reaksiyonu gerçekleştirilir.

Belirtilen bu metodların yanısıra serum bilirubin tayinlerinde fluorometrik, fotometrik ve kromatografik yöntemler de kullanılmaktadır. Diazo reaksiyonlarında kullanılan diazo reaktifine alternatif olarak 2,4-dikloroanilin ve 2-amino-5-nitrobenzen gibi renk reaktiflerinin kullanıldığı metodlar da serum bilirubin tayin metodları arasındaki yerini almaktadır.

Serum total bilirubin (dekonjuge + konjuge) normal değerleri 0.3 - 1.3 mg/dl dir. Bunun 0.1 - 0.4 mg/dl kadarını dekonjuge bilirubin, 0.2 - 0.8 mg/dl kadarını ise konjuge bilirubin oluşturur (3). Aslında, serumda bilirubin



bileşenleri adı altında toplanan bir grup bileşikten söz etmek mümkündür. Bu grubun % 45 - 95'ini total sarı bilirubin pigmenti, % 8'ni karoten, % 3'nü ksantofil esterleri ve % 15'ni miyoglobinden kaynaklanan bilifuskin ve mezobilifuskin oluşturur. Bu pigmentlerin oranı diete bağlı olarak büyük ölçüde değişiklik gösterir (38).

#### I.4.4.2. Serum total bilirubinin arttığı durumlar(31):

Dekonjuge bilirubinin fonksiyonel bir yetersizliğe bağlı olarak konjuge bilirubin şekline dönüşememesi sonucunda biriken dekonjuge bilirubin ciltle sarı veya sarımsı-yeşil bir renk oluşturur. İkter olarak adlandırılan bu hiperbilirubinemi durumlarında bilirubin konsantrasyonu 4 mg/dl'yi aşmaktadır. Hemolitik hastalıklarda aşırı hem yıkımına bağlı olarak gelişen hiperbilirubinemiler meydana gelir. Hemolitik, obstrüktif, hepatoselüler ve konjenital ikterlerde (Gilbert sendromu, Crigler-Najar, Dubin-Johnson sendromları gibi) serum total bilirubin düzeyleri aşırı derecede yüksektir. Bilirubinin konjuge şekli kolebilirubin olarak da bilinir ve karaciğer hastalıkları ile kolebilirubin artar. Dekonjuge bilirubin hemobilirubin olarak da adlandırılır ve eritrositler ile ilgili hastalıklarda büyük ölçüde artar. Ayrıca total serum bilirubin konsantrasyonu siroz, karaciğer harabiyetlerinde (iltihabi, toksik, neoplazik), intra ve ekstra hepatik safra yolları tıkanıklığı, infeksiyöz mononükleozis, hemokromatöz, Wilson hastalığı,

viral hepatit, alkolik karaciğer hastalıklarında artar.

Çalışmamızda serum total bilirubin miktar tayini için Malloy-Evelyn metodu kullanılmıştır.

## B Ö L Ü M II

### G E R E Ç ve Y Ö N T E M

#### II.1. Kullanılan Maddeler:

Çalışmalarda distile su ve amaca uygun saflıkta kimyasal maddeler kullanıldı.

Total asit fosfataz ve kolesterol kitleri "Gökhan Laboratuvar, San.ve Tic. A.Ş.", LDH kiti "Sclavo Diagnostics, Siena, Italy", kristal bilirubin "Merck" ve hemoglobin (Human Hemoglobin) "Sigma Chemical Company, Saint Louis, Missouri, U.S.A" dan sağlanmıştır.

#### II.2. Kullanılan Aletler:

Deneylerde spektrofotometreler (Coleman 295 ve Spectronic 100), santrifüj (Nüvefuj), karıştırıcı (Nüvemix), su banyosu (Kottermann), hassas terazi (Sartorius), etüv (Heraeus), kapiller pipet (Sahli pipeti), otomatik pipetler (Brand Transperfette), filtre kağıdı (Whatman No.I paper) kullanılmıştır.

### II.3. Çalışma materyali olan serumun sağlanması:

Çalışma materyali, farklı hacimlerde hemolizat (hemoliz edilerek hazırlanan eritrosit çözeltisi) katılmış serum örnekleridir. Serumlar, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarlarına rutin analizler için gelen serumlardan ihtiyaç fazlası olanlar tesbit edilerek ve gözle görülebilen bir hemolizi olmama koşulu ile toplanmıştır.

"Serum örneği" 10 ml'dir ve altı ayrı serumun karıştırılması ile oluşturulmuştur (pooled serum)(16). Fakat total asit fosfataz aktivite tayininde serumun kısa sürede bekletilmeden kullanılması gerektiğinden farklı bir yol izlenmiş ve üç sağlıklı kişiden elde edilen serumlar karıştırılarak serum örneği oluşturulmuş ve deneyler bu örnekte yapılmıştır (38). Serum örnekleri analiz edilecek bileşenlerin stabil kalma koşulları gözönünde tutularak deney gününe kadar derin dondurucuda saklanmıştır.

### II.4. Serum örneklerine hemolizat katılması:

In vitro hemolizin deney sonuçlarına etkisinin incelendiği bu çalışmada, sağlanmış şekli yukarıda anlatılmış olan serumlara, eritrositleri patlatarak elde edilen hemolizattan belirli Hb konsantrasyonlarını verecek şekilde katılarak hemolizli serum örnekleri hazırlanmıştır.

#### II.4.1. Hemolizat (hemolize edilmiş eritrosit)

hazırlanması:

Disodyum etilendiamin tetra asetik asit ( $\text{Na}_2\text{EDTA}$ ) içeren bir tüpe sağlıklı bir kişiden 6 ml venöz kan alınır (16). Daha sonra 5000 g de, 5 dakika santrifüjlenerek kanın plazma kısmı uzaklaştırılır. Böylece paketlenmiş eritrositler elde edilir. Bu eritrositler 8 ml serum fizyolojikle üç kez yıkanır ve her yıkama işleminden sonra 3 dk. santrifüjlenerek eritrositler yıkama çözeltilisinden uzaklaştırılır (22). Son yıkama ve santrifüjlemeden sonra yıkanmış eritrosit paketi üzerine eşit hacminde distile su ilave edilerek eritrositlerin patlaması ve hemoliz olmaları sağlanır (16). Hazırlanan bu hemolizat hemen kullanılmadığı takdirde  $-18^{\circ}\text{C}$ ' de en fazla iki hafta saklanabilir (38).

#### II.4.2. Hemolizli serum örneklerinin hazırlanması:

Serum örnekleri deney gününde filtre kağıdından (Whatman No.1) süzülmüştür (16). Yukarıda hazırlanışı anlatılan hemolizattan serum örneklerine teorik olarak yapılan hesaplardan hareketle belirli hacimler katılarak ön deneyler yapılmış ve gözle farkedilemeyecek kadar az hemolizli iki, gözle farkedilebilecek kadar hemolizli üç farklı örnek hazırlamak üzere 10 ml "serum örneği"ne eklenmesi gereken hemolizat hacimlerinin sırasıyla 0.005, 0.0075, 0.01, 0.03, 0.05 ml olduğu belirlenmiştir. Belirtilen bu miktarlarda hemolizat katılan 10 ml'lik altı serum örneğinin (pooled

serum) içerdığı Hb miktarları Benzidin metodu ile deneysel olarak ölçülmüştür. Deney sonuçları bu Hb miktarları esas alınarak değerlendirilmiştir. Farklı miktarlarda hemolizat katılarak hazırlanan bu serum örnekleri deneyimli klinik biyokimya teknisyenlerine gösterilerek örneklerdeki hemoliz şiddetini 0, 1+, 2+, 3+, 4+ vb. şekilde değerlendirmeleri istenmiş ve böylece hemolizin kalitatif olarak da değerlendirilmesi sağlanmıştır.

## II.5. Yöntemler

### II.5.1. Hb miktar tayini yöntemi:

Hb miktar tayinleri Benzidin yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntemin ilkesi; Hb'nin psödo-peroksidaz özelliğe sahip bir bileşik olarak, peroksidaz ve indirgen bir bileşikarasındaki redoks reaksiyonunu katalizleyebilmesine dayanır. Benzidin löko boyaları sınıfına giren ve kromojen olarak tanımlanan indirgen bir bileşiktir, Hb ile hemokromojen reaksiyonuna girerek, kahverengi-yeşil bir renk oluşturur. Bu rengin şiddeti Hb konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (1,11).

#### II.5.1.1. Hb miktar tayininde kullanılan çözeltiler

(11):

A) Benzidin reaktifi (% 1): 0.5 g benzidin baz 45 ml glasiyel asetik asit içinde çözülür ve damıtık su ile 50 ml ye tamamlanır. Bu çözelti 15 günde bir yenilenmeli ve buzdolabında korunmalıdır.

B) Hidrojen peroksit çözeltisi (% 1): 0.5 ml % 30 luk hidrojen peroksit çözeltisi damıtık su ile 15 ml'ye tamamlanır. Bu çözeltinin çalışma öncesinde taze olarak hazırlanması ve renkli şişede saklanması gereklidir.

C) Seyreltici glasiyel asetik asit çözeltisi (% 10): 10 ml % 99(luk glasiyel asetik asit çözeltisi damıtık su ile 100 ml'ye tamamlanır.

D) Standart Hb çözeltisi: % 120 mg Hb içerir. 12 mg Hb serum fizyolojik içinde çözülerek hazırlanır. Bu stok çözelti serum fizyolojik ile gereken oranlarda seyreltilerek % 100, % 80, % 50, % 30, % 15, % 8 mg Hb içeren standart Hb çözeltileri elde edilir.

#### II.5.1.2. Hb standart eğrisinin çizimi:

Çözeltiler kısmında belirtilen % 120, % 100, % 80, % 50, % 30, % 15, % 8, % 3 mg Hb içeren standart çözeltilerine aşağıda anlatılan Benzidin metodu uygulanarak Hb tayinleri yapılmış ve standart eğri çizilmiştir.

#### II.5.1.3. Deneyin yapılışı:

	<u>Örnek</u>	<u>Kör</u>	<u>Standart</u>
Benzidin reaktifi (% 1)(ml)	1	1	1
Serum (ml)	0.02	-	-
Standart (ml)	-	-	0.02
Hidrojen peroksit çöz.(% 1)(ml)	1	1	1
Damıtık su (ml)	-	0.02	-

Yukarıda belirtildiği şekilde çözeltiler sırasıyla tüplere pipetlendikten sonra, karıştırılır ve renk oluşumu tamamlanıncaya kadar oda sıcaklığında 20 dk bekletilir. Bu sürenin sonunda her tüpe 10'ar ml % 10'luk dilüent glasiyel asetik asit çözeltisi ilave edilir ve alt-üst edilerek karıştırılır. 10 dk'lık bir bekletme süresinden sonra kör, standart ve örneklerin absorbanları spektrofotometrede 515 nm de okunur.

Hb konsantrasyonları, önceden hazırlanan bir standart eğriden hesaplanmakla birlikte, her deneye bilinen konsantrasyonlarda standartların sokulması ile standart eğriden sapmalar kontrol edilmiştir.

#### II.5.2. Serum total asit fosfataz aktivitesinin ölçülmesi:

##### II.5.2.1. Total asit fosfataz aktivite tayin yöntemi:

Bu yöntem ile serum total asit fosfataz tayini, p-nitrofenil fosfat substratının asit fosfatazlar tarafından belirli pH ve sıcaklıkta fosfat ve p-nitrofenol'e parçalanmasına dayanır. Ortama sodyum hidroksit çözeltisinin ilave edilmesi ile enzim aktivitesi durdurulur ve açığa çıkan p-nitrofenol, alkali ortamda sarı bir renk meydana getirir. Belirli bir zaman içinde açığa çıkan p-nitrofenol miktarı, asit fosfataz aktivitesi ile doğru orantılıdır (31).



II.5.2.2. Total asit fosfataz aktivite tayininde kullanılan çözeltiler:

Total asit fosfataz aktivite tayininde total asit fosfataz kiti kullanılmıştır. Önerildiği şekilde tarafımızdan B ve D çözeltileri hazırlandı.

A) Asit tampon çözeltisi

B) Asit tampon substrat çözeltisi (pH 4.8): Asit tampon substrat etiketli şişenin içindeki toz halindeki madde 10 ml damıtık suda iyice eritilir ve üzerine 10 ml asit tampon çözeltisi ilave edilerek karıştırılır. Bu karışım +4°C de en az bir hafta dayanıklıdır.

C) Sodyum hidroksit çözeltisi (1 N)

D) Sodyum hidroksit çözeltisi (0.02 N): 1 N sodyum hidroksit çözeltisinden 2 ml alınır ve damıtık su ile 100 ml'ye tamamlanır.

II.5.2.3. Deneyin yapılışı:

Serunda total asit fosfataz aktivite tayini kit yöntemine uyularak, önerildiği şekilde yapılmıştır. Deney ve kör tüplerine 1'er ml asit tampon substrat çözeltisi pipetlenir ve 37°C'lik su banyosunda 5 dk bekletilir. Daha sonra deney tüpüne 0.2 ml serum eklenerek her iki tüp 37°C'lik su banyosunda 30 dk bekletilir. Bu sürenin sonunda deney ve kör tüplerine 10'ar ml 0.02 N sodyum hidroksit çözeltisi eklendikten sonra kör tüpüne 0.2 ml serum ilave edilir.

Tüpler ters-yüz edilerek karıştırılır ve örneğin absorban-  
sı köre karşı 405 nm de okunur.

#### II.5.2.4. Serum total asit fosfataz aktivite hesabı:

Deneylerde paralel iki örnekle çalışılmış, çift ça-  
lışmanın ortalaması hesaplanarak ve örnek absorbans değər-  
leri aşağıdaki formüle yerleştirilerek total asit fosfataz  
aktivitesi (mu/ml) olarak hesaplanmıştır.

Serum total asit fosfataz aktivitesi (mu/ml) = Örnek  
absorbansı x 101

#### II.5.3. Serum laktat dehidrogenaz aktivite ölçümü:

##### II.5.3.1. Serum laktat dehidrogenaz aktivite tayin yöntemi:

Serumda LDH aktivite tayini LDH kiti kullanılarak,  
önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu yöntemde pirüvat, LDH  
tarafından NADH varlığında laktata dönüştürülür. Pirüvatın  
değişmeden kalan miktarı 2,4-dinitrofenil hidrazin ile reak-  
siyona girer ve sarı renkli fenil hidrazon bileşiği oluşur,  
bu bileşiğin renk şiddeti alkali ortamda kolorimetrik ola-  
rak saptanır (41).

##### II.5.3.2. LDH aktivite tayininde kullanılan çözeltiler:

LDH aktivite tayininde LDH kiti (Sclavo) kullanıldı  
ve tarafımızdan sadece A ve D çözeltisi önerildiği şekilde  
hazırlandı.

A) NADH çözeltisi: Kit içindeki şişede bulunan 100 mg/dl NADH üzerine substrat çözeltisinden 2 ml katılarak hazırlanmıştır. Bu çözelti 22°C'yi aşmayan oda sıcaklığında en az 12 saat stabildir.

B) Substrat çözeltisi: 0.1 M fosfat tamponu ve 0.836 M sodyum pirüvat içerir.

C) Renk reaktifi: 1 mM 2,4-dinitrofenil hidrazin ve 1 mM hidroklorik asit içerir.

D) Sodyum hidroksit çözeltisi (% 1.6): % 32'lik sodyum hidroksit çözeltisinden damıtık su ile 1:20 oranında seyreltilerek hazırlanır.

#### II.5.3.3. LDH standart eğrisinin çizimi:

<u>Tüp no.</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
Substrat çözeltisi (ml)	0.9	0.7	0.5	0.3	0.2	0.1
Damıtık su (ml)	0.1	0.3	0.5	0.7	0.8	0.9
Renk reaktifi (ml)	1	1	1	1	1	1

Yukarıda belirtilen miktarlardaki çözeltiler tüplere sırasıyla pipetlenip, karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 20 dk. bekletilirler. Bu süre sonunda bütün tüplere 10'ar ml % 1.6'lık sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilir ve iyice karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dk daha bekletilir. Bütün tüplerin absorbansı spektrofotometrede damıtık suya karşı 520 nm de okunur.

LDH standart eğrisi, elde edilen absorbanslar ve aşağıda gösterildiği gibi kitte belirtilen LDH aktivite değerleri yardımıyla çizilmiştir.

<u>Tüp no.</u>	<u>1</u>	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>4</u>	<u>5</u>	<u>6</u>
LDH(I.U)	0	111.4	223.1	334.9	390.6	446.3

#### II.5.3.4. Deneyin yapılışı:

Serum örneği serum fizyolojik ile 1:5 oranında seyreltilir. Örnek tüpüne 0.9 ml substrat-NADH çözeltisi pipetlenir ve su banyosunda 37°C de 3 dk inkübasyona bırakılır. Daha sonra 0.1 ml seyreltilmiş serum ilave edilerek, karıştırılır ve su banyosunda 30 dk inkübe edilir. Inkübasyon sonunda 1 ml renk reaktifi ilave edilerek, karıştırılır ve oda sıcaklığında 20 dk bekletilir. Bu süre sonunda 10 ml % 1.6'lık sodyum hidroksit çözeltisi ilave edilip, karıştırılır ve oda sıcaklığında 10 dk daha bekletildikten sonra absorbansı 520 nm de damıtık suya karşı okunur. Sonuçlar LDH standart eğrisinde değerlendirilir ve LDH aktivitesi (I.U) olarak hesaplanır.

#### II.5.4. Serum total kolesterol miktar tayini:

##### II.5.4.1. Serum total kolesterol miktar tayin yöntemi:

Serumda total kolesterol miktar tayini kolesterol kiti kullanılarak, önerilen yöntemle göre yapılmıştır. Bu

yöntemde kolesterol oda sıcaklığında asetik asit anhidr ve sülfürik asit ile yükseltgenerek yeşil bir renk oluşturur (48). Kolesterol ve serum proteinleri arasında çoğu zaman deneyleri bozan etkileşimler vardır, fakat bu yöntemde 2,5-dimetil benzen sülfonik asit yer aldığı için proteini uzaklaştırma (deproteinizasyon) işlemlerine gerek duyulmaz.

II.5.4.2. Serum total kolesterol miktar tayininde kullanılan çözeltiler:

A) Kolesterol renk reaktifi

B) Kolesterol standart çözeltisi: % 200 mg kolesterol içerir.

C) Sülfürik asit (% 95-97) pr.anal.

II.5.4.3. Deneyin yapılışı:

	<u>Örnek</u>	<u>Standart</u>	<u>Kör</u>
Serum (ml)	0.1	-	-
Standart kolesterol çöz.(ml)	-	0.1	-
Damıtık su (ml)	-	-	0.1
Renk reaktifi (ml)	2.5	2.5	2.5

Yukarıda belirtilen miktarlardaki çözeltiler tüplere sırasıyla pipetlenerek karıştırılır ve 25°C'lık su banyosunda 5 dk bekletilir. Bu süre sonunda tüplere 0.5'er ml

sülfürik asit eklenir, hemen karıştırılarak aynı sıcaklıkta 10 dk bekletildikten sonra standart ve örneğin absorbanları köre karşı 560 nm de okunur.

#### II.5.4.4. Serum total kolesterol miktarının hesaplanması:

Serum total kolesterol miktarı, elde edilen standart ve örnek absorbanlarının aşağıdaki formüle yerleştirilmesiyle hesaplanır.

$$\text{Serum total kolesterol miktarı (\%mg)} = \frac{\text{Örneğin absorbansı}}{\text{Standartın absorbansı}} \times \text{Standartın konsantrasyonu}$$

#### II.5.5. Serum total bilirubin miktar tayini:

##### II.5.5.1. Serum total bilirubin miktar tayin yöntemi (3):

Serum total bilirubin miktar tayininde kullanılan yöntemin ilkesi, bilirubinün sülfonik asit ile diazo reaksiyonuna girmesi ve reaksiyon sonunda asit ortamda kırmızımenekşe renkli azobilirubin bileşimini oluşturmasına dayanır. Azobilirubinün renk şiddeti serum total bilirubin miktarı ile doğru orantılıdır.

##### II.5.5.2. Serum total bilirubin miktar tayininde kullanılan çözeltiler (3):

A) Bilirubin stok standart çözeltisi: 4 mg kristalize

bilirubin 10 ml kloroform içinde çözülerek hazırlanır.

B) Bilirubin çalışma standart çözeltisi: % 4 mg bilirubin taşıyacak şekilde stok standartın 0.1 ml'si etanol ile 10 ml'ye tamamlanarak hazırlanır.

C) Diazo I çözeltisi: 0.5 g sülfanilik asit ve 15 ml konsantre hidroklorik asit damıtık su ile 1 L'ye tamamlanır.

D) Diazo II çözeltisi: 0.5 g sodyum nitrit damıtık su ile 100 ml'ye tamamlanır.

E) Diazo I ve II karışımı: 10 ml Diazo I ve 0.25 ml Diazo II içerir. Bu karışım kullanılmadan 30 dk önce hazırlanır.

F) Metanol (% 99)

#### II.5.5.3. Total bilirubin standart eğrisinin çizilmesi:

0.4 mg Bilirubin 10 ml kloroform ile çözündürülerek hazırlanan % 4 mg'lık stok standartından gerekli seyreltmeler yapılarak 0.4, 0.6, 0.8, 1 mg bilirubin içeren standartlar elde edilir. Deneyin yapılışı kısmında açıklandığı şekilde standart absorbanları okunup, standart eğri çizilir.

#### II.5.5.4. Deneyin yapılışı (3):

0.5 ml Serum örneği (veya standart) 4.5 ml serum fizyolojik ile 1:9 oranında seyreltildikten sonra deneye sokulur.

	<u>Tüp A(örnek)</u>	<u>Tüp B</u>
Seyreltik serum (ml)	4	4
Diazo karışımı (ml)	1	-
Metanol (ml)	5	5
Hidroklorik asit(% 1.5)(ml)	-	1

Yukarıda belirtildiği şekilde çözeltiler tüplere sırasıyla pipetlenir, karıştırılır ve 30 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra A (örnek) tüpünün absorbansı B tüpüne karşı 540 nm de okunur.

#### II.5.5.5. Serum total bilirubin miktarının hesaplanması:

Deneylerde iki paralel örnekle çalışılmış ve absorbans değerlerinin ortalaması alınmıştır. Çizilen standart bilirubin eğrisinden total bilirubin miktarı % mg olarak hesaplanır.

#### II.6. Sonuçların istatistik değerlendirmesi:

Kontrol ve hemolizli örneklerde alınan bütün deney sonuçlarının istatistik analiz hesapları temel istatistik yöntemlerine göre E.Ü.Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği bölümü mikro-bilgisayarlarında yapılmıştır.



## B Ö L Ü M III

### B U L G U L A R

III.1. Hb tayinleri ve hemolize ait bulgular:

III.1.1. Hb standart eğrisi:

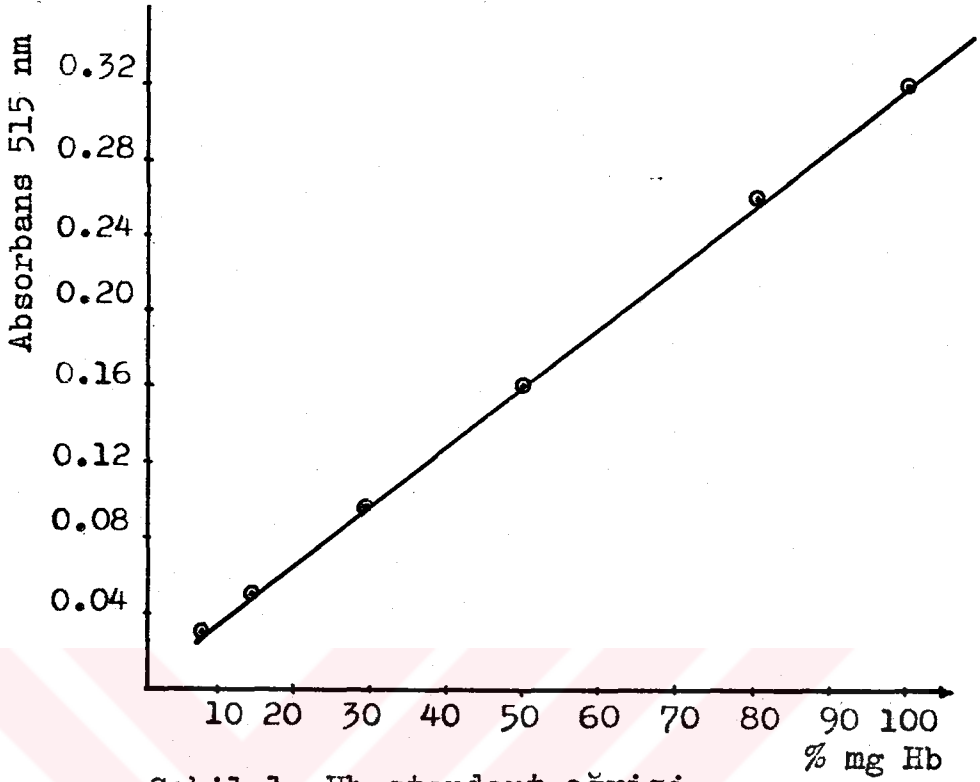
Benzidin yöntemi ile Hb standart eğrisinin çiziminde kullanılan standartların konsantrasyonları ve bu konsantrasyonlara ait absorban değerleri standart hataları ile birlikte Tablo 1'de, çizilen standart eğri ise Şekil 1'de sunulmuştur.

Hb konsantrasyonu(%mg)	Absorbans Ortalama $\bar{x}$ s.h	(n)
100	0.324 $\bar{x}$ 0.009	(6)
80	0.264 $\bar{x}$ 0.009	(6)
50	0.165 $\bar{x}$ 0.009	(6)
30	0.090 $\bar{x}$ 0.004	(6)
15	0.050 $\bar{x}$ 0.003	(6)
8	0.028 $\bar{x}$ 0.003	(6)

Tablo 1. Hb standart eğri çizimi için bilinen Hb konsantrasyonlarına karşı okunan absorbanlar.

$\bar{x}$  s.h.: Standart hata

(n) : Her konsantrasyon için yapılan ölçüm sayısı



Şekil 1. Hb standart eğrisi

### III.1.2. Hemolizat katılmış serum örneklerinde Hb tayini:

Bölüm II.4.'de belirtildiği şekilde bu çalışmada beş farklı hemolizat hacmi katılan serum örneklerinin içeriğindeki Hb konsantrasyonları saptanmıştır ve bu konsantrasyonlara karşılık gelen ortalama absorbanlar standart hataları ile birlikte Tablo 2.'de gösterilmiştir. Hemolizsiz olması beklenen kontrol serum örneklerinin de düşük düzeylerde de olsa Hb içerdiği saptanmıştır. Bu nedenle, kontrol serum örneklerinde ölçülen (n=6) ortalama Hb miktarı 1-5 numaralı serum örneklerine bilinen hacimlerde hemolizat katılması ile elde edilen Hb miktarlarına eklenmiş ve deney sonuçları bu düzeltilmiş Hb konsantrasyonları üzerinden değerlendirilmiştir.

Serum örneği no.	Katılan hemolizat hacmi (ml)	Absorbans Ort. $\bar{x}$ s.h (n)	Hb (% mg)	Düzeltilmiş Hb konsantrasyonu (mg/l)
Kontrol	-	0.023 $\bar{x}$ 0.007 (6)	6.6	66
1	0.0050	0.035 $\bar{x}$ 0.001 (6)	8.5	151
2	0.0075	0.038 $\bar{x}$ 0.004 (6)	12	186
3	0.010	0.055 $\bar{x}$ 0.006 (6)	18	246
4	0.030	0.166 $\bar{x}$ 0.007 (6)	55	616
5	0.050	0.275 $\bar{x}$ 0.015 (6)	85	916

Tablo 2. Serum örneklerine katılan hemolizat hacimleri ve nihai Hb konsantrasyonları

III.1.3. Kalitatif olarak hemoliz şiddetinin belirlenmesi:

Değişik hacimlerde hemolizat katılmış serum örneklerinde kalitatif olarak hemoliz şiddetinin belirlenmesi amacıyla deneyimli klinik biyokimya teknisyenlerinin serum örneklerini değerlendirmesi sonucunda; 0.0050, 0.0075 ml hemolizat katılmış serum örnekleri hemolizsiz, 0.01 ml hacminde hemolizat katılmış serum örnekleri hemoliz açısından şüpheli, 0.03 ml hemolizat katılmış serum örnekleri hemolizli ve 0.05 ml hemolizat katılmış serum örnekleri ise belirgin derecede hemolizli olarak nitelenmiştir. Hemoliz şiddetinin kalitatif değerlendirilme sonuçları Tablo 3'de gösterilmiştir. Hemolizsiz olduğu belirtilen hemolizat katılmış serum örneklerinin berrak görünümlü ve normal serum renginde, hemoliz açısından şüpheli serum örnekleri ise berrak ve çok hafif pembemsi renkli, hemolizli olduğu belirtilen serum örneklerinin ise berrak ve belirgin derecede kırmızı renkli olduğu gözlenmiştir.

Serum ör. no.	Katılan hemolizat hacmi (ml)	Hb (mg/L)	Hemoliz şiddeti
Kontrol	-	66	0
1	0.0050	151	0
2	0.0075	186	0
3	0.01	246	1+(?)
4	0.03	616	2+
5	0.05	916	4+

Tablo 3. Hemoliz şiddetinin kalitatif olarak değerlendirilmesi.

III.2. Analiz edilen serum bileşenlerine ait bulgular:

III.2.1. Serum total asit fosfataz aktivitesi bulguları:

Bölüm II.5.2.1.'de belirtilen yöntem kullanılarak kontrol ve hemolizli serum örneklerinde total asit fosfataz aktivitesi ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 4.de sunulmuştur.

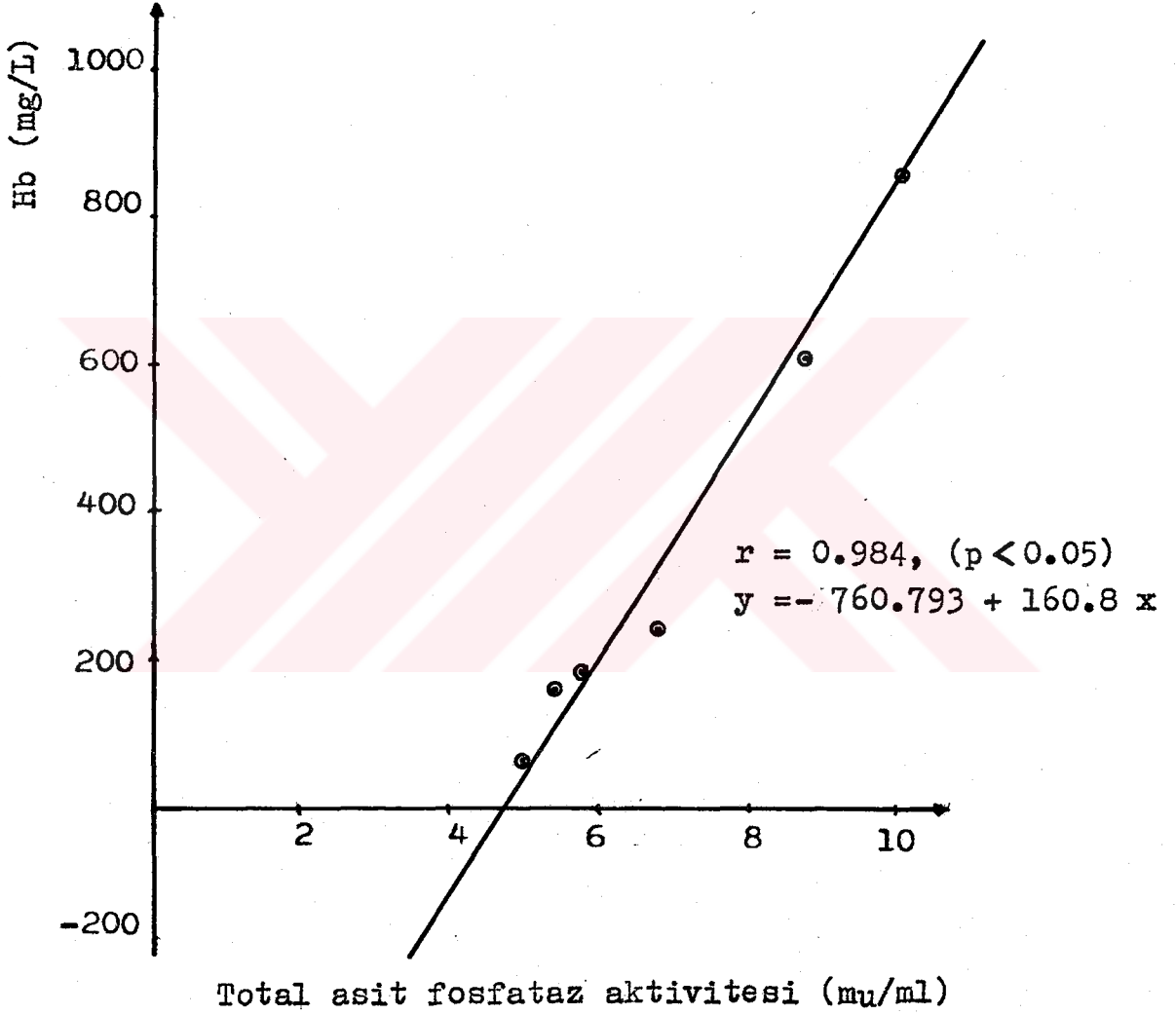
Hemoliz şiddeti (Kalitatif)	0	0	0	1+(?)	2+	4+
Hb (mg/L)	66	151	186	246	616	916
Serum örneği no	(Kontrol)					
1	5.95	5.95 (%) <sup>xx</sup>	6.47 (%8.7)	6.98 (%17.3)	9.49 (%59.4)	11.21 (%88.4)
2	5.15	5.45 (%5.8)	5.75 (%11.6)	7.37 (%43.1)	9.69 (%88.1)	10.10 (%96.1)
3	4.47	4.97 (%11.18)	5.47 (%22.3)	6.26 (% 40)	7.37 (%64.8)	9.09 (%103.3)

Tablo 4. Kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerinde total asit fosfataz aktivite değerleri (mu/ml).

(x) Sağlıklı kişilerden sağlanmıştı (Bkz. Bölüm II.3).

(xx) Hemoliz nedeniyle enzim aktivitesinde ortaya çıkan yalancı pozitif değerlerin kontrole göre % etki olarak ifadesi.

Serum total asit fosfataz aktivitesi ile hemoliz şiddeti arasındaki ilişki istatistik olarak incelenmiş ve aralarında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu ( $r = 0.984$ ,  $p < 0.05$ ) saptanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Serum total asit fosfataz aktivitesi-hemoliz ilişkisine ait regresyon eğrisi

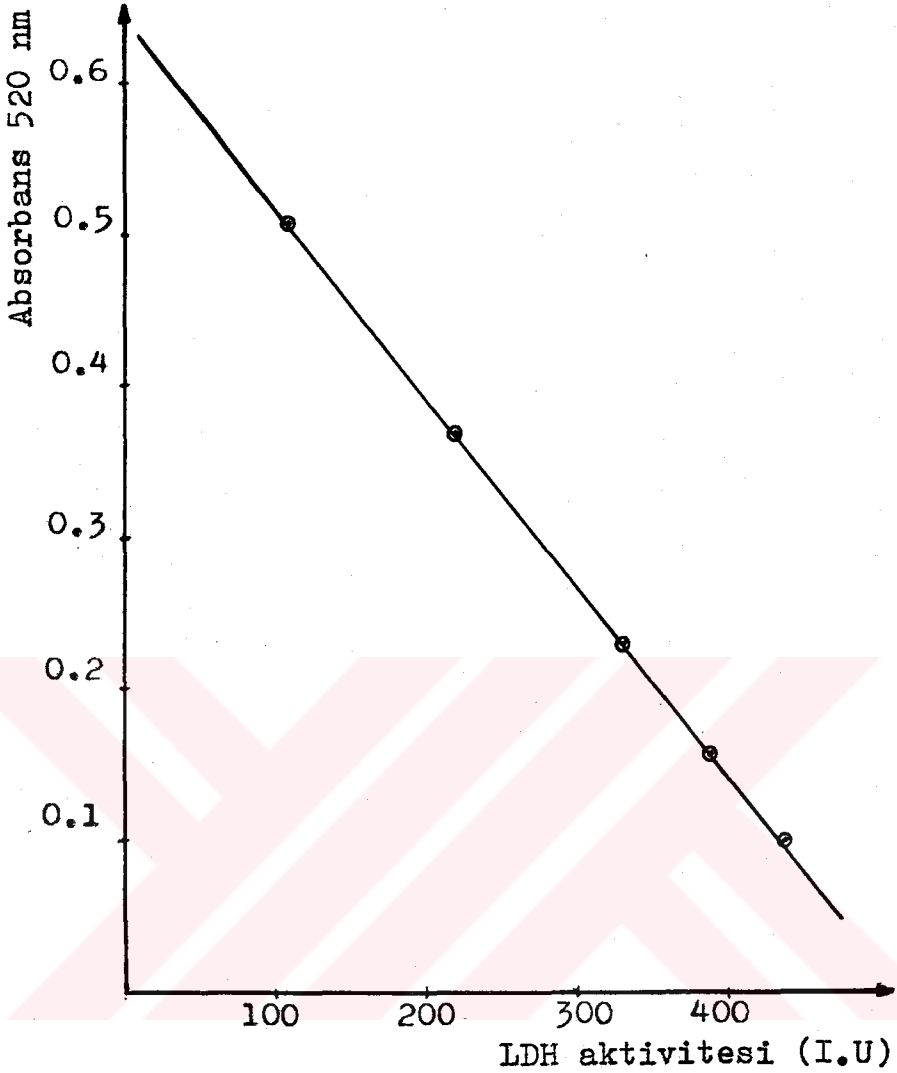
III.2.2. Serum LDH aktivitesi bulguları:

LDH standart eğrisi Bölüm II.5.3.3.'de anlatıldığı şekilde kit yöntemine uyularak çizilmiştir. LDH aktivite değerleri (I.U) ve bu değerlere karşı okunan absorbanlar Tablo 5, LDH standart eğrisi ise Şekil 3'de gösterilmiştir.

LDH (I.U)	Absorbans Ortalama $\bar{x}$ s.h	(n)
0	0.659 $\bar{x}$ 0.008	(4)
111	0.516 $\bar{x}$ 0.009	(4)
223	0.372 $\bar{x}$ 0.011	(4)
334	0.239 $\bar{x}$ 0.001	(4)
390	0.168 $\bar{x}$ 0.005	(4)
446	0.100 $\bar{x}$ 0.007	(4)

Tablo 5. LDH standart eğri çizimi için  
LDH (I.U) değerleri ve okunan  
absorbanslar





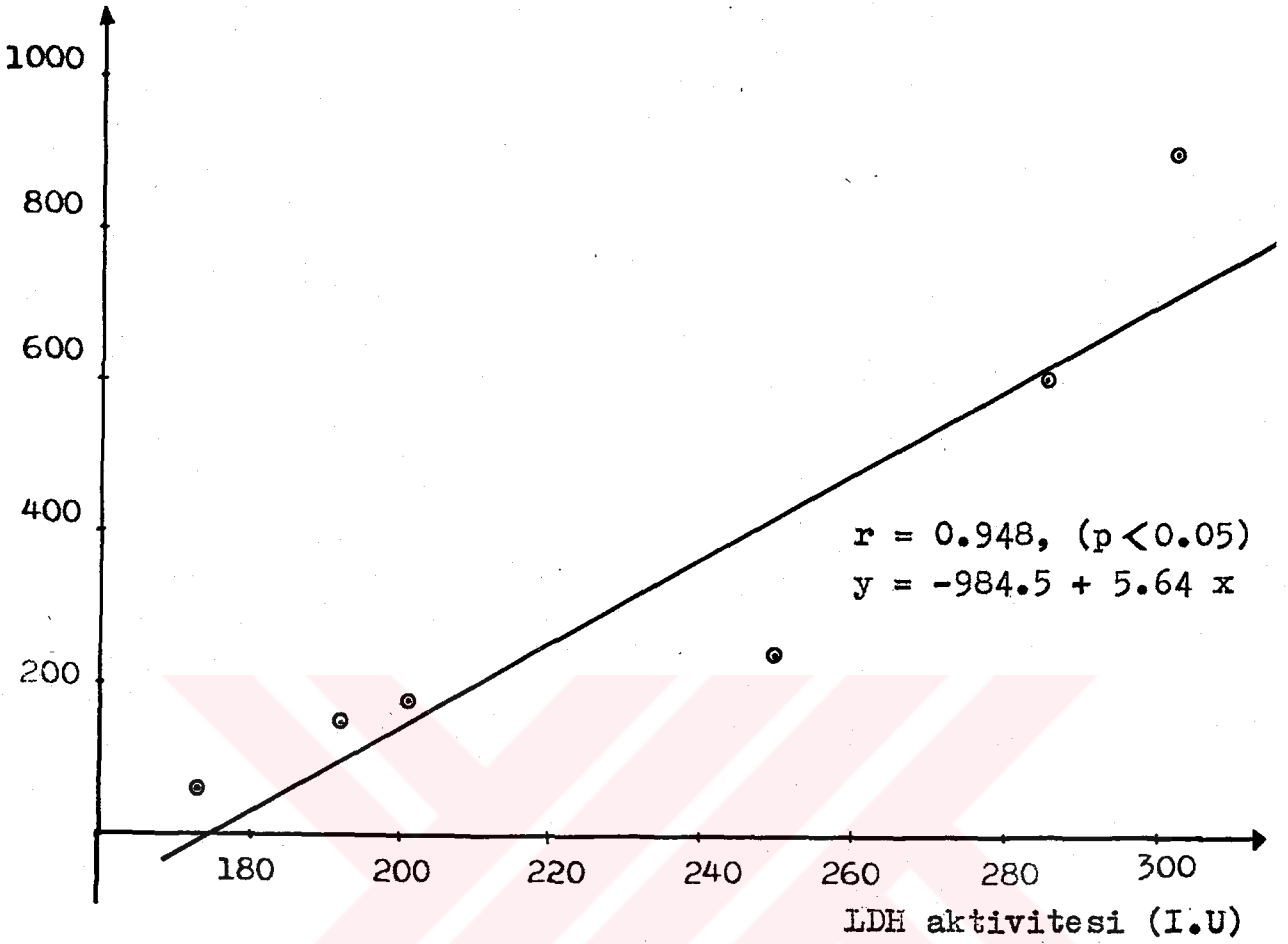
Şekil 3. LDH standart eğrisi

Kontrol ve hemolizli serum örneklerinde ölçülen serum LDH aktivite sonuçları Tablo 6'da gösterilmektedir. Şekil 4'de ise serum LDH aktivitesi ile hemoliz şiddeti arasındaki ilişkinin istatistiksel değerlendirme sonucu sunulmuştur. LDH aktivitesi ile hemoliz şiddeti arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ( $r= 0.948$ ,  $p < 0.05$ ).

Hemoliz şiddeti (Kalitatif)	0	0	0	0	1+(?)	2+	4+
Hb (mg/L)	66 (Kontrol)	151	186	246	616	916	
Serum örneği no							
1	115	125 (%8.6) <sup>x</sup>	136 (%15.4)	160 (%39.1)	210 (%82.6)	242 (%110)	
2	230	245 (%6.5)	270 (%17.3)	300 (%30.43)	335 (%45.6)	370 (%60.8)	
3	150	180 (%20)	220 (%46.6)	280 (%86.6)	335 (%123.3)	390 (%160)	
4	220	255 (%15.9)	295 (%34)	360 (%63.6)	390 (%77.2)	425 (%93.1)	
5	165	176 (%6.6)	185 (%12.1)	210 (%27.2)	230 (%39.3)	245 (%48.4)	
6	160	175 (%9.3)	180 (%12.5)	195 (%21.8)	215 (%34.3)	230 (%43.7)	

Tablo 6. Kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerinde LDH aktivite değerleri (I.U)

(x) Hemoliz nedeniyle enzim aktivitesinde ortaya çıkan yalancı pozitif değerlerin kontrole göre % etki olarak ifadesi



Şekil 4. Serum LDH aktivitesi-hemoliz ilişkisine ait regresyon eğrisi

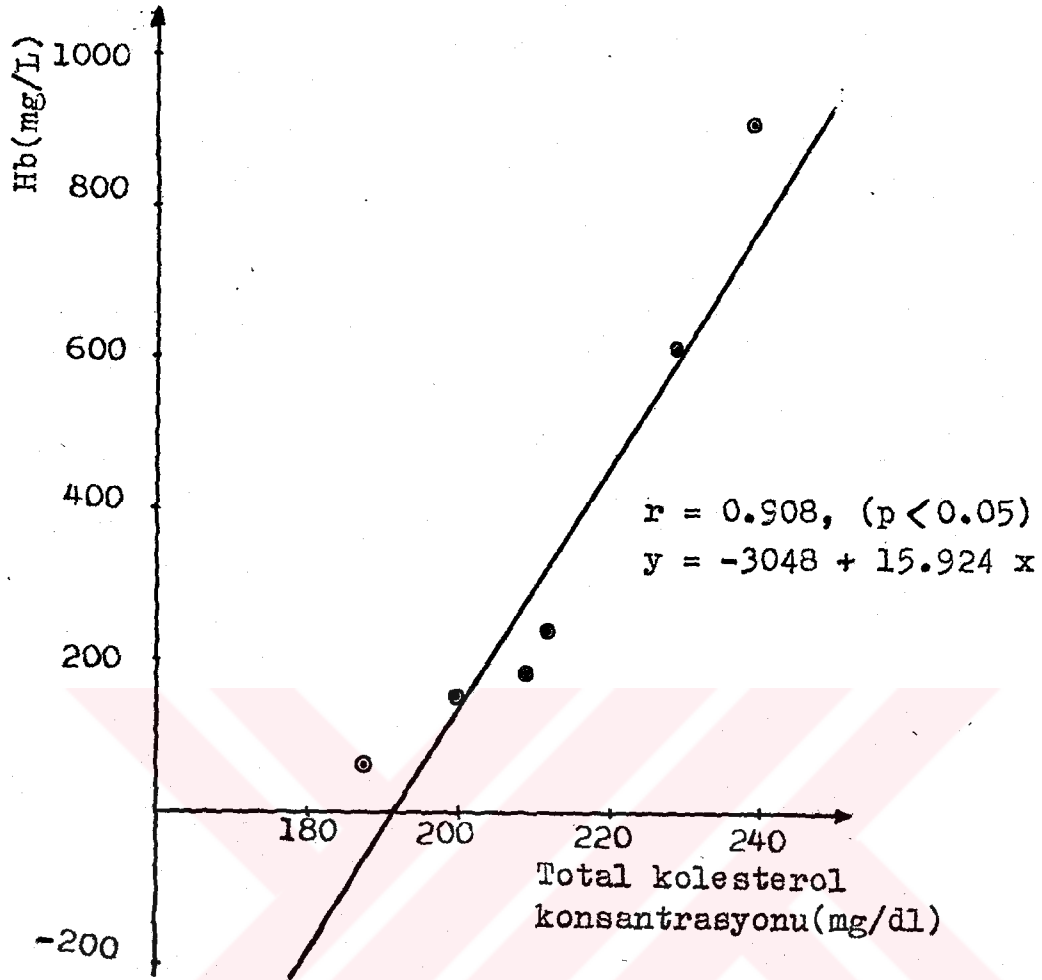
### III.2.3. Serum total kolesterol ölçümüne ilişkin bulgular:

Bölüm II.5.4.1.'de belirtilen yöntem kullanılarak kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerinde total kolesterol değerleri ölçülmüş ve sonuçlar Tablo 7'de sunulmuştur. Şekil 5 ise, hemoliz şiddeti ile serum total kolesterol konsantrasyonu arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğunu göstermektedir ( $r = 0.908, p < 0.05$ ).

Hemoliz şiddeti (Kalitatif)	0	0	0	1+(?)	2+	4+
Hb (mg/L)	66	151	186	246	616	916
Serum örneği no						
1	243	270 (%11.1) <sup>x</sup>	279 (%14.8)	294 (%20.9)	301 (%23.8)	310 (%27.5)
2	169	183 (%8.2)	188 (%11.2)	197 (%16.5)	205 (%21.3)	221 (%30.7)
3	196	206 (%5.1)	215 (%9.6)	227 (%15.8)	237 (%20.9)	246 (%25.5)
4	177	181 (%2.2)	184 (%3.9)	194 (%9.6)	207 (%16.9)	215 (%21.4)
5	203	216 (%6.4)	217 (%6.8)	228 (%12.3)	236 (%16.2)	248 (%22.1)
6	136	143 (%5.1)	163 (%19.8)	176 (%29.4)	185 (%36)	191 (%40.4)

Tablo 7. Kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerinde total kolesterol konsantrasyonları (mg/dl).

(x) Hemoliz nedeniyle serum total kolesterol konsantrasyonlarında ortaya çıkan yalancı pozitif değerlerin kontrole göre % etki olarak ifadesi.



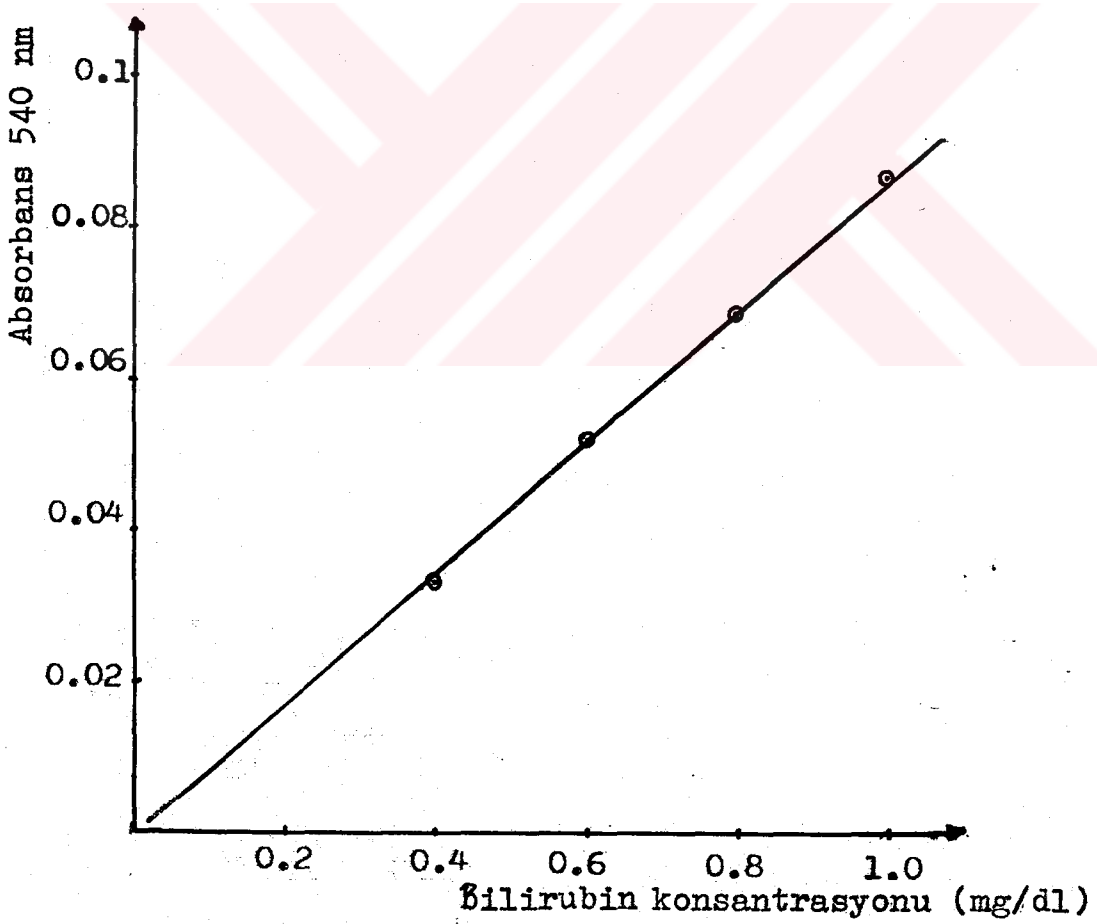
Şekil 5. Serum total kolesterol konsantrasyonları-hemoliz ilişkisine ait regresyon eğrisi

#### III.2.4. Serum total bilirubin ölçümüne ilişkin bulgular:

Bölüm II.5.5.1.'de açıklanan yöntem kullanılarak elde edilen standart absorbanları Tablo 8, çizilen standart eğri ise Şekil 6'da gösterilmiştir. Kontrol ve hemolizli serum örneklerinde elde edilen total bilirubin miktarları Tablo 9 ve serum total bilirubin miktarları ile hemoliz şiddeti arasındaki ilişki de Şekil 7'de sunulmuştur.

Bilirubin standart(% mg)	Absorbans	
	Ort. $\bar{x}$ s.h	(n)
0.4	0.032 $\bar{x}$ 0.017	(4)
0.6	0.052 $\bar{x}$ 0.005	(4)
0.8	0.068 $\bar{x}$ 0.008	(4)
1.0	0.086 $\bar{x}$ 0.006	(4)

Tablo 8. Serum total bilirubin standartlarının absorbansları.



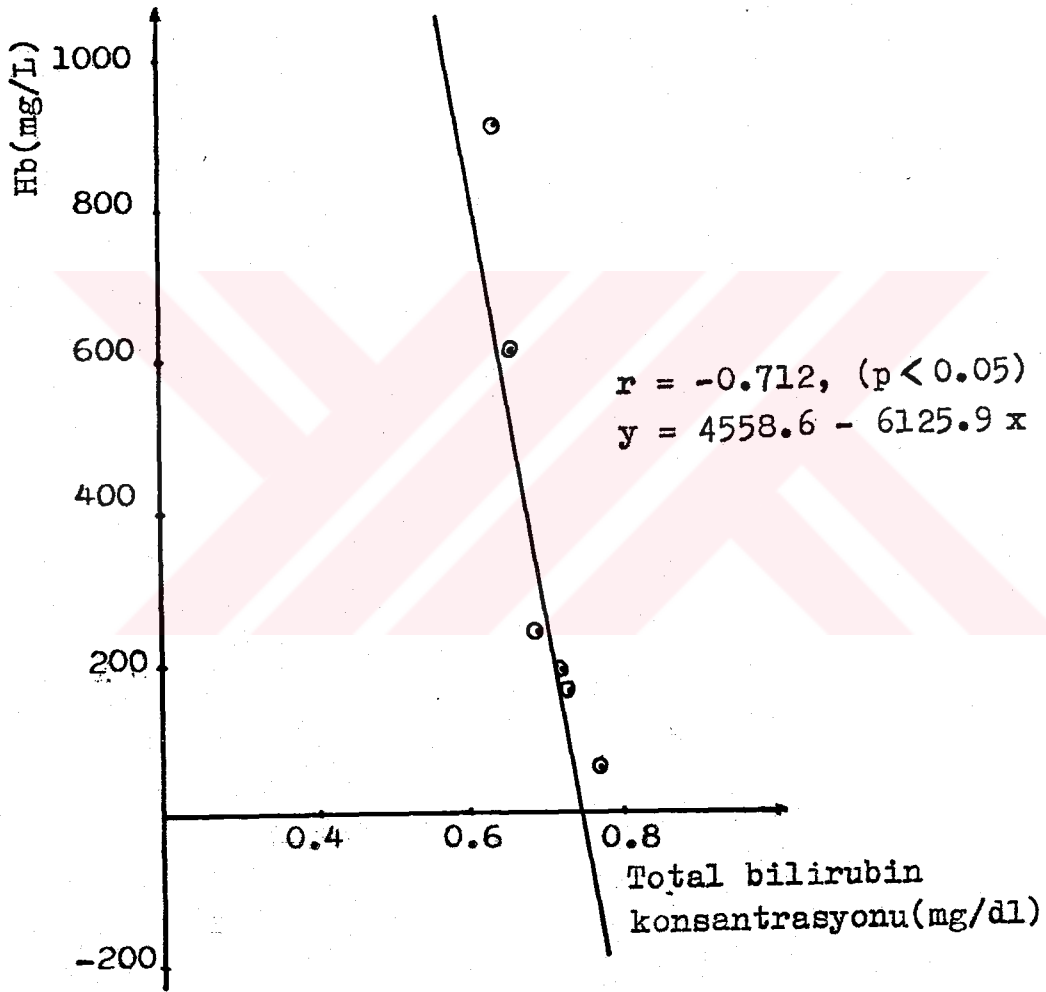
Şekil 6. Total bilirubin standart eğrisi

Hemoliz şiddeti (Kalitatif)	0	0	0	1+(?)	2+	4+
Hb (mg/L)	66	151	186	246	616	916
Serum örneği no						
1	0.86	0.82 (%-4.6) <sup>x</sup>	0.81 (%-5.8)	0.80 (%-6.9)	0.76 (%-11.6)	0.76 (%-11.6)
2	0.90	0.87 (%-3.3)	0.86 (%-4.4)	0.78 (%-13.3)	0.76 (%-15.5)	0.73 (%-18.8)
3	0.73	0.66 (%-5.4)	0.61 (%-16.4)	0.60 (%-17.8)	0.58 (%-20.5)	0.56 (%-23.2)
4	0.49	0.47 (%-4)	0.47 (%-4)	0.43 (%-12.2)	0.42 (%-14.2)	0.38 (%-22.4)
5	0.72	0.69 (%-4.1)	0.67 (%-6.9)	0.65 (%-9.7)	0.61 (%-15.2)	0.60 (%-16.6)
6	0.93	0.90 (%-3.2)	0.89 (%-4.3)	0.86 (%-7.5)	0.84 (%-9.6)	0.81 (%-12.9)

Tablo 9. Kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerinde total bilirubin konsantrasyonları (mg/dl).

(x) Hemoliz nedeniyle serum total bilirubin konsantrasyonlarında ortaya çıkan yalancı negatif değerlerin kontrole göre % etki olarak ifadesi.

Kontrol ve hemolizli serum örneklerinde elde edilen total bilirubin konsantrasyonları ve hemoliz şiddeti arasında anlamlı negatif bir korelasyon olduğu saptanmıştır ( $r = -0.712$ ,  $p < 0.05$ ).



Şekil 7. Serum total bilirubin konsantrasyonları-hemoliz ilişkisine ait regresyon eğrisi



## B Ö L Ü M IV

### T A R T I Ş M A ve S O N U Ç

#### IV.1. Hemolizli serum örneklerinin hazırlanışına ilişkin tartışma:

Çalışmada kullanılan serumlar Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi biyokimya laboratuvarlarına analiz için gelen serumlardan sağlanmıştır. Çalıştığımız her parametrenin farklı hemolizat konsantrasyonunda ve paralel deneyler şeklinde yürütülmesi öngörüldüğünden oldukça fazla miktarda serum sağlanması gerekmiş ve bu nedenle hastane laboratuvarlarına rutin analizler için gelen serumlardan artanlar toplanarak, 6 ayrı serumun karıştırılması ile her deney için 10 ml'lik serum örneği (pooled serum) hazırlanmıştır (16).

Çalışmamızda ölçtüğümüz parametrenin normal değerlerden sapsmış olmasının bir önemi bulunmadığı düşünüldüğünden hasta serumlarında çalışılmasında bir sakınca görülmemiştir. Ancak toplanan serumların berrak görünümlü ve hemolizsiz olmasına özen gösterilmiş, belirgin derecede lipemik, ikterik görünümlü serumlar çalışmalara sokulmamıştır.

Serum örneklerine eritrositleri patlatarak hazırlanan hemolizattan belirli hacimler katılarak çalışma materyali olan hemolizli serum örnekleri hazırlanmıştır. Paketlenmiş eritrositler çeşitli yöntemlerle parçalanabilirler. Waring Blender'da 4°C'de ve düşük hızda 5 dk homojenizasyon ile eritrositler mekanik olarak parçalanabilirler (6). Eritrosit paketi üzerine eşit hacimde distile su ilavesi de eritrositlerin parçalanmasına yol açar, bazı uygulamalarda distile su içerisine sodyum saponin ilavesi de önerilmektedir (16,20).

Çalışmamızda eritrositleri patlatmak için doğrudan distile su kullanılmıştır. Eritrosit paketi üzerine eşit hacimde distile su ilave edilerek hazırlanan hemolizat -18°C'de saklanmıştır. Kullanılacağı gün ise çözme işlemi uygulanarak dondurma-çözme etkisinin de katkısı ile hemolizin tam olması sağlanmıştır (24).

İn vitro hemolizin bazı test sonuçlarına etkisini araştırmak için yapılan bu çalışmada serum örneklerine katılacak hemolizat miktarını saptamak üzere ön deneyler yapılmış ve gözle farkedilemeyecek kadar az miktarda, gözle ancak farkedilebilecek miktarda ve gözle kolayca farkedilebilecek miktarda hemolizli serum hazırlamak için gereken minimum hemolizat miktarları araştırılmıştır. Bu ön deneyler sonucunda 10 ml serum örneğine 0.0050 ile 0.0075 ml hemolizat katıldığında serumda gözle farkedilebilecek bir değişiklik olmamıştır. 0.01 ml Hemolizat katıldığında şüp-

heli bir hemolizden sözedilebileceği, 0.03 ve 0.05 ml hemolizat katıldığında ise bariz hemolizli serumdan sözetmenin mümkün olduğu anlaşılmıştır.

Serum örneklerine katılacak hemolizat hacimlerinin saptanması için yapılan çalışma sonucunda katılacak hemolizat hacimleri belirlenmiş ve Tablo 2'de sunulmuştur. Bu tablo incelendiğinde gözle görülebilecek hemolizi olmamasına özen gösterilerek toplanan serumlarında (kontrol) belirli miktarlarda hemoglobinin içerdiği görülmektedir. Kontrol ve hemolizli serum örneklerinde Hb tayinleri benzidin yöntemi ile Bölüm II.5.1'de belirtildiği şekilde yapılmıştır. Bu yöntem düşük Hb konsantrasyonlarının saptanmasında önerilen bir yöntem olduğu için seçilmiştir.

Altı kontrol serum örneğinde ortalama 66 mg/L Hb bulunduğu anlaşılmış ve bu değer beş farklı hacimde hemolizat katılmış serum örneklerinde hesaplanan Hb değerlerine ilave edilerek düzeltilmiş Hb değerleri elde edilmiştir (Tablo 2). Çalışılan yöntemlerde düzeltilmiş Hb değerleri esas alınmıştır.

Hemolizli serum örneklerinde hemoliz şiddeti kalitatif olarak da değerlendirilmiştir (Tablo 3). Bu tabloda da görüldüğü üzere 1 ve 2 no'lu serum örneklerinde bulunan Hb konsantrasyonları gözle farkedilemeyecek düzeyde ve kalitatif hemoliz değerlendirmesi (0) dır. 3 No'lu serum örneği için değerlendirme yapan teknisyenlerden bir kısmı 0, bir kısmı ise 1+ hemoliz şiddeti belirtmişlerdir. 4 ve 5 no'lu

serum örnekleri ise sırasıyla 2+, 4+ hemolizli olarak değerlendirilmiştir.

#### IV.2. Seçilen serum parametrelerine ilişkin tartışma:

İn vitro hemolizin bazı kimyasal test sonuçlarına etkisini incelemek üzere planlanan bu çalışmada serum parametreleri ve bu parametreleri ölçmek için seçilen analiz yöntemleri saptanırken şu hususlar gözönünde bulundurulmuştur:

- a) Seçilen parametrenin her rutin analiz laboratuvarında çalışılan parametrelerden biri olması,
- b) Hemolizden etkilebildiğinin daha önceki yayınlarda belirtilmiş olması,
- c) Analiz yöntemi, kit yöntemi ise yönteme ilişkin talimatında hemolizli serumun kullanılamayacağı kaydının bulunması,
- d) Seçilen parametrenin analizinin laboratuvar olanaklarımız içerisinde gerçekleştirilebilir olması.

#### IV.2.1. Total asit fosfataz bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma:

Serum total asit fosfataz aktivitesi Bessey-Lowry-Brock modifiye yöntemine dayanan ve p-nitrofenilfosfatın substrat olarak kullanıldığı kit yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntem serumun mümkün olan en kısa sürede deneye sokul-

masını öngördüğünden çalışılan diğer serum parametrelerinden farklı olarak serum örnekleri kendi imkanlarımız ölçüsünde sağlıklı kişilerden sağlanmış ve bekletilmeden deneye sokulmuştur. Bu nedenle total asit fosfataz aktivite tayini için altı yerine üç serum örneğinde çalışılabilmıştır (Tablo 4).

Tablo 4 ve Şekil 2 incelendiğinde serum total asit fosfataz aktivitesi ile hemoliz şiddeti arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu anlaşılmaktadır ( $r= 0.984$ ,  $p < 0.05$ ). Bu beklenen bir sonuçtur, eritrosit içindeki konsantrasyonları serum veya plazmaya göre yüksek olan bileşenlerin hemolizden etkilenmesi beklenir. Asit fosfataz bu tip bileşenlere iyi bir örnektir (20,6). Ayrıca çeşitli dokulardan kaynaklanan asit fosfataz enzimlerinin özgüllüğü olduğu ve fenil fosfat, p-nitrofenil fosfat'ın eritrosit asit fosfatazı tarafından özellikle hidroliz edildiği bildirilmiştir (46).

Gözle farkedilebilecek Hb konsantrasyonunun  $200 \text{ mg/L}$ 'nin, üzerinde olduğu belirtilmiştir (41). Bu değer altında  $186 \text{ mg/L}$  Hb içeren ve hemoliz şiddeti (0) olarak değerlendirilen serum örneklerinde total asit fosfataz aktivitesi kontrole göre % 8.7 ilâ % 22.6 oranında artmış değerler göstermiştir (Tablo 4). Brydon ve Roberts (6), tarafından yapılan bir araştırmada King-Armstrong ünitesi esas alınarak total asit fosfatazın hemolizden etkilenme boyutu Caraway formülü (Bkz. I.3) ile g Hb başına teorik % hata 192 olarak

hesaplanmıştır. Oysa deneysel sonuçlarında bu hata % 627'ye ulaşmıştır. Yazarlar bir çok bileşen için teorik ve uygulamalı hesapların uyum gösterdiğini ancak total asit fosfatazda aralarında olmak üzere bazı bileşenler için bu uyumu gözleyemediklerini belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda total asit fosfataz için teorik ve uygulamalı sonuçlar kısmen uyum göstermiş 246 mg/L Hb içeren serum örnekleri için Caraway (8), formülüne göre teorik hata hesaplandığında % 48 bulunmuştur. Deneysel sonuçlarımızda bu hata % 43.1, % 40 olarak saptanmıştır (Tablo 4).

Laessig ve diğ.(20), tarafından yapılan bir çalışmada hemolizat veya "intact" eritrosit katılmış serum örneklerinde çeşitli serum parametreleri incelenmiştir. Bunlardan total asit fosfataz aktivitesi Du Pont ACA yöntemiyle oto analizörde ölçüldüğünde bu aktivitenin gerek hemoliz, gerekse intact eritrositlerden pek fazla etkilenmediği belirtilmiştir.

Benzer konuda yapılan diğer bir çalışmada total asit fosfataz aktivitesine çeşitli derecelerdeki hemolizin etkisi üç ayrı metotla incelenmiştir. Prostatik izoenzime özgü substratın kullanıldığı yöntemde enzim aktivitesindeki artış ihmal edilebilecek düzeyde iken p-nitrofenilfosfatın kullanıldığı yöntemde total asit fosfataz aktivitesinde dört katı bir artış gözlemişlerdir (16). Çalışmamızda bizde p-nitrofenilfosfatı substrat olarak kullandığımızdan bulgularımızı bu çalışma sonuçları ile karşılaştırma iste-

dik ancak sözkonusu çalışmada kullanılan serumlardaki Hb konsantrasyon sınırları 90-2800 mg/L Hb olduğu için tam bir karşılaştırma yapamadık. Bu çalışmada en yüksek Hb konsantrasyonunun enzim aktivitesinde % 315'lik yalancı pozitif sonuca yol açtığı belirtilmektedir ki bu konsantrasyon bizim en yüksek Hb konsantrasyonumuzun yaklaşık üç katıdır. Bulgularımız total asit fosfatazın hemolizden en fazla etkilenen parametrelerden biri olduğunu desteklemekte ve kalitatif hemoliz şiddeti 4+ olan örneklerde % 103'e ulaşan yalancı pozitif değerlerin elde edilebileceğini göstermektedir.

#### IV.2.2. Serum LDH bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma:

Bu çalışmada serum LDH aktivite ölçümleri pirüvatın substrat olarak kullanıldığı kit yöntemiyle yapılmıştır. Tablo 6 ve Şekil 4 incelendiğinde serum LDH aktivitesi ile hemoliz şiddeti arasında anlamlı pozitif bir korelasyon olduğu görülmektedir ( $r = 0.948$ ,  $p < 0.05$ ). LDH'in eritrosit : serum konsantrasyon oranı 160 olduğu için hemolizden etkilenme olasılığı oldukça yüksektir (20). Tablo 6 incelendiğinde kalitatif hemoliz şiddeti (0) olan serum örneklerinde Hb'nin LDH aktivitesine etkisinin kontrola göre % 12-47 oranları arasında olduğu görülür. Hemoliz şiddeti 1+(?) olan ve 246 mg/L Hb içeren örneklerde ise kontrola göre bu etki % 22-87 arasında değişmektedir. 916 mg/L Hb içeren ve

hemoliz şiddeti 4+ olan serum örneklerinde kontrole göre hemolizin % etkisi 44-160 arasındadır. Bu sınırların genişliği hemolizat hazırlanması sırasında enzim aktivitesinin bir kısmını kaybetmiş olmamız ve serum örneklerinin farklı zamanlarda çalışılmış olmasının da buna katkısı ile açıklanabileceği kanısındayız.

LDH'in hücre harabiyetini gösteren ve dolayısıyla hemoliz etkisini en iyi gösteren parametrelerden biri olduğu belirtilmiş ve % 0.1 hemolizli örneklerde LDH aktivitesinde 35-40 U'lık bir artış edilmesine karşılık % 1 hemolizli örneklerde bu artış beklenen değerler olan 355-360 U'ye ulaşmıştır (20).

Frank ve diğ.(16), 90-2800 mg/L arasındaki Hb konsantrasyonlarını içeren serum örneklerinde LDH aktivitesini iki ayrı yöntemle saptamış ve kontrole göre % 143, % 155 oranlarında yalancı pozitif değerler elde etmişler ve LDH aktivitesindeki artışların hemoliz şiddetini çok iyi yansıttığını vurgulamışlardır. Brydon ve Roberts (6), LDH için g Hb başına Caraway'e (8), göre teorik % hatanın 463 olduğunu, deneysel sonuçlarında ise bunun g Hb başına % 550'ye ulaştığını bildirmişlerdir. Aynı çalışmada s.u/ml olarak ifade edilen LDH aktivitesinde 120 olarak saptanan serum kontrol değeri hemolizden etkilenecek 1 g Hb içeren örneklerde 670 s.u/ml'ye ulaşmıştır. Bizim bulgularımızda serum LDH aktivitesinin gözle farkedilebilme sınırına yakın Hb konsantrasyonlarından itibaren hemolizden artan oranlarda etkilendiğini desteklemektedir.



IV.2.3. Serum total kolesterol bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma:

Serum total kolesterol miktar tayinleri esasını Liebermann-Burchard yönteminin teşkil ettiği kit yöntemiyle yapılmıştır. Bu yöntem ekstraksiyon gerektirmeyen bir yöntemdir. Tablo 7 ve Şekil 5'in incelenmesi ile serum total kolesterol ve in vitro hemoliz arasında pozitif anlamlı bir korelasyon olduğu görülür ( $r = 0.908$ ,  $p < 0.05$ ).

Çalışmamızda hemoliz şiddeti (0) olan ve 186 mg/L Hb içeren serum örneklerinde kontrole göre hemolizin etkisi % 4 ilâ 20 oranlarında saptanmıştır (Tablo 7). 246 mg/L Hb içeren serum örneklerinde bu etki % 10-29 oranları arasında farklı değerler göstermektedir. En fazla hemolizat katılmış ve hemoliz şiddeti 4+ şeklinde değerlendirilmiş (916 mg/L Hb) serum örneklerinde hemoliz etkisi kontrole göre % 40'a ulaşmaktadır.

Kolesterol tayinlerinde ekstraksiyon uygulanan veya enzimatik tayin yöntemlerinin hemolizden hiç etkilenmediği veya çok az etkilendiği bildirilmiştir (48). Çünkü, total kolesterol tayin yöntemlerine hemolizin etkisi renkli kompleks oluşumuna dayanan tayinlerde Hb nin renk girişimi yapma mekanizmasına dayanır (20). Ekstraksiyon uygulanan kolorimetrik ve enzimatik yöntemler bundan etkilenmez. Serumda enzimatik yöntemlerle yapılan total kolesterol tayinlerinin 1-2 g/L Hb konsantrasyonlarından etkilenmediği gösterilmiştir (29,32,33). Ness ve diğ.(27), tarafından Liebermann-

Burchard reaktifinin stabilitesi ve direkt serum total kolesterol tayini için yapılan bir çalışmada yöntem girişimde bulunan başlıca etkenlerin turbidite, Hb ve bilirubin olduğu bildirilmiş ve bunlar içinde bilirubin en fazla girişimde bulunduğu da vurgulanmıştır. Frank ve diğ. (16), tarafından yapılan bir çalışmada serum total kolesterol tayini için Trinder metodu kullanılmış ve 2800 mg/L Hb içeren en yüksek düzeyde hemolizli serum örneğinde kontrole göre ancak % 3 oranında önemsiz bir etki saptanmıştır.

Aynı parametreyi ölçmek için değişik yöntemler kullanılarak elde edilen farklı sonuçların karşılaştırması hemoliz etkisinin incelenmesinde metodolojinin önemini göstermektedir (20). Çalışmamızda ekstraksiyona dayanmayan direkt bir yöntem kullanıldığından gittikçe artan konsantrasyonlardaki artan Hb miktarının total kolesterol miktarlarında aynı paralelde artışlar göstermesi beklenen bir sonuçtur ve bulgularımızda bunu destekleyecek niteliktedir (Tablo 7, Şekil 5). Çalıştığımız kit yönteminde normal değerler yetişkin erkek yaş gruplarında % 110 ila 310 mg, kadınlarda % 110-355 mg olarak belirtilmektedir. Geniş bir sınırı olan normal değerler gözönüne alındığında gerek bizim bulgularımız, gerekse literatürde verilen etkileşme değerleri, serum parametreleri arasında total kolesterolde hemolizin yol açtığı yalancı pozitif değerlerin enzimatik sonuçlar üzerindeki etkisi kadar önemli olmadığını göstermektedir.

IV.2.4. Serum total bilirubin bulgularına in vitro hemolizin etkisine ilişkin tartışma:

Serum total bilirubin tayini için Malloy-Evelyn yöntemi kullanılmıştır. Sonuçların değerlendirilmesinde Şekil 6 da gösterilen standart eğriden yararlanılmıştır. Kontrol ve hemolizat katılmış serum örneklerindeki total bilirubin konsantrasyonları Tablo 9 da sunulmuştur. Bu tablo incelendiğinde hemolizin serum total bilirubin konsantrasyonlarında yalancı negatif değerlerin elde edilmesine yol açtığı gözlenmektedir. Serum total bilirubin değerlerine hemolizin etkisi istatistik olarak da incelenmiş ve bu iki parametre arasında anlamlı negatif bir korelasyon olduğu Şekil 7 de sunulmuştur ( $r = -0.712$ ,  $p < 0.05$ ). 186 mg/L Hb içeren ve hemoliz şiddeti (0) olan serum örneklerinde hemolizin kontrole göre % etkisi (-4)-(-16.4) oranları arasındadır. 246 mg/L Hb içeren ve hemoliz şiddeti 1 + (?) olan serum örneklerinde bu etki % (-6.9)-(-17.8) olarak bulunmuştur. 4+ Hemoliz şiddetine sahip ve 916 mg/L Hb içeren serum örneklerinde ise serum total bilirubin değerlerinde kontrole göre % (-11.2)-(-23.2) oranları arasında yalancı negatif değerler elde edilmiştir.

Bilirubinin direkt spektrofotometrik analizinde hemolizin önemli bir rol oynadığı belirtilmiştir (36). Hemoglobinin bu etkisi konusunda çeşitli mekanizmalar öne sürülmekte ve değişik yöntemler kullanılarak elde edilen bulgular tartışılmaktadır. Serum örneklerinde bilirubin ölçümlerine

hemolizin etkisinin incelendiği serumdaki total protein veya albümin içeriğindeki farklılıkların serum örneğindeki Hb'nin tampon etkisiyle test çözeltisinin asiditesinde olabilecek değişikliklerin rol oynayabileceği öne sürülmüş ancak deneysel çalışmalarla bunlar kanıtlanamamıştır (24).

Jendrassik-Grof yöntemiyle total bilirubin tayininde Hb'nin yöntemi etkilediği belirtilmiştir (37). Bu etkinin mekanizması diazolama işlemi sırasında oksidize Hb'den oluşan hidrojen peroksit azobilirubini oksitleyerek yalnızca negatif sonuçlara yol açtığı şeklinde açıklanmaktadır. Bu nedenle yöntem modifiye edilmiş ve oluşabilecek hidrojen peroksiti indirgemek üzere potasyum iyodür veya askorbik asit kullanılarak nihai ürün (azobilirubin) stabil hale getirilmiştir (30).

Laessig ve diğ.(20), sözkonusu bu yöntemi kullanarak serum total bilirubin tayinine hemolizin etkisini incelemişler ve kayda değer hiç bir etki gözlememişlerdir. Aynı yöntem kullanılarak hemolizin serum total bilirubin değerlerinde kontrole göre % -28'e varan bir etki gözleyen araştırmacılar bu beklenmeyen sonucu kullandıkları SMA 12/60 sisteminde "artifact" etkiye bağlamışlardır (16).

Serum total bilirubin tayini modifiye Malloy-Evelyn metodu Van den Bergh metodu kullanılarak yapılan bir çalışmada  $2 - 3 \times 10^{-4}$  g/ml Hb'nin bilirubin konsantrasyonunda % 5-15'lik bir azalmaya neden olduğu bildirilmiştir. Hemolizin bu metot üzerine etkisi tam olarak açıklanamamıştır (23). Bizim bulgularımızda bu etkinin boyutları Hb konsan-

trasyonuna bağlı olarak % (-3.2)-(-23.3) oranında değişmektedir. Ancak kullandığımız yöntem diazolanmaya dayanmakla birlikte yukarıda sözü edilen yöntemlere göre ufak farklılıklar içermektedir. Sülfanilik asit ile diazolanmaya dayanan bir yöntem kullanılarak yapıldığı belirtilen diğer bir çalışmada ise bilirubin konsantrasyonunda g Hb başına 2.2 lik bir artış saptanmış ancak bu sonuç ayrıntılı olarak tartışılmamıştır (6). Sonuçta hemolizin serum total bilirubin değerlerine etkisinin yöntemlere göre farklı olduğu söylenebilir. Yarı-mikro teknikler kullanılarak ve uygun yöntem seçilerek bu etkinin minimuma indirilmesi mümkündür (24).

#### IV.3. Sonuç:

Bulgularımız, kontrollü olarak oluşturulan in vitro hemolizin bazı klinik biyokimya laboratuvarlarında uygulanan sonuçlar üzerinde yalancı pozitif veya negatif değerler elde edilmesine yol açtığını göstermekte ve bu konudaki yayınlarla uyum sağlamaktadır. Kontrollü olarak oluşturulan hemolizde, gözle farkedilemeyecek hemoliz şiddetinde (kalitatif değerlendirme 0) bile incelediğimiz test sonuçlarının in vitro hemolizden etkilenmiş olduğunun gösterilmiş olması, üzerinde durulacak bir konudur. Hemolizden etkilenebileceği belirtilen analizlerin gözle görülebilir düzeyde hemolizli serumlarda çalışılmaması kesin bir dille tavsiye edilmektedir. Ancak, bulgularımız gözle farkedilemeyecek

düzeydeki hemolizin de etkili olabileceğini gösterdiğinden sözkonusu analizlerin yapılacağı serumların hemoliz açısından özenli bir şekilde değerlendirilmesinde ve şüpheli sonuçlar elde edildiğinde analizlerin tekrar edilmesinde yarar olabileceği sonucuna varılmıştır.



## Ö Z E T

Bu çalışmada bazı serum parametreleri üzerinde kontrollü olarak oluşturulan in vitro hemolizin etkisinin boyutları araştırılmış ve sonuçlar benzer yayınlarla karşılaştırılmıştır.

Çalışma materyali olan serum Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarlarına analiz için gelen serum fazlalarından sağlanmıştır.

Hemolizden etkilendiği belirtilen serum parametreleri arasından total asit fosfataz, laktat dehidrogenaz, total kolesterol ve total bilirubin seçilerek bu parametreler yöremizdeki hastanelerde uygulandığı saptanan yöntemler kullanılarak ölçülmüştür. Serum örneklerine hemolizat katılarak 151, 186, 246, 616, 916 mg/L Hb konsantrasyonlarında kontrollü in vitro hemoliz oluşturulmuştur. Artan Hb konsantrasyonları ile ölçülen serum parametreleri arasında total asit fosfataz, laktat dehidrogenaz, total kolesterol için anlamlı pozitif korelasyon bulunduğu saptanmış olup, korelasyon katsayıları sırasıyla ( $r= 0.984$ ,  $p < 0.05$ ),

( $r = 0.948$ ,  $p < 0.05$ ), ( $r = 0.908$ ,  $p < 0.05$ ) dır. Hemoliz şiddeti ile serum total bilirubin konsantrasyonları arasında da anlamlı ancak negatif bir korelasyon olduğu gözlenmiştir ( $r = -0.712$ ,  $p < 0.05$ ).

Kantitatif olarak oluşturulan in vitro hemolizin kalitatif değerlendirmesi de yapılarak (0-4+) bulgularımız ile rutin uygulama arasında ilişki kurulmaya çalışılmıştır.

Bulgularımız bu konuda yapılmış olan çalışmalarla uyum sağlamış ve gözle farkedilemeyecek düzeydeki hemoliz şiddetinde bile ölçtüğümüz parametre sonuçlarında sapmalar olabileceğini ortaya koymuştur.



## S U M M A R Y

In this study, the dimensions of effect of the controlled in vitro hemolysis on some serum parameters were investigated and the obtained results were compared to dealing some papers.

The working material was obtained from leftover parts of serums received in the laboratory for analysis from Biochemistry Department of Faculty of Medicine of Ege University.

The serum parameters which were affected by hemolysis such as total acid phosphatase, lactate dehydrogenase, total cholesterol and total bilirubin were choiced to examine. These parameters were assayed by the methods which were being applied in the hospitals in İzmir. The hemolysate was added to serum specimens to obtain, 151, 186, 246, 616, 916 mg/L Hb final concentrations and the controlled in vitro hemolysis was occured by this way.

It was found that there were positive and significant correlations between increased hemoglobin concentrations

and total acid phosphatase, lactate dehydrogenase activities and the concentration of total cholesterol. The correlation coefficients were ( $r= 0.984, p < 0.05$ ), ( $r= 0.948, p < 0.05$ ), ( $r= 0.908, p < 0.05$ ) respectively. The correlation between the degree of hemolysis and the concentrations of serum total bilirubin was found to be significant but negative ( $r=-0.712, p < 0.05$ ).

In vitro hemolysis occurred quantitatively was also evaluated qualitatively (0-4+) to investigate the relation between our results and the routine evaluation.

It was concluded that our results were in agreement with the papers and the deviated results of assayed serum parameters in no visible hemolysis were also observed.

K A Y N A K L A R

1. Ahlquist, D.A., Schwartz, S., "Use of leuco-dyes in the quantitative colorimetric microdetermination of hemoglobin and other heme compounds."  
Clin.Chem., Vol.21., no.3, (1975), 362-69.
2. Amador, E., Dorfman, L.E., Wacker, E.C., "Serum lactic dehydrogenase activity: An analytical assessment of current assays."  
Clin.Chem., Vol.9, No.4, (1963), 391-99.
3. Bauer, J.D., Ackerman, P.G., Toro, G., "Clinical Laboratory Methods" Saint.Louis, The C.V.Mosby Company, 1974, S.134, 490, 483, 485, 448, 449, 402.
4. Bhagavan, N.V., "Biochemistry A Comprehensive Review", Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1974, s.592.
5. Blattner, R.J., "Hemolysis of erythrocytes", J.Pediat. 55, Nov.59, 668-71.
6. Brydon, W.G., Roberts, L.B., "The effect of haemolysis on the determination of plasma constituents",  
Clin.Chim. Acta 41, (1972), 435-38.

7. Buhl, S.N., Jackson, K.Y., Lubinski, R., Vanderlinde, R.E.,  
"A search for the best buffer to use in assaying human  
lactate dehydrogenase with the lactate-to-pyruvate  
reaction."  
Clin.Chem., Vol.22, No.11, (1976), 1872-75.
8. Caraway, W.T., "Chemical and diagnostic specificity of  
laboratory tests."  
Am.J.Clin.Path. May(1962), 445-63.
9. Caraway, W.T., Kammeyer, C.W., "Chemical interference by  
drugs and other substances with clinical laboratory  
test procedures."  
Clin.Chim.Acta 41, (1972), 395-434.
10. Chan, K.M., Scott, M.G., Wu, T.W., et. al. "Inaccurate  
values for direct bilirubin with some commonly used  
direct bilirubin procedures."  
Clin.Chem. Vol.31, No.9, (1985), 1560-63.
11. Crosby, W.H., Furth, F.W., "A modification of the Benzidine  
method for measurement of hemoglobin in plasma and urine."  
Blood, 11, (1956), 380-83.
12. Davidson and Henry, Todd-Sanford Clinical Diagnosis by  
Laboratory Methods, 15 th ed., Philadelphia, W.B. Saunders  
Company, 1974,
13. Devlin, T.M., Textbook of Biochemistry with Clinical Corre-  
lations, New York, John Wiley and Sons. Inc., 1982, s.1081.

14. Dumas, B.T., Biggs, H.G., "Determination of serum albumin." *Stand. Methods, Clin. Chem.* 7, (1972), 175-188.
15. Dumas, B.T., Perry, B.W., Sasse, E.A., Straumfjord, J.V., "Standardization in bilirubin assays: Evaluation of selected methods and stability of bilirubin solutions." *Clin. Chem.* 19, (1973), 984-993.
16. Frank, J.J., Bermes, E.W., Bickel, M.J., Watkins, B.F., "Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum." *Clin. Chem.*, Vol. 24, No. 11, (1978), 1966-70.
17. Gay, R.J., McComb, R.B., Bowers, G.N., "Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity." *Clin. Chem.*, Vol. 14, No. 8, (1968), 740-53.
18. Gayton, A.C., *Textbook of Medical Physiology*, 5th ed., W.B. Saunders Company, Philadelphia, 1976, s.90.
19. Hargreaves, T., "Neonatal serum bilirubin estimation.", *Clin. Chim. Acta.*, 26, (1969), 931-37.
20. Laessig, R.H., Hassemer, D.J., Paskey, T.A., Schwartz, T.H., "The effects of 0.1 and 1.0 per cent erythrocytes and hemolysis on serum chemistry values." *A.J.C.P.*, Vol. 66, Oct. (1976), 639-44.
21. Logue, G.L., Rosse, W.F., Adams, J.P., "Mechanisms of immune lysis of red blood cells in vitro." *Jour. Clin. Invest.* Vol. 52, (1973), 1129-1137.

22. Mather, A., Mackie, N.R., "Effect of hemolysis on serum electrolyte values."  
Clin.Chem., Vol.6., No.3, (1960), 223-27.
23. Mathies, J.C., "Evaluation of a new device for rapidly separating serum or plasma from blood."  
Clin.Chem. Vol.20, No.12, (1974), 1573-76.
24. McGann, C.J., Carter, R.E., "The effect of hemolysis on the van den Bergh reaction for serum bilirubin."  
The Journal of Pediatrics, Vol.57, No.2, (1960), 199-203.
25. Mountcastle, V.B., Medical Physiology, Vol.2, Saint-Louis, The C.V. Mosby Company, 1980, s.1132.
26. Müftüoğlu, E., Klinik hematoloji, Diyarbakır, Dicle Üniversitesi Basımevi, 1986, s.108.
27. Ness, A.T., Pastewka, J.V., Peacock, A.C., "Evaluation of a recently reported stable Liebermann-Burchard reagent and its use for the direct determination of serum total cholesterol."  
Clin.Chim.Acta, 10, (1964), 229-237.
28. Perrelli, W.V., Watson, C.J., "Comparison of the Weber-Schalm method with the Ducci-Watson modification of the Malloy-Evelyn method for serum bilirubin determination."  
Clin.Chem., Vol.16, No.3, (1970), 239-246.
29. Pesce, M.A., Bodourian, S.H., "Enzymic measurement of cholesterol in serum with the Centrifichem centrifugal analyzer."  
Clin.Chem., Vol.23, No.2, (1977), 280-82.

30. Poon, P.K., "A Jendrassik-Grof method modified to eliminate hemoglobin interference with assay of total serum bilirubin."  
Clin.Chem., 19, (1973), 984-993.
31. Raphael, S.S., Lynch's Medical Laboratory Technology, Philadelphia, W.B Saunders Company, 1983, s.248, 245.
32. Richmond, W., "Preparation and properties of a cholesterol oxidase from Nocardia sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum."  
Clin.Chem., Vol.19, No.12, (1973), 1350-56.
33. Richmond, W., "Use of cholesterol oxidase for assay of total and free cholesterol in serum by continuous-flow analysis."  
Clin.Chem., Vol.22, No.10, (1976), 1579-1588.
34. Romas, N.A., Rose, N.R., Tannenbaum, M., "Acid phosphatase: New developments."  
Human Pathology, Vol.10. No.5, (1979), 501-11.
35. Rothwell, D.J., Jendrzyczak, B., Becker, M., Dumas, B.T., "Lactate dehydrogenase activities in serum and plasma."  
Clin.Chem., Vol.22, No.7, (1976), 1024-26.
36. Schwartz, M.K., "Interferences in diagnostic biochemical test procedures."  
Adv.Clin.Chem. 16, 1, (1973), 2-45.
37. Shull, B.C., Lees, H., Li, P.K., "Mechanism of interference

- by hemoglobin in the determination of total bilirubin."  
Clin.Chem., 26, (1980), 22-29.
38. Sonnenwith,A.C., Jareth,L., Gradwohl's Clinical Laboratory  
Methods and Diagnosis, Vol.1, Saint-Louis, The C.V. Mosby  
Company, 1980, s.151,157,159,160,168.
39. Spencer,W.W., Nelson,G.H., Konicki,K.A.,"Evaluation of a  
new system (Corvac) for separating serum from blood for  
routine laboratory procedures."  
Clin.Chem., Vol.22, No.7, (1976), 1012-16.
40. Strand,F.L., Physiology, 2 nd ed.,  
McMillan Publishing Co., Inc., New York (1978), 52.
41. Tietz,N.W.,(Ed.) Textbook of Clinical Chemistry, W.B  
Saunders Company, 1983, s.488,752,691,882.
42. Vural,S., Çetin,E.T., Tuzlacı,U., Tağ.T., Klinik Teşhisde  
Laboratuvar, İstanbul, Nurettin Uycan Cilt ve Basım San.  
A.Ş., 1986, s.70.
43. Williams,D., Marks,V., Biochemistry in Clinical Practice,  
New York, William Heineman Medical Books LTD, 1983, s.214.
44. Wilson,J.F., Jobling,D.M.,"Precipitation reaction between  
serum and lysed erythrocytes."  
Nature, May 6, Vol.190, (1961), 550.
45. Wintrobe,M.M., Clinical Hematology, Philadelphia, Lea  
and Febiger Company, 1983, s.175-177.



46. Yam.,L.T., "Clinical significance of the human acid phosphatases."  
The American Journal of Medicine, Vol.56, May (1974),  
604-16.
47. Yılmaz,B., Fizyoloji, Ankara, Hacettepe TAŞ. 1984,  
s.128-129.
48. Zak,B., "Cholesterol methodologies: A review."  
Clin.Chem., Vol.23, No.7, (1977), 1201-14.

## ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında İzmir'de doğdum. İlk ve orta öğrenimimi İzmir'de tamamladıktan sonra 1980 yılında E.Ü. Eczacılık Fakültesine girdim ve 1985 yılında mezun oldum. Aynı yıl E.Ü. Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans eğitimime başladım.