

SERUM KİMYASAL DEĞERLERİNE İN VİTRO HEMOLİZİN ETKİSİ (x)

Nuri BAKAN (xx)

ÖZET

Serum örneklerinde görülen hemoliz bilinen bir gerçektir. Bu çalışmada belli başlı kimyasal deney sonuçları üzerine hemolizin etkisi incelenmektedir. Hemoglobinin konsantrasyonu 90-2800 mg/lt olacak şekilde ve teknisyenler tarafından hemoliz olduğu ifade edilecek şekilde seruma hemolizat ilave edilerek suni hemoliz meydana getirilmiştir. Özellikle asit fosfataz ve kreatin kinaz gibi serum bileşenlerine ait değerler üzerine hemolizin etkisinin metoda bağlı olarak değiştiği gösterilmiştir. Beklenildiği gibi, hemoliz, laktat dehidrogenaz (LDH) değerlerini oldukça değiştirecektir.

GİRİŞ

Kimyasal analizler için alınan serumun maksada uygun olmayışının başlıca sebebi hemolizdir. İn vitro hemoliz ya uygun olmayan kan alınışından dolayı ya da santrifüjasyon veya ayırma esnasında meydana gelebilir.

Hemoliz üç türlü etki meydana getirir: 1-Eritrosit bileşenlerinin serbest bırakılması, serumda bazı değerlerin artmasına neden olur. 2-Eritrosit bileşenlerinin serbest bırakılmasıyla birtakım dilüsyonlar olur. 3-Kolorimetrik tayinlerde, hemoglobin direk olarak rengi değiştirir.

Caraway, eritrositlerin plazmaya göre 160 kat daha fazla LDH, 67 kat daha fazla fenil fosfataz, 20 defa daha fazla amino transferaz ve 23 kat daha fazla potasyum ihtiva ettiğini göstermiştir. Aşırı dilüsyona sebep olan hemoliz, kolesterol esterleri, sodyum ve potasyum sonuçlarını değiştirebilir.

Çalışmanın amacı, in vitro hemoliz ile klinik kimyasal sonuçlar arasındaki ilişkiyi araştırmaktır. Elde edilen sonuçlar, bu konuda daha önce elde edilmiş olanlara göre daha güvenilir sonuçlardır.

(x) Orijinalinden kısaltılarak Türkçeye çevrilmiştir. Clin-chem. 24/11. 1966-70 (1978)

(xx) Araş. Gör., Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı

MATERYAL VE METODLAR

Total kan hemolizinin in vitro etkisini incelemek için, serum havuzuna parçalanmış eritrositler ilave edilmiştir. Bu eritrositler laboratuvara gelen kanlardan elde edilmiştir. Bu şekilde 6 serum havuzu hazırlanmış, kullanılıncaya kadar -20°C de saklanmıştır.

Eritrosit hemolizati, antikoagulan olarak disodyum etilen diamintetra asetik asit (EDTA) ın kullanıldığı kan örneklerinden hazırlandı. Santrifüj edilerek ayrılan eritrositler üç defa izotonik tuz çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra eşit hacimde deiyonize su ve 2,0 mg Na-saponin ilave edilerek eritrositler parçalandı. Serumun litresinde 0.125,0.250,0.50,0.75,1,0 2.0,3.0,4.0,5.0,6.25,7,5 ml eritrosit olacak şekilde 20 ml'lik serum havuzlarına yeterli miktarda hemolizat ilave edilmiştir. 12 değişik konsantrasyonlu 6 serum havuzu (yani 72 numune) 24 saat içerisinde analize tabi tutulmuştur.

Hemoglobin konsantrasyonu benzidin metoduyla tayin edildi. Elektrolitler (Na^+ , K^+ , Cl^- , HCO_3^-) konsantrasyonu bu iyonlara ait iyon seçici elektrolitler ve alev fotometresi kullanılarak tayin edilmiştir. CO_2 titrimetrik bir işlemle tayin edilmiş, magnezyum atomik absorpsiyon aletiyle ve Connerty ve arkadaşlarının metoduna göre tesbit edilmiştir. Serum demiri Du Pont aca metodu ve Henry ve arkadaşlarının metoduna göre tayin edilmiştir. Serum elektrolitleri ve bazı katyonlara ait değerler tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1-Serum elektrolitleri ve bazı katyonlara ait sonuçlar. (a)

Hemoglobin (kalitatif)	0	eser	2+	4+	Değişim (0-4+)	
	90	320	1440	2800	U/lt	%
Stat İon						
Sodyum, mmol/lt	143	143	143	143	0	0
Klor, mmol/lt	108	108	109	109	+1	+1
Bikarbonat, mmol/lt	23,3	22,6	22,0	21,5	-18	-8
Potasyum, mmol/lt	4,3	4,4	4,7	5,1	+0,8	+19
Alev fotometresi						
Sodyum, mmol/lt	143	143	143	142	-1	-1
Potasyum, mmol/lt	4.3	4,4	4,7	5,0	+0,7	+16
aca						
Demir, $\mu\text{g}/\text{lt}$	780	780	850	860	+80	+10
Magnezyum, mmol/lt	1,7	1,7	1,8	1,7	0	0
Atomik Absorpsiyon						
Magnezyum, mmol/lt	1,9	1,8	1,8	1,9	0	0
Manuel-Henry metodu						
Demir, $\mu\text{mol}/\text{lt}$	820	830	890	1020	+200	+24

(a) Bu değerler, 6 serum havuzuna ait ortalama değerleri göstermektedir.

Enzim aktivitelerindeki değişmeler değişik metodlarla tayin edilmiş ve tablo 2'de gösterilmiştir. Ayrıca, sonuçlar oto analizör ile de tayin edilmiştir. Bu sonuçlar da tablo 3'de verilmiştir.

SONUÇLAR

Hazırlanan 6 serum havuzunda, hemoglobinin konsantrasyonu 90-2800 mg/lt olarak tayin edilmiştir. Serum elektrolit değerleri ise tablo 1'de özetlenmiştir. Hemoglobinin konsantrasyonuna paralel olarak potasyum konsantrasyonunda % 0,75 mmol/lt'lik bir artış olurken bikarbonat konsantrasyonunda kullanılan metoda bağlı olarak % 24 lük bir konsantrasyon artışı vardır.

Enzim aktivitelerindeki değişiklikler tablo 2'de gösterilmiştir. Tablodan görüleceği gibi, laktat dehidrogenaz hemolize karşı oldukça hassastır. Litrede 260 U'lik bir artış LDH aktivitesini 2,5 kat artırmaktadır.

Aynı şekilde, aspartat amino transferaz aktivitesindeki 24 U/lt'lik bir artış, yaklaşık 2 kat daha fazla aktivite göstermesine sebep olmuştur. Kreatin kinaz ve asit fosfataz enzimleri için de kayda değer artışlar vardır.

Oto analizörü ile elde edilen sonuçlara göre ise (Tablo 3) değerler ya hiç değişmemiş ya da çok az değişmiştir. Beklenildiği gibi LDH ve amino transferaz değerleri önemli derecede artış gösterirken, total bilirubin konsantrasyonu % 22 gibi aşık bir düşüş göstermiştir.

Tablo 2. Enzim Değerleri

Hemoglobin (Kalitatif)	0	eser	2+	4+	Değişim (0—4+)	
Hemoglobin, mg/lt	90	320	1440	2800	U/lt	%
	Aktivite, U/lt					
Aspartat aminotransferaz						
Du Pont aca	31	34	47	57	+26	+84
Gilford 3500	32	32	41	54	+22	+69
Laktat Dohidrojenaz						
Du Pont aca	184	207	320	448	+260	+143
Gilford 3500	170	194	301	434	+264	+155
βOH Butirat Dehidrogenaz						
Du Pont aca	267	309	481	677	+440	+153
Kreatin kinaz						
Du Pont aca	57	66	98	131	+74	+130
Gilford 3500	57	57	62	77	+20	+35
Asid fosfataz						
Du Pont Aca	0,18	0,18	0,19	0,22	+0,04	+22
Bodansky	0,41	0,41	0,43	0,47	+0,06	+15
Besey, Lowry Brock	0,19	0,24	0,41	0,79	+0,6	+315

Tablo 3. Oto analizörden elde edilen değerler.

Hemoglobin (Kalitatif)	0	eser	2+	4+	Değişim (0—4+)	
					U/lit	%
Hemoglobin, mg/lit	90	320	1440	2800		
1- Kalsiyum, mg/lit	93	93	93	93	0	0
2- İnorganik fosfat, mg/lit	38	39	39	39	+1	+2
3- Glukoz, mg/lit	1130	1140	1140	1140	+10	+1
4- Üre azotu, mg/lit	182	182	182	182	0	0
5- Ürik asid, mg/lit	55	55	56	56	+1	+2
6- Albumin, g/lit	39	39	39	39	0	0
7- Alk. fosfataz, U/lit	60	60	60	60	0	0
8- Kolesterol, mg/lit	2060	2090	2120	2130	+70	+3
9- Total protein, gl/lit	70	71	72	72	+2	+3
10- Total bilirubin, mg/lit	5,2	4,8	4,6	4,1	-1,1	-28
11- Laktat dehidrogenaz, U/lit	179	201	318	424	+245	+137
12- Asp. aminotrasferaz, U/lit	36	38	48	60	+24	+66

TARTIŞMA

Bu çalışmada elde edilen sonuçlar daha önce elde edilmiş olan sonuçlarla uyumaktadır. Aşırı hemoliz olmuş bir numunede belli başlı değerlerdeki artış % 1,5 dir. 7,5 ml/lit parçalanmış eritrosit ilave edildiği zaman, hemoglobin konsantrasyonundaki artış 2710 mg/lit dir. Halbuki beklenen artış 2550 mg hemoglobindir.

Tablolarda verilen değerlere bakıldığında konsantrasyon veya aktivitedeki artış veya azalış fazla önemsenmemelidir. Konsantrasyon değişimi daha önemlidir. Potasyum, bikarbonat ve demir konsantrasyonlarında önemli değişiklik vardır.

0,75 mmol/lit'lik bir potasyum artışı, beklenen bir değerdir. Sodyum (Serum[Na⁺]/Eritrosit[Na⁺]=8,75/1) Kalsiyum (Serum [Ca⁺⁺]/Eritrosit [Ca⁺⁺] = 10/1) Magnezyum (Serum [Mg⁺⁺]/Eritrosit [Mg⁺⁺]=0,35/18 ve Klor (Serum [Cl⁻]/Eritrosit [Cl⁻]=2/1) konsantrasyonunun ölçülmesinden elde edilen sonuçlar hemolizle değişme göstermemiştir. Enzim araştırmalarında ise hemolizle LDH aktivitesinde bir artış gözlenmiştir. Şöyleki LDH aktivitesindeki bir artış hemoliz derecesini gösterir.

EFFECT OF IN VITRO HEMOLYSIS ON CHEMICAL VALUES FOR SERUM SUMMARY

Hemolysis in serum sepecimens is commonplace. This study examines the effect of hemolysis on results of selected chemical assays. Hemolysis was simulated

by adding hemolysate to serum to give hemoglobin concentrations of 90 to 2800 mg/liter and a rating by technologists of 0 to 4 + hemolyzed. The effect of hemolysis on values for some serum constituents, particularly acid phosphatase and creatine kinase, was shown to be method dependent. Not unexpectedly, hemolysis most affects results for lactate dehydrogenase.

KAYNAKLAR

- 1- Craway, T.W., Chemical and diagnostic specificity of laboratory tests. *Am. J. Clin. Pathol.* 37, 445 (1965).
- 2- Laessig, R.H., Hassemer, D.J., Paskey, T.A., and Schwartz, T.H., The effects of 0,1 and 1,0 per cent erythrocytes and hemolysis on serum chemical values. *Am. J. Clin. Pathol.* 66, 639 (1976).
- 3- Schwartz, M., Interferences in diagnostic biochemical procedures. *Adv. Clin. Chem.* 16,1 (1973).
- 4- Brydon, W.G., Roberts, L.B., The effects of haemolysis on the determination of plasma constituents. *Clin. Chim. Acta* 41, 435 (1972).
- 5- Crosby, W.H., and Furth, F.W., A modification of the benzidine method for measurement of hemoglobin in plasma and urine. *Blood* 11, 380 (1956).
- 6- Henry, R.J., Sobel, C., and Chiamori, N., On the determination of serum iron and iron-binding capacity. *Clin. Chim. Acta* 3,523 (1958).
- 7- Connerty, H.V., Lau, H.S.C., and Briggs, A.R., Spectrophotometric determination of magnesium by use of methylthymol blue. *Clin. Chem.* 17, 661 (1971).
- 8- Henry, R.J., Chiamari, N., O.J., and Berkaman, ZS., Revised spectrophotometric methods for the determination of glutamic oxalacetic transaminase, glutamic-pyruvic transaminase and lactic acid dehydrogenase. *Am. J. Clin. Pathol.* 34, 381 (1960).
- 9- Wacker, W., Ulmer, D., and Vallee, B., Metalloenzymes and myocardial infarction. II. Malic and lactic dehydrogenase activities and zinc concentration in serum. *N. Engl. J. Med.* 255, 449 (1956).
- 10- Gay, R., McComb, R., and Bowers, G., Optimum reaction conditions for human lactate dehydrogenase isoenzymes as they affect total lactate dehydrogenase activity. *Clin. Chim.* 14, 740 (1968).
- 11- Rosalri, S.B., and Wilkinson, J.H., Serum hydroxybutyrate dehydrogenase in diagnosis. *J. Am. Med. Assoc.* 189, 61 (1964).

- 12- Oliver, I.T., A spectrophotometric method for the determination of creatine phosphokinase myokinase. *Biochem. J.* 61, 116 (1955).
- 13- Rosalki, S.B., An improved procedure for serum creatine phosphokinase determination. *J. Lab. Clin. Med.* 69, 696 (1967).
- 14- Szasz, R., Gerhardt, W. Gruber, W. and Bernt, E., Creatine kinase in serum: 2. Interference of adenylat kinase with the assay. *Clin. Chem.* 22, 1806 (1976).
- 15- Roy, A.U., Brover, M.E., and Haydon, J.E., Sodium thymophthalein monophosphate: A new acid phosphate substrate with greater cpecificity for the prostatic enzyme in serum. *Clin. Chem.* 17, 1093 (1971).
16. Henry, R.J., *Clinical Chemistry: Principles and Technic*, 1st. en. Harper and Row, New York, N.Y., 1965, p. 486.
17. Bessey, O.A., Lowry, O.H., and Brock, M.J., A Method for the rapid determination of alkaline phosphatase with five cubic milliliters of serum. *J. Biol. Chem.* 164, 321 (1946).
18. Tietz, N.W., Electrolytes. In *Fundamentals of Clinical Chemistry*, 2 and ed., N. Tietz, Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, Pa., 1976, p 873.
19. Hicks, J.M., Aldrich, F.T., and Iosefsohn, M., An evaluation of the Beckman Chloride/Carbon Dioxide Analyzer. *Clin. Chem.* 22, 1868 (1976).
20. Kachmar, J.F., and Mose, D.W., Enzymes. In *Fundamentals of Clinical Chemistry* 2nd ed., N. Tietz, Ed., W.B. Saunders, Philadelphia, Pa., 1976. p 583.
21. Szasz, G., Gerhardt, W., and Gruber W., Creatine kinase in serum: 3. Furt-hert study of adenylate kinase inhibitors. *Clin. Chem.* 23, 1888 (1977).
22. Caraway, W.T., and Kammeyer, C.W., Chemical intrference by drugs and other substances with clinical laboratory ttest procedures. *Clin. Chim. Chim. Acta* 41, 395 (1972).
23. McGann, C.J., and Carter, R.E., The effect of hemolysis on the Van den Bergh reaction for serum bilirubin, *J. Pediat.* 57, 199 (1960).