

# Hemoliz ve lipeminin biyokimyasal testlere etkisi ve lipemik etkinin uzaklaştırılmasında kullanılan yöntemlerin karşılaştırılması

Yaşar Hüseyin Türkmen (\*), Muhittin A.Serdar (\*), Adnan Haşimi (\*), Murat Cihan (\*), İsmail Kurt (\*), Şerif Akman (\*), Türker Kutluay (\*), M.Kemal Erbil (\*)

## Özet

Bu çalışmada, biyokimyasal test sonuçlarını etkileyen önemli nedenler arasında bulunan hemoliz ve lipeminin laboratuvar sonuçlarında neden olduğu değişimler ve bunların engellenmesi amaçlanmıştır. Hemoglobinin içeriğine göre beş farklı, lipid içeriğine göre ise 3 farklı serum havuzu ve 10 farklı doğal lipemik hasta serumunda biyokimyasal test ölçümleri yapılmıştır. Ayrıca lipeminin eliminasyonu için ultrasantifüjasyon, karbontetraklorür (CCl<sub>4</sub>), LipoClear® ekstraksiyonu ve serum örneğinin 1:4 dilüsyonu yöntemleri karşılaştırıldı. Hemoliz etkisi incelendiğinde, hemoglobin konsantrasyonu 750 mg/dl'den fazla olduğunda LDH, konjuge bilirubin, AST ve potasyum değerlerinin arttığı, amilaz ile ürik asit değerlerinin ise anlamlı düştüğü saptanmıştır. İn vitro lipemik çalışmada özellikle total protein etkilenirken, doğal lipemik serumlarda üre, bilirubinler, ALT, AST, GGT ve LDH testlerinin etkilendiği gözlenmiştir. Lipemik etkisini azaltmak için uygulanan eliminasyon tekniklerinin tümünün etkin olduğu değerlendirildi. Lipemik etkisinin uzaklaştırılmasında LipoClear® ve ultrasantifüj teknikleri yüksek maliyetli olup, çok işlem ve özel ekipman gerektirmektedir. Basit ve ucuz olan seyreltme ve CCl<sub>4</sub> ile çöktürme yöntemlerinin ise daha pratik ve her laboratuvar için uygun ve ekonomik olduğu değerlendirilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Biyokimyasal testler, hemoliz, interferans, lipemi

## Summary

**The effects of hemolysis and lipemia on biochemical analyses and comparison of the methods used in the elimination of lipemic effect**

In this study our objectives were the evaluation of interferences on biochemical analyses caused by hemolysis and lipemia, which are of important causes of interference, and prevention of these interferences. Various biochemical analyses were carried out by using five serum pools with different hemoglobin concentrations, three serum pools with different lipid concentrations and ten intrinsically natural lipemic sera from different patients. Moreover, efficacies of ultracentrifugation, carbontetrachloride (CCl<sub>4</sub>), LipoClear® extraction and 1:4 dilution for the elimination of lipemia were compared. Regarding the effect of hemolysis, serum LDH, conjugated bilirubin, AST and potassium levels were found to increase, and amylase and uric acid levels were found to decrease at hemoglobin concentrations of >750 mg/dL. In the study of in vitro lipemia, total protein was especially affected, and serum urea nitrogen, bilirubins, AST, ALT, GGT and LDH were affected in naturally lipemic serums. All of the lipemia elimination methods were found to be adequately efficacious. Ultracentrifugation and LipoClear® methods in elimination of the lipemic effect are expensive and require special equipment. Dilution and CCl<sub>4</sub> precipitation methods are more practical, appropriate and economical for every laboratory.

**Key words:** Biochemical analysis, hemolysis, interference, lipemia

## Giriş

Analitik süreçleri etkileyebilecek faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkün olduğu kadar giderilmesi, sonuçların doğruluğunu sağlamak açısından son derece önemlidir; buna göre analiz sonuçlarının yorumlama etkinliği için hastanın klinik tablosunun belirlenmiş olması ve test isteğiyle birlikte laboratuvar uzmanına iletilmesi gereklidir (1-3).

Laboratuvar sonuçlarının etkin yorumlanmasını sağlamak için, hastanın klinik tablosunun doğru biçimde belirlenmiş olması ön koşuldur. Bu nedenle, sonuçları etkileyen faktörlerin önceden bilinmesi ve mümkünse giderilmesi sonuçların doğruluğu açısından çok önemlidir (1-3).

Klinik biyokimya laboratuvar hataları; analiz öncesi (preanalitik), analiz anı (analitik) ve analiz sonrası (post analitik) olmak üzere başlıca üç ana grupta incelenir. Preanalitik ve analitik hataları en az düzeyde tutmak için laboratuvarların olanakları dahilinde çeşitli uygulamalar yapılmaktadır (1-3).

Analitik dönem laboratuvar problemlerinin başında hemoliz ve lipemik yer alır. Eritrositlerin parçalanarak hemoglobinin (Hb) içeriğinin hücre dışına yayılması durumu olarak ta-

\*GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD

**Ayrı basım isteği:** Dr. Muhittin A.Serdar, GATA Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD, Etlik-06018, Ankara

**E-mail:** maserdar@gata.edu.tr

**Makalenin geliş tarihi:** 07.08.2006

**Kabul tarihi:** 12.12.2006

nımlanan 'hemoliz', in vivo (hemolitik anemiler, uygunsuz kan transfüzyonları, bakteri-hayvan [yılan, örümcek gibi] toksinleri, eritrofagozitoz olayları vb.) veya in vitro (ozmotik parçalanma, kompleman bağımlı hücre yıkılması, fiziksel-mekanik veya kimyasal etkiler gibi) nedenlerle oluşabilir (1-3).

Lipemi ise kanda şilomikron düzeyinin aşırı yüksekliğine bağlı makroskopik bulanıklık bulunması hali olarak tanımlanabilir. Şilomikron etkisini azaltmak için kan örneklerinin bir gece açlık sonrası alınması kısmen etkinlik sağlayabilirken, yağ metabolizma bozukluğu olan bireylerde veya acil laboratuvar analizi yapılması gerekli olan hastaların kan örneklerindeki lipemi, laboratuvar sonuçlarını etkileyerek değerlendirmelerde yanılgılara neden olabilir (3).

Bu çalışmada, laboratuvarımızda uygulanmakta olan bazı klinik biyokimya yöntemleri kullanılarak, seçilen serum parametrelerine lipemi ve hemolizin etkisi ve lipidlerin uzaklaştırılmasının sonuçlara olan etkisi araştırıldı.

### Gereç ve Yöntem

Çalışma 2003-2004 yılları arasında Gülhane Askeri Tıp Akademisi Biyokimya ve Klinik Biyokimya AD laboratuvarlarında yapılmıştır.

**Lipidlerin etkilerinin incelenmesi:** İn vitro lipemi çalışmasında 2'si normal, 5'i patolojik değerler içeren toplam 7 serum havuzu oluşturuldu. Bu serum havuzlarına üç farklı düzeyde Lipovenöz (LV) (Fresenius AG, Hamburg, Germany) yağ emülsiyonu eklendi. Bu amaçla, her bir serum havuzu iki bölüme ayrıldı. Yüzde 20'lik LV solüsyonu katılarak 20, 10 ve 5 g/LLV konsantrasyonunda havuzlar elde edildi. Bu şekilde hazırlanan toplam 28 serum havuzunda AU 600 otoanalizörü (Olympus, Japan) ile glukoz, üre, kreatinin, ürik asid, kolesterol, trigliserid, total protein,

albümin, direkt ve indirekt bilirübin, alanin aminotrasferaz (ALT), aspartat aminotrasferaz (AST), gama glutamiltransferaz (GGT), amilaz, kreatin kinaz (CK), laktat dehidrogenaz (LDH), alkalen fosfataz (ALP), sodyum (Na), potasyum (K) ve klor (Cl) ölçümleri orijinal kitleri kullanılarak, ardışık ikişer defa ölçüldü.

Bu ölçümlere ek olarak, her bir serum havuzunun absorbanı, ışık saçılım indeksi (ISI) ve lipemi indeksi (LI) değerleri elde edildi. Absorbans okumaları için 4 ml %0.9'luk sodyum klorür (NaCl) çözeltisi içine ölçümü yapılan serum havuzundan 50 µl eklenerek karıştırıldı ve spektrofotometre (Shimadzu Corporation; Kyoto, Japan) ile 340 nm'de suya karşı absorban ölçümü yapıldı. Işık saçılımı indeksi (ISI) ölçümleri için absorban ölçümlerinde kullanılan karışımlar kullanıldı ve florometrede (Perkin Elmer, UK)  $\lambda_{ex} = 340$  nm ve  $\lambda_{em} = 700$  nm'de suya karşı floresan ölçümleri yapıldı. LI değerleri, Olympus AU 600 analizörünün serum indeks fonksiyonu kullanılarak elde edildi. İn vivo (doğal) lipemi çalışmasında klinik laboratuvarımızda rutin çalışmalar sırasında karşılaşılan ve trigliserid konsantrasyonu 500 mg/dl üzerinde olan 10 serum örneği kullanıldı. Lipemi interferansını ortadan kaldırmak amacıyla organik çözücü (CCl<sub>4</sub>), LipoClear® ise ekstraksiyon, ultrasantrifüjasyon ve dilüsyon yöntemleri kullanıldı. Organik çözücü ekstraksiyonunda lipemik serum örnekleri, karbon tetraklorür (CCl<sub>4</sub>) ile ekstre edilerek lipidler ortamdaki uzaklaştırıldı. Bu amaçla lipemik serumu CCl<sub>4</sub> (%50)/(%50) v/v eklendi ve bu karışım vorteks cihazında 1 dakika süreyle karıştırıldı, 5 dakika oda sıcaklığında dinlendirildikten sonra 4.500 g hızında oda sıcaklığında 30 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant ayrılarak analiz için kullanıldı. LipoClear® (StatSpin, Westwood, MA)

ile ekstraksiyonda içinde 0.3 ml reaktif bulunan ependorf tüplerine, 1.5 ml in vivo lipemik ve in vitro olarak lipemik hale getirilmiş olan serum örnekleri kondu. Vorteks cihazında karıştırıldı ve oda sıcaklığında 5 dakika bekletildi; daha sonra örnekler santrifüj edildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant analiz için kullanıldı. Analiz sonucunda çıkan sonuçlar, dilüsyon faktörüne bağlı olarak 1.2 katsayısı ile çarpıldı. Ultrasantrifüjasyon işlemi lipemik serum örnekleri, 140.000 g'de 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi (Sorvall Combi Plus DuPont, USA). Santrifüj sonrası altta kalan fraksiyonu, analiz için kullanıldı. Dilüsyon yönteminde, lipovenöz emülsiyon ve doğal olan lipemik serum örnekleri, çalışma öncesi 1/4 oranında serum fizyolojik (%0.9 NaCl) ile dilüe edildi. Analiz sonucunda çıkan sonuçlar dilüsyon katsayısı ile çarpıldı.

**Hemoliz çalışmaları:** İn vitro hemoliz çalışmasında dört patolojik ve bir normal serum havuzu kullanıldı. Serum havuzları ölçüm gününe kadar derin dondurucuda -40°C'de muhafaza edildi. Hemolizat hazırlanmasında EDTA'lı tüpe alınan 6 ml kan örneği 5.000 g de 5 dakika santrifüjlenerek plazması ayrılarak atıldı. Dipte kalan hücre paketi 8 ml serum fizyolojik ile 3 kez yıkandı ve her yıkama işlemi sonrası 3 dakika 5.000 g'de santrifüj edilerek üst kısım atıldı. Son yıkama sonrası santrifüj edilip yıkama solüsyonu ortamdaki uzaklaştırıldıktan sonra yıkanmış eritrosit paketi üzerine eşit hacimde distile su ilave edildi. Distile su ilave edilen eritrosit paketi daha sonra -40°C'de 20 dakika bekletilerek eritrositlerin patlaması ve hemoliz olmaları sağlandı. Örnekler 3 dakika 5.000 g'de santrifüj edilerek üstte kalan hemolizat ayrıldı. Elde edilen bu hemolizatın hemoglobinin miktarı Coulter® STKS tam kan sayımı cihazında (Beckman Coulter, Inc. CA, USA) tespit edildi. Hazırlanan

bu hemolizat her bir serum havuzunun son Hb konsantrasyonu 0 (-), 90 ( $\pm$ ), 375 (+), 750 (++) , 1.500 (+++) , 3.000 (++++ ) mg/dl olacak şekilde hesaplanarak eklendi.

Hemoliz ve lipeminin test sonuçlarına etkileri klinik olarak 'kabul edilebilir' veya 'kabul edilemez' yorumları yapılırken CLIA 88 kriterleri göz önünde bulundurulmuştur (4). Çalışmadaki veriler tanımlayıcı özellikte sunulmuştur.

## Bulgular

Farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış olan serum havuzlarında yapılan değerlendirme sonuçlarına göre 90 ve 375 mg/dl Hb içeren serum örneklerinin biyokimya analizlerine etkisi kabul edilebilir sınırlarda iken, 750 mg/dl Hb konsantrasyonunda konjuge bilirubin, LDH ve amilaz; 1.500 mg/dl Hb içeren serum örneklerinde ilave olarak ürik asit, ankonjuge bilirubin, AST ve potasyum; 3.000 mg/dl Hb konsantrasyonunda ise ayrıca CK ölçümlerindeki farklılığın kabul edilebilir değerlerin üzerinde olduğu saptandı (Tablo I).

İn vitro lipemi çalışması kapsamında 5, 10, 20 gr/L konsantras-

yonlarda lipovenöz (LV) solüsyonu içeren serum örneklerinde yapılan biyokimya analizlerinin sonuçları Tablo II'de gösterilmiştir. Burada özellikle LV içeren örneklerin total protein ölçüm değerlerinin, LV'suz

örneklere oranla anlamlı derecede yüksek olduğu saptanırken, diğer testlerde önemli bir değişim olmadığı gözlemlendi. Total proteinin gerçek değerlerine en yakın sonuçları elde etmek için bu çalışmada kullanılan

**Tablo I.** Hemolizin biyokimyasal testlere etkileri

	Hemoglobin düzeyi (mg/dl)				
	90 ( $\pm$ )*	375 (+)	750 (++)	1500 (+++)	3000 (++++)
Glukoz	0.99#	0.98	0.98	0.97	0.93
Üre	0.99	1.04	1.02	1.03	1.04
Kreatinin	0.98	0.99	0.99	0.98	0.92
Ürik asit	0.97	0.92	0.84	<b>0.71&amp;</b>	<b>0.32</b>
Total kolesterol	0.96	1.04	1.05	1.04	1.01
Trigliserid	1.00	0.99	0.99	0.99	0.99
HDL kolesterol	1.00	0.99	1.01	1.02	1.03
LDL kolesterol	0.92	1.08	1.09	1.07	1.02
VLDL kolesterol	1.00	1.00	0.99	0.99	0.99
Konjuge bilirubin	0.95	1.12	<b>1.35</b>	<b>1.71</b>	<b>3.40</b>
Ankonjuge bilirubin	0.93	0.88	0.81	<b>0.74</b>	<b>0.48</b>
AST	1.02	1.08	1.11	<b>1.33</b>	<b>1.89</b>
ALT	0.99	1.02	1.04	1.09	1.23
ALP	1.01	0.99	0.97	0.96	0.84
GGT	1.01	0.98	0.97	0.95	0.87
Total protein	0.99	1.00	1.01	1.04	1.09
Albümin	1.00	0.99	0.99	1.00	1.02
LDH	1.06	1.20	<b>1.44</b>	<b>1.90</b>	<b>2.93</b>
CK	1.01	1.02	1.01	1.10	1.22
Amilaz	0.93	0.82	<b>0.59</b>	<b>0.54</b>	<b>0.09</b>
Sodyum	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
Potasyum	1.04	1.02	1.06	<b>1.13</b>	<b>1.24</b>

\*: () parantez içerisindeki gruplamalar Hb değerine göre yapılmıştır

#: Sonuçlar interferansız ölçülen çalışma sonuçlarına oranlanarak sunulmuştur (Değişim katsayısı)

&: Kabul edilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir

**Tablo II.** Farklı tekniklerle lipeminin uzaklaştırılmasının laboratuvar testlerine etki oranları

Testler	Lipovenöz solüsyonlar														
	20 gr/L ilave edilen örnekler					10 gr/L ilave edilen örnekler					5 gr/L ilave edilen örnekler				
	LV	CCI <sub>4</sub>	Ultra	LC	D	LV	CCI <sub>4</sub>	Ultra	LC	D	LV	CCI <sub>4</sub>	Ultra	LC	D
Üre	1.02*	1.03	1.02	1.04	0.98	1.01	1.03	1.02	1.02	0.92	1.00	1.04	1.02	0.98	0.90
Kreatinin	1.03	1.14	1.14	1.13	1.28	1.00	1.06	1.06	1.03	1.21	1.02	1.04	1.05	1.00	1.17
Ürik asit	0.96	1.05	1.02	1.01	0.90	0.98	1.03	1.02	1.01	0.91	1.00	1.03	1.01	0.99	0.90
Total kolesterol	1.00	<b>0.28#</b>	0.93	<b>0.25</b>	<b>0.85</b>	1.00	<b>0.36</b>	0.94	<b>0.25</b>	<b>0.86</b>	1.00	<b>0.42</b>	0.94	<b>0.24</b>	0.86
Trigliserid	<b>8.16</b>	<b>4.69</b>	<b>5.30</b>	<b>4.72</b>	<b>8.87</b>	<b>4.92</b>	<b>2.44</b>	<b>2.95</b>	<b>2.52</b>	<b>4.92</b>	<b>3.01</b>	<b>1.68</b>	<b>2.12</b>	<b>1.38</b>	<b>2.86</b>
Konjuge bilirubin	1.00	1.38	0.99	1.70	1.73	1.14	1.36	1.09	<b>1.71</b>	<b>1.66</b>	1.11	1.17	1.16	<b>1.69</b>	<b>1.43</b>
Ankonjuge bilirubin	1.02	<b>0.85</b>	0.99	<b>0.71</b>	0.82	0.97	0.88	0.96	<b>0.69</b>	<b>0.76</b>	0.98	0.93	0.94	<b>0.70</b>	<b>0.68</b>
AST	0.96	1.05	1.04	0.97	1.24	1.01	1.04	1.03	0.94	0.98	1.00	1.05	1.02	0.94	0.91
ALT	1.00	<b>0.82</b>	1.03	0.93	0.97	1.04	<b>0.76</b>	1.03	<b>0.86</b>	1.00	1.02	<b>0.72</b>	1.03	<b>0.86</b>	0.94
ALP	0.99	0.97	0.99	0.91	0.96	1.01	0.98	0.99	0.91	0.93	1.00	0.98	1.00	0.92	0.94
GGT	0.96	<b>0.73</b>	0.93	0.81	0.90	0.97	<b>0.76</b>	0.96	0.81	0.91	0.99	<b>0.78</b>	0.94	0.82	0.92
Total protein	<b>1.36</b>	0.98	1.03	0.87	1.28	1.18	0.97	1.03	0.85	1.12	1.09	0.97	1.02	0.84	1.03
Albümin	1.05	1.01	1.02	1.01	1.12	1.03	1.01	1.01	1.01	1.10	1.02	1.01	1.01	1.01	1.07
LDH	1.03	1.13	1.06	0.96	0.94	1.01	1.09	1.03	0.93	0.90	1.01	1.10	1.01	0.91	0.90
CK	1.00	1.00	1.02	0.91	0.82	0.86	1.00	1.02	0.90	0.82	1.01	0.97	1.02	0.90	0.81
Amilaz	0.98	1.06	1.05	0.93	1.00	0.86	1.04	1.04	0.91	0.95	0.98	1.05	1.05	0.89	0.96

LV: lipovenöz solüsyon, Ultra: ultrasantrifüj, D: dilüsyon, LC: LipoClear®

\*: Sonuçlar interferansız ölçülen çalışma sonuçlarına oranlanarak sunulmuştur (Değişim katsayısı)

#: Kabul edilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir

eliminasyon yöntemlerinin tümünün uygun olduğu değerlendirildi.

İn vivo lipeminin etkisini belirlemek için yaptığımız çalışmada ise lipemik serum örneklerinde üre, bilirubinler, ALT, AST ve LDH test ölçümlerinin yapılamadığı gözlemlendi. On örnekte yapılan çalışma sonucunda, 5 örnekte üre, 2 örnekte bilirubinler, 7 örnekte ALT ve AST, bir örnekte ise GGT ve LDH ölçümlerinin yapılamadığı saptandı. Bu çalışma kapsamında kullanılan eliminasyon yöntemlerinin tümünün trigliserid, bilirubinler ve kolesterol haricindeki testlerin ölçümü için uygun olduğu değerlendirildi (Tablo III).

Çalışmada, LV solüsyonu katılan örnekler ile in vivo lipemik serum hazırlarında yüksek trigliserid konsantrasyonlarına bağlı olarak oluşan absorbans ve ışık saçılım indeksinin artmış olduğu, ultrasantifüzyon, CCl<sub>4</sub>, LipoClear® ekstraksiyonu ve dilüsyon teknikleri ile bu etkilerin yeterince elimine edilebildiği gözlemlendi (Şekil 1).

## Tartışma

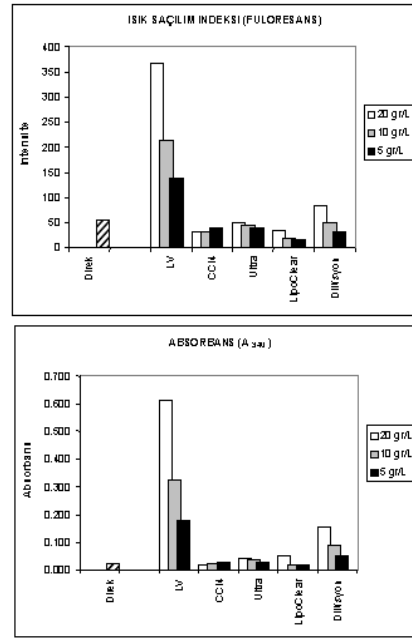
Biyokimyasal testler üzerine etki

eden faktörler preanalitik, analitik ve postanalitik dönem olarak üç grup altında incelenir. Son yıllardaki teknolojik gelişmeler ve etkin kalite kontrol programlarının uygulanması, analitik dönemdeki hataları azaltmış ve özellikle preanalitik dönem hataları üzerine daha çok yoğunlaşmaya

neden olmuştur (3).

Hemoliz faktörünün, klinik kimyasal analizlere interferansı ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (1,3,5-7). Bu çalışmada, hemolizden kaynaklanan hatalar otoanalizör kullanılarak incelenmiş ve artan hemoliz ile birlikte bazı biyokimyasal parametrelerin değiştiği görülmüştür. Hemolizin neden olduğu interferansın 750 mg/dl hemoglobin düzeyine kadar ihmal edilebilir düzeyde olduğu, bu miktarın üzerine çıkılmasının ürik asid ile amilaz değerlerinin gerçek değerinden daha düşük, konjuge bilirubin, AST ve LDH değerlerinin gerçek değerlerinden belirgin olarak yüksek bulunmasına neden olduğu saptandı. Literatürde benzer bulgular rapor edilmiş olmasına rağmen AST, ALT, ALP ve glukoz değerlerinin değişen hemoglobin konsantrasyonlarından ne kadar etkilendiği konusunda farklı değerlendirmeler bulunmaktadır (1,3,6,8-13). Genel olarak bu çalışmada, yeni gelişen teknolojik cihazlar ile analitik etkileşimlerin daha azaldığı saptanmış olmakla birlikte, yüksek hemoliz konsantrasyonlarında (>3.000 mg/dl hemoglobin içeren) yaklaşık olarak bütün testlerin ölçümünün etkilendiği görülmüştür.

Biyokimyasal testlerin değerlendirilmesinde önemli bir diğer interferans nedeni lipemidir. Değişik araştırmacılar tarafından lipeminin oluşturduğu bulanıklığın değerlendirilmesi için ışık saçılım indeksi, absorbans ölçümleri yapılmış ve eliminasyon teknikleri karşılaştırılmıştır (3,14,18). Bu araştırmada benzer olarak eliminasyon işlemleri sonucunda bulanıklığın kaybolduğu, ışık saçılım indeksi ve absorbans değerlerinin in vitro lipemi uygulamalarında LV solüsyon katılmadan önceki değerlerine döndüğü saptandı. Ek olarak, daha önceki makalelerde öne sürülen görüşleri destekler biçimde, ölçümleri UV dalga boyun-



Şekil 1. İn vitro lipemik çalışmada direkt ve eliminasyon işlemleri sonrasında ışık saçılım indeksi ve absorbans değerleri

Tablo III. İn vivo (doğal) lipemik çalışmasının sonuçları

	Konsantrasyonlar					Değişim katsayısı			
	Direkt (%)	CCl <sub>4</sub>	Ultra	D	LC®	CCl <sub>4</sub>	Ultra	D	LC®
Glukoz	127	131	129	131	125	1.02	1.01	1.03	0.98
Üre	35.8 (50)*	45.4	44.7	47.2	43	0.97	0.98	1.05	0.95
Kreatinin	1.64	1.64	1.61	1.60	1.64	1.04	1.01	0.92	1.03
Ürik asid	6.62	6.74	6.62	6.08	6.1	1.03	1.01	0.92	0.93
Total kolesterol	190	42.3	134.3	209.6	52.3	<b>5.38#</b>	<b>11.98</b>	<b>25.75</b>	<b>5.39</b>
Trigliserid	815	73	356	1224	169	0.09	0.46	1.57	0.21
Konjuge bilirubin	0.08 (80)	0.12	0.08	0.19	0.15	<b>2.56</b>	<b>1.61</b>	<b>2.34</b>	<b>4.53</b>
Ankonjuge bilirubin	0.26 (80)	0.27	0.34	0.33	0.18	<b>1.17</b>	<b>1.45</b>	<b>1.31</b>	<b>0.76</b>
AST	30.3 (30)	25.3	24.8	26.8	23	1.06	1.06	1.10	0.93
ALT	35.3 (30)	16.6	22.3	22	17	0.72	1.02	1.01	0.82
ALP	113	117	115	110	107	1.02	1.01	0.98	0.94
GGT	43 (90)	36	42	40	37	0.92	1.03	0.89	0.89
Total protein	7.51	7.57	7.62	7.36	6.47	1.01	1.01	0.98	0.86
Albümin	4.9	4.68	4.61	4.36	4.41	0.96	0.94	0.89	0.90
LDH	187 (90)	208	200	186	178	1.07	1.03	0.96	0.92
CK	75.1	77.4	82	81.6	75	1.02	1.08	1.14	0.98
Amilaz	50	51.5	51	47.2	43	1.03	1.02	0.95	0.87
Sodyum	142	144	143		140	1.02	1.01		0.99
Potasyum	4.31	4.39	4.37		4.2	1.02	1.01		0.98
Klor	100	103	102		98	1.03	1.02		0.98

\*: Lipemik serumlarda sonuç alınabilen örneklerin yüzde oranı. Ultra: ultrasantifüzyon, D: dilüsyon, LC: LipoClear®

\*: Lipemik serumlarda sonuç alınabilen örneklerin yüzde oranı

Ultra: ultrasantifüzyon, D: dilüsyon, LC: LipoClear

# Kabul edilebilir hata oranının üzerindeki sonuçlar koyu olarak gösterilmiştir

da yapılan enzimlerin (ALT, AST, LDH) saptanan aktivite miktarlarını, ölçümleri görünür dalga boyunda yapılan enzimlere (ALP, GGT, amilaz) oranla daha yüksek oranda etkilendiği gösterilmiştir (3,14,19-21). Farklı olarak bu çalışmada oluşturulan in vitro lipemide trigliserid değerlerinin daha yüksek olmasına rağmen, biyokimya analizlerinin bu durumdan çok daha az etkilendikleri görüldü. İn vitro olarak, lipemik hale getirilmiş serumlarda enzim aktivite ölçümlerinin yapılabildiği olmasına rağmen, doğal lipemik örneklerde özellikle AST, ALT daha az olarak da GGT ve LDH aktivite ölçümlerinin yapılmasının mümkün olmadığı görülmüştür. Bu durumun, doğal lipemide VLDL ve şilomikron konsantrasyonlarının daha belirgin olmasına, in vitro lipemi çalışmasında ise lipidlerin özellikle şilomikronların süspansiyon halinde bulunmasına, lipid fraksiyonu farklılıklarına bağlı olarak ışık kırılması miktarının daha az olmasına bağlı olduğu değerlendirilmiştir. Bu bulgular diğer çalışmalar ile benzerlik göstermesine rağmen, Topkaya ve ark.nın çalışması ile kısmen çelişmektedir; söz konusu farklılığın olasılıkla farklı analizör, reaktif ve analitik yöntemler kullanımından ileri gelebileceği değerlendirilmiştir (3,14,20).

Bu çalışmada, eliminasyon işlemlerinden sonra genel olarak analitik ölçümlerin hepsinin yapılabildiği, gerçek değerlerine yaklaştığı ve kabul edilebilir klinik değerler içerisinde olduğu tespit edildi (Tablo II).

Değişik araştırmacılar LDH ölçümlerinde lipidlerin çöktürülmesi esaslı uygulamaların ultrasantrifüjasyon kadar etkili olduğunu, ancak yine de bu yöntem sonrası GGT aktivite ölçüm sonuçlarının lipemiye bağlı nedenlerle gerçek değerlerin altında bulunduğunu göstermişlerdir (19-21). Topkaya ve ark. amilaz ve LDH dışında kalan testler için etkili bir

düzelme sağlayamadıklarını bildirmektedirler (14). Bu çalışmadaki in vitro lipemi çalışmasında CCl<sub>4</sub> ekstraksiyonu sonucunda GGT ve LDH ölçümlerinin, dilüsyon sonrası CK, LDH, GGT değerlerinin, LipoClear® uygulaması sonrasında AST, ALT, GGT ve ALP değerlerinin yaklaşık %5-10 azaldığı saptanmış, ancak bu sonuçların kabul edilebilir sınırlarda olduğu değerlendirilmiştir. Bununla birlikte bu değişimlerin, normal sınırlar içerisindeki örneklerde önemli olabileceği, ancak enzim aktivitesi yüksek bulunanlarda önemli olmayacağı değerlendirilmiştir.

Çeşitli araştırmacılar yaptıkları çalışmalarda iyon selektif elektrotlar ile yapılan sodyum ve potasyum ölçümlerinde lipemiden etkilenmenin %10'un altında kaldığını bildirmiş, klorür ölçümlerinde ise yaklaşık %10 negatif interferans bulunduğunu rapor etmişlerdir (14,15,22). İyon selektif elektrotlarla yapılan elektrolit ölçümleri, analiz öncesinde seyreltme gerekmediğinden lipemiden daha az etkileniyor olabilir (19,22). Elektrolit ölçümlerinde kabul edilme sınırı, diğer testlerden önemli farklılıklar gösterir. CLIA 88 kriterleri, sodyum için toplam izin verilen hatayı 4 mmol/L olarak belirlemiştir. Bu kriter göz önüne alınarak sodyum konsantrasyonu için doğal lipemiden etkilenme oranının 4 mmol/L'nin altında bulunduğu tespit edilmiştir. LV solüsyonu içerisinde sodyum ve potasyum bulunduğundan invitro lipemi çalışması kapsamında elektrolitler değerlendirilememiştir.

Değişik araştırmacılara benzer olarak bu çalışmada, ultrasantrifüjasyon, ekstraksiyon, LipoClear® ve dilüsyon yöntemlerinin doğal lipemik serumlarda elektrolit ölçümlerinde lipemiden kaynaklanan hataları gidermede etkin olduğu tespit edilmiştir (14).

Farklı araştırmacılar özellikle 340 nm'de yapılan kinetik ölçümlerin

lipemiden negatif yönde etkilendiğini göstermişlerdir (3,14,18). Bu dalga boyu, lipeminin en fazla interferansa neden olduğu dalga boyunu temsil eder. Ayrıca, okumaların görünür bölgede yapılmasına ve örnek körünün bulunmasına rağmen, konjuge ve total bilirubin ölçümlerinin lipemiden fazla etkilendikleri ortaya konmuştur. Bunun, ardışık iki ölçüm arasındaki çok az miktardaki absorbans farkının ( $\Delta$  absorbans) büyük önem taşıdığı analiz türlerinde doğal bir süreç olarak ortaya çıktığı değerlendirilmektedir. Bu çerçevede total protein ve albümin ölçümleri sırasındaki ardışık absorbans farklarının ( $\Delta$  absorbans) çok büyük olması ve ölçüm esnasında dilüsyon katsayısının yüksek olması nedenlerine bağlı olarak lipemi interferansının görülmesi olağan değildir. (14). Bu çalışmadaki doğal lipemik örnekler grubundaki serumların %50'sinin üre miktarları da, ölçüm amacıyla UV aralıktaki dalga boyu kullanıldığından saptanamamıştır. Ayrıca albümin düzeylerinin gerçek değerden daha düşük olarak tespit ediliyor olmasına rağmen, bu değişimin klinik açıdan önem taşıyacak miktarda olmadığı görülmüştür; lipemik örneklerde total protein ölçümlerinde de albümine benzer ve önemsiz düzeydeki azalmanın bulunduğu görülmüştür.

Olympus AU600 cihazı, bikromatik ölçüm özelliğine sahip bir biyokimya otoanalizörü olmasına rağmen bazı belirli testlerde lipemi interferansını engellemekte yeterli olmayabilir. Özellikle lipemi ışık saçılımı nedeniyle taban absorbansında artışa yol açtığından, bu durumlarda örnek körü kullanılarak lipemi interferansı azaltılabilir (23). İnterferansı önlemede kullanılan diğer bir yol, örneğin seyreltilmesi olabilir. Bu çalışmada da seyreltme yönteminin kolesterol ve bilirubinler testleri dışında oluşan değişimlerin ihmal edilebilir sınırlarda olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda ultrasantrifüjasyon, ekstraksiyon, dilüsyon ve LipoClear® uygulamalarının sonuçları birbirlerine yakın etkinlik gösterdi. Örneklerle herhangi bir madde katılmadığından, ultrasantrifüjasyon yöntemi en ideal yaklaşım olarak kabul edilebilir. Ancak, ultrasantrifüjler pahalı cihazlardır ve klinik laboratuvarların çoğunda bulunması beklenmez; bu amaçla daha ucuz ve kullanılması daha kolay olan ekstraksiyon ve LipoClear® yöntemlerinin kullanılması önerilebilir. Ekstraksiyon için Liposol® ve Frigen® gibi ticari organik çözeltiler piyasaya sürülmüştür. Bu ürünlerden Frigen'in içeriğinde trikloroflorometan bulunur (24). Organik çözücü (Liposol®) ekstraksiyonunun sodyum, potasyum, klorür, kalsiyum, bilirubin, ALT ve LDH ölçümlerinde kullanılmaması gerektiği belirtilmektedir. Bizim çalışmamızda yapısal olarak trikloroflorometana benzemesi nedeniyle CCl<sub>4</sub> ekstraksiyonu kullanılmış ve oldukça başarılı sonuçlar elde edilmiştir.

Sonuç olarak, ultrasantrifüjasyon, LipoClear®, CCl<sub>4</sub> ve dilüsyon kullanılarak lipemi eliminasyon girişimlerinin değişik oranlarda ve seçiciliklerde olmak üzere lipemi interferansını önlemede etkili olduğu bulundu. Bu çerçevede klinik laboratuvar uygulamalarında ilk basamakta yapılması uygun olan tekniğin maliyet artışı getirmeyen "örnek dilüsyonu" tekniği olduğu değerlendirildi. CCl<sub>4</sub> ve LipoClear® ekstraksiyon teknikleri ile temel olarak GGT haricindeki ölçümler için uygundur ve her ikisi de ultrasantrifüjasyon sonrası değerler ile uyumludur. Ancak, ultrasantrifüj tekniği pahalıdır ve her tip klinik laboratuvar için uygun değildir. CCl<sub>4</sub> ekstraksiyonu ve dilüsyon tekniklerinin her laboratuvarda bulunabilecek aletlerle yapılabilecek uygun yöntemler olduğu değerlendirilmiştir.

#### Kaynaklar

- 1- Young DS, Bermes EW, Haverstick DM. Specimen collection and processing. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnosis. 4th ed. St. Louis, Elsevier WB Saunders, 2006: 41-58.
2. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evacuated Tubes and Additives for Blood Specimen Collection: Approved Standard H1-A4. 4th ed. Wayne PA, National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1996.
3. Guder WG, Narayavan HW, Zawta B. Samples: From the Patient to the Laboratory, Git Verlag, GMBH, 1996.
4. Department of Health and Human Services. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988: Final Rules and Notice. 42 CFR Part 493. The Federal Register 1992; 57: 7188-7288.
5. Ceriotti F, Ceriotti G. Improved direct specific determination of serum iron and total iron-binding capacity. Clin Chem 1980; 26: 327-331.
6. Sonntag O. Haemolysis as an interference factor in clinical chemistry. J Clin Chem Biochem 1986; 24: 127-139.
7. Van der Woerd-de Lange JA, Guder WG, Schleicher E, Paetzke I, Schleithoff M, Wieland OH. Studies on the interference by haemoglobin in the determination of bilirubin. J Clin Chem Clin Biochem 1983; 21: 437-443.
8. Passey RB, Gillum RL, Fuller JB, Urry FM, Giles ML. Evaluation and comparison of 10 glucose methods and the reference method recommended in the proposed product class standard (1974). Clin Chem 1977; 23: 131-139.
9. Guder WG. Haemolysis as an influence factor in clinical chemistry [Editorial]. J Clin Chem Clin Biochem 1986; 24: 124-126.
10. Frank JJ, Bermes EW, Bickel MJ, Watkins BF. Effect of in vitro hemolysis on chemical values for serum. Clin Chem 1978; 24: 1966-1970.
11. Borner K, Klose S. Enzymatic determination of total cholesterol with the Greiner Selective Analyzer (GSA-II) (author's transl). J Clin Chem Clin Biochem 1977; 15: 121-130.
12. Kageyama N. A direct colorimetric determination of uric acid in serum and urine with uricase-catalase system. Clin Chim Acta 1971; 31: 421-426.
13. Persijn JP, van der Slik W. A new method for the determination of gamma-glutamyltransferase in serum. J Clin Chem Clin Biochem 1976; 14: 421-427.
14. Topkaya BÇ, Yücel D, Şeneş M, Canatan H, Saydam G. Lipeminin rutin biyokimyasal analizler üzerine etkileri. Biyokimya Dergisi 1997; 2: 5-15.
15. Kroll MH, Elin RJ. Interference with clinical laboratory analyses. Clin Chem 1994; 40: 1996-2005.
16. Kroll HM. Evaluation interference caused by lipemia. Clin Chem 2004; 50: 1968-1969.
17. Twomey PJ, Don-Wauchope, McCullough D. Unreliability of triglyceride measurement to predict turbidity induced interference. J Clin Pathol 2006; 56: 861-862.
18. Dimeski G, Mollée P, Carter A. Effects of hyperlipidemia on plasma sodium, potassium, and chloride measurements by an indirect ion selective electrode measuring system. Clin Chem 2006; 52: 155-156.
19. Glick MR, Ryder KW. Interferographs: a user's guide to interferences in clinical chemistry instrumentation. Indianapolis: Science Enterprises Inc., 1987.
20. Hindriks, F.R., Greon, A. Pitfalls of use of lipemic serum with the technicon SMAC and Du Pont ACA. Clin Chem 1978; 24: 2062-2063.
21. Koch DD, Burmeister B, Garber CC. Use of Intralipid parenteral nutrition solution causes major interferences with several common chemistry tests. Clin Chem 1983; 29: 1248.
22. Creer MH, Ladenson J. Analytical errors due to lipemia. Lab Med 1983; 14: 351-355.
23. Sampson M, Ruddel ME, Elin RJ. Effect of specimen turbidity and glycerol concentration on nine enzymatic methods for triglyceride determination. Clin Chem 1994; 40: 221-226.
24. Borgen J, Ingebresten OC, Sonstabo K. Interference of intralipid with measurement of total serum proteins in the Du Pont Aca is removed by trichlorofluomethane. Clin Chem 1982; 28: 1982-1983.