

Lipemi İnterferansına Karşı Kolay Bir Çözüm: Polietilen Glikol-dekstran Sülfat

[An Easy Solution Against Lipemia Interference: Polyethylene Glycol-dextran Sulfate]

Mehmet Şeneş,
Oğuzhan Zengi,
Rabia Şeker,
B. Çiğdem Topkaya,
Doğan Yücel

S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, Ankara 06340, Türkiye

Yazışma Adresi
[Correspondence Address]

Doç. Dr. Doğan YÜCEL
S.B. Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Bölümü Cebeci /Ankara 06340
Tel: 0 312 5953212
Fax: 0 312 3621857
e-posta: doyuvel@yahoo.com

Kayıt tarihi 06.12.2004 kabul tarihi 13.05.2005
[Received 06.12.2004; accepted 13.05.2005]

ÖZET

Klinik kimya analizlerinde interferans oluşturan lipemiği azaltmak için ultrasantrifügasyon, organik çözücü ile ekstraksiyon, diyaliz, örneğin seyreltilmesi veya örnek körü düzeltmesi gibi yollar kullanılmaktadır. Çalışmamızda, lipemik örneklerde lipit partiküllerini polietilen glikol (PEG) ve dekstran sülfat (DS) ile çöktürerek lipemi interferansını gidermeyi amaçladık. Bunun için 200 g/L PEG ve 10 mg/L DS içeren bir çözelti hazırlandı. Bu çözeltinin, 20'si fotometrik 6'sı elektrokimyasal olarak ölçülen 26 testte lipemi interferansını azaltma etkisi araştırıldı. Normal düzeyde bileşenler içeren serum havuzuna beş farklı düzeyde lipit çözeltisi (Ivelip %10, IL) eklenerek toplam 6 serum havuzu oluşturuldu. Hazırlanan örneklerde hem referans kabul edilen ultrasantrifüj yöntemi ile, hem de PEG-DS çözeltisi ile paralel çalışmalar yapıldı. PEG-DS çözeltisinin trigliseritleri havuzlardan ortalama %50 (%35-%76) oranında, ultrasantrifüjün %29 (%19-%41) oranında uzaklaştırdığı saptandı. Testlerde, orijinal serum havuzu değerlerine göre \pm %10'luk değişim göz önünde bulundurulduğunda 26 testin 19'unda farklılık olmadığı saptandı. Sonuç olarak lipit uzaklaştırıcı PEG-DS çözeltisi glukoz, üre, kreatinin, ürik asit, total protein, transaminazlar, γ -glutamiltransferaz, alkalen fosfataz, laktat dehidrogenaz, potasyum, klorür, kalsiyum, magnezyum, demir, amilaz, doymamış demir bağlama kapasitesi ve kolinesteraz testlerinde lipemiden kaynaklanan interferansı gidermede kullanılabilir.

Anahtar Kelimeler: İnterferans, laboratuvar hataları, lipemi, bulanıklık, ışık saçılımı

ABSTRACT

Different approaches are used against lipemia interference in clinical chemistry analyses. These are ultracentrifugation, organic solvent extraction, dialysis, sample dilution and sample blank correction. In our study, lipid particles were sedimented by polyethylene glycol (PEG) and dextran sulfate (DS) in lipemic samples. We prepared a solution containing 200 g/L of PEG and 10 mg/L DS and investigated the efficiency of this solution against lipemia interference in 26 biochemical tests of which 20 were photometric and 6 were electrochemical. A lipid solution (Ivelip %10, IL) was added to a normal serum pool at five different concentrations to obtain five different pools. These pools were simultaneously analyzed after ultracentrifugation and treatment with PEG-DS. PEG-DS solution removed about 50% (35% - 76%) of triglycerides and ultracentrifugation removed 29% (19% - 41%). There was no difference between original serum pool and PEG-DS procedure for 19 out of 26 tests when \pm %10 limits of original values were considered. In conclusion, PEG-DS solution can be used for the prevention of lipemia interference in the measurement of glucose, urea, creatinine, uric acid, total protein, ALT, AST, GGT, ALP, LDH, CK, K, Cl, Ca, Mg, Fe, AMS, IUBC, and cholinesterase.

Key Words: Interference, laboratory errors, lipemia, turbidity, light scattering

GİRİŞ

Klinik kimya analizlerinde ölçümün doğruluğunu etkileyen interferans kaynaklarıyla sık karşılaşılır. Lipemi interferansı da bu kaynaklardan biridir ve ölçüm doğruluğu lipemi tarafından önemli ölçüde etkilenir (1).

Biyokimyasal analizlerde lipemi, ışık saçılımını artırarak, analitlerin polar (sulu) veya nonpolar (lipit) fazları arasında dağılımına neden olarak veya polar ve iyonik maddeleri lipit fazın dışında bırakarak etki gösterir (2). Klinik kimyada analizlerin çoğu belirli reaksiyon koşullarında, ölçülen örnekten yayılan, yansıyan, geçen ya da absorbe edilen ışık enerjisinin ölçümüne dayanır. Lipit partikülleri ışık saçılımına yol açarak ölçülen ışık miktarını etkiler. Bu durum, analizlerde kullanılan fotometrik yöntemlerde yanlış sonuçların alınmasına neden olur(3).

Lipemi interferansından kaçınmak için çeşitli yaklaşımlar kullanılmaktadır. Bunlar arasında örnek körü kullanımı (4-6), okumaların birden fazla dalga boyunda yapılması (7) ve analiz öncesinde örneklerden lipitlerin, dolayısıyla lipitlere bağlı bulanıklığın giderilmesi yer alır. Lipitlerin uzaklaştırılmasında ultrasantrifügasyon (5, 8), organik çözücülerle ekstraksiyon (9,10), deterjan eklenmesi (2,11) ve polianyonik bileşiklerin yardımıyla çöktürme (12-15) gibi farklı yöntemler kullanılır.

Serum örnekleri 10-15 dakikalık süreyle ultrasantrifügasyon işlemine tabii tutulduğunda şilomikron ve çok düşük dansiteli lipoproteinler (VLDL) tüpün üst bölümünde toplanırlar. Bu yolla elde edilen berrak sıvı (infranatan) biyokimyasal analizler için kullanılabilir (6,10).

Polianyonik bileşiklerin yardımıyla oluşturulan çöktürme işleminde lipoproteinler polianyon-divalan katyon bileşiklerle kompleks oluşturarak çökerler. Bu amaçla polietilen glikol (PEG), dekstran sülfat (DS) ya da heparan sülfat kullanılmaktadır (14, 15). Belirli hız ve sürede santrifüj işleminden sonra elde edilen berrak süpernatant analiz için kullanılır.

Çalışmamızda, normal analit değerlerine sahip serum havuzuna belirli miktarlarda lipit emülsiyonu eklenmesiyle hazırlanan lipemik örnekleri ultrasantrifügasyon ve kendi geliştirdiğimiz polianyonik bileşikler içeren çözelti ile çöktürdükten sonra lipemi interferansının ne ölçüde önlenildiğini araştırdık. Böylece geliştirdiğimiz PEG-DS çözeltisinin, referans kabul edilen ultrasantrifügasyon yöntemine göre avantaj ve dezavantajlarını saptamayı hedefledik.

GEREÇ VE YÖNTEM

Kimyasal malzemeler. Rutin biyokimyasal analizlerde orijinal Beckman Coulter (CA., ABD) kitleri kullanıldı. Polietilen glikol ve dekstran sülfat Merck firmasından, lipit emülsiyonu Ivelip (IL, %10) Baxter Clinitec firmasından sağlandı. Bu emülsiyonun bileşiminde 100 g/L soya fasulyesi yağı, 12 g/L fosfatidil kolin, 25 g/L gliserol ve 0.3g/L sodyum benzoat bulunmaktadır.

Cihazlar. Absorbans okumaları Shimadzu UV 1208 spektrofotometrede, fotometrik ve elektrokimyasal biyokimya analizleri Beckman Coulter LX20 analizöründe gerçekleştirildi. Ultrasantrifügasyon işlemleri Sigma 3K30 yüksek hızlı santrifüj ile, diğer santrifüj işlemleri Hettich Micro 20 santrifüj ile yapıldı.

İn vitro lipemi çalışmaları. Çalışmalar için normal bileşenler içeren serum havuzu kullanıldı. Lipemi kaynaklı türbiditeyi taklit etmek için serum havuzuna beş farklı oranda %10'luk IL katıldı (1). Bu amaçla serum havuzu ikiye ayrıldı. Bunlardan birine 1/5 oranında IL katıldı (2 hacim IL+8 hacim serum; 20 g/L IL). IL'den kaynaklanan seyreltmeyi gidermek için serum havuzlarının diğer yarısına aynı oranda (1/5) deiyonize su eklendi. Daha sonra 20 g/L IL içeren havuz, eşit hacimde sulu havuz ile karıştırılarak 10 g/L ve aynı şekilde seyreltmeler yapılarak 5 g/L, 2.5 g/L ve 1.25 g/L konsantrasyonlarda IL içeren serum havuzları hazırlandı (1). En yüksek IL içeren serum havuzunun trigliserit konsantrasyonu ortalama 70 g/L idi. Bu şekilde hazırlanan toplam 6 serum havuzunda (Grup I= 0 g/L IL, Grup II= 1.25 g/L IL, Grup III= 2.5 g/L IL, Grup IV= 5 g/L IL, Grup V= 10 g/L IL ve Grup VI= 20 g/L IL) ultrasantrifügasyon ve PEG-DS işlemlerinden önce ve sonra kreatinin, ürik asit, kolesterol, trigliserit, total protein, albümin, total ve direkt bilirubin, alanin aminotransferaz (ALT), aspartat aminotransferaz (AST), laktat dehidrogenaz (LDH), alkalin fosfataz (ALP), amilaz (AMS), γ -glutamilttransferaz (GGT), kreatin kinaz (CK), magnezyum (Mg), fosfor, fruktozamin, demir ve doymamış demir bağlama kapasitesi (UIBC) olmak üzere toplam 20 fotometrik ve glukoz, üre, sodyum (Na), potasyum (K), klorür (Cl) ve kalsiyum (Ca) olmak üzere toplam 6 elektrokimyasal test çalışıldı. Bu ölçümler Beckman Coulter LX20 analizörü ile yapıldı.

Lipemi interferansını önlemede kullanılan yöntemler. Çalışılan testler için lipemi interferansını önlemede iki farklı yöntem kullanıldı. Bu iki yöntem IL katılan tüm serum havuzlarına uygulandı.

1. PEG-DS çözeltisiyle çöktürme. IL katılan serum havuzlarına, PEG-DS çözeltisi (PEG 200 g/L + dekstran sülfat 10 g/L) eklenerek lipitler uzaklaştırıldı. Bunun için 0.1 mL PEG-DS çözeltisi içeren 1.5 mL'lik Eppendorf tüplerine 0.5 mL lipemik serum eklendi. Bu karışım vorteks karıştırıcıda 20 saniye süreyle karıştırıldı ve daha sonra 13000 xg'de ve oda sıcaklığında 3 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrılarak analiz için kullanıldı.
2. Ultrasantrifügasyon. IL katılan serumlar 30000 xg'de 20 dakika santrifüj edildi. Üstteki lipit tabakası dağıtılmadan infranatan alınarak analiz için kullanıldı.

Absorbans okumaları. Lipemiye bağlı absorbans artışını saptamak için 4 mL %0.9'luk sodyum klorür çözeltisi içine ölçümü yapılan serum havuzlarından 50 μ L ilave edilerek karıştırıldı. Bu karışımların 340 nm'deki absorbansları suya karşı okundu (16). Bu ölçümler ultrasantrifügasyon ve PEG-DS işlemleri sonrasında da yapıldı.

Böylece kullanılan yöntemlerin lipemiye bağlı bulanıklığı gidermede ne kadar etkin oldukları araştırıldı. Bu amaçla işlem öncesi ve sonrası trigliserit ölçümleri de yapıldı.

Hesaplamalar. Çalışmamızda her bir havuzdaki (n=6) analitler çift çalışıldı. Hesaplamalarda bu çift çalışmaların ortalamaları kullanıldı. PEG-DS çözeltisiyle çöktürme işleminden sonra elde edilen değerler seyreltim faktörü olan 1.2 değeriyle çarpıldı. Ultrasontrifügasyon ve PEG-DS yöntemlerinin etkinliği, bu işlemler sonucu elde edilen analit değerleri ile gerçek örnek değerleri arasındaki farkın gerçek değere göre yüzdesi alınarak değerlendirildi. Bu değerlendirmelerde, işlemlerin kabul edilebilirliği, gerçek değerlerin \pm %10 sınırları göz önüne alınarak belirlendi (4,8). Ultrasontrifügasyon ve PEG-DS işlemleri sonrası elde edilen 340 nm'deki absorbans (A_{340}) ve trigliserit değerleri eşleştirilmiş Student t testi ile karşılaştırıldı (n = 10).

BULGULAR

IL eklenen serum havuzlarında orijinal havuz değerlerinin \pm %10 sınırları göz önüne alındığında serum havuzlarında glukoz, üre, GGT, ALP, Na, K, Cl, Ca ve kolinoesteraz testlerinin en yüksek değerdeki lipeminin neden olduğu bulanıklıktan etkilenmediği görüldü. Lipemiden en çok etkilenen ölçümler, UV bölgesinde okuma yapılan ALT, AST, CK, CK-MB ve LDH enzim aktiviteleri ile inorganik fosfor idi. Görünür bölgede ise ürik asit, total protein, total bilirubin, kreatinin, Mg, demir ve demir bağlama kapasitesi ile AMS lipemiden en çok etkilenen analitler idi. Lipemiden etkilenen testler ve etkilenme yönleri Tablo I'de, lipemiden etkilenen testleri gösteren interferograflar ise Şekil 1, Şekil 2 ve Şekil 3'te gösterilmektedir.

Orijinal ve IL eklenen serum havuzlarının ultrasontrifügasyon ve PEG-DS çözeltisiyle çöktürme işleminden önce ve sonra 340 nm'de elde edilen absorbans değerleri Tablo II'de görülmektedir. Buna göre ultrasontrifügasyon ve PEG-DS yöntemleri arasında lipitleri uzaklaştırma açısından bir fark görülmedi (n=10, P>0.05). Uygulamalar sonrasında yapılan trigliserit ölçümleri sonucunda ultrasontrifügasyon işleminin trigliseritleri %29 oranında (%19-%41), PEG-DS işleminin ise %50 oranında (%35-%76) azalttığı saptandı.

Çalışmamızda lipemik serum havuzlarında ultrasontrifügasyon işleminden sonra yapılan analizlerde tüm testlerde 20 g/L'lik IL konsantrasyonunda dahi orijinal değerlere göre yüzde farkın, \pm %10 sınırları içerisinde kaldığı görüldü. PEG-DS ile çöktürme işleminden sonra yapılan ölçümlerde \pm %10'luk değişim göz önünde bulundurulduğunda 26 testin 19'unda farklılık olmadığı saptandı. Ancak bu lipit uzaklaştırıcı çözelti albümin, CK, CK-MB, Na, fosfor, total bilirubin ve fruktozamin testlerinde \pm %10 sınırlarının dışında değerler elde edilmesine neden oldu (Tablo III).

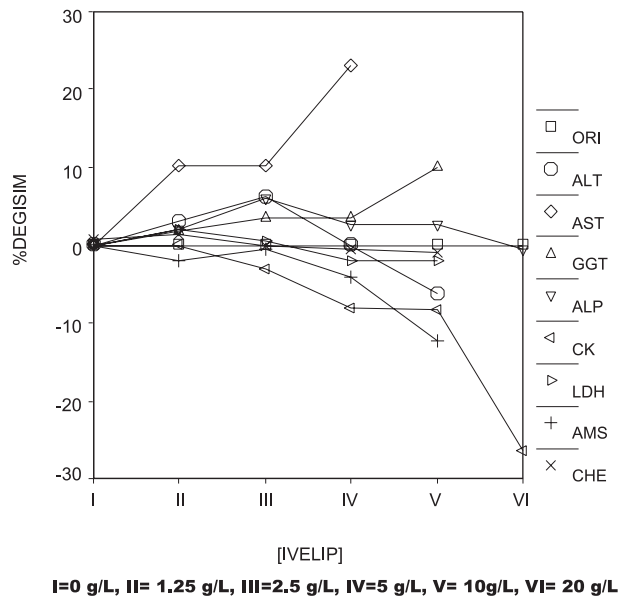
Tablo I. Farklı lipemi düzeylerinden etkilenen testler ve etkilenme yönleri.

Grup	Etkilenen Testler ve Etkilenme Yönü
Grup II	P \uparrow *, Fruktozamin \uparrow **, UA \downarrow
Grup III	TP***, Mg \uparrow , P \uparrow , Fruktozamin \uparrow , UA \downarrow
Grup IV	AST \downarrow , T.Bil \uparrow , Fe \downarrow , UIBC \uparrow , TP***, Mg \uparrow , P \uparrow , Fruktozamin \uparrow , UA \downarrow
Grup V	AMS \downarrow AST***, T.Bil \uparrow , Fe \downarrow , UIBC \uparrow TP***, Mg \uparrow , P \uparrow , Fruktozamin \uparrow , UA \downarrow
Grup VI	Kre \downarrow , ALT***, LDH***, CK \downarrow , CK-MB***, AMS***, AST***, T.Bil \uparrow , Fe***, UIBC \uparrow , TP***, Mg \uparrow P \uparrow , Fruktozamin \uparrow , UA***

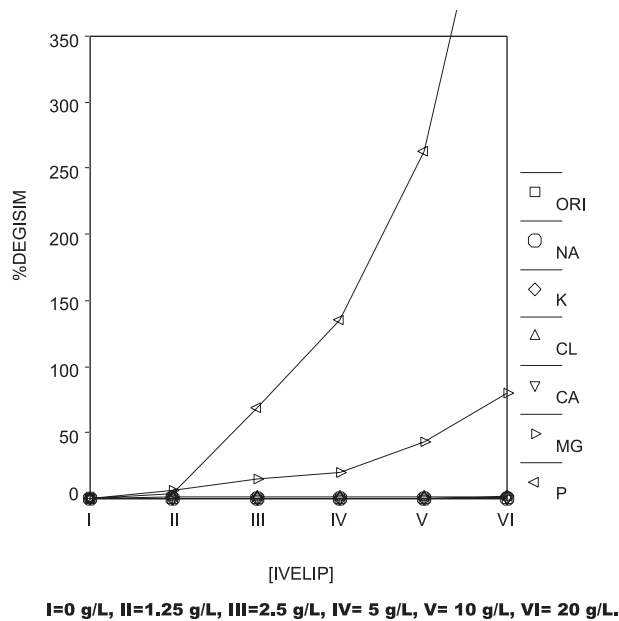
* \uparrow Pozitif interferans

** \downarrow Negatif interferans

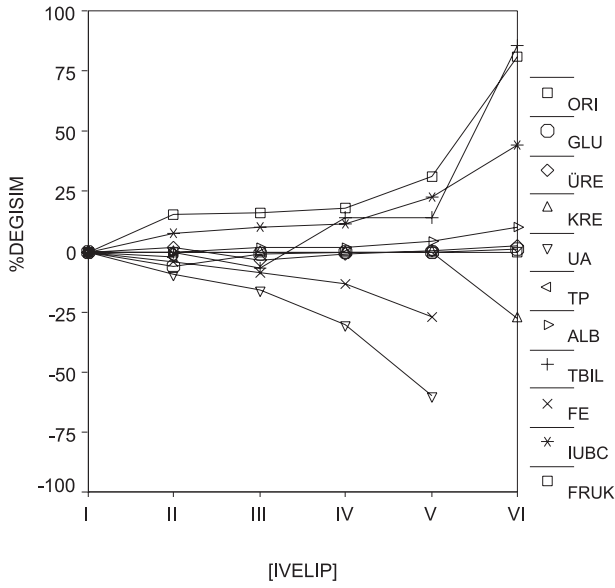
*** Absorbans artışı nedeniyle okuma yapılamadı



Şekil 1. Enzimler için lipemi interferansını gösteren interferograf.



Şekil 2. Elektrolitler için lipemi interferansını gösteren interferograf.



I= 0g/L, II=1.25 g/L,III=2.5 g/L, IV= 5 g/L, V= 10 g/L, VI=20 g/L

Şekil 3. Enzimler ve elektrolitler dışında kalan analitler için lipemi interferansını gösteren interferograf .

Tablo II. Orijinal ve IL katılmış serum havuzlarının işlem görmemiş, ultrasantrifüj ve PEG-DS sonrası A_{340} değerleri.

		A_{340}
I. Grup		0.028
II. Grup	1.25 g/L IL	0.113
	Ultrasantrifüj sonrası	0.020
III. Grup	2.5 g/L IL	0.210
	Ultrasantrifüj sonrası	0.022
IV. Grup	5 g/L IL	0.416
	Ultrasantrifüj sonrası	0.029
V. Grup	10 g/L IL	0.788
	Ultrasantrifüj sonrası	0.020
VI. Grup	20 g/L IL	1.47
	Ultrasantrifüj sonrası	0.020
	PEG-DS sonrası	0.034

TARTIŞMA

Klinik laboratuvarında lipemik örneklerle ve lipeminin neden olduğu interferansla sık karşılaşılır. Diabetes mellitus, alkol kullanımı, kronik böbrek yetmezliği, pankreatit, multiple miyelom, primer biliyer siroz, sistemik lupus eritematosus, total parenteral nutrisyon ve ilaç kullanımı (özellikle proteaz inhibitörleri, östrojen ve steroidler) lipemiye neden olabilmektedir (17).

VLDL fraksiyonu büyüklük olarak küçük (27-35 nm), orta (35-60 nm) ve büyük (60-200 nm) lipit partikülleri

içerir. Sadece orta ve büyük boyutlardaki VLDL ışık saçılımı yoluyla interferans oluşturur. VLDL partikülleri büyükse, lipemi düzeyi yüksek olmasa bile interferans görülebilir. Bu durum özellikle diyabet ve insülin direncine bağlı olarak artan VLDL partikülleri için söz konusudur. Şilomikronlar ise 70-1000 nm büyüklükteki moleküllerdir. Büyüklük dağılımları ve sayıları bireyler arasında çeşitlilik gösterir (17).

Lipemiye bağlı interferansın ortadan kaldırılmasında çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Biz de çalışmamızda, lipemik örneklerden lipitlerin uzaklaştırılmasında geliştirdiğimiz PEG-DS yöntemini ultrasantrifüj yöntemiyle karşılaştırdık. IL katılan serum havuzlarında ultrasantrifüjasyon ve PEG-DS yöntemi sonrasında lipemiye bağlı bulanıklık önemli ölçüde giderilmiştir (A_{340} değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak önemsizdir, $P<0.05$). Trigliserit ölçümleri ise PEG-DS yönteminin trigliseritleri ultrasantrifüjasyona göre daha etkin uzaklaştırdığını göstermektedir. Ancak görsel olarak lipitlerin verdiği bulanıklık her iki işlem sonrasında da tamamen uzaklaştırılmış ve berrak serum örnekleri elde edilmiştir.

Enzimler. Spektrumda 340 nm dalga boyu lipeminin en fazla interferansa neden olduğu dalga boyudur. Bu nedenle spektrumun UV bölgesinde olan bu dalga boyunda ölçümü yapılan enzimler (ALT, AST, CK, CK-MB, LDH gibi) lipemiden değişik oranlarda etkilenmektedir. Grup VI'da absorbans yüksekliği nedeniyle bu enzim aktiviteleri ölçülememiştir. Bu durum bulanıklığa bağlı absorbansın kısa dalga boylarında yüksek olması nedeniyle beklenen bir sonuçtur (3). Spektrumun görünür bölgesinde ölçümü yapılan GGT ve ALP enzimleri ise en yüksek konsantrasyondaki lipemiden bile etkilenmemektedir. Sonuçlarımız bu analitler için farklı cihazlarda yapılan lipemi interferans çalışmaları ile uyum göstermektedir (1,3).

Bulgularımıza göre lipemi interferansının giderilmesinde ultrasantrifüjasyon ve PEG-DS yöntemlerinin her ikisi de UV bölgesinde ölçümü yapılan enzimlerden ALT, AST, CK ve LDH'da lipemi interferansına bağlı hataları düzeltmektedir. Ancak, çöktürme yöntemi CK-MB ölçümlerinde lipeminin yol açtığı hatalardan daha büyük hatalara neden olmakta, bu enzimin değerini gerçek değerinin altına düşürmektedir. Topkaya ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (19) CCl_4 ile ekstraksiyon sonrasında CK-MB ölçümünde analitin gerçek değerinin çok altında sonuçlar elde edildiği bildirilmiştir. Görünür bölgede ölçümü yapılan diğer bir enzim olan AMS lipemi interferansından etkilenmektedir. Bu bulgu da Topkaya ve ark.'nın (19) elde ettiği bulgular ile çakışmaktadır. Ancak bu analitteki etkilenme hem ultrasantrifüjasyon hem de çöktürme yöntemi ile giderilebilmektedir.

Elektrolitler. Beckman Coulter LX 20 analizöründe iyon selektif elektrotlarla (ISE) ölçümleri yapılan Na, K, Cl ve Ca için farklı IL konsantrasyonlarında herhangi bir etkilenme görülmedi. Elektrolit ölçümlerinde lipemi in-

Tablo III. Beckman Coulter LX20'de IL katılmadan önce ve sonraki ortalama analit değerleri ile ultrasantrifüjasyon ve PEG-DS işlemleri sonucunda elde edilen ortalama analit değerleri ve orijinal değere göre % farkları.

	GLU mg/dL	ÜRE mg/dL	KRE mg/dL	UA mg/dL	TP g/dL	ALB g/dL	ALT U/L	AST U/L	GGT U/L	ALP U/L	LDH U/L	CK U/L	CKMB U/L	TBİL mg/dL	Na mmol/L	K mmol/L	Cl mmol/L	Ca mg/dL	P mg/dL	Mg mmol/L	Fe µ/dL	UIBC µ/dL	AMS U/L	Fruk U/L	CHE U/L
ORJİNAL DEĞERLER																									
I	83	28	0.9	4.3	6.25	3.5	16	20	14	73	147	83	10	0.7	124	3.98	91	8.2	2.92	0.78	11	57	73	304	7652
İL KATILIMINDAN SONRAKİ DEĞERLER VE ORJİNAL DEĞERE GÖRE %FARKLARI																									
II	82	29	0.9	3.9	6.1	3.5	17	22	15	75	150	83	10	0.7	125	3.99	92	8.2	3.91	0.83	10.5	61	71	351	7720
	%-1.2	%2.5	%0	%-10	%-2.4	%0	%6.3	%10	%-7.1	%2.7	%2	%0	%0	%0	%0.8	%0.3	%1	%0	%33	%6.4	%-4.5	%7	%-2.8	%15.5	%0.9
III	82	27	0.9	3.6	ok	3.6	17	22	14	78	148	81	11	0.65	125	3.99	93	8.2	4.93	10	10	62	72	352	7764
	%-1.2	%-3.5	%0	%-16	%0	%2.9	%6.3	%10	%0	%6.8	%0.7	%-2.4	%10	%-7.1	%0.8	%0.3	%2.2	%0	%68.8	%15	%-9	%8.8	%-1.4	%15.8	%1.5
IV	83	28	0.9	3	ok	3.6	16	24	14	75	144	76	11	0.8	124	3.99	92	8.2	6.86	0.94	9.5	63	70	358	7636
	%0	%0	%0	%-30	%0	%2.9	%0	%20	%0	%2.7	%-2	%-8	%10	%14	%0	%0.3	%1	%0	%135	%20	%-14	%10.5	%-4.1	%17.8	%-0.2
V	83	28	0.9	1.7	ok	3.7	15	ok	14	75	144	76	9	0.8	124	3.99	92	8.2	10.6	1.12	8	69	64	398	7610
	%0	%0	%0	%-60	%0	%5.7	%-6.3	%0	%2.7	%2	%-8	%-10	%0	%14	%0	%0.3	%1	%0	%263	%44	%-27	%21	%-12	%31	%-0.5
VI	84	28	0.65	ok*	ok	3.9	ok	ok	15	73	ok	61	ok	1.3	124	4.01	92	8.2	18.47	1.4	ok	82	ok	551	7574
	%1.2	%0	%27.8	%0	%11.4	%0	%0	%-7.1	%0	%0	%-26	%0	%0	%85	%0	%0.8	%1	%0	%552	%79	%44	%0	%81	%-1	
ULTRASANTRİFÜJASYON SONRASI DEĞERLER VE ORJİNAL DEĞERE GÖRE %FARKLARI																									
II	82	28	0.9	4.2	6.4	3.6	17	18	14	78	158	86	10	0.75	125	4	91	8	3.1	0.83	10.8	60	78	311	8103
	%-1.2	%0	%0	%-2.3	%2.4	%2.9	%6.3	%-10	%0	%6.8	%7.5	%3.6	%0	%7.1	%0.8	%0.5	%0	%0	%-2.4	%6.1	%1.8	%5.3	%6.8	%2.3	%5.9
III	84	27	0.9	4.2	6.4	3.5	17	19	14	77	153	83	10	0.7	124	3.98	91	8	3.1	0.85	11.5	60	76	306	8126
	%1.2	%-3.5	%0	%-2.3	%2.4	%0	%6.3	%-5	%0	%5.5	%4	%0	%0	%0	%0	%0	%0	%0	%-2.4	%6.1	%4.5	%5.3	%4.1	%0.7	%6.2
IV	82	28	0.95	4.1	6.3	3.6	17	20	15	77	154	83	10	0.65	125	4.01	92	8.1	2.9	0.83	10.3	58	74	310	7981
	%-1.2	%0	%5.5	%-4.6	%0.8	%2.9	%6.3	%0	%7.1	%5.5	%4.8	%0	%0	%-7.1	%0.8	%0.8	%1	%-1.2	%-0.7	%0.7	%6.4	%1.8	%1.4	%2	%-4.3
V	86	28	0.9	4.2	6.3	3.6	16	19	15	79	156	85	10	0.75	125	4.01	92	8	3	0.82	11.7	59	77	311	8103
	%3.6	%0	%0	%-2.3	%0.8	%2.9	%0	%-5	%7.1	%8.2	%6.1	%2.4	%0	%7.1	%0.8	%0.8	%1	%-2.4	%2.7	%5.1	%6.4	%3.5	%5.5	%2.3	%5.9
VI	84	29	0.95	4.1	6.3	3.7	17	20	14	77	156	85	10	0.75	127	4.1	93	8.2	3.1	0.83	11.4	60	75	315	8119
	%1.2	%3.5	%5.5	%-4.6	%0.8	%5.7	%6.3	%0	%0	%5.5	%6.1	%2.4	%0	%7.1	%2.4	%3	%2.2	%0	%6.1	%6.4	%3.6	%5.3	%2.8	%3.6	%6.1
PEG-DS İŞLEMİ SONRASI DEĞERLER VE ORJİNAL DEĞERE GÖRE %FARKLARI																									
II	85	30	0.96	4.4	5.8	2.3	17	19	14	78	140	66	2	0.6	144	3.91	97	7.7	8.6	0.82	11.8	61	75	32	7858
	%2.4	%7.1	%6.7	%2.3	%-7.2	%-34	%6.3	%-5	%0	%6.8	%-4	%-20	%-80	%-14	%16	%-1.8	%6.7	%6.7	%-6	%194	%5.1	%7.3	%7	%2.8	%89
III	85	30	0.96	4.4	5.8	2.2	17	18	14	75	135	57	3	0.6	144	3.92	97	7.7	8.1	0.79	11.3	60	73	36	7578
	%2.4	%7.1	%6.7	%2.3	%-7.2	%-37	%6.3	%-10	%0	%2.7	%-8	%-31	%-70	%-14	%16	%-1.5	%6.7	%6.7	%-6	%177	%1.3	%2.7	%5.3	%0	%-88
IV	86	28	0.96	4.4	5.8	2.2	16	19	13	76	136	57	2	0.7	144	3.93	97	7.7	8	0.79	11.3	60	73	38	7510
	%3.6	%0	%0	%6.7	%2.3	%-7.2	%-37	%0	%-5	%-7.1	%-7.5	%-31	%-80	%0	%16	%-1.3	%6.7	%6.7	%-6	%174	%1.3	%2.7	%5.3	%0	%-87
V	86	29	0.96	4.4	5.8	2.2	17	19	14	74	130	52	2	0.6	144	3.95	98	7.6	6.5	0.79	11.8	57	71	32	7250
	%3.6	%3.5	%6.7	%2.3	%-7.2	%-37	%6.3	%-5	%0	%1.4	%-11	%-37	%-80	%-14	%16	%-0.8	%6.8	%6.8	%-7.3	%123	%7.3	%7.3	%0	%-2.8	%-89
VI	88	30	0.95	4.5	6.2	2.8	17	19	15	79	148	84	2	0.5	146	4.1	96	7.9	10.3	0.79	11.5	54	75	53	7623
	%6	%7.1	%6.7	%4.6	%-0.8	%-20	%6.3	%-5	%7.1	%8.2	%0.7	%-1.2	%-80	%-29	%18	%3	%5.5	%-3.6	%25.3	%1.3	%4.5	%-5.3	%2.8	%-82	%-0.4

I= Orijinal değerler, II=1.25 g/L IL, III= 2.5g/L IL, IV= 5 g/L IL, V= 10 g/L IL, VI= 20 g/L IL.

*ok: Absorbans yüksekliği nedeniyle okuma yapılmadı.

terferansını önlemek için seyreltme gerektirmeyen direkt ISE yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (1,19, 20). Bununla birlikte Beckman Coulter LX 20 analizöründe kullanılan ISE yöntemi indirekt idi ve 20 g/L IL konsantrasyonunda bile testlerde herhangi bir etkilenme görülmedi.

Lipemiye bağlı bulanıklıktan en fazla etkilenen elektrolitler Mg ve inorganik fosfor idi. İnorganik fosfor ölçümünün spektrumun UV bölgesinde yapılması nedeniyle bu beklenen bir sonuçtur. Bu konuda yapılmış çeşitli çalışmalarda farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bizim bulduğumuz pozitif interferans bazı çalışmalar tarafından desteklenirken (20,21), bazı çalışmalarda negatif interferansa rastlandığı belirtilmektedir (4,19, 22). Mg ölçümlerinden elde ettiğimiz pozitif interferans ise bu konuda yapılmış diğer çalışmalar ile çelişiktir (19,20,23). Bulgularımıza göre ultrasantrifügasyon ve PEG-DS yöntemlerinin her ikisi de Mg için lipemiden kaynaklanan hataları gidermede etkili olmuştur. Ancak inorganik fosfor ölçümlerinde ultrasantrifügasyon etkili olmuş, PEG-DS yöntemi etkisiz kalmıştır. Bunun nedeni kullanılan kimyasallardan dekstran sülfatın fosfor içermesi olabilir. Benzer şekilde dekstran sülfat, sodyum da içerdiğinden, sodyum için lipemi interferansının giderilmesinde bu çözeltinin kullanılmaması doğru olacaktır.

Diğer analitler. Diğer analitlerin ölçümleri lipemiden değişik oranlarda etkilenmektedir. Ürik asit ölçümünde elde ettiğimiz negatif interferans diğer çalışmalarda elde edilen bulguları desteklemektedir (19, 23). Çalışmamızda total protein 1.25 g/L ve daha yüksek IL konsantrasyonundan önemli derecede etkilenmiştir. Genel olarak kinetik yöntemler interferansın daha az etkilenir. Beckman Coulter LX 20 cihazında, total protein kinetik olarak 40 saniyede ölçülmektedir. Ancak, bu havuzlarda total protein ölçümlerinin etkilenme nedeni absorban yüksekliği nedeniyle okuma yapılamamasıdır. Total bilirubin ölçümleri de lipemiden önemli ölçüde ve pozitif yönde etkilenmektedir. Bu ölçümler spektrumun görünür bölgesinde yapılmakla birlikte, absorban ölçümleri arasındaki farklar çok küçüktür ve bu nedenle lipemiden fazla etkilenmesi beklenebilir. Demir (negatif interferans), fruktozamin ve UIBC (pozitif interferans) testleri de lipemiden farklı derecelerde etkilenmişlerdir. Bu analitlerin ölçümleri görünür bölgede yapılmaktadır. Bu testlerde total reaksiyon hacmi: örnek hacmi oranının her üç test için de nispeten düşük olması, (10:1), lipemi interferansını kolaylaştırmaktadır.

Lipemiden etkilenen testlerden total bilirubin ve UIBC'deki pozitif ve demirdeki negatif interferans hem ultrasantrifügasyon hem de PEG-DS yöntemleriyle giderilebilmektedir. Ancak fruktozaminde karşılaşılan pozitif lipemi interferansının ultrasantrifügasyon ile giderilebilmesine karşın, PEG-DS yöntemiyle gerçek değerden daha düşük değerler (<-%10) elde edilmektedir. Bu durum proteinlerin polianyon-divalen katyon bileşiklerle kompleks oluşturarak çökmesinden (12) kaynaklanabilir.

Nitekim, lipemiden etkilenmemesine rağmen PEG-DS yöntemi albümin ölçümlerinde de negatif yönde yaklaşık %35'lik bir fark ortaya koymaktadır. Total protein ölçümlerinde ise bu fark negatif yönde %7 düzeyinde görülmektedir.

İnterferansın basit yöntemlerle giderilemediği durumlarda interferans veren madde ortamdaki uzaklaştırılabilir veya etkisi ortadan kaldırılabilir. Bu amaçla organik çözücülerle ekstraksiyon, ultrasantrifügasyon, siklodeks-trin (15) ile ön işlem gibi yöntemler kullanılmıştır. Çalışmamızda lipitler ultrasantrifügasyon ve PEG-DS çöktürme yöntemleriyle trigliserit ölçümlerine dayanarak sırasıyla %30 ve %50 oranında uzaklaştırılmıştır. Buna göre PEG-DS yöntemi, 30000 xg'de 20 dakika santrifüj işlemine göre lipitleri daha etkin uzaklaştırmaktadır. Literatürde daha yüksek hızlarda santrifügasyon uygulamaları da yer almaktadır. Bizim daha önce yaptığımız bir çalışmada 140000 xg'de 15 dakika santrifüj sonrasında lipitler yaklaşık olarak %50 oranında azalmıştır (19). Bu çalışmada ise serumu berraklaştırmak için yeterli minimum santrifüj hızı ve süresi kullanılmıştır. Ancak her iki yöntem sonrasında elde edilen A_{340} değerleri birbirine çok yakındır ve aralarında istatistiksel olarak bir fark yoktur.

PEG-DS uygulaması sonrasında albumin ve albumine bağlı bazı analitlerin ölçümünde negatif interferans görülebilmektedir. Sonuçlarımız, genel olarak lipemi interferansının giderilmesinde lipemik örneklerde PEG-DS çözeltisinin kullanılabilirliğini göstermektedir. Ancak her iki yöntem de serum lipitlerini uzaklaştırdığından bu iki işlem sonrasında ölçülecek trigliserit ve kolesterol değerleri ile doğru sonuç elde edilemez. Dolayısıyla bu analitlerin ölçümlerinin işlem görmemiş serumlarda yapılması gerekmektedir. Eğer analit konsantrasyonu çok yüksekse ve analiz yapılamıyorsa örneklerin seyreltme yoluna gidilmelidir.

Biz çalışmamızda lipemiye, hemen hemen diğer tüm yayımlanmış çalışmalarda olduğu gibi, serum havuzlarına lipit emülsiyonu ekleyerek taklit ettik. Ancak, dışarıdan sentetik lipit emülsiyonu ekleyerek yapılan in vitro lipemi çalışmalarının in vivo lipemi interferansını tam olarak yansıtmayabileceği öne sürülmektedir (17, 18). Bu nedenle üç tür hata ile karşılaşılabilir: (a) interferansın emülsiyon eklenen örneklerde görülüp doğal lipemik örneklerde görülmemesi; veya tersine (b) doğal lipemik örneklerde görülüp emülsiyon eklenenlerde görülmemesi; ya da (c) doğal lipemik örnekler ile emülsiyon eklenen örneklerde farklı yönlerde ve derecelerde görülmesi. Bu nedenle geniş bir konsantrasyon aralığında VLDL ve şilomikron içeren doğal lipemik örneklerde interferans çalışmalarının yapılması lipemi interferansı konusunda daha ileri bilgiler verecektir. Bizim daha önce yapmış olduğumuz lipemi interferansı çalışmasında da doğal ve sentetik lipemik örneklerde farklı düzeyde ve yönlerde interferans görülmüştür (19).

Çalışmamızda ultrasantrifügasyon ve PEG-DS yöntem-

leri birçok analit için yakın etkinlik göstermiştir. Ultrasontrifügasyon yöntemi herhangi bir ön işlem gerektirmediğinden ideal olarak kabul edilebilir. Ancak ultrasontrifüjler pahalıdır ve her laboratuvarında bulunmazlar. Bunun yerine birçok analit için çöktürme yöntemi kullanılabilir. Sonuç olarak, geliştirdiğimiz PEG-DS çözelti-

si lipemik örnekleri berraklaştırmada genellikle toksik yapıdaki organik çözücülere ve ultrasontrifüj gibi pahalı tekniklere ihtiyaç duyulmaksızın, rutin olarak ölçülen pek çok analit için kullanılabilecek özellikte, güvenilir ve ucuz bir çözüldür.

Kaynaklar

1. Glick, M.R., Ryder, K.W., Jackson, S.A. (1986) Graphical comparisons of interferences in clinical chemistry instrumentation. *Clin. Chem.* 32, 470-5.
2. Lacher, D.A., Elsea, A.R. (1986) Effect of a lipid-clarifying reagent on results of Becman Astra methods. *Clin. Chem.* 32, 394.
3. Hindriks, F.R., Groen, A. (1978) Pitfalls of use of lipemic serum with the Technicon SMAC and Du Pont ACA. *Clin. Chem.* 24, 2062-3.
4. Ng, R.H., Altaffer, M., Statland, B.E. (1987) Effects of lipemia on Technicon RA-1000 measurements. *Clin. Chem.* 33, 913.
5. Musiala, S.T., Dubin, A. (1977) Effects of chylomicrons and their removal on spectrophotometric analyses. *Clin. Chem.* 23, 1121.
6. Ryder, K.W., Glick, M.R. (1993) Erroneous laboratory results from hemolyzed, icteric and lipemic specimens. *Clin. Chem.* 39, 175-6.
7. Borst, A., de Jong, E.B., Weijden, A.H. (1974) Bichromatic colorimeter for automatic turbidity correction in continuous flow analysis using only one flow cuvette. *Clin. Chim. Acta.* 55, 113-9.
8. Hutton, P.S., Conn, R.B. (1982) Interference by hyperlipidemia: A comparison of results obtained on Ektachem 400 and the ACA III or Astra-8 before and after ultracentrifugation. *Clin. Chem.* 28, 1632.
9. Epstein, E., Baginski, E.S., Zak, B. (1972) Extraction of lipids from serum and measurements of serum total lipids. *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2, 244-54.
10. Borgen, J., Ingebretsen, O.C., Sonstabo, K. (1982) Interference of intralipid with measurements of total serum proteins in Du Pont ACA is removed by trichlorofluoromethane. *Clin. Chem.* 28, 1982-3.
11. Helenius, A., Simons, K. (1971) Removal of lipids from human plasma low density lipoprotein by detergents. *Biochemistry* 10, 2542.
12. Zeppezauer, M., Brishammer, S. (1965) Protein precipitation by unchanged water soluble polymers. *Biochim. Biophys. Acta.* 94, 581.
13. Rasbold, K., Rendell, M.S., Goljan E. (1985) Simple removal of lipids from serum. *Clin. Chem.* 31, 782.
14. Thompson, M.B., Kunze, D.,J. (1984) Polyethylene glycol-6000 as a clearing agent for lipemic serum samples from dogs and the effects on 13 serum assays. *Am. J. Vet. Res.* 45, 2154-7.
15. Sharma, A., Anderson, K., Baker, J.W. (1990) Flocculation of serum lipoproteins with cyclodextrins: Application to assay of hyperlipidemic serum. *Clin. Chem.* 36, 529-32.
16. Schreiner, R.L., Glick, M.R., Nordschow, C.D., Gresham, E.L. (1979) An evaluation of methods to monitor infants receiving intravenous lipids. *J. Pediatrics* 94, 197-200.
17. Kroll, M.H. (2004) Evaluating interference caused by lipemia. *Clin. Chem.* 50, 1968-9.
18. Bornhorst, J.A., Roberts, R.F., Roberts, W.L. (2004) Assay-specific differences in lipemic interference in native and Intralipid – supplemented samples. *Clin. Chem.* 50, 2197-201.
19. Topkaya, B.Ç., Yücel, D., Şeneş, M., Canatan, H., Saydam, G. (1997) Lipemik rutin biyokimyasal testler üzerine etkisi. *Biyokimya Dergisi* 22, 5-15.
20. Jay, D.W., Provasek, D. (1993) Characterization and mathematical correction of hemolysis in selected Hitachi 717 assay. *Clin. Chem.* 39, 1804-10.
21. Koch, D.D., Burmeister, B., Garber, C.C. (1983) Use of intralipid parenteral nutrition solution causes major interference with several common chemistry tests. *Clin. Chem.* 29, 1248.
22. Shukla, R., Nario, A., Bauer, B., Flores, N., Szydlo, S. (1981) Elimination of interference due to hemolyzed, icteric and lipemic sera in glucose, phosphorus and urea nitrogen determination. *Clin. Chem.* 27, 1099.
23. Creer, M.H., Ladenson, J. (1983) Analytical errors due to lipemia. *Lab. Med.* 14, 351-5.