



TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERGİSİ

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 17, Sayı 3, 2019 / Volume 17, No. 3, 2019

Kurucu Founder

Oya Bayındır

Sahibi ve Sorumlu Yazı İşleri Müdürü

Türk Klinik Biyokimya Derneği adına

*Owner and Responsible Manager on Behalf of Turkish Society
of Clinical Biochemistry*

Özkan Alataş (Eskişehir Osmangazi Üniv., Tıp Fakültesi, Eskişehir, Türkiye)

Baş Editör Chief Editor

Dilek Özmen (İzmir, Türkiye)

Editörler Editors

Ceyda Kabaroğlu (Ege Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ece Onur (Celal Bayar Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Manisa, Türkiye)

Sezer Uysal (Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, İzmir, Türkiye)

Ayşenur Yeğin (Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Antalya, Türkiye)

Yayın Kurulu Editorial Board

- | | |
|----------------|----------------|
| • Pınar Akan | • Figen Narin |
| • Halide Akbaş | • İmge Ergüder |

Türk Klinik Biyokimya Dergisi; Index Copernicus Master List, Chemical Abstracts, TÜBİTAK-ULAKBİM
"Türk Tıp Dizini", Türk Medline ve Türkiye Atıf Dizini
(Türkiye Citation Index) kapsamında
yer almaktadır.

Yönetim Yeri

Erzene Mah. 116/2 Sok. No: 10 Bornova/İzmir
Tel: +90 232 343 82 71 Faks: +90 232 339 21 34
E-posta: tkbd@tkbd.org
Web sitesi: www.tkbd.org.tr

Yayının Türü

Dergi, Türk Klinik Biyokimya Derneği yayın
organıdır. Akademik, hakemli dergidir.
Yılda üç kez (Nisan - Ağustos - Aralık)
yayınlanır.

Danışmanlar
Editorial Advisory Board

Abdullah Arpacı, Hatay
Ali Rıza Şişman, İzmir
Aslı Pınar, Ankara
Aslıhan Karul, Aydın,
Asuman Orçun, İstanbul
Ayfer Çolak, İzmir
Ayşe Binnur Erbağcı, Gaziantep
Bahattin Avcı, Samsun
Banu Başok, İzmir
Beyhan Ömer, İstanbul
Burak Çimen, Mersin
Burcu Barutçuoğlu, İzmir
Can Duman, İzmir
Canan Çoker, İzmir
Derya Aldemir, Ankara
Dilek Çımrın, İzmir
Dilek Ülker Çakır, Çanakkale
Duygu Kumbul Doğuç, Isparta
Emel Altekin, İzmir
Emre Sarandöl, Bursa
Evin Ademoğlu, İstanbul
Fatma Taneli, Manisa
Figen Narin, İzmir
Filiz Akbıyık, Ankara
Giray Bozkaya, İzmir
Gültekin Yücel, Antalya

Güneş Ak, İzmir
Halide Akbaş, Antalya
Hülya Aybek, Denizli
Işıl Mutaş, İzmir
Mehmet Köseoğlu, İzmir
Metin Kılınç, Kahramanmaraş
Murat Örmən, İzmir
Neslihan Bukan, Ankara
Osman Çağlayan, Kırıkkale
Özlem Gülbahar, Ankara
Özlem Görüroğlu Öztürk, Adana
Özlem Yavuz, Düzce
Pınar Akan, İzmir
Pınar Tuncel, İzmir
Sara Habif, İzmir
Sebahat Özdem, Antalya
Sembol Türkmen Yıldırım, Giresun
Sevgi Eskiocak, Edirne
Tamer İnal, Adana
Tevfik Noyan, Ordu
Tuncay Küme, İzmir
Tülay Köken, Afyon
Zehra Serdar, Bursa

Basım Yeri

META Basım Matbaacılık Hizmetleri
+ 90 232 343 64 54 Bornova - İzmir
Basım Tarihi: 30/12/2019

Türk Klinik Biyokimya Dergisi

Journal of Turkish Clinical Biochemistry

Cilt 17, Sayı 3, 2019 / Volume 17, No. 3, 2019

İÇİNDEKİLER / CONTENTS

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

♦ **Comparison of Spectrophotometric Assays Determining Total Antioxidant Capacity**

Toplam Antioksidan Kapasiteyi Belirleyen Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Merve Ergin Tuncay 111

♦ **ST-segment Yüksekliği Olan Miyokard Enfarktüsünde Platelet Biyobelirteçleri**

Platelet Biomarkers In ST-Elevation Myocardial Infarction

Işıl Çakır, Nahide Ekici Günay, Ahmet Oğuz Baktır 120

♦ **Analitik Evre Performansının Altı Sigma Metodu Kullanılarak Değerlendirilmesi**

Evaluation of Analytical Phase Performance by Using Six Sigma Method

Şeniz Korkmaz 126

♦ **Ischemia Modified Albumin Levels in Invasive Ductal Carcinoma and Fibroadenoma Patients**

İnvaziv Duktal Karsinom ve Fibroadenom Hastalarında İskemi

Modifiye Albümin Düzeyleri

Sibel Bilgili, Özlem Uğurlu, Giray Bozkaya, Nuriye Uzuncan, Baha Zengel..... 134

◆ **Klinik Remisyonda olan Crohn Hastalarında Hastalık Aktivitesinin Erken Öngörüsü**

Early Prediction Of Crohn's Disease Activity In Clinically Remission Patients

Günel Hasanova, Burcu Barutçuoğlu, Nalan Gülşen Ünal,

Günes Ak, Ömer Özütemiz 140

◆ **Kan Gazı ve Serum Bikarbonat Değerleri Arasındaki İlişkinin Analizi**

Analysis of the Relationship Between Blood Gas and

Serum Bicarbonate Values

Fatıma Betül Tuncer, Erdem Çokluk, Mehmet Ramazan Şekeroğlu,

Fatma Özdemir, Meltem Boz 149

İÇERİK 2019 (REGISTRY 2019) 157

Comparison of Spectrophotometric Assays Determining Total Antioxidant Capacity

Toplam Antioksidan Kapasiteyi Belirleyen Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması

Merve Ergin Tuncay

25 Aralık State Hospital, Department of Biochemistry, Gaziantep, Türkiye

Başvuru Tarihi: 12 Eylül 2019

Kabul Tarihi: 07 Kasım 2019

ÖZET

Amaç: Çalışmanın amacı, doğrudan antioksidan kapasiteyi ölçen dört tam otomatik fotometrik yöntem arasında yer alan ferrik iyon indirgeyici güç, total antioksidan durum, total antioksidan yanıt ve total tiyol yöntemlerinin kapsamlı olarak değerlendirilmesi ile belirtilen yöntemlerin güçlü ve zayıf yönlerini açığa çıkarmaktır.

Gereç ve Yöntem: Kan örnekleri 125 sağlıklı bireyden alındı. Analitik tayinlerde serum örnekleri ile çeşitli endojen ve eksojen antioksidan moleküller kullanıldı. Yöntemlerin analitik performans özellikleri analiz edildi ve bu yöntemlerin sonuçları arasındaki ilişkiler incelendi.

Bulgular: Bu çalışmadan elde edilen verilere göre, ferrik iyon indirgeyici güç yöntemi tiyol bileşiklerini, karotenoid ve ürik asidi ölçmek için yetersizdi. Total antioksidan yanıt yöntemi için tekrarlanabilirlik skorları diğer üç yöntemden daha düşüktü ve ürik asidi ölçmek için total antioksidan yanıt yöntemi zayıftı; bununla birlikte total antioksidan yanıt, diğer yöntemlerden daha yüksek doğrusalığa sahipti. Total antioksidan durum yöntemi, hemoliz ve lipemi etkileşiminden en az etkilenen yöntemdi. Total tiyol yöntemi saptama sınırı, hassasiyet ve tekrarlanabilirlik açısından etkili bulundu.

Sonuç: Halen, bir bileşiğin antioksidan aktivitesini belirlemek için kullanılan standart bir yöntem bulunmamakla birlikte, farklı yöntemlerin kullanılması ve farklı yöntemlerden elde edilen sonuçların değerlendirilmesi, antioksidan kapasitenin değerlendirilmesi için uygun bir yoldur.

Anahtar kelimeler: antioksidan kapasite; FRAP; TAS; TAR; TTL

Merve Ergin Tuncay : <https://orcid.org/>

Yazışma adresi: Merve Ergin Tuncay
25 Aralık State Hospital, Department of
Biochemistry, Gaziantep, Türkiye
e-mail: erginmerve@hotmail.com

ABSTRACT

Aim: The aim of this study was to extensively evaluate four fully-automated photometric methods directly measuring antioxidant capacity; ferric ion reducing power, total antioxidant status, total antioxidant response, total thiol and to reveal the weak and strong sides of the assays.

Material and methods: Blood samples were obtained from 125 healthy subjects. Serum samples and several endogenous and exogenous antioxidant molecules were used for analytical determinations. The performance characteristics of the methods were compared and the relationships between these methods' results were investigated.

Results: According to the data obtained from this study, the ferric ion reducing power method was inadequate for measuring thiol compounds, carotenoid and uric acid. Repeatability scores for the total antioxidant response method were lower than the other three methods, and the total antioxidant response method was found to be weak to measure uric acid. However, total antioxidant response method had a higher linearity than the other methods. The total antioxidant status method was the least affected by hemolysis and lipemia interference. Total thiol method—with the lowest limit of detection, high sensitivity, and repeatability—was found to be efficient.

Conclusion: Though there is currently no standard method used to determine the antioxidant activity of a compound, the use of different methods and assessing the results gathered from the different methods is a convenient way to evaluate antioxidant capacity.

Key words: antioxidant capacity; FRAP; TAS; TAR; TTL

INTRODUCTION

Over the past several years, oxidative stress has been described as the impairment of the equilibrium between oxidants and antioxidants [1]. Free radical generation appears sustainably during normal cellular function [2]. When overproduction of a reactive oxygen species (ROS) occurs, it leads to modifications in several cell organelles [3]. As a result, oxidative stress is suspected to be involved in various disease processes [2, 4].

Substances neutralizing the potentially harmful effects of free radicals are grouped together in what is referred to as the antioxidant defense system [5]. The antioxidant system is responsible for cellular protection against oxidative stress [3]. In vitro and in vivo antioxidant measurement methods have been developed and implemented by several different techniques so far [6]. Various terms, such as "capacity," "activity," "power," "parameter," "potential," "potency", and "activity" are used to define antioxidant capacity [7]. According to the reaction mechanisms, the determination of antioxidant capacity can be divided into two main groups: the reactions based on hydrogen transfer (HAT) and the reactions based on single electron transfer (ET) [8, 9].

Various tests for the assessment of antioxidant capacity are available, but no standardized methods exist that measure antioxidant capacity [6-8]. The aim of this study was to comprehensively evaluate the analytical performance characteristics of four different automated methods: the ferric reducing ability of plasma (FRAP) [10], total antioxidant status (TAS) [11], total antioxidant response (TAR) [12], and total thiol (TTL) [13, 14]. FRAP method is based on the principle of the reduction of the ferric-tripyridyltriazine complex (Fe^{+3} -TPTZ) by the antioxidants at low pH to the blue ferrous form (Fe^{+2} -TPTZ). The change of the absorbance is measured [10]. TAS method is based on the reduction of colored 2, 2'-azino-bis (3-ethylbenzotiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) radical to a colorless reduced form by the antioxidants that are present in the sample [11]. In TAR method Fe^{+2} - O-dianizidine complex reacts with hydrogen peroxide and hydroxyl radical occurs. This radical oxidizes o-dianizidine molecules to yellow-brown dianizidyl radicals. Color formation increases with forward oxidation reactions. Antioxidants in the sample suppress oxidation reactions and the color formation. This reaction is monitored spectrophotometrically [12]. TTL method is based on the reduction of 5, 5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic) acid (DTNB) molecule by thiols

to disulfide form and a molecule of 5-thionitrobenzoic acid. This reaction is observed on the spectrophotometry [13, 14].

In this study these methods were compared and their advantages and disadvantages were discussed.

MATERIALS AND METHODS

Study protocol

Blood samples were obtained from 125 healthy subjects. All participants had a normal medical history, and normal laboratory and clinical findings. Subjects with any acute or chronic diseases were excluded. None of the participants were currently using any medication, nor were they cigarette smokers or alcohol abusers. The study was approved by the local ethics committee and written informed consents were received from all participants. After an overnight fasting period, blood samples were taken into tubes, and the serum samples were separated by centrifugation at 1800 g for 10 min and were stored at -80 °C until the analysis was performed. A Shimadzu UV-1800 spectrophotometer (Shimadzu, Kyoto, Japan), which had a temperature-controlled cuvette holder, and a c501 automated analyzer (Roche Hitachi, Mannheim, Germany) were used in this study.

Analytical determinations

FRAP assay

FRAP measurement was performed using the method originally developed by Benzie and Strain [10]. The method was applied to the automated analyzer. The sample volume was 20 μ l (obtained from the mixture of the 10 μ l sample with 30 μ l distilled water), so the working reagent volume was 150 μ l. The absorbance at 593 nm was read, and a 0–10 min reaction time window was used.

TAS assay

The TAS assay was performed according to Erel's method [11]. When the method was performed on the automated analyzer, the sample volume was 6 μ l; the volume of reagent 1 was 100 μ l, and the volume of

reagent 2 was 10 μ l. The absorbance was taken at 660 nm. Originally, absorbance was read before the mixing of reagent 1 and 2. Then, the last absorbance was taken at the end of the incubation period (10 min).

TAR assay

The TAR assay was performed according to Erel's method [12]. When the method was applied to the automated analyzer, the sample volume was 4.5 μ l; the volume of reagent 1 was 180 μ l, and the volume of reagent 2 was 10 μ l. The absorbance was taken at 444 nm. Absorbance was first read prior to the mixing of reagents 1 and 2. The last absorbance was read when the reaction chart reached a plateau line (10 min).

TTL assay

The assay was performed using the method that was developed by Ellman and modified by Hu [13, 14]. The procedure for the automated analyzer was as follows: the sample volume was 10 μ l; the volume of reagent 1 was 110 μ l, and the volume of reagent 2 was 10 μ l. The absorbance was taken at 412 nm. First, absorbance was read before the mixture of reagent 1 and 2; the last absorbance was taken when the reaction graph reached a plateau line (10 min).

Statistical analyses

As the data distributed normally, independent sample t-tests were used for comparison. Pearson's correlation coefficients and linear regression analyses were performed to observe the relationships between assays. In all analyses, a p value of less than 0.05 was considered statistically significant. SPSS software version 22.0 was used for statistical calculations (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

RESULTS

Reaction kinetics of pure antioxidants

The reaction kinetics of pure antioxidants are shown in Figures 1–4. As shown in Figure 1, the FRAP assay revealed that the antioxidant effects of vitamin C, ($\pm$)-catechin, Trolox, and α -tocopherol were fast and were completed at the beginning of the reaction. In addition,

the antioxidant effect on DTT was lower than on the other compounds and was completed later in the reaction. The effect of uric acid proved to consist of little or no reaction. Although the antioxidant effects of β -carotene and GSH were close to each other, they were weaker than the reactions of other stronger antioxidants. The antioxidant effects of gallic acid and bilirubin were found to be much more than other antioxidants, such as vitamin C and Trolox.

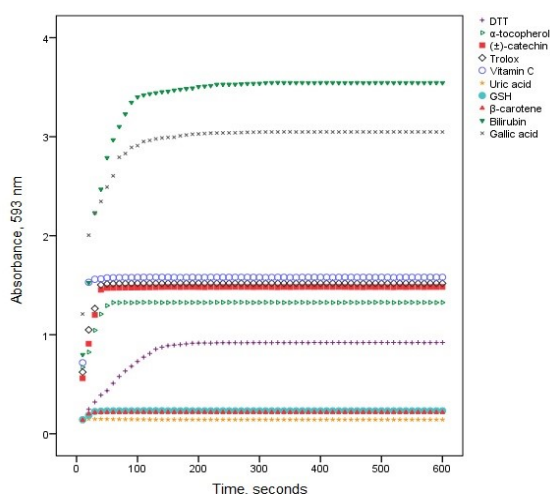


Figure 1. Reaction kinetics of some antioxidants in the FRAP assay

In the TAS assay, the antioxidant effects of vitamin C, Trolox, bilirubin, and DTT were rapid and took place at the start of the reactions. The reactions of uric acid, α -tocopherol, and GSH occurred later than other antioxidants. In particular, the latest effect was observed with uric acid. The effects of gallic acid and ($\pm$)-catechin were expressed at the beginning of reactions within seconds and were more powerful than other antioxidants (Figure 2).

As shown in Figure 3 within the TAR assay, the antioxidant effect of vitamin C was slower than that of DTT, uric acid, and GSH. The effect of β -carotene was faster than that of Trolox, α -tocopherol, gallic acid, and ($\pm$)-catechin. Of the all antioxidants assessed, gallic acid had the latest reaction. Bilirubin was found to have the fastest and highest reaction. In the TTL assay, DTT had a higher antioxidant effect than GSH (Figure 4).

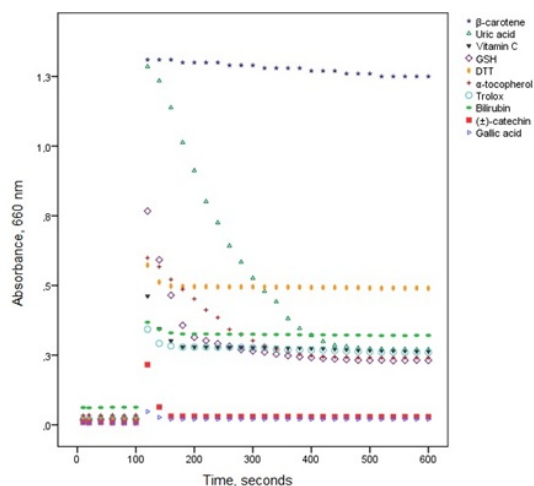


Figure 2. Reaction diagrams of antioxidants solutions in the TAS assay

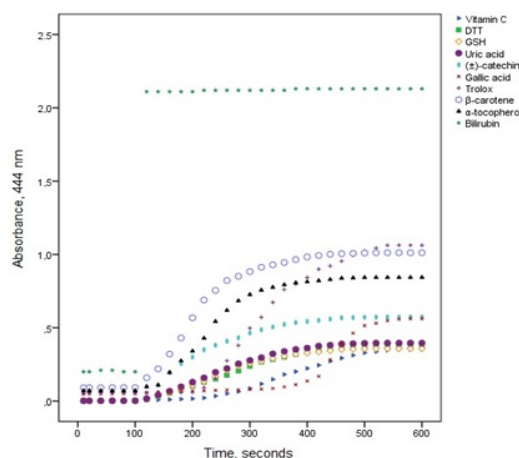


Figure 3. Reactions graphs of pure antioxidants in the TAR assay

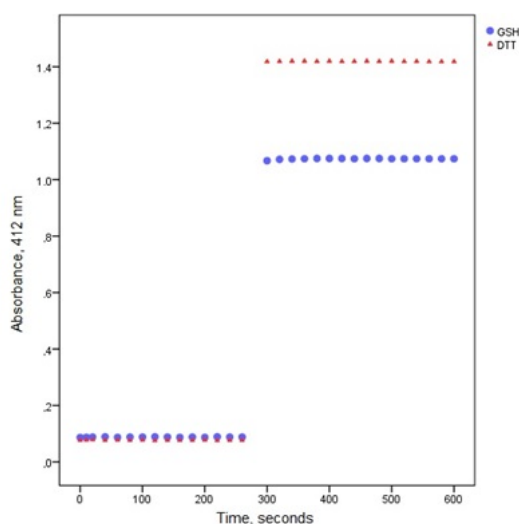


Figure 4. Reaction charts of individual antioxidants in the TTL assay

Linearity of the assays

The linearity of the FRAP, TAS, and TAR assays were performed using serial dilutions of the Trolox solution. The upper limit of the linearity in the FRAP assay was 6.0 mmol Trolox equivalent/l. In the regression analyses, the r value was 0.99 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.147$), while the slope was 0.94 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.037$), and the intercept was 0.07 ($p = 0.334$, $Sy/x = 0.064$). In the TAS assay, the upper limit of the linearity in the assay was 620 mmol Trolox equivalent/l. In the regression analyses, the r value was 0.99 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.028$), the slope was 0.97 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.036$), and the intercept was -0.004 ($p = 0.863$, $Sy/x = 0.023$). The upper limit of the linearity in the TAR assay was 5.0 mmol Trolox equivalent/l. In the regression analyses, the r value was 0.99 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.136$), the slope was 1.248 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.025$), and the intercept was -0.401 ($p < 0.001$, $Sy/x = 0.055$). The linearity of the TTL assay was performed by serial dilutions of the DTT solution. The upper limit of the linearity in the assay was 4.0 mmol/l. In the regression analyses, the r value was 0.99 ($p < 0.001$, $Sy/x = 79.5$), the slope was 1203 ($p < 0.001$, $Sy/x = 20.12$), and the intercept was 75.21 ($p = 0.057$, $Sy/x = 34.52$).

Analytical sensitivity

Analytical sensitivity, which is the slope of the calibration line, for the FRAP, TAS, and TAR assays were 8.7×10^{-5} , 1.05×10^{-5} , and 6.67×10^{-4} [Absorbance/(Amount)], [A X (mmol/l)-1], respectively. The analytical sensitivity of the TTL assay was 1.96×10^{-4} [Absorbance/(Amount)], [A X (μ mol/l)-1].

Analytical recovery

The recovery of the FRAP, TAS, and TAR assays were determined by adding 2 mmol/l vitamin C to serum samples. The mean percentage recovery of the FRAP, TAS, and TAR assays were 136–141%, 110–114%, and 128–132%, respectively. The percentage recovery of the TTL assay was determined by adding 200 μ mol/l GSH to serum samples.

The mean percentage recovery of the TTL assay was 97–102%.

Limit of detection

The detection limit of the methods was determined by performing the zero calibrator 10 times. The detection limit was calculated as the mean of the zero calibrator + 3 SD. The detection limits of the FRAP, TAS, and TAR assays were 0.070, 0.091, and 0.184 mmol Trolox equivalent/l, respectively. The detection limit of the TTL assay was 3.92 μ mol/l.

Precision

The precision of the methods was determined by evaluating the three levels within the serum pool. Within run variability was determined by analyzing duplicates of 20 serum samples. Within day, (between run) variability was calculated on the basis of two runs and 20 determinations with duplicates of serum. Between days, variability was calculated by analyzing frozen aliquots of serum pools on 20 working days. The mean $\pm$ SD values of serum for each method at high, medium, and low levels and the coefficient variation percentage (CV %) of each assay are given in Table 1.

Table 1. The precision of the assays determining antioxidant capacity

A) The precision of the FRAP assay

	Mean $\pm$ SD	CV %
Within run		
Low	0.395 $\pm$ 0.02	2.74
Medium	0.550 $\pm$ 0.03	2.71
High	0.920 $\pm$ 0.03	1.33
Within day		
Low	0.405 $\pm$ 0.02	3.53
Medium	0.562 $\pm$ 0.02	3.14
High	0.942 $\pm$ 0.04	3.57
Between day		
Low	0.396 $\pm$ 0.01	2.16
Medium	0.550 $\pm$ 0.02	3.21
High	0.920 $\pm$ 0.03	2.05

B) The precision of the TAS assay

	Mean $\pm$ SD	CV %
Within run		
Low	0.807 $\pm$ 0.13	20.55
Medium	0.826 $\pm$ 0.12	15.68
High	0.883 $\pm$ 0.13	16.15
Within day		
Low	0.785 $\pm$ 0.12	8.22
Medium	0.803 $\pm$ 0.13	7.18
High	0.900 $\pm$ 0.13	8.67
Between day		
Low	0.816 $\pm$ 0.14	15.63
Medium	0.803 $\pm$ 0.13	13.92
High	0.908 $\pm$ 0.14	12.19

C) The precision of the TAR assay

	Mean $\pm$ SD	CV %
Within run		
Low	0.807 $\pm$ 0.13	20.55
Medium	0.826 $\pm$ 0.12	15.68
High	0.883 $\pm$ 0.13	16.15
Within day		
Low	0.785 $\pm$ 0.12	8.22
Medium	0.803 $\pm$ 0.13	7.18
High	0.900 $\pm$ 0.13	8.67
Between day		
Low	0.816 $\pm$ 0.14	15.63
Medium	0.803 $\pm$ 0.13	13.92
High	0.908 $\pm$ 0.14	12.19

D) The precision of the TTL assay

	Mean $\pm$ SD	CV %
Within run		
Low	296.8 $\pm$ 3.99	0.91
Medium	367.8 $\pm$ 4.26	0.85
High	374.7 $\pm$ 3.83	0.80
Within day		
Low	297.3 $\pm$ 4.08	0.15
Medium	368.4 $\pm$ 4.29	0.24
High	375.1 $\pm$ 4.14	0.48
Between day		
Low	296.7 $\pm$ 4.23	1.35
Medium	368.2 $\pm$ 4.30	1.10
High	374.8 $\pm$ 4.34	1.03

Interference

A hemoglobin standard was used for experiments of hemolysis interference. Serum samples with 20 mg/dl, 40 mg/dl, 60 mg/dl, 80 mg/dl, 100 mg/dl, 200 mg/dl, 400 mg/dl, 600 mg/dl, 800 mg/dl, and 1000 mg/dl of hemoglobin concentration were

obtained by adding appropriate amounts of hemoglobin standard to the serum. In the FRAP, TAS, TAR, and TTL methods, more than 10% interferences were observed over 400 mg/dl, 800 mg/dl, 200 mg/dl, and 200 mg/dl of hemoglobin concentrations, respectively.

Bilirubin interference experiments were performed by using the bilirubin standard. Samples with 2.5 mg/dl, 5 mg/dl, 7.5 mg/dl, 10 mg/dl, 20 mg/dl, 30 mg/dl, 40 mg/dl, 50 mg/dl, and 60 mg/dl of bilirubin concentrations were achieved by adding various amounts of the bilirubin standard to the serum pools. More than 10% interferences were obtained over 2.5 mg/dl, 5 mg/dl, 7.5 mg/dl, and 20 mg/dl of bilirubin concentrations in the FRAP, TAS, TAR, and TTL assays, respectively.

Clinoleic emulsion (20%) was used for the experiments of lipemia interference, and 20% of lipid emulsion was added to the serum pool in different proportions to simulate lipemia-induced turbidity. Triglyceride concentrations within the serum pool containing the highest lipid emulsion was 2000 g/l. This concentration was recognized as the 2000 lipemia index. In the FRAP, TAS, TAR, and TTL methods, the test results were not affected until reaching the 500, 1000, 500, and 500 lipemia indexes for each method, respectively.

Dilution

The sensitivity of the methods were assessed under different serum dilutions. With different serum dilutions, the resulting values were evaluated against expected values. The dilution of the serum did not affect the results of the assays.

The relationship between methods determining antioxidant capacity and antioxidant components of serum

As seen in Table 2, both the TAS and FRAP methods were significantly correlated with serum uric acid, total protein, and total bilirubin levels. While the TAR assay had a positive significant correlation with total

bilirubin and total protein, the TAR assay did not achieve a statistically significant relationship with uric acid. The TTL assay correlated positively at high levels with total protein concentrations, but it did not have a significant relationship with uric acid or total bilirubin levels. The association of the TAS assay results with both the FRAP and TAR assays were statistically significant. There was no significant relationship between the TAS and the TTL methods. In addition, there was no significant relationship between the FRAP assay and either the TAR or TTL assays. A statistically positive correlation was also found between the TAR and the TTL methods.

DISCUSSION

Measurement of the total antioxidant capacity of a tissue or biological fluid shows its oxidant buffering potential [15]. Numerous methods have been developed to measure total antioxidant capacity for various compounds [6-8]. Methodological aspects, such as the chemistry of the method, the target molecules, the differences of measurement conditions, pH, wavelength, and reaction time all play important roles in assessing the results of antioxidant capacity measurement methods [9, 16]. The four different photometric methods evaluated in this study are based on different fundamental principles [10-14].

Cao et al. found that within runs and between runs, the CV of the FRAP assay were 3.5% and 5.6%, respectively [17]. In another study, Jansen et al. obtained a FRAP method CV as 11.4% [18]. In this study, the CVs of all levels of the FRAP method were lower than those obtained in the literature (Table 1). In the TAS method, the within and between run CVs obtained were lower in this study, although the CV of the TAS method was under 4% in both studies [11]. Jansen et al. [18] found the CV of the TAS method was higher compared to both Erel's study [11] and this research. Though the CVs of the TAR assay were lower than 3% across all three levels in Erel's work [12], the CV obtained was over 10% in this study. The low reproducibility rate of the TAR method may be due to the increased number of steps in the method's procedure when compared with the other methods.

The TTL method was affected by hemolysis interference, perhaps due to the spectral absorbance of hemoglobin because the strongest characteristic wavelength of light absorbed by hemoglobin was 415 nm. The TTL method was monitored spectrophotometrically at 412 nm. Why the TAR method was affected at lower concentrations of hemoglobin than the other evaluated methods may be the yellow-brown color that was formed in the principle method. At high hemoglobin concentrations, hemoglobin may have led to the increase in absorbance by causing darkening of this color.

Table 2. The relationship between methods determining antioxidant capacity and antioxidant components of serum

<i>n</i> = 125	TAS assay	TAR assay	TTL assay	Total protein	Uric acid	Total Bilirubin
FRAP assay	<i>r</i> = 0.934 <i>p</i> < 0.001	<i>r</i> = 0.129 <i>p</i> = 0.154	<i>r</i> = -0.063 <i>p</i> = 0.485	<i>r</i> = 0.22 <i>p</i> = 0.014	<i>r</i> = 0.952 <i>p</i> < 0.001	<i>r</i> = 0.265 <i>p</i> = 0.003
TAS assay		<i>r</i> = 0.18 <i>p</i> = 0.16	<i>r</i> = -0.022 <i>p</i> = 0.810	<i>r</i> = 0.22 <i>p</i> = 0.014	<i>r</i> = 0.924 <i>p</i> < 0.001	<i>r</i> = 0.282 <i>p</i> = 0.001
TAR assay			<i>r</i> = 0.332 <i>p</i> < 0.001	<i>r</i> = 0.182 <i>p</i> = 0.044	<i>r</i> = 0.125 <i>p</i> = 0.169	<i>r</i> = 0.307 <i>p</i> = 0.001
TTL assay				<i>r</i> = 0.405 <i>p</i> < 0.001	<i>r</i> = -0.053 <i>p</i> = 0.562	<i>r</i> = 0.074 <i>p</i> = 0.416

FRAP, ferric ion reducing power; TAS, total antioxidant status; TAR, total antioxidant response; TTL, total thiol. The *r* value is the Pearson correlation coefficient. The *p* value is the value of significance.

Bilirubin absorbed light strongly between 340–500 nm [19]. In a strongly acidic medium, the absorption of bilirubin transposes to the UV wavelengths. Under alkaline conditions, bilirubin loses a few of its absorption properties [19]. Due to the reductant substance prospect of bilirubin, the FRAP, TAS, and TAR methods may have experienced interference by bilirubin. Because bilirubin can react with H_2O_2 [19], bilirubin may have caused interference in both the TAS and TAR assays' results. The TTL method may have not been affected by the bilirubin's reductant character because the principle of the method is not based on electron transfer.

The FRAP method measures the ferric reducing ability, and it is different from other ET-based methods, such as TAS and TAR, because there are no free radicals or oxidants in the FRAP method. The antioxidant capacity of an antioxidant against any oxidant may not operate in line with the reduction ability of a ferric ion to a ferrous ion [21]. These difference led to lower results in the FRAP method than those obtained in the TAS and the TAR methods.

Ruskovska et al. [24] and Jansen et al. [18] found quite strong correlations between uric acid levels and the FRAP and TAS assays, in a similar manner to this study. Likewise, Jansen et al. found no statistically significant correlations between uric acid values, and either the TAR or the TTL methods [18]. Similarly to this study, both Erel [11] and Jansen et al. [18] found strong relationships between the TAS and FRAP methods. Because acidic pH forms a principle of the TAR method, the uric acid could not have been determined or may have been determined to be very weak in the TAR method. The TTL method, using a different mechanism than the other three assessed methods, comprised an antioxidant method that reflected the presence of free thiol groups. The absence of correlation between the TTL method and uric acid may explain the lack of relationships between both the TAS and FRAP methods. Due to the

insufficient measurement of molecules that contain sulfhydryl groups by the FRAP method, the lack of correlation between the FRAP and the TTL methods was not unexpected.

In brief, The FRAP assay was based on only iron ions; so this reaction was not specific, and it was insufficient to measure thiol compounds, such as glutathione. Despite these results, the FRAP method was simple, cheap, and did not require special equipment. The TAR method was inadequate for measuring uric acid, an important antioxidant component of serum, due to the pH of the assay principle. In addition, the reproducibility of the TAR method was lower when compared to the other three methods, but the TAR method had a higher linearity than the others. Due to its simple and easy application, the TAS method could be used in many laboratories for antioxidant capacity research studies. Not to be affected by lipemia and hemolysis interferences were advantages of this method. The TTL assay was a very good method, providing the lowest limit of detection, high sensitivity, and high reproducibility.

This study evaluated and reported on the limitations and strengths of several antioxidant capacity methods. Currently, there is no standard method to determine the antioxidant activity of a compound. Methods of determining antioxidant activity depend on various parameters, such as substrate, reaction conditions, the nature of the compound to be analyzed, and the speed and sensitivity of the analysis. Therefore, using different methods for evaluating antioxidant capacity and assessing the results through multiple methods provided more accurate and complete results.

Conflict of interest

There is no conflict of interest.

Acknowledgements

I give my thanks Prof. Dr. Ozcan Erel for support.

REFERENCES

- Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O Oxidative stress and antioxidant defense. *World Allergy Organ J.* 2012;5(1):9-19.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007;39(1):44-84
- Valko M, Rhodes C, Moncol J, Izakovic M, Mazur M Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact.* 2006;160(1):1-40
- Halliwell B, Gutteridge JM editors. Free radicals in biology and medicine. 5th edition USA: Oxford University Press; 2015. p.199-354
- Pisoschi AM, Pop A The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. *Eur J Med Chem.* 2015;97:55-74
- Magalhães LM, Segundo MA, Reis S, Lima JL Methodological aspects about in vitro evaluation of antioxidant properties. *Anal Chim Acta.* 2008;613(1):1-19
- Niki E Assessment of antioxidant capacity in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med.* 2010;49(4):503-15
- MacDonald-Wicks LK, Wood LG, Garg ML Methodology for the determination of biological antioxidant capacity in vitro: a review. *J Sci Food Agric.* 2006;86(13):2046-56
- Huang D, Ou B, Prior RL The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J Agric Food Chem.* 2005;53(6):1841-56
- Benzie IF, Strain J The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal Biochem.* 1996;239(1):70-6
- Erel O A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277-85
- Erel O A novel automated method to measure total antioxidant response against potent free radical reactions. *Clin Biochem.* 2004;37(2):112-9
- Ellman G, Lysko H A precise method for the determination of whole blood and plasma sulfhydryl groups. *Anal Biochem.* 1979;93(1):98-102
- Hu M-L Measurement of protein thiol groups and glutathione in plasma. *Methods Enzymol.* 1994;233:380-5
- Kohen R, Vellaichamy E, Hrbac J, Gati I, Tirosh O Quantification of the overall reactive oxygen species scavenging capacity of biological fluids and tissues. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(6):871-9
- Shahidi F, Zhong Y Measurement of antioxidant activity. *J Funct Foods.* 2015;18:757-81
- Cao G, Prior RL Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clin Chem.* 1998;44(1):1309-15
- Jansen EH, Ruskovska T Comparative analysis of serum (anti) oxidative status parameters in healthy persons. *Int J Mol Sci.* 2013;14(3):6106-15
- Guder W, da Fonseca-Wollheim F, Heil W, Schmitt Y, Töpfer G, Wisser H et al. The Haemolytic, Icteric and Lipemic Sample Recommendations Regarding their Recognition and Prevention of Clinically Relevant Interferences. Recommendations of the Working Group on Preanalytical Variables of the German Society for Clinical Chemistry and the German Society for Laboratory Medicine. *LaboratoriumsMedizin/Journal of Laboratory Medicine* 2000;24(8):357-64
- Balcerczyk A, Grzelak A, Janaszewska A, Jakubowski W, Koziol S, Marszałek M et al. Thiols as major determinants of the total antioxidant capacity. *Biofactors.* 2003;17(1-4):75-82
- Apak R, Güçlü K, Özyürek M, Karademir SE Novel total antioxidant capacity index for dietary polyphenols and vitamins C and E, using their cupric ion reducing capability in the presence of neocuproine: CUPRAC method. *J Agric Food Chem.* 2004;52(26):7970-81
- Pulido R, Bravo L, Saura-Calixto F Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J Agric Food Chem.* 2000;48(8):3396-402
- Glantzounis G, Tsimoyiannis E, Kappas A, Galaris D Uric acid and oxidative stress. *Curr Pharm Des.* 2005;11(32):4145-51
- Ruskovska T, Jansen EH, Antarorov R Evaluation of assays for measurement of serum (anti) oxidants in hemodialysis patients. *Biomed Res Int.* 2014;2014:843157
- Dimitrios B Sources of natural phenolic antioxidants. *Trends in Food Science & Technology* 2006;17:505-12

ST-segment Yüksekliği Olan Miyokard Enfarktüsünde Platelet Biyobelirteçleri

Platelet Biomarkers In ST-Elevation Myocardial Infarction

Işıl Çakır* Nahide Ekici Günay* Ahmet Oğuz Baktır**

* Kayseri Şehir Hastanesi, Biyokimya, Kayseri, Türkiye

** Kayseri Şehir Hastanesi, Kardiyoloji, Kayseri, Türkiye

Başvuru Tarihi: 17 Ağustos 2019

Kabul Tarihi: 07 Kasım 2019

ÖZET

Amaç: ST- segment yüksekliği olan Miyokard enfarktüsü (STEMI) morbidite ve mortalitenin önemli bir nedenidir. Platelet (PLT) aktivasyonu ve tromboz akut iskemik sendromların önemli nedenlerinden biri olan ateroskleroz sürecinde önemli rollere sahiptir. PLT sayısı enflamasyon ile ilişkilidir ve ortalama platelet hacmi (MPV) PLT aktivasyonunun önemli bir belirteçidir. Her iki parametre de artmış kardiyovasküler risk ile ilişkili bulunmuştur. Bu çalışmada Troponin I yüksekliği olan STEMI hastalarının klinik tanısında yeni bir parametre olan MPV/PLT oranının klinik kullanılabilirliğini araştırmayı amaçladık.

Gereç ve Yöntem: Başarılı primer perkütan koroner girişim (PKG) uygulanan STEMI hastası 92 erkek hasta ve 75 kontrol erkek katılımcı çalışmaya dahil edildi. Gruplar arasındaki normal dağılımlı değişkenler için t-test, her bir grubun değişkenler arası korelasyonları için Spearman analizi yapıldı. STEMI hastalarının PLT, MPV ve MPV/PLT oranı parametreleri için bağımsız prediktif faktörleri bulundu. Karakteristik ROC eğrileri oluşturuldu ve optimal cut-off değerleri saptandı. İstatistiksel analizler için SPSS 21.0 programı kullanıldı.

Bulgular: Hastaların PLT, MPV ve MPV/PLT oranı düzeyleri arasında yüksek anlamlı ilişki saptandı ($P < 0.001$). PLT için optimal kesim değeri 262.5 (EAA 0.488, duyarlılık %50 ve özgüllük %52); MPV için 10.45 (EAA 0.700, duyarlılık %69 ve özgüllük %54); ve MPV/PLT için 0.043 (EAA 0.778, duyarlılık %71 ve özgüllük %64) olarak bulundu.

Sonuç: MPV/PLT oranının STEMI'lı hastalarda PLT ve MPV değerlerinden daha sensitif ve spesifik olduğu gösterildi. Ayrıca yükselmiş MPV/PLT oranı yüksek SYNTAX skoru ile ilişkili idi. MPV/PLT oranının bu hastaların ciddiyetinin değerlendirilmesinde yarar sağlayabileceğini önermekteyiz.

Anahtar kelimeler: platelet aktivasyonu, enflamasyon, miyokard enfarktüsü

*Bu araştırmanın bir kısmı Türk Biyokimya Derneği Sivas Biyokimya Günleri 2016'da sözlü sunum olarak sunulmuştur.

Işıl Çakır : <https://orcid.org/0000>

Yazışma adresi: Işıl Çakır
Kayseri Şehir Hastanesi Biyokimya,
Kayseri, Türkiye
e-mail: isilscakir@gmail.com

ABSTRACT

Objective: ST-segment elevation myocardial infarction (STEMI) is an important cause of morbidity and mortality. Platelet (PLT) activation and thrombosis have important roles in the process of atherosclerosis that is one of the most important cause of acute ischaemic syndromes. PLT count is related with inflammation and mean platelet volume (MPV) is an important marker of PLT activation. Both parameters are found to be related with increased cardiovascular risk. In this study we aimed to investigate clinically usability of a new parameter:MPV/PLT ratio, in the diagnosis of patients with Troponin I elevated STEMI.

Material and Methods:92 male patients with STEMI-underwent percutaneous coronary intervention (PCI) successfully and 75 healthy subjects were enrolled in the study. T-test was used to determine significant differences between the groups for data with normal distribution and Spearman's analysis was used to determine the correlations between the variables. Independent predictive factors were found for PLT, MPV and MPV/PLT ratio of patients with STEMI.Characteristic ROC curves were performed, optimal cut-off points were determined.

Results: Significant differences were determined for PLT, MPV and MPV/PLT ratio levels of patients ($P<0.001$). Optimal cut off points were 262.5 for PLT(AUC 0.488;sensitivity 50%, specificity 52%);10.45 for MPV(AUC 0.700, sensitivity 69%, specificity 54%) and 0.043 for MPV/PLT(AUC 0.788, sensitivity 71%, specificity 64%).

Conclusion: MPV/PLT ratio was demonstrated to be associated with patients with STEMI with a higher specificity and sensitivity than PLT and MPV. Also, higher MPV/PLT ratio was associated with greater SYNTAX score.We suggest that an elevated level of MPV/PLT ratio may be of benefit to predict severity of these patients.

Key words: platelet activation, inflammation, myocardial infarction

GİRİŞ

ST-segment yüksekliği olan miyokard enfarktüsü (STEMI); persistan ST-segment yüksekliği, 30 dakikadan daha uzun tipik göğüs ağrısı ile karakterize ve miyokard nekrozunun biyokimyasal belirteçlerinin birbiri ardına salgılandığı hayatı tehdit eden tıbbi bir acildir (1). STEMI olan hastaların enfarkt ile ilişkili arterlerinin hızlı ve başarılı revaskülarizasyonu kanıtlanmış en etkili tedavi seçeneğidir (2,3).

Platelet, kardiyovasküler hastalıkların başlangıcında önemli bir role sahiptir. Ortalama platelet hacmi (MPV), platelet aktivasyonunu ifade eden bir belirteçtir. Artmış MPV değerleri daha düşük MPV değerli plateletlere göre daha aktif ve trombojenik plateletleri ifade etmektedir (4). Platelet aktivasyonu aterosklerozun progresyonunda kritik rol oynamaktadır, miyokard enfarktüsü (MI) ve diğer kardiyovasküler olaylar ile de ilişkili bulunmuştur (5,6). Bu nedenle platelet fonksiyonlarının izlenmesi, koroner arter hastalığının ciddiyeti ve prognozunun değerlendirilmesinde yardımcı olabilmektedir (7). Platelet aktivitesini platelet sayısından ziyade

büyüklüğü daha net olarak göstermektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda MPV ve MPV/platelet sayısı oranının yüksekliği diyabetes mellitus, kronik böbrek yetmezliği, kolorektal kanser, mitral stenoz ve de miyokard enfarktüsü ile ilişkili bulunmuştur (8-11).

Çalışmamızda, yeni bir enflamasyon belirteci olan MPV/platelet sayısı oranını ST yüksekliği olan perkutan koroner girişim yapılan miyokard enfarktüsü hastalarda değerlendirmeyi ve sonrasında Troponin I ve SYNTAX (SYnergy between PCI with TAXUS and Cardiac Surgery) skoru ile ilişkili olup olmadığını araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Ocak 2015-Ocak 2016 tarihleri arasında acil servise göğüs ağrısı nedeniyle başvuran, akut ST-segment yüksekliği olan miyokard enfarktüsü tanısı ile kardiyoloji kliniğine kabul edilen ve başarılı perkutan koroner girişim yapılan 92 erkek hasta ve kardiyoloji polikliniğine başvuran, ekokardiyografi (EKO) bulguları normal kabul edilen 75 erkek kontrol grubunu oluşturmak üzere çalışma-

mıza dahil edildi. Hastaların EKO ve anjiyografi verileri dosyaları taranarak incelendi. Tanı ve aynı zamanda tedavi yöntemi olarak değerlendirilen koroner anjiyografi sonrasında SYNTAX skoru bilgisayar programı kullanılarak hesaplandı. SYNTAX skoru 0-22 için düşük, 23-32 için orta, 33 ve üzeri için yüksek olarak (12) değerlendirilen hastaların skorları kaydedildi. Hastaların başvuru anındaki tam kan sayımı parametreleri (WBC, MPV, PLT), biyokimyasal verileri (Glukoz, trigliserid, total kolesterol, HDL kolesterol, LDL kolesterol, CRP) ve Troponin I değerleri laboratuvar bilgi sisteminden elde edildi. Verilerin istatistiksel analizinde SPSS 23.0 (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA) versiyon paket programı kullanıldı. Grupların karşılaştırılmasında parametrik değerler için Student t-testi nonparametrik değerler için Mann-Whitney U-testi kullanıldı. Değerler ortalama $\pm$ standart sapma ya da medyan (%25-%75 persentil) olarak belirtildi. Parametrelerin birbiriyle ilişkisinin değerlendirilmesinde Spearman's korelasyon analizi kullanıldı. Receiver operating characteristic curve (ROC) analizi ile MPV, PLT ve MPV/PLT oranları için sensitivite, spesifite ve prediktif değer tayini yapıldı. $P \leq 0.05$ değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR

Hasta grubunda bulunan 92 STEMI hastasının ortalama yaşı 65.80 ± 15.34 yıl ve kontrol grubunu oluşturan 75 erkek katılımcının yaş ortalaması ise 62.28 ± 5.87 yıl idi. Her iki grup arasında yaşları bakımından istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu ($P < 0.05$). Her iki gruba ait demografik, ekokardiyografik, hematolojik ve biyokimyasal veriler Tablo 1 de özetlenmiştir. Hastaların glukoz, total kolesterol, trigliserid ve LDL-kolesterol değerleri kontrol grubu hastalarına göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla; $P < 0.001$, $P = 0.008$, $P < 0.001$, $P = 0.03$). HDL-kolesterol değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görülmedi ($P > 0.05$).

Hasta grubunda WBC ve MPV değerleri kontrol grubunun değerlerinden istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (sırasıyla; $P < 0.001$, $P = 0.017$). PLT ortalama değerleri hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 263.81 ± 87.69 ve 261.93 ± 65.33 olarak bulundu ancak aralarında anlamlı bir fark yoktu ($P > 0.05$). MPV/PLT ortalama değerleri hasta ve kontrol grubunda sırasıyla 0.048 ± 0.019 ve 0.037 ± 0.012 idi ve aralarındaki fark istatistiksel olarak anlamlı idi ($P = 0.003$). Hastaların ejeksiyon fraksiyonu (EF) değerleri

Tablo 1. STEMI hasta grubu ve kontrol grubuna ait demografik, hematolojik, biyokimyasal ve ekokardiyografik özellikler.

Değişkenler	Hasta grubu (n=92)	Kontrol grubu (n=75)	P değeri
Cinsiyet	Erkek	Erkek	-
Yaş (yıl)	65.80 ± 15.34	62.28 ± 5.87	> 0.05
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	12.10 ± 4.08	7.83 ± 1.57	< 0.001
PLT ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	263.81 ± 87.69	261.93 ± 65.33	> 0.05
MPV (fL)	10.86 ± 1.80	10.26 ± 1.17	0.017
MPV/PLT	0.048 ± 0.019	0.037 ± 0.012	0.003
CRP (mg/L)	33.86 ± 18.72	3.32 ± 0.01	< 0.001
Glukoz (mg/dL)	154.46 ± 69.73	108.92 ± 39.61	< 0.001
Trigliserid (mg/dL)	210.57 ± 102.53	170.49 ± 77.71	0.008
Total kolesterol (mg/dL)	214.76 ± 45.59	181.84 ± 61.73	< 0.001
HDL- kolesterol (mg/dL)	46.25 ± 10.04	45.48 ± 13.07	> 0.05
LDL-kolesterol (mg/dL)	140.16 ± 39.87	119.44 ± 44.39	0.03
Troponin I (ng/dL)	2.79 (0.52-15.03)	-	-
EF (%)	17.72 ± 7.29	63.82 ± 5.74	< 0.001
SYNTAX skoru	41.0 ± 9.70	-	-

ortalaması 0.037 ± 0.012 iken kontrol grubunda bu değer 63.82 ± 5.74 idi ($P < 0.001$). STEMI hasta grubunda hastaneye başvuru anında Troponin I değerleri ortalaması 2.79 (0.52-15.03) ve hesaplanan SYNTAX skorları ortalaması 41.0 ± 9.70 idi (Tablo 1).

Hastaların MPV/PLT oranları ile enflamasyon belirteçleri olan WBC ve CRP ile hastaların SYNTAX skoru değerleri, ejeksiyon fraksiyonu değerleri ve Troponin I değerleri Spearman's korelasyon analizi kullanılarak karşılaştırıldı ve MPV/PLT oranları ile Troponin I ve WBC değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı ilişki bulundu (sırasıyla, $P=0.034$ ve $P=0.028$) (Tablo 2).

Hasta grubu SYNTAX skoruna göre iki ayrı gruba (düşük (skor ≤ 22) skorlu hastamızın

olmaması nedeniyle orta (skor 23-32, 21 hasta) ve yüksek (≥ 33 , 61 hasta) olmak üzere ayrıldı. Her iki grup için MPV/PLT oranı hesaplandı ve aralarında istatistiksel olarak yüksek anlamlı fark bulundu ($P < 0.001$) (Tablo 3).

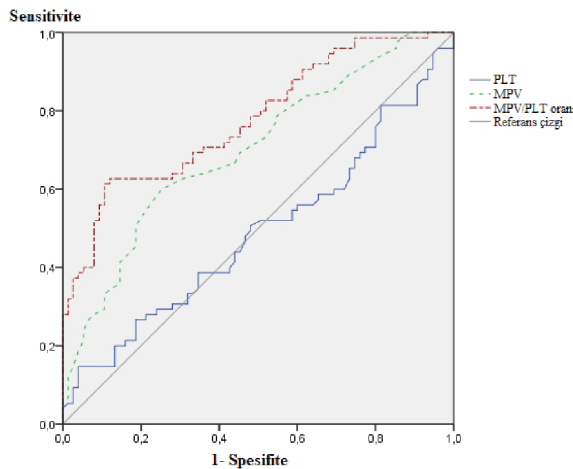
MPV, PLT ve MPV/PLT oranının STEMI hastalarındaki tanısal değerini belirlemek için ROC eğrisi çizildi; PLT için optimal kesim değeri 262.5 (Eğri altındaki alan (EAA) 0.488, duyarlılık % 50 ve özgüllük % 52); MPV için 10.45 (EAA 0.700, duyarlılık % 69 ve özgüllük % 54); ve MPV/PLT için 0.043 (EAA 0.778, duyarlılık % 71 ve özgüllük % 64) olarak bulundu (Şekil 1) (Tablo 4).

Tablo 2. Spearman's korelasyon analizi ile STEMI hastalarının MPV/PLT oranlarının Troponin I, WBC, CRP, SYNTAX skorları ve EF değerleri ile aralarındaki korelasyonun değerlendirilmesi.

MPV/PLT Korelasyon katsayısı P	Troponin I	WBC	CRP	SYNTAX skoru	EF
	0.245	-0.254	-0.073	0.034	-0.061
	*0.034	*0.028	0.532	0.770	0.602

Tablo 3. SYNTAX skoruna göre orta ve yüksek skorlu hasta gruplarında MPV/PLT oranları.

Değişken	SYNTAX skoru (23-32)	SYNTAX skoru (≥ 33)	P
MPV/PLT	0.041 ± 0.018	0.36 ± 0.09	< 0.001



Şekil 1. STEMI hastalarının MPV, PLT ve MPV/PLT oranı değerleri için ROC eğrisi analizi.

Tablo 4. STEMI hastalarında MPV, PLT ve MPV/PLT oranlarının ROC eğrisi analizi ile belirlenen eğri altındaki alan, sensitivite ve spesifite değerleri.**Eğri altındaki alan (EAA)**

Değişkenler	Alan	Std. hata	P	% 95 Güven Aralığı	
				Düşük değer	Yüksek değer
PLT	,488	,048	,806	,395	,582
MPV	,700	,042	,000	,617	,783
MPV/ PLT oranı	,778	,037	,000	,705	,851

TARTIŞMA

Kardiyovasküler hastalıklar, kan damarlarını ve kalbi etkileyen bir dizi hastalıkla temsil edilir. Koroner arter hastalığına neden olan ateroskleroz lipidlerin, enflamatuvar hücrelerin ve fibröz elemanların akümüasyonu ve arter duvarında birikimini destekler, striaların ve çoğunlukla bu damarların obsrüksiyonuna neden olan yağlı plakların oluşumundan sorumludur (13). Plateletler, MI patogenezinde kritik bir rol oynarlar: koroner arterlerin reblokajı ve revaskülarizasyon. Ayrıca artmış MPV akut MI'da kötü prognoz ile ilişkilidir. Akut STEMI hastalarında artmış MPV düzeyleri gösterilmiştir (14). Plateletlerin proenflamatuvar ve protrombotik fonksiyonları aterosklerotik plakların ve trombüsün gelişiminde yer almaktadır. STEMI olan hastaların prognozunda da enflamasyon ve tromboz önemli rol oynamaktadır (15). MPV, platelet aktivasyonunun indikatörüdür. Büyük plateletlerin agregasyon ve trombojenik özellikleri daha fazladır (16). Protrombotik potansiyelleri intraselüler tromboxan A2 ve beta tromboglobulin düzeylerinin daha fazla olmasından, ilaveten artmış prokoagülan yüzey proteinlerinin mevcudiyetinden kaynaklanmaktadır (17). MPV sadece kardiyovasküler olaylarla ilişkili değil, aynı zamanda da aterosklerozun ciddiyeti ile ilişkili bulunmuştur. Uysal ve arkadaşları yaptıkları çalışmada MPV'nin

ciddi aterosklerozun prediktörü olduğunu belirtmişlerdir (18). Akut koroner sendromlu hastalarda artmış MPV değerleri son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (19, 20). Akgül ve arkadaşlarının çalışmasında ise PKG yapılan STEMI hastalarında yüksek MPV değerleri artmış 6 aylık mortalite oranları ile ilişkili bulunmuştur (21). Bolat ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada MPV/PLT oranını STEMI hastalarının bir yıllık fatal olmayan yeniden infarktüs oranları ile ilişkili olduğunu belirtmişler ancak kısa ve uzun dönem mortalite ile ilişkili olmadığını bildirmişlerdir (22).

Çalışmamızda başarılı PKG yapılan STEMI hastalarında MPV/PLT oranı kontrol grubu ile karşılaştırıldı ve anlamlı yüksek fark olduğu ayrıca MPV/PLT oranının SYNTAX skoru yüksek hastalarda daha yüksek olduğu gösterildi. Yüksek SYNTAX skoru, kötü kardiyovasküler sonuçlara ve komplikasyonlara işaret etmektedir. Çalışmamızda sunulan sonuçlara göre MPV/PLT oranının STEMI hastalarında özellikle risk belirlenmesinde kullanılan SYNTAX skoru ile birlikte değerlendirilmesinin yararlı olabileceği kanaatindeyiz. Çalışmamızın tek merkezli, sadece erkek hastalar ile ve nisbeten düşük katılımcı sayısı ile yapılmış olması nedeniyle daha geniş katılımcı sayısı ile yapılacak ileri araştırmalara ihtiyaç vardır.

KAYNAKLAR

1. Doganay B, Okutucu S, Cetin M, Kızıltunc E, Karayigit O, Ozkan C, et al. Association of Serum Copeptin Levels with Patency of Infarct-Related Arteries in Patients with ST-Segment Elevation Myocardial Infarction. Acta Cardiol Sin. 2019; 35(4): 360-368.
2. Steg PG, James SK, Atar D, et al. ESC guidelines for the management of acute myocardial infarction in patients presenting with ST-segment elevation. Eur Heart J. 2012; 33: 2569-2619.
3. O'Gara PT, Kushner FG, Ascheim DD, et al. 2013 ACCF/AHA guideline for the management of ST-elevation myocardial infarction: executive summary: a report of the American College of Cardiology Foundation/American Heart Association Task Force on Practice Guidelines: developed in collaboration with the American College of Emergency Physicians and Society for Cardiovascular Angiography and Interventions. Catheter Cardiovasc Interv. 2013; 82: E1-E27.

4. Corash L, Tan H, Gralnick HR. Heterogeneity of human whole blood platelet subpopulations. I. Relationship between buoyant density, cell volume, and ultrastructure. *Blood*. 1977; 49: 71-87.
5. Chu SG, Becker RC, Berger PB, et al. Mean platelet volume as a predictor of cardiovascular risk: a systematic review and meta-analysis. *J Thromb Haemost*. 2010; 8(1): 148-156.
6. Martin JF, Bath PM, Burr ML. Influence of platelet size on outcome after myocardial infarction. *Lancet*. 1991; 338(8780): 1409-1411.
7. Jiang P, Song Y, Xu JJ, Wang HH, Jiang L, Zhao W, et al. Two-year prognostic value of mean platelet volume in patients with diabetes and stable coronary artery disease undergoing elective percutaneous coronary intervention. *Cardiology Journal* 2019;26(2): 138-146.
8. Ju HY, Kim JK, Hur SM, et al. Could mean platelet volume be a promising biomarker of progression of chronic kidney disease?. *Platelets* 2015; 26: 143-147.
9. Wu YY, Zhang X, Qin YY, Qin JQ, Lin FQ. Mean platelet volume/platelet count ratio in colorectal cancer: a retrospective clinical study *BMC Cancer* 2019; 19: 314.
10. 10-Aslanabadi N, Separham A, Valae Hiagh L, Karkon Shayan F, Toufan M, Ghaffari S, et al. Association of mean platelet volume with echocardiographic findings in patients with severe rheumatic Mitral stenosis. *J Cardiovasc Thorac Res*. 2019; 11(2): 95-99.
11. Azab B, Torbey E, Singh J, et al. Mean platelet volume/platelet count ratio as a predictor of long-term mortality after non-ST-elevation myocardial infarction. *Platelets* 2011; 22: 557-66.
12. Neumann F-J, Sousa-Uva M, Ahlsson A, Alfonso F, Banning AP, Benedetto U, et al. 2018 ESC/EACTS Guidelines on myocardial revascularization. *European Heart Journal*. 2018: 394.
13. Batista TR, Figueiredo RC, Rios DRA. Platelets volume indexes and cardiovascular risk factors. *Rev Assoc Med Bras* (1992). 2018; 64(6): 554-559.
14. Karaman S, Coskun A. Do MCHC, MPV, and Procalcitonin Levels Determine Prognosis in Acute Coronary Syndrome?. *Emerg Med Int*. 2019: 6721279.
15. Kamińska J, Koper OM, Siedlecka-Czykier E, Matowicka-Karna J, Bychowski J, Kemona H. The utility of inflammation and platelet biomarkers in patients with acute coronary syndromes. *Saudi J Biol Sci*. 2018; 25(7): 1263-1271.
16. Adel MH, Seyedian M, Jafarsalehi M, Najafi MH, Nourizadeh M, Mohebi M, et al. Is any correlation between platelet indices with extent of coronary artery involvement in ischemic heart diseases?. *Health* 2016; 1266-1274.
17. Reddy SK, Shetty R, Marupuru S, Yedavalli N, Shetty K. Significance of Platelet Volume Indices in STEMI Patients: A Case-Control Study. *J Clin Diagn Res*. 2017; 11(4): LC05-LC07.
18. Uysal HB, Dağlı B, Akgüllü C, Avcil M, Zencir C, Ayhan M, et al. Blood count parameters can predict the severity of coronary artery disease. *Korean J Intern Med*. 2016; 31(6): 1093-1100.
19. Lippi G, Filippozzi L, Salvagno GL, Montagnana M, Franchini M, Guidi GC, et al. Increased mean platelet volume in patients with acute coronary syndromes. *Arch Pathol Lab Med* 2009; 133: 1441-1443.
20. Sušilović Grabovac Z, Baković D, Lozo M, Pintarić I, Dujčić Ž. Early Changes in Platelet Size and Number in Patients with Acute Coronary Syndrome. *Int J Angiol*. 2017; 26(4): 249-252.
21. Akgul O, Uyarel H, Pusuroglu H, Gul M, Isiksacan N, Turen S, et al. Prognostic value of elevated mean platelet volume in patients undergoing primary angioplasty for ST-elevation myocardial infarction. *Acta Cardiol*. 2013; 68 (3): 307-314.
22. Bolat I, Akgul O, Cakmak HA, Pusuroglu H, Somuncu U, Ozbey S, et al. The prognostic value of admission mean platelet volume to platelet count ratio in patients with ST-segment elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *Kardiol Pol*. 2016; 74(4): 346-355.

Analitik Evre Performansının Altı Sigma Metodu Kullanılarak Değerlendirilmesi

Evaluation of Analytical Phase Performance by Using Six Sigma Method

Şeniz Korkmaz

Karacabey Devlet Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, Bursa, Türkiye

Başvuru Tarihi: 16 Temmuz 2019

Kabul Tarihi: 12 Aralık 2019

ÖZET

Amaç: Bu çalışma ile laboratuvarımızda sık istenen klinik biyokimya parametrelerinin analitik süreç performanslarının altı sigma metodu ile değerlendirilmesi ve elde edilen sonuçlara göre gerekli düzenlemelerin yapılması amaçlandı.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda Bursa Karacabey Devlet Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda 2018 yılı Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında 17 biyokimya parametresinin süreç sigma düzeyleri "(%TEa-%Bias)/%CV" formülüne göre hesaplandı. Bias değerleri dış kalite kontrol raporlarından (KBUDEK), %CV değerleri iki düzey iç kalite kontrol (İKK) numunelerinden elde edildi. Formüle CLIA'nın belirlediği kabul edilebilir toplam hata (TEa) oranları kullanıldı.

Bulgular: Glukoz her iki düzey, total protein düzey-1, amilaz düzey-2 için sigma değerleri <3 olarak saptandı. Albümin, klor, kolesterol ve kreatinin her iki düzey, HDL kolesterol düzey-1, ALT (Alanin Aminotransferaz), total protein ve trigliserid düzey-2 için sigma değerleri 3.00-3.99 arasında bulundu. AST (Aspartat Aminotransferaz), demir, üre, ürik asit her iki düzey, ALT, amilaz, Trigliserid düzey-1, HDL kolesterol düzey-2 için sigma değerleri 4.00-5.99 arasında saptandı. ALP (Alkalen Fosfataz), CK (Kreatin Kinaz) ve LDH (Laktat Dehidrogenaz) her iki düzey için sigma değerleri >6 olarak bulundu.

Sonuç: Altı sigma metodu, laboratuvarların kalite kontrol yönetimine rehberlik edecek öz değerlendirmenin yapılmasına olanak verir. Çalışmamızda özellikle sigma >6 çıkan testler için Westgard 1_{3s} kuralının uygulanarak maliyetlerin ve zaman kaybının azaltılabileceği kanaatine varıldı.

Anahtar Sözcükler: Analitik evre; altı sigma metodu; kabul edilebilir toplam hata

Şeniz Korkmaz : <https://orcid.org/0000>

Yazışma adresi: Şeniz Korkmaz
Karacabey Devlet Hastanesi, Tıbbi
Biyokimya, Bursa, Türkiye
e-mail: senizkorkmaz@gmail.com

ABSTRACT

Aim: In this study, we aimed to evaluate the analytical process performance of clinical biochemistry parameters by six sigma method and to make the necessary arrangements according to the obtained results in our laboratory.

Material and Methods: In this study, the process sigma levels of 17 biochemistry parameters in August, September and October 2018 were calculated according to the formula “(TEa%-Bias%)/CV%”. Bias values were obtained from external quality control reports (KBUDEK), CV% values were acquired from two levels of internal quality control (IQC) samples. Acceptable total error (TEa) ratios determined by CLIA were used for this formula.

Results: Sigma values for glucose in both levels, level-1 of total protein, level-2 of amylase were <3. Sigma values for albumin, chloride, cholesterol and creatinine in both levels and level-1 of HDL cholesterol, level-2 of ALT (Alanine Aminotransferase), total protein and triglyceride were between 3-3.99. Sigma values for AST(Aspartate Aminotransferase), iron, urea, uric acid in both levels, level-1 of ALT, amylase and triglyceride, level-2 of HDL cholesterol found between 4-5.99. The sigma values for level-2 of total protein, ALT and AST found between 4-5.99. The sigma values for ALP (Alkaline Phosphatase), CK (Creatine Kinase) and LDH (Lactate Dehydrogenase) in both levels were > 6.

Conclusion: Six sigma method allow self-assessment to guide the laboratory's quality control management. In our study, it was concluded that the costs and time loss could be reduced by implementing the Westgard 1_{3s} rule especially for the parameters with sigma levels higher than six.

Key words: Analytical phase; six sigma method; acceptable total error

GİRİŞ

Klinik laboratuvarlarda toplam test süreci preanalitik, analitik ve postanalitik olmak üzere 3 evreden oluşmaktadır. Yapılan çalışmalara göre toplam test sürecinin evreleri için tahmin edilen hata oranları preanalitik evrede %30-75, analitik evrede %4-30 ve postanalitik evrede %9-55 arasında değişmektedir (1). Son yıllarda hem laboratuvarların hem de laboratuvar ekipmanı ve reaktif üreticilerinin önemli çabaları ile toplam test sürecinin analitik aşamasındaki hatalar önemli ölçüde azalmıştır (2).

Bir laboratuvardaki kalite çalışmaları, analitik kalite ile başlamalıdır çünkü analitik kalite, tüm laboratuvar testleri için gerekli olan kalite özelliğidir. Analitik kalite, tek başına bir kalite gerekliliği değildir ancak analitik kalite sağlanmadıkça diğerlerinin de önemi kalmamaktadır. Laboratuvarlar, diğer kalite gerekliliklerinden önce, doğru test sonucu verebilmelidir (3). Analitik süreç özellikle test yöntemlerinin, kullanılan analizörlerin, iç ve dış kalite kontrolün ve kalibrasyonların ön plana çıktığı ve değişkenlerin kontrolünün daha mümkün olduğu bir süreçtir (4). Hastaneye başvuran bireylerin %75-80'inin

klinik laboratuvarlarda test yaptırdığı dikkate alındığında, toplam laboratuvar sürecinin kalitesinin kontrol altında tutulması kurumsal ve ulusal sağlık hizmeti açısından bir gereklilik haline gelmektedir. Türkiye’de “Tıbbi Laboratuvarlar Yönetmeliği” (5) ve “Sağlıkta Kalite Standartları-Hastane” (6) gereği laboratuvarların kalite güvence sisteminin yapılandırılması gerekmektedir. Özellikle Yönetmeliğin 31. Maddesi’nde “Laboratuvarın kalite kontrol ve değerlendirme sistemi” alt maddelerinde belirtildiği gibi “Laboratuvar; test sonuçlarının güvenilirliğini sağlamak amacıyla kalite kontrol ve değerlendirme sistemi kapsamında yöntemlerini ve faaliyetlerini gözden geçirmek ve gerekli önlemleri almak zorundadır.” Bu maddedeki zorunlulukların yerine getirilebilmesi için bilimsel olarak geçerliliği kanıtlanmış standart, kılavuz ve önerilerden yararlanılması gereklidir.

Klinik laboratuvarlarda kullanılan Altı Sigma metodu; istatistiksel hesaplamalara dayanan, süreç değişkenlerine odaklı, süreç performansı hakkında bilgi sağlayan bir kalite yönetim aracıdır. Temel gösterge süreç sigma düzeyidir. Altı Sigma metodunda süreç performansı, süreç sigma düzeylerinden

belirlenen kalitesizlik maliyetlerine göre değerlendirilir ve iyileştirmede bu kalitesizlik maliyetlerinin azaltılması hedeflenir (7). Sigma seviyesi <3 düşük performansın göstergesi iken, sigma seviyesi ≥ 3 iyi performans göstergesi olarak kabul edilir. Sigma seviyesinin 6 veya daha büyük olması dünya standartlarında performansı göstermektedir (8). Altı Sigma Metodunda özellikle klinik laboratuvarlar en kolay uygulanabilen alanlardandır ve çok sayıda uygulamalar ve öneriler bulunmaktadır (7, 9, 10).

Sağlık hizmetlerinde sıfır hata hedeflenir. Ancak dinamik bir sektör olması ve çok sayıda değişkenliğin etkisi altında bulunması bu hedefe ulaşmayı zorlaştırmaktadır. Özellikle, her hasta boyutunda tüm etkenlerin kontrol edilmesi mümkün olamamaktadır. Bu açıdan değerlendirildiğinde Altı Sigma kalite yönetimi oldukça avantaj sağlamaktadır. Süreç temelli olması, özellikle bir sürecin ana değişkenlerine/hata kaynaklarına odaklı projelerle süreç performansı hakkında genel bir bilgi sağlaması açısından yararlıdır. Özellikle laboratuvar tıbbına uygulanabilme avantajlarından yararlanılması, tüm hastane genelinde uygulanmasına öncülük edilmesi için gerekli eğitimlerin uygulanması önerilmektedir (7).

Klinik laboratuvar testlerinin ölçümlerindeki temel analitik kriterler doğruluk ve tekrarlanabilirliktir. Ölçüleri de, sırasıyla bias ve standart sapmadır. Hedeflenen dağılım aralığı kabul edilebilir toplam hata (TEa) veya Avrupa Birliği'nde önerilen biyolojik değişkenlik katsayıları temel alınarak belirlenmektedir (11). Westgard'ın önerisinde hedef aralık kabul edilebilir toplam hataya göre belirlenir. Buna göre analitik sürecin sigma düzeyi her analit için $\text{Süreç sigma} = (\text{TEa} - \text{bias}) / \text{SD}$ veya $\text{Süreç sigma} = (\% \text{TEa} - \% \text{bias}) / \text{CV}$ formülleriyle hesaplanabilir (12). Analitik sürecin sigma düzeyinin hesaplanmasında laboratuvarlarda İKK ve DKK değerlendirme programlarıyla elde edilmekte olan %CV ve bias kullanılabilmektedir. Bu olanak Altı Sigma metodunun uygulanabilmesi için

avantaj sağlamaktadır (7). Altı sigma metodu ile analiz öncesi ve sonrası süreçlerin, analiz süreciyle birlikte değerlendirilmesi de sürece bütünsel bir bakış sağlamaktadır.

Altı sigma metodu sayesinde kontrol altında olduğu düşünülen bir sistemde güvenli olmayan sonuç ihtimalini belirleme fırsatı yakalanabilmektedir. Sigma değeri küçük testlerin düşük analitik performans sergiledikleri düşünülerek daha sıkı takip edilmeleri ve iyileşme göstermedikleri takdirde analitik yöntemin detaylı değerlendirilmesi gerekliliği ortaya çıkacak ve belki de yöntem değişikliği kararı alınabilecektir. Sigma değerleri kullanımının diğer yararı ise, kontrol uygulamalarında düzenleme yapma fırsatı vermesidir. Örneğin, sigma değeri ≥ 6 olan testler için günlük bir kez, iki düzey iç kalite kontrol ile ve 1_{3S} Westgard kuralı ile takip önerilir. Sigma değeri 4-6 ise günlük iki düzey kontrol ve 1_{3S} , 2_{2S} , R_{4S} Westgard çoklu kuralı uygulanır. Sigma değeri 3-3,99 ise günde iki kez iki düzey kontrol ve 1_{3S} , 2_{2S} , R_{4S} , 4_{1S} Westgard çoklu kuralı uygulanır. Sigma değeri 3'ün altında ise kök neden analizi yapılmalı ve rutin kullanıma girmeden önce metod performansı iyileştirilmelidir. Bu sayede, yanlış İKK reddinin azaltılarak hem maliyet hem de sonuç verme sürelerinde gecikmeye neden olan zaman kaybının azaltılabileceği düşünülmektedir. Westgard tarafından sigma değerlerine göre uygulanması önerilen İKK kuralları Tablo 1'de gösterilmiştir (13,14).

Bu çalışmada esas alınan süreç, klinik laboratuvar analitik sürecidir. Bu süreçten beklentiler de doğru ve güvenilir test sonuçlarının elde edilmesidir. Bunun sağlanabilmesi için sürekli uygulanmakta olan iç kalite kontrol programlarından tekrarlanabilirlik ölçütü CV ve dış kalite kontrol değerlendirme programlarından (KBUDEK) doğruluk ölçütü olan bias değerleri elde edildi ve süreç sigma düzeylerinin hesaplanmasında bu değerlerden yararlanıldı.

Tablo 1. Sigma değerlerine göre uygulanması önerilen iç kalite kontrol kuralları**Table 1.** Recommended internal quality control rules according to sigma values

Sigma Değeri	Performans tanımı	İç Kalite Kontrol Kuralı
<3	Yetersiz- Metod performansının iyileştirilmesi gerekli	$1_{3S} / 2_{2S} / R_{4S} / 4_{1S}$ Günde 2 kez, 3 düzey
3-3,99	Yeterli-Daha sıkı İKK	$1_{3S} / 2_{2S} / R_{4S} / 4_{1S}$ Günde 2 kez, 2 düzey
4-6	İyi/Kabul edilebilir performans	$1_{3S} / 2_{2S} / R_{4S}$ Günde 1 kez, 2 düzey
≥ 6	Mükemmel performans	1_{3S} Günde 1 kez, 2 düzey

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda Bursa Karacabey Devlet Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda 2018 yılı Ağustos, Eylül ve Ekim aylarında laboratuvar işleyiş prosedürü ve sağlıkta kalite standartları gereğince çalışılan iç kalite ve dış kalite kontrol verileri kullanılarak, 17 klinik biyokimya parametresinin analitik performansları sigmametrik olarak değerlendirildi. Çalışmaya, albümin, ALP, ALT, amilaz, AST, klor, total kolesterol, CK, kreatinin, glukoz, HDL kolesterol, demir, LDH, total protein, trigliserid, üre ve ürik asit parametreleri dahil edildi.

UniCel DxC 800 (Beckman Coulter, ABD) otoanalizörü ile analizi gerçekleştirilen 17 parametrenin ortalama %CV (günler arası tekrarlanabilirlik) değerleri, günlük olarak çalışılan İKK numuneleri sonuçları ile cihazın kendi yazılımından elde edildi. Laboratuvarımızda normal ve patolojik olmak üzere iki düzey İKK numunesi analizi gerçekleştirildiğinden dolayı %CV değerleri iki düzey için ayrı ayrı hesaplandı.

Bir veri setinden elde edilen standart sapmanın (SD) ortalamaya ($\bar{x}$) oranının yüzde olarak ifadesi olan varyasyon katsayısı (CV) şu şekilde hesaplanır: $CV(\%) = (SD / \bar{x}) \times 100$ (15).

Bias, bir testin analizi sonucunda elde edilen değer ile referans değer arasındaki farktır (15). Çalışmamızda Ağustos, Eylül ve Ekim aylarına ait KBUDEK DKK programı raporlarındaki veriler ile %bias=[(test sonucu-testin DKK ortalama değeri)/testin DKK ortalama değeri] x 100 formülü kullanılarak %bias

saptandı. Sigma değerinin hesaplandığı formülde kullanılmak üzere, her bir testin üç ay boyunca belirlenen %bias değerlerinin ortalaması alındı.

Sigma (σ) değeri, İKK verilerinden elde edilen varyasyon katsayısı (%CV), DKK verilerinden elde edilen %bias ve CLIA 2019 (Clinical Laboratory Improvement Amendments of 2019) toplam izin verilen hata oranları (TEa) üzerinden Sigma (σ) = (%TEa-%Bias)/%CV formülü ile hesaplandı.

Toplam izin verilebilir hata (TEa), tanı veya tedavi sürecinde yararlanılan bir testin hasta güvenliğini tehdit etmeyecek ölçüde doğruluk ve kesinliğinden verilebilecek taviz oranı şeklinde tanımlanır ve biyolojik varyasyon ve analitik yöntemin performansına göre belirlenmektedir (11).

BULGULAR

On yedi biyokimya parametresinin her iki düzey İKK değerlerinden elde edilen 3 aylık ortalama %CV değerleri Tablo 2'de verilmiştir. Tüm parametrelerin %CV değerleri %5'in altında olup iyi tekrarlanabilirliği göstermektedir.

On yedi parametrenin 3 aylık DKK verilerinden elde edilen mutlak %bias değerleri ve ortalama %bias değeri Tablo 3'te sunulmuştur.

On yedi parametrenin İKK verilerinden elde edilen %CV, DKK verilerinden elde edilen %bias ortalaması ve CLIA 2019 TEa oranlarından yararlanılarak hesaplanan her iki düzey için sigma değerleri ile "TEa=%bias+ 1,65*%CV" formülüne göre (16) hesaplanan

Toplam Hata değerleri de Tablo 4'te sunulmuştur. Tüm parametrelerin hesaplanan Toplam Hata değerleri, hedef TEa değerlerinin altında saptandı.

Her iki düzey İKK için bulunan sigma değerleri analitik performansları belirlemek için 4 gruba ayrıldı. Sigma değeri <3 yetersiz performansı gösterirken; Sigma değeri 3-3.99 arası amaç için uygun kalitede performansı; ancak daha sıkı kontrol kuralları ile takip edilmesi gerekliliğini gösterir. Sigma değeri 4-5.99 arası amaç için uygun kalitede performansı, sigma >6 ise çok iyi kalitede performansı (dünya sınıfı kalite) göstermektedir (17). Testlerin ait olduğu grupları gösteren veriler Tablo 5'te sunulmuştur.

Glukoz her iki düzey, total protein düzey-1, amilaz düzey-2 için sigma değerleri <3 olarak saptandı. Albümin, klor, kolesterol ve kreatinin her iki düzey, HDL kolesterol düzey-1, ALT, total protein ve trigliserid düzey-2 için sigma değerleri 3.00-3.99 arasında bulundu. AST, demir, üre, ürik asit her iki düzey, ALT, amilaz, trigliserid düzey-1, HDL kolesterol düzey-2 için sigma değerleri 4.00-5.99 arasında saptandı. ALP, CK ve LDH her iki düzey için sigma değerleri >6 olarak bulundu.

Tablo 2. İç kalite kontrol verilerinden yararlanılarak hesaplanan %CV değerleri

Table 2. CV% values calculated from internal quality control data

Parametreler	Düzy-1 CV (%)	Düzy-2 CV (%)
Albümin	2,1	1,9
ALP	1,7	2,4
ALT	2,6	2,9
Amilaz	1,1	1,7
AST	2,8	3,2
CK	1,6	1,7
Demir	2,6	2,9
Glukoz	1,9	2,1
HDL kolesterol	3,5	2,8
Klor	1,2	1,2
Kolesterol	2,3	2,1
Kreatinin	2,2	2,5
LDH	1,5	1,8
Total protein	2,4	1,8
Trigliserid	2,4	3,2
Üre	1,2	1,3
Ürik asit	1,7	1,6

Tablo 3. Dış kalite kontrol raporlarından elde edilen mutlak ve ortalama % bias değerleri

Table 3. Absolute and average bias% values obtained from external quality control reports

Parametreler	Mutlak %bias değerleri			Ortalama %bias
	Ağustos	Eylül	Ekim	
Albümin	3,5	1,1	0	1,5
ALP	1,2	4,1	1,9	2,4
ALT	5	5,9	2,4	4,4
Amilaz	4,8	8,7	3,4	5,6
AST	3,3	1	0,5	1,6
CK	2	2,1	4,2	2,8
Demir	0,1	1,3	0,7	0,7
Glukoz	4,9	2	3,5	3,5
HDL kolesterol	3,2	12,1	11,5	8,9
Klor	0,6	2	1,4	1,3
Kolesterol	5,6	0,6	0,5	2,2
Kreatinin	2,3	1,6	3,1	2,3
LDH	0,4	1	1,9	1,1
Total protein	1,9	3,7	2,4	2,7
Trigliserid	2,7	3,8	3,7	3,4
Üre	4,1	1,1	1,9	2,4
Ürik asit	0,2	2	2,5	1,6

Tablo 4. İki düzey İKK için sigma ve toplam hata değerleri
 Table 4. Sigma and total error values for two levels of internal quality control

Parametreler	Sigma değerleri		Toplam Hata değerleri		CLIA TEa
	Düzyey-1	Düzyey-2	Düzyey-1	Düzyey-2	
Albümin	3,1	3,4	5	4,7	8
ALP	10,4	7,3	5,2	6,4	20
ALT	4,1	3,6	8,7	9,2	15
Amilaz	4	2,6	7,4	8,4	10
AST	4,8	4,2	6,2	6,9	15
CK	10,8	10,1	5,4	5,6	20
Demir	5,5	4,9	5	5,5	15
Glukoz	2,4	2,2	6,6	6,9	8
HDL kolesterol	3,2	4	14,7	13,6	20
Klor	3,1	3,1	3,3	3,3	5
Kolesterol	3,4	3,7	6	5,7	10
Kreatinin	3,5	3,1	6	6,5	10
LDH	9,3	7,7	3,6	4,1	15
Total protein	2,2	3	6,6	5,6	8
Trigliserid	4,8	3,6	7,4	8,7	15
Üre	5,5	5,1	4,3	4,5	9
Ürik asit	5	5,3	4,4	4,2	10

Tablo 5. Sigma değerlerine göre test grupları
 Table 5. Test groups according to sigma values

	Düzyey-1	Düzyey-2
Sigma <3.00	Glukoz, total protein	Glukoz, amilaz
Sigma 3.00-3.99	Albümin, HDL kolesterol, klor, kolesterol, kreatinin	Albümin, ALT, klor, kolesterol, kreatinin, total protein, trigliserid
Sigma 4.00-5.99	ALT, amilaz, AST, demir, trigliserid, üre, ürik asit	AST, demir, HDL kolesterol, üre, ürik asit
Sigma >6	ALP, CK, LDH	ALP, CK, LDH

TARTIŞMA

Analitik sürecin performansını kanıtlamayı hedeflediğimiz çalışmamızda kanıtlama yolu olarak Altı Sigma Metodu kullanıldı. CLIA %TEa oranları belirlenmiş olan testler arasından laboratuvarımızda sık istenen testlerden 17 parametre seçilerek 3 aylık değerlendirilmeye alındı. Günlük İKK verileri LBS (laboratuvar bilgi sistemi)'ne aktarılamadığından %CV değerleri cihazın kendi yazılımından hesaplatılarak elde edildi. Bu aşamada LBS'nin geliştirilmesi ile veri aktarımı ve işlenmesine olanak sağlanması, daha ileri performans kanıtlama aşamalarına geçilmesine ve zaman kaybının azaltılmasına katkı sağlayacağı düşünüldü.

2000 ve 2001 yıllarında sırayla Nevalainen ve ark. ve Westgard laboratuvar performansını sigma metodu ile ilk kez değerlendirmişlerdir (10,18). Nevalainen ve ark.'na göre

"en iyi ya da dünya sınıfında kalitede olan ürünlerde performans düzeyi 6 sigmadır. Ortalama kalitede ürünlerin kalite performans değeri yaklaşık 4 sigmadır (10).

Literatürde farklı biyokimya otoanalizörlerinde, biyokimya testlerinin altı sigma performansının belirlendiği çalışmalar bulunmaktadır. Nanda ve ark. (19) Cobas Integra otoanalizöründe bazı rutin biyokimya testleri için altı sigma değerlerini belirledikleri çalışmalarında, AST, ALT, ALP, total bilirubin ve ürik asit parametreleri için 6'dan büyük; üre, total protein, albümin, total kolesterol ve klor için ise 3'den küçük sigma değerleri hesaplamışlardır. Diğer bir çalışmada, Singh ve ark. (16) Olympus AU 400 biyokimya analizöründe test ettikleri AST, CK, amilaz ve trigliserid için 6'dan büyük; üre, total kolesterol, HDL kolesterol, sodyum ve potasyum için 3'den küçük sigma değerleri elde etmiş-

lerdir. Chaudhary ve ark.'nın (20) yaptığı çalışmada ise ILAB-650 (Instrumentation Laboratory, USA) klinik kimya otoanalizöründe glukoz, ALP, total protein, trigliserid, HDL kolesterol, amilaz ve ürik asit için 3'den büyük ve AST, ALT ve total kolesterol için 3'den küçük sigma değeri bulmuşlardır, ayrıca hiçbir test için 6'dan büyük sigma değeri bildirilmemiştir. Verma ve ark.'nın yaptığı çalışmada albümin, ürik asit, HDL kolesterol ve ALP 6'dan büyük sigma değeri gösterirken, total kolesterol, AST ve ALT için 3'ün altında sigma değeri saptamışlardır (21). Ercan'ın Cobas c501 (Roche Diagnostik, Almanya) otoanalizöründe yaptığı çalışmada ALP, ALT, amilaz, CK, demir, HDL kolesterol, magnezyum, trigliserid ve ürik asit testlerinin sigma değerleri 6'dan büyük olarak saptanırken, albümin, lityum ve üre testleri için sigma değeri 3'den küçük saptanmıştır (13).

Çalışmamızda yapılan analizler sonucunda; Glukoz her iki düzey, total protein düzey-1, amilaz düzey-2 için sigma değerleri <3 olarak saptandı. Albümin, klor, kolesterol ve kreatinin her iki düzey, HDL kolesterol düzey-1, ALT, total protein ve trigliserid düzey-2 için sigma değerleri 3.00-3.99 arasında bulundu. AST, demir, üre, ürik asit

her iki düzey, ALT, amilaz, trigliserid düzey-1, HDL kolesterol düzey-2 için sigma değerleri 4.00-5.99 arasında saptandı. ALP, CK ve LDH her iki düzey için sigma değerleri >6 olarak bulundu. Böylelikle sigma değeri 6'nın üstünde olan testler için Tablo 1'de belirtilen sigma değerlerine göre İKK uygulama tablosuna bakarak gereksiz İKK reddinin azaltılabileceği düşünüldü.

Sonuç olarak sigma metodu analitik yöntemleri değerlendirmek ve laboratuvar performansını artırmak için yardımcı bir yöntemdir. Toplam test sürecinin tüm basamaklarına uygulanabilen sigma metoduyla laboratuvarın performansı değerlendirilebilir. Laboratuvarlarda kalitenin iyileştirilmesi için sigma metoduyla birlikte diğer kalite indikatörlerinin de kullanımı yaygınlaştırılmalı, bununla birlikte bu amaca ulaşmak için HBS-LBS yapılandırılmalı ve laboratuvar personelinin eğitimlerle yeterlilikleri sağlanmalıdır.

TEŞEKKÜR

Laboratuvar teknik personeline, laboratuvar işleyiş prosedürüne uygun çalışma konusunda göstermiş oldukları özen için teşekkür ederiz. Çalışmamızın yayına uygun hale getirilmesinde vermiş olduğu destek için Doç. Dr. Arzu Yılmaztepe Oral'a teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. Clin Chem. 2002 May; 48(5):691-8
2. Stankovic AK. The laboratory is a key partner in assuring patient safety. Clin Lab Med. 2004 Dec;24(4):1023-35.
3. Westgard JO. Six Sigma: Quality Design and Control Processes. <http://www.westgard.com/lesson67.htm>.
4. Berte ML. Laboratory Quality Management: A Road Map. Clin Lab Med 2007; 27: 771-790.
5. Resmi gazete. Tıbbi laboratuvar yönetmeliği. <http://www.resmigazete.gov.tr.Sayı:28036>. <http://www.resmigazete.gov.tr/eskiler/2011/08/20110825-5.htm>
6. T.C. Sağlık Bakanlığı Sağlıkta Verimlilik, Kalite Ve Akreditasyon Dairesi Başkanlığı. Sağlıkta Kalite Standartları -Hastane. <https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/3460,skshastanesetiv5r1pdf.pdf?0>
7. Aslan D, Demir S. Laboratuvar tıbbında altı- sigma kalite yönetimi. Türk Biyokimya Der. 2005; 30(4): 272-278.
8. Adiga US, Preethika A, Swathi K. Sigma metrics in clinical chemistry laboratory - A guide to quality control. Al Am een J Med Sci 2015; 8: 281-287
9. Westgard JO. Six Sigma Basics: Outcame Measurement of Process Performance. <https://www.westgard.com/lesson66.htm>
10. Nevalainen D, Berte L, Kraft C, et al., Evaluating laboratory performance on quality indicators with the six sigma scale. Arch Pathol Lab Med 2000; 124: 516-519.
11. Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (CLIA) Proficiency Testing Regulations Related to Analytes and Acceptable Performance. Federal Register 2019 Feb 4;84.
12. Westgard JO. Six Sigma and Requisite Laboratory QC <https://www.westgard.com/essay36.htm>
13. Ercan Ş. Altı Sigma Kullanılarak Analitik Evrenin Değerlendirilmesi. Türk Klinik Biyokimya Derg 2015; 13(2): 59-68

14. Westgard J, Westgard S. An Assessment of σ Metrics for Analytic Quality Using Performance Data From Proficiency Testing Surveys and the CLIA Criteria for Acceptable Performance. *Am J Clin Pathol* 2006;125(3):343-54
15. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *Clin Chem Lab Med* 2006;44(6):750-759.
16. Singh B, Goswami B, Gupta VK, Chawla R, Mallika V. Application of Sigma Metrics for the Assessment of Quality Assurance in Clinical Biochemistry Laboratory in India: A Pilot Study. *Indian J Clin Biochem*. 2011;26(2):131-5
17. Carey RN, Cembrowski GS, Garber CC, Zaki Z. Performance Characteristics of Several Rules for Self-interpretation of Proficiency Testing Data. *Arch Pathol Lab Med*. 2005;129:997-1003
18. Westgard JO. Six sigma quality design and control: Desirable precision and requisite QC for laboratory measurement processes. Madison, Wis.: Westgard QC; 2001.
19. Nanda SK, Ray L. Quantitative Application of Sigma Metrics in Medical Biochemistry. *J Clin Diagn Res*. 2013;7(12):2689-91
20. Chaudhary NG, Patani SS, Sharma H, Maheshwari A, Jadhav PM, Maniar MA. Application of Six Sigma For The Quality Assurance In Clinical Biochemistry Laboratory-A Restrospective Study. *Int J Res Med* 2013;2(3):17-20
21. Verma M, Dahiya K, Ghalaut VS, Dhupper V. Assessment of quality control system by sigma metrics and quality goal index ratio: A roadmap towards preparation for NABL. *World J Methodol* 2018; 8(3): 44-50

Ischemia Modified Albumin Levels in Invasive Ductal Carcinoma and Fibroadenoma Patients

İnvaziv Duktal Karsinom ve Fibroadenom Hastalarında İskemi Modifiye Albümin Düzeyleri

Sibel Bilgili* Özlem Uğurlu* Giray Bozkaya*
Nuriye Uzuncan* Baha Zengel**

* SBÜ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye

** SBÜ İzmir Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Genel Cerrahi Kliniği, İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 31 Ekim 2019

Kabul Tarihi: 12 Aralık 2019

ABSTRACT

Aim: Chronic kidney disease (CKD) is highly prevalent, with increasing numbers of patients affected by the disease world-wide (1). Anemia is a common complication that contributes to the burden of disease associated with CKD, and it impacts negatively on cardiovascular disease, exercise capacity, and quality of life, resulting in significant mortality and morbidity in patients with CKD (2–5). Anemia is currently defined by the World Health Organization (WHO) as a hemoglobin (Hb) level ≤ 13 g/dL in men and ≤ 12 g/dL in women (6).

Purpose: Impaired oxidative-antioxidative balance plays an important role in the pathogenesis of many diseases like cancer. Ischemia modified albumin (IMA) is altered albumin by free radicals generated from ischemic tissues. The aim of this study was to evaluate the levels of the IMA in newly diagnosed patients with invasive ductal carcinoma and fibroadenoma before the surgery or medical treatment.

Methods: IMA levels were measured in 30 patients which were diagnosed as "invasive ductal carcinoma" (Group 1), 30 patients as "fibroadenoma" (Group 2) and in 28 "healthy controls" (Group 3). An albumin-cobalt binding test was used to define serum IMA in absorbance units (ABSU).

Results: There were statistically significant differences between three groups. IMA levels were significantly higher in the invasive ductal carcinoma group (0.434 ± 0.056 ABSU) compared to fibroadenoma group (0.344 ± 0.135 ABSU) and control group (0.196 ± 0.050 ABSU) ($p < 0.05$), also fibroadenoma group values were significantly higher than the control group ($p < 0.05$).

Sibel Bilgili : <https://orcid.org/0000-0001-9148-1111>

Yazışma adresi: Sibel Bilgili
Sağlık Bilimleri Üniversitesi İzmir
Bozyaka Eğitim ve Araştırma Hastanesi,
Tıbbi Biyokimya, İzmir, Türkiye
e-mail: sibel.bilgili@yahoo.com.tr

Conclusion: These findings indicate that serum IMA measurements can be demonstrative of the severity of oxidative stress among patients with breast pathologies. Highest IMA levels in invasive ductal carcinoma group than fibroadenoma and control groups may reflect disease severity in newly diagnosed patients and in the future it may be a new marker in breast cancer.

Key Words: breast cancer; fibroadenoma; invasive ductal carcinoma; ischemia modified albumin; oxidative stress

ÖZET

Amaç: Bozulmuş oksidatif-antioksidan denge, kanser gibi birçok hastalığın patogeneğinde önemli bir rol oynar. İskemi modifiye albümin (IMA), iskemik dokulardan üretilen serbest radikallerle değişime uğramış albüminidir. Bu çalışmanın amacı, invaziv duktal karsinomlu ve fibroadenomlu yeni tanı alan hastalarda cerrahi veya medikal tedavi öncesi IMA düzeylerini değerlendirmektir.

Gereç ve Yöntem: IMA düzeyleri invaziv duktal karsinom tanısı alan 30 hastada (Grup 1), fibroadenom tanısı alan 30 hastada (Grup 2) ve 28 sağlıklı kontrol grubunda (Grup 3) ölçüldü. Serum IMA düzeyleri albümin-kobalt bağlanma testi ile absorbanans ünitesi (ABSU) olarak ölçüldü.

Bulgular: Üç grup arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardı. IMA düzeyleri invaziv duktal karsinom grubunda (0.434 ± 0.056 ABSU) fibroadenoma grubuna (0.344 ± 0.135 ABSU) ve kontrol grubuna (0.196 ± 0.050 ABSU) göre anlamlı derecede yüksekti ($p < 0.05$). Aynı zamanda fibroadenoma grubu değerleri de kontrol grubundan anlamlı olarak yüksekti ($p < 0.05$).

Sonuç: Bu bulgular serum IMA ölçümlerinin meme patolojileri olan hastalarda oksidatif stresin ciddiyetinin göstergesi olabileceğini göstermektedir. İnvaziv duktal karsinom grubunda fibroadenoma ve kontrol gruplarına göre tespit edilen en yüksek IMA seviyeleri, yeni tanı alan hastalarda hastalık şiddetini yansıtabilir ve gelecekte meme kanserinde yeni bir belirteç olabilir.

Anahtar Sözcükler: meme kanseri; fibroadenom; invaziv duktal karsinom; iskemik modifiye albümin; oksidatif stres.

INTRODUCTION

Free radicals are known to be involved in carcinogenesis (1,2). There are potentially hundreds of different types of chemical changes in DNA resulting from reactive oxygen species (ROS) that could be mutagenic and involved in the etiology of cancer (3). A large body of evidence suggests important roles for ROS in the expansion of tumor clones and acquisition of malignant properties (4,5). Damage to the breast epithelium by chemical carcinogens such as ROS can lead to fibroblast proliferation, hyperplasia of epithelium, cellular atypia and breast cancer (6,7).

Albumin has a binding site of transitional metal ions, including cobalt and copper, on its N-terminal region (8). Ischemic and oxidative stress (free radicals and ROS) modifies this terminal peptide irreversibly to

a dysfunctional form, known as ischemia-modified albumin (IMA) (9,10).

IMA levels are higher in many inflammatory and oxidative stress-associated diseases. In recent years, different studies have described the role of IMA as a new marker for diseases related to inflammation. The generation of reactive oxygen species (ROS) and free radicals can transiently modify the N-terminal region of albumin and produce an increase in the concentration of IMA. IMA is indicated a marker of ischemia and oxidative stress originating as a consequence of tissue hypoxia. There have also been studies describing the relationship between cancer and inflammation. This relationship may include both an extrinsic and an intrinsic pathway. The extrinsic pathway is related to inflammatory circumstances, which increase cancer risk, whereas the intrinsic pathway is maintained by genetic changes that cause

inflammation, which may also induce oncogenesis (11).

In recent years, studies have shown that IMA is a marker of myocardial ischemia and a marker related to critical pathologies, including cancers as well (12-17). The impaired oxidative/antioxidative balance was the absolute impact in the pathogenesis of many, perhaps every human disease, including the cancer (11). Also, serum IMA levels increased in patients with gastric, prostate, soft tissue cancer and neuroblastoma in some studies. But there is no published report about serum concentrations of IMA in patients with breast cancer. Breast cancer is common in modern societies, and the management of breast cancer is crucial. Breast carcinoma is related to the increase of lipid peroxidation in plasma with concomitant decrease of antioxidant defense capacity in blood cells, which becomes more pronounced during aging of the patients. Chemotherapy and radiotherapy promote further oxidative shift, which potentiate already existing chronic oxidative stress linked to breast cancer. In these effects, impaired capacity for H₂O₂ detoxification (CAT, GPX and GSH) seems to have major contribution (18).

The relationship between the IMA levels and breast pathologies, also the degree of severity in patients with breast cancers and IMA correlations are unknown. So, the aim of this study was to evaluate the levels of IMA in patients with newly diagnosed as invasive ductal carcinoma (IDC) and fibroadenoma (FA) before the surgery or other treatments.

MATERIALS AND METHODS

There were three groups in the study; Group 1 was "invasive ductal carcinoma group" including 30 women, Group 2; "fibroadenoma group" with 30 women and Group 3; "healthy control group" with 28 women.

All subjects had full physical examination and were asked to complete a questionnaire and gave informed consent before the onset of

study. The study was approved by the local ethics committee.

Patients with alcoholism, smoking, diabetes, viral hepatitis, cardiac disease, renal, hepatic or endocrine disease, HIV were excluded. None of the participants in the present study were using drug medications including vitamins or antioxidant drugs. Patients were diagnosed by surgery and pathology clinics using histopathologic evidence and also healthy control group was chosen after mammographic and ultrasonographic examinations.

Blood samples were collected by venous puncture into vacutainer tubes with gel. Specimens were routinely centrifuged within 1 hr of collection for 15 min at 1000 g, and aliquots of serum samples were stored at -80 °C for a maximum of 4 weeks before IMA measurement.

An albumin-cobalt binding test was used to define serum IMA. The decreased binding capacity of cobalt to albumin was assessed using the rapid colorimetric detection method developed by Bar-Or et al. (19). Briefly, 200 µL of patient serum was transferred into glass tubes and 50 µL of 0.1% CoCl₂ × 6H₂O (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was added. After gentle shaking, the mixture was incubated for 10 minutes to ensure sufficient cobalt to bind to albumin. Then, 50 µL of 1.5 mg/mL dithiothreitol (DTT) (Sigma-Aldrich, Missouri, USA) was added as a colouring agent. After 2 minutes, 1 mL of 0.9% NaCl was added to halt the binding between the cobalt and albumin. A blank was prepared for every specimen. At the DTT addition step, 50 µL of distilled water was used instead of 50 µL of 1.5 mg/mL DTT to obtain a blank without DTT. The absorbances were recorded at 470 nm. Colour formation in specimens with DTT was compared with colour formation in the blank tubes, and the results were expressed as absorbance units (ABSU). Serum albumin levels were measured with Olympus AU 2700 autoanalyser (Beckman Coulter, Tokyo, Japan).

All data were analysed using the statistical software package SPSS Statistics version 21. Kolmogorov Smirnov test was used to determine the normality of the distributions. Data were expressed as mean $\pm$ standard deviation. The Student t test was used to evaluate the difference between groups. For comparison of IMA and characteristics of patients Man Whitney U test was used. $p<0.05$ was considered as statistically significant.

RESULTS

There were significant differences between three groups. IMA levels were significantly higher in the invasive ductal carcinoma group (0.434 ± 0.056 ABSU) compared to fibroadenoma group (0.344 ± 0.135 ABSU)

and control group (0.196 ± 0.050 ABSU) ($p<0.05$), also fibroadenoma group values were significantly higher than the control group ($p<0.05$). Serum albumin levels were normal in all groups. Demographic properties of groups were shown in Table 1.

Also, histopathologic findings of IDC patients were evaluated (Table 2). There were no significant correlation between these characteristics and IMA values ($p>0.05$). According to AJCC (American Joint Committee on Cancer) TNM Classifications of patients were as follows; Stage IA: 9 (%30), Stage IB: 4 (%13.33), Stage IIA: 6 (%20), Stage IIB: 9 (%30), Stage IIIA: 1 (%3.33), Stage IIIC: 1 (%3.33). Our patients tumor sizes were between 0.8 and 4.5 cm in diameter (mean: 2.25 ± 0.96 cm).

Table 1. Demographic characteristics of groups

Characteristics	IDC (n=30)	FA (n=30)	Control (n=28)
Age	44.6 $\pm$ 13.1	41.8 $\pm$ 7.6	40.2 $\pm$ 9.6
Family history (+/-)	10/20	11/19	0/28
Birth (+/-)	26/4	25/5	22/6
Breast feeding (+/-)	26/4	25/5	22/6

(IDC: invasive ductal carcinoma, FA: fibroadenoma)

Table 2. Histopathologic findings of IDC patients

	Characteristics	n	%
Tumor size	<2cm	11	36.66
	$\geq$ 2cm	19	63.33
Lymph node	Negative	20	66.66
	Positive	10	33.33
Stage	1	13	43.33
	2	15	50
	3	2	6.66
HG	1-2	25	83.33
	3	5	16.66
ER	Positive	25	83.33
	Negative	5	16.66
PR	Positive	21	70
	Negative	9	30
c-erbB-2	Positive	11	36.66
	Negative	19	63.33

(HG: Histologic grade, ER: Estrogen receptor, PR: progesterone receptor)

DISCUSSION

The presence of high amounts of reactive metabolites in the cancer tissue may have a significant role in both carcinogenesis and spread of cancerous tissue (6). Cancer development is a multi-stage process and ROS-mediated DNA damage plays an important role in these stages, especially in initiation and promotion processes (20).

IMA levels are higher in many inflammatory and oxidative stress-associated diseases (11). IMA is elevated in most patients with liver cirrhosis, acute infections and advanced cancers; all these conditions are potent producers of free radicals (21,22).

It is well established that oxidative stress is linked to cancer formation and patients with several types of cancers can have high IMA levels (23-25). Kasapovic et al. (18) performed a study in patients with breast cancer and examined antioxidant status and lipid peroxidation. Fidan et al. (24) showed that serum IMA levels were increased in patients with gastric cancer. Mastella et al. (25) found increased serum IMA levels in patients with prostate cancer, but this increase was not statistically significant. Stachowicz-Stencel et al. (11) found that serum IMA levels were statistically higher in pediatric patients with neuroblastoma and soft tissue sarcomas. In the other study, the oxidative/antioxidant status was impaired in favor of oxidative stress in colorectal carcinoma patients but this observation was not confirmed by IMA measurement (23). Abusoğlu et al. reported that serum IMA concentrations statistically higher in breast cancer patients than in the control group (26).

The results of the present study indicate that IMA levels in invasive ductal carcinoma patients were higher than fibroadenoma patients and healthy subjects. Also fibroadenoma patients IMA levels were higher than healthy control group values. So we thought IMA levels may reflect the severity of the breast pathologies and this condition may be associated with the impairment of oxidant antioxidant balance. There were no correlation of histopathologic findings with IMA levels in terms of tumor size, grade, lymph node involvements, histologic grade, c-erbB-2, estrogen and progesterone receptor positivity. We think the reason of this may be the small number of our patients.

To the best of our knowledge this was the first study evaluating serum IMA measurements in fibroadenoma and also breast cancer patients. Also the relationship between the IMA and the degree of severity in patients with breast cancers is unknown. The findings of this study indicate that serum IMA measurements can be demonstrative of the oxidative stress among patients with breast pathologies. The preoperative IMA levels may help clinicians in assessment of these patients. Highest IMA levels in invasive ductal carcinoma group may reflect disease severity in preoperative patients and it may be a new biomarker in the future. The small number of patients may be the limitation of this study and therefore further studies are necessary to confirm these results.

Conflict of Interest Statement

The authors of this paper have no conflicts of interest, including specific financial interests, relationships, and/ or affiliations relevant to the subject matter or materials included.

REFERENCES

1. Goldstein BD, Witz G. Free radicals and carcinogenesis. Free Radic. Res. Commun. 1990;11:3-10.
2. Cerutti P. Prooxidant states and tumor promotion. Science 1985;227:375-381.
3. Halliwell B, Aruoma OI. DNA damage by oxygen-derived species: its mechanism and measurement in mammalian systems. FEBS Lett. 1991;281:9-19.
4. Feig DI, Reid TM, Loeb LA. Reactive oxygen species in tumorigenesis. Cancer Res. (Suppl) 1994;154: 1890-1894.
5. Dreher D, Junod AF. Role of oxygen free radicals in cancer development. Eur. J. Cancer 1996;1:30-38.
6. Haklar G, Sayin-Ozveri E, Yüksel M, Aktan AO, Yalçın AS. Different kinds of reactive oxygen and nitrogen species were detected in colon and breast tumors. Cancer Lett. 2001;165(2):219-24.

7. Murrell TG. Epidemiological and biochemical support for a theory on the cause and prevention of breast cancer. *Med. Hypotheses* 1991;36:389-396.
8. Sokolowska M, Krezel A, Dyba M, Szewczuk Z, Bal W. Short peptides are not reliable models of thermodynamic and kinetic properties of the N-terminal metal binding site in serum albumin. *European Journal of Biochemistry* 2002;269(4): 1323-1331.
9. Roy D, Quiles J, Gaze DC, Collinson P, Kaski JC, Baxter GF. Role of reactive oxygen species on the formation of the novel diagnostic marker ischaemia modified albumin. *Heart* 2006;92(1):113-114.
10. Sitar ME, Aydin S, Çakatay U. Human serum albumin and its relation with oxidative stress. *Clinical Laboratory* 2013;59(9-10):945-952.
11. Ellidag HY, Eren E, Aydin O, Akgol E, Yalcinkaya S, Sezer C et al. Ischemia Modified Albumin Levels and Oxidative Stress in Patients with Bladder Cancer. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(5):2759-63.
12. Kotani K, Caccavello R, Sakane N, Miyamoto M, Gugliucci A. Influence of ezetimibe monotherapy on ischemia modified albumin levels in hypercholesterolemic patients. *Pharmacological Reports* 2011;63(5):1248-1251.
13. Lippi G, Montagnana M. Ischemia-modified albumin in ischemic disorders. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2009;15(2):137.
14. Vassalle C, Pratali L, Boni C, Mercuri A, Ndreu R. An oxidative stress score as a combined measure of the pro-oxidant and anti-oxidant counterparts in patients with coronary artery disease. *Clinical Biochemistry* 2008;41(14-15):1162-1167.
15. Şeneş M, Kazan N, Coşkun Ö, Zengi O, Inan L, Yücel D. Oxidative and nitrosative stress in acute ischaemic stroke. *Annals of Clinical Biochemistry* 2007;44(1):43-47.
16. Kotur-Stevuljjevic J, Memon L, Stefanovic A, Spasic S, Spasojevic-Kalimanovska V, Bogavac-Stanojevic N et al. Correlation of oxidative stress parameters and inflammatory markers in coronary artery disease patients. *Clinical Biochemistry* 2007;40(3-4):181-187.
17. Can M, Demirtas S, Polat O, Yildiz A. Evaluation of effects of ischaemia on the albumin cobalt binding (ACB) assay in patients exposed to trauma. *Emergency Medicine Journal* 2006;23(7):537-539.
18. Kasapović J, Pejić S, Stojiljković V, Todorovic A, Radosevic-Jelic L, Saicic ZS et al. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=Pajovi%C4%87%20SB%5BAuthor%5D&cauthor=true&author_uid=20713039. Antioxidant status and lipid peroxidation in the blood of breast cancer patients of different ages after chemotherapy with 5-fluorouracil, doxorubicin and cyclophosphamide. *Clin Biochem.* 2010;43(16-17):1287-93.
19. Bar-Or D, Lau E, Winkler JV. A novel assay for cobalt-albumin binding and its potential as a marker for myocardial ischemia: a preliminary report. *J Emerg Med* 2000;19:311-315.
20. Ziech D, Franco R, Pappa A, Panayiotidis MI. Reactive oxygen species (ROS)--induced genetic and epigenetic alterations in human carcinogenesis. *Mutat Res.* 2011;711:167-73.
21. Sbarouni E, Georgiadou P, Kremastinos DT, Voudris V. Ischemia Modified Albumin: Is This Marker of Ischemia Ready for Prime Time Use?. *Hellenic J Cardiol.* 2008;49(4):260-6.
22. Sbarouni E, Georgiadou P, Voudris V. Ischemia modified albumin changes – review and clinical implications. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49:177-84.
23. Ellidag HY, Bulbulur N, Eren E, Abusoglu S, Akgol E, Cetiner M et al. Ischemia-modified albumin: could it be a new oxidative stress biomarker for colorectal carcinoma? *Gut and Liver* 2013; 7(6): 675-680.
24. Fidan E, Mentese A, Kavgaci H, Orem A, Fidan S, Uzun A et al. Increased ischemia-modified albumin levels in patients with gastric cancer. *Neoplasma* 2012;59(4):393-397.
25. Mastella AK, Moresco RN, da Silva DB, Becker AM, Duarte MM, Giovelli LL et al. Evaluation of ischemia-modified albumin in myocardial infarction and prostatic diseases. *Biomedicine and Pharmacotherapy* 2009;63(10):762-766.
26. Abusoglu S, Eryavuz D, Bal C, Nural C , Ozcan E, Yildirime M et al. Assessment of Serum Ischemia-modified albumin, Prolidase and Thiol-Disulphide Levels in Subjects With Breast Cancer. *Revista Română de Medicină de Laborator* 2019;27(1): 25-33.

Klinik Remisyonunda olan Crohn Hastalarında Hastalık Aktivitesinin Erken Öngörüsü

Early Prediction Of Crohn's Disease Activity In Clinically Remission Patients

Günel Hasanova* Burcu Barutçuoğlu** Nalan Gülşen Ünal***
Günes Ak** Ömer Özütemiz***

* Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD., İzmir, Türkiye

** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, Klinik Biyokimya BD., İzmir, Türkiye

*** Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji AD., İzmir, Türkiye

Başvuru Tarihi: 18 Aralık 2019

Kabul Tarihi: 10 Ocak 2020

ÖZET

Amaç: Crohn's hastalığı (CH) gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesinde transmural tutulumu olan, etyolojisi bilinmeyen, immünite kökenli inflamatuvar bir hastalıktır. Bu hastalarda hastalık aktivitesini saptamak için birçok klinik aktivite indikatörü ve invazif olmayan göstergeler kullanılmıştır ancak, hiçbir histopatolojik ve endoskopik incelemeler kadar doğru olmamaktadır. CH'nda, hastalık aktivitesi klinik olarak Crohn's Hastalığı Aktivite indeksi (CDAI) ile saptanmaktadır. CDAI'e göre 150 puanın altı remisyon ve 450 puan üzeri ciddi fulminan hastalık olarak kabul edilmektedir. Bu çalışmanın amacı klinik remisyonundaki CH'da hastalık aktivitesini fekal kalprotektin ve fekal laktoferrin ile öngörmektir.

Gereç ve Yöntem: Gastroenteroloji polikliniğe başvuru alan on iki asemptomatik CH'sı (CDAI<150) çalışmamıza dahil edildi. Serum C-reaktif protein (CRP), serum amiloid A (SAA), eritrosit sedimentasyon hızı (ESH), lökosit sayısı, fekal kalprotektin ve fekal laktoferrin ölçüldü. Aynı hafta içinde yapılan kolonoskopilerine göre, 5 hasta remisyonunda, 7 hasta aktif CH idi.

Bulgular: Aktif CH'da, fekal kalprotektin, laktoferrin, serum CRP ve SAA (hepsi $p<0.050$), remisyondakilere göre belirgin olarak daha yüksek olup, CDAI, ESH ve lökosit sayıları için anlamlı fark saptanmadı (hepsi $p>0.050$). Kalprotektinle SES/Rutgeerts kolonoskopi skor indeksleri ($r=0.592$, $p=0.043$) arasında ve laktoferrinle SES/Rutgeerts kolonoskopi skor indeksleri ($r=0.720$, $p=0.008$) arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı.

Sonuç: Mukozal inflamasyonu yansıtan fekal kalprotektin ve laktoferrin kolonoskopiye aday hastaları seçebilmek için mutlaka ölçülmelidir.

Anahtar kelimeler: Crohn Hastalığı; kalprotektin; laktoferrin

Burcu Barutçuoğlu : <https://orcid.org/0000-0001-6570-5229>
Günes Ak : <https://orcid.org/0000-0001-6780-1812>
Nalan Gülşen Ünal : <https://orcid.org/0000-0001-8870-2450>
Ömer Özütemiz : <https://orcid.org/0000-0002-6960-4043>

Yazışma adresi: Burcu Barutçuoğlu
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi,
Klinik Biyokimya Bilim Dalı,
Bornova İZMİR, 35100
e-mail: burcu.barutcuoglu@ege.edu.tr

Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Aim: Crohn's disease (CD) is an immunity-based inflammatory disease of unknown etiology which affects any region of the gastrointestinal tract with transmural involvement. In these patients; many clinical activity indicators and noninvasive markers have been used to assess disease activity, but none have been as accurate as histopathological and endoscopic examinations in detecting inflammatory activity. In CD, disease activity is clinically determined by Crohn's Disease Activity Index (CDAI) score. According to CDAI, less than 150 points is accepted as remission, and over 450 points is a serious fulminant disease. The aim of this study is to predict the CD activity by fecal calprotectin and fecal lactoferrin in clinically remission Crohn's disease patients.

Materials and Methods: Twelve asymptomatic CD patients (CDAI<150), chosen in outpatient Gastroenterology clinics, were included in our study. Serum C reactive protein (CRP), serum amyloid A (SAA), erythrocyte sedimentation rate(ESR), WBC count, fecal calprotectin and fecal lactoferrin were measured. Based on colonoscopy performed within the same week, 5 were in remission and 7 were active CD patients.

Results: Fecal calprotectin, lactoferrin, serum CRP and SAA were significantly higher in active CD than in remission (all $p < 0.050$), but there were no significant difference in CDAI, ESR and WBC (all $p > 0.050$). There was significant positive correlation between calprotectin SES/Rutgeerts colonoscopy score indices ($r = 0.592$, $p = 0.043$) and between lactoferrin SES/Rutgeerts colonoscopy score indices ($r = 0.720$, $p = 0.008$).

Conclusion: In order to chose the candidates to colonoscopy, fecal calprotectin and lactoferrin which reflect mucosal inflammation should be performed.

Key words: Crohn's Disease;calprotectin; lactoferrin

GİRİŞ

Crohn hastalığı (CH) transmural tutulum ile gastrointestinal sistemin herhangi bir bölgesini etkileyebilen, nedeni bilinmeyen immun temelli inflamatuvar bir hastalık olup; relaps ve remisyon dönemleri ile ilerler (1). CH'nın aktivitesinin değerlendirilmesi ve tedavinin şekillendirilmesi için klinisyenler bugüne kadar en sık hastalık aktivite indekslerini kullanmışlardır. CH için birçok klinik aktivite göstergesi ve girişimsel olmayan belirteçler denenmiş ancak hiçbirisi inflamatuvar aktivitenin saptanmasında histopatolojik ve endoskopik incelemeler kadar kesin bulgular sağlamamıştır. Bu indeksler içinde en yaygın kullanılan CH aktivitesi klinik bir değerlendirme ile Crohn hastalığı aktivite indeksi (CDAI) puanına göre belirlenir. Buna göre 150 puan altındaki hastalar remisyonda kabul edilir iken, 450 puan üzeri ciddi fulminan hastalık olarak değerlendirilir (2,3). İnflamatuvar barsak hastalıklarında uygulanan endoskopik uygulamalar ile hastalık lokalizasyonu ve mukozal lezyonların tespiti hastalık aktivitesini belirlemede altın standard olarak kabul edilir. Ancak endoskopi; invaziv, pahalı, hastalar tarafından kolay tolere edilmeyen ve rahatsızlık veren bir işlemdir.

Bu nedenle yeni biyobelirteç arayışları halen devam etmektedir (4).

Kalprotektin, özellikle nötrofiller olmak üzere lökositlerde bulunan S100 A8 / A9'un bir heterodimeri olan çinko bağlayıcı proteinlerden S100 ailesinin üyesi bir proteindir. Barsaklarda aktif inflamasyon varlığında, nötrofiller dolaşımdan barsak mukozasına göç eder. İnflamatuvar süreçten dolayı mukozal yapıda oluşan bozukluk, nötrofillerin ve dolayısıyla da kalprotektinin lümen içine kaçmasına ve bunun ardından dışkıyla atılmasına yol açar. İnflamasyona neden olan barsak hastalıklarında barsaktaki artan nötrofil sayısı fekal kalprotektinde artışa neden olur. Bu nedenle, barsakta gelişen inflamasyonu gösterebilecek bir biyobelirteç olarak kullanılabileceği düşünülmüştür (5-9).

Laktoferrin, transferrin protein ailesi içinde yer alan, başta süt olmak üzere birçok sıvıda bulunan, 80 kDa'lık, demir bağlayan bir glikoproteindir. Laktoferrin, nötrofillerin sekonder granüllerinin önemli bir bileşenidir. Laktoferrin; antibakteriyel, antifungal, antiviral, antiprotozoal, antioksidan, antikanserojen, antiinflamatuvar, immünomodulator olup sağlıklı kemik yapısının oluşması, bar-

sakta demir absorpsiyonunu düzenleyicisi olması gibi birçok biyolojik aktiviteye sahip multifonksiyonel bir proteindir. Göz yaşı, sinoviyal sıvı, anne sütü ve tükürük gibi vücut sıvılarındaki nötrofillerin sekonder granülositlerinde laktoferrin bulunur. Barsağın inflammatuvar durumlarında, mukozanın lökosit infiltrasyonu nedeniyle dışkıda laktoferrin artışı saptanmıştır. (10,11).

Bu çalışmada, klinik olarak remisyondaki asemptomatik (CDAI<150) CH'da; kolonoskopi ile saptanan gerçek hastalık aktivitesi ile fekal kalprotektin, laktoferrin ilişkisinin araştırılması amaçlandı. Ayrıca çalışmada ikincil olarak barsaktaki lokal inflammatuvar belirteçler (fekal kalprotektin ve laktoferrin) ile genel inflammatuvar belirteçlerin (CRP, SAA, ESH ve lökosit sayıları) birbirlerine üstünlüğünün araştırılması amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Olgular

Olgular, Gastroenteroloji BD polikliniğine başvuran hastalar arasından seçildi. En az son 6 ay içinde CH tanısı alan, klinik olarak remisyonda olan (CDAI<150) ve 19 yaş üzeri 12 CH çalışmaya dahil edildi. Enfeksiyöz enterokolit, otoimmün başka bir hastalık (SLE, romatoidartrit, vs) varlığı, akut veya kronik inflammatuvar durum, kolostomi ya da pouch varlığı, karaciğer ve/veya böbrek hastalığı, malignite ve gebelik durumu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Çalışma, yerel Klinik Araştırmalar Etik kurulu tarafından onaylıdır (karar no: 16-3.2/15).

CDAI

CH'larında haftalık (7 günlük) sıvı gaita çıkışı sayısı, karın ağrısı, hastanın genel durumu / iyilik hali, barsak dışı komplikasyonlar (artrit/ artralji, iritis/uveitis, eritema nodosum, piyoderma gangrenosum, aftöz stomatit, anal fissür/fistül/abse, ateş >37.0 °C), diare için barsak motilite düzenleyici veya benzer diare kesici ilaç kullanımı, abdominal kitle varlığı, hematokrit düzeyi ve vücut ağırlığı sorgulanarak Crohn hastalığı aktivitesi için CDAI aşağıdaki gibi hesaplandı. CDAI sonucu 150 puan altı remisyonda hastalık olarak kabul

edilir iken, 450 puan üzeri ciddi fulminan hastalık olarak değerlendirildi.

Basit Endoskopik Skor (SES)

SES kolonoskopi ile saptanan CH aktivite indeksi olup opere olmamış CH'da kolonoskopik aktivite göstergesidir. Barsağın 5 segmentinde tüm değişkenler (ülser boyutu (cm), ülserleşmiş yüzey, etkilenmiş yüzey ve striktür) değerlendirilir ve 0-3'e kadar skorlanır. Toplam skor 0 -2 ise remisyondadır; 3 - 6 ise hafif endoskopik aktivite, 7-15 ise orta endoskopik aktivite ve >15 ise ciddi endoskopik aktivite olarak değerlendirilir (12).

Rutgeert skor indeksi

Rutgeerts skor indeksi kolonoskopi ile saptanan bir diğer CH aktivite indeksi olup opere olmuş CH'da kolonoskopik aktivite göstergesidir. Çeşitli değişkenlerin varlığına göre 0-4 arası skora yapılır. 0: Aftöz Ülser Yok; 1: Beşten az aftöz ülser; 2: Normal mukozada ara ara beşten fazla aftöz lezyon, yayılan alanlarda büyük lezyonlar veya ileokolonik anastomozla sınırlı lezyonlar (ör. 1cm den az); 3: İnflamasyonlu difüz mukozalı difüze aftöz ileitis ve 4: Difüz inflamasyonlu büyük ülserler, nodüller ve/veya striktür olarak değerlendirilir (13).

Örneklerin Alınması, Saklanması, Hazırlanması

8-12 saat açlık sonrası venöz kan örnekleri antikoagulan içermeyen jelli tüplere, 3.6 mg K₂EDTA ve 4NC ESR sodyum sitratlı içeren antikoagulanlı tüplere alındı. Jelli tüpteki kan örnekleri 4000 devir/dk hızda 10 dk süre ile santrifüj edildi. Örneklerden günlük çalışılan serum CRP, SAA, eritrosit sedimentasyon hızı (ESH) ve tam kan sayımı aynı gün içinde ölçüldü. Fekal kalprotektin ve fekal laktoferrin için gaita örnekleri ön ayırma işlemleri (ekstraksiyon) tamamlandıktan sonra çalışma gününe kadar - 80°C soğutmalı derin dondurucuda saklandı.

Fekal Kalprotektin feçes örnek hazırlığı

Yaklaşık 1 gr feçes 4 ml ekstraksiyon tamponu ile dilüe edildi ve iyice vortekslendi. Dilüe edilmiş örnekler 18-28°C'de en az 5 dakika bekletildi. Bu örnekten 50µL alınarak

üzerine 450µL ekstraksiyon solüsyonu eklendi (1:10 dilüsyon), 5 dakika 3000g de santrifüj edilip, sonrasında süpernatant ayrılarak ölçüme kadar -80°C de saklandı. Çalışma günü, süpernatant oda sıcaklığına getirilerek çalışıldı.

Fekal laktoferrin feçes örnek hazırlığı

Toplanan 55 mg feçes örneğine 2695 µL ekstraksiyon tamponu (BioVendor marka Kat. No: C005821) eklendi. Bu şekilde feçes örneklerine ekstraksiyon sırasında 1:50 dilüsyon yapıldı. Numuneler vorteks üzerinde 30 dakika yüksek hızda homojenize edildikten sonra, 3000g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant ayrılarak çalışma yapılacak güne kadar -80°C de saklandı. Feçes içerisindeki bileşenleri açığa çıkarmak için özel dilüsyon tamponu (Cat.No: C005114) kullanarak 1:3 dilüsyon yapıldı (40 µL feçes süpernatantı + 80 µL Özel Dilüsyon Tamponu).

Fekal Kalprotektin Ölçümü

Oda sıcaklığına getirilen süpernatant 5 dakika 3000g de santrifüj edildi. Süpernatantdan 60µL alınarak, kartuş üzerindeki lateral flow cip üzerine damlatıldı ve 12 dakika örneğin kartuş tarafından emilmesi için beklendi. Kantitatif lateral flow assay yöntemi ile ölçüldü (Quantum Blue®fCALextended Quantitative Lateral Flow Assay Katalog No:LF-CALE25 Bühlmann Laboratories, AGBaselstrasse 554124 Schönenbuch, İsviçre). Sonrasında kartuş Bühlmann Quantum Blue® Reader cihazında okundu. Test ölçüm aralığı: 30- 1000 µg/g gaita

Fekal Laktoferrin Ölçümü

ELISA (BioVendor® Human Lactoferrin ELISA, Katalog No: RD194334200R, Çek Cumhuriyeti) ile ölçüm yapıldı.

CRP, SAA, ESH ölçümü

CRP immunoturbidimetrik yöntem ile (CRP Gen3, Cat No: 05172373190, Roche Diagnostics, Mannheim, Almanya) Roche COBAS 8000 otomatik analizörde ölçüldü. SAA nefelometrik yöntem ile (N Latex SAA, Cat No:OQMP11, Siemens Healthcare Diagnostics Products Marburg, Almanya)

Siemens BN II nefelometri cihazında ve ESH modifiye Westerngreen metodu ile ölçüldü.

İstatistiksel Analiz

CDAI ve kolonoskopi sonuçlarının fekal kalprotektin, fekal laktoferrin, serum CRP, SAA, ESH ve lökosit sayısı ile olan ilişkisinin araştırılması hedeflenen bu çalışmada olgu sayısının az olmasından dolayı tüm veriler nonparametrik testler ile değerlendirildi. Grup dağılımları Gaussian olmadığı için sonuçlar ortanca (minimum- maksimum) olarak sunuldu. Aktif ve remisyonda olmak üzere iki gruba ayrılan CH'da değişkenler Mann Whitney-U nonparametrik iki grup karşılaştırma testi ile karşılaştırıldı. Değişkenler arası korelasyon analizi için Spearman's Rho analizi kullanıldı. İstatistiksel hesaplamalar SPSS (21.0 versiyon, SPSS;IL) ile yapıldı. p<0,050 değerleri anlamlı, p<0,010 değerleri güçlü olarak anlamlı kabul edildi. Korelasyon Katsayısının (r) 1,00 olması: mükemmel pozitif ilişki; -1,00 olması: mükemmel negatif ilişki; 0,00 olması: ilişki yok; 0,70 – 1,00: yüksek ilişki; 0,70 – 0,30: orta ilişki; 0,30 – 0,00: düşük ilişkili olarak değerlendirildi.

BULGULAR

Çalışmaya katılan olguların yaş, cinsiyet, vücut kitle indeksi (BMI), alkol kullanımı, sigara kullanımı ve CH hastalık öyküsüne ait demografik veriler Tablo 1 de verildi. Olguların hesaplanan CDAI'leri, hastalık öyküsü süresi, kolonoskopiye göre hastalık aktivitesi, kalprotektin ve laktoferrin sonuçları tablo 2 de verildi. Tüm hastaların CDAI'leri <150'nin altında olup ortanca (min-maks) 104.6 (18.3-148.7) idi. CDAI'ye göre klinik olarak remisyonda olan hastaların aslında sadece 5'i gerçek remisyonda olup, geri kalan 7 hasta aktif olarak saptandı.

Olgulara ait biyokimyasal parametreler ortanca (minimum – maksimum) olarak verildi. Buna göre fekal kalprotektin 644 (30-1000) µg/g gaita, fekal laktoferrin 7.75 (0.17-13.28) µg/g gaita, serum CRP 9.95 (0.3 – 96.2) mg/L, SAA 15.1 (4.09- 240) mg/L, ESH 16 (2- 67) mm/st ve lökosit sayısı 8.57 (3.44-13.09) µg/L olarak ölçüldü. Rutgeert's

kolonoskopi skoru veya Basit endoskopi skoru (SES)'e göre hesaplanan CH aktivite skoruna göre sınıflandırılan aktif ve remis-yondaki CH'ı arasında fekal kalprotektin, laktoferrin, serum CRP, ve SAA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (sıra-sıyla $p=0.007$, $p=0.004$, $p=0.042$, $p=0.045$). Ancak CDAI, ESH ve lökosit sayıları arasında anlamlı fark saptanmadı (sırasıyla $p=0.223$, $p=0.120$, $p=0.570$) (Tablo 3).

Biyokimyasal parametreler; demografik veri-ler, CDAI ve kolonoskopi aktivite indeksleri

arasında ilişkiyi araştırmak için yapılan korelasyon analizinde fekal kalprotektin ile SES / Rutgeert skor indeksleri ($r=0.592$, $p=0.043$) arasında ve fekal laktoferrin ile SES / Rutgeert skor indeksleri ($r=0.720$, $p=0.008$) arasında anlamlı pozitif korelasyon saptandı (Tablo 4). CDAI ile biyokimyasal parametreler, demografik veriler arasında anlamlı korelasyon saptanmadı. Biyokim-yasal parametreler arası anlamlı korelasyon gösterenler Tablo 5'te verildi.

Tablo 1. Hastalara ait demografik veriler

Demografik veriler (n:12)	Ortanca	Minimum-Maksimum	Oran
Yaş (yıl)	42	26-58	-
Cinsiyet (Erkek/Kadın)	-	-	6/6
BMI (kg/m ²)	22	16.5-26.9	-
Alkol (Evet/Hayır)	-	-	4/8
Sigara (Evet/Hayır)	-	-	7/5
CH hastalık öyküsü (yıl)	7.5	0.5-31 yıl	-

n: hasta sayısı, BMI: vücut kitle indeksi

Tablo 2. Olguların hesaplanan CDAI'leri, hastalık öyküsü süresi, kolonoskopi, gaitada kalprotektin ve laktoferrin sonuçları

Hasta no	CH öyküsü (yıl)	CDAI	CH skor*	Kolonoskopiye göre aktivite	Kalprotektin (µg/g gaita)	Laktoferrin (µg/g gaita)
1	8	124.4	16	aktif	1000	13.21
2	12	107.2	i1	remisyon	558	2.40
3	5	144.6	8	aktif	730	12.51
4	31	148.7	i3	aktif	1000	11.28
5	6	145.4	9	aktif	815	4.22
6	7	103.8	i2	aktif	1000	11.62
7	1	18.3	7	aktif	409	11.58
8	0.5	57.0	2	remisyon	30	0.49
9	8	88.3	10	aktif	882	13.28
10	6	31.1	i1	remisyon	68	0.77
11	12	105.3	2	remisyon	168	0.17
12	9	100.3	i2	remisyon	55	0.31

*Rutgeert's kolonoskopi skoru veya Basit endoskopi skoru (SES)' e göre hesaplanan kolonoskopik CH aktivite skoru

Tablo 3. Biyokimyasal veriler

Biyokimyasal parametre	Aktif CH Ortanca (min-maks)	Remisyonadaki CH Ortanca (min-maks)	İstatistiksel p değeri
Fekal kalprotektin (µg/g gaita)	882 (409-1000)	68(30-558)	$p=0.007^*$
Fekal laktoferrin (µg/g gaita)	11.61(4.22-13.28)	0.49(0.17-2.4)	$p=0.004^*$
CRP (mg/L)	17.5 (0.3-96.2)	5.4(1.2-7.7)	$p=0.042^*$
SAA (mg/L)	38.35 (5.58-240)	6.91(4.09-15.8)	$p=0.045^*$
ESH (mm/st)	40 (7-67)	8(2-28)	$p>0.050$
WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)	8.87 (3.50-13.09)	8.27(3.44-12.53)	$p>0.050$

*: istatistiksel olarak anlamlı

Tablo 4. CDAI, kolonoskopide elde edilen CH aktivite skoru ve biyokimyasal değişkenler arası anlamlı korelasyon gösterenler

Değişkenler	CDAI	Kolonoskopiye göre CH aktivite skoru
Fekal kalprotektin	$r=0.564, p=0.056$	$r=0.592, p=0.043^*$
Fekal laktoferrin	$r=0.182, p=0.572$	$r=0.720, p=0.008^*$
CRP	$r=0.182, p=0.572$	$r=0.360, p=0.250$
SAA	$r=-0.209, p=0.537$	$r=0.522, p=0.099$

r: korelasyon katsayısı, *: anlamlı korelasyon

Tablo 5. Biyokimyasal değişkenler arası anlamlı korelasyon gösterenler

Değişkenler	Fekal kalprotektin	Fekal laktoferrin
Fekal kalprotektin	-	-
Fekal laktoferrin	$r=0.768, p=0.004^*$	-
CRP	$r=0.711, p=0.009^*$	$r=0.692, p=0.013^*$
SAA	$r=0.405, p=0.216$	$r=0.645, p=0.032^*$

*: anlamlı korelasyon

TARTIŞMA

Klinik olarak remisyonda olan asemptomatik (CDAI<150) olan CH'da fekal kalprotektin, laktoferrin, serum CRP, SAA, ESH ve WBC sayıları ile gerçek hastalık aktivitesinin ilişkisini araştırmayı hedeflediğimiz çalışmamıza 12 olgu dahil edildi. Klinik olarak remisyonda olan tüm olgularda kolonoskopi yapıldı ve Rutgeert's kolonoskopi skoru veya SES'e göre hesaplanan CH aktivite skoruna göre 5 olgu remisyonda, 7 olgu aktif CH olarak saptandı.

CH'da, kronik aktif inflamasyon ve gelişen mukozal inflamatuvar değişiklikler nedeniyle mukozal ülserler, striktür, barsak perforasyonu, displazi ve/veya kanser gelişebilir. Gelişebilecek tüm komplikasyonları en aza indirebilmek için en önemli tedavi hedefi "barsak mukoza iyileşmesi" dir. Bu nedenle klinik parametrelerin izlenmesi aracılığıyla hastalar sıkı takip edilmektedir (14). CDAI, CH'nın klinik durumu ve tedavi etkilerini izlemek için kullanılan en yaygın skordır. Çalışmamızda klinik olarak remisyonda olan CH'larını seçerken CDAI'i kullanıldı (2). CDAI <150 olan olgular remisyonda kabul edilerek çalışmaya dahil edildi. CDAI çok sık kullanılan bir skordur ve yapıları yapılan çalışmalarda barsakta gelişen mukozal değişiklikleri yeterince yansıtmadığı ve tedavi izlemi için yetersiz olduğu gösteril-

mektedir (15,16). Çalışmamızda 7 Crohn hastasında, CDAI indeksi 150'nin altında olmasına rağmen kolonoskopilerinde aktif mukoza lezyonları saptandı.

Yapılan çalışmalarda, fekal kalprotektin, endoskopik hastalık aktivitesi ile korele bulunmuştur (17,18). Çalışmamızda kolonoskopi indekslerine göre remisyonda ve aktif CH arasında fekal kalprotektin, laktoferrin, serum CRP ve SAA düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Fekal kalprotektin ve laktoferrin düzeyleri ile hastaların kolonoskopik CH aktivite skorları arasında orta derecede pozitif korelasyon saptandı. Schoepfer ve ark. da benzer şekilde fekal kalprotektin ve laktoferrin düzeyleri ile kolonoskopide saptanan aktif mukozal inflamasyonlarının korele olduğunu saptadı (19). Kalprotektin inflamasyonlu barsak duvarından lokal olarak barsak lümenine geçen nötrofiller tarafından salınır (20). Sipponen ve ark, 61 CH'sını SES indeksine göre inaktif, hafif-orta ve şiddetli mukozal inflamasyonu olanlar şeklinde sınıflandırmışlardır. Bu üç grupta ölçülen fekal kalprotektin değerleri incelendiğinde inaktif ve hafif mukozal inflamasyonu olan gruplar arasında bile anlamlı fark saptanmıştır (21). Langhorst ve ark, endoskopik SES skoruna göre aktif ve inaktif olarak sınıflandırılan CH'da fekal kalprotektin, laktoferrin, CRP ve klinik indeksleri incelemiş ve bizim çalışmamıza

benzer şekilde gruplar arası anlamlı fark bulunmuşlardır (18). Fekal kalprotektin ve laktoferrin ile CH'da inflamasyonun öngörüsü, hastalık aktivitesi için ileri araştırma kararını vermede etkili olur. Mukozal inflamasyon saptanmayan yani remisyondaki hastalar fekal kalprotektin ve laktoferrin ile izlenebilmelidir. Barsak granulositlerinden salınan yüksek fekal kalprotektin ve laktoferrin, artmış mukozal inflamasyon varlığını yansıttığı için endoskopi ve kolonoskopi gibi ileri tetkikler gereken hastaların daha doğru seçilmesini sağlar. Dolayısıyla düşük fekal kalprotektin ve laktoferrin saptanan CH'da gereksiz kolonoskopi uygulamaları engellenmiş olur. Yüksek fekal kalprotektin ve laktoferrin ise mukozal inflamasyona yansıttığı için daha hızlı kolonoskopiye yönlendirilme ve daha erken tedavi sağlar (19). Jones ve ark, 164 CH'da yaptıkları çalışmada; CDAI, endoskopik SES skoru ile serum CRP, IL-6 ve fekal biyobelirteçleri (kalprotektin, laktoferrin) karşılaştırmışlar ve SES skoruna göre aktif CH'da CRP, IL-6 ve fekal biyobelirteçleri yüksek bulunmuşlardır. Çalışmamıza benzer olarak, SES skoru ile fekal biyobelirteçler korelasyon gösterirken CDAI ile korelasyon göstermemiştir (22).

Ungaro ve ark, CH'li 143 hastada BT enterografisi ile ince barsak inflamasyonunun endoskopik şiddeti ve CRP ile korelasyonunu araştırmıştır. Araştırmacılar, CRP'nin perienterik inflamasyonun radyolojik bulguları ile (yağ yoğunluğunun artması) ilişkili olduğu, ancak inflamasyonun barsak duvarıyla sınırlı olmadığı ve CH'da CRP cevabında perienterik inflamasyonun potansiyel rolüne dikkat çekmişlerdir. İnflamatuvar süreçlere özgü, inflamatuvar hücrelerin yağ dokusuna istilası sonucu salınan IL-6, IL-8, TNF-alfa, IL-10 ve IL-18 gibi çeşitli pro-inflamatuvar sitokinler yağ dokusuna bağlanıp, beraberinde perienterik inflamasyona bağlı barsakta kalprotektin sentez ve barsak lümenine atılımı görülmektedir. (23). Çalışmamızda, serum CRP düzeyi ile barsak lümenine atılan kalprotektin ve laktoferrin arasında pozitif korelasyon izlendi.

İnflamasyon belirteçleri olan ESH ve SAA ölçümlerini de çalışmamızda inceledik. Burada amacımız lokal inflamasyonu gösteren

biyobelirteçler gibi sistemik diğer belirteçlerin de CDAI <150 olan klinik remisyondaki hastalarda yararını ortaya koymaktı. Kolonoskopiye göre aktif ve remisyondaki hastalar arasında CRP gibi SAA düzeylerinde de istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. Bu durum mukozal inflamasyonu olan hastalar asemptomatik bile olsa sistemik inflamatuvar olayların tekrarlamış olacağını bize gösterdi. Şimdiye kadar CH'da mukozal inflamasyon biyogöstergelerinin yararlılığında sistemik inflamasyon göstergeleri olarak en çok CRP, ESH ve lökosit sayısı incelenmiştir ve çalışmalarda duyarlılık ve özgüllüklerinin düşük, yaklaşık %50 olan bir dizi çalışma vardır, bu da aktif CD'li birçok hastada negatif olduğu anlamına gelir. Bu nedenle biz de sistemik inflamasyonun birçok hastalıkta güçlü göstergelerinden olan bir akut faz yanıtı proteini olan SAA'yı CH da hastalık aktivitesi göstergesi açısından araştırdık. Çalışmamızda remisyonda ve aktif CH arasında SAA düzeylerinde anlamlı fark saptandı. Ayrıca fekal laktoferrin değerleri ile pozitif korelasyon gösterdi ancak CDAI ve kolonoskopik CH aktivite skorlamaları arasında korelasyon izlenmedi. Bizim çalışmamızdan farklı olarak, Yarur ve ark'nın yaptığı çalışmada, 94 CH'da SAA yüksekliği mukozal iyileşme yani hastalık aktivitesi ile korele bulunmuş, ancak CRP düzeyleri ile korele bulunmamıştır (24).

Çalışmamızda en önemli kısıtlayıcı olarak gördüğümüz faktör, klinik remisyonda olan CH hasta sayısına ulaşamamış olmamızdır. Hasta toplama süresi boyunca aktif CH sayısı çok olmasına rağmen remisyonda CH sayısı çok az idi. Bu durum klinik olarak asemptomatik hastaların hastaneye başvurmamasından ve rutin vizitlerini aksatmalarından kaynaklanmaktaydı. Daha geniş bir CH grubunda çalışmalar yapılması bu biyobelirteçlerin tanı ve takipte gücünü arttıracaktır. Bir diğer önemli kısıtlayıcı nokta CH'nın GİS'nin kolon dışında başka yerlerinde de yerleşebileceği idi. Kolon dışında inflamatuvar mukozası olan hastalar CH'da gözden kaçırılmamalıdır.

Sonuç olarak, çalışmamızda toplumda çok da nadir görünmeyen bir hastalık grubu olan İBH'dan CH'da, kolonoskopi gibi invazif

tetkiklerden önce hasta vizitlerinde yapılan CDAI'nin hastalık aktivitesini iyi yansıtmadığı görüldü. Kolonoskopi ile remisyonda ve aktif olduğu saptanan CH arasında kolonik mukozal inflamasyonu gösteren fekal kalprotektin, laktoferrinin düzeylerinin anlamlı farklı olduğu, kolonoskopi ile saptanan aktivite skorları ile fekal kalprotektin ve laktoferrinin korele olduğu saptandı. Kolonoskopi gibi

zahmetli ve invazif bir tetkikten önce mukozal inflamasyonu iyi yansıtan fekal kalprotektin ve/veya laktoferrin testlerinin uygulanması, kolonoskopiye yönlendirilecek hastaların daha iyi seçilebileceğini göstermektedir.

Teşekkür: Çalışmamızı destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeler birimine teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- Xavier RJ, Podolsky DK. Unravelling the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Nature* 2007;448:427-434. PMID:17653185 DOI: 10.1038/nature06005
- Sostegni R, Daperno M, Scaglione N et al. Review article: Crohn's disease: monitoring disease activity *Aliment Pharmacol Ther* 2003;17:11-7.
- Schoepfer AM, Vavricka S, Zahnd-Straumann N, Straumann A, Beglinger C. Monitoring inflammatory bowel disease activity: clinical activity is judged to be more relevant than endoscopic severity or biomarkers. *J Crohns Colitis* 2012;6:412-418. [PMID: 22398068 DOI: 10.1016/j.crohns.2011.09.008]
- Annese V, Daperno M, Rutter MD, Amiot A, Bossuyt P, East J, Ferrante M, et al; European Crohn's and Colitis Organisation. European evidence based consensus for endoscopy in inflammatory bowel disease. *J Crohns Colitis* 2013;7:982-1018. [PMID: 24184171 DOI: 10.1016/j.crohns.2013.09.016]
- Bjerrum JT, Nielsen OH, Hao F, Tang H, Nicholson JK, Wang Y, Olsen J. Metabonomics in Ulcerative Colitis: Diagnostics, Biomarker Identification, And Insight into the Pathophysiology. *J Proteome Res* 2010;9:954-962.
- Boschetti G, Laidet M, Moussata D, et al (2015) Levels of Fecal Calprotectin Are Associated With the Severity of Postoperative Endoscopic Recurrence in Asymptomatic Patients With Crohn's Disease. *Am J Gastroenterol* 110:865-872
- Krzesiek E. Fecal Calprotectin as an Activity Marker of Inflammatory Bowel Disease in Children. *Adv Clin Exp Med* 2015;24:815-822.
- Yamamoto T, Shimoyama T. Can Fecal Biomarkers Detect Ileal Inflammation in Inflammatory Bowel Disease? *Am J Gastroenterol* 2015;110:1370-1370.
- Dai C, Jiang M, Sun M-J (2017) Fecal Calprotectin in Monitoring the Disease Activity in Colonic Inflammatory Bowel Disease. *Dig Dis Sci*. 2017;62(12):3625-26. doi: 10.1007/s10620-017-4799-0
- Klimczak K, Lykowska-Szuber L, Eder P, Krela-Kazmierczak I, Stawczyk-Eder K, Szymczak A, Michalak M, et al. The diagnostic usefulness of fecal lactoferrin in the assessment of Crohn's disease activity. *Eur J Intern Med* 2015;26:623-627.
- Mosli MH, Zou G, Garg SK, Feagan SG, MacDonald JK, Chande N, Sandborn WJ, et al. C-Reactive Protein, Fecal Calprotectin, and Stool Lactoferrin for Detection of Endoscopic Activity in Symptomatic Inflammatory Bowel Disease Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol* 2015;110:802-819.
- Daperno M, D'Haens G, Van Assche G, Baert F, Bulois P, Maunoury V, Sostegni R, et al. Development and validation of a new, simplified endoscopic activity score for Crohn's disease: the SES-CD. *Gastrointest Endosc* 2004;60:505-12.
- Rutgeerts P, Geboes K, Vantrappen G, Beyls J, Kerremans R, Hiele M. Predictability of the postoperative course of Crohn's disease. *Gastroenterology* 1990;99:956-63.
- Best WR, Becktel JM, Singleton JW, Kern F. Development of a Crohn's disease activity index. National Cooperative Crohn's Disease Study. *Gastroenterology* 1976;70:439-44.
- Xiang J-Y, Ouyang Q, Li G-D, Xiao N-P. Clinical value of fecal calprotectin in determining disease activity of ulcerative colitis. *World J Gastroenterol*. 2008;14:53-7.
- Voiosu T, Benguş A, Dinu R, Voiosu AM, Bălănescu P, Băicuş C, Diculescu M, et al. Rapid fecal calprotectin level assessment and the SIBDQ score can accurately detect active mucosal inflammation in IBD patients in clinical remission: A prospective study. *J Gastrointest Liver Dis* 2014;23:273-278.
- Berni Canani R, Terrin G, Rapacciuolo L, Miele E, Siani MC, Puzone C, et al. Faecal calprotectin as reliable non-invasive marker to assess the severity of mucosal inflammation in children with inflammatory bowel disease. *Dig Liver Dis* 2008; 40:547-553.
- Langhorst J, Elsenbruch S, Koelzer J, Rueffer A, Michalsen A, Dobos GJ. Noninvasive Markers in the Assessment of Intestinal Inflammation in Inflammatory Bowel Diseases: Performance of Fecal Lactoferrin, Calprotectin, and PMN-Elastase, CRP, and Clinical Indices. *Am J Gastroenterol* 2008; 103:162-169.
- Schoepfer AM, Beglinger C, Straumann A, Trummler M, Vavricka SR, Bruegger LE, Seibold F. Fecal Calprotectin Correlates More Closely With the Simple Endoscopic Score for Crohn's Disease (SES-CD) than CRP, Blood Leukocytes, and the CDAI. *Am J Gastroenterol* 2010;105:162-169. doi:10.1038/ajg.2009.545

20. Røseth AG, Schmidt PN, Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 1999;34:50–4.
21. Sipponen T, Kärkkäinen P, Savilahti E, Kolho KL, Nuutinen H, Turunen U, Färkkilä M. Correlation of faecal calprotectin and lactoferrin with an endoscopic score for Crohn's disease and histological findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2008;28:1221–1229.
22. Jones J, Loftus EV, Panaccione R, Chen LS, Peterson S, McConnell J, Baudhuin L, et al. Relationships Between Disease Activity and Serum and Fecal Biomarkers in Patients With Crohn's Disease. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008;6:1218–1224. doi: 10.1016/j.cgh.2008.06.010.
23. Ungaro R, Mehandru S, Allen PB, Peyrin-Biroulet L, Colombel J-F. Ulcerative colitis. 2017;389:1756–70. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32126-2
24. Yarur AJ, Quintero MA, Jain A, Czul F, Barkin JS, Abreu MT. Serum Amyloid A as a Surrogate Marker for Mucosal and Histologic Inflammation in Patients with Crohn's Disease. *Inflamm Bowel Dis* 2017;23:158–164

Kan Gazı ve Serum Bikarbonat Değerleri Arasındaki İlişkinin Analizi

Analysis of the Relationship Between Blood Gas and Serum Bicarbonate Values

Fatıma Betül Tuncer* **Erdem Çokluk*** **Mehmet Ramazan Şekeroğlu***
Fatma Özdemir** **Meltem Boz***

* Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya AD, Sakarya, Türkiye

** Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim Araştırma Hastanesi, Sakarya, Türkiye

Başvuru Tarihi: 16 Ekim 2019

Kabul Tarihi: 13 Ocak 2020

ÖZET

Amaç: Kan gazı ölçüm cihazında ve serumda otoanalizörle ölçülen bikarbonat (HCO_3^-) değerlerini karşılaştırarak birbiri ile uyumunu araştırmaktır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmamızda geçmiş 1 yıllık sürede (Eylül 2018 - 2019) 186 adet aynı hastanın eş zamanlı olarak ölçülen serum bikarbonat ve kan gazı bikarbonat değerleri retrospektif olarak değerlendirildi. Serum HCO_3^- düzeyi Olympus AU5800 otoanalizörü, kan HCO_3^- düzeyi ise Radiometer ABL800 cihazı ile çalışıldı. Serum bikarbonat sonuçları numune alımı ile sonuç verme zamanı arasında geçen süreye göre 0-60, 61-120 ve >120 dakika olarak üç gruba ayrıldı.

Bulgular: Her iki yöntemle bulunan [kan HCO_3^- serum HCO_3^-] arası fark ortalaması; 0-60, 61-120 ve >120 dakika için sırasıyla $0,13 \pm 7,6$; $0,92 \pm 7,6$; $1,6 \pm 5,4$ mmol/L idi. Literatüre göre birey içi değişkenlik katsayılarından elde edilen maksimum izin verilen hata 0,46 mmol/L olarak belirtilmiştir. Dolayısıyla, çalışmamızda 0-60 dakika arasında çalışılan numunelerin iki yöntem arası farkının ortalaması 0,46 mmol/L den düşükken; diğer grupların iki yöntem arası fark ortalamaları 0,46 mmol/L den daha yüksek bulundu. Ayrıca serum bikarbonat düzeyleri için % Bias=8,52, Total % CV=10,27 ve total analitik hata (TAH)=25,47 olarak bulundu.

Sonuç: Serum HCO_3^- düzeyi 0-60 dakika aralığında ölçüldüyse iki yöntemin birbirinin alternatifi olarak kabul edilebileceği, daha uzun süre bekleyen numunelerde ise birbirinin alternatifi olarak değerlendirilmesinin hatalara neden olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca optimum şartlarda çalışılsa bile serum bikarbonat düzeyi sonuçları değerlendirilirken laboratuvarın TAH değerinin dikkate alınması gerektiği kanaatindeyiz.

Anahtar Kelimeler: Kan Gazı Analizi; bikarbonat düzeyi; enzimatik yöntem

Fatıma Betül TUNCER : <https://orcid.org/0000-0002-4034-4188>
Erdem Çokluk : <https://orcid.org/0000-0002-6205-5109>
Ramazan ŞEKEROĞLU : <https://orcid.org/0000-0001-8383-6740>
Fatma ÖZDEMİR : <https://orcid.org/0000-0003-0244-5356>
Meltem BOZ : <https://orcid.org/0000-0002-7939-8503>

Yazışma adresi: Fatıma Betül Tuncer
Korucuk Mah. Konuralp Bulvarı No:81
54290 Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi
Adapazarı/SAKARYA
Telefon: 0505 869 22 50
e-mail: fbtuncer07@gmail.com

ABSTRACT

Objective: The aim of this study is to investigate the compatibility of bicarbonate (HCO_3^-) levels measured by blood gas meter in serum autoanalyser.

Materials and Methods: In the study, serum bicarbonate and blood gas bicarbonate levels of 186 patients were evaluated retrospectively in the last one year period (September 2018 - 2019). Serum HCO_3^- levels were analyzed with Olympus AU5800 autoanalyser and blood HCO_3^- level with Radiometer ABL800. Serum bicarbonate results were divided into three groups as 0-60, 61-120 and > 120 minutes according to the time elapsed between sampling and delivery time.

Results: The mean difference between the two methods [blood HCO_3^- - serum HCO_3^-]; for 0-60, 61-120 and 120 minutes were; 0.13 ± 7.6 , 0.92 ± 7.6 ; 1.6 ± 5.4 mmol / L, respectively. According to the literature, the maximum allowable error obtained from intra-individual coefficients of variability was reported as 0.46 mmol / L. In this study, the mean difference between the two methods examined between 0-60 minutes was less than 0.46 mmol / L; The difference between the other two groups was greater than 0.46 mmol / L. In addition, % Bias, Total CV% and total analytical error (TAH) of levels serum bicarbonate were found as 8.52, 10.27 and 25.47 respectively.

Conclusion: If the serum HCO_3^- level was measured in the time of 0-60 min, we think that the two methods can be considered as alternatives. However, for samples that are waiting longer, evaluation of them as an alternative may cause errors. We also believe that the TAH value of the laboratory should be taken into consideration when evaluating serum bicarbonate level results, even if it is run under optimum conditions.

Keywords: Blood Gas Analysis; bicarbonate levels; enzymatic method

GİRİŞ

Kan gazı analizi, hastaların asit-baz dengesi ve oksijenlenme durumunu değerlendirmek için kullanılan en önemli laboratuvar analiz yöntemlerindendir. Hastaya tanı koymanın yanında hastanın takibi ve tedaviye yanıtını değerlendirmek için de bu analize başvurulmaktadır (1,2). Kan gazı ölçüm sistemlerinde pH, kısmi oksijen basıncı (pO_2), kısmi karbondioksit basıncı (pCO_2), elektrolitler [Sodyum(Na), Potasyum(K), Kalsiyum(Ca) vb.], metabolitler (glukoz, üre vb.) gibi bazı parametreler doğrudan ölçülürken bazı parametreler için (anyon gap (AG), bikarbonat (HCO_3^-) vb.) çeşitli formüller kullanılarak hesaplama sonuçları raporlanmakta bu da cihazlar arasında raporlanan sonuçlarda farklılıkların oluşmasına sebebiyet vermektedir(3).

Hücre dışı sıvının en önemli ikinci anyonu ve kandaki tamponlama sistemlerinin başlıca bileşeni olan bikarbonat kanın asit-baz dengesini belirlemede kullanılan en önemli parametrelerdendir. Standart bikarbonat konsantrasyonu ($\text{CHCO}_3^-(\text{std})$), 37°C 'de 40 mmHg pCO_2 altında kanda bulunması gereken bikarbonat değeri iken; aktüel bikarbonat konsantrasyonu ($\text{CHCO}_3^-(\text{act})$), pH, pCO_2

kullanılarak Hendersen-Hasselbalch denklemi ile hesaplanan numunenin anlık bikarbonat değeridir. Normal şartlarda bu iki değer birbirine eşittir (3,4).

HCO_3^- düzeyini ölçmek için kan gazı analizörlerinin dışında numune olarak serum/plazma kullanan iyon selektif elektrot (ISE) ya da spektrofotometrik ölçüm yöntemleri de kullanılabilmektedir. ISE yönteminde örnekler asidifiye edilerek çeşitli formlarda olan karbondioksit, gaz haline çevrilmekte ve pCO_2 elektrodu ile ölçüm yapılmaktadır. Ancak bu yöntemin özgüllüğü düşük olduğu için kullanımda çokça tercih edilmemektedir. Enzimatik spektrofotometrik yöntemde ise, öncelikle numune alkalileştirilerek karbondioksit ve karbonik asit bikarbonata çevrilmektedir. Daha sonra fosfoenolpiruvat kullanılarak iki basamaklı bir reaksiyon gerçekleştirilmekte ve reaksiyon sonucunda nikotinamid-adenin di-nükleotid (NADH) absorbanstaki azalma 340 nm dalga boyunda ölçülerek sonuç verilmektedir. Bikarbonat düzeyinin referans aralığı ölçülen yöntemle göre değişmekle birlikte 24-31 mmol/L arasındadır (5).

Kan gazı analizörü ile bikarbonat düzeyini ölçülürken numuneler bekletilmeden hızlı bir

şekilde cihaza verilmektedir. Ancak serum ya da plazma kullanılan yöntemlerde; numunenin pıhtılaşma süresi, santrifüj edilmesi gibi ön işlemlerden dolayı bu süreç bir miktar uzamaktadır. Bu uzama sürecinden dolayı da numunedeki karbondioksit miktarı 6 mmol/L/saat kadar azalabilmektedir(5). Bu nedenle numunenin ağzının kapalı olması ve mümkün olduğunca hızlı şekilde analiz edilmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada kan gazı cihazında çalışılan ve ayrıca otoanalizörlerde spektrofotometrik yöntemle ölçülen serum bikarbonat değerlerini karşılaştırmayı ve elde edilen sonuçların birbirlerinin alternatifi olarak kullanılıp kullanılamayacağını irdelemeyi amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Eylül 2018 - 2019 tarihleri arasında Sakarya Üniversitesi Tıp Fakültesi Eğitim ve Araştırma Hastanesinde eş zamanlı olarak serum bikarbonat ve kan gazı pH, pCO₂, pO₂, bikarbonat sonuçları çalışılmış olan, 18-65 yaş arası, 103 Erkek ve 83 Kadın hasta numunesine ait toplam 186 analiz sonucu kullanılarak gerçekleştirildi. Serum bikarbonat verileri, numune alımından sonucun verilmesine kadar geçen süreye göre 0-60 dakika (dk), 61-120 dk ve >120 dk olarak üç gruba ayrıldı. Çalışma için girişimsel olmayan etik kurulundan 02.10.2019 tarih ve 132 sayılı karar ile etik kurul onayı alındı. Eş zamanlı olarak serum bikarbonat ve kan gazı pH, pCO₂, pO₂, bikarbonat sonuçları olmayan hasta verileri çalışma dışı bırakıldı.

Serum bikarbonat düzeyi Olympus AU5800 (Beckman Coulter, Inc. Brea, CA92821 U.S.A.) biyokimya otoanalizörüyle tayin edilmiştir. Kan HCO₃⁻ düzeyi ise, direkt pH, pCO₂, pO₂ düzeyi ölçümü yaparak HCO₃⁻ düzeyini hesaplayan Radiometer ABL800 Flex (Radiometer Medical ApS, Bronshøj, Denmark) kan gazı cihazından elde edilmiştir.

İstatiksel Analiz;

Elde edilen verilerin istatistiksel hesaplamaları SPSS (ver. 20.0; SPSS, USA) programıyla yapıldı. Her iki yöntemle elde edilen bikarbonat düzeylerinin ve iki yöntemin farklarının ortalama ve standart sapmaları hesaplandı.

Shapiro-wilk testi ile grupların normal dağılıma uygunluğu test edildi. Normal dağılıma uyan parametrelerde üç grubun birbiriyle karşılaştırılması için tek yönlü varyans analizi (Oneway ANOVA) ve Post Hoc Tukey testi yapıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerde ise Kruskal Wallis Analizi ve Mann Whitney U testi yapıldı. Parametreler arasındaki ilişki normal dağılım göstermeyen değişkenlerde spearman, normal dağılım gösteren değişkenlerde ise pearson korelasyon testi ile belirlendi. p<0,05 anlamlı kabul edildi. İki yöntem arasındaki ilişkinin gösterilmesi için doğrusal regresyon grafiği çizildi ve gruplar arası sonuçların uyumu Bland-Altman analizi ile değerlendirildi. Çalışmanın yapıldığı biyokimya otoanalizöründe serum bikarbonat düzeyi kabul edilebilir hata değeri için dış kalite kontrol sonuçları ile % bias ve iç kalite kontrol sonuçları ile de varyasyon katsayısı (%CV) değerleri hesaplandı. Daha sonra bu değerler kullanılarak total analitik hata (TAH) bulundu (6).

BULGULAR

Çalışmaya alınan hastaların genel yaş ortalaması 46,3 ± 28,5 olarak hesaplandı. Çalışmaya alınan tüm hastaların kan gazı bikarbonat seviyesi (HCO₃⁻) ortalaması, otoanalizörde ölçülen serum bikarbonat düzeyi (sHCO₃⁻) ortalaması ve her iki yöntemle bulunan değerler arası farkın (HCO₃-sHCO₃⁻) ortalaması hesaplandı (Tablo 1). Ayrıca hastaların kan gazı pH, pO₂ ve pCO₂ değerlerinin de ortalamaları ve standart sapmaları Tablo 1’de verilmiştir.

Numune alımı ile cihaz sonuç verme arasında geçen süreler göre ayrılan üç grubun HCO₃⁻, sHCO₃⁻ ve HCO₃⁻ - sHCO₃⁻ düzeyleri arasında anlamlı fark saptanmadı (p>0,05). İki yöntem arası ilişkinin tespiti için yapılan analizler sonucu elde edilen gruplar arası korelasyon katsayıları, doğrusal regresyon denklemi ve katsayısı ise Tablo 2’de verilmiştir.

İki metodun uyumunu değerlendirmek için yaygın olarak kullanılan iki ölçüm arasındaki farkların, bu ölçümlerin ortalamasına göre saçılımını gösteren Bland-Altman Grafikleri Şekil 1’de (1a, 1b, 1c ve 1d grafikleriyle)

sırasıyla tüm örnekler, 0-60 dk, 61-120 dk ve >120 dk'da sonuçlandırılan örnekler olarak gösterilmiştir.

Serum bikarbonat ölçümü için %bias=8,52 ve total%CV=10,27 olarak bulundu. TAH ise 25,47 olarak hesaplandı.

Tablo 1. Kan Gazı Cihazı ve Otoanalizörle Çalışılan Parametrelere Ait Veriler
Table 1. Parameter data by the Blood Gas Device and the autoanalyser

	N	pH Ort±SD	pO2 Ort±SD	pCO2 Ort±SD	HCO3 Ort±SD	sHCO3 ⁻ Ort±SD	HCO3 - sHCO3 ⁻ Ort±SD
Tüm Örnekler	186	7,36±0,2	42,6±19,3	46,3±69,5	23,7±12,9	23,0±14,0	0,6±7,4
0-60 dk*	81	7,36±0,2	42,4±19,6	45,6±57,8	23,6±12,6	23,5±12,9	0,13±7,6
60-120 dk*	73	7,35±0,2	43,3±20,2	44,0±6,0	23,8±14,0	22,9±16,0	0,92±7,6
120 dk ve üzeri*	32	7,37±0,1	41,4±16,2	53,4±53,2	24,0±11,2	22,4±12,0	1,6±5,4

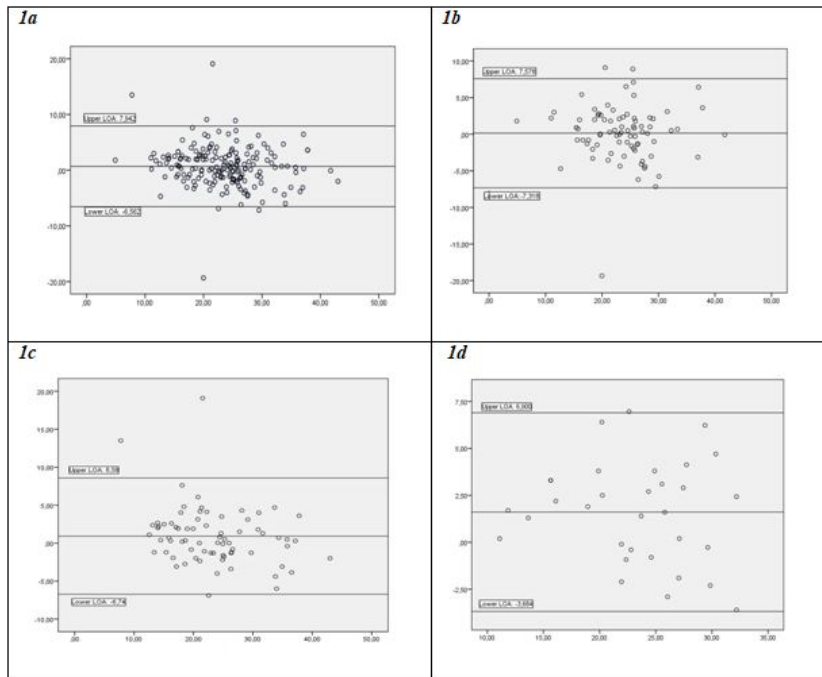
*Serum bikarbonat düzeyi sonuçları, numune alımı ile cihaz sonuç verme zamanı arasında geçen süreler gereğince gruplandırılmıştır.

HCO3⁻: kan gazı bikarbonat düzeyi, sHCO3⁻:serum bikarbonat düzeyi SD: standart sapma, Ort:ortalama
HCO3⁻ - sHCO3⁻ : kan gazı ve serum bikarbonat düzeyleri arasındaki fark

Tablo 2. Bikarbonat Analizinde İki Farklı Ölçümün Korelasyonu ve Regresyon Denklemi
Table 2. Correlation and Regression Equation of Two Different Measurements in Bicarbonate Analysis

	Korelasyon Katsayısı(r)	Lineer Regresyon Denklemi	r ²
Tüm Örnekler	0,852	$sHCO_3^- = 0,924 \times HCO_3 + 1,113$	0,726
0-60 dk*	0,816	$sHCO_3^- = 0,832 \times HCO_3 + 3,847$	0,666
60-120 dk*	0,878	$sHCO_3^- = 1,003 \times HCO_3 - 0,985$	0,771
120 dk ve üzeri*	0,896	$sHCO_3^- = 0,953 \times HCO_3 - 0,487$	0,803

*Serum bikarbonat düzeyi sonuçları numune alımı ile cihaz sonuç verme zamanı arasında geçen süreler gereğince gruplandırılmıştır.



Şekil 1. Bland-Altman Grafiği

Lower LOA:Kabul edilebilir en düşük değer; Upper LOA:Kabul edilebilir en yüksek değer X Eksen: iki ölçüm yönteminin ortalamasını; Y Eksen: iki ölçüm yönteminin farkını göstermektedir. **1a**:tüm örnekler, **1b**:0-60 dk, **1c**:61-120 dk, **1d**:>120 dk içerisinde sonuç verilen örnekler

TARTIŞMA

Acil servis ya da polikliniklerden gönderilen numunelerde hastanın asit-baz dengesini değerlendirmek için kan gazı cihazıyla tam kandan ya da otoanalizörle serumdan bikarbonat düzeyi tespit edilmektedir. Kısa sürede sonuç alındığı için, özellikle acil hastalarda bikarbonat ölçümünde kan gazı ölçüm cihazları tercih edilmektedir. Ancak bu cihazlarda kullanılacak numunelerin arterden alınması ve hızlı bir şekilde acil olarak çalışılması gerektiğinden; her ne kadar laboratuvar rehberlerinde yer alsın ve hizmet içi eğitimlerde özellikle belirtilse de; acil servislerin yoğunluğu, bu servislerde çalışan personel sayısının yetersizliğine bağlı olarak optimum numune transfer koşulları rutin kullanımda her zaman sağlanamamaktadır. Bununla birlikte serum ya da plazma kullanımı gerektiren durumlarda ise yukarıda bahsedilen transfer koşullarına ilaveten pıhtılaşma ve santrifüj gibi ön işlemlerden dolayı analiz süreci uzamakta ve bu da test sonucunu etkileyebilmektedir. Bu nedenle beklemenin analiz sürecine etkisini gözlemlemek için çalışmamızda kullandığımız serum bikarbonat düzeyi sonuçlarını; numune alımı ile cihaz sonucu arasında geçen süreye göre 0-60 dk, 61-120 dk, >120 dk olmak üzere üç gruba ayırarak inceledik.

Bu çalışmada serum bikarbonat düzeylerini eş zamanlı alınan kan gazı bikarbonat düzeyleri ile karşılaştırdığımızda iki yöntem arasında anlamlı bir ilişkinin varlığını tespit ettik. Literatürde yöntem karşılaştırmalarında korelasyon katsayısı ve regresyon analizi ile birlikte Bland-Altman grafiği kullanılmasının gerekliliği de vurgulanmaktadır (7). Bu nedenle biz de aynı grafiği kullandık. Bland-Altman grafiğinde iki ölçüm arasındaki farkların, iki ölçümün ortalamasına karşı saçılım grafiği çizilmekte ve %95 güven aralığında ölçümler arasındaki farkın ortalama $\pm 1,96$ SD olarak hesaplanan uyum sınırları (Lower LOA-Upper LOA) içinde olması beklenmektedir (8).

Story ve Poustie (9) yoğun bakımda yatan hastalardan aldıkları numuneleri Hitachi 747 otoanalizörü ve Ciba Corning 865 kan gazı

cihazıyla analiz ederek bikarbonat düzeylerini karşılaştırmışlardır. Bu araştırmacılar iki yöntemin birbirinin yerine kullanılabilirliğinin kabul edilebilmesi için Bland-Altman grafiğinde şu iki kriterin sağlanması gerekliliğini öne sürmüşlerdir: i- Kan gazı ve serum bikarbonat düzeyi arasındaki farkın ortalaması ± 1 mmol/L olmalı ve ii- en düşük kabul edilebilir ölçüm seviyesi (LLOA) ve en yüksek kabul edilebilir ölçüm seviyesi (ULOA) arasındaki fark da en fazla 4 mmol/L olmalıdır. Bizim çalışmamızda kan gazı ve serum bikarbonat düzeyi arasındaki farkların ortalaması ± 1 mmol/L ye yakın bulunmasına rağmen, LLOA ve ULOA arasındaki fark Story ve Poustie (9)'nin belirttiği kriterin kabul edilebilir sınırlarının dışındaydı. Mohd Nasir ve ark.(10)'nın ABL800 Flex kan gazı cihazı ile serum enzimatik bikarbonat düzeylerini karşılaştırdıkları çalışmalarında elde ettikleri sonuçlar da bizim sonuçlarımıza benzer şekilde Story ve Poustie (9)'un belirlediği birinci kuralı sağlamış ancak, LLOA ve ULOA uyum sınırları dışında 4 mmol/L den yüksek bulmuşlardır. Bu sonuçlara göre belirtilen iki yöntemin birbirinin alternatifi olarak kullanılamayacağını belirtmişlerdir.

Memişoğulları ve ark. (11) ise ABL800 Flex kan gazı cihazı ile Roche Diagnostics Cobas c501 otoanalizöründe ölçülen bikarbonat sonuçlarını karşılaştırdıkları çalışmalarında Mohd Nasir ve ark.'na benzer sonuç bulmalarına rağmen, elde ettikleri istatistik analizde korelasyon katsayısının oldukça yüksek olmasına ($r=0.944$) ve Bland-Altman grafiğinde uyum sınırlarının dışına çıkan numune sayısının az olmasına dayanarak; kan gazı cihazındaki bikarbonat sonuçlarını enzimatik ölçüm metodu ile korele ve kabul edilebilir olarak yorumlamışlardır. Benzer olarak Nargis ve ark.(12) da çalışmalarında iki yöntemin ortalamaları arasında anlamlı fark tespit etmemişler ve korelasyon düzeyini yüksek ($r = 0.987$; $P < 0.001$) tespit etmişlerdir. Bu sonuçlara göre çalışmanın yapıldığı hastane imkanlarını da göz önünde bulundurduklarında serumda ölçülen bikarbonat düzeyinin kan gazı analizi sonucuna alternatif olabileceği yorumunda bulunmuşlardır.

Literatürde hem kan gazı ve hem de otoanalizör ile ölçülen bikarbonat dışında analit sonuçlarının karşılaştırıldığı diğer çalışmalarda (13, 14) iki yöntemin farkının kabul edilebilirliğine karar vermek için United States Clinical Laboratory Improvement Amendment (US CLIA) tarafından belirlenen izin verilebilir hata değerleri referans alınmıştır (15). CLIA tarafından bikarbonat ölçümü için izin verilebilir hata değeri belirtilmemesine rağmen Fraser ve ark.(16) tarafından yayınlanan birey içi değişkenlik katsayısından elde edilen maksimum izin verilen hata 0,46 mmol/L olarak belirtilmiştir(5). Bizim çalışmamızda 0-60 dk arasında çalışılan numunelerin iki yöntem arası farkının ($\text{HCO}_3\text{-SHCO}_3$) ortalaması 0,46 mmol/L den düşüken; tüm veriler ve zamana göre ayrılmış diğer grupların iki yöntem arası farkı ($\text{HCO}_3\text{-SHCO}_3$) 0,46 mmol/L den yüksek bulundu.

Sonuç olarak yöntem karşılaştırılması ile ilgili yapılan çalışmalarda kabul edilebilirlik için farklı kriterler belirlenmiş ve bu kriterlere göre araştırmacılar tarafından farklı yorumlar yapılmıştır (8,13). Bununla birlikte aynı kriterlere göre değerlendiren çalışmalarda bile araştırmacılar sonucu farklı şekilde yorumlayabilmektedir (9,10). Ancak biz bu çalışmamızdaki verilerimizi irdelediğimizde; iki yöntem sonuçlarını karşılaştırdığımızda bulduğumuz yüksek korelasyonun bikarbonat düzeyinin referans aralığının genişliğinden de kaynaklanabileceğini (7), bu nedenle de farklı iki yöntemin uyumunun sadece korelasyon katsayısına göre yorumlanmaması gerektiğini düşünüyoruz. Yine çalışmamızdan elde ettiğimiz verileri değerlendirirken hem Story ve Poustie (8) hem de Fraser ve ark. (16) nın verilerini dikkate aldığımızda; karşılaştırma yaptığımız iki yöntemin (otoanalizör ve kan gazı cihazı sonuçlarının) Story

ve Poustie (8) tarafından belirlenen uyum sınırlarını tam olarak karşılayamadığını; Fraser ve ark.(16) tarafından verilen maksimum izin verilen hata sınırına ise sadece 0-60 dk aralığındaki sürede çalışılan serum bikarbonat düzeyi sonuçlarının uyulabildiğini saptadık. Bu tespitlerden (bulgulardan) yola çıkarak eğer serum bikarbonat düzeyi 0-60 dk aralığında ölçüldüyse iki yöntemin birbirinin alternatifi olarak kabul edilebileceğini, daha uzun süre bekleyen numunelerde ise birbirinin alternatifi olarak değerlendirilmesinin hatalara neden olabileceğini düşünüyoruz. Ayrıca numune optimum (normal) şartlarda çalışılsa bile çıkan serum bikarbonat sonuçları değerlendirilirken laboratuvarların TAH değerinin dikkate alınması gerektiğini düşünüyoruz. Bununla birlikte sağlık çalışanlarına bikarbonat analizi yapılacak numunenin (serum örneğinin) transferi ve bekleme süresi sırasında oluşabilecek hatalar konusunda eğitim verilmesinin gerekli olduğu kanısındayız.

Kısıtlılıklar

Bu çalışma retrospektif olarak yapıldığı için çeşitli kısıtlılıklar içermektedir. Bunlar arasında numunelerinin uygun şartlarda alınıp alınmadığı, numunelerin interfere edici etkenlere sahip olup olmadığının kontrol ve tespit edilememesi, kan gazı numunelerinin arteriyel ya da venöz kandan alınmış olabileceğinden dolayı standardize edilememesi başlıca kısıtlılıklardır. Ancak, bütün bu kısıtlılıkların yani arter ya da venöz numune olup olmaması, interfere edici özelliklerin standardize edilememesi gibi durumların, pratikte de her zaman tam olarak bilenemeyeceği göz önüne alındığında, bu çalışmanın rutin kullanımda meydana gelen sonuçları yansıtmaya kapasitesine sahip olduğunu düşünüyoruz.

KAYNAKLAR

1. Börekçi Ş, Umut S. Arter kan gazı analizi, alma tekniği ve yorumlaması. Türk Toraks Dergisi .2011; 12(1): 5-9.
2. Acıcan T. Arter kan gazları. Yoğun Bakım Dergisi 2003;3:160-75.
3. Konukloğlu D, Bolayır M, Turan T, Canbulat C, Yücel Ç. Kan gazları Parametreleri. Konukloğlu D, editor. Kan Gazları El Kitabı. Nobel Tıp Kitapevleri; 2017.p1-9
4. Bishop M, Fody EP, Schoeff LE. Elektrolitler, Kan Gazları, pH ve Tampon Sistemleri. Akbıyık F, editor. Klinik Biyokimya. Akademisyen Tıp Kitabevi; 2016.p354-77

5. Burtis Carl A, Ashwood Edward R. Elektrolitler ve Kan Gazları, Yöntemlerin Değerlendirilmesi-İstatistiksel Tekniklere Giriş. Aslan D, editor. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Ankara: Palme Yayıncılık, 5. baskı; 2005.p243,494-517
6. Genelge-201618izin-verilen-toplam-hata-sinirlari, <https://dosyamerkez.saglik.gov.tr/Eklenti/2581> (ET: 05.10.2019).
7. Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S. Klinik Araştırmalarda İki Ölçüm Tekniğinin Uyumunu İncelemede Kullanılan İstatistiksel Yöntemler. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası. 2003; 56(1).
8. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement Lancet 1986; I: 307-10
9. Story DA, Poustie S. (2000) Agreement between two plasma bicarbonate assays in critically ill patients. Anaesth Intensive Care. 4: 399-402.
10. Mohd Nasir N, Sthaneshwar P, Megat Yunus PJ and Yap SF.(2010) Comparing measured total carbon dioxide and calculated bicarbonate. Malaysian J Pathol. 32(1): 21-26.
11. Memişoğulları R, Özcan M E, Celbek G, Ankaralı H, Aydın Y. Kan gazı analiz cihazı ve direkt enzimatik ölçüm metodu ile elde edilen bikarbonat değerlerinin korelasyonu. Türk Biyokimya Dergisi [Turkish Journal of Biochemistry-Turk J Biochem] 2011; 36 (3); 270-72.
12. Nargis W, Rahman AS, Ahamed BU, Hossain MZ. Üçüncü dünya ülkesinde bir hastanenin yoğun bakım ünitesi hastalarında, geleneksel olarak ölçülen venöz bikarbonat ile hesaplanan arter bikarbonat değerlerinin karşılaştırılması. *Niger Med J* . 2014; 55 (4): 285-88.
13. Jain A, Subhan I, Joshi M. Comparison of the point-of-care blood gas analyzer versus the laboratory auto-analyzer for the measurement of electrolytes. *Int J Emerg Med*. 2009; 2(2):117-120.
14. Sezik S. Kan Gazı Analizi İle Otoanalizör Sodyum Ve Potasyum Sonuçlarının Karşılaştırılması. *Tepecik Eğit Hast Derg* 2014; 24 (1): 7-11
15. Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA).Regulations and Federal Register Documents. Standards and Certification: Laboratory Requirements (42 CFR 493).CLIA Code of Federal Regulations.Subpart I Proficiency Testing Programs by Specialty and Subspecialty. 493.931 Routine chemistry.
16. Fraser CG. Biological variationin clinical chemistryan update:collated data, 1988-1991.Arc Patrol Lab Med 1992; 116: 916-23.

TÜRK KLİNİK BİYOKİMYA DERGİSİ

İÇERİK (REGISTRY)

Cilt 17, 2019

İÇİNDEKİLER

Cilt 17, Sayı 1, 2019

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Behçet Hastalığında Plazma Vitamin D3 düzeylerinin Hastalık Aktivitesi ve İnflamasyon Belirteçleri ile ilişkisi**
The Relation Between Plasma 25-Hydroxy Vitamin D3 Levels, Disease Activity and Inflammatory Markers in Behçet Disease
Veysel Sucu, Müberra Vardar, Ralfi Singer, Mustafa Durmuşcan, Okan Dikler 1
- ♦ **Effectiveness of Critical Laboratory Value Reporting: An Evaluation by Clinicians**
Kritik Laboratuvar Değerlerinin Raporlanmasının Klinisyenler tarafından Değerlendirilmesi
Nilgün Başaran, Osman Evliyaoğlu, Sembol Yıldırım, Eren Vurgun 10
- ♦ **Demir Eksikliği Anemisinin Tanısında Gereksiz Test İstemi ve Maliyet Verimliliği**
Unnecessary Laboratory Test Requesting for the Diagnosis of Iron Deficiency Anemia and Cost Effectivity
Volkan Savaş, Tülay Köken 17
- ♦ **Mevzuat Değişikliğinin Kanda Etanol Tayini Numune Red Oranları Üzerine Etkisi**
Effects of Regulation Changes on Ethanol Assay Sample Rejection Rates in Blood
Cemal Kazezoğlu, Yasemin Tuğba Sutaşır 23
- ♦ **Iron Deficiency Anemia and β -Thalassemia Minor Differentiation With Hematological Indices**
Demir Eksikliği Anemisi ve Beta Talasemi Minör Ayırımında Kullanılan Hematolojik İndeksler
Nuriye Uzuncan, Sibel Bilgili, Sezen Şahin, Giray Bozkaya..... 29
- ♦ **Uşak İli ve Çevresinde B-Talasemi Taşıyıcı Sıklığı**
Prevalance of Beta Thalassemia Carriers in Uşak Province and Surrounding Areas
Arzu Etem Akağaç, Soycan Mızrak, Gamze Can, Mustafa Aydın, Sembol Yıldırım, Sefer Erman Yılmaz..... 36

◆ Gereksiz Tekrar Edilen Total PSA Testleri; Minimum Retest İnterval ve RCV ile Değerlendirme <i>Unnecessary Repeated Total PSA Tests; Evaluation with Minimum Retest Interval and Reference Change Value</i> Nergiz Zorbozan, İlker Akarken	42
◆ Koroner Arter Hastalığında Yeni Parametreler: Oksidatif Stres Belirteçleri <i>New Parameters of Coronary Artery Diseases: Oxidative Stress Markers</i> Uğur Erçin, Ayşe Bilgihan, Aycan Fahri Erkan, Hayati Yücel	48
◆ Kronik Hepatit C Virüs İnfeksiyonlu Hastalarda Polimeraz Zincir Yöntemiyle HCV-RNA Tayini ve Klinik Önemi <i>Determination of HCV-RNA by Polymerase Chain and Its Clinical Importance in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection</i> Mesude Falay Yılmaz, Doğan Cengiz, Gülsevrim Saydam.....	56

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Use of Reference Change Value for Dyslipidemia Follow up**
Dislipidemi Takibinde Referans Değişim Değerinin Kullanımı
 Okan Diker, Mustafa Şahin..... 63
- ♦ **İlk Trimester Tarama Testi Parametrelerinin Kayseri Bölgesi için Güncel Medyan Değerleri**
The Current Median Values of First Trimester Screening Test Parameters for Kayseri Region
 Nahide Ekici Günay..... 70
- ♦ **Evaluation of Analytical Performance of Clinical Chemistry Assays Using Six Sigma**
Altı Sigma Kullanılarak Klinik Kimya Testlerinin Analitik Performansının Değerlendirilmesi
 Gökhan Çakırca, Tülin Yazıcı 79
- ♦ **Hızlı, Hassas ve Kolay HPLC-UV 25(OH)D Tayini ve İmmün Ölçüm Yöntemi ile Karşılaştırılması**
A Simple, Sensitive and Rapid HPLC-UV Method for the Determination of 25(OH)D and Comparison of the Immunoassay Method
 Özgür Baykan..... 85
- ♦ **Tiroid Fonksiyon Testlerinde Sirkadiyen Ritim Analizi**
Circadian Rhythm Analysis in Thyroid Function Tests
 Belkız Öngen İpek, Mustafa Erinc Sitar 95
- ♦ **Bir Soğuk Aglütinin Olgusu (IgG Kappa ve IgM Lambda Biklonal Gammopati)**
A Case of Cold Agglutinin (IgG Kappa and IgM Lambda Biclinal Gammopathy)
 Arzu Oran..... 103
- Editöre Mektup**
- ♦ **Hatalı Trigliserid Yüksekliğine Neden Olan Gliserol Kontaminasyonu**
Falsely Elevated Triglyceride Levels due to Glycerol Contamination
 Şerif Ercan..... 108

ARAŞTIRMALAR / (ORIGINAL ARTICLES)

- ♦ **Comparison of Spectrophotometric Assays Determining Total Antioxidant Capacity Running Title: Assays Determining Antioxidant Capacity**
Toplam Antioksidan Kapasiteyi Belirleyen Spektrofotometrik Yöntemlerin Karşılaştırılması
Merve Ergin Tuncay 111
- ♦ **ST-segment Yüksekliği Olan Miyokard Enfarktüsünde Platelet Biyobelirteçleri**
Platelet Biomarkers In ST-Elevation Myocardial Infarction
Işıl Çakır, Nahide Ekici Günay, Ahmet Oğuz Baktır..... 120
- ♦ **Analitik Evre Performansının Altı Sigma Metodu Kullanılarak Değerlendirilmesi**
Evaluation of Analytical Phase Performance by Using Six Sigma Method
Şeniz Korkmaz 126
- ♦ **Ischemia modified albumin levels in invasive ductal carcinoma and fibroadenoma patients**
İnvaziv Duktal Karsinom ve Fibroadenom Hastalarında İskemi Modifiye Albümin Düzeyleri
Sibel Bilgili, Özlem Uğurlu, Giray Bozkaya, Nuriye Uzuncan, Baha Zengel 134
- ♦ **Klinik Remisyonda olan Crohn Hastalarında Hastalık Aktivitesinin Erken Öngörüsü**
Early Prediction Of Crohn's Disease Activity In Clinically Remission Patients
Günel Hasanova, Burcu Barutçuoğlu, Nalan Gülşen Ünal, Günes Ak, Ömer Özütemiz 140
- ♦ **Kan Gazı ve Serum Bikarbonat Değerleri Arasındaki İlişkinin Analizi**
Analysis of the Relationship Between Blood Gas and Serum Bicarbonate Values
Fatıma Betül Tuncer, Erdem Çokluk, Mehmet Ramazan Şekeroğlu, Fatma Özdemir, Meltem Boz 149
- İÇERİK 2019 (REGISTRY 2019) 157**

YAZAR DİZİNİ

A

Ak G, 140
 Akağaç A. E, 36
 Akarken İ, 42
 Aydınli M, 36

B

Baktır A. O, 120
 Barutçuoğlu B, 140
 Başaran N, 10
 Baykan Ö, 85
 Bilgihan A, 48
 Bilgili S, 29, 134
 Boz M, 149
 Bozkaya G, 29, 134

C - Ç

Can G, 36
 Cengiz D, 56
 Çakır I, 120
 Çakırca G, 79
 Çokluk E, 149

D - E

Diker O, 63
 Dikker O, 1
 Durmuşcan M, 1
 Ercan Ş, 108
 Erçin U, 48
 Erkan A. F, 48
 Evliyaoğlu O, 10

G - H - İ

Günay N. E, 70, 140
 Hasanova G, 140
 İpek B. Ö, 95

K - L

Kazetoğlu C, 23
 Korkmaz Ş, 126
 Köken T, 17

M

Mızrak S, 36

O - Ö

Oran A, 103
 Özdemir F, 149
 Özütemiz Ö, 140

S - Ş - T

Savaş V, 17
 Saydam G, 56
 Singer R, 1
 Sitar M. E, 95
 Sucu V, 1
 Sutaşır Y.T, 23
 Şahin M, 63
 Şahin S, 29
 Şekeroğlu M. R, 149
 Tuncay M. E, 111
 Tuncer F. B, 149

U - Ü

Uğurlu Ö, 134
 Uzuncan N, 29, 134
 Ünal N. G, 140

V - Y

Vardar M, 1
 Vurgun E, 10
 Yazıcı T, 79
 Yıldırım S, 10, 36
 Yılmaz M. F, 56
 Yılmaz S. E, 36
 Yücel H, 48

Z

Zengel B, 134
 Zorbozan N, 42

KONU DİZİNİ

Behçet Hastalığı, 2	Laboratuvar Bilgi Sistemleri, 11,80
D vitamini, 2, 85	Laboratuvar Kalite Göstergeleri, 11, 23, 80, 126
Demir Eksikliği Anemisi, 17,30	Laboratuvarda Maliyet Etkinlik, 17, 42
Dislipidemi, 64	Oksidatif Hasar, 48, 111, 134
Etanol analizi, 23	Prenatal Tarama Testleri, 70
Hepatit, 56	Protein Elektroforezi, 103
İnflamasyon belirteçleri, 120, 140	Talasemiler, 20, 36
İskemi Modifiye Albümin, 134	Tiroid Hormon Analizi, 95
Kalprotektin, 140	
Kan Gazı Analizi, 149	

YAZARLARA BİLGİ

Türk Klinik Biyokimya Dergisi, Türk Klinik Biyokimya Derneği'nin süreli yayın organıdır ve yılda üç sayı olarak yayınlanır. Dergi, klinik biyokimya alanında yapılmış araştırma, derleme yazıları, olgu sunumları ve editöre mektupları yayınlamayı amaçlar.

Derginin yayın dili Türkçe ve İngilizcedir. Türk Klinik Biyokimya Dergisi International Committee of Medical Journal Editors tarafından yayımlanan "Biyomedikal Dergilere Gönderilen Makalelerde Bulunması Gerekli Standartlara" uymaktadır (<http://www.icmje.org>). Gönderilen makaleler belirtilen standartları karşılamalıdır.

Dergide yayınlanmak üzere gönderilen yazıların başka yerde yayınlanmamış ve yayınlanmak üzere gönderilmemiş olması gerekir. Daha önce kongrede tebliğ edilmiş çalışmalar, bu durum belirtilmek koşulu ile kabul edilir. Yayın için gönderilmiş yazılarını, gecikme veya başka bir nedenle dergiden çekmek isteyenlerin bir yazı ile başvurmaları gerekir. Dergiye gönderilen yazılara telif hakkı ödenmez ve yazarlar yazının tüm yayın haklarının Türk Klinik Biyokimya Derneği'ne ait olduğunu kabul eder. Türk Klinik Biyokimya Dergisi makale başvurusu ve değerlendirilmesi için yazarlardan herhangi bir ücret talep etmez.

Yayın Kurulu yayın koşullarına uymayan yazıları yayınlamamak, düzeltmek üzere yazarına geri vermek, biçimce düzenlemek yetkisine sahiptir. Yayınlanmak üzere gönderilen yazılar en az iki danışman tarafından değerlendirildikten sonra yayınlanması uygun görülürse dergide basılır.

ETİK

Makale göndermeden önce, www.ease.org.uk/publications/author-guidelines adresinde farklı dillerde serbest ulaşılabilen *EASE kılavuzları* incelenmelidir. *Türk Klinik Biyokimya Dergisinde basılan makaleler etik kurallar çerçevesinde hazırlanmalıdır. Klinik araştırmalarda çalışma protokolü Helsinki Deklarasyonu kuralına uygun olarak hazırlanmalıdır* (<http://www.wma.net/en/30publications/10policy/es/b3/>). *Bütün çalışmalar için etik komite onayı alınmalıdır.*

Yazım Kuralları

Gönderilen yazıların işleme konulabilmesi için on-line gönderilmesi gerekmektedir. Elektronik posta ile gönderilen yazılar işleme alınmayacaktır. On-line makale gönderimi için www.tkbd.org adresinden dergi başlığına giriş yapılarak talimatlar izlenmelidir.

A. Araştırma yazıları sıra ile şu bölümlerden oluşmalıdır: Başlık sayfası, özet ve anahtar kelimeler, metin, teşekkür, kaynaklar, tablolar (her biri ayrı sayfada), şekiller için açıklamalar. Her bölüm yeni bir sayfada başlamalı ve sayfalar, başlık sayfasından başlayarak ard arda numaralandırılmalıdır.

1. Başlık sayfası: Yazının Türkçe ve İngilizce başlığı (harfler ve boşluklar dahil 90 karakterden fazla olmamak koşulu ile), yazarların soyadı, adı ve bağlı bulundukları kurum ve bölüm, tüm yazarların ORCID bilgisi (<https://orcid.org/> adresinden alınmalıdır) yazışmalardan sorumlu yazarın adı, soyadı ve tam iletişim adresi (iş adresi, telefon, GSM ve e-posta adresi) makalenin diğer sayfalarda da yer alacak olan kısa başlığı (harfler ve boşluklar dahil 40 karakterden fazla olmamak koşulu ile) ve eğer varsa araştırmayı destekleyen kurum ya da kuruluşun adı yer almalıdır. Yazı, kongrelerde sunulmuş ise bu sayfada belirtilmelidir.

2. Özet: Özet, araştırma yazıları için 250 kelimeyi aşmayacak şekilde Türkçe ve İngilizce olarak yazılmalıdır. Özet; Amaç, Gereç ve Yöntem, Bulgular ve Sonuç şeklindeki alt bölümleri içerecek şekilde düzenlenmelidir. Özetle, çalışmanın amacı, temel gereç ve yöntemler (olguların veya laboratuvar hayvanlarının seçimi, gözlemsel veya analitik yöntemler), ana bulgular (özgün veriler ve mümkünse istatistiksel anlamlılık) ve başlıca sonuçlar belirtilmeli; çalışmanın yenilik ve önem taşıyan yönleri vurgulanmalıdır. Özetle herhangi bir kısaltma kullanılmamalıdır. Anahtar kelimeler en az 2 adet olacak şekilde, Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. Kelimeler birbirlerinden noktalı virgül (;) ile ayrılmalıdır. İngilizce anahtar kelimeler "Medical Subject Headings (MESH)"e uygun olarak verilmelidir (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>). Türkçe anahtar kelimeler Türkiye Bilim Terimleri (TBT)'ne uygun olarak verilmelidir (<http://www.bilimterimleri.com>).

3. Metin: Giriş, gereç ve yöntem, bulgular ve tartışma bölümleri ardarda yazılabilir.

Giriş; çalışmanın amacı belirtilmelidir.

Gereç ve Yöntemler; gözlemsel veya deneysel olguların seçim (hastalar veya laboratuvar hayvanları) kriterleri açıklanmalı, yaş, cinsiyet belirtilmelidir. Yöntemler, kullanılan madde ve cihazlar (parentez içinde üretici adı ve adresi, şehir ve ülke adı olarak belirtilerek) ve yapılan işlemler diğer çalışmacıların tekrarlayabilme-

sine olanak sağlayacak şekilde açıklıkla anlatılmalıdır. Kullanılan tüm kimyasallar ve ilaçlar, jenerik isimleri, dozları ve veriliş yolu dahil, tanımlanmalıdır. Klinik ve deneysel çalışmalar için etik kurul görüşleri de bu bölümde belirtilmelidir. İstatistiksel yöntemler, gerektiğinde orijinal verilere ulaşan bir okuyucunun tekrarlayabilmesini sağlayacak şekilde ayrıntılı olarak tanımlanmalıdır. Bir genel bilgisayar programı kullanıldı ise belirtilmelidir.

Bulgular; metinde, grafiklerde ve tablolarda mantıklı bir sıra ile sunulmalıdır. Grafiklerde ve tablolarda yer alan tüm bulgular metinde tekrarlanmamalı, sadece önemli bulgular vurgulanmalı ve özetlenmelidir.

Tartışma; çalışmanın yeni ve önemli yönleri ve çıkarılan sonuçlar vurgulanmalıdır.

4. Teşekkür: Teşekkür bölümü, metnin sonuna eklenmeli ve bir paragrafı geçmemelidir.

5. Kaynaklar: Kaynaklar, metin içinde ilk kez belirtildikleri yere göre sıralanmalıdır. Kaynaklar, Arap rakamları (1, 2, 3,...) ile parantez içinde belirtilmelidir. Dergilerin isimlerinin kısaltılması, Index Medicus'ta belirtildiği şekilde yapılmalıdır. Yurt içinde yayınlanan Türkçe ve İngilizce dergilerin isimleri eğer varsa dergide belirtildiği şekilde kısaltılmalı veya tam olarak yazılmalıdır. Makalede bulunan yazar sayısı 6 veya daha az ise tüm yazarlar belirtilmeli, 7 veya daha fazla ise ilk 6 isim yazılıp "et al" eklenmelidir. Kongre bildirileri, kişisel deneyimler, basılmamış yayınlar, tezler ve internet adresleri kaynak olarak gösterilmemelidir. DOI tek kabul edilebilir on-line referans olmalıdır.

Kaynakların yazımı için örnekler (Noktalama işaretlerine dikkat edilmesi önemlidir):

Makale için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, makale ismi, dergi ismi, yıl, cilt, sayı, sayfa no'su belirtilmelidir.

Örnek: Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010;30(2):803-7.

Kitap için: Yazar(lar)ın soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, editörün(lerin) ismi, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Türkçe kitaplar için; Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Yazar ve editörün aynı olduğu kitaplar için; Yazar(lar)ın/editörün soyad(lar)ı ve isim(ler)inin başharf(ler)i, bölüm başlığı, kitap ismi, kaçınıcı baskı olduğu, şehir, yayınevi, yıl ve sayfalar belirtilmelidir.

Örnek: Yabancı dilde yayınlanan kitaplar için; Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Türkçe kitaplar için; Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etkin Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tablolar: Her tablo ayrı bir sayfaya çift aralıklı olarak yazılmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Romen rakamları (I, II, III, IV,...) ile işaretlenmeli ve tablo kapsamının kısa tanımı başlık olarak konmalıdır. Açıklamalar başlıkta değil dip notta yer almalıdır. Başka kaynaklardan veri alınmış ise izin alınmalı, kaynak dip not olarak belirtilmelidir. Tablo başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

7. Şekil ve resimler: Şekiller ve resimler konuyla doğrudan ilişkili olmalı ve metinde geçtiği sıraya göre Arap rakamları ile numaralandırılmalıdır. Daha önceden basılmış materyal veya olgu olarak alınan kişileri tanımlayan şekiller kullanılacaksa izin belgesi eklenmelidir. Şekil başlığı Türkçe ve İngilizce olmalıdır.

B. Derleme: Doğrudan veya davetli yazarlar tarafından hazırlanabilir. Toplam sayfa sayısı 15'i aşmamalıdır. Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) yanısıra verilerin saptanması, seçilmesi, ayrılması ve sentez edilmesi için kullanılan yöntemleri tanımlayan bir bölüm yer almalıdır.

C. Olgu sunumu: Toplam sayfa sayısı üçü geçmemeli, Türkçe ve İngilizce başlık, Türkçe ve İngilizce özet (en fazla 100 kelime) giriş, olgu sunumu, tartışma bölümlerini içermelidir.

D. Editöre Mektup: Daha önce yayınlanmış yazılara eleştiri ve katkı sağlamak amacı ile yazıldığından, özet içermemeli, kaynakları sınırlı olmalı, kısa ve öz olarak biçimlendirilmelidir.

INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Journal of Turkish Clinical Biochemistry is the official journal of Turkish Society of Clinical Biochemistry and is published three times a year. The journal welcomes original research articles, reviews, case reports and letters to the editor which are written in the field of clinical biochemistry.

Official languages of the journal are Turkish and English.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Manuscripts that are already have been published or under consideration for publication should not be submitted. If the works has been presented in previous congresses it should be mentioned. In order to withdraw a submitted manuscript the authors must apply with a written requisition. There is no payment for copyright and if the manuscript is accepted to be published by signing the Copyright Transfer Agreement authors agree to transfer all the copyright of the manuscript to the Turkish Society of Clinical Biochemistry. Journal of Turkish Clinical Biochemistry does not levy any charge to the authors at any stage of the publication process.

Editorial board may reject or make a change in style or send the manuscript to be revised. Submitted manuscripts are sent to at least two reviewers for evaluation. Depending on reviewers' comments manuscripts are accepted to be published.

ETHICS

Before submission, the EASE Guidelines for Authors and Translators, freely available in many languages at "www.ease.org.uk/publications/author-guidelines" must be followed. Articles published in the Turkish Journal of Clinical Biochemistry should be prepared according to ethical rules. The protocols of clinical studies must be in accordance with the principles of "Helsinki Declaration" (<http://www.wma.net/en/30publications/10policies/b3/>). For all the studies ethical committee approval should be taken.

MANUSCRIPT PREPARATION

All manuscripts should be submitted online at Turkish Society of Clinical Biochemistry web page (www.tkbd.org). No other form of submission is accepted.

A. Research articles: Must include title page, abstract, key words, main text, acknowledgement, references, tables and figures. Pages should be numbered starting with the title page.

1. Title Page: It should include the following information:

- full title of submission (both in Turkish and English), which should include only generic, not trade, names when describing a test, assay, etc.;
- running head of fewer than 65 characters (including spaces)
- list of all authors (first name, middle name and last name, in that order);
- names of each author's institution, an indication of each author's affiliation and ORCID number of each author (<https://orcid.org/>);
- name, address, telephone and e-mail address of the corresponding author;
- keywords (both in Turkish and English);
- any previous presentation of the manuscript;
- list of abbreviations, in order cited; and
- Research funding, financial support, or other disclosure/conflict of interest information

2. Abstract: Structured abstracts both in Turkish and English should be formatted to include separate headings of: Aim, Materials and Methods, Results, and Conclusions. Structured abstracts are subject to a limit of 250 words. The purpose of the study, materials and methods (design of the study, subjects/patients, analytical methods), main findings (statistical methods, if possible), and significance of the findings should be given. New and important observations or aspects of the study should be emphasized. No abbreviations should be used in this section.

Minimum 2 maximum 6 keywords should be provided both in Turkish and English. Keywords must be separated by a semi colon (;). For English keywords authors have to use terms from the Medical Subjects Headings list from Index Medicus <http://www.nlm.nih.gov/mesh/MBrowser.html>. For Turkish keywords, authors have to use terms from Türkiye Bilim Terimleri www.bilimterimleri.com

3. Main text: The body of the paper should include; Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion.

Introduction; The nature and purpose of the work must be stated clearly.

Materials and Methods; Clinical (patients/subjects), technical or experimental (animals etc.) procedures and sampling should be concisely explained. Age, gender and inclusion criteria should be included. For method descriptions full corporate names of manufacturers of materials should be utilized.

Ethical approval of the study should be mentioned here. Description of the statistical methods must enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results.

Results; Findings should be presented in a certain flow in the main text, tables and figures. Repeat of table/figure data should be avoided in the text.

Discussion; New and important observations or aspects of the study should be emphasized.

4. Acknowledgement: Acknowledgments are limited to one separate paragraph heading labeled "Acknowledgments" and should follow the main text of the manuscript.

5. References: Citations in the text should be identified by numbers in parenthesis with Arabic numerals (1,2,3...). The list of the references at the end of the paper should be given according to their first appearance in the text, listing all authors and using journal abbreviations as listed in Index Medicus. For articles with equal to or more than seven authors, list the first six authors followed by "et al." For fewer, list all authors.

Citations of abstract books, personal communications, unpublished manuscripts in preparation or under review and web pages should not appear in the reference list. For articles from electronic publications DOI number is accepted.

**All the references should be written according to the below examples:
(Punctuation is important):**

Articles from Journals:

Stephane A. Management of Congenital Cholesteatoma with Otoendoscopic Surgery: Case Report. Türkiye Klinikleri J Med Sci 2010; 30(2):803-7.

Books:

Underwood LE, Van Wyk JJ. Normal and aberrant growth. In: Wilson JD, Foster DW, eds. Williams' Textbook of Endocrinology. 1 st ed. Philadelphia: WB Saunders; 1992. p.1079-138.

Tür A. Acil Hava Yolu Kontrolü ve Endotrakeal Entübasyon. Şahinoğlu AH, editör. Yoğun Bakım Sorunları ve Tedavileri. 2. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri;2003. p.9-16.

Books which the author and editor is the same person:

Solcia E, Capella C, Kloppel G. Tumors of the exocrine pancreas. Tumors of the Pancreas. 2 nd ed. Washington: Armed Forces Institute of Pathology; 1997. p.145-210.

Eken A. Kozmesötikler: Kozmetiklerle İlaçlar Arası Ürünler. Eken A, editör. Kozmesötik Etken Maddeler. 1. Baskı. Ankara: Türkiye Klinikleri; 2006. p.1-7.

6. Tables: Tables should be numbered according to their first appearance in the text with Roman numerals (I, II, III, IV,...). Each table should appear on an individual page. Table headings should uniquely display the data and not repetition of information available either in the text and must be both in Turkish and English. Place explanatory matters (including permissions for use of others' data) in footnotes.

7. Figures and illustrations: They should be those which display the data and not repetition of information available either in the text or as a table. They should be numbered according to their first appearance in the text with Arabic numerals. If there is use of previously published material or cases describing patients, a copy of signed "**Informed consent form**" should be included during the submission. Figure headings should be both in Turkish and English.

B. Reviews: The journal is open to direct reviews from authors and "invited reviews". The total number should not exceed 15 pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. Reviews are intended to provide comprehensive coverage of a topic, including background clinical or analytical information, the relevance and importance of the subject matter, and potential future directions.

C. Case reports: The total number should not exceed 3pages. The title and abstract (maximum 100 words) should be both in Turkish and English. They should be structured as introduction, presentation of the case and discussion.

D. Letter to the Editor: Letters are submitted directly from authors in response or contribution to published articles only. It should not include an abstract. It should be concise and should have a limited number of references.

8. The declaration of the conflict of interest should mention at the end of manuscript.