

# İn Vitro Heparinin İyonize Kalsiyuma Etkisi ve Doz-Yanıt İlişkisi

## In Vitro Effects of Heparin on Ionized Calcium and Dose-Response Relation

Tuncay Küme\*

Gonca Küme\*\*\*

Burcu Çinkooğlu\*

Gül Ergör\*\*

Ali Rıza Şişman\*

Canan Çoker\*

\*Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir

\*\*Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Halk Sağlığı Anabilim Dalı, İzmir

\*\*\* Buca Seyfi Demirsoy Devlet Hastanesi Mikrobiyoloji Laboratuvarı, İzmir

### ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada in vitro heparinin iyonize kalsiyuma (iCa) kimyasal etkisinin değerlendirilmesi amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Bu çok basamaklı deneysel çalışmada serum örnekleri kullanılarak Nova CCX kan gazı cihazında iCa düzeyleri analiz edildi. İlk iki basamakta sıvı heparinle yıkanmış 1, 2, 5 ve 10 ml enjektörlere ve kuru heparin içeren vakumlu tüp, kan gazı enjektörü, dengelenmiş kan gazı enjektörlerine azaltılmış hacimde örnek çekilerek heparinin iCa düzeyinde yaptığı yüzde değişim saptandı. Son iki basamakta ise 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39, 20, 10, 5, 2, 1 IU/ml heparin içeren serum havuzlarının iCa düzeylerindeki yüzde değişim saptanarak doz- yanıt ilişkisi ve son konsantrasyonu 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 mM potasyum (K) ve magnezyum (Mg) eklenerek diğer katyonların doz yanıt ilişkisine etkisi belirlendi.

**Bulgular:** Sıvı heparin içeren enjektörlere 10, 5, 2, 1, 0.5 ml ve kuru heparin içeren örnek 19 kaplarına 2, 1, 0.5 ml azalan hacimde örnek çekiminde gruplar arasında iCa yüzde değişimlerinde istatistiksel fark saptandı ( $p < 0.05$ ). Heparin konsantrasyonu-iCa yüzde değişim (doz-yanıt) eğrisinin negatif hiperbolik, log doz-yanıt eğrisinin negatif sigmoidal olduğu saptandı. 10 mM K eklenmesi eğrisiyi paralel olarak sola kaydırdı, 10 mM Mg eklenmesi ise eğri eğiminin artmasına sebep oldu.

**Sonuç:** Bu önçalışma ile heparinin iyonize kalsiyuma in vitro doz-yanıt ilişkisini ortaya koyarak özellikle kan gazı analizleri açısından- elektrolit ölçümünde heparinin kimyasal interferansının çözümünde yol açıcı olacağına inanıyoruz.

**Anahtar Sözcükler:** Kan gazı analizi; kan örneği alma; kalsiyum; heparin; iğneler; enjektörler

### ABSTRACT

**Objective:** We aimed to evaluate the chemical effect of heparin on ionized calcium (iCa). In this multi-step experimental study, we analyzed serum samples with Nova CCX blood gas analyzer.

**Materials and Methods:** In the first two steps, we calculated the percent changes of iCa in samples with decreased volumes, suctioned into the 1, 2, 5 and 10 ml syringes washed with liquid sodium heparin and into evacuated tubes, blood gas syringes, electrolyte balanced blood gas syringes with dry lithium heparin. In the last two steps, we determined a dose-reponse relation via calculating percent changes of iCa in serum pool samples containing 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39, 20,

10, 5, 2, 1 IU/ml of heparin and effects of cations on dose-response relation by adding potassium (K) and magnesium (Mg) at 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2, 1 mM concentrations.

**Results:** Statistical differences in percent changes of ionized calcium were obtained between groups of samples of 10, 5, 2, 1, 0.5 ml volumes with syringes washed with liquid heparin and groups of samples of 2, 1, 0.5 ml volumes with containers containing dry heparin ( $p < 0.05$ ). A negative hyperbolic dose-response (heparin – percent changes in iCa) curve and a negative sigmodal log dose-response curves were concluded. The log dose - response curve was shifted to left with adding of K of 10 mM, and the curve slope increased with adding of Mg of 10 mM.

**Conclusion:** Owing to the results of this preliminary study, we think that in vitro dose - response relation of heparin and percent changes in iCa will help us to find a solution for the chemical interference of heparin on electrolyte measurements in blood gas samples.

**Key Words:** Blood gas analysis; blood specimen collection; calcium; heparin; needles; syringes

## GİRİŞ

İyonize kalsiyum (iCa); kalsiyumun dolaşımdaki düzeyinin yaklaşık yarısını oluşturan, metabolik olarak aktif ve proteinlere bağlı olmayan serbest formudur. Dolaşımdaki iyonize düzey, total düzeyden daha iyi bir gösterge olduğundan klinik açıdan daha yararlı parametredir. Bu nedenle klinisyenler tarafından, özellikle kritik hastaların izlemi veya tedavisini değerlendirmek amacıyla istem yapılır (1,2). Günümüzde klinik laboratuvar rutin uygulamalarında iCa konsantrasyonu; heparinlenmiş tam kan örneklerinde, diğer test parametreleriyle birlikte (pH, kan gazları (pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>), elektrolitler (Na, K, iCa, iMg), metabolitler (glukoz, laktat)), iyon selektif elektrot potansiyometri yöntemiyle kan gazı cihazlarında ölçülür (3-5).

Heparin, molekül ağırlığı 3 000-100 000 D arasında değişen düz zincirli anyonik bir mukopolisakkarittir. Tekrarlayan disakkaritlerin birbirlerine glikozidik bağlarla bağlanması ile çeşitli büyüklükte polimerler oluşur. Monosakkaritlerin her birindeki sülfatlanmış hidroksil grupları nedeniyle, polimerler kuvvetli negatif yüklüdür. Üç D-glukozamin ve iki üronik asit birimlerini içeren özgün pentasakkaridik dizinin antitrombin III ile bağlanması nedeniyle antikoagülan aktivite gösterir. Bu nedenle heparin, tıpta in vivo ve in vitro antikoagülan olarak kullanılır (6,7).

Klinik laboratuvarlarda heparin, plazma ve tam kan örnekleri elde edilmesinde antikoagülan olarak in vitro numune kaplarına

eklenir (8). Sitrat, okzalat, etilendiamintetraasetik asit (EDTA) gibi kalsiyumu bağlayarak etki gösteren antikoagülanlara göre; trombin aktivitesini inhibe ederek etki gösteren heparin, iCa ölçümleri için diğerlerine nispeten uygun tek antikoagülan olduğu kılavuzlarda yeralmaktadır. Fakat preanalitik basamakta antikoagülan olarak kullanılan heparinin de, iCa' u bağlayarak düşürdüğü bildirilmiştir (9-14).

Preanalitik basamakta kan gazı örnek alınımında kullanılan çeşitli uygulamalarda antikoagülan olarak heparinin kullanılması; sıvı formundan kaynaklanan dilüsyonel, serbest katyonları bağlamasından kaynaklanan kimyasal veya heparin tuzlarının kontaminasyonundan kaynaklanan bileşimsel etkilerin değişik derecelerde kombinasyonuna sebep olduğu bildirilmiştir (10,11). Kuru formda heparinin kullanılması dilüsyonel ve lityum tuzu kullanılması bileşimsel etkiyi çözmeye rağmen, heparinin kimyasal etkisi tam olarak çözülmemiş bir problemdir (15-22). Son zamanlarda ticari üretilen elektrolitle dengelenmiş kan gazı enjektörlerindeki beklenmeyen uyumsuzlukların saptanması heparin interferansını tekrar gündeme oturtmuştur (21,22).

Heparinin iCa ölçümü üzerine kimyasal etkisi; kan gazı örnek alınımında kullanılan çeşitli uygulamalarda son heparin konsantrasyonunun (SHK) değişmesine bağlı olduğu düşünülür. Fakat bu etkinin SHK ile ilişkili olmadığı ve bu ilişkiyi diğer kan katyonlarının değiştirebileceği bildirilmiştir (23,24). Bu çalışmada;

i) sıvı heparinli, ii) kuru heparinli değişik örnek alım uygulamalarına azaltılmış hacimde örnek alımının, iii) son heparin konsantrasyonunun ve iv) diğer kan katyon konsantrasyonlarının iCa ölçümüne etkisi değerlendirildi.

## GEREÇ VE YÖNTEM

### Kullanılan Materyaller, Örnekler ve Cihazlar

Kliniklerde sıklıkla bulunan ve kullanılan dört farklı tipte (1, 2, 5 ve 10 ml tek kullanımlık plastik enjektörler (Hayat Tıbbi Malzeme San. ve Tic. AŞ, İstanbul, Türkiye), 2 ml lityum heparinli vakumlu tüpler (Becton Dickinson, İngiltere), 3 ml'lik kan gazı enjektörleri (Plasti-med, İstanbul), 3 ml'lik kalsiyumla titre edilmiş kan gazı enjektörleri (Becton Dickinson, İngiltere) kullanıldı. Enjektörler 5000 U/ml sodyum heparin solusyonu içeren "Nevparin flakon" (Mustafa Nevzat İlaç Sanayi AŞ, İstanbul, Türkiye) kullanılarak yıkandı. Kuru heparin olarak "Heparin, Sodium Salt, Porcine Intestinal Mucosa" (375095, Calbiochem, ABD) kullanıldı. Katyon çözeltilerini hazırlamak için potasyum klorür (KCl) (P-4504, Sigma, ABD) ve magnezyum klorür ( $MgCl_2$ ) (M1028, Merck, Almanya) kullanıldı.

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi merkez laboratuvarında analizi tamamlanan düz tüpe alınan kan örneklerinden serum havuzu hazırlandı. Soğuk ortamda ( $+4C^\circ$ ) ve ağız kapalı olarak saklanan örneklerin aynı gün tüm analizleri tamamlandı. Çalışma için merkez laboratuvar yönetiminden örnek kullanım izni sağlandı. Örnek sahibi hastaların kimlik ve tıbbi kayıtları kullanılmadı, ilave kan örneği alınmadı ve hastalarla görüşülmedi.

Serum örneklerinde iCa analizi, iyon selektif elektrot potansiyometri yöntemi ile Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı acil biriminde bulunan Nova Critical Care Xpress (Nova Biomedical, Waltham, MA, ABD) kan gazı cihazında üretici firma önerilerine göre yapıldı. Günlük rutininde uygulanan "Stat Profile Control" (Nova Biomedical, Waltham, MA, ABD) kalite kontrol materyelleri ile kalite kontrol uygulandı.

### Çalışma Tasarımı

Bu çok adımlı deneysel çalışma 1 Haziran-15 Ağustos 2012'da Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında (İzmir, Türkiye) yapıldı.

1. Adım: Sıvı heparinle yıkanmış plastik enjektörlere azaltılmış hacimde örnek alımının iCa ölçümüne etkisinin belirlenmesi:

Klinik rutindeki kan gazı örneği alınma modelini oluşturmak için tek kullanımlık plastik enjektörler ölçeğinin sonuna kadar heparin çözeltisiyle dolduruldu ve tamamen boşaltıldı. Bu işlem 2 kez yapılarak enjektör ve iğne iç cidarının heparinle yıkanması sağlandı. Tüm enjektörler yıkandıktan sonra, değişik örnek hacimlerinin etkisini saptamak için 1 ml enjektöre 0.5 ve 1 ml; 2 ml enjektöre 0.5, 1 ve 2 ml; 5 ml enjektöre 0.5, 1, 2 ve 5 ml; 10 ml enjektöre 0.5, 1, 2, 5 ve 10 ml hacimlerde serum çekildi.

2. Adım: Kuru heparinli değişik örnek alım araçlarına azaltılmış örnek alımının iCa ölçümüne etkisinin belirlenmesi:

Kuru heparinli değişik örnek alım şekillerinin etkisini saptamak için, 2 ml lityum heparinli vakumlu tüplerine, 3 ml kan gazı enjektörlerine ve 3 ml'lik kalsiyumla dengelenmiş kan gazı enjektörlerine 0.5, 1 ve 2 ml hacimlerde serum çekildi.

Birinci ve ikinci adımda bazal ölçüm için ayrıca yıkanmamış ve boş enjektörlere serum çekildi. Daha sonra hazırlanan örnekler, enjektör ve tüplerin kapakları kapatılarak anaerobik koşulların sağlandığı soğuk ortam ( $+4C^\circ$ ) koşullarında bekletildi. Analizden önce örnekler 10-15 saniye homojenize edildi. Bazal ve tek deney setinden oluşan 10'ar adet örnek grupları birlikte kan gazı cihazında analiz edildi. Her gruptaki örneklerin analizleri olası en kısa sürede (yaklaşık 15-20 dk içinde) tamamlandı. Daha sonra iCa'un bazalden yüzde değişimi şu formülle hesaplandı:

iCa yüzde değişimi = ((Deneysel örnek iCa konsantrasyonu (mmol/L) – Bazal örnek iCa konsantrasyonu (mmol/L)) / Bazal örnek iCa konsantrasyonu (mmol/L)) x 100

3. Adım: Örnekteki son heparin konsantrasyonunun iCa ölçümüne etkisinin belirlenmesi:

Son heparin konsantrasyonunun etkisini saptamak için, 5 000 IU/ml sıvı heparin çözeltisine 35 000 IU/ml (240 mg) kuru heparin eklenerek elde edilen 40 000 IU/ml sodyum heparinden hazırlanan seri heparin çözeltileri 1:2 oranında serum havuzu porsiyonlarına eklenerek son heparin konsantrasyonu 40000, 20000, 10000, 5000, 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39, 20, 10, 5, 2, 1 IU/ml olacak şekilde örnekler hazırlandı. Bazal ölçüm için ise serum havuzu porsiyonlarına 1:2 oranında saf su eklendi. Bazal ve tek deney setinden oluşan örnekler duplike olarak analiz edildi. Daha sonra iCa yüzde değişimi yukarıdaki formüle göre hesaplandı.

4. Adım: Örnekteki diğer katyon konsantrasyonlarının iCa ölçümüne etkisinin belirlenmesi:

Diğer kan katyonlarının etkisini saptamak için; hazırlanan katyon çözeltilerinden (KCl ve MgCl<sub>2</sub>) son K ve Mg konsantrasyonu 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 mmol/L olacak şekilde örnekler hazırlandı ve heparin konsantrasyonu 2500, 1250, 625, 313, 156, 78, 39, 20, 10, 5, 2, 1 IU/ml serum havuzlarına eklendi. Bazal ve tek deney setinden oluşan örnekler duplike olarak analiz edildi. Daha sonra iCa yüzde değişimi yukarıdaki formüle göre hesaplandı.

### **Deneysel Metodolojinin Geçerliliği**

#### **Serum kullanımının geçerliliği**

Serum ve heparinli tam kan örnekleri için geri kazanım deneyleri uygulandı. Bunun için 1:10 oranında saf su eklenmiş bazal ve 10 mmol/L iCa içeren elektrolit çözeltisi eklenmiş test örnekleri hazırlandıktan sonra duplike olarak analiz edildiler. +4 C'de 15 dk bekletilen ve 1200 g 10 dk santrifügasyon sonrası elde edilen serum örneğinin geri

kazanımı %102, 40 IU/ ml heparin içeren kar gazı enjektörüne alınan tam kan örneğinin geri kazanımı %90 olarak saptandı. Bu değerler Rilibak'ın önerdiği total izin verilen hata (TEa) %15 limitleri içindedir.

Buna göre tam kan yerine çalışma kolaylığı sağlayan serumun kullanılabileceğine karar verildi.

#### **Kan gazı ölçümlerinin geçerliliği**

iCa ölçüm yönteminin geçerliliği ISO 15189: 2007 standardı gerekliliklerine göre yapıldı. Bunun için iCa testinin "bias" (%) ve "coefficient variation (CV)" (%) belirlendikten sonra, testin toplam hatası (TE) "TE = %Bias + (1.65 x %CV)" formülünden hesaplandı. RİLİBAK'ın izin verilen hata değerinden düşük olduğu saptanarak yöntem geçerliliği onaylandı (TEiCa = %7.5 + (1.65 x %1.9) = 10.6; TEiCa = 10.6 < TEa = %15).

#### **İstatistiksel Analiz**

Deneylerden elde edilen veriler "PASW Statistics or Windows 18.0" (IBM Corporation, NY, ABD) ticari istatistik programıyla analiz edildi. Verilerin dağılımı Kolmogorov-Smirnov testi ile değerlendirildi. Normal dağılıma uyan veriler için grupların karşılaştırılmasında "one way ANOVA" testi ve farklılığa sebep olan grupların testpitinde posthoc analizlerde "Bonferoni" testi kullanıldı. Bu veriler "ortalama±SD" olarak gösterildi. Heparin konsantrasyonu ile iCa yüzde değişimi arasındaki ilişkiyi belirlemek için "linear regresyon" analizi kullanıldı. İstatistiksel olarak p değerinin 0.05'den küçük olduğu sonuçlar anlamlı kabul edildi.

#### **BULGULAR**

1. Sıvı heparinle yıkanmış plastik enjektörlere azaltılmış hacimde örnek alımının iCa ölçümüne etkisi:

iCa ölçümünde yüzde değişim; 1 ml enjektöre 0.5, 1 ml örnek çekiminde sırasıyla -%33±8, -%15±5; 2 ml enjektöre 0.5, 1, 2 ml örnek çekiminde -%47±6, -%34±3, -%21±2;

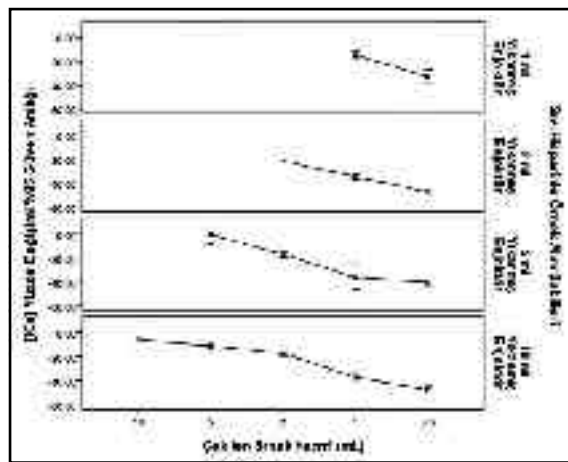
5 ml enjektöre 0.5, 1, 2, 5 ml örnek çekiminde  $-%40 \pm 6$ ,  $-%36 \pm 13$ ,  $-%17 \pm 4$ ,  $-%10 \pm 4$ ; 10 ml enjektöre 0.5, 1, 2, 5, 10 ml örnek çekiminde  $-%48 \pm 6$ ,  $-%37 \pm 5$ ,  $-%11 \pm 2$ ,  $-%6 \pm 1$  olarak saptandı. Enjektörlere değişik hacimde örnek çekimlerinde, iCa yüzde değişimlerinde gruplararası istatistiksel fark saptandı ( $p < 0.05$ ).

2. Kuru heparinli değişik örnek alım araçlarına azaltılmış örnek alımının iCa ölçümüne etkisi:

Kuru heparinli 2 ml kan alım kapları ile yaptığımız çalışmada; 0.5, 1, 2 ml örnek çekiminde iCa ölçümünde yüzde değişim sırasıyla lityum heparinli tüpte  $-%16 \pm 3$ ,  $-%10 \pm 1$ ,  $-%9 \pm 7$ ; kuru lityum heparinli enjektörde  $-%5 \pm 4$ ,  $-%2 \pm 1$ ,  $-%1 \pm 1$  ve dengelenmiş kuru lityum heparinli enjektörlerde  $-%6 \pm 2$ ,  $-%5 \pm 1$ ,  $-%3 \pm 1$  olarak saptandı. Örnek kaplarına değişik hacimde örnek çekimlerinde, gruplararası iCa yüzde değişimlerinde, istatistiksel fark saptandı ( $p < 0.05$ ).

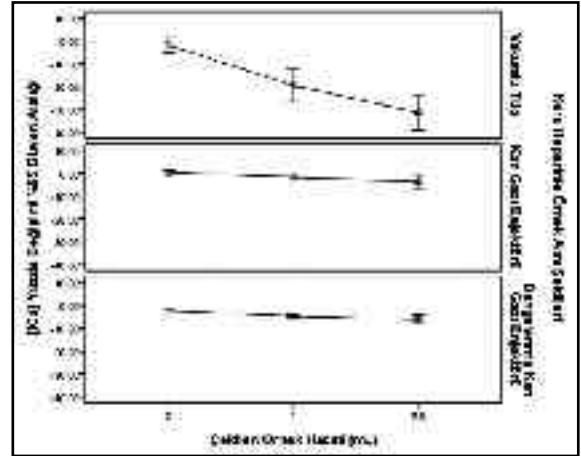
3. Son heparin konsantrasyonunun iCa ölçümüne etkisi:

Artan SHK karşı iCa yüzde değişimi Şekil 3'de gösterilmiştir. Heparin konsantrasyonu aritmetik ölçekte iken negatif hiperbolik eğri oluşurken, logaritmik ölçekte iken negatif sigmoidal eğri oluştu. Logaritma doz (U/ml) – yanıt (yüzde) grafiğinde üç aşamalı kinetik gözlemlendi: Sigmoidal eğrinin 1. ve 3. bölge-

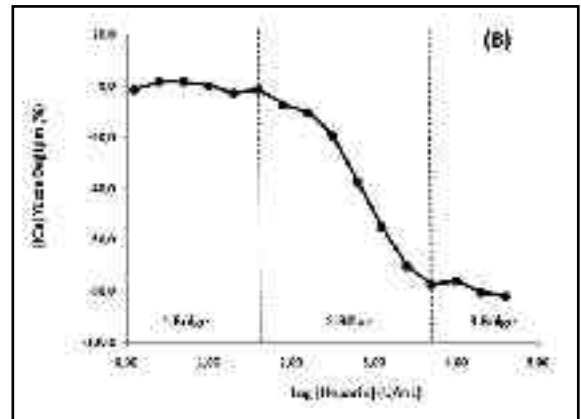
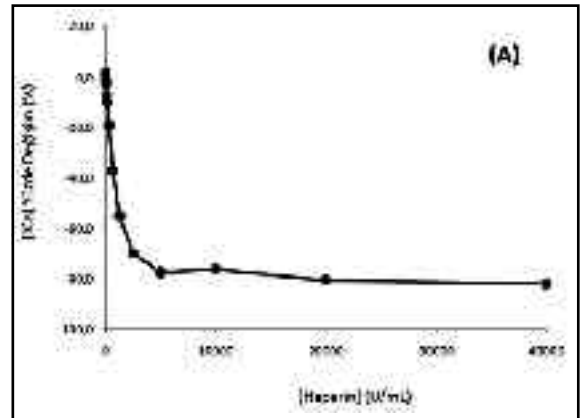


Şekil 1. Sıvı heparinle değişik örnek alım şekillerinin iCa'ya etkisi.

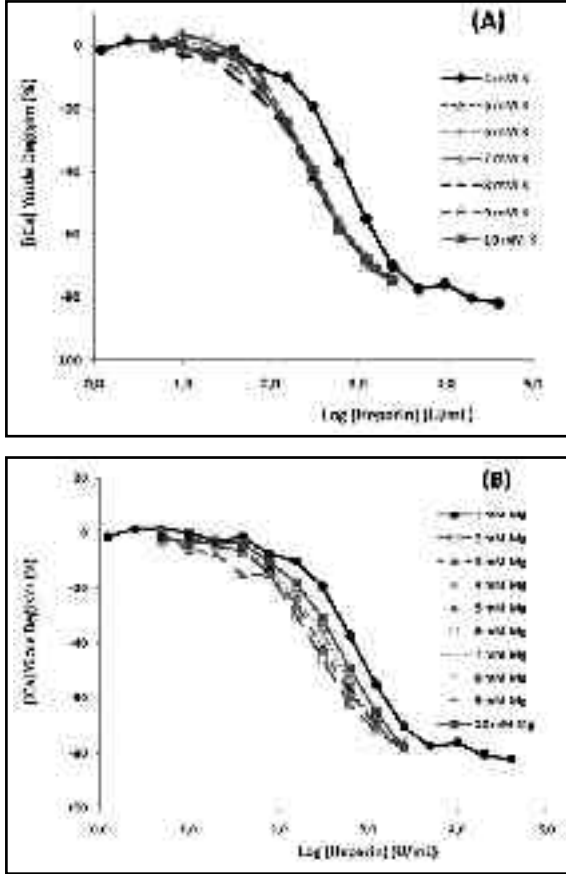
sinde plato veya yavaş bir düşüş görüldü. Eğrinin 2. bölgesinde ise daha hızlı linear bir düşüş görüldü. Bu eğrinin denklemi ise "(iCa) yüzde değişim =  $-44.57 \cdot \log(\text{heparin}) + 85.11$ " idi. Sabit (eğri kesişimi) ve x katsa-



Şekil 2. Kuru heparinle değişik örnek alım şekillerinin iCa'ya etkisi.



Şekil 3. Heparin konsantrasyonu – iCa etkisi ilişkisi. Heparin konsantrasyonu A'da aritmetik ölçekte iken hiperbolik eğri oluştururken, B'de logaritmik ölçekte sigmoid eğri oluşturdu.



**Şekil 4.** K ve Mg'un log. heparin konsantrasyonu – iCa yüzde değişimi ilişkisine etkisi. A'da 10 mM K'un ve B'de 10 mM Mg'un eklenmesi sigmodal eğriyi sola kaydırır.

- Fizyolojik koşullarda doz-yanıt eğrisi,
- 10 mM katyon eklenmiş doz-yanıt eğrisi.

yısı (eğri eğimi) istatistiksel olarak anlamlı olduğundan lineer bir ilişki olarak değerlendirildi ( $r=0.978$ ,  $p<0.001$ ).

4. Diğer katyon konsantrasyonlarının iCa ölçümüne etkisi:

Son konsantrasyonu 10 mM K ve 10 mM Mg olan örneklerde logaritma doz yanıt eğrisinin sırasıyla denklemi " $iCa$  yüzde değişim =  $-43.52 \cdot \log(\text{heparin}) + 68.83$ " ve " $iCa$  yüzde değişim =  $-47.52 \cdot \log(\text{heparin}) + 84.11$ " saptandı ve istatistiksel olarak lineer ilişki olarak değerlendirildi ( $r=0.992$ ,  $p<0.001$ ;  $r=0.995$ ,  $p<0.001$ ). Eğri eğimleri değerlendirildiğinde K eklenmesi serum havuzlarında logaritma doz - yanıt eğrisini fizyolojik koşullara göre paralel olarak sola kaydırırken, Mg eklen-

mesinin eğimin yükselmesine (hızlı düşüşe) sebep olduğu görüldü.

## TARTIŞMA

Heparinin kimyasal etkisi, yapısından kaynaklanan özelliklerine bağlıdır. Heparin negatif yüklü karboksil (COO-) ve sülfat (SO<sub>4</sub>-) gruplarından kaynaklanan güçlü anyonik polielektrolit özelliği ile mikro-katyonları (katyonik metal iyonları, katyonik boyalar gibi) ve makro-katyonları (polikatonik peptit ve proteinler gibi) bağlar (24). Heparinin in vitro kan gazı örneklerindeki serbest katyonları bağlaması, bu parametrelerin hatalı düşük ölçülmesine sebep olur. Heparinin katyon bağlaması örnekteki SHK ile orantılı olduğu düşünüldüğünden, genellikle heparinin kimyasal etkisi bu belirteç ile değerlendirilir.

Bu çalışmada heparinin kimyasal etkisini değerlendirmek için; miktar kısıtlılığı (yeterli tekrarda denemeler yapmak için gereken miktarda örneğin gönüllülerden temin zorluğu), hemoliz interferansı (soğuk zincir, bekleme veya doğrudan katyonik çözeltiler etkisiyle hücrelerin yıkılması) ve karışma zorluğu (vertikal ile horizontal iki yönde ve yeterli süre karıştırmak gerekliliği) gibi sebeplerle deneysel çalışmalarını gerçekleştirebilmek için tam kan yerine serum kullanıldı. Ayrıca plazma ve tam kandan farklı olarak serumun heparin içermeyen örnek olması da heparinin etkisini değerlendirme kolaylığı sağlandı. Bu çalışmanın ilk iki adımında değişik kan gazı örnek alımı uygulamalarında; daha az örnek çekerek örnekteki SHK'daki artışa bağlı iCa'daki düşmenin korelasyonunun test edilmesi amaçlandı. Birinci adımda kan gazı analizi için günümüzde bazı hastaneler ve kliniklerde –kendi hastanemiz de dahil- ekonomik veya geleneksel sebeplerle tercih edilen sıvı sodyum heparinle yıkanmış plastik enjektörlere heparinize kan alımı test edildi. Sıvı heparinle kan gazı örnek alımında çekilen örnek hacmine bağlı olarak hem dilüsyonel hem de kimyasal etkinin kombinasyonuna bağlı iCa değerlerinde düşme

gözlenir. Bu kombine etkiyi gravimetrik yöntemle enjektörlerin ölü boşluk hacimlerini ölçerek, sıvı heparinin sebep olduğu yüzde dilüsyon oranları (YDO, dilüsyonel etki) ve son heparin konsantrasyonları (SHK, kimyasal etki) hesaplanarak saptanmıştı (25). Bu çalışmada da iCa testi için; 1, 2, 5, 10 ml-enjektörlere toplam kapasitesinin altında örnek çekiminde YDO ve SHK\_daki artışa bağlı iCa değerlerinde düşme saptandı. Bu sonuçları daha önce sadece 10 ml- enjektörlere alınan tam kan örneklerinde yaptığımız çalışma ile uyumludur.

Heparinin kimyasal etkisinin en aza indirilmesi için temel şart, örnekte pıhtılaşmayı sağlayacak en düşük SHK'nun (<10 IU/ml) sağlanmasıdır. Fakat bu durum heparinle iyi karışmama nedeniyle pıhtı oluşumu riskine sahiptir. Bu nedenle IFCC ayrı örnek kapları için optimum konsantrasyonda (en az kimyasal etki - en fazla antikoagülan etki) - tüplerde 15 IU/ml, enjektörlerde 40 IU/ml ve kapiller tüplerde 50 IU/ml- heparin konulmasını tavsiye eder. Ayrıca heparinin kimyasal etkisini bertaraf etmek için üretilen kan gazı enjektörlerinde, örnekteki heparinin çeşitli katyonlarla doyurulması (elektrolit dengeli enjektörler) veya başka metallerle iCa bağlanma bölgelerinin kapatılması (çinko heparinli veya çinko lityum heparinli enjektörler) kimyasal etkisini gidermede kullanılan iki temel stratejidir. Daha sonraları çinkonun albumin-kalsiyum etkileşimini bozarak pozitif biasa sebep olduğunun saptanması üzerine bu tip enjektörler terkedilmiştir. Çalışmanın ikinci adımında; rutin kan gazı örnek alımında heparinin kuru ve lityum tuzu formunun kullanıldığı diğer uygulamalar test edildi. Hacmi 2-3 ml'lik kan alım kapları ile yaptığımız çalışmada, iCa ölçümü için lityum heparinli tüp, kuru lityum heparinli ve dengelenmiş kuru lityum heparinli enjektörlerle kan alımında da azalan örnek hacimlerinde iCa değerlerinde düşme saptandı. Böylece çalışmanın ilk iki adımında sıvı ve kuru heparinle örnek hacimleri azaltılmış kan alım uygulamalarında SHK

artışına bağlı olarak iCa seviyelerinde düşme gözlemlendi. Son iki adımda ise heparinin doz-yanıt (interferant - interferans) ilişkisini ve bunu etkileyen faktörlerin incelenmesi amaçlandı.

Heparinin iCa ölçümüne etkisi örnekteki SHK'nun bir fonksiyonudur. Ama in vitro heparin interferansında, doz (eklenen interferant konsantrasyonu) - yanıt (analitik interferans yüzdesi) ilişkisi çok iyi bilinmemektedir. Üçüncü adımda heparin tasarrufu amacıyla 1:2 oranında dilüe edilerek serum bileşimi düşürülerek heparinin doz- yanıt ilişkisi saptandı. İn vitro heparinin iCa ölçümünde; doz-yanıt ilişkisinin negatif hiperbolik eğri; log doz-yanıt ilişkisini negatif sigmodal bir eğri olduğu saptandı. Bu interferans kinetiğinde; 1. bölge heparinin örnekte dağılımı ile in vitro spesifik veya nonspesifik bağlanma bölgelerini (mikro- (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup> gibi serbest plazma katyonlarına) ve makro-katyonları (ulaşılabilir bazik aminoasite sahip plazma proteinleri)) doyurmasına bağlıdır. Bu fazda etki yoktur veya minimaldir (izin verilen hatayı aşmamış). 2. Bölge ise heparinin artan konsantrasyonuna karşılık plazmadaki serbest kalsiyumu (ki bu iCa'dur) bağlamadaki artışa bağlı oluşur. İn vivo ilaç doz yanıt eğrisinden farklı olarak elimine edilemeyen heparin örnekteki sınırlı iCa ve diğer katyonları tümünü bağlayıncaya kadar süreceğini düşünürken en fazla iCa %80'lik düşme saptandı. Bu çalışmadaki kısıtlılıklar nedeniyle yüksek konsantrasyonları test edilemedi. Literatürde heparinin diğer katyonlardan farklı olarak iCa ile bağlanmasının, biyolojik aktivitesi için yapısında halkalaşmasını engellemesi ve konformasyonel değişiklikleri sağlayan bir spesifik bir mekanizma olduğu da ileri sürülmektedir (7,24).

Dördüncü adımda ise heparinin iCa bağlanmasını etkileyen faktörleri inceledik. Heparin güçlü anyonik yapısı nedeniyle örnekteki tüm serbest ve ulaşılabilir katyonik yapılarla birleşir. Örnekteki diğer katyonların konsantras-

yonu yükseldikçe heparinin iCa bağlaması azalacak ve doz yanıt eğrisinin sağa kayacağı öngörülüyordu. Fakat diğer katyonların konsantrasyonlarındaki yükselme doz-yanıt eğrisinin sola kaymasına; dolayısıyla heparinin iCa kimyasal etkisinin artmasına sebep oldu. Bu sonuç, ölçüm yöntemindeki (elektrodun selektivitesi, iyonik güç) veya örnekteki (Ca proteinle bağlanması) değişikliklere bağlı olduğunu düşünülmektedir. Bu etkinin sebebini açıklayabilmek için daha ileri çalışmalar gerekmektedir.

Sonuç olarak klinik laboratuvarlarda interferans önemli ve çözümü güç bir sorundur. Örnekteki interferantların sebep olduğu interferansın, ilaçların doz-yanıt ilişkisi modeline göre değerlendirilmesi interferansın daha iyi anlaşılmasına sebep olacaktır. Bu ön çalışma ile in vitro doz-yanıt ilişkisini ortaya koyarak özellikle kan gazı analizleri açısından elektrolit ölçümünde heparinin kimyasal interferansının çözümünde yol açıcı olacaktır.

#### KAYNAKLAR

1. Baird GS. Ionized calcium. Clin Chim Acta 2011; 412(9-10): 696-701.
2. Zaloga GP, Chernow B, Cook D, Snyder R, Clapper M, O'Brian JT. Assessment of calcium homeostasis in the critically ill surgical patient. The diagnostic pitfalls of the McLean-Hastings nomogram. Ann Surg 1985; 202(5): 587-94.
3. Ladenson JH, Bowers GN Jr. Free calcium in serum. I. Determination with the ion-317 specific electrode, and factors affecting the results. Clin Chem 1973; 19(6): 565-74.
4. Bowers GN Jr, Brassard C, Sena SF. Measurement of ionized calcium in serum with ion-selective electrodes: a mature technology that can meet the daily service needs. Clin Chem 1986; 32(8): 1437-47.
5. Burritt MF. Current analytical approaches to measuring blood analytes. Clin Chem 1990; 36(8 Pt 2): 1562-6.
6. Gunay S, Linhardt R. Heparanoids: Structures, Biological Activities and Therapeutic Applications. Planta Med 1999; 65(4): 301-6.
7. Hirsh J, Anand SS, Halperin JL, Fuster V. Guide to anticoagulant therapy: Heparin: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. Circulation 2001; 103(24): 2994-3018.
8. Use of Anticoagulants in Diagnostic Laboratory Investigations: World Health Organization, Geneva, Switzerland, 2002.
9. Narayanan S. The preanalytic phase. An important component of laboratory medicine. Am J Clin Pathol 2000; 113(3): 429-52.
10. CLSI Document C46-A. Ionized Calcium Determinations: Pre-collection Variables, Specimen Choice, Collection, and Handling; Approved Guideline: CLSI, 2001.
11. Boink AB, Buckley BM, Christiansen TF, Covington AK, Maas AH, Muller-Plathe O, et al. International Federation of Clinical Chemistry (IFCC) Scientific Division. IFCC recommendation--recommendation on sampling, transport and storage for the determination of concentration of ionized calcium in whole blood, plasma and serum. Clin Chim Acta 1991; 202(1-2): 13-21.
12. Dimeski G, Badrick T, John AS. Ion Selective Electrodes (ISEs) and interferences--a review. Clin Chim Acta 2009; 411(5-6): 309-17.
13. Bowen RA, Hortin GL, Csako G, Otanez OH, Remaley AT. Impact of blood collection devices on clinical chemistry assays. Clin Biochem 2009; 43(1-2): 4-25.
14. Higgins C. The use of heparin in preparing samples for blood-gas analysis. MLO Med Lab Obs 2007; 39(10): 16-8.
15. Urban P, Buchmann B, Scheidegger D. Facilitated determination of ionized calcium. Clin Chem 1985; 31(2): 264-6.
16. Swanson JR, Heeter C, Limbocker M, Sullivan M. Bias of ionized calcium results from blood gas syringes. Clin Chem 1994; 40(4): 669-70.
17. Toffaletti J, Ernst P, Hunt P, Abrams B. Dry electrolyte-balanced heparinized syringes evaluated for determining ionized calcium and other electrolytes in whole blood. Clin Chem 1991; 37(10 Pt 1): 1730-3.
18. Muller-Plathe O, Heyduck S. Stability of blood gases, electrolytes and haemoglobin in heparinized whole blood samples: influence of the type of syringe. Eur J Clin Chem Clin Biochem 1992; 30(6): 349-55.
19. Toffaletti J. Use of novel preparations of heparin to eliminate interference in ionized calcium measurements: have all the problems been solved? Clin Chem 1994; 40(4): 508-9.
20. Sachs C, Rabouine P, Dautzenberg MD. Evaluation of syringes for ionized calcium measurements. Scand J Clin Lab Invest Suppl 1996; 224: 193-201.
21. van Berkel M, Scharnhorst V. Electrolyte-balanced heparin in blood gas syringes can introduce a significant bias in the measurement of positively charged electrolytes. Clin Chem Lab Med 2010; 49(2): 249-52.
22. Lima-Oliveira G, Lippi G, Salvagno GL, Montagnana M, Picheth G, Guidi GC. Different manufacturers of syringes: a new source of variability in blood gas, acid-base balance and related laboratory test? Clin Biochem 2012; 45(9): 683-7.



23. Koch SM, Mehlhorn U, McKinley BA, Irby SL, Warters RD, Allen SJ. Arterial blood sampling devices influence ionized calcium measurements. Crit Care Med 1995; 23(11): 1825-8.
24. Stevic I, Parmar N, Paredes N, Berry LR, Chan AK. Binding of heparin to metals. Cell Biochem Biophys 2010; 59(3): 171-8.
25. Kume T, Sisman AR, Solak A, Tuğlu B, Cinkoğlu B, Coker C. The effects of different syringe volume, needle size and sample volume on blood gas analysis in syringes washed with heparin. Biochem Med (Zagreb) 2012; 22(2): 189-201.

---

**Yazışma adresi:**

Dr. Tuncay Küme  
Dokuz Eylül Üniversitesi, Tıp Fakültesi  
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, İzmir  
E-posta: tuncaykume@deu.edu.tr

---