

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ KOORDİNATÖRLÜĞÜNE

Proje Türü : Lisansüstü Tez Projesi (Doktora)

Proje No : 18L0230008

Proje Yürütücüsü : Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder

Proje Başlığı : Bazı peptit yapılı analitlerin (Adrenokortikotropik hormon-ACTH, insülin, C-peptit ve insülin benzeri büyüme faktörü-1-IGF-1) ölçümünde hemoliz interferansının ve N-fenil maleimidin olası koruyucu etkisinin değerlendirilmesi

Yukarıda bilgileri yazılı olan projemin sonuç raporunun e-kütüphanede yayınlanmasını;

İSTİYORUM

İSTEMİYORUM

GEREKÇESİ:

22.07.2019

Proje Yürütücüsü
İmza



1946

ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPORU

Bazı peptit yapılı analitlerin (Adrenokortikotropik hormon-ACTH, insülin, C-peptit ve insülin benzeri büyüme faktörü-1-IGF-1) ölçümünde hemoliz interferansının ve N-fenil maleimidin olası koruyucu etkisinin değerlendirilmesi

Prof. Dr. Berrin İmge Ergüder

Dr. Mustafa Durmaz

18L0230008

Başlama Tarihi: 26/04/2018

Bitiş Tarihi: 26/04/2019

Rapor tarihi: 22/07/2019

Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri
Ankara - " 2019 "

RAPOR FORMATI

I. Projenin Türkçe ve İngilizce Adı ve Özetleri

ÖZET

**BAZI PEPTİT YAPILI ANALİTLERİN (ACTH, İNSÜLİN, C-PEPTİT VE IGF-1)
ÖLÇÜMÜNDE HEMOLİZ İNTERFERANSININ VE N-FENİL MALEİMİDİN OLASI
KORUYUCU ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Amaç: Bu çalışmada hemoliz sonucunda salınan proteolitik enzimlere bağlı olarak peptit yapılı parametrelerde azalmayı göstermek ve N-fenil maleimid (NPM) ekleyip proteaz enzimlerinin inhibisyonunu sağlayarak azalmayı önlemek amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Laboratuvara gelen hasta kanlarının istenilen parametreleri çalışıldıktan sonra artan hasta serum ve plazmalarından havuz oluşturularak bu çalışma gerçekleştirildi. Seçilen numunelerin konsantrasyonlarının klinik karar noktalarına yakın olmasına özen gösterildi. Her parametreden iki farklı seviye serum/plazma havuzu oluşturuldu. Her bir havuz iki eşit hacme bölünüp birine NPM eklenerek NPM'li ve NPM'siz gruplar elde edildi. Her grup 5 tekrarla çalışıldı. Numune olarak her tekrarda 400 µL serum/plazma kullanıldı. Hemolizat oluşturmak için EDTA'lı tam kan tüpleri santrifüj edilerek plazmaları uzaklaştırıldı. Plazmaya eşit hacimde % 0,9'luk SF koyulup 5 kez yıkama gerçekleştirildi. Her yıkamadan sonra santrifüj edildi. Distile su eklenerek ozmotik şok metoduyla hemoliz indüklendi. 1 gece -20 °C'de bekledikten sonra hemoglobün konsantrasyonu ölçülerek uygun dilüsyonlarla 1000 mg/dL, 500 mg/dL ve 250 mg/dL hemolizatlar elde edildi. 400 µL serum/plazma üzerine 100 µL hemolizat eklenerek 200 mg/dL, 100 mg/dL ve 50 mg/dL Hİ'ler oluşturuldu. 0 mg/dL hemolizat seviyesi için SF kullanıldı. ACTH ve C-peptit elektrokemilüminesans, insülin ve IGF-1 ise IRMA yöntemiyle ölçüldü.

Bulgular: ACTH'nın düşük seviyesinde 200 mg/dL, yüksek seviyesinde ise 100 mg/dL hemolizden itibaren interferans görüldü. Ayrıca ACTH düşük seviyesinde (200 Hİ p=0,043) ve yüksek seviyesinde (100 Hİ p=0,043, 200 Hİ p=0,043) NPM eklenmesi ACTH değerlerinde yükselmeye neden oldu. İnsülin yüksek seviyesinde 100 Hİ'den itibaren hemolize bağlı anlamlı düşüş tespit edildi. NPM'nin koruyucu etkisi ise insülin yüksek seviyesinde 200 Hİ'de (p=0,043) görüldü. C-peptit ve IGF-1 ise her iki seviyede de 200 Hİ'ye kadar hemolize bağlı herhangi bir interferans görülmedi.

Sonuçlar: ACTH ve insülinde belli bir noktadan itibaren hemolizat seviyesi arttıkça proteaz enzimleri peptit yapılı hormonları parçalayarak negatif interferansa neden olmaktadır. NPM eklenmesi ise proteaz enzim inhibisyonu yaparak bu kaybı azalttı. Bu veriler laboratuvara gelen kanları reddetmede veya kabul etmede yol gösterici olabilir. Böylece laboratuvar hataları azaltılarak daha doğru sonuçlar verilebilir.

Anahtar Sözcükler: Hemoliz, interferans, NPM, peptit yapılı analitler, proteaz inhibitörleri

SUMMARY

EVALUATION OF HEMOLYSIS INTERFERENCE AND POSSIBLE PROTECTIVE EFFECT N-PHENYL MALEIMIDE ON THE MEASUREMENT OF SOME PEPTIDE STRUCTURED ANALYTES (ACTH, INSULIN, C-PEPTIDE AND IGF-1)

Aim: In this study, it was aimed to show the decrease in the peptide structure parameters due to proteolytic enzymes released as a result of hemolysis and to prevent decrease by adding N-phenyl maleimide (NPM) and inhibiting protease enzymes.

Material and Methods: After the study of the desired parameters of the patient blood coming to the laboratory, a pool was created from the remaining serum and plasma. Care was taken to ensure that the concentrations of the selected samples were close to the clinical decision points. Two different levels of serum/plasma pool were generated for each parameter. When each pool was divided into two equal volumes and NPM was added to one, NPM and without NPM groups were obtained. Each group was studied in 5 replicates. 400 µL serum/plasma was used as a sample. Whole blood tubes with EDTA were centrifuged to form hemolysate and their plasmas were removed. Instead of plasma, an equal volume of 0.9 % SF was added and 5 washings were performed. Centrifuged after each wash. Hemolysis was induced by osmotic shock method by adding distilled water. After waiting at -20 °C for a night, the hemoglobin concentration was measured and 1000 mg/dL, 500 mg/dL and 250 mg/dL hemolysates were obtained with appropriate dilutions. 100 µL of hemolysate was added to 400 µL of serum/plasma to form 200 mg/dL, 100 mg/dL and 50 mg/dL HI. SF was used for the hemolysate level of 0 mg/dL. ACTH and C-peptide were measured by electrochemiluminescence, insulin and IGF-1 by IRMA method.

Results: Interference was observed from the hemolysis of 200 mg/dL at the low level of ACTH and from the 100 mg/dL hemolysis at the high level of ACTH. Furthermore, the addition of NPM at the ACTH low level (200 HI p = 0.043) and at the high level of ACTH (100 HI p = 0.043, 200 HI p = 0.043) caused an increase in ACTH values. Significant decreases due to hemolysis in high level insulin were detected from 100 mg/dL HI. The protective effect of NPM was determined at the high level of insulin at 200 mg/dL HI (p = 0.043). No interference from hemolysis was observed at C-peptide and IGF-1 at both levels until 200 mg/dL HI.

Conclusion: As the hemolysate level increases from a certain point, protease enzymes break down the peptide-structured hormones and cause negative interference on ACTH and insulin. The addition of NPM reduced the loss of these enzymes by inactivating the protease enzyme. These data may be a guide in rejecting or accepting blood from the laboratory. Thus, more accurate results can be given by reducing laboratory errors.

Keywords: Hemolysis, interference, NPM, peptide structured analytes, protease inhibitors

II. Amaç ve Kapsam

Projemizin amacı, bazı peptit yapıları analitlerin (ACTH, insülin, C-peptit ve IGF-1) serum/plazma düzeylerine hemolizin etkilerini göstermek ve hemolizli numunelerde N-fenil maleimidin (NPM) olası koruyucu etkisini değerlendirmektir. Çalışmamızda NPM'nin proteolizi önleyici etkisinin gösterilebilmesi durumunda NPM'li tüplerin üretilmesinin ve laboratuvarlarda kullanımının önerilebileceği değerlendirilmektedir.

III. Materyal ve Yöntem

Numunelerin Seçilmesi ve Gruplandırılması

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulunun 12 Şubat 2018 tarihli ve 03-128-18 sayılı kararıyla uygun görülmüştür. Bu çalışmada Haziran 2018-Ağustos 2018 tarihleri arasında Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarı ve Endokrinoloji Laboratuvarına gelen hasta kanlarının istenilen parametreleri çalışıldıktan sonra artan kısımlarında ACTH, insülin, C-peptit ve IGF-1 ölçümleri yapıldı. Her parametre için iki farklı seviyede serum/plazma havuzu oluşturuldu. Bu seviyelerin referans aralığının üst ve alt değerlerine yakın olmasına özen gösterildi (1). Referans aralığının üst noktasına yakın hasta kanları ile yüksek seviye serum/plazma havuzları oluşturuldu. Referans aralığının alt noktasına yakın hasta kanları ile düşük seviye serum/plazma havuzları oluşturuldu.

Hemolizli, lipemik ve ikterik numuneler çalışmaya dâhil edilmedi. Her serum/plazma havuzu iki eşit hacme bölünerek bunlardan birine proteaz inhibitörü olan NPM eklendi. Daha sonra, hemoglobin konsantrasyonları 1000 mg/dL, 500 mg/dL, 250 mg/dL ve 0 mg/dL olacak şekilde hemolizatlar oluşturuldu.

İnsülin hormonuyla yaptığımız bir ön çalışmada 1000 mg/dL hemoglobin seviyesi için 0,05 anlamlılık düzeyinde 0,80 güç ile örneklem hesabı yapıldığında grup başına 5, toplamda 10 tekrarın bu çalışma için yeterli olduğu saptandı.

Numunelerin Toplanması ve Saklanması

ACTH için kanlar mor kapaklı K₂EDTA'lı tüplere alındı. Soğuk zincirle laboratuvara ulaştırıldı. Laboratuvarda 3600 devirde (RCF: 1960 x g) 10 dk santrifüj edildikten sonra artan plazma analiz zamanına kadar -80 C°'de dondurularak saklandı. Daha sonra numuneler çözülerek ölçümler Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarında otoanalizör (Roche cobas e 411) cihazı ile yapıldı. Numuneler, kalibratörler ve kontroller ölçümden önce ortam sıcaklığına getirildi. Buharlaşıma etkisinden dolayı numune, kalibratör ve kontroller 2 saat içinde çalışıldı.

C-peptit çalışılacak kanlar sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine alındı. 3600 devirde (RCF: 1960 x g) 10 dk santrifüj edildikten sonra serum örnekleri elde edildi. Artan serum örnekleri analiz zamanına kadar -80 C°'de dondurularak saklandı. C-peptit ölçümleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuvarında otoanalizör (Roche cobas e 411) cihazı ile yapıldı. Numuneler, kalibratörler ve kontroller ölçümden önce ortam sıcaklığına getirildi. Buharlaşıma etkisinden dolayı numune, kalibratör ve kontroller 2 saat içinde çalışıldı.

İnsülin ve IGF-1 için kanlar sarı kapaklı jelli biyokimya tüplerine alındı. 3600 devirde (RCF: 1960 x g) 10 dk santrifüj edildikten sonra serum örnekleri elde edildi. Artan serum örnekleri analiz zamanına kadar -80 C°'de dondurularak saklandı. İnsülin Berthold Models LB 2111 cihazı ile, IGF-1 ise PC-RIA

MAS STRATEC cihazı kullanılarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Endokrinoloji Laboratuvarında çalışıldı.

NPM Solüsyonunun Hazırlanması

NPM bir proteaz inhibitörüdür ve molekül ağırlığı 173,17 gramdır. 1 ml dimetilsülfoksitte (DMSO) 69,2 mg NPM çözülerek 400 mM NPM solüsyonu elde edildi. Daha sonra her 1 ml serum/plazmaya 5 µl NPM solüsyonu eklenerek 2 mM NPM konsantrasyonu elde edildi (2). Çalışmamızda NPM'nin kör etkisi olup olmadığını ekarte etmek için; ilgili testin zero kalibratörü ve NPM eklenmiş zero kalibratörü ölçüldü ve herhangi bir kör etkisine rastlanmadı.

Hemolizatin Hazırlanması ve Hemoliz İndeksi (HI)'nin Belirlenmesi

Hemolizat oluşturmak için mor kapaklı EDTA'lı tam kan tüpleri kullanıldı. Santrifüj sonrası plazma uzaklaştırıldıktan sonra eşit hacimde % 0,9'luk SF eklenip yıkama gerçekleştirildi. Daha sonra örnek santrifüjlenip SF ile yıkama işlemi 5 kez tekrar edildi. Yıkama işleminin ardından distile su eklenerek ozmotik şok metoduyla hemoliz indüklendi. Örnek -20 °C'de bir gece bekletildikten sonra çözülüp tekrar santrifüj edildi (1,3,4). Elde edilen hemolizatin hemoglobin konsantrasyonu tam kan cihazı (Sysmex XN-3000) ile ölçüldü. Ölçülen hemoglobin miktarından yararlanılarak 1000 mg/dL, 500 mg/dL, 250 mg/dL hemoglobin konsantrasyonlarında hemolizatlar elde edildi. 0 mg/dL hemolizat seviyesi için % 0,9'luk SF kullanıldı. 100 µl hemolizat 400 µl serum/plazma havuzu üzerine eklenince 200 mg/dL, 100 mg/dL ve 50 mg/dL hemoliz indeksi (HI) seviyeleri oluşturuldu. Serum/plazma havuzu üzerine hemolizatlar eklendikten sonra vorteksleme işlemi yapıldı.

Serum ve Plazmada Analizi Yapılan Parametrelerin Ölçüm Yöntemleri

ACTH Ölçüm Yöntemi

ACTH tayininde elektrokemilüminesans (ECL) yöntem kullanıldı. Test prensibi; immünolojik sandviç metoda dayanmaktadır. Birinci inkubasyonda 50 µl numune, ACTH'ye spesifik biyotinli Mab ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş ACTH'ye spesifik Mab bir sandviç kompleks oluşturmak için reaksiyona girer. Daha sonra streptavidin kaplı mikropartiküller eklenerek biyotin ile streptavidin etkileşimi meydana gelir. İkinci inkubasyonda reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrotun yüzeyinde manyetik olarak tutuldukları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Bağlanmamış maddeler uzaklaştırıldıktan sonra elektrot üzerine voltaj uygulanarak kemilüminesans emisyonu meydana gelir ve bir foton sayıcı ile ölçüm yapılır.

ACTH'nin referans aralığı 7,2-63,3 pg/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek ve düşük seviye kontrollerinin

laboratuvardaki varyasyon katsayısı (CV) sırasıyla % 1,56 ve %1,75'tir.

C-peptit Ölçüm Yöntemi

Serum örneklerinde C-peptit tayini için ECL yöntem kullanıldı. Birinci inkübasyonda 20 µl numune, C-peptite spesifik biyotinli Mab ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş C-peptide spesifik Mab'ın reaksiyona girmesi sonucu sandviç kompleks oluşur. İkinci inkübasyonda streptavidin kaplı mikropartiküller eklendiğinde biyotin ile streptavidin etkileşime girer. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrotun yüzeyinde manyetik olarak tutuldukları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Daha sonra bağlanmamış maddeler uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonuna neden olup bir foton sayıcı ile ölçülür.

C-peptitin referans aralığı 1,1-4,4 ng/mL olarak belirlenmiştir. Yüksek ve düşük seviye kontrollerinin laboratuvardaki CV'si sırasıyla % 2,25 ve % 2,19'dur.

İnsülin Ölçüm Yöntemi

İnsülin tayininde IRMA test kiti kullanıldı. Yakalayıcı antikorlar olan Mab1'ler plastik tüpün alt ve iç yüzeyine tutturulmuştur. Kalibratör ve numuneler vortekslenip 50 µl olarak plastik tüplere pipetlendi. 50 µl ¹²⁵I ile işaretlenmiş antikor olan Mab2 eklenerek immünojenik reaksiyon tetiklendi. 2 saat oda sıcaklığında inkübe edildi. 2 kez yıkama yapıldıktan sonra tüpe bağlı olan radyoaktivite numune konsantrasyonunu yansıtmaktadır. Gama sayacı aracılığıyla plastik tüplerdeki radyoaktivite ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi çizilerek numune konsantrasyonları hesaplandı.

İnsülinin referans aralığı 4-16 µIU/mL arasındadır. İnsülin kitinin çalışma içi (intra-assay) CV'si düşük seviye % 2,1, yüksek seviye % 1,5 iken, çalışmalar arası (inter-assay) CV'si düşük seviye % 6,5, yüksek seviye % 6,1'dir.

IGF-1 Ölçüm Yöntemi

IGF-1 ölçümü için IRMA test kiti kullanıldı. IGF-1'in bağlayıcı proteinlerinden ayrılması için ayrışma aşaması gereklidir. Bunun için 25 µl serum ile 500 µl dissosiyasyon buffer karıştırılıp vortekslendi. Bu numuneler içinde Mab1 bulunan plastik tüplere 50 µl olarak pipetlendi. Daha sonra 300 µl ¹²⁵I ile işaretlenmiş antikor olan Mab2 eklendi. 1 saat shaker üzerinde inkübe edildi. 2 kez yıkama yapıldıktan sonra gama sayacı ile radyoaktivite ölçüldü. Kalibrasyon eğrisi çizilip numune konsantrasyonları hesaplandı.

IGF-1 kitinin çalışma içi (intra-assay) CV'si % 5,6 iken, çalışmalar arası (inter-assay) CV'si % 8,3'tür. IGF-1 testinin referans aralıkları yaşa göre değişkenlik göstermektedir.

İstatistiksel Değerlendirme

Sonuçların istatistiksel analizi 'SPSS 11.5 for Windows' paket programıyla yapıldı. Sonuçların parametrik dağılmadığı tespit edildi. Bu durumda dağılımı normal olmayan değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; medyan (minimum (min) – maksimum (maks)) olarak gösterildi. NPM'siz ve NPM'li gruplar arasında yapılan ikili karşılaştırmalarda Wilcoxon testi uygulandı. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. İki'den fazla grubun karşılaştırıldığı durumlarda tekrarlı ölçümlerde varyans analizi (repeated measures ANOVA) uygulandı. Çoklu karşılaştırmada farklar anlamlı çıktığında post hoc değerlendirmeler ise Bonferroni testi ile yapıldı. $p < 0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. Analiz ve Bulgular**ACTH**

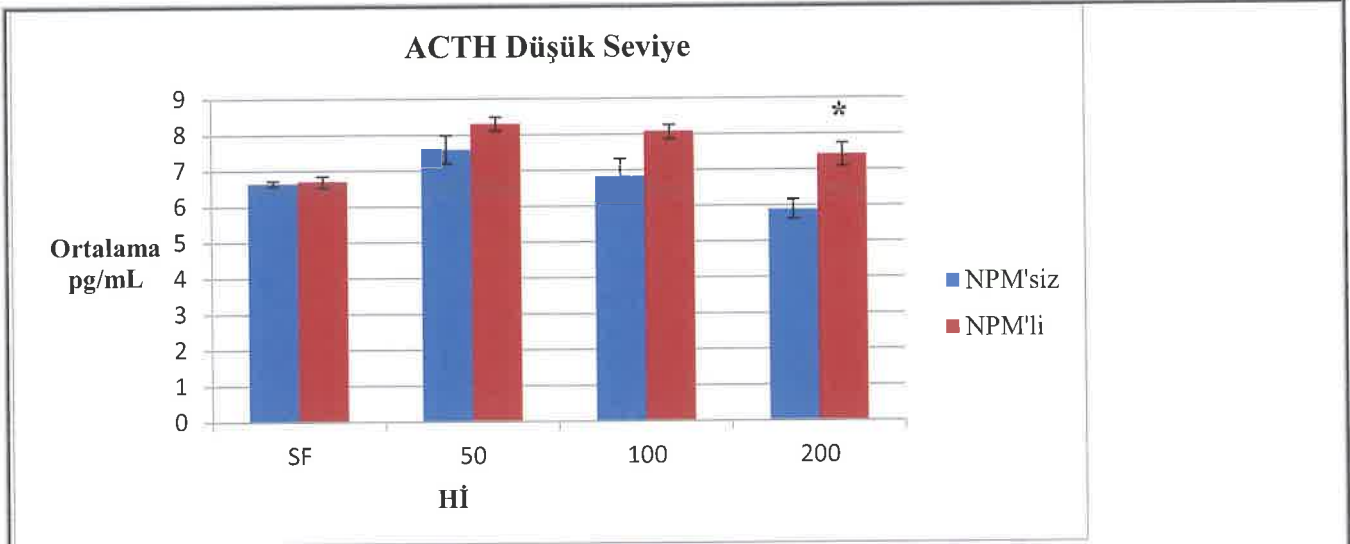
ACTH'nın düşük seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,05$). Hemolizat seviyeleri post hoc Bonferroni testi ile değerlendirildiğinde ise SF ile 200 Hİ arasında ACTH seviyelerinde anlamlı bir düşüş ($p = 0,011$) izlendi.

ACTH düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li gruplarının Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 1'de verildi. Hemolize bağlı anlamlı ACTH azalmasının görüldüğü 200 Hİ'de NPM eklenerek ACTH seviyelerinde anlamlı artış görüldü ($p = 0,043$).

Tablo 1. ACTH düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	ACTH Düşük seviye NPM'siz	ACTH Düşük seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	6,61 (6,59-6,77)	6,75 (6,44-6,85)	0,50
50	7,69 (6,90-7,88)	8,31 (8,01-8,51)	0,043
100	7,02 (6,02-7,2)	8,11 (7,8-8,29)	0,043
200	5,99 (5,43-6,07)	7,35 (7,09-7,84)	0,043

ACTH'nın düşük seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortalamaları Şekil 1'de karşılaştırıldı. NPM'siz grupta 200 Hİ'de ACTH değeri 5,87 pg/mL iken, NPM eklenen grupta aynı hemolizat düzeyinde 7,41 pg/mL'ye anlamlı bir yükseliş gösterdi.



*P<0,05

Şekil 1. ACTH düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarda ortalamalarının karşılaştırılması.

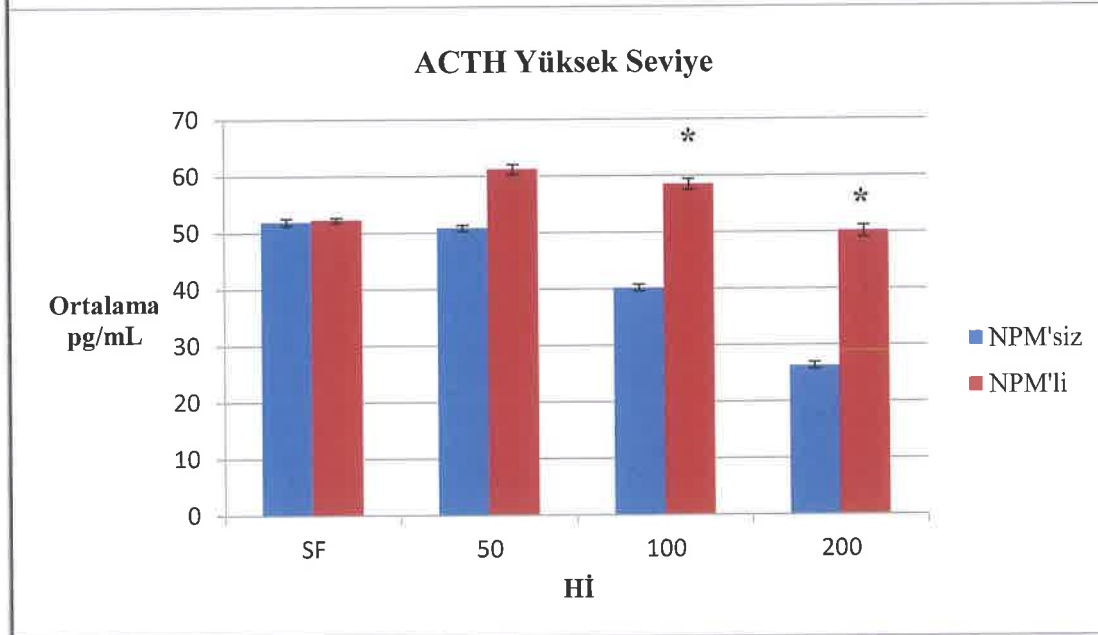
ACTH'nın yüksek seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulundu ($p<0,05$). Hemolizat seviyeleri post hoc Bonferoni testi ile karşılaştırıldığında ise SF ile 100 ve SF ile 200 Hİ'lerinde ACTH seviyelerinde anlamlı bir düşüş (sırasıyla $p<0,001$, $p<0,001$) izlendi.

ACTH yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 2'de gösterildi. Hemolize bağlı anlamlı ACTH azalmasının görüldüğü 100 ve 200 Hİ'de NPM eklenmesi sonucu ACTH seviyelerinde anlamlı artış görüldü ($p=0,043$).

Tablo 2. ACTH yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	ACTH Yüksek seviye NPM'siz	ACTH Yüksek seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	52,02 (50,88-52,45)	52,22 (51,91-52,92)	0,345
50	51,0 (50,06-51,41)	61,03 (60,06-62,51)	0,043
100	40,01 (39,64-41,1)	58,36 (57,69-60,08)	0,043
200	26,18 (25,6-27,13)	49,98 (48,66-51,22)	0,043

ACTH'nın yüksek seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortalamaları Şekil 2'de karşılaştırıldı. NPM'siz grupta 100 ve 200 Hİ'de ACTH değerleri sırasıyla 40,2 pg/mL ve 26,3 pg/mL iken, NPM eklenen grupta 100 ve 200 Hİ'de ACTH seviyeleri sırasıyla 58,4 pg/mL ve 50,1 pg/mL'ye anlamlı bir yükseliş gösterdi.



*p<0,05

Şekil 2. ACTH yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarda ortalamalarının karşılaştırılması.

Bu sonuçlar hemoliz sonucunda salınan proteazların ACTH'yı parçaladığını doğrulamaktadır. NPM'li gruplarda ACTH'da artış olması ise NPM'nin salınan proteazları inhibe ettiğini göstermektedir.

İnsülin

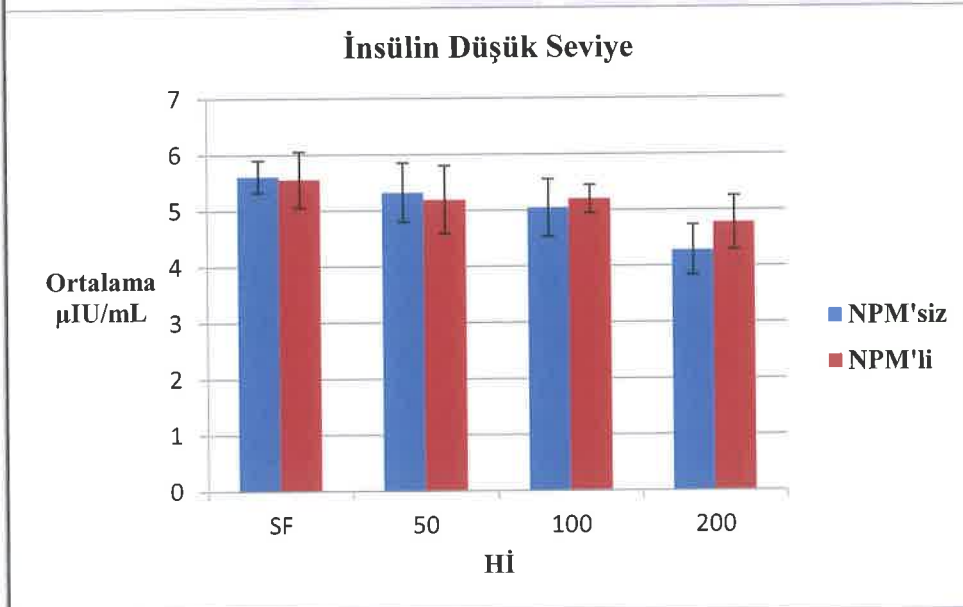
İnsülinin düşük seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulundu (p<0,05). Hemolizat seviyeleri post hoc Bonferoni testi ile değerlendirildiğinde ise anlamlı sonuç bulunamadı.

İnsülin düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li gruplarının Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 3'de verildi. İnsülin düşük seviyesinde hemolize bağlı bir düşüş görülürken, NPM eklenmesiyle anlamlı bir artış olmadı.

Tablo 3. İnsülin düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	İnsülin Düşük seviye NPM'siz	İnsülin Düşük seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	5,71 (5,14-5,88)	5,32 (5,14-6,31)	0,50
50	5,53 (4,55-5,87)	5,30 (4,42-5,80)	0,686
100	5,27 (4,44-5,62)	5,11 (4,89-5,54)	0,50
200	4,42 (3,59-4,80)	4,77 (4,09-5,42)	0,138

İnsülinin düşük seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortalamaları Şekil 3'de karşılaştırıldı. Gruplar arasında anlamlı bir fark bulunamadı.



Şekil 3. İnsülin düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarda ortalamalarının karşılaştırılması.

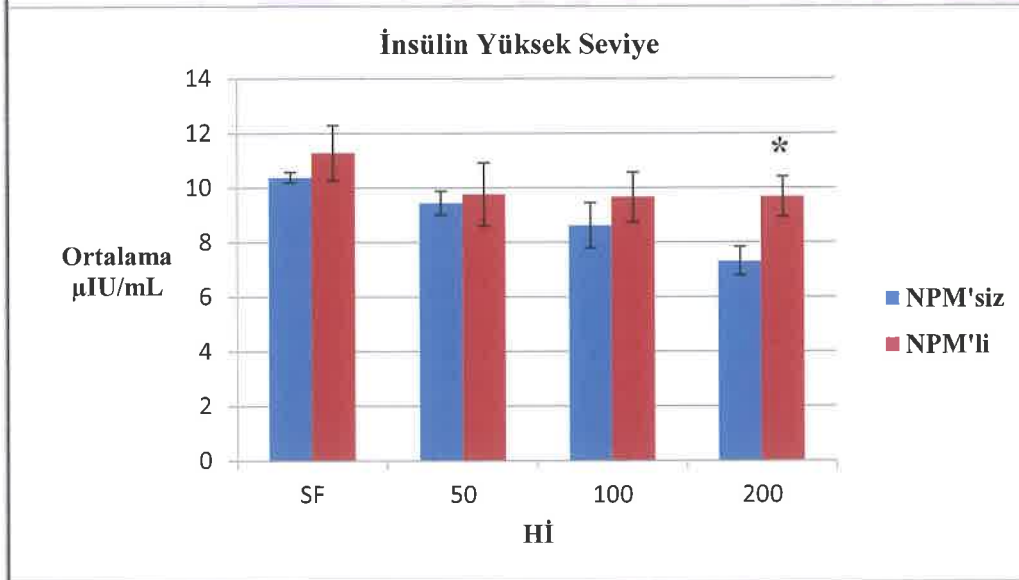
İnsülinin yüksek seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,05$). Hemolizat seviyeleri post hoc Bonferoni testi ile karşılaştırıldığında ise SF ile 100 ve SF ile 200 Hİ'lerinde insülin seviyelerinde anlamlı bir düşüş (sırasıyla $p < 0,04$, $p < 0,001$) izlendi.

İnsülinin yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 4'de gösterildi. Hemolize bağlı anlamlı insülin azalması 100 ve 200 Hİ'de görülürken, NPM eklenmesi sonucu insülin seviyelerinde anlamlı artış sadece 200 Hİ'de görüldü ($p = 0,043$).

Tablo 4. İnsülin yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	İnsülin Yüksek seviye NPM'siz	İnsülin Yüksek seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	10,41 (10,19-10,67)	11,44 (9,81-12,62)	0,08
50	9,56 (8,93-9,89)	9,63 (8,74-11,70)	0,50
100	8,97 (7,14-9,14)	9,99 (8,14-10,44)	0,138
200	7,03 (6,86-8,12)	9,72 (8,89-10,63)	0,043

İnsülinin yüksek seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortalamaları Şekil 4'te karşılaştırıldı. NPM'siz grupta 100 ve 200 Hİ'de insülin değerleri sırasıyla 8,62 μ IU/mL ve 7,31 μ IU/MI'ye düştü. NPM eklenen grupta ise anlamlı artış olduğu 200 Hİ'de insülin seviyesi 9,68 μ IU/MI'ye yükseldi.



*p<0,05

Şekil 4. İnsülin yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarda ortalamalarının karşılaştırılması.

Bu sonuçlar hemoliz sonucunda salınan proteazların insülini parçaladığını doğrulamaktadır. NPM'li gruplarda insülinde artış olması ise NPM'nin salınan proteazları inhibe ettiğini göstermektedir.

C-peptit

C-peptitin düşük seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunamadı. C-peptit seviyelerinde hemolize bağlı düşüş görülmedi.

C-peptitin düşük seviyesinde NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 5'te gösterildi. C-peptit üzerinde hemoliz etkisi gözlenmemesine rağmen SF ve 200 Hİ'lerinde NPM'siz ve NPM'li gruplar arasında anlamlı p değerleri elde edildi. Ancak anlamlı ilişki bulunan NPM'li gruplarda artış yerine düşüş gözlemlendi.

Tablo 5. C-peptit düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	C-peptit Düşük seviye NPM'siz	C-peptit Düşük seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	0,922 (0,91-0,93)	0,886 (0,88-0,91)	0,043
50	0,932 (0,93-0,94)	0,930 (0,92-0,94)	0,34
100	0,931 (0,93-0,94)	0,923 (0,92-0,94)	0,22
200	0,928 (0,92-0,94)	0,882 (0,87-0,90)	0,043

C-peptitin yüksek seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulundu ($p < 0,05$). Bonferoni testi ile yapılan post hoc değerlendirmede ise SF ile 50 Hİ arasında anlamlı ilişki bulunmasına rağmen C-peptit seviyelerinde hemolize bağlı düşüş yerine artış görüldü.

C-peptitin yüksek seviyesinde NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 6'da gösterildi. C-peptit üzerinde hemolize bağlı anlamlı bir düşüş olmamasına rağmen 50 Hİ'de NPM'siz ve NPM'li gruplar arasında anlamlı p değeri elde edildi. Ancak anlamlı ilişki bulunan NPM'li gruplarda artış yerine düşüş gözlemlendi.

Tablo 6. C-peptit yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	C-peptit Yüksek seviye NPM'siz	C-peptit Yüksek seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	3,15 (3,13-3,18)	3,17 (3,11-3,18)	0,89
50	3,26 (3,23-3,29)	3,09 (3,03-3,11)	0,042
100	3,15 (3,09-3,15)	3,12 (3,08-3,13)	0,22
200	3,11 (3,08-3,13)	3,11 (3,06-3,15)	0,49

Bu sonuçlar C-peptitin 200 Hİ'ye kadar hemolizden etkilenmediğini göstermektedir. Hemolizden etkilenme olmadığı için NPM'nin hemolize karşı koruyucu etkisinden bahsetmek anlamsız olacaktır.

IGF-1

IGF-1'in düşük seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı ilişki bulunamadı. IGF-1 seviyelerinde hemolize bağlı anlamlı düşüş görülmedi.

IGF-1'in düşük seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 7'de gösterildi. NPM'siz ve NPM'li grupların karşılaştırılması sonucu anlamlı p değeri bulunamadı.

Tablo 7. IGF-1 düşük seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	IGF-1 Düşük seviye NPM'siz	IGF-1 Düşük seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	197,7 (192,8-210,5)	204,4 (194,9-210,1)	0,50
50	199,1 (174,5-206,2)	203,5 (189-206,4)	0,34
100	202,5 (172,9-212,9)	192,4 (187,6-211,6)	0,50
200	204,6 (200,9-215,7)	202,5 (163-216,3)	0,50

IGF-1'in yüksek seviyesinde artan hemolizat düzeyleri tekrarlı ölçümlerde varyans analizi ile karşılaştırıldığında anlamlı bir ilişki bulunamadı. IGF-1 seviyelerinde hemolize bağlı anlamlı düşüş görülmedi.

IGF-1'in yüksek seviyesinde NPM'siz ve NPM'li grupların ortanca değerleri ve NPM'siz ve NPM'li grupların Wilcoxon testi ile karşılaştırılması sonucu elde edilen p değerleri Tablo 8'de gösterildi. NPM'siz ve NPM'li grupların karşılaştırılması sonucu anlamlı p değeri bulunamadı.

Tablo 8. IGF-1 yüksek seviyesinin NPM'siz ve NPM'li gruplarının ortanca değerleri ve Wilcoxon testi p değerleri.

	IGF-1 Yüksek seviye NPM'siz	IGF-1 Yüksek seviye NPM'li	NPM'siz ve NPM'li grup karşılaştırması
Hİ	Ortanca (Min-Maks)	Ortanca (Min-Maks)	Wilcoxon p değeri
SF	395 (388,3-425,1)	401,8 (379,6-415,7)	0,50
50	408,6 (360,8-417,7)	414,8 (387,2-425,2)	0,34
100	402,7 (376,2-415,8)	389,7 (387-419,5)	0,68
200	411,2 (402,3-413,3)	411,3 (354,5-429,7)	0,68

Bu sonuçlar IGF-1'in 200 Hİ'ye kadar hemolizden etkilenmediğini göstermektedir. Hemolizden etkilenme olmadığı için NPM'nin hemolize karşı koruyucu etkisinden bahsetmek anlamsız olacaktır.

V. Sonuç ve Öneriler

1. ACTH ve insülinde hemolize bağlı degradasyon sonucu azalma tespit ettik. NPM'li gruplarda ise proteolitik parçalanmayı önleyerek konsantrasyonlarda artış saptadık.
2. C-peptit ve IGF-1 için çalıştığımız hemolizat seviyelerinde herhangi bir interferansla karşılaşmadık.
3. Bu veriler laboratuvarımızda hemolizli numuneyi reddetmede veya sonuçlandırmada bize yardımcı olacaktır. Böylece laboratuvar hataları azaltılarak klinisyenlere daha doğru sonuçlar verilecektir. Bu da yanlış tanı ve tedavileri önleyecektir.

VI. Geleceğe İlişkin Öngörülen Katkılar

Çalışmamızda elde ettiğimiz veriler başka çalışmalarla desteklenirse maleimimli tüp üretimine önemli katkıda bulunacaktır.

VII. Sağlanan Altyapı Olanakları ile Varsa Gerçekleştirilen Projeler

Yok

VIII. Sağlanan Altyapı Olanaklarının Varsa Bilim/Hizmet ve Eğitim Alanlarındaki Katkıları

Yok

EK-11 Sonuç Raporu Formatı

IX. Kaynaklar

1. Cook PR, Glenn C, Armston A. Effect of hemolysis on insulin determination by the Beckman Coulter Unicell DXI 800 immunoassay analyzer. Clin Biochem. 2010;43(6):621-2.
2. Livesey JH, Dolamore B. Stability of plasma adrenocorticotrophic hormone (ACTH): influence of hemolysis, rapid chilling, time, and the addition of a maleimide. Clin Biochem. 2010;43(18):1478-80.
3. Garinet S, Fellahi S, Marlin G, Capeau J, Lefevre G, Bastard JP. Differential interferences of hemoglobin and hemolysis on insulin assay with the Abbott Architect-Ci8200 immunoassay. Clin Biochem. 2014;47(6):445-7.
4. Wu ZQ, Lu J, Chen H, Chen W, Xu HG. Individualized correction of insulin measurement in hemolyzed serum samples. Immunol Res. 2017;65(3):605-8.

X. Ekler

- a. Mali Bilanço ve Açıklamaları

Bütçe Kodu	İşin adı, tanımı ve niteliği	Başlangıç Ödeneği	Harcanan	Kalan
03.2 Tüketime Yönelik Mal ve Malzeme Alımları	1 kutu insülin RIA/96 test kiti 1 kutu IGF-1 RIA/96 test kiti Ayarlanabilir Hacimli Pipet Seti	7.496,80	6.255,32	1.241,48
03.5 Hizmet Alımları	80 Adet ACTH (sabah) ölçümü 80 Adet C- peptit (açlık) ölçümü 80 Adet insülin (açlık) ölçümü 80 Adet IGF-1 ölçümü	7.603,20	7.040,00	563,20
Toplam		15.100,00	13.295,32	1.804,68

b. Makine ve Teçhizatın Konumu ve İlerideki Kullanımına Dair Açıklamalar
Ayarlanabilir hacimli pipet seti sonraki çalışmalarımızda da gerektiğinde kullanılacaktır.

- c. Teknik ve Bilimsel Ayrıntılar

Yok

- d. Sunumlar (bildiriler ve teknik raporlar) (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)

Yok

- e. Yayınlar (hakemli bilimsel dergiler) ve tezler (Altyapı ve Yönlendirilmiş Projeler için uygulanmaz)

Tez EK-1 olarak sunulmuştur.

NOT: Verilen sonuç raporu bir (1) nüsha olarak ciltsiz şekilde verilecek, sonuç raporu Komisyon onayından sonra ciltlenerek bir kopyasının yer aldığı CD ile birlikte sunulacaktır. Sonuç raporunda proje sonuçlarını içeren, ISI' nın SCI veya SSCI veya AHCI dizinleri kapsamında ve diğer uluslar arası dizinlerce taranan hakemli dergilerde yayınlanmış makaleler, III. Materyal ve Yöntem ve IV. Analiz ve Bulgular bölümleri yerine kabul edilir.

