TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKSTRAKORPOREAL YAŞAM DESTEĞİNDEKİ HASTALARDA OPTİMUM BİYOKİMYASAL TAKİP: HEMOLİZ KRİTERLERİ VE ANAEROBİK METABOLİZMA

Dr. Metin GENÇ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan AVCI

ANKARA
2015

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKSTRAKORPOREAL YAŞAM DESTEĞİNDEKİ HASTALARDA OPTİMUM BİYOKİMYASAL TAKİP: HEMOLİZ KRİTERLERİ VE ANAEROBİK METABOLİZMA

Dr. Metin GENÇ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Aslıhan AVCI

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 15L0230003 proje numarası ile desteklenmiştir.

ANKARA
2015

Düzenleme tarihi: 26/08/2015

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	**: Metin GENÇ**	**Sınav tarihi:** 26 / 08 / 2015
Anabilim/Bilim Dalı	**: Tıbbi Biyokimya**	
Tez Danışmanı	**: Prof. Dr. Aslıhan AVCI**	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: Ekstrakorporeal Yaşam Desteğindeki Hastalarda Optimum Biyokimyasal Takip: Hemoliz Kriterleri ve Anaerobik Metabolizma			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

- ☒ Kabulüne
- ☐ Reddine
- ☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Murat KAÇMAZ
Kırıkkale Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Aslıhan AVCI
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Erdinç DEVRİM
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

ÖNSÖZ

Tıpta uzmanlık eğitimi aldığım süre boyunca, eğitimimde karşılaştığım her türlü zorluk karşısında, derin bilgi ve tecrübelerini ve rehberliğini benden hiçbir zaman esirgemeyen çok değerli tez danışmanı hocam Sayın Prof. Dr. Aslıhan Avcı'ya başta olmak üzere, eğitimim sırasında her zaman engin tecrübelerine başvurduğum, değerli hocam Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. H. Serdar Öztürk'e ve değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. İlker Durak'a, Sayın Prof. Dr. Kadirhan Sunguroğlu'na, Sayın Prof. Dr. Serenay Elgün Ülkar'a, Sayın Prof. Dr. B. İmge Ergüder'e ve Sayın Prof. Dr. Erdinç Devrim'e;

Yetişmemde ve bugünlere gelmemde en büyük pay sahipleri olan sevgili anneme, babama, ağabeyime ve kardeşime;

Desteklerini her zaman yanımda hissettiğim değerli araştırma görevlisi arkadaşlarım Dr. Oğuz Han Edebal'a, Dr. Süleyman Büber'e, Dr. Özkan Özer'e, Dr. Pınar Koyuncu'ya, Dr. Bedia Akosman'a, Dr. Ömer Yavuz'a ve Dr. Hikmet Can Çubukçu'ya;

Anabilim Dalımızın değerli çalışanları Ömer Savran, Sema Öztürk, Nurdan Torunoğlu, Nurhan Gödelekoğlu, Kadime Kızılırmak ve Hidayet Arslan'a;

Sayın Uz. Dr. Esra Elmalı'ya, Sayın Uz. Dr. Zihni Karaeren'e ve Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nın değerli çalışanlarına;

Tez çalışmamın ortaya çıkmasında bilgi, emek ve tecrübeleriyle bana yardımcı olan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. A. Rüçhan Akar'a ve Sayın Uz. Dr. Mehmet Taşar'a ve Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin değerli yönetici ve çalışanlarına;

Teşekkürlerimi, saygılarımı ve şükranlarımı sunarım.

Dr. Metin GENÇ
Ankara, 2015

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Önsöz ..... **i**

İçindekiler ..... **iii**

Simgeler ve Kısaltmalar Dizini ..... **vi**

Şekiller Dizini ..... **x**

Tablolar Dizini ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **3**

2.1. EKSTRAKORPOREAL MEMBRAN OKSİJENASYONU (EKMO) **3**

2.1.1. EKMO'nun Gelişimi **3**

2.1.2. EKMO Uygulamaları **4**

2.1.2.1. VA EKMO **4**

2.1.2.2. VV EKMO **6**

2.1.3. EKMO Dolaşımı ve Donanımları **7**

2.1.3.1. Pompa **8**

2.1.3.2. Oksijenatörler **9**

2.1.3.3. Kanüller ve Borular **9**

2.1.3.4. Isı Değiştiriciler **10**

2.1.3.5. Monitör **10**

2.1.4. EKMO'da Antikoagülasyon **11**

2.1.5. EKMO Yönetimi **13**

2.1.6. EKMO Endikasyonları **14**

2.1.6.1. Kalp Yetmezliğinde EKMO **14**

2.1.6.2. Solunum Yetmezliğinde EKMO **16**

2.1.7. EKMO'dan Ayrılma **16**

2.1.8. EKMO'nun Komplikasyonları **18**

2.2. HEMOLİZ **21**

2.2.1. Eritrositler ve Hemoglobin **22**

2.2.2. Hemoglobin Metabolizması **23**

2.2.3. Ekstraselüler Hemoglobin ve Toksisitesi **24**

2.2.3.1 Nitrik Oksit (NO) **27**

2.2.4. Mekanik Dolaşımlarda Hemoliz **29**
2.2.4.1. Mekanik Dolaşım **29**
2.2.4.2. Eritrosit Transfüzyonu **30**
2.2.5. Hemolizin Zararlı Etkilerinden Koruyucu Mekanizmalar **30**
2.2.5.1. Haptoglobin **30**
2.2.5.2. Hemopeksin **32**
2.2.5.3. Hem Oksijenazlar **33**
2.2.5.4. Diğer Hem-Bağlayıcı Mekanizmalar **34**
2.2.5.5. Antioksidan Mekanizmalar **34**
2.2.6. Serbest Plazma Hemoglobini (sHb) Ölçüm Yöntemleri **36**
2.2.6.1. Direkt Optik Teknikler **37**
2.2.6.2. Kimyasal Eklemeli Teknikler **39**
2.3. ANAEROBİK METABOLİZMA 40
2.3.1. Laktat **40**
2.3.1.1. Laktat Metabolizması **40**
2.3.1.2. Laktat ve Asidoz **42**
2.3.1.3. Laktat ve Doku Hipoksisi **43**
2.4. DİĞER PARAMETRELER 43
2.4.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) **43**
2.4.2. C-Reaktif Protein (CRP) **45**
3. GEREÇ VE YÖNTEM 47
3.1. HASTALAR 47
3.1.1. Hasta Seçimi **47**
3.1.2. Hastaların Örneklerine Uygulanan Genel İşlemler **47**
3.2. GEREÇLER 48
3.2.1. Cihazlar **48**
3.2.2. Kimyasal maddeler **49**
3.3. SERBEST PLAZMA HEMOGLOBİNİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ OLUŞTURULMASI 49
3.3.1. Oksihemoglobin Standardının Oluşturulması **49**
3.3.2. Bilirubin Girişiminin Değerlendirilmesi **51**
3.3.3. Lipit Girişiminin Değerlendirilmesi **53**
3.4. NİTRİK OKSİT (NO) MİKTARI ÖLÇÜM YÖNTEMİ 54
3.5. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ANALİZİ 55

3.5.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Ölçümü 55
3.5.2. Laktat Ölçümü 56
3.5.3. Total Bilirubin (TB) ölçümü 56
3.5.4. Direkt Bilirubin (DB) Ölçümü 56
3.5.5. Trigliserit (TG) Ölçümü 57
3.5.6. C-Reaktif Protein (CRP) Ölçümü 57
3.5.7. Haptoglobin (Hp) Ölçümü 58
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 58
4. BULGULAR 59
4.1. YÖNTEM OLUŞTURMA VE DEĞERLENDİRME BULGULARI 59
4.2. ÖLÇÜLEN PARAMETRELERLE İLGİLİ BULGULAR 61
5. TARTIŞMA 64
6. SONUÇLAR 74
ÖZET 75
SUMMARY 77
KAYNAKLAR 79
EKLER 99
EK 1: Etik Kurul Kararı 99
EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu 102

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

µL	**:**	Mikrolitre
µM	**:**	Mikromolar
µm	**:**	Mikrometre
µmol	**:**	Mikromol
A	**:**	Absorbans
aKZ	**:**	Aktive koagülasyon zamanı
ALT	**:**	Alanin transaminaz
aPTZ	**:**	Aktive parsiyel tromboplastin zamanı
ARDS	**:**	Akut solunum sıkıntısı sendromu
AST	**:**	Aspartat transaminaz
ATP	**:**	Adenozin 5'-trifosfat
Ca^{+2}	**:**	Kalsiyum
CD	**:**	Farklılaşma kümesi (*cluster of differentiation*)
Cd	**:**	Kadmiyum
cGMP	**:**	Siklik guanozin 3', 5'-monofosfat
CLSI	**:**	Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
CO	**:**	Karbon monoksit
CO_2	**:**	Karbon dioksit
CRP	**:**	C-Reaktif Protein
Cu	**:**	Bakır
CV	**:**	Varyasyon katsayısı
DB	**:**	Direkt bilirubin
DHBS	**:**	3,5-dikloro-2-hidroksibenzensülfonik asit
DİK	**:**	Dissemine intravasküler koagülasyon
dk	**:**	Dakika
dL	**:**	Desilitre
DNA	**:**	Deoksiribonükleik asit
EC	**:**	Enzim komisyonu
EDRF	**:**	Endotel kaynaklı gevşetici faktör
EDTA	**:**	Etilendiamin tetraasetik asit

EKMO	**:**	Ekstrakorporeal membran oksijenasyonu
EKYD	**:**	Ekstrakorporeal yaşam desteği
ELSO	**:**	Ekstrakorporeal Yaşam Destek Organizasyonu
eNOS	**:**	Endotelyal NOS
F	**:**	Çap birimi (*French*)
FAD	**:**	Flavin adenin dinükleotit
Fe^{2+}	**:**	Ferröz demir
Fe^{3+}	**:**	Ferrik demir
Fe^{4+}	**:**	Ferril demir
FiO_2	**:**	Solunan oksijen fraksiyonu
fL	**:**	Femtolitre
FMN	**:**	Flavin mononükleotit
FTS	**:**	Fosfat tamponlu salin
G	**:**	Çap birimi (*Gauge*)
g	**:**	Gram
g	**:**	Santrifüj kuvveti
GPx	**:**	Glutatyon peroksidaz
GSH	**:**	Redükte glutatyon
GSSG	**:**	Okside glutatyon
GTP	**:**	Guanozin 5'-trifosfat
H^-	**:**	Hidrid iyonu
H^+	**:**	Hidrojen iyonu
H_2O_2	**:**	Hidrojen peroksit
Hb	**:**	Redükte hemoglobin
HbO_2	**:**	Oksihemoglobin
HCl	**:**	Hidroklorik asit
HDL	**:**	Yüksek dansiteli lipoprotein
Hi	**:**	Methemoglobin (hemiglobin)
HiCN	**:**	Siyanomethemoglobin
HİT	**:**	Heparinle indüklenen trombositopeni
HO	**:**	Hem oksijenaz
Hp	**:**	Haptoglobin

Hpx	**:**	Hemopeksin
IU	**:**	İnternasyonel ünite
İABP	**:**	İntraaortik balon pompası
iNOS	**:**	İndüklenebilen NOS
K_2HPO_4	**:**	Dipotasyum hidrojen fosfat
K_d	**:**	Denge sabiti
kDa	**:**	Kilodalton
kg	**:**	Kilogram
KH_2PO_4	**:**	Potasyum Dihidrojen fosfat
KK	**:**	Kreatin kinaz
K_m	**:**	Michaelis–Menten sabiti
KPB	**:**	Kardiyopulmoner baypas
L	**:**	Litre
LDH	**:**	Laktat dehidrogenaz
LDL	**:**	Düşük dansiteli lipoprotein
M	**:**	Molar
m^2	**:**	Metrekare
mEq	**:**	Miliekivalan
mg	**:**	Miligram
mL	**:**	Mililitre
mM	**:**	Milimolar
mm^3	**:**	Milimetreküp
mmHg	**:**	Milimetre cıva
mmol	**:**	Milimol
Mn	**:**	Mangan
mRNA	**:**	Mesajcı ribonükleik asit
mV	**:**	Milivolt
N	**:**	Numune
Na_2CO_3	**:**	Sodyum karbonat
NaCl	**:**	Sodyum klorür
NAD^+	**:**	Okside nikotinamid adenin dinükleotit
NADH	**:**	Redükte nikotinamid adenin dinükleotit

NADPH	**:**	Redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
nm	**:**	Nanometre
nmol	**:**	Nanomol
nNOS	**:**	Nöral NOS
NO	**:**	Nitrik oksit
NO_2^-	**:**	Nitrit
NO_3^-	**:**	Nitrat
NOS	**:**	Nitrik oksit sentaz
O_2	**:**	Oksijen molekülü
$O2^{\bullet-}$	**:**	Süperoksit radikali
^oC	**:**	Santigrat derece
OD	**:**	Optik dansite
PaO_2	**:**	Arteriyel oksijen kısmi basıncı
PK	**:**	Protein kinaz
pmol	**:**	Pikomol
pO_2	**:**	Oksijen kısmi basıncı
R	**:**	Korelasyon katsayısı
ROT	**:**	Reaktif oksijen türleri
s	**:**	Saniye
SaO_2	**:**	Arteriyel oksijen satürasyonu
sHb	**:**	Serbest plazma hemoglobini
SNOHb	**:**	S-nitrozile hemoglobin
SOD	**:**	Süperoksit dismutaz
SvO_2	**:**	Venöz oksijen satürasyonu
TB	**:**	Total bilirubin
TG	**:**	Trigliserit
TMB	**:**	Tetrametilbenzidin
U	**:**	Ünite
VA	**:**	Veno-arteriyel
VV	**:**	Veno-venöz
Zn	**:**	Çinko

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No:

Şekil 2.1. VA EKMO uygulaması 5

Şekil 2.2. VV EKMO uygulaması 7

Şekil 2.3. İntravasküler hemolizin NO metabolizmasına etkileri 26

Şekil 2.4. FTS'de 50 mg/dL'lik sHb'nin çeşitli dalga boylarında taranması 37

Şekil 2.5. Cripps metodu; 576,7 nm'deki oksihemoglobin piki 38

Şekil 3.1. Plazmada oksihemoglobin standartlarının resmi 50

Şekil 3.2. Plazma 10 ve 50 mg/dL sHb'nin çeşitli dalga boylarında taranması 51

Şekil 3.3. Plazmada bilirubin girişiminin değerlendirilme resmi 52

Şekil 3.4. Plazmada lipit girişiminin değerlendirilme resmi 54

Şekil 4.1. FTS'de oksihemoglobin standardı 60

Şekil 4.2. Plazmada oksihemoglobin standardı 60

Şekil 4.3. Plazmada bilirubin girişiminin değerlendirilmesi 60

Şekil 4.4. Plazmada lipit girişiminin değerlendirilmesi 61

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No:

Tablo 2.1. EKMO uygulamaları arasındaki temel farklılıklar.....4

Tablo 2.2. EKMO'nun başlangıç ayarları 13

Tablo 2.3. Kardiyak nedenlerle EKMO kullanım endikasyonları.....15

Tablo 2.4. EKMO'nun çeşitli komplikasyonları ve insidansları.....18

Tablo 2.5. NOS izoformları ve özellikleri.....28

Tablo 2.6. L-laktik asidoz nedenleri.....42

Tablo 2.7. Çeşitli dokulardaki ve organlardaki LDH izoenzim tipleri ve yüzdeleri.....44

Tablo 3.1. sHb standartlarının hazırlanma tablosu. 50

Tablo 3.2. Farklı bilirubin konsantrasyonlarındaki 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlanma tablosu.....52

Tablo 3.3. Farklı lipit konsantrasyonlarındaki 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlanma tablosu.....53

Tablo 3.4. NO miktarı ölçüm yöntemine ait protokol.....55

Tablo 4.1. Çalışmadaki hastaların genel özellikleri ve EKMO uygulamalarıyla ilgili bazı veriler 62

Tablo 4.2. Parametrelerin referans değerlere göre karşılaştırılması. 62

Tablo 4.3. Korelasyon tablosu 63

1. GİRİŞ

Kardiyopulmoner yetmezlik durumlarında, organ iyileşmesine veya nakline kadar, geçici süreyle kalp veya akciğer fonksiyonlarının vücut dışı tıbbi cihazlarla desteklenmesine ekstrakorporeal yaşam desteği (EKYD) veya ekstrakorporeal membran oksijenasyonu (EKMO) denir (1).

EKMO kullanımına bağlı belirli oranlarda intravasküler hemoliz olabilmektedir (2). Mekanik stres, cihazın fiziksel özellikleri, kan hacim değişiklikleri ve basınç değişimleri gibi birçok neden intravasküler hemoliz gelişimine neden olabilir (3). Hastaların yüksek miktarda hemolize maruz kalmaları başta renal tübüler hasar olmak üzere, pulmoner ve sistemik vasküler direnç artışı, trombosit fonksiyon bozukluğu gibi birçok patolojiye ve hatta mortaliteye neden olabilir (4).

Ekstrakorporeal Yaşam Destek Organizasyonu (ELSO), EKYD uygulanan hastaların hemoliz takiplerinin serbest plazma hemoglobin ölçümüyle yapılmasını önermektedir (1). İntravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan hemoglobinin (serbest hemoglobin, sHb) plazmada ölçümü, aşağıda belirtilen parametrelerdeki kısıtlılıkları olmayan, ekstrakorporeal yaşam desteği uygulanan hastaların takibinde sıklıkla kullanılabilen bir belirteçtir (5, 6). Ancak bu ihtiyaca rağmen, ülkemizdeki laboratuvarlarda serbest plazma hemoglobin ölçümü rutin olarak yapılmamaktadır.

Ülkemizde, hemoliz takiplerinde, daha çok laktat dehidrogenaz (LDH) ve haptoglobin (Hp) gibi parametreler kullanılmaktadır. İntravasküler hemoliz sonucunda eritrosit sitoplazmasında bol miktarda bulunan LDH hücre dışına çıkmakta ve kandaki seviyesi artmaktadır. Ancak, izoenzimlerinin diğer dokularda da bol miktarda oluşu hemoliz değerlendirmesindeki özgüllüğünü ve duyarlılığını azaltan en önemli kısıtlılıklarından birisidir (7). Hp ise intravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan hemoglobini bağlayıp renal kaçağını önleyerek, retiküloendotelyal sistemde yıkımından sorumludur. Ancak Hp miktarının intravasküler hemolizde azalması karaciğerde sentezini tetiklememekte dolayısıyla hemoliz sonrası düzeyleri alt sınırlara inmektedir. Dahası, önemli bir akut faz reaktanı olan Hp'nin, enflamatuvar durumlarda artması özgüllüğünü düşürmektedir (8).

Ayrıca intravasküler hemoliz sonucu açığa çıkan hemoglobin (Hb), hem nitrik oksit (NO) ile reaksiyona girerek nitrat (NO_3^-) ve methemoglobin oluşturur; hem de Hb'nin direkt NO'yu bağlamasıyla, S-nitrozile Hb (SNOHb) oluşumuna neden olur. Ek olarak hemoliz sonucunda eritrosit sitozolünde bol miktarda bulunan arginaz açığa çıkarak NO'nun öncülü olan argininin yıkılmasına neden olabilmektedir. Bütün bu reaksiyonlar sonucunda, özellikle mikrovasküler dolaşımdaki NO düzeylerinin azalmasıyla doku kanlanması bozulması sHb'nin toksik etkilerinin bir kısmından sorumludur (9, 10).

Doku oksijenasyonunun bozulması, anaerobik metabolizmada artışa yol açarak, sıklıkla laktat üretimindeki artıştan sorumludur (11). sHb artışı sonucu özellikle mikrovasküler dolaşımdaki NO azalması, doku oksijenasyonunu bozarak laktat üretiminde artışa neden olabilir.

Bu çalışma, ekstrakorporeal yaşam destek cihazına bağlanan hastalardaki sHb seviyeleriyle, nitrik oksit, laktat, laktat dehidrogenaz ve haptoglobin miktarları arasında ilişki olabileceği varsayımından yola çıkarak planlanmıştır.

Bu çalışmanın amaçları:

1. Kalp merkezimizin ihtiyacı nedeniyle, mg/dL seviyesinde hemoglobin ölçümü yapabilen bir yöntemle, EKMO uygulanan hastaların serbest plazma hemoglobin seviyelerini belirlemektir.

2. Elde edilen serbest plazma hemoglobin seviyeleriyle, hastaların nitrik oksit, laktat, laktat dehidrogenaz ve haptoglobin miktarları arasındaki ilişkiyi değerlendirmektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. EKSTRAKORPOREAL MEMBRAN OKSİJENASYONU (EKMO)

Kardiyopulmoner yetmezlik durumlarında, organ iyileşmesine veya nakline kadar, geçici süreyle kalp veya akciğer fonksiyonlarının vücut dışı tıbbi cihazlarla desteklenmesine ekstrakorporeal yaşam desteği (EKYD) veya ekstrakorporeal membran oksijenasyonu (EKMO) denir (1). Genel anlamda EKMO, kalp cerrahisinde kullanılan kardiyopulmoner baypas (KPB) sisteminin, daha uzun süre uygulanan şeklidir.

Ekstrakorporeal yaşam destek organizasyonu (ELSO), EKYD alanındaki durum tespitlerini yapıp, bu alanda rehberler yayınlamaktadır. ELSO verileri Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi tarafından klinik araştırmalarda referans veri olarak kabul edilmiştir (12).

2.1.1. EKMO'nun Gelişimi

1972'de Hill ve ark. 22 yaşında akut solunum sıkıntısı sendromu (ARDS) olan hastaya, 72 saat süreyle ilk başarılı EKMO uygulamasını yapmışlardır (13). 1974'te Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsü, ciddi ARDS hastalarında, EKMO ve geleneksel tedavi işlemlerini karşılaştıran, randomize kontrollü bir çalışmaya başlamıştır (14). Bu çalışmada, her iki grupta mortalitenin % 90 olduğunun açıklanması EKMO alanında büyük hayal kırıklığı oluşturmuştur. 1979'da veno-venöz (VV) EKMO geliştirilmiştir (15). 1987'de Gattanoni ve ark. normal şartlarda mortalitelerinin % 90'ın üzerinde olduğunu tahmin ettikleri hastalarda, EKMO uygulamasıyla ile sağkalımın yaklaşık % 50 olduğunu bildirmişlerdir (16). İngiltere ortak EKMO çalışmasında, EKMO'nun özellikle ciddi vakalarda faydalı olduğu belirtilmiştir (17). 2009'da ciddi solunum yetmezliği olan 68 merkezden toplam 180 hastanın,

geleneksel tedavi ve EKMO gruplarına ayrıldığı CESAR çalışmasında, sonucun EKMO lehine anlamlı derece yüksek olduğu görülmüştür (18).

2.1.2. EKMO Uygulamaları

EKMO, kanın venöz sistemden çekildiği, oksijenatöre pompalandığı ve daha sonra tekrar hastaya gönderildiği invaziv tekniktir (19). Bu işlem, CO_2 ve O_2 değişimini artırır ve potansiyel tehlikeli ventilatör uygulamalarının azalmasını sağlar. Temelde iki tip EKMO uygulaması vardır: VV EKMO ve veno-arteriyel (VA) EKMO. VV EKMO, sadece solunum desteği sağlarken, VA EKMO, hem kalp hem de akciğerleri baypas eder bu yüzden hem solunum desteği hem de dolaşım desteği sağlar. VV EKMO ve VA EKMO temel farklılıklar tablo 2.1'de gösterilmiştir (20).

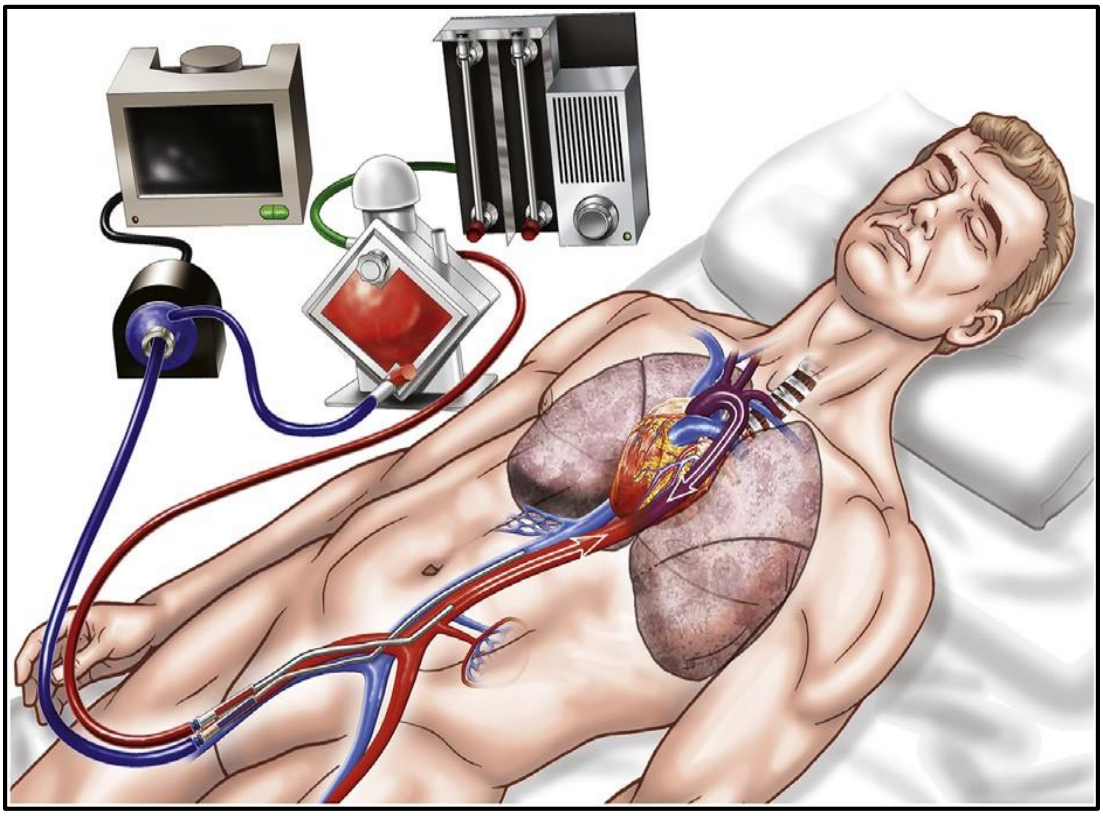
Tablo 2.1. EKMO uygulamaları arasındaki temel farklılıklar- Lafçı ve ark. (20)'ndan alınmıştır

VA EKMO	VV EKMO
Yüksek PaO_2 sağlanır.	Düşük PaO_2 sağlanır.
Düşük kan akım hızları gerekir.	Yüksek kan akım hızları gerekir.
Pulmoner dolaşımı atlar.	Pulmoner dolaşım devam eder.
Pulmoner arter basıncı düşer.	Karışık venöz pO_2 artar.
Kardiyak destek sağlar.	Kardiyak desteği yok.
Arteriyel kanülasyon gerekir.	Sadece venöz kanülasyon gerekir.

2.1.2.1. VA EKMO

VA EKMO'da, düşük oksijenli kan venöz sistemden çekilir ve oksijeni yükselen kan sistemik tarafa pompalanarak, gaz değişimi ve kardiyak destek sağlanır (Şekil 2.1) (21). Bu uygulama geleneksel KPB'ye benzer. VA EKMO'da kanülasyon santral

veya periferik olarak yapılabilir. Santral kanülasyonda, kan sağ atriyumdan çekilir ve inen aortun proksimaline gönderilir. Periferal kanülasyonda ise kan büyük proksimal venlerden (femoral veya juguler ven aracılığıyla) çekilir ve aorta (karotis, aksillar veya femoral arter aracılığıyla) gönderilir. Sistemik arteriyel kan akımı, EKMO akımı ve sol ventrikül kasılmasıyla sağlanır. Hastanın sol ventrikülü destek olmadığında, sistemik arteriyel akımın tamamı EKMO dolaşımından sağlanır ve arteriyel oksijen satürasyonu (SaO_2) % 100 olur. Ancak eğer sol ventrikül desteği varsa, bu akıma bağlı olarak SaO_2 değişir (20).

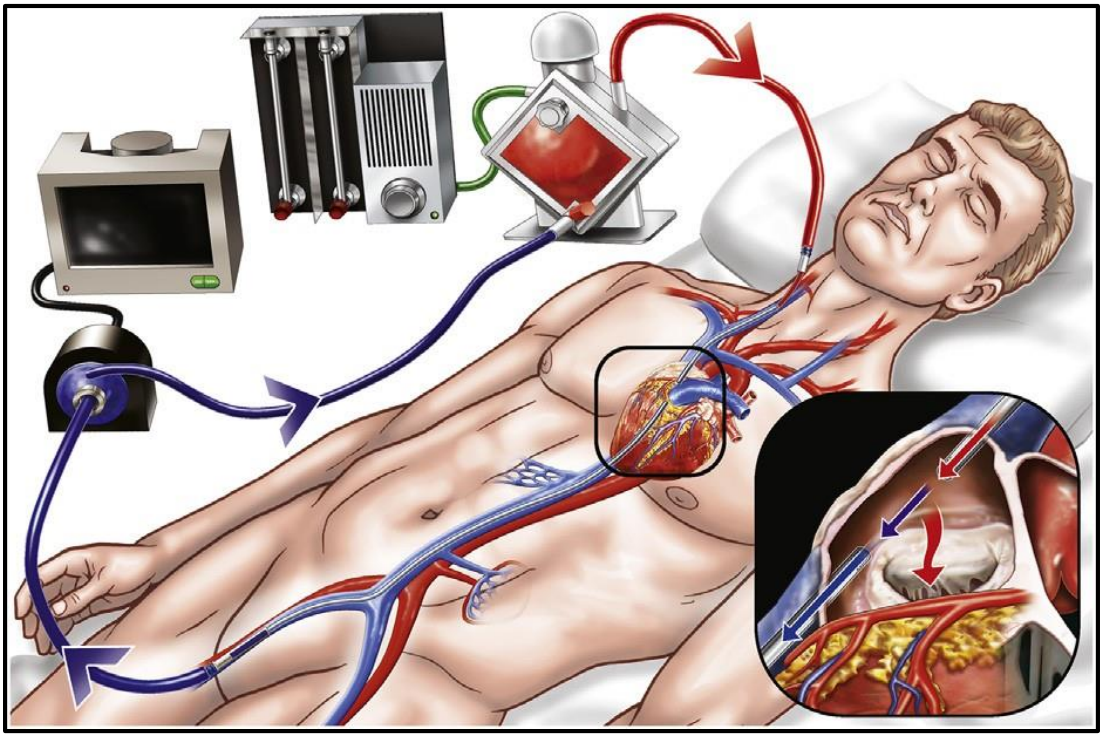


Şekil 2.1. VA EKMO uygulaması- Abrams ve ark. (21)'ndan alınmıştır.

Femoral ven (çekiş) ve femoral arter (dönüş, kırmızı ok) aracılığıyla VA EKMO uygulaması. Kardiyak fonksiyona bağlı olarak EKMO dönüş akımıyla kardiyak akımın birleşme yeri değişebilir, serebral ve koroner vasküler yatağa oksijene kan ulaşamayabilir (mor ok).

2.1.2.2. VV EKMO

VV EKMO, kardiyak çıkış yeterli olan hastada ciddi solunum yetmezliği olduğunda, akciğer fonksiyonlarının kısmen veya tamamen desteklenmesi amacıyla, tercih edilen yoldur (22). VV EKMO uygulamasıyla, mekanik solunum ihtiyacı azaldığı ve kalbin oksijen desteği arttığı için kardiyak fonksiyonlar sıklıkla artar. VV EKMO'da hem çekiş kanülü hem de dönüş kanülü sistemik venöz sisteme yerleştirilir. Büyük çocuk ve erişkinlerde düşük oksijenli kan femoral damarlardan çekilir ve oksijenden zengin kan sağ internal juguler ven aracılığıyla gönderilir veya çift-lümenli kanülle bifemoral yaklaşım da uygulanabilir (Şekil 2.2) (21, 23). Ayrıca VV EKMO, çift-lümenli kanülün internal juguler ven aracılığıyla sağ atriyuma yerleştirilmesiyle de uygulanabilir (24). % 100 oksijene EKMO dönüş kanı sistemik venöz kanla karışır ve sonra pulmoner sisteme geçer. Teorik olarak sadece deoksijene sistemik venöz kan EKMO'ya çekilir. Bununla beraber yerleştirilen kanülün pozisyonuna bağlı olarak, tekrar dolaşım olarak adlandırılan değişik oranlarda oksijene kan tekrar EKMO'ya çekilebilir. Karışık venöz kanın oksijen satürasyonu (SvO_2), EKMO akımı (oksijene kan) ve sistemik venöz dönüşün (deoksijene kan) göreceli katkılarıyla belirlenir. Tekrar dolaşım, oksijene kanın pulmoner artere taşınmasını azaltarak SvO_2'yi düşürür. SaO_2 ise EKMO akımı, sistemik venöz dönüş, tekrar dolaşım derecesi, SvO_2 ve pulmoner fonksiyon tarafından belirlenir. Bütün bu parametrelerden EKMO akımı, SaO_2'nin en önemli ve kolayca değiştirilebilen belirleyicisidir (25).



Şekil 2.2. VV EKMO uygulaması- Abrams ve ark. (21)'ndan alınmıştır.

Femoral ven (çekiş) ve juguler ven (dönüş) aracılığıyla VV EKMO uygulaması. Bu şekilde yakın çapta yerleştirilen kanüllerde, tekrar dolaşım olarak adlandırılan, oksijene kanın EKMO'ya çekilmesi durumu olabilir (mor ok).

2.1.2.3. AV EKMO

Düşük kan akımı nedeniyle kullanımı kısıtlı olan, sadece çok yüksek CO_2 uzaklaştırılmasında kullanılan EKMO türüdür (1).

2.1.3. EKMO Dolaşımı ve Donanımları

Temel olarak, bir EKMO dolaşımı; çekiş ve dönüş kanülleri, borular, pompa ve gaz/ısı değiştirici içerir. Kanüllerindeki farklılığın yanında, VA ve VV EKMO için benzer donanımlar kullanılır.

2.1.3.1. Pompa

Çoğu EKMO dolaşımında iki tip pompa kullanır: Silindir pompa ve santrifügal pompa. Bu iki tip pompanın uygunluk ve komplikasyon oranlarının karşılaştırılması bakımından literatürde tutarsızlık olsa da, eğilim daha çok silindir pompadan yanadır (24).

Santrifügal pompalar, hızlıca dakikada 3000 devire kadar çıkarken kanı santrifügal güçle ileriye doğru iten, pervane şekilli çark veya iç içe geçmiş düz plastik konilerden oluşur (26). Santrifügal pompalar, 900 mmHg itici güç oluştururken, sadece 400-500 mmHg negatif basınç oluşturduğundan mikroemboli daha az olur. Kan akışı ön-yük ve art-yük bağımlıdır. Bu yüzden pompa hızı ve kan akışı arasında sabit ilişki yoktur. Bu nedenle akım-ölçer gerekir. Az miktarda hava pompalayabilirler. Eğer hipovolemi olursa giriş basıncı daha negatif olur ancak pompa hızı sabit kalır bu yüzden kan akışı azalır. Ayrıca VA EKMO sırasında pompa yetmezliği dolaşımın tersine dönmesiyle sonuçlanabilir (25).

Silindir pompalar, kavisli kanal içerisinde 180° ayrı iki silindirin sıkıştırdığı borudan oluşur. Dönen kola bağlı silindirler sürekli boruların bir bölümünü sıkıştırarak kanı silindirlerin önünde iter. Akış hızı boruların çapına, dönme hızına, kanal uzunluğuna ve sıkıştırmanın derecesine bağlıdır. Silindir pompalar, hastanın intravasküler hacmindeki değişimlerden etkilenmemesi için, çekiş kanülü ile pompa arasında yer alan kan dolu rezervuarla birlikte kullanılabilir. Eğer hipovolemi olursa pompa hızı ve bu yüzden kan akımı azalır. Silindir pompalar art-yük bağımsızdır. VA EKMO sırasında sistemik vasküler dirençteki önemli değişim, kan pompalanmasını etkilemez. Rezervuara kan akımı yer çekimiyle olduğundan silindir pompalar hasta seviyesinin altında tutulmalıdır. Silindir pompalarda pompa hızı ve kan akımı arasında direkt ilişki vardır bu yüzden akım-ölçere gereksinim yoktur (20).

Silindir pompalar daha ucuzdur, güvenlidir ve daha az yıkama hacmi gerektirirler ancak yüksek negatif basınç ve sıkıştırılan borulardan parçalanmayla küçük parçacıklar oluşturabilirler. Silindir pompalar; dikkatsiz uygulama, geri akım, bağlantılarda kopma, borularda yırtılmaya daha yatkındır. Santrifügal pompalar nabızsız, sürekli kan akımı üretirken, silindir pompalar 5 mmHg civarı sinüs dalga

nabzı üretirler. Elastik geri-dönüş kanülü nabzı azaltır ve maksimum KPB'de 20 mmHg'nin üzerinde nabız basıncı üretmek zordur (27).

2.1.3.2. Oksijenatörler

Membran oksijenatörler, kan ve gaz fazlarının arasına ince mikroporlu polipropilen oluklu membran veya mikroporsuz silikon membran yerleştirerek, insan akciğerini taklit eder. Polipropilen oksijenatörler, KPB sırasında kullanılan standart oksijenatörlerdir. Yıkama hacimleri az, gaz transfer oranları yüksek ve dirençleri düşük olduğundan, en azından teorik olarak silikon membran oksijenatörlere üstündürler (28). Bununla beraber, zamanla mikroporların plazmaya geçirgenliği artmakta ve gaz faza ve çıkış yoluna plazma sızıntısı olup, gaz değişimini bozduğu ve koagülopati geliştirdiği saptanmıştır. Peek ve ark. polipropilen oksijenatörlerle karşılaştırdıklarında, silikon oksijenatörlerin, harika uyumluluğu ve dayanıklılığı olduğunu ancak daha az gaz değişimi sağladığı, hantal olduğu, yıkamanın zor olduğu ve kan akımına yüksek direnç olduğu sonuçlarına varmışlardır (29).

2000'lerin başlarında yeni nesil mikropor içermeyen, polimetilpenten oluklu oksijenatörler klinik uygulamalarda yerini almıştır. Polimetilpenten oksijenatörler, silikon membranların dayanıklılığı ile polipropilen oksijenatörlerin kolay kullanımı ve etkili gaz değişim özelliklerini birleştirmişlerdir. Khoshbin ve ark. (30) silikon membran oksijenörlerle karşılaştırdıklarında, polimetilpenten oksijenatörlerin daha az eritrosit ve trombosit transfüzyonu ve artmış gaz değişimiyle ilişkili olduklarını öne sürmüşlerdir. Polipropilen oksijenatörlerle karşılaştırıldıklarında ise daha fazla dayanıklılık ve daha az kan ürün transfüzyon ihtiyacı göstermişlerdir.

2.1.3.3. Kanüller ve Borular

Kanül terimi, ekstrakorporeal yaşam desteğinde direkt olarak damar içinde uzanan kateter anlamında kullanılmaktadır (1). Çekiş kanüllerinin ucu, genellikle dolaşım sisteminin en dar parçasıdır ve uygun olmayan kateterler yüksek basınç farklılıkları

ile türbülans oluşturabilir. Daha geniş çaplı kanüller daha iyi akış sağlar. Erişkinlerin çoğunda, çekiş kanülünün 23F-25F ve dönüş kanülünün ise 17F-21F olması yeterlidir (20).

EKMO'nun çeşitli bileşenleri, polivinil boru ve polikarbonat bağlayıcılarla bağlanır. Polivinilklorid borular esnek, inert, nontoksik, şeffaf, bükülmeye dirençli oluşundan ve ısı ile sterilize edilebildiğinden dolayı genellikle tercih edilen malzemelerdir.

Sistemik antikoagülasyon ihtiyacının azaltılması için, yapay yüzeylerin kaplanması EKMO işlemleri sırasındaki komplikasyonların oranı üzerinde önemli etkiye sahiptir (31). Heparin, tüm sistemin iç yüzeyine kovalent veya iyonik bağlarla bağlanabilir. Koster ve ark. yapay yüzeye sabitlenmiş heparinin, heparinle indüklenen trombositopeni (HİT) gelişiminde önemli olan anti-heparin-platelet faktör 4 antikoru gelişimini indüklemediğini belirtmişlerdir (32).

2.1.3.4. Isı Değiştiriciler

Isı değiştiriciler, EKMO dolaşımından geçen kanın sıcaklığını değiştirerek, vücut sıcaklığını kontrol eder. Kardiyovasküler cerrahide, oksijen ihtiyacını azalttığı için, hipotermi tercih edilir. Gazlar soğukta daha fazla çözünürler bu yüzden kanın hızlıca ısıtılması hava kabarcıklarına ve dolayısıyla gaz embolisine neden olabilir (33). Membran oksijenatörlerin çoğu hava embolisini azaltmak için kendinden sonra ısı değiştirici içerirler. Kan plazma proteinlerinin denatürasyonunu önlemek için $40^{o}C$'nin üzerine ısıtılmaz. Genellikle vücuttaki kanla ve EKMO dolaşımındaki kanın sıcaklık farkı $5\text{-}10^{o}C$'yi geçmez.

2.1.3.5. Monitör

Monitörler dolaşımın bazı parametrelerini ölçmek ve kullanıcıya anormal durumlar hakkında bilgi sağlamak amacıyla tasarlanmıştır (1). Çoğu monitör şu ölçümleri içerir:

1. Kan akımı, direkt olarak ultrasonik detektörlerle ölçülebilir veya silindir pompaların dakikadaki devir sayılarıyla hesaplanarak bulunur.
2. Oksijenatör öncesi ve sonrası basınçlar, aşırı basınçların önlenmesi amacıyla ölçülür.
3. Pompa öncesi venöz çekiş basıncı, aşırı negatif çekiş basıncından korunmak için ölçülür.
4. Oksijenatör öncesi ve sonrası oksihemoglobin satürasyonu ve kan gazı ölçümleri yapılabilmektedir.

2.1.4. EKMO'da Antikoagülasyon

EKMO'da antikoagülasyonda hedef; platelet aktivasyonunun azaltılarak yaşamı tehdit eden trombozların önlenmesi ile aşırı kanamanın önlenmesi için yeterli pıhtılaşmanın oluşumu arasındaki dengenin sağlanmasıdır.

Antikoagülasyonun takibi EKMO yönetiminin esasıdır. Antikoagülasyon takibinde en sık kullanılan test, aktive koagülasyon zamanı (aKZ)'dır. aKZ ile intrensek ve ortak yolakların çalışması değerlendirilir. Bununla beraber aKZ'nin antikoagülasyon durumunu doğru değerlendirme kapasitesi sorgulanabilir (34). aKZ test sonuçlarının koagülopatiden, hipotermi derecesinden, antitrombin seviyesinden, yaştan, hemodilüsyondan ve sıcaklıktan etkilenmesi olumsuzluklara neden olmaktadır (35). Heparinle EKMO sırasında, aKZ için tercih edilen değer, 180-220 saniyedir (36).

Antikoagülasyon takibinde heparin seviyesinin ölçümü altın standarttır ancak bu kolayca ve hızlıca sağlanamaz. Anti-Xa ölçümü, APT ile kıyaslandığında daha iyi sonuçlar ortaya koymuştur (36). Daha önemlisi, APT'den farklı olarak, heparin seviyesinin ölçülmesi, hastanın platelet ve pıhtılaşma faktör seviyelerindeki değişimlere daha az duyarlıdır. Bununla beraber, antikoagülasyon için heparin seviyesinin takibiyle ilgili çalışmalar AKZ ile ilgili olanlara kıyasla çok azdır bu yüzden hedeflenen heparin seviyeleri belirli değildir.

Bazı merkezler, tromboelastogram gibi viskoelastik testleri kullanmaktadır (37). Tromboelastogram, tüm pıhtılaşma sistemini incelemek için kanın viskoelastik özelliklerini ölçen alettir. Tromboelastogram, pıhtılaşmanın sadece başlangıç kısmının değil ayrıca fibrinolizdeki gibi pıhtı çözülmesi hakkında da bilgi sağlar.

Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT), KPB'deki gibi yüksek heparin dozlarının gerekli olduğu durumlar dışında, heparin tedavisinin standart takibinde, evrensel olarak kabul edilmiştir. Yüksek heparin dozlarının gerekli olmadığı, EKMO gibi durumlarda aPTT antikoagülasyonun değerlendirilmesinde değerli bir araçtır. Trombüs gelişimini önleyen aPTT seviyesinin bazalin 1,5 katı olduğu rapor edilmiştir (38).

Heparin, EKMO için hızlı etki gösterdiği, etkisinin kolayca geri çevrilebildiği, ucuz olduğu ve hastalar tarafında kolayca tolere edilebildiği için ilk tercih olmayı sürdürmektedir. Sistemik heparin konsantrasyonuna bağlı olarak, heparinin biyolojik aktivitesi 30 dakika ile 6 saat arasında değişmektedir. Çocuklardaki daha yüksek kan hacmi/vücut ağırlığı oranının varlığı nedeniyle erişkinlerden daha fazla heparin gerekir (39). Ayrıca çocuklardaki daha yüksek metabolik hız da heparin dozunu etkiler.

Geleneksel olarak EKMO için heparin dozu saatte 20-70 U/kg'dır. Heparin konsantrasyonuyla ilgili son çalışmalarda, değerin 0,3-0,7 U/mL olması önerilmiştir (40).

Etkili antikoagülasyon için heparin dozuyla antitrombin seviyesi yakından ilişkilidir. Heparin direnci olarak adlandırılan, azalmış heparin cevabı ve etkili trombin inhibisyonu için, yeterli düzeyde antitrombin gereklidir. Uzamış EKMO süreleri antitrombinin tükenmesine ve hastanın bu seviyeyi koruma yeteneğinin bozulmasına neden olur. Koster ve ark. akut tip A aort diseksiyonu sonrası miyokardiyal yetmezliğe bağlı EKMO uygulamasında, HİT gelişen hastada, direkt trombin inhibitörü bivalirudini kullanmış ve postoperatif kan kaybı ve transfüzyon ihtiyacı yönünden başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (41).

2.1.5. EKMO Yönetimi

Kanülasyon uygun şekilde yapıldıktan sonra, steril koşullarda, normal ekstraselüler sıvıya benzeyen (4-5 mEq/L) izotonik elektrolit solüsyonuyla yıkama yapılır. Yıkama rezervdeki tüm hava kabarcıkları gidene kadar yapılmalıdır. Bu yıkama solüsyonuna % 100 CO_2 eklenerek daha hızlı yapılabilir. Mikroporlu membran, gaz hızlı bir şekilde atıldığından, hızlıca yıkanır (1).

Dolaşım başlatılmadan önce sıvının ısıtılması için ısıtıcı açılmalıdır. Bazı merkezler, yüzeye kan maruziyetinden önce kaplama amacıyla insan albümini (12,5 g) ekleyebilmektedir. Hematokritin % 30-40'a getirilmesi amacıyla eritrosit süspansiyonu eklemek gerekebilir. Yıkama sıvısına kan eklendiğinde, antikoagülasyonun sağlanması için heparin (yıkama solüsyonunun her mL'sine 1 U) ve daha sonra da banka kanındaki sitratın nötralizasyonu için kalsiyum eklenir. Eğer zaman müsaade ederse, dolaşımı başlatmadan önce elektrolit bileşimi ve iyonize kalsiyum değerlerini ölçmek faydalı olabilir (1).

EKMO, klemplerin çözülmesiyle başlatılır ve yavaşça akım istenilen aralığa artırılır. EKMO için istenilen standart başlangıç ayarları tablo 2.2'de listelenmiştir (25).

Tablo 2.2. EKMO'nun başlangıç ayarları- Sidebotham ve ark. (25)'ndan alınmıştır.

Akım	50-80 mL/kg/dk
Gaz akımı	50-80 mL/kg/dk
Fraksiyone solunan oksijen	% 100
Giriş basıncı (santrifügal pompa)	>100 mmHg
Oksijen satürasyonu (dönüş kanülü)	% 100
Oksijen satürasyonu (çekiş kanülü)	>% 65
Arteriyel oksijen satürasyonu	VA: >% 95, VV:% 85–92
Karışık venöz oksijen satürasyonu	>% 65
Arteriyel karbon dioksit	35-45 mmHg
pH	7,35-7,45
Ortalama arteriyel basınç	65-95 mmHg
Hematokrit	% 30-40
Platelet sayısı	>100 000 mm^3

Kalbi dinlendirmek için inotropların kullanımı azaltılmalıdır. Bununla beraber sıklıkla düşük doz inotrop infüzyonu sol ventrikülün boşaltılması amacıyla yapılabilir. EKMO, sağ atriyumun boşaltılmasında iyi iş görürken, sol ventrikül boşalmasında o kadar iyi değildir. Bundan dolayı özellikle ciddi kardiyak yetmezliği olan vakalarda ventriküler gerilmeyi azaltmak çok önemlidir. Bu durumlarda inotrop desteği uygulanmalı ve gerekirse intraaortik balon pompası (İABP) ile de takviye edilebilir. Mekanik dolaşım desteği düşünüldüğünde, İABP, göreceli olarak noninvaziv oluşundan dolayı ilk seçenektir. EKMO'nun sağladığı nabızsız dolaşım problemlere neden olduğundan, İABP sayesinde nabız, koroner dolaşım ve ventriküler art-yük değerlerinde artış olur. Bir diğer seçenek ise sol ventrikülü cerrahi müdahale, EKMO'nun venöz hattına boşaltmaktır. Ayrıca hastanın hipovolemik olmaması da önemlidir (42).

2.1.6. EKMO Endikasyonları

EKMO'nun invaziv doğasından ve ilişkili risklerinden dolayı, diğer klinik stratejilerin ve tedavilerin denendiğine ve uygun hale getirildiğine emin olunduktan sonra, EKMO başlatma kararı alınmalıdır (43).

2.1.6.1. Kalp Yetmezliğinde EKMO

Kalp patolojilerinin yönetiminde, EKMO, kolay uygulanabilir olması ve organ fonksiyonlarını koruması ve yenilemesi nedeniyle, önemli bir yere sahiptir (44). Kardiyak nedenlerle EKMO kullanım endikasyonları tablo 2.3'te gösterilmiştir (20).

Tablo 2.3. Kardiyak nedenlerle EKMO kullanım endikasyonları- Lafçı ve ark. (20)'ndan alınmıştır

1.	Kalp cerrahisinden sonra destek
2.	Kalp naklinden sonra destek
3.	Non-iskemik kardiyojenik şok (fulminan miyokardit veya kardiyomiyopati)
4.	Kalp nakli veya ventriküler destek cihazı yerleştirmek için kısa süreli köprü
5.	Miyokart enfarktüsü
6.	Aşırı doz ilaç
7.	Sepsis kaynaklı miyokart depresyonu
8.	Ekstrakorporeal kardiyopulmoner canlandırma
9.	Miyokardit
10.	Kardiyomiyopati
11.	Konjenital kalp hastalıklarında perioperatif destek
12.	Yüksek riskli hastalardaki kalp kateterizasyon işlemleri için destek
13.	Feokromasitimomadaki ketokolamin krizi veya dolaşım kollapsı

EKMO, kardiyak baypastan iyileşemeyen veya ventriküler destek cihazıyla tedavi edilemeyen, inatçı kalp yetmezliği olan hastalardaki, kalp yetmezliğinin tedavilerinde kullanılmaktadır (45). Maksimum inotrop desteği ve İABP'ye rağmen ısrarlı bir şekilde kardiyak endeksi <2 L/dk/m^2, sistolik kan basıncı <90 mmHg ve laktik asidozu olan hastalar, EKMO için düşünülebilir.

Bütün endikasyonlar içinde en sık endikasyon, KPB'den ayrılamamadır. ELSO'nun 825 erişkin kardiyak EKMO uygulamasının verilerini yayınladığı Ocak 2008 raporunda, postkardiyotomi kardiyak şok sıklığını % 79 (658/825) olarak belirtmiştir (46). Mekanik destek gerektiren postkardiyotomi kardiyak şok sıklığı % 0,5-1'dir. Bu hastalarda sağkalımın % 50 civarında olduğu bildirilmiştir (47). Bu nedenle bu hastalarda EKMO kullanma kararı iyileşebilirliğin sorgulanmasıyla başlamalıdır.

İskemi-reperfüzyon hasarına bağlı miyokart sersemlemesi postkardiyotomi kardiyojenik şokun en önemli nedenidir (48). Geri dönüşümsüz kardiyak yetmezliği olan hastalar da, ventriküler destek cihazı takılana kadar veya kalp nakline kadar köprü olarak EKMO'ya adaydırlar.

2.1.6.2. Solunum Yetmezliğinde EKMO

EKMO desteği gerektiren kardiyak yetmezlik hastaları şu an için çoğunluğu oluşturmakta ve solunum yetmezliğine göre oranı artmaya devam etmektedir. EKMO, yaşamı tehdit eden fakat potansiyel olarak geri dönüşümlü solunum yetmezliği olan hastalarda düşülmelidir (49). KPB ilişkili postoperatif akciğer disfonksiyonu halen ciddi bir komplikasyondur. Kan bileşenlerinin yapay yüzeye teması, enflamatuvar cevaba ve serbest radikal aracılı pulmoner disfonksiyona neden olmaktadır. Dahası KPB uygulamasıyla, akciğer dolaşımını sadece bronşiyal arteryal sistem aracılığıyla sürdürdüğünden, iskemik hasara daha yatkındır. İskemi sonrası yeniden kanlanma akciğerdeki adhezyon moleküllerinin sayısını ve ekstravasküler nötrofil birikimini artırır ve dolayısıyla pulmoner endotelyal hücrelerin yapısal ve fonksiyonel hasarı artar. Bu yüzden KPB sırasında, sistemik enflamatuvar cevap ve iskemi-reperfüzyon, KPB ilişkili akciğer hasarı patogenezinde önemlidir (50). İyileşebilirliğin değerlendirilmesinde, solunum yetmezliğinin altında yatan neden, hastanın yaşı, hastalık öncesi fonksiyonları ile mekanik ventilasyonun süresi hesaba katılmalıdır.

2.1.7. EKMO'dan Ayrılma

EKMO'dan ayrılmayla ilgili, standart metot veya teknik yoktur. VV EKMO ile ilgili, hastanın kendi solunum fonksiyonunun değerlendirilmesinde, EKMO akımının değiştirilmesi gerekmez, bu değerlendirme EKMO gaz akımının değiştirilmesiyle yapılır. Pulmoner fonksiyonların düzelmesi sıklıkla 1-3 hafta nadiren de daha uzun süre alır (51). Pulmoner fonksiyonların düzeldiğinin işaretleri:

1. SaO_2'nin SvO_2'den daha fazla devamlı artışı.
2. Sabit akış hızında SaO_2'de artış veya hedef SaO_2'nin sağlanması için gerekli akış hızında azalma.
3. Akciğer kompliyansında artış.
4. Göğüs radyografisinde düzelme.

Eğer gaz değişimi düşük FiO_2'yle (ör. <% 30) ve düşük gaz akış oranlarıyla (ör. <2 L/dk) sürdürülebiliyorsa, ventilatördeki solunum hızı ve pozitif ekspirasyon sonu basınç ayarı çok yüksek olmaması (ör. sırasıyla <25 soluk/dk ve <15 cmH_2O) şartıyla hasta ayrılabilir (51).

Kardiyak fonksiyonların değerlendirilmesi EKMO akımının azaltılmasıyla yapılır. Ancak bu sırada oksijenatör gaz akım ayarlarının değiştirilmesi ve düşük EKMO akımında yüksek staz ve tromboz risklerinden dolayı, heparin dozunun artırılması gerektiğinden, dikkatli olunmalıdır. Transözöfagiyal ekokardiyogram kardiyak iyileşmenin derecesini ve azalmış akıma cevabını değerlendirmek için faydalıdır. Hastalar genelde EKMO'dan hafif inotrop desteğiyle ayrılırlar. İnotrop uygulamasına ayrılmadan birkaç saat önce başlanmalıdır. Dolaşım yavaşça 1-2 L/dk'ya düşürülmelidir. Eğer hasta minimal destekle veya hiç destek yok iken 1-2 saat stabil ise kanüller çıkarılabilir (52).

VA EKMO ile ilişkili olarak kardiyak iyileşmeyi gösteren faktörler ve bu nedenle muhtemel ayrılabilir hasta:

1. Vazodilatörlere ihtiyaç gösterebilen kan basınç artışı, arteriyel basınçtaki nabzın geri dönmesi.
2. Muhtemelen düşük oksijenli kanın, kalp tarafından pompalandığının göstergesi olarak, sağ radial arter hattında pO_2 düşüşü.
3. Santral venöz ve/veya pulmoner basınçların düşüşü.

2.1.8. EKMO'nun Komplikasyonları

EKMO'nun sayısız olası komplikasyonu vardır. Çeşitli komplikasyonları ve insidansları tablo 2.4'te gösterilmiştir (20).

Tablo 2.4. EKMO'nun çeşitli komplikasyonları ve insidansları- Lafçı ve ark. (20)'ndan alınmıştır.

Komplikasyon	**İnsidans (%)**
Kan pıhtıları (oksijenatör, pompa, borular, hemofiltre)	0,13-22
Kanama (cerrahi alan, kanülasyon alanı, gastrointestinal, intrakraniyal, trakeostomi, hemoliz, DİK)	5,3-79
Pompa yetmezliği	4,7-30
Oksijenatör yetmezliği	21-27
Nörolojik ve kas-iskelet sistemi (intrakraniyal kanama, felç, nöbet, ensefalopati)	10-33
Ekstremite iskemisi	13-25
Enfeksiyon	17-49
Böbrek yetmezliği	30-58
Çoklu organ disfonksiyon sendromu	10
Kanülasyon sırasındaki problemler	0,8-8
Hiperbilirubinemi	27

Dolaşım komplikasyonları bakımından, gaz embolisi ve aşırı kan kaybı (boruların rüptürü, bağlantıların kopması) hızlıca yaşamı tehdit eder. Santrifügal pompalarla çekiş kanülü ile pompa başı arasından yüksek negatif basınç oluşturulur. Masif gaz embolisine neden olabilen hava sisteme çoğunlukla buradan girer. Dolaşımda kayıp veya azalma, çoğunlukla hipovoleminin neden olduğu, sık bir komplikasyondur. Diğer sebepleri kardiyak tamponat, tansiyon pnömotoraks ve kanül pozisyon bozukluğudur (25).

Hasta komplikasyonları bakımından, hızlıca yaşamı tehdit eden, özellikle kanülasyon alanından ve cerrahi alandan olan kanama en sık komplikasyondur. Daha az sıklıkta ama muhtemel daha ciddi olanlar gastrointestinal ve intrakranyal kanamalardır. Hemorajinin, koagülopati derecesi ve hastanın platelet sayısıyla

orantılı olmadığı görülmektedir. Hemorajik komplikasyonlar yönünden EKMO süresi çok önemlidir. Dissemine intravasküler koagülasyon (DİK), HİT ve tromboz da olabilir. Kanamanın önlenmesinde en önemli mekanizma korumadır. Bu yüzden bütün invaziv veya cerrahi işlemlerden kaçınılmadır. Platelet sayısı >150 000 mm-3, fibrinojen >200 mg/L ve protrombin oranı <1,5 olmalıdır. aKZ'nin düşürülmesi (normalin 1,2-1,5 katı) gerektiğinde geçici olarak heparin infüzyonu durdurulur veya bivalirudin gibi diğer bir antikoagülan tedaviye geçilir (41). Heparin kaplı sistemlerin, kan hücrelerin travmasını, kompleman ve granülosit aktivasyonunu azalttığı raporlanmıştır (53, 54).

EKMO'nun koagülopatiye neden olduğu bilinmektedir. Koagülopatinin nedenleri heparin uygulaması, trombositopeni, fibrinoliz, üremi ve hepatik disfonksiyondur (25). Temasla fibrinolitik sistemin sürekli aktivasyonu, faktörlerin tüketimi ve dilüsyonu, EKMO başlangıcından sonraki dakikalar içinde gerçekleşir (55).

Tromboz görece sık ve tehlikeli EKMO komplikasyonudur (39). Tromboembolik kompliasyonların gerçek insidansı bilinmemektedir, otopsi çalışmalarında tromboembolik hadise sıklığının klinik gözlemlerden daha fazla olduğu gösterilmiştir (56). 2014 ELSO raporunda oksijenatörde yaklaşık %13 sıklıkta trombüs olduğu belirtilmiştir (57). Bu durum oksijenasyon bozukluğuna ve tromboembolizme neden olabilir. Dolaşım ve oksijenatör gözle kontrol edilmelidir. Günlük D-dimer analizi gelişen pıhtı oluşumunu yakalamamızı sağlayabilir. Her ne kadar EKMO hastalarında D-dimer birçok nedenle yükselse de ani artış ve oksijenasyonda bozulma trombozun kuvvetli göstergesi olabilir (58). Oksijenatörün değerlendirmesinde, oksijenasyonda bozulmanın yanında oksijenatör sonrası basıncın düşüşü de kullanılabilir. Pompada da tromboz olabilir. Bu durum hızlıca gelişip pompa yetmezliğine neden olduğundan hemen saptanmalıdır. Bu durumda pompanın sesinde, intravasküler hemolizde ve hemoglobinüride artış olur. Oksijenatördeki trombüslerin aksine gözle saptanması olası değildir. Saptandığında pompa değiştirilmeli ve antikoagülasyon yeniden düzenlenmelidir (1).

Eğer fibrinoliz saptanırsa (yüksek D-Dimer, tromboelastografi) traneksamik asit gibi bir antifibrinolitik uygulanabilir. Antifibrinolitikler (aminokaproik asit,

aprotinin, traneksamik asit) kanama komplikasyonlarını önlemek için başarılı şekilde kullanılmaktadır (59).

Wittenstein ve ark. rekombinan aktive faktör VIIa'yı EKMO'daki aşırı kanamada uygulamışlar fakat bunun kullanımı ölümcül kanamayla da ilişkili olabilmektedir (60).

Hemoliz, literatürde insidansı % 5-18 arasında değişen, bir diğer iyi tanımlanmış EKMO komplikasyonudur (61). Eğer idrar pembe renk alırsa (mesane kanamasına bağlı olabilir hemolizden kaynaklanmayabilir) şüphelenilmelidir ve serbest plazma hemoglobini (sHb) ölçülerek doğrulanmalıdır. Normal sHb 10 mg/dL'den düşük olmalıdır ve 50 mg/dL'nin üzerindeki değerlerin kaynağı araştırılmalıdır. Yüksek değerler, hasta veya EKMO dolaşımı kaynaklı olabilir. Pompa, tek başına emiş basıncı 300 mmHg'yi geçmedikçe hemolize neden olmaz. Özellikle santrifügal pompalarda çemberde pıhtı olması da hemolize neden olabilir. Çok dar bir açıklıktan yüksek hızlı kan akımı olursa hemolize neden olabilir. Bu durum dönüş kanülünde yüksek direnç varlığında veya pompa sonrasında yüksek derece tıkanma olduğunda ortaya çıkabilir. Hemoliz ayrıca dolaşıma hemofiltre veya plazmaferez cihazları eklendiğinde ve yüksek akımda çalıştıklarında da olabilir (1).

Özellikle periferik VA EKMO'nun lokal komplikasyonlardan en dikkat çekeni bacak iskemisidir. Yüzeyel femoral arterde olması gereken kanül, yanlışlıkla ana femoral artere yerleştirilebilir. Açık işlemlerde, Şiddetli bacak iskemisiyle, hastaların % 6'sında, fasyatomi gerekli olabilir (42).

Bir diğer hasta komplikasyonu enfeksiyondur. Enfeksiyon, EKMO hastalarında diğer cerrahi yoğun bakım ünite hastalarından daha sık görülür. Bununla beraber enfeksiyonun yeri (kan, alt solunum yolları, üriner sistem ve yara yeri) ve neden olan mikroorganizmalar (gram negatif basil ve stafilokok) aynıdır (62).

Hemodinamik bozulma, hem EKMO uygulamaları hem de farklı sebeplerle olabilir. VA EKMO dolaşımı tamamen desteklediğinden, bu işlem sırasındaki hipotansiyon, azalmış vasküler direncini gösterir. VV EKMO hemodinami üzerine direkt etkisi yoktur bu yüzden bu sırada hipotansiyon azalmış vasküler dirençten, azalmış ön-yükten veya kardiyak fonksiyon bozukluğundan kaynaklanabilir. Özellikle mitral ve

aort kapak kaçağı olan hastalarda, VA EKMO sırasında sol ventrikül gerilimi olabilir. Bu komplikasyon sıklıkla göğüs radyografisinde alveoler ödem varlığıyla veya EKMO başlamasında kısa süre sonra endotrakeal tüpten ödem sıvısının köpürmesiyle tanınabilir. Artırılan pompa hızıyla pulmoner akım azaltılarak bu problem hafifletilebilir. Bu başarılamazsa, sol kalp, cerrahi olarak veya perkutan atriyal septostomiyle uygulanan kateterle boşaltılmalıdır (63).

Hipoksemi de diğer bir hasta komplikasyonudur. VA EKMO daima yeterli SaO_2 sağlar. Fakat önemli miktarda ventriküler ejeksiyonun varlığında ve akciğer fonksiyonları bozuk olduğunda özellikle vücudun üst kısmında hipoksemiyle sonuçlanabilir. Bu durum özellikle, VA EKMO izole solunum yetmezliğinde kullanıldığında sıklıkla olur. VV EKMO'da hipokseminin en sık nedeni yetersiz akımdır. Diğer sebepler sepsis, yetersiz sedasyon, aşırı sıcak, aşırı besle(n)me, nöbetler veya tekrar dolaşımdır.

EKMO'yla ilişkili en sık nörolojik komplikasyon intrakraniyal kanamadır. Raporlanan vaka sıklığı % 1,6'dan 18,9'a kadar değişmektedir (64, 65). Diğer nörolojik komplikasyonlar iskemik felç ve nöbetlerdir (44). İntrakraniyal kanama ve/veya iskemik felç, sistemik heparinizasyon, trombositopeni, karotid arter ve juguler venin bağlanması, koagülopati veya sistemik hipertansiyon kaynaklı oluşur.

Böbrek yetmezliği sık olmayan bir diğer komplikasyondur. Sıklıkla sHb artışı veya dolaşım bozukluğundan kaynaklanır. Oligüri, EKMO'nun erken aşamalarında sıklıkla görülür. Akut tübüler nekroz, hemofiltrasyon veya hemodiyaliz gerektirebilir.

2.2. HEMOLİZ

Latince hemo (kan) ve lizis (parçalanma) kelimelerinden oluşan hemoliz, hemoglobin (Hb) salınımına neden olan eritrosit membranlarının parçalanması olarak tanımlanır. Bu durum normal fizyolojik süreçte yavaş bir şekilde olsa da patolojik durumlarda hızlanır (66).

Temel olarak, *in vivo* ve *in vitro* olmak üzere, iki tip hemoliz vardır. *İn vivo* hemoliz, temel olarak hemolizin olduğu yere göre de intravasküler ve ekstravasküler olmak üzere ikiye ayrılır (67). Eritrositler retiküloendotelyal sistemde yıkılabilir (ekstravasküler hemoliz) veya daha nadir olarak eritrositler dolaşımda parçalanabilir (intravasküler hemoliz). Ekstravasküler hemoliz, daha çok otoimmün anemilerdeki gibi immünoglobilin bağlanmış eritrositlerin veya eritrositlerin şekil değiştirebilme özelliklerini azaltan etkenlerle, retiküloendotelyal sistemde yıkımıyla ilişkiliyken, intravasküler hemoliz, eritrositlerin travması veya kompleman bağlamalarında artış ya da eksternal toksinlerle olabilir. Ekstravasküler hemolizde bilirubin ve retikülosit sayılarında artış gözlenebilirken, intravasküler hemolizde, haptoglobin seviyesi azalır, LDH, indirekt bilirubin, ürobilinojen ve retikülosit sayısında hemolizle orantılı olarak artış gözlenir. LDH artışı özellikle LDH1 ve LDH2'de belirgindir (68). *İn vitro* hemoliz ise hastanın kan alımından örneğin analizine kadar herhangi bir aşamada oluşabilir (69).

2.2.1. Eritrositler ve Hemoglobin

Eritrositler, eritropoez olarak adlandırılan, kemik iliğinde öncü hücreleri olan pronormoblastlardan, yaklaşık bir hafta süren bir süreçte gelişip dolaşıma çıkarlar. Bikonkav disk yapıda olan eritrositlerin temel fonksiyonu, sitoplazmasının yaklaşık üçte birini (% 34) dolduran, hemoglobini taşımak ve fonksiyonel halde tutmaktır. Çapları 7,5 - 8,7 μm arasında değişen eritrositlerin kalınlıkları merkezde 0,6 μm ve kenarlarda 2,8 μm'dir. Eritrositlerin ortalama hacmi ise 90 fL'dir. Ortalama eritrosit sayısı, erkeklerde 4,2 - 6,2 x 10^{12}/L ve kadınlarda 3,8 - 5,5 x 10^{12}/L kadardır (70). İnsan eritrositlerinin dolaşımda ortalama 120 gün ömrü vardır. Bu süre boyunca dereceli olarak yaşlanan ve belirli enzimatik aktivitelerini kaybeden eritrositler, retiküloendotelyal sistem makrofajları tarafından fagosite edilerek dolaşımdan temizlenirler (71).

Eritrositlerin ana bileşeni hemoglobindir (Hb). Hb temel olarak, O_2 molekülüne geri dönüşümlü bağlanarak, O_2 taşıyıcısı olarak fonksiyon görür. Hb tam olarak doygunluğa ulaştığında gramı başına, 1,34 mL O_2 taşıyabilir. Hb molekülü, her

birine hem molekülü bağlı, dört protein zincirinin (globinler) bir araya gelmesiyle oluşur. Hem grubu, tetrapirol halka ve bunun merkeze yönelik dört nitrojen atomuyla bağlanan demir atomundan oluşur. Demirin proksimal histidinin (F8) imidazol halkasının nitrojeniyle ilişkisi sonucu, hem globüler protein yapısına bağlanır. Bu durumda demirin bir bağ bölgesi boşta kalarak geri dönüşümlü olarak gaz yapıdaki molekülleri (normalde O_2 fakat CO ve NO de) bağlayabilir. Pulmoner kapillerdeki, yaklaşık 100 mmHg parsiyel O_2 basıncında, Hb % 95-98 doygunluğa ulaşır. Dokularda düşük O_2 basıncında ise dokudaki O_2 basıncıyla ters orantılı olarak, bağlı O_2 molekülleri Hb'den ayrılır. Hb'nin bir diğer önemli fonksiyonu da dokulardaki yüksek CO_2'nin uzaklaştırılmasında yer almasıdır. Redükte Hb (Hb), demirin O_2 ile ilişkide olmadığı hemoglobindir. Her bir hem grubu bir molekül O_2 ile bağlandığında buna oksihemoglobin (HbO_2) denir. Hem redükte Hb'de hem de HbO_2'de demir ferröz (Fe^{2+}) formdadır. Demir, ferrik (Fe^{3+}) duruma okside olduğunda methemoglobin (hemiglobin, Hi) oluşur ve O_2 ve CO_2 taşıma kapasitesini kaybeder (72, 73).

2.2.2. Hemoglobin Metabolizması

Başlıca kemik iliği (% 80-90) ve karaciğerde (% 10-20) yapılan hem sentezi, hücrenin mitokondri ve sitozolik fraksiyonlarında gerçekleştirilir. Karaciğerde mikrozomal enzimler için gerekli olan hem sentezi bir yana bırakılırsa geri kalan sentezin neredeyse tamamı kemik iliğinde yapılır. Eritropoezin belirli aşamalarında gerçekleştirilen hem sentezi olgun eritrositlerde yapılamaz. Eritrosit öncülerinde sentezlenen hem, globinle birleştirilerek sitozolde depolanır. Eritrositler dolaşımda son halini aldığında sitoplazmalarının yaklaşık üçte biri Hb ile doludur (70).

Normal şartlardaki 120 günlük ömrünü tamamlayan eritrositler, retiküloendotelyal sistem makrofajlarınca tutularak yıkılır (ekstravasküler hemoliz). Bu sırada salınan Hb yine makrofajlarda hem ve globin yapılarına ayrılır. Globin, amino asitlerine yıkılırken, hemden serbestleşen demir, ferritin depolarına alınarak yeniden kullanılabilir. Hemin tetrapirol halkaları ise bilirubine çevrilerek safrayla atılır. Ekstravasküler hemolizden farklı olarak, eritrositlerin intravasküler yıkımında

serbestleşen Hb, yıkılmak yerine, dolaşıma geçer. Burada Hb, ya haptoglobin (Hp)'e bağlanır veya methemoglobine okside olur. Hb-Hp kompleksi, monosit veya doku makrofajları tarafından ifade edilen CD163 yüzey çöpçü reseptörü aracılığıyla endositozla dolaşımdan hızlıca temizlenir. Bu yolla Hp fizyolojik koşullarda plazma sHb birikimini önler (9). Hemolizin bir diğer yan ürünü olan serbest hem, serbest Hb'nin oksidasyonu sırasında salınır ve dolaşımdaki hemopeksin (Hpx) tarafından temizlenir. Mikrovasküler dolaşımdaki bozulmanın sonucu olarak aktive olan hem oksijenaz (HO)-1 hemi başlıca karaciğer ve dalakta karbon monoksit (CO), biliverdin ve demire yıkar. Hb-Hp ve hem-Hpx kompleksleri dolaşımdan alındıktan sonra, Hp ve Hpx sıklıkla tekrar dolaşıma verilmediğinden hemoliz sonrası düzeyleri azalır. Bu durum, toksik ürünler olan Hb ve hem düzeylerinin artmasıyla sonuçlanır (74).

2.2.3. Ekstraselüler Hemoglobin ve Toksisitesi

Her ne kadar Hb, O_2 taşınmasında hayati olsa da fonksiyonel non-toksik durumda kalması için eritrositler içerisinde tutulmalıdır. Normal fizyolojiyle toksisite arasındaki denge, eritrositler tarafından sunulan fizyolojik ve biyokimyasal bariyerlere bağlıdır. Dahası eritrositler, Hb'nin bu fonksiyonel non-toksik durumunun korunmasında, eşsiz enzimatik mekanizmalara sahiptir (9). Bununla beraber, eğer bu sistem, intravasküler hemoliz gibi nedenlerle bozulursa, hem grubunun serbest radikal aktivitesiyle ilgili çok sayıda toksik ve potansiyel tehlikeli etkileri olabilir. ELSO, yayınladığı rehberlerinde, EKMO uygulanan hastalarda, intravasküler hemolizin, serbest plazma hemoglobini (sHb) ölçümü yapılarak takip edilmesini önermektedir (1). Yine bu rehberlerde, 10 mg/dL üzerindeki sHb değerlerinin hemoliz varlığını gösterdiği belirtilirken, 50 mg/dL seviyelerinin üzerindeki sHb nedeninin araştırılması gerektiğini belirtmektedir.

sHb'nin toksisitesine aracılık eden reaksiyonlar aşağıda gösterilmiştir. İlk olarak, oksi-Hb molekülündeki ferröz demir (Fe^{2+}), spontan otooksidasyona uğrayarak ferrik iyon (Fe^{3+}) ve süperoksit radikali ($O_2^{\bullet-}$) üretir.

$$Fe^{2+} + O_2 \rightarrow Fe^{3+} + O_2^{\bullet-}$$

Süperoksit daha sonra hidrojen peroksite (H_2O_2) dismutasyona uğrar ve ferrik (Fe^{3+}) proteinler bu peroksitle reaksiyona girerek reaktif ferril demir (Fe^{4+}) ile protein kaynaklı serbest radikal ($R^{\bullet+}$) oluşumuna neden olabilir (75).

$$RFe^{3+} + H_2O_2 \rightarrow R^{\bullet+} + Fe^{4+}$$

Hem protein kaynaklı radikaller hem de ferril iyonları, proenflamatuvar, prooksidan, toksik ve hücre membranlarını hasara uğratabilen kuvvetli oksidan moleküllerdir (76). Demir ve hem gibi Hb metabolitleri, lipitlere, proteinlere ve DNA'ya direkt oksidasyonla ve/veya reaktif oksijen türleri (ROT) oluşumuyla hasar verebilir (77). Lipofilik tabiatından dolayı hem grubu, membranların arasına girer ve hücre iskeleti üzerine stabilizasyonu bozucu etki gösterir (78). Yüksek redoks potansiyelinden dolayı, hem protein kaynaklı radikal hem de ferril iyonu çok sayıda oksidasyon reaksiyonunu indükleyebilir. Bu oksidasyon reaksiyonları, *in vivo* gerçekleştiğinde bunlar da çok sayıda fizyolojik ve patofizyolojik cevabı uyarır.

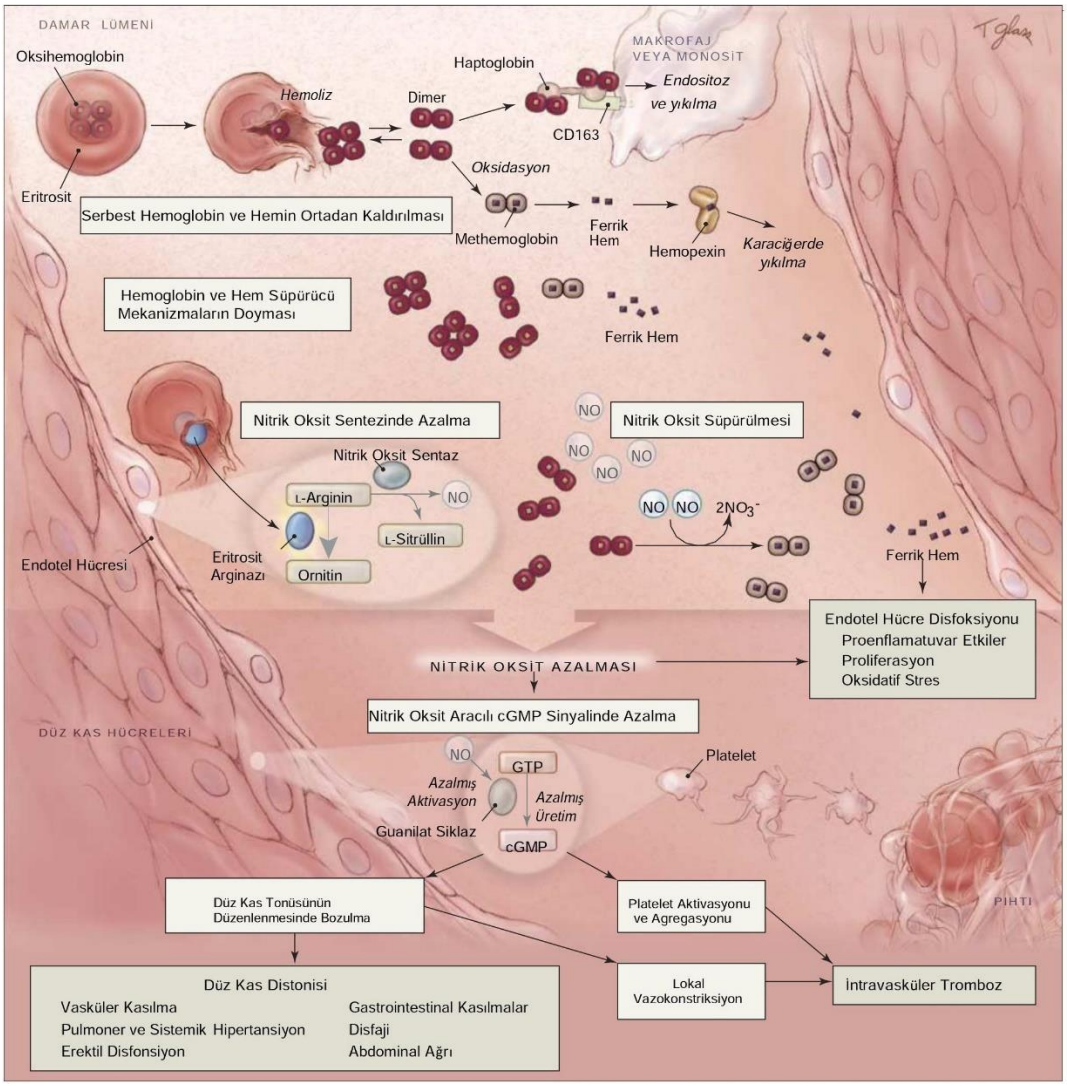
Ayrıca, oksi-Hb (O_2Hb)'nin, en önemli endojen vazodilatör olan, NO'nun güçlü süpürücüsü olduğu gösterilmiştir (9). Oksijene Hb ve NO'nun hızlı (6-8 X 10^7 $M^{-1}.s^1$) ve geri dönüşümsüz reaksiyonu, Hb'nin methemoglobine ve NO'nun nitrata (NO_3^-) dönüşümüyle sonuçlanır.

$$Fe^{2+}O_2Hb + NO \rightarrow Fe^{3+}Hb + NO_3^-$$

Dolaşımdaki Hb ayrıca deoksijene formda da bulunur. Bu deoksijene Hb S-nitrozile Hb oluşumuyla da NO'nun azalmasına neden olur fakat bu reaksiyon hem yavaş (10^7 $M^{-1}.s^{-1}$) hem de geri dönüşümlüdür (79).

$$Fe^{2+}Hb + NO \rightarrow Fe^{2+}NOHb$$

Üçüncüsü, hemoliz eritrositlerden, NO sentezi için substrat olan L-arginini ornitine dönüştüren, arginaz-1 salınımıyla sonuçlanır (80). Bu yolla hemoliz, sadece NO süpürücüsü olarak kalmayıp onun sentezini de önler (Şekil 2.3) (9).



Şekil 2.3. İntravasküler hemolizin NO metabolizmasına etkileri- Rother ve ark. (9)'ndan alınmıştır.

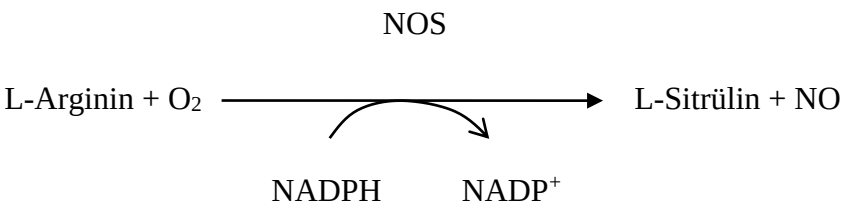
İntravasküler hemoliz sırasında hemoglobin, normalde haptoglobin ve hemopeksinin yer aldığı plazmaya salınır. Hemoglobin-haptoglobin kompleksinin makrofaj/monosit yüzeyindeki CD163'e bağlanması kompleksin endositozunu ve yıkımını başlatır. Hemoglobin ayrıca oksidasyonla, hemopeksine bağlanarak hepatositlerde yıkımı sağlanan, ferrik hem salınımına da neden olur. Aşırı hemoliz bu hemoglobin temizleyici sistemin doygunluğa ulaşıp tükenmesine neden olarak plazmada hemoglobin ve hemin artışına yol açar. Plazma hemoglobininin ve hemin, endotelyal hücreler üzerinde direkt proenflamatuvar, proliferatif ve prooksidan etkileri vardır. Nitrik Oksit (NO), normalde endotel hücrelerinde nitrik oksit sentaz (NOS) enzimlerinde L-argininden üretilir. NO düz kas hücrelerinin gevşemesini ve platelet aktivasyonunu ve agregasyonunu inhibisyonunu sağlar, bu yüzden vasküler tonüsü düzenleyerek organ/sistem homeostazını destekler. İntravasküler hemoliz sırasında NO miktarı, oksihemoglobinle reaksiyonu ve NO sentezinin substratı L-argininin eritrosit arginazı tarafından yıkılması nedeniyle, artan NOS seviyelerine karşın, aşırı derece azalabilir. NO azalması, siklik guanozin 3', 5'-monofosfat (cGMP) üretimi için gerekli olan guanilat siklaz aktivasyonunda azalmayla sonuçlanır. Azalan cGMP seviyeleri düz kas tonüsünün düzenlenmesini bozarak, sistemik ve pulmoner hipertansiyon, erektil disfonksiyon, disfaji ve abdominal ağrıyı içeren distoniyle sonuçlanır. NO azalmasıyla azalan cGMP seviyeleri ayrıca platelet aktivasyon ve agregasyonuna yol açarak pıhtı oluşumuna neden olur. GTP: Guanozin 5'-trifosfat.

Sonuç olarak hemoliz, NO biyoyararlanımını anlamlı olarak bozar (81). NO, güçlü vazodilatör molekül olduğundan, *in vivo* hemoliz modelinde sHb ilişkili NO azalması sistemik vazokonstriksiyon ve renal fonksiyonlarda azalmayla ilişkili olduğu bulunmuştur (82). Normalde Hb'nin eritrositte sınırlandırılması *in vivo* NO tüketimini ve buna bağlı gelişebilecek vazokonstriksiyonu önler (83).

2.2.3.1 Nitrik Oksit (NO)

1980 yılında, asetil kolin etkisiyle endotel hücrelerince üretilip damar düz kasını gevşetici özelliği bulunan bir madde bulunduğu bildirilmiştir. Bu nedenle bu maddeye endotel kaynaklı gevşetici faktör (EDRF) ismi verilmiştir. Daha sonra, EDRF'nin aslında NO olduğunu anlaşılmıştır (84-86).

Gaz yapıda, renksiz bir molekül olan NO, organik çözücülerde sudan daha iyi çözünür. Bu nedenle lipit bariyerleri rahatça geçip hücrelere girebilmektedir. Vücudumuzda NO sentezi, nitrik oksit sentaz (NOS, EC 1.14.13.39) enzimiyle, L-arginin ve O_2'den katalizlenmektedir. Bu reaksiyonda ek olarak, redükte nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH), flavin adenin dinükleotit (FAD), flavin mononükleotit (FMN), tetrahidrobiopterin, hem ve kalmodulin gibi diğer moleküller de yer alır (87-90).



Üç farklı izoforma sahip olan NOS'un, izoformları ve özellikleri tablo 2.5'te görülmektedir. Sabit miktarda NO sentezini devamlı olarak yapan eNOS ve nNOS enzimleri başlıca sinir sistemi ve vasküler düz kaslarda bulunmaktadır. Ca^{+2} ve kalmodulin bağımlı olan bu iki form, yapısal izoformlardır. iNOS izoformu ise aktive makrofajlar, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler ve hava yolu epiteli gibi çok çeşitli hücrelerde bulunmakta ve sentezi tümör

nekroz faktör-α ve interlökin-1β gibi sitokinler, bakteriyel toksinler ve oksidan moleküller tarafından indüklenmektedir. iNOS enziminin aktivitesi Ca^{+2}'dan bağımsızdır. Eğer ortamda arginin bulunmaya devam ederse, sürekli aktif halde kalır. Bu nedenle de uzun süreli ve yüksek konsantrasyonda NO sentezinden sorumludur (91, 92).

Tablo 2.5. NOS izoformları ve özellikleri- Özkan ve ark. (89)'ndan alınmıştır.

NOS İzoform	**Diğer Adı**	**Salınım**	**Kaynak**	**Regülasyon**	**NO Miktarı**	**Kromozom**
Tip I	nNOS	Devamlı	Sinir hücreleri	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)	12
Tip II	iNOS	İndüklen-diğinde	Makrofaj, damar düz kası, damar endoteli, miyokard, endokard, hepatosit, immün hücreler, hava yolu epiteli	Sitokinler, endotoksin ve oksidanlar tarafından indüklenme	Yüksek (nmol)	17
Tip III	eNOS	Devamlı	Vasküler endotel hücreleri, plateletler, miyokard ve endokard, mast hücreleri, nötrofiller	Kalsiyuma bağımlı	Düşük (pmol)	7

NO: nitrik oksit, NOS: nitrik oksit sentezleyen enzim, nNOS: nöral NOS, iNOS: indüklenebilen NOS, eNOS: endotel kökenli NOS

NO'nun yarılanma ömrü oldukça kısadır ve hızla okside olarak nitrit (NO_2^-) ve nitrata (NO_3^-) dönüşmektedir. NO, Fe^{2+} ile ve ferröz bileşenlerle stabil kompleksler oluşturmaktadır. *İn vivo* üretilen NO'nun büyük kısmı hemoglobinin hem gruplarıyla etkileşimi sonucunda kaybedilmektedir. Bu bağlanma, O_2'ye göre 3000 kat daha hızlıdır ve bu kadar hızlı inaktive olması NO'nun etkilerini lokalize kılan en önemli faktörlerden biridir. NO'nun çeşitli geçiş metallerine ilgisi bilinen bir gerçektir. Pek çok fizyolojik etkisini de guanilat siklaz enzimindeki Fe^{2+}'ye bağlanmasıyla gerçekleştirir. Bu şekilde ikinci haberci olarak fonksiyon gösterir. Endotel hücrelerince sentezlenen NO, vasküler düz kas tabakasına ulaştığında, guanilat

siklazın sitozolik formuna bağlanır ve aktive eder. Bu sayede cGMP üretimi artar. Bunun etkisiyle protein kinazlar (PKG1 ve PKG2) aktive olur. PKG I, NO'nun etkilerinden asıl sorumlu olan izoenzimdir. Bunun sonucunda potasyum kanalları fosforile, Ca^{2+} kanalları hiperpolarize olur ve hücre içi serbest Ca^{2+} azalarak kalsiyum-kalmodulin-miyozin hafif zincir kinaz kompleksinin oluşumu azalır. Bunun sonucunda vasküler kas gevşeyerek damarın genişler ve kan basıncı düşer. Ayrıca NO, trombositlerdeki, çözünür guanilat siklaz reseptörü üzerinden etki ederek, trombositlerin adezyon ve agregasyonunu azaltmaktadır. Ek olarak, mikroorganizmaların mitokondriyal proteinlerine bağlı demir bileşikleriyle reaksiyona girip, DNA sentezini bozarak ölümlerine yol açtığından savunma sisteminde de rol oynamaktadır (87-89, 93).

2.2.4. Mekanik Dolaşımlarda Hemoliz

Mekanik destek sistemlerinde hemoliz başlıca iki yerden kaynaklanır: Mekanik dolaşımım kendisi ve eritrosit transfüzyonu (10).

2.2.4.1. Mekanik Dolaşım

Mekanik dolaşım, pompa, borular, kanül, rezervuar ve oksijenatördeki türbülans ve kayma direnciyle, değişen miktarlarda eritrosit hasarı oluşturur. Kan-hava teması, kan-nonendotel yüzey teması, pozitif/negatif basınçlar ve rezervuar kullanımı gibi bütün nedenler hemoliz gelişimine neden olabilir. Ek olarak mekanik destek süresi de hemoliz derecesiyle doğru orantılıdır (94). Mekanik dolaşım, direkt eritrosit hasarının yanında, mekanik dolaşımın kesilmesinden sonra artan sHb seviyeleriyle açıklanan, hafif eritrosit hasarına da neden olur (95). Bu şekilde hafif hasarlanan eritrositlerin daha sonra oluşan *in vivo* hemolize daha yatkın oldukları gösterilmiştir (94). Ayrıca EKMO dışında uygulanan hemofiltrasyon ve hemoperfüzyon sistemlerinin de hemolize neden olabildiği bilinmektedir.

2.2.4.2. Eritrosit Transfüzyonu

Depolanmış eritrosit transfüzyonu da sHb'de artışa yol açan diğer nedendir. Eritrositlerin depolanması, yapışma ve çökelme özelliklerinde artış ve proenflamatuvar maddelerin birikiminin yanında, membran yenilenmesinde ve oksijen bağlama kapasitesinde azalma gibi geri dönüşümsüz değişikliklere neden olmaktadır. Ayrıca kan ürünlerinin saklanma süresinin de transfüzyon ilişkili morbidite ve mortalite üzerine etkisi vardır. Uzun süreli beklemiş kan kullanımı uzamış solunum desteği, artmış böbrek yetmezliği insidansı, sepsis ve çoklu organ yetmezliğiyle de ilişkili olduğu bulunmuştur. Yakın zamanda, eritrosit transfüzyonunun, tranfüze edilen her ünite başına, sistemik sHb seviyesinde 7,5 µM artış yaptığı bildirilmiştir (96). Kardiyak cerrahi hastalarında ortalama transfüzyon ihtiyacı 2 ünite olarak bildirilirken torakoabdominal açık aort anevrizma onarımında 10 ünite olduğu bildirilmiştir (97). 2-10 ünite eritrosit transfüzyonu plazma sHb seviyelerinde 15-75 µmol/L artış yapabilir. Bu seviyeler normal sağlıklı gönüllülerdeki sHb seviyelerinden (0,1-0,2 µmol/L) çok yüksektir (96). Ayrıca depolanmış eritrositlerle direkt sHb transfüzyonunun yanında, depolanmış eritrositlerin canlılık özelliklerindeki azalmadan dolayı parçalanmalarıyla da ek sHb oluşur.

2.2.5. Hemolizin Zararlı Etkilerinden Koruyucu Mekanizmalar

İnsanlarda, hemoliz sonucu oluşan sHb'nin ve hemin zararlı etkilerine karşı, birkaç farklı savunma mekanizması tanımlanmıştır.

2.2.5.1. Haptoglobin

Hb toksisitesine karşı koruyucu olan proteinlerden en önemlilerinden birisi Hp'dir. α2 bandında yer alan Hp, en fazla hepatositlerde sentezlenir. Fazla miktarda bulunan akut faz proteinidir ve stres, enfeksiyon, doku nekrozu ve akut enflamasyonda sentezinin artışıyla miktarı artar. İnsanlarda dolaşımdaki seviyeleri 0,3'ten 3

mg/mL'ye çok değişkendir. Bu geniş aralık, farklı alt tiplerinin ölçüm özelliklerinden kaynaklanır. Dolaşımdaki yarı ömrü yaklaşık 4 gün olan Hp, Hb ile kompleks yaptığında dakikalar içinde retiküloendotelyal sistem tarafından temizlenir. Hb ve Hp arasındaki bağlanma biyolojik sistemlerdeki bilinen en kuvvetli nonkovalent etkileşimlerden biridir ve düşük ayrışma sabiti ($K_d=10^{-15}$) vardır. Eğer Hb 50–200 mg/dL'yi (8–31µmol/L) aşarsa Hp azalır ve böylece Hb idrara geçer ve böbrekte birikerek toksik etki yapar (73, 98). Ayrıca Hp miyoglobini bağlamadığından, rabdomyoliz gibi miyoglobin artışı olan durumlarda, koruyucu değildir.

Monomerik Hp, bir α ve bir β olmak üzere iki zincirden oluşur ve tek bir öncü proteinden sentezlenir. Hp 1 ve Hp 2 insan Hp gen alelleri iki farklı ağırlıkta α-zincir (sırasıyla α1 yaklaşık M_a=9 kDa, α2 yaklaşık M_a=16 kDa) üretirken yaklaşık M_a=33 kDa ağırlıkta β-zincir üretirler. Memelilerde α ve β zincirler birbirine disülfit bağıyla bağlanır ve çoğu türde α zincirler birbiriyle de disülfit çapraz bağları kurarak iki αβ alt ünitenin birleşmesini sağlar. Bu yüzden, her iki kromozomda Hp 1 aleline sahip olan Hp 1-1 homozigot bireyler, α1-zincirler arasında tek bir disülfit bağıyla dimer oluştururken, Hp 2-1 ve 2-2 bireyler, daha yüksek sayılı düzene sahiptir (α2 zincirler iki disülfit bağı kurduğundan). Hp, Hb αβ dimerlerine bağlanır. Hp'nin bütün monomerik formları ve Hp 1-1 dimerleri Hb dimerlerine yüksek afiniteyle bağlanır. Polimerik Hp formları da Hb'ye bağlanabilir ancak monomerlere ve dimerlere göre çok daha düşük afinite gösterir. Alt tipine bağlı olarak, Hp 0,07-0,15 g/dL arasında hemoglobin bağlayabilir (99-101).

Hp fenotipleri arasında, önemli biyolojik ve klinik sonuçları olan farklılıklar rapor edilmiştir (102). Örneğin fazla sayılı polimerik Hp moleküllerinin ekstravasküler sıvıda dağılımı moleküler kütleleriyle kısıtlanır. Sonuç olarak, Hp 2-2 bireylerde, ekstravasküler alanda Hb koruyucu kapasite sınırlıdır. Örneğin tip 2 diyabeti olan ve Hp 2-2 bireyler, daha yüksek vasküler komplikasyon riski taşırlar. Fenotipler arsındaki diğer farklılıklar; antijenik aktivite ve makrofaj reseptörlerine bağlanmayı içermektedir. Hb-Hp kompleksi, sHb'nin böbrekler tarafından filtrasyonu ve temizlenmesini engelleyerek, Hb'yi makrofaj CD163 reseptörüne yönlendirerek endositozunu ve yıkımını sağlar. Makrofajlardaki hem oksijenaz enzimi Hb'nin hem grubunu bilirubin ve karbon monoksite yıkar. Hb'nin direkt olarak CD163'e

bağlanmasının da ikincil temizlenme mekanizması olduğu bildirilmiştir (103). Hb-Hp'nin CD163'e bağlanması bazı sitokinlerin ve nonenflamatuvar aracıların üretimine ve antioksidan genlerin aktivasyonuna neden olur (104). Literatürde Hp'e bağlanmayla Hb'nin oksijen bağlama ve redoks reaksiyonlarının inhibe olmadığı belirtilmektedir. Ayrıca Hb-Hp kompleksi oluşsa bile, Hb NO bağlama özelliklerini sürdürür. Benzer şekilde H_2O_2 ile de reaksiyona girebilir (105). Ayrıca önemli bir akut faz proteini olan Hp'nin konsantrasyonu enflamatuvar durumlarda artmaktadır (106).

Yine de Hp'nin Hb molekülünü otooksidasyon dâhil oksidatif atağa karşı da koruyabileceği belirtilmiştir. Hb molekülündeki oksidasyona yatkın yüzeysel amino asitlerin korunmasına ek olarak Hp, hem aktif bölgesini engellemeyerek oksidanların temizlenmesini sağlar (107). Hb α alt biriminin bir tirozin rezidüsünün (αTyr42), ferril Hb'nin otoredüksiyonunu kolaylaştıran bir devre gibi davranarak hem grubu elektron verip aldığı, gösterilmiştir (108).

2.2.5.2. Hemopeksin

Hemin, hemopeksin (Hpx) tarafından (yüksek dansiteli lipoprotein (HDL), düşük dansiteli lipoprotein (LDL), plazma albümini ve α1-mikroglobin ile beraber) temizlenmesi, oksidatif hasara karşı koruma sağlar, Plazmada hemin görülmesinden birkaç saniye sonra % 80'den fazlası HDL ve LDL'ye % 20'si ise Hpx ve albümine bağlanır. Hem daha sonra HDL ve LDL'den yavaşça uzaklaştırılarak Hpx'e geçer (109). İnsan Hpx'i 439 amino asit rezidüsü içeren ve altı zincir içi disülfit köprüsü bulunan, tek bir polipeptit zincirinden oluşur. Polipeptit zinciri, her birinin 20 rezidülük bağlantılarla bağlandığı, iki adet yaklaşık 200 rezidülük homolog domainlerden oluşur. Hem, iki domaininin arasına bağlanır. İki histidin, hem demirini düzenler ve stabil bis-histidil Fe^{3+} kompleksi oluşturur (110).

Hem bağlanma bölgesinin göze çarpan özelliği aromatik ve bazik rezidülerin bolluğudur (111). Hem cebinin yapısı ve yerleşimi, Hpx tarafında yüksek afiniteli fakat geri dönüşümlü hem bağlanmasıyla ilişkilidir ve demir bağlayıcı transferin gibi

diğer yüksek afiniteli bağlanma proteinlerinin dizaynına tamamen uyar. Hem bağlanması ve serbestleşmesi, iki β-domaininin ve/veya domainler arası bağlantı peptitlerinin hareketiyle, hem cebinin açılıp kapanması sonucunda olur (112).

Hpx bağlı hemi taşır ve LDL reseptörü ilişkili CD91 proteiniyle etkileşim sonucu reseptör aracılı endositozla hücre içine alınır. İnsan Hpx-hem reseptörü makrofaj, hepatosit, nöronlar ve sinsityotrofoblastları içeren birkaç hücre tipinde ifade edilir. Hemi taşıdıktan sonra hem grubu yıkılır ve sağlam Hpx ise kan dolaşımına geri salınabilir (109).

2.2.5.3. Hem Oksijenazlar

Hem oksijenazlar (HO), özellikle serbest hem grubunun yıkılmasında rol oynayan sitozolik enzimlerdir. İki HO izoformu tanımlanmıştır: HO-1, ifadesi çeşitli çevresel stres durumlarında indüklenir. HO-2 ise yapısal olarak ifade edilir. Üçüncü bir (HO-3) genetik varyantı da tanımlanmıştır ancak muhtemelen ifadesi yoktur. HO-1 ve 2 ayrı genlerin ürünleridir ve amino asit sekansları, yapıları ve boyutları farklı olmasına rağmen, benzer katalitik aktiviteleri ve özgüllükleri vardır (113, 114).

Her iki enzim de mikrozomal NADPH-sitokrom P450 redüktazla birlikte çalışarak, her bir hem molekülü başına üçer molekül O_2 ve NADPH kullanarak, hemi, biliverdin, karbon monoksit (CO) ve Fe^{2+}'ye çevirir. Bu reaksiyonların ürünlerinin antioksidan etkiler sağlayan faydalı fizyolojik aktiviteleri vardır. Biliverdin, biliverdin redüktazla bilirubine redüklenir ve bilirubin de güçlü bir fizyolojik antioksidandır. CO'nun, çoğunlukla hem proteinlerine bağlanarak, hem prooksidan hem de antioksidan etkileri olduğu bildirilmiştir. CO, ayrıca hem proteini olan guanilat siklaza bağlanarak vazodilatasyonu uyarır. Serbest Fe^{2+} salınımı, demir depolayan protein olan, ferritin senteziyle yakından ilişkilidir. Bu yüzden HO-1 uyarımı, ferritin sentezini uyarır (74, 115-117).

Dinlenme halinde, stressiz koşullarda, HO-2 dalak haricindeki bütün organlarda baskın formdur ve en yüksek aktiviteler dalak, testisler ve beyinde bulunur. HO-1

ifadesi, serbest Hb ve hemin yüksek konsantrasyonlarını içeren oksidatif stresle ilişkili çok sayıda uyaranla, artırılır. Aslında, HO-1 mRNA'sının yüksek seviyeleri sıklıkla oksidatif stres biyolojik belirteci olarak kullanılmaktadır (118, 119).

2.2.5.4. Diğer Hem-Bağlayıcı Mekanizmalar

Plazma albümini de, hem ile 1:1 ve 1:2 protein/hem oranında, Hpx'den düşük afiniteyle (yaklaşık $K_d=10^{-8}$ M), bağlanır. Albüminin plazma konsantrasyonları yüksek olduğundan (3-5 g/dL), albümin tarafından bağlanabilen hem miktarı fazladır ve özellikle Hpx tükendiğinde, albümin bağlanması önemli hale gelir. Albümin, hemin toksik etkilerini de kısmen inhibe eder fakat spesifik enzim inhibitör etkileri yoktur. Bu yüzden albüminin koruyucu etkisinin, serbest hem gruplarının deposu olarak fonksiyon gösterdiğinden kaynaklandığı düşünülmektedir (120, 121).

Plazmadaki serbest hem hızlıca ve yüksek afiniteyle lipoproteinlere (LDL, HDL) de bağlanır. Hem grubu lipoprotein partikülünün oksidasyonuna ve sonrasında endotel hasarına neden olur ve muhtemelen ateroskleroz gelişimine neden olur (122).

Hem grubu membranlardan serbestçe diffüze olamaz. Bazı hem bağlayıcı ve transport proteinlerinin, ektraselüler hemin sitozole geçişine aracılık ettiği gösterilmiştir. HO-1'e benzer şekilde iki sitozolik proteinin (peroksiredoksin I ve α1-mikroglobin) serbest hem toksisitesine karşı koruyucu etkileri gösterilmiştir. Her ikisi de serbest hem konsantrasyonlarındaki artışa cevaben uyarılır. İlginç bir şekilde, α1-mikroglobin çoğu hücrede lokal olarak sentezlenebilmesine rağmen karaciğerde üretilip kanla dokulara taşınır (123-125).

2.2.5.5. Antioksidan Mekanizmalar

Daha önce bahsedildiği şekilde, Hb, hem ve demir, çoğu ROT olmak üzere, serbest radikal üretirler. Yukarıda bahsedilen Hb, hem ve demir bağlayıcı proteinler radikal ve ROT oluşumunu önleyici fonksiyon gösterseler de, çok farklı mekanizmalarla

dokuları ve hücreleri serbest radikal ve ROT'un zararlı etkilerinden korumak için işbirliği yapan farklı bir antioksidan molekül ağı vardır. Bazı yüksek moleküler ağırlıklı enzimatik antioksidanlar tanımlanmıştır. Süperoksit dismutaz (SOD), $O_2^{\bullet-}$'nin H_2O_2'ye dönüşümünü katalizler. Memelilerde SOD enziminin üç formu bulunur: Sitoplazmik Cu/ZnSOD (SOD1), mitokondriyal MnSOD (SOD2) ve ekstraselüler Cu/ZnSOD (SOD3). Peroksidaz grubunun üyesi olup, hem taşıyan enzim olan katalaz, iki molekül H_2O_2'in su ve O_2'ye dönüşümünü katalizler. Çekirdekli hücrelerin peroksizomlarında bulunan katalazın ana fonksiyonu bu organelde oluşan H_2O_2'in ortadan kaldırmak ve sitozolik H_2O_2 konsantrasyonlarını düşük tutmaktır. İkinci en fazla bulunan peroksidaz olan glutatyon peroksidaz (GPx) sitozolik ve mitokondriyal bir enzimdir ve elektron verici olarak glutatyonu (GSH) kullanarak H_2O_2'in yıkımını katalizler (126-128).

Bazı nonenzimatik, düşük moleküler ağırlıklı, radikal süpürücüler, direkt ROT ve ROT olmayan radikallerle reaksiyona girerek veya enzimatik antioksidan reaksiyonlarında kofaktör olarak yer alarak etkili olurlar. Bunların içinde muhtemelen en önemlisi, sitozolik tripeptit olan GSH'dır. GSH sitozolde sentezlenir ve serbest tiyol grubuyla indirgeyici ekivalan sağlar. Bu yüzden GSH ve okside formu olan okside glutatayon (GSSG) sitozolik redoks tamponu oluşturarak, antioksidan kapasite ve ROT aktivitesi arasındaki dengeyi düzenler. Tiyoredoksin, disülfitteki iki tiyol grubu aracılığıyla elektron rezervuarı olarak davranan sistein-X-X-sistein motifi (X herhangi bir amino asit) olan, bolca bulunan 12 kDa'lık bir proteindir. Redükte tiyoredoksin ve GSH'nın yüksek seviyeleri ve bu yüzden de yüksek antioksidan kapasite, sitozolden NADH ve NADPH'tan redükleyici ekivalanları çekerek yenilenmeleri, sırasıyla GSH redüktaz ve tiyoredoksin redüktaz enzimleriyle sağlanır. Esansiyel besinler olan C ve E vitaminlerinin antioksidan olarak önemli fonksiyon gösterdiklerine inanılmaktadır. Suda çözünen C vitamini, hem ROT veya radikallerle reaksiyon sonucu, dehidroaskorbik asite dönüşen indirgeyici ajandır hem de bazı enzimatik reaksiyonlarda kofaktördür. Yağda çözünen E vitamini ise önemli lipit türevi radikal süpürücüsüdür. Ek olarak, kurkumin ve resveratrol gibi antioksidan özellikleri olan, çok sayıda, diyetsel düşük moleküler ağırlıklı radikal süpürücü tanımlanmıştır (129-135).

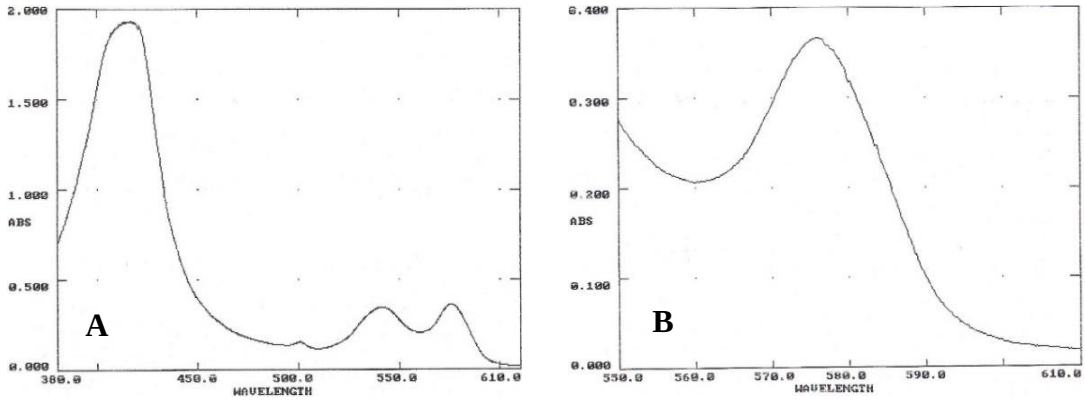
2.2.6. Serbest Plazma Hemoglobini (sHb) Ölçüm Yöntemleri

Tam kan total hemoglobin ölçümünde, evrensel olarak kabul gören, referans yöntem bulunurken (siyanomethemoglobin yöntemi), sHb ölçümünde uluslararası kabul gören bir yöntem henüz yoktur. Bu nedenle farklı merkezlerde farklı yöntemlerle sHb ölçümü yapılmaktadır.

Plazma hemoglobin ölçümleri yöntemleri, direkt optik teknikler ve kimyasal eklemeli teknikler olarak ikiye ayrılabilir. Direkt optik teknikler, oksihemoglobinin yaklaşık 415, 541 ve 577 nanometre (nm) dalga boylarındaki absorbans (A) piklerinin ölçülmesi temeline dayanırken, kimyasal eklemeli teknikler ise, siyanomethemoglobin reaktifi ve tetrametilbenzidin gibi kimyasallarla karıştırıldığında hemoglobinden oluşan renkli reaksiyon ürününün ölçülmesi temeline dayanmaktadırlar (136).

İnsan oksihemoglobini, fosfat tamponlu izotonik NACl çözeltisinde (FTS), 400 ve 700 nm arasında, 414,3, 541,5 ve 576,7 nm olmak üzere üç ayrı absorbans piki verir. Absorbans piklerinin tam yeri, kullanılan cihaz (ör. dalga boyu kalibrasyonu, spektral bant genişliği, mercekler), örneğin saflığı ve dilüsyon ortamına bağlı olarak değişebilir. 414-415 nm dalga boyundaki pikin ölçümünün avantajı, 541 nm veya 577 nm'deki piklerden 9 kat daha büyük absorbans sinyali (sırasıyla, milimolar absorbtiviteler 131'e karşı 14.37 ve 15.37 mmol/L x cm) sağlamasıdır (66). Dezavantajları ise, solüsyonun daima sulandırılması gerekmesi ve albüminle kompleks oluşturan bilirubinin (460-464 nm civarında absorbans pikiyle), plazma ve lipitlerin bu bölgede önemli absorbansa neden olmasıdır. Eritrosit ozmotik farajilite testinden uyarlanan, 541 nm'deki pikten yararlanarak oksihemoglobin ölçümü de, kimyasal ve mekanik kan hücre hasarının değerlendirilmesinde kullanılabilir. Ancak 541 nm oksihemoglobin piki, 577 nm pikinden, daha geniş olsa da (fakat yaklaşık % 7 daha küçük), direkt arka plan düzeltmesini güçleştiren daha fazla spektral etkileşimden dolayı, sadece plazma hemoglobininin göreceli ölçümlerinde kullanılmalıdır. 577 nm'deki piki kullanarak oksihemoglobin ölçümü yapmanın avantajları, bilirubin ve plazma piklerinden en uzaktadır, albümin ve lipitlerin etkileri

daha azdır ve örneklerin dilüsyonu gerekmez. Muhtemel dezavantajları ise, absorbans sinyali küçüktür, zamana bağlı oksihemoglobin bozulması sinyali azaltabilir ve en doğru ölçümlerin yapılabilmesi için spektral bant genişliği 2 nm civarında olan görece daha pahalı spektrofotometrelerin bulunması gereklidir (Şekil 2.4) (136, 137).



Şekil 2.4. FTS'de 50 mg/dL'lik sHb'nin çeşitli dalga boylarında taranması

A'daki şekilde fosfat tamponlu salin (FTS)'e eklenen 50 mg/dL'lik sHb'nin 380-615 nm dalga boylarında taranmasıyla elde edilen şekil görülmektedir. B'de ise A'daki örneğin 550-615 nm dalga boylarındaki taraması görülmektedir.

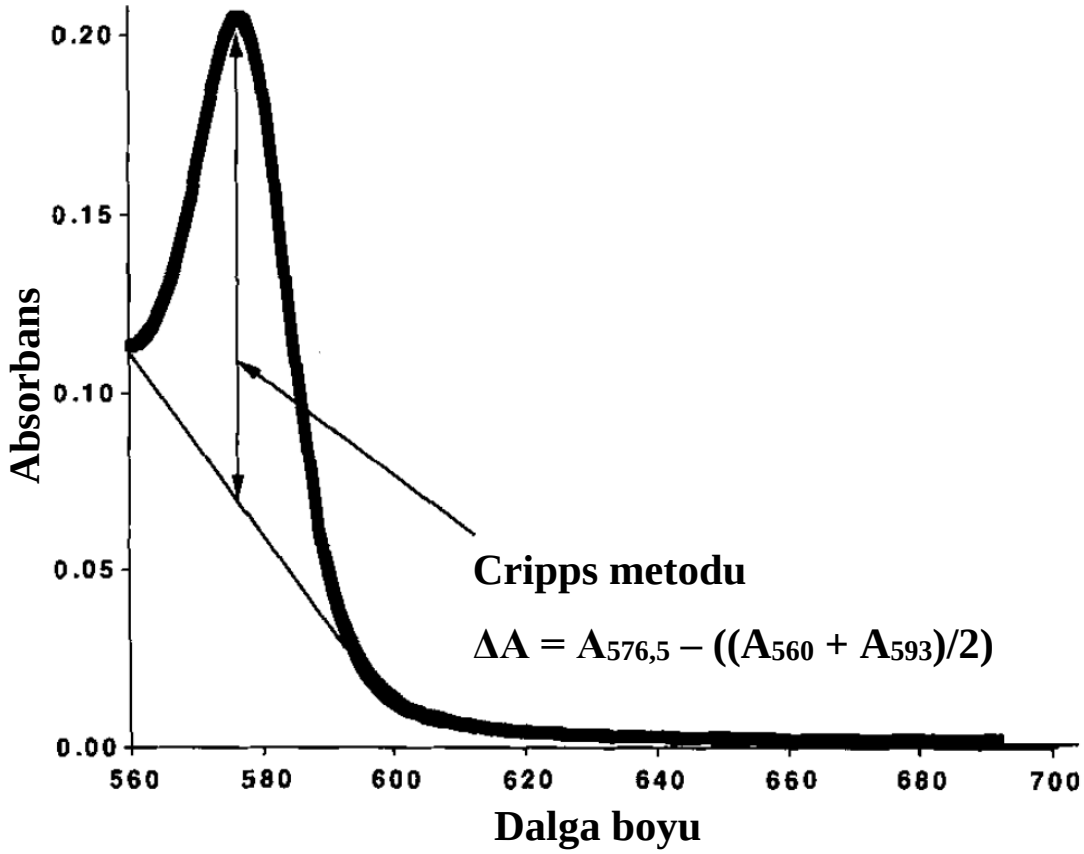
2.2.6.1. Direkt Optik Teknikler

Direkt optik teknikler de örnekte dilüsyon ihtiyacına göre iki grup altında toplanabilir.

Dilüsyonsuz direkt optik teknikler, 577 nm civarındaki oksihemoglobin pikinin, FTS veya su körüne karşı, dilüsyonsuz direkt plazma örneklerinde ölçülmesi temeline dayanırlar. Birçok tekniğin yer aldığı bu grupta en dikkat çekeni Cripps metodudur.

Cripps metodu (138), dilüsyonsuz plazma örneğinde, 3 dalga boyu kullanarak, Allen taban düzeltme metoduyla (139), oksihemoglobinin ölçülmesi temeline dayanır. Buna göre, 576,5 nm'deki oksihemoglobin absorbansı, 560 ve 593 nm'ler arasındaki doğrusal taban çizgisine göre hesaplanır (Şekil 2.5 (136)). Bu tekniğin kuvvetli yönü, 576,5 nm'deki oksihemoglobin pikinde absorbans artışına yol açabilen maddelerin

($A_{576,5}$örnek = $A_{576,5}$Hb + $A_{576,5}$arka plan), pikin her iki tarafındaki dalga boyu absorbans değerleri kullanılarak düzeltilmesidir.



Şekil 2.5. Cripps metodu; 576,7 nm'deki oksihemoglobin piki- Malinauskas ve ark. (136)'ndan alınmıştır.

Dilüsyonlu optik tekniklerde, yaklaşık 415 nm'deki hemoglobin piki, örneğe belirli oranlarda dilüsyon yaparak belirlenir. Dilüsyonlu optik tekniklerden sıkça kullanılanı ise Harboe metodudur.

Harboe metodu (140) da, 415 nm'deki Hb absorbansından faydalanarak, Hb konsantrasyonunu ölçmek için, 3 nokta (380, 415 ve 450 nm) Allen düzeltmesini kullanır. 100 µL örnek, 1000 µL 10 mg/dL'lik Na_2CO_3'te sulandırılır. Alkali pH, karışımdaki bulanıklığı azaltır (136). Absorbans değerleri, Na_2CO_3 körüne karşı okunarak değerlendirilir.

2.2.6.2. Kimyasal Eklemeli Teknikler

Kimyasal eklemeli teknikler siyanomethemoglobin ve tetrametilbenzidin tekni̇kleridir.

Siyonamethemoglobin metodu, tam kan total Hb konsantrasyonun (tipik olarak 11-18 g/dL) belirlenmesi için Hb'nin formlarının çoğunun stabil HiCN formuna dönüştürülmesi, uluslararası standartlar tarafından desteklenen tekniktir. Moore ve ark. (141), arka plan etkileşimini düzeltmek için uygun plazma körü kullanılarak bu kimyasal eklemeli tekniğin modifiye edilip, plazma Hb konsantrasyonunun ölçünde kullanılabileceğini belirtmişlerdir. 5 dakikada tamamlanan reaksiyon sırasında, 415, 541 ve 576,5 nm'lerdeki 3 oksihemoglobin piki, HiCN dönüşümüne bağlı olarak 420 ve 540 nm'de 2 pikle yer değiştirir. Örnekteki hemoglobin miktarını ölçmek için, HiCN reaktif körüne karşı, 540 nm'deki geniş pikin absorbansı ölçülür ve uluslararası HiCN standardı ile karşılaştırılır.

Tetrametilbenzidin (TMB) metodu, insan plazmasında sulandırılan hemoglobinden oluşan standart içeren kit formunun varlığından dolayı popülerdir. Hemoglobinin, hidrojen peroksitle kromojenin (TMB) oksidasyonunu katalizleyerek, ürün oluşumuyla doğru orantılı olarak renk oluşturması temeline dayanır (142). TMB, orijinal metottaki karsinojen benzidin yerine kullanılan birkaç kromojenin (ör. o-tolidin, klorpromazin, diansidin ve lökomalaşit yeşili) bir temsilidir. 800 µL, 5 mg/mL'lik asetik asitteki TMB çözeltisi içeren tüpe 4 µL örnek veya standart koyulup karıştırılır. Daha sonra 800 µL % 0,3'lük H_2O_2 eklenir ve parafilm ile ağzı kapatılan tüpler, ters çevrilerek karıştırılır. Tam olarak H_2O_2 eklendikten 10 dakika sonra, distile su körüne karşı, 600 nm'deki absorbanslar ölçülür. Bu dalga boyundaki ölçüm minimal spektral etkileşim sağlar. Çalışma içi varyasyondan dolayı, her çalışmada seyreltilmiş örneklerle beraber, TMB reaktif körü ve 15, 30 veya 45 mg/dL Hb standartlarından ikisi de kullanılır. Bu yöntemin doğrusal ölçüm aralığı 5-50 mg/dL'dir.

2.3. ANAEROBİK METABOLİZMA

Herhangi bir dokudaki anaerobik metabolizmayı direkt olarak değerlendirmek zordur. Bunun için çoğunlukla, doku düzeyindeki anaerobik metabolizmayı indirekt olarak gösteren belirteçler kullanılmaktadır. Kan laktat düzeyi, anaerobik metabolizma değerlendirmesinde sıklıkla kullanılan belirteçtir (143).

2.3.1. Laktat

2.3.1.1. Laktat Metabolizması

Laktat, yaşamın kaynağı iki temel enerji üreten işlemle (glikoliz ve oksidatif fosforilasyon) ilişkili olan, önemli bir metabolittir. Glikolizde, glukoz, 2 ATP'nin üretildiği reaksiyonla pirüvata çevrilir. Çevresel şartlar stabil olduğunda, glikoliz ve oksidatif fosforilasyon, glukozu sabit bir şekilde metabolize eder. Pirüvat bu iki işlemi bağlayan moleküldür. Anaerobik şartlarda, oksidasyonu azalan pirüvat, glikolizin devam etmesini sağlamak için laktata çevrilir. Şartlar düzelince, laktat tekrar pirüvata çevrilir. Her iki yönde de gerçekleşebilen bu işlem, sitozolde bolca bulunan laktat dehidrogenaz (LDH) enzimiyle katalizlenir. Bu yüzden, hücresel stres koşulları gibi kısa süre fazla miktarda enerji gerektiğinde, laktat glikolizin devamını sağlayan kritik bir tampon gibi davranır (144).

$$\text{Pirüvat} + \text{NADH} \overset{\text{LDH}}{\longleftrightarrow} \text{Laktat} + \text{NAD}^+$$

Laktat ve pirüvat arasındaki dengeye yakın reaksiyon ve bunun hücresel oksidoredüksiyon durumuyla bağlantısı göz önünde tutulduğunda, laktat-pirüvat oranının, sitozolik NADH-NAD^+ oranıyla eşleştiği görülebilir. Aslında glikolizin hem aerobik hem de anaerobik şartlarda son ürünü pirüvattır. Ancak glikoliz sırasında oluşan NADH'lar ortamda oksijen varlığında mitokondriye taşınarak oksitlenebilir. Ancak ortamda oksijen yok iken, hücrelerin NAD^+ havuzu sınırlı

olduğundan, NADH'ın oksitlenmesi, pirüvatın laktata indirgenmesiyle gerçekleştirir (145, 146).

Ayrıca laktat, organizma düzeyinde, membran bağlı monokarboksilat taşıyıcılarıyla, çeşitli dokular arasında hızlıca değiştirilen, aracı bir yakıt benzeri rolü vardır. Karaciğer ve böbrekler arasında olduğu gibi astrositler ve nöronlar, çizgili kas ve kalp kası arasında da laktat mekiği tanımlanmıştır. Anaerobik şartlarda özellikle kas dokusunda oluşturulan laktat, kanla karaciğer ve böbreklere gelerek glukoneogenezle tekrar glukoza çevrilip kana verilerek kasa gider. Bu şekildeki döngüye Kori döngüsü adı verilir. Uzun süredir bilinen Kori döngüsünün, şuan çok sayıda laktat mekiğinden biri olduğu düşünülmektedir. Kori döngüsü, karaciğer veya böbrekte enerji tüketen glukoneogenezde yer alırken, laktatın kendisinin direkt dokular arasında değişimi enerji harcamaz hatta ekzojen laktat uygun bir substrat olarak bile fonksiyon görebilir (147, 148).

Çoğunluğu glikolitik yolakla ve alanin deaminasyonuyla olmak üzere, günlük laktat üretimi, yaklaşık 1400 mmol'dür. Normal arteriyel kan laktat değeri 0,3-0,8 mmol/L'dir. Laktat üretiminin temel kaynağı eritrositler, perivenöz hepatositler, iskelet kası miyositleri ve cilttir. Karaciğer laktat klirensi için primer organ olup, normal şartlarda saatte 100 mmol laktatı kandan temizler. Oluşan laktatın bir kısmı böbrekler tarafından metabolize edilerek temizlenir (66).

Bazı klinik durumlar laktat temizlenme bozukluğuyla ilişkilidir. İlk olarak, karaciğer ve böbrek fonksiyonun bozukluğunun, laktat temizlenmesini bozduğu gösterilmiştir. İkincisi, kardiyak cerrahi sonrası da, hastalardaki laktat temizlenmesi bozulabilir. Üçüncüsü, sepsis, glukoz metabolizmasındaki artışa ve bu yüzden laktat üretimine bağlı olarak, pirüvat dehidrogenaz enziminin inhibisyonuyla, laktat temizlenmesini bozabilir (149-151).

2.3.1.2. Laktat ve Asidoz

Doku hipoksisi sırasında glukoz metabolizması, $[laktat]^-$, ATP ve su oluşumuyla sonuçlanır. Bu esnada H^+ üretimi, ATP'nin ADP'ye hidrolizinden kaynaklanır. Oksijen varlığında, oksidatif fosforilasyon glikolizle beraber yürütülebilir, bu H^+ iyonları, mitokondride oksidatif fosforilasyonda kullanılabildiğinden asidoz gelişimi olası değildir. Klasik Henderson-Hasselbalch denklemine göre, dolaşıma $[laktat]^-$ iyonu eklendiğinde, asit-baz eşitliğinin sürdürülmesi için suyun iyolarına ayrışması sonucu asidoz gelişir (152, 153).

Laktik asidoz, artmış anyon açıklı yüksek kan laktat seviyeleri (>45 mg/dL veya >5,0 mmol/L) ve düşük kan pH'sıyla (<7,35) karakterizedir. Laktik asidoz, tip A ve tip B olmak üzere iki gruba ayrılır. Tip A laktik asidoz gelişiminde ana faktör doku oksijenasyon bozukluğudur. Daha sık görülür ve hipoksik tip olarak da bilinir. Hipoksik olmayan tip olarak da bilinen, tip B laktik asidoz ise bazı ilaç, kimyasal, toksik bileşenlere veya laktat birikimine sebep olabilen bozukluklara bağlı oluşur. Normal şartlarda vücutta L-laktat bulunur ancak jejunoileal baypas yapılan hastalar gibi bazı durumlarda, bağırsak florasından kaynaklanan D-laktat seviyeleri de kanda saptanabilir. Bunun kandan temizlenmesi yavaş olduğundan dikkatli olunmalıdır (D-laktik asidoz gelişebilir). Nörolojik fonksiyon bozukluğuyla beraber şiddetli asidoz durumlarında akılda bulundurulmalıdır. Laktik asidoz nedenleri tablo 2.6'da gösterilmiştir (66).

Tablo 2.6. L-laktik asidoz nedenleri- McPherson ve ark. (66)'ndan alınmıştır.

Tip A laktik asidoz	**Tip B laktik asidoz**
Dolaşım şoku	Akut alkolizm
Şiddetli hipoksemi	İlaçlar ve toksinler (fenformin, salisilat)
Kalp yetmezliği	Diyabetes mellitus
Şiddetli anemi	Lösemi
Grand mal nöbet	Tiamin veya riboflavin eksikliği

2.3.1.3. Laktat ve Doku Hipoksisi

Birçok çalışmada, doku hipoksisi ve laktat üretimi arasındaki ilişki gösterilmiştir. Kritik oksijen seviyelerinde, oksijen tüketimi, oksijen miktarıyla kısıtlı hale gelir ve bu da laktat seviyelerindeki keskin artışla birliktedir (154).

Oksijen değişimi mikrovasküler dolaşımda gerçekleştiğinden, mikrovasküler dolaşımdaki değişimler de oksijen temininin bozulmasıyla sonuçlanabilir. Özellikle sepsiste, mikrovasküler dolaşım düzensizliği hücrelere oksijen taşınmasında yetersizliğe yol açarak laktat seviyelerinde artışa yol açar. Bu durum, septik şoktaki hastalarda kapiller dolaşımın artırılmasıyla laktat seviyelerindeki azalmanın ilişkili olduğunun belirtilmesiyle indirekt olarak gösterilmiştir (155).

2.4. DİĞER PARAMETRELER

2.4.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH)

LDH (EC 1.1.1.27), oksidoredüktaz enzim grubunda yer alan, "CH-OH" gruplarına etki ederek, NAD^+'a hidrid iyonu (2 elektron ve 1 proton içeren H iyonu) transfer eden enzimdir. Bütün 2-hidroksimonokarboksilik asitleri de oksitleyebilme yeteneğine sahiptir (66).

$$\text{Pirüvat} + \text{NADH} \overset{\text{LDH}}{\longleftrightarrow} \text{Laktat} + NAD^+$$

LDH, çinko içeren bir enzimdir ve hücrelerin sitoplazmasında yer alır. 134 kDa moleküler ağırlıktaki iki (H ve M) alt birimin oluşturduğu, tetramer yapıda bir enzimdir. Bu alt birimlerin kombinasyonu sonucu 5 izoenzim oluşur (LDH1 (HHHH), LDH2 (HHHM), LDH3 (HHMM), LDH4 (HMMM) ve LDH5 (MMMM)). Dört C alt biriminden oluşan diğer bir tip spermatazoa ve semende bulunur ancak serumda saptanamamıştır. LDH1 ve LDH2, laktat için, en düşük K_m'ye (yüksek ilgi)

sahiptirler. Bunun tersi de LDH4 ve LDH5 için doğrudur (düşük ilgi). Çeşitli dokulardaki LDH izoenzim yüzdeleri tablo 2.7'de verilmiştir (66, 70, 144).

Tablo 2.7. Çeşitli dokulardaki ve organlardaki LDH izoenzim tipleri ve yüzdeleri- McPherson ve ark. (66)'ndan alınmıştır

	LDH1 %	**LDH2 %**	**LDH3 %**	**LDH4 %**	**LDH5 %**
Serum	25	35	20	15	5
Kalp	45	40	10	5	0
Eritrosit	40	35	15	10	0
Renal korteks	35	30	25	20	0
Akciğer	10	15	40	30	5
İskelet kası	0	0	10	30	60
Karaciğer	0	5	10	15	70

LDH1 ve LDH2, özellikle miyokardiyal dokuda ve eritrositlerde yüksek seviyelerde ifade edildiği, karaciğer ve iskelet kasında çok daha düşük ifade olduğu ayrıca bunun tersinin de LDH4 ve LDH5 için doğru olduğu bilinmektedir. Bu nedenle miyokart hasarında veya hemolizde LDH1 ve LDH2 seviyeleri, karaciğer ve iskelet kas hasarında ise LDH4 ve LDH5 seviyeleri, serumda artış gösterir. Çoğu dokudaki enzim aktivitesi serumdan 500 ila 1000 kat yüksek olmasına rağmen birbirlerine yakındır. Bu yüzden çok küçük doku hasarında bile serum enzim seviyelerinde anlamlı artışlar olur. Serumdaki yükselen izoenzimlerin tipi de kaynağı hakkında bilgi sağlar. Serumdaki LDH'nın çoğu, değişen miktarlarda diğer organlardan da katkı olmakla beraber, eritrosit ve plateletlerin yıkımından kaynaklanır. Serum LDH aktiviteleri (ortalama 30 IU/L) plateletlerden salınıma bağlı olarak, plazma seviyelerinden daha yüksektir (146, 156).

Eser miktarda veya hafif hemoliz, LDH ve LDH izoenzim analizlerini geçersiz kılar. Pıhtıyla temas veya özellikle pnömatik tüp sisteminde olabilen sarsıntı, hemolize neden olup LDH seviyelerinde artışa neden olur. Hemoliz hem total LDH hem de LDH1/LDH2 oranını etkiler. Total LDH, kan transfüzyonlarından sonra da geçici süreyle artabilir ancak 24 saat içerisinde normale döner. LDH izoenzimlerinin

yarılanma süreleri çok değişkendir. LDH1'in yarılanma zamanı 4-4,5 gün iken, LDH5'in 4-6 saattir (66, 144).

LDH, özgül bir test değildir. Yani normal olmayan değerleri, belirli bir organ hasarına özgül değildir. Diğer enzimlere (aspartat transaminaz (AST), alanin transaminaz (ALT), kreatin kinaz (KK)) göre göreceli miktarı, organ hasarının kaynağı hakkında ipuçları sağlayabilir. Eğer LDH belirgin şekilde artmış fakat AST, ALT ve KK normal veya minimal artmış ise bu durum, eritrosit, lökosit, böbrek, akciğer veya tümör hücre hasarını gösterir. AST/ALT oranının 1'in üzerinde olduğu, LDH ve KK'nın her ikisinde de artış varsa bu durum, kardiyak veya iskelet kas hasarını gösterir. Karaciğer hasarında da LDH artar ancak özgül değildir. Son zamanlarda, fulminan hepatik yetmezlikte, başlangıçta LDH'da daha hızlı olmak üzere, serum ALT ve LDH enzim aktivitelerinde artış gözlenir. Ayrıca metastaz veya primer karaciğer karsinomu gibi karaciğerin yer kaplayan lezyonlarında AST ve LDH'da artış olur. 36 saatten fazla süreyle LDH yüksekliği ve bu süre boyunca normalde 1'dan küçük olan LDH1/LDH2 oranının 1'in üzerinde olması miyokart enfarktüsü tanısını doğrular. Ancak bunun için 36 saat gözlem gerekli olduğundan akut miyokart enfarktüsü tanısında kullanılmaz. Ek olarak hemolitik anemi, megaloblastik anemi ve renal kortikal hastalıklar da LDH1 artışına ve sıklıkla LDH1/LDH2 oranının 1'in üzerine çıkmasına neden olabilirler. Lösemi, lenfoma ve multipl miyelomda LDH3 ve sıklıkla LDH4'te artış olurken LDH1 ve LDH2 azalır. Pulmoner hastalıklar da benzer artışa neden olur. LDH5 ve bazen LDH4 artışı iskelet kas hasarı veya iskemik veya toksik karaciğer hasarında görülebilir (7, 70, 157).

2.4.2. C-Reaktif Protein (CRP)

İlk defa 1930 yılında, pnömokokal pnömoni hastalarının plazmalarından izole edilen CRP'nin, daha sonra birçok enfeksiyöz veya enflamatuvar durumlarda arttığı ve akut faz reaktanı olduğu tespit edilmiştir. Pnömokokların somatik C-polisakkaritine bağlanıp çökmesini sağladığından bu isim verilmiştir. Proteinlerin pentraksin ailesinin bir üyesi olan CRP, 206 amino asit içeren ve 23 kDa moleküler ağırlığı olan 5 protomerin, halkasal şekilde bir araya gelmesinden oluşur. Toplam molekül ağırlığı

karbonhidrat içeriğine bağlı olarak 188-144 kDa arasında değişmektedir. CRP senteziyle ilişkili gen insan 1. kromozomundadır. Ca^{2+} ile beraber çeşitli protein ve özellikle fosfatidilkolin olmak üzere, fosfolipitlere bağlanır. Partikülleri opsonize ederek komplemanı klasik yoldan aktive eder ancak gerçek biyolojik fonksiyonu bilinmemektedir (66, 158).

Karaciğerde özellikle interlökin-6 kontrolü altında, enflamasyon, enfeksiyon ve malignansi gibi durumlarda sentezlenir. İlk yükselen ve uzün süre yüksek kalan akut faz reaktanıdır. Enflamatuvar durum göstergesi olarak kullanılmasının yanında son zamanlarda, kardiyovasküler hastalıklarda da tanıya yardımcı faktör olarak kullanılmaya başlanmıştır. CRP, *in vivo* lökosit göçünü ve infiltrasyonu inhibe ederek antienflamatuvar etki sağlayabilir. Ancak dokularda zararlı etkisi de olabilir (159-161).

CRP'nin normal sağlıklı kişilerde, serumdaki değeri 0,3-1,7 mg/L arasındadır. 3 mg/L üzerindeki CRP seviyelerinin altta yatan bir patolojiyi işaret ettiği belirtilmektedir. Akut faz cevabıyla birlikte CRP seviyeleri 1000 kat artabilir. Dolaşımda yarılanma zamanı 19 saattir. CRP'nin dolaşımdaki miktarını belirleyen en önemli faktör sentez hızıdır. Akut faz cevabının iyi bir göstergesi olduğundan sıkça kullanılmaktadır. Ancak sentezinin karaciğerde olması nedeniyle, hepatoselüler yetmezlik durumlarında, dikkatlice kullanılıp, değerlendirilmelidir (162-164).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. HASTALAR

3.1.1. Hasta Seçimi

Bu çalışma için Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulundan gerekli izin alındı (Ek 1). Çalışmaya katılan tüm gönüllülerin aydınlatılmış onamları alındı (Ek 2). Bu çalışma, Kasım 2014 - Mayıs 2015 dönemleri arasında, aşağıda belirtilen çalışmaya dâhil olma kriterlerini karşılayan, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Kalp ve Damar Cerrahisi Anabilim Dalı tarafından ECMO uygulanan, hastalarının katılımıyla gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, toplam 18 hastanın, EKMO'ya bağlı olduğu süre boyunca alınan günlük takip örnekleriyle yapılmıştır. Bu şekilde 100 örnek toplandığında çalışmamız sonlandırılmıştır. Çalışmamız, sHb ölçüm yönteminin oluşturulması ve değerlendirilmesi ve ölçülen parametreler arasında korelasyon çalışması olarak planlandığından hasta örneklerinin gruplara ayrılması gerekli görülmemiştir.

Hastaların çalışmaya dâhil edilme kriterleri:

1. Hastanın 18 yaş üstünde olması.
2. Hastaya EKMO uygulanmış olması.
3. Hastanın gönüllü olarak aydınlatılmış onam formunu imzalamış olması.

Hastaların çalışmadan çıkarılma kriterleri:

1. Hastanın total bilirubin (TB) seviyesinin 10 mg/dL'nin üzerinde olması.
2. Hastanın trigliserit (TG) seviyesinin 200 mg/dL'nin üzerinde olması.

3.1.2. Hastaların Örneklerine Uygulanan Genel İşlemler

Hastalardan, EKMO'ya bağlı olduğu süre boyunca, bir tüp etilendiamin tetraasetik asit (EDTA)'li kan örneği alınarak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi

Biyokimya Anabilim Dalı, Prof. Dr. Zuhal Yurtarslanı Araştırma Laboratuvarı'nda 2000 g'de 7 dakika santrifüj edilip plazması ayrıldı (136). Daha sonra bu plazma, 1250, 350 ve 300 µL hacimlerde olacak şekilde üç parçaya bölündü. İlk kısımda (1250 µL) sHb ölçümü, Cripps yöntemiyle (138) 1,4 mL'lik kuartz küvetlerde (Hellma Analitics) yapıldı ve daha sonra bu kısım biyokimyasal analizler için 2 mL hacimli kapaklı ependorf tüplerinde, -80ºC'ye kaldırıldı. Diğer iki kısım, NO (300 µL) ve Hp (350 µL) testleri çalışılması için, hızlıca 0,5 mL hacimli kapaklı ependorf tüplerin içerisinde, -80ºC'ye kaldırılmıştır. Çalışma günlerinde -80ºC'den alınan plazmalar oda ısısında eritilip, vorteksle karıştırıldıktan sonra 2000 g'de 10 dk santrifüj edilmiştir. Biyokimyasal analizler (LDH, CRP, TG, TB, direkt bilirubin (DB)) Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında, Beckmann Coulter Unicell DxC 800 Synchron Clinical System cihazında çalışılmıştır. Haptoglobin ölçümü ise, aynı laboratuvardaki Siemens BN II System cihazında yapılmıştır. NO ölçümü, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Prof. Dr. Zuhal Yurtarslanı Araştırma Laboratuvarında yapılmıştır. Hastaların laktat sonuçları ise kan örneğinin alınma saatine en yakın saatteki kan gazı analiz sonuçlarının, laboratuvar bilgi sisteminden (Nükleus) alınmasıyla elde edilmiştir.

3.2. GEREÇLER

3.2.1. Cihazlar

Spektrofotometre (Helios-α, Unicam marka), 1,4 mL hacimli spektrofotometre küveti (Hellma Analitics) sanyo Ultra Low MDF–U4086S marka derin dondurucu (–80°C), Arçelik marka buzdolabı (+4ºC), hassas elektronik tartı (Sartorius Basic marka), sabit/ayarlanabilir pipetler (Axygen, Socorex ve Brand marka), Sorvall RMC 14 marka santrifüj, Harrier 18/80 marka soğutmalı santrifüj, Whirlmix 20 W vorteks, 'Beckman Coulter Unicell DxC 800 Syncron Clinical System' cihazı, 'Siemens BN II System' cihazı, 'Cobas B 221 System' cihazı ve 'Coulter LH 750 System' cihazı.

3.2.2. Kimyasal maddeler

Çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler Sigma-Aldrich ve Merck firmalarından temin edilmiştir.

3.3. SERBEST PLAZMA HEMOGLOBİNİ ÖLÇÜM YÖNTEMİ OLUŞTURULMASI

Aşağıdaki işlemlerde kullanılması için oksihemoglobin izole edilmesi amacıyla, tam kan örneği, yeşil uçlu (21G) vaccutainer setiyle EDTA'lı tam kan tüpüne alındı. 8 defa alt-üst edilerek, plazmasının ayrılması için 2000 g'de 7 dakika santrifüj edilen bu örneklerin hücresel kısmı oksihemoglobin izolasyonu için alındı. Kendi hacminin iki katı hacimde soğuk FTS (100 mL için 110 mg K_2HPO_4, 32 mg KH_2PO_4, 850 mg NaCl karıştırılıp pH 7,2'ye ayarlandı) ilave edildi ve 1000 g'de 10 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatan kısmı atılarak hücresel kısım alındı. Bu yıkama işlemi toplam 3 defa yapıldıktan sonra eritrositlerin parçalanması için hücresel kitlenin 4 katı hacimde distile su ilave edildi ve 10 dakika inkübe edildi (165). Daha sonra bu solüsyon, eritrosit membran parçalarının çöktürülmesi için, 1200 g'de 30 dakika santrifüj edildi (136). Süpernatan kısmı alınarak, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi Merkez Laboratuvarında, Coulter LH 750 System hematoloji cihazında Hb konsantrasyonu (yaklaşık 5 g/dL) ve saflığı tayin edildi.

3.3.1. Oksihemoglobin Standardının Oluşturulması

Öncelikle girişimsiz ortamda yöntemin değerlendirilmesi için FTS kullanıldı. Daha sonra yöntemin girişim olabilen (plazma) ortamdaki performansı incelendi.

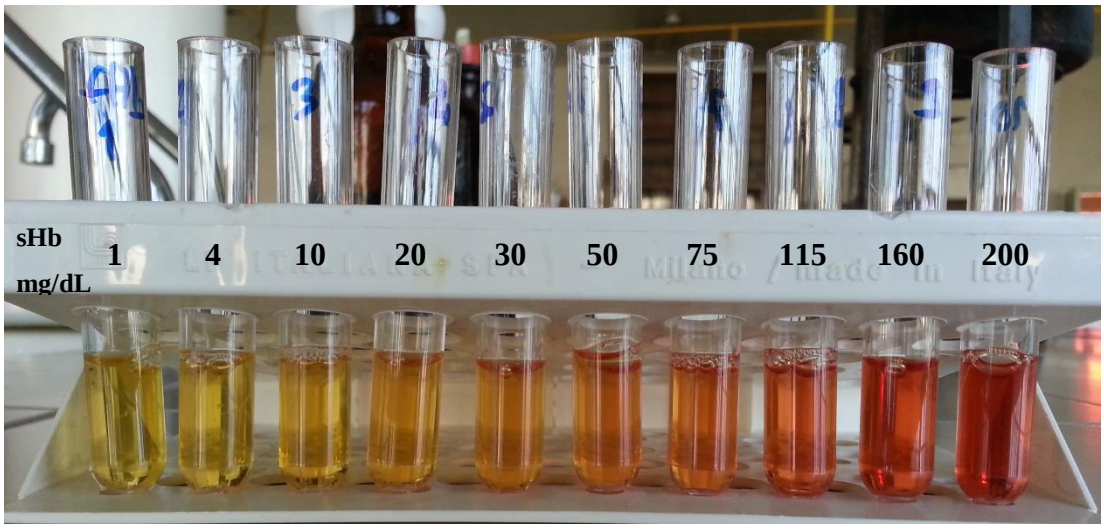
Oksihemoglobin standardının oluşturulması için süpernatan (yaklaşık 5 g/dL Hb), FTS'de ve plazmada değişen konsantrasyonlarda (1, 4, 10, 20, 30, 50, 75, 115, 160 ve 200 mg/dL) dilüe edildi. Plazmada oksihemoglobin standardı yapılabilmesi için,

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Kan Merkezinden, taze donmuş plazma (albümin: 3,1 g/dL, trigliserit (TG): 32, total bilirubin (TB): 0,4, direkt bilirubin (DB): 0,1 mg/dL, sHb: 0,6 mg/dL) temin edildi.

FTS ve plazmada belirtilen konsantrasyonlarda sHb standartlarının hazırlanması için öncelikle ilk süpernatandan (yaklaşık 5 g/dL) FTS ve plazmada 5000 µL hacimde 200 mg/dL'lik sHb standardı hazırlandı (süpernatandan 200 µL alınarak 5 mL'ye tamamlandı). Daha sonra bundan 3507 µL çekilerek FTS ile ve plazmayla 4384 µL'ye tamamlandı. Daha sonra her konsantrasyondaki standart için aşağıdaki tabloya göre işlemler yapıldı. Bu şekilde, yaklaşık 1500 µL'lik hacimlerde istenilen konsantrasyonlarda standartlar oluşturuldu ve Cripps metoduyla ölçümler yapıldı.

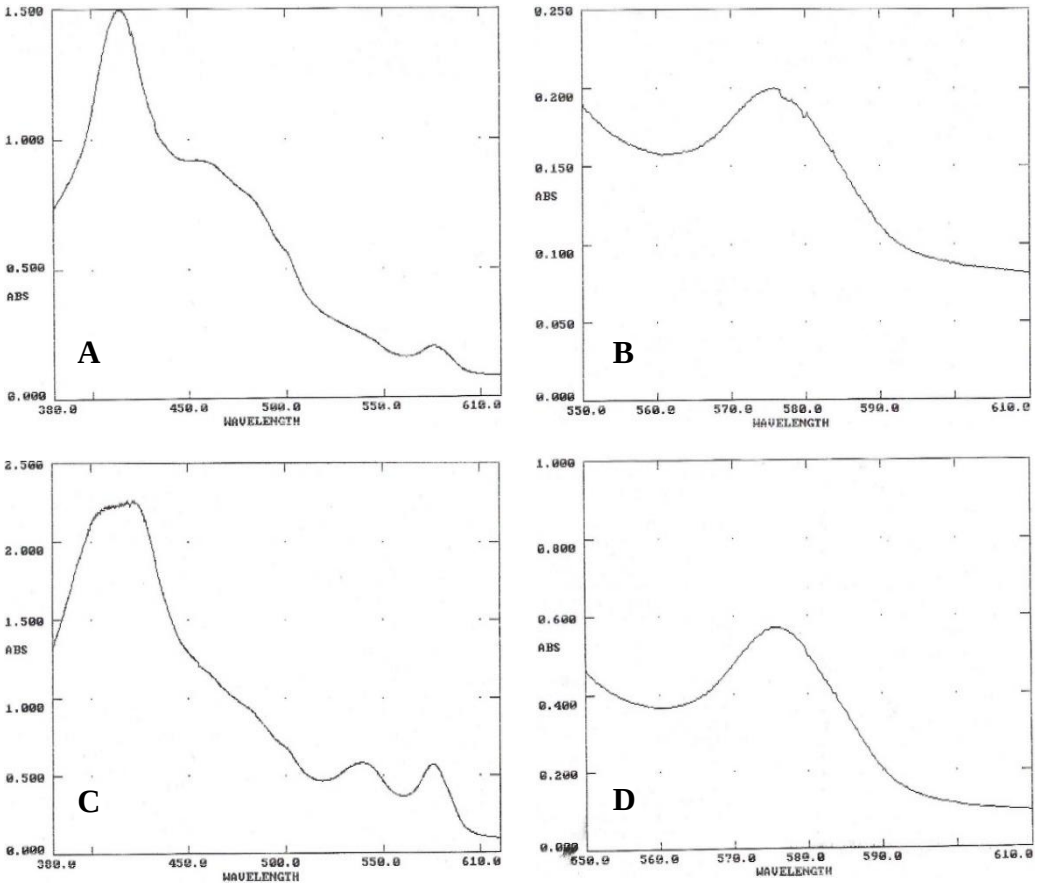
Tablo 3.1. sHb standartlarının hazırlanma tablosu.

sHb (mg/dL)	**200**	**160**	**115**	**75**	**50**	**30**	**20**	**10**	**4**	**1**
Toplam	5000	4384	4013	4853	3530	3383	2825	2650	1875	1500
Çekilen	3507	2884	2513	2353	2030	1883	1325	1150	375	



Şekil 3.1. Plazmada oksihemoglobin standartlarının fotoğrafı.

Daha sonra 10 mg/dL (ELSO'ya göre normal aralığın aşıldığı değer) ve 50 mg/dL (ELSO'ya göre nedeni araştırılması gereken patolojik yüksek değer) konsantrasyonlardaki sHb içeren plazma örnekleri spektrofotometrede 380-615 nm dalga boylarında taranarak aşağıdaki şekiller elde edilmiştir.



Şekil 3.2. Plazma 10 ve 50 mg/dL sHb'nin çeşitli dalga boylarında taranması

A'daki şekilde, plazmadaki 10 mg/dL'lik sHb standardının 380-615 nm dalga boylarında taranmasıyla elde edilen şekil görülmektedir. B'de ise A'daki örneğin 550-615 nm dalga boylarındaki taraması görülmektedir. C'deki şekilde, plazmadaki 50 mg/dL'lik sHb standardının 380-615 nm dalga boylarında taranmasıyla elde edilen şekil görülmektedir. D'de ise C'deki örneğin 550-615 nm dalga boylarındaki taraması görülmektedir.

3.3.2. Bilirubin Girişiminin Değerlendirilmesi

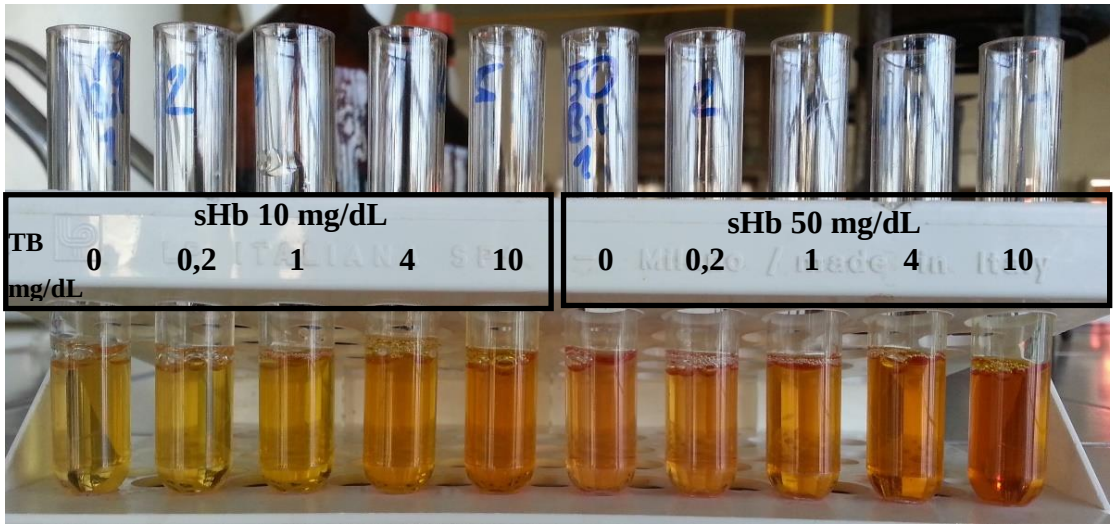
Bilirubin girişimi, plazmadaki yaklaşık 10 ve 50 mg/dL'lik sHb standartlarının farklı bilirubin konsantrasyonlarında (0, 0,2, 1, 4, 10 mg/dL) örnekleri hazırlanıp ölçülmesiyle değerlendirildi.

Belirtilen konsantrasyonlarda sHb ve bilirubin içeren solüsyonların hazırlanması için öncelikle 4 mg unkonjuge bilirubin (Merck, Art. 24320) 0,4 mL dimetil sülfoksitte (Merck) çözüldü ve 0,8 mL 0,1 M Na_2CO_3'te (52,5 mg anhidröz Na_2CO_3 distile suda çözülerek 5 mL'ye tamamlanarak hazırlandı) seyreltildi ve daha sonra plazma (TB

0,4 mg/dL, DB 0,1 mg/dL, albümin 3,1 g/dL) ile 10 mL'ye tamamlandı (yaklaşık 40 mg/dL bilirubin) (166). Ayrıca 10 mL plazmada, 20 ve 100 mg/dL'lik sHb standartları hazırlandı. Daha sonra bunların 5'er mL'si alınarak, 40 mg/dL bilirubin içeren solüsyonla eşit hacimlerde karıştırıldı. Böylece 10 mL, 10 ve 50 mg/dL sHb içeren 20 mg/dL'lik bilirubin çözeltileri (B) hazırlanmış oldu. Sonra plazmadaki 20 ve 100 mg/dL'lik sHb standartlarından kalan 5 mL'lik kısım, eşit hacimde plazmada seyreltilerek, 10 mL 10 ve 50 mg/dL'lik sHb solüsyonları (A) elde edildi. Son olarak aşağıdaki şemaya göre A ve B çözeltileri farklı miktarlarda karıştırılarak farklı bilirubin konsantrasyonlarında 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlandı ve Cripps yöntemiyle sHb seviyeleri ölçüldü.

Tablo 3.2. Farklı bilirubin konsantrasyonlarındaki 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlanma tablosu

sHb	**10 mg/dL**					**50 mg/dL**				
Bilirubin	**0**	**0,2**	**1**	**4**	**10**	**0**	**0,2**	**1**	**4**	**10**
A'dan	1500	1485	1425	1200	750	1500	1485	1425	1200	750
B'den	0	15	75	300	750	0	15	75	300	750



Şekil 3.3. Plazmada bilirubin girişiminin değerlendirilme fotoğrafı

İlk beş tüp değişen konsantrasyonlarda bilirubin içeren yaklaşık 10 mg/dL sHb içeren tüpler. İkinci beşli, aynı konsantrasyonlarda bilirubin içeren yaklaşık 50 mg/dL sHb içeren tüpler. sHb; serbest hemoglobin, TB; total bilirubin.

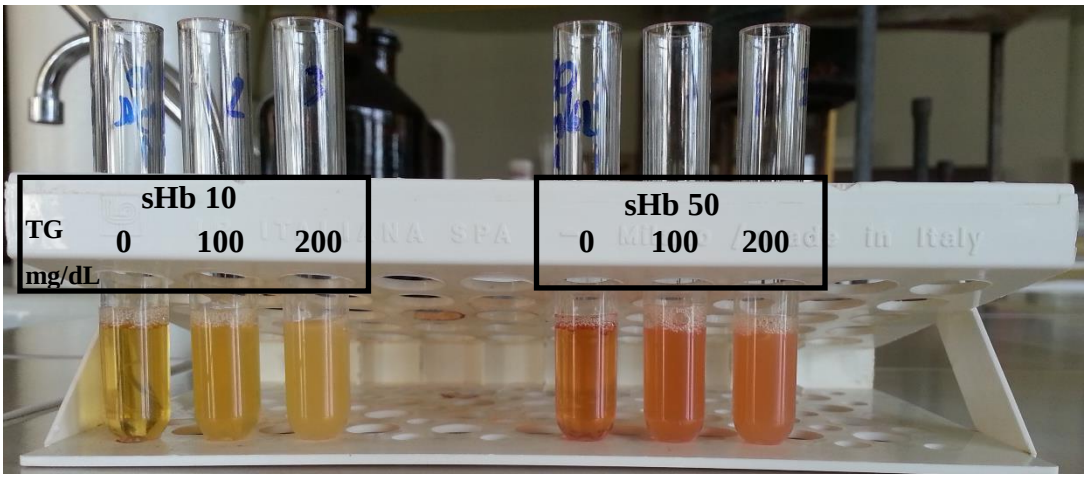
3.3.3. Lipit Girişiminin Değerlendirilmesi

Kullanılan yönteme lipit girişiminin değerlendirilmesi için ClinOleic (500 mL % 20'lik saf zeytinyağı (% 80) ve soya yağı karışımı (% 20), Eczacıbaşı-Baxter) intravenöz lipit solüsyonu kullanılarak 10 ve 50 mg/dL konsantrasyonlarda sHb içeren standartların farklı lipit konsantrasyonlarında (0, 100, 200 mg/dL trigliserit) solüsyonları hazırlandı.

Belirtilen konsantrasyonlarda sHb ve lipit içeren solüsyonların hazırlanması için öncelikle 0,2 mL lipit solüsyonu plazma (TG 32 mg/dL) ile 10 mL tamamlandı, böylece 400 mg/dL lipit içeren çözelti hazırlanmış oldu. Ayrıca 10 mL plazmada 20 ve 100 mg/dL'lik sHb standartları hazırlandı. Daha sonra bunların 5'er mL'si alınarak 400 mg/dL lipit içeren solüsyonla eşit hacimlerde karıştırıldı. Böylece 10 mL, 10 ve 50 mg/dL sHb içeren 200 mg/dL'lik lipit çözeltileri (B) hazırlanmış oldu. Sonra plazmadaki 20 ve 100 mg/dL'lik sHb standartlarından kalan 5 mL'lik kısım eşit hacimde plazmada seyreltilerek, 10 mL 10 ve 50 mg/dL'lik sHb standartları (A) hazırlandı. Son olarak aşağıdaki şemaya göre A ve B çözeltileri karıştırılarak farklı lipit konsantrasyonlarında 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlandı ve Cripps yöntemiyle sHb seviyeleri ölçüldü.

Tablo 3.3. Farklı lipit konsantrasyonlarındaki 10 ve 50 mg/dL'lik sHb çözeltileri hazırlanma tablosu.

sHb	**10 mg/dL**			**50 mg/dL**		
Lipit (TG (mg/dL))	**0**	**100**	**200**	**0**	**100**	**200**
A'dan çekilen (µL)	1500	750	1500	1500	750	1500
B'den çekilen (µL)	0	750	0	0	750	0



Şekil 3.4. Plazmada lipit girişiminin değerlendirilme fotoğrafı

İlk üç tüp değişen konsantrasyonlarda lipit içeren yaklaşık 10 mg/dL sHb içeren tüpler. İkinci üçlü aynı konsantrasyonlarda lipit içeren yaklaşık 50 mg/dL sHb içeren tüpler. sHb; serbest hemoglobin, TG; trigliserit.

3.4. NİTRİK OKSİT (NO) MİKTARI ÖLÇÜM YÖNTEMİ

Deneyin prensibi; NO'nun asidik ortamda, sülfanilik asitin diazotizasyonuyla naftiletilendiaminle reaksiyona girmesini sağlaması esasına dayanmaktadır. Sonuçta ortaya çıkan renkli bileşiğin absorbansı, spektrofotometrede 540 nm'de okunur. Ölçülen değer NO konsantrasyonuyla doğru orantılıdır (167).

Deneyde kullanılan reaktiflerin hazırlanması:

Sülfanilik asit çözeltisi: 10 ml distile suda 180 mg sülfanilik asit çözülür.

Naftiletilendiamin çözeltisi: 10 ml distile suda 162 mg naftiletilendiamin çözülür.

Hidroklorik asit (HCl): 10 ml distile suda 50 µl HCl çözülür.

200 µl numuneye % 20'lik 20 µl TCA eklenir, 5 dakika süreyle beklenir. Daha sonra 200 µl distile su ilave edilir. 5 dakika süreyle 5000 devirde santrifüj edildikten sonra süpernatan alınır ve içine kadmiyum (Cd) metali konulur. 24 saat bekletildikten sonra aşağıdaki protokol uygulanır.

Tablo 3.4. NO miktarı ölçüm yöntemine ait protokol

	KÖR	**NUMUNE**
SÜZÜNTÜ	100 µl	100 µl
HCl	250 µl	250 µl
SÜLFANİLİK ASİT	250 µl	250 µl
NAFTİETİLENDİAMİN	-	250 µl
DİSTİLE SU	250 µl	-

Son işlemden sonra tüpler 10 dk oda sıcaklığında bekletilir ve daha sonra spektrofotometrede, 540 nm'de distile suya karşı okunur. NO konsantrasyonu, hazırlanan standartla elde edilen OD değerinden yararlanılarak hesaplanır. Buna göre bulunan 'faktör' değeri 250'dir.

NO konsantrasyonu (µM) = $(OD_N - OD_{Kör}) \times 250$

3.5. BİYOKİMYASAL PARAMETRELERİN ANALİZİ

Hastaların plazmalarında, TG, TB, DB, LDH ve CRP seviyeleri, 'Beckman Coulter Unicell DxC 800 Syncron Clinical System' cihazında, haptoglobin seviyeleri ise 'Siemens BN II System' cihazında çalışılmıştır. Bu çalışmada sadece verileri kullanılan laktat analizleri ise 'Roche Cobas B System' kan gazı cihazında yapılmıştır. Kullanılan kitlerin prospektüslerine göre çalışılan parametrelerin prensipleri şu şekildedir:

3.5.1. Laktat Dehidrogenaz (LDH) Ölçümü

Reaksiyonda, LDH L-laktatı pirüvata tersine çevrilebilir yükseltgenmesini katalize eder ve β-nikotinamid adenin dinükleotid (NAD) indirgenmiş β-nikotinamid adenin dinükleotide (NADH) eş zamanlı olarak indirgenir. Cihaz uygun numune ve reaktif

hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 20 kısım reaktiftir. Sistem 340 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki laktat dehidrojenazın aktivitesi ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından laktat dehidrojenaz aktivitesinin hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.2. Laktat Ölçümü

Test reaksiyonunda, laktatın oksidaz laktatı pirüvata dönüştürmesiyle beraberinde hidrojen peroksit (H_2O_2) oluşur. Oluşan H_2O_2, manganez dioksit/karbon elektrot kullanılarak amperometrik olarak ölçülür. Sistem 350 mV'deki voltaj değişikliğini takip eder. Voltajdaki bu değişiklik numunedeki laktik asidin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından laktik asit konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.3. Total Bilirubin (TB) ölçümü

TB konsantrasyonu bir zamanlı bitiş noktalı diazo yöntemiyle ölçülür. Reaksiyonda, bilirubin azobilirubinin oluşturulması için hızlandırıcı olarak kullanılan kafein, benzoat ve asetatın varlığında diazo reaktifi ile reaksiyona girer. Cihaz uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 35 kısım reaktiftir. Sistem 520 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki TB konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından TB konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.4. Direkt Bilirubin (DB) Ölçümü

DB konsantrasyonu bir zamanlı bitiş noktalı diazo yöntemiyle ölçülür. Reaksiyonda, DB diazo ile bileşerek azobilirubin oluşturur. Cihaz uygun numune ve reaktif

hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 32 kısım reaktiftir. Sistem 560 nanometredeki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki DB konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından DB konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.5. Trigliserit (TG) Ölçümü

Numune içindeki TG, lipazın etkisiyle gliserol ve serbest yağ asitlerine hidroliz olur. Gliserol kinaz, gliserofosfat oksidaz ve horseradish peroksidaz kullanılan birleştirilmiş üç enzimatik adımdan bir seri 3,5-dikloro-2-hidroksibenzensülfonik asidin (DHBS) 4-aminoantipirin ile oksidatif birleşmesine neden olup, kırmızı bir kinonimin boya oluşur. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 100 kısım reaktiftir. Sistem 520 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki TG konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve sistem tarafından TG konsantrasyonunun hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.6. C-Reaktif Protein (CRP) Ölçümü

CRP reaktifi, CRP konsantrasyonunun bir türbidimetrik yöntemle ölçülmesinde kullanılır. Reaksiyonda CRP, çözünmez antijen-antikor komplekslerini oluşturmak için spesifik antikorla birleşir. Cihaz, uygun numune ve reaktif hacimlerini küvet içinde otomatik olarak orantılar. Kullanılan oran bir kısım numuneye 26 kısım reaktiftir. Sistem 340 nm'deki absorbans değişikliğini takip eder. Absorbanstaki bu değişiklik numunedeki CRP konsantrasyonu ile orantılıdır ve sistem tarafından CRP konsantrasyonunun tek noktalı ayarlanmış, önceden belirlenmiş kalibrasyon eğrisinde hesaplanması ve gösterilmesi için kullanılır.

3.5.7. Haptoglobin (Hp) Ölçümü

Haptoglobin konsantrasyonu nefelometrik yöntemle ölçülmektedir. Protein içeren vücut sıvılarında özgül antikorlarla immünokimyasal reaksiyonla immün kompleksler oluşur. Bu kompleksler örnekten geçen ışık sütununda saçılmaya neden olur. Saçılan ışığın yoğunluğu, örnekteki aranan protein konsantrasyonuyla orantılıdır. Bu sonuçlar konsantrasyonu bilinen bir standartla karşılaştırılarak değerlendirilir.

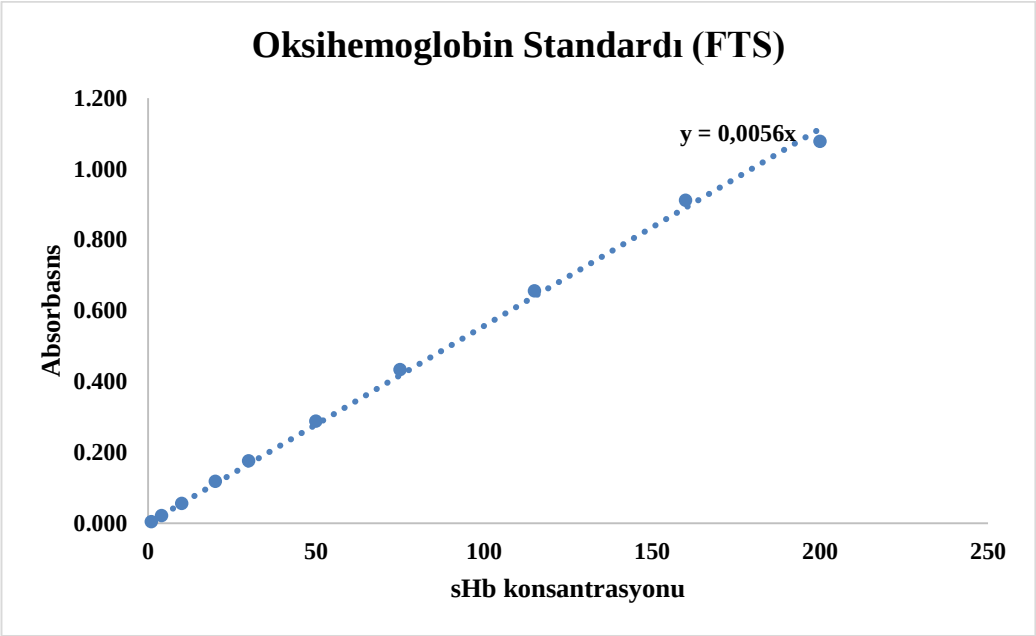
3.6. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Sonuçların istatistiksel analizi 'SPSS 15.0 for Windows' paket programıyla yapılmıştır.

Parametrelerin dağılımlarının değerlendirilmesi sonucu parametrik test varsayımları sağlanmadığında, dağılımı normal olmayan değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; medyan (minimum (min) – maksimum (maks)) olarak gösterildi. Parametrik test varsayımları sağlandığında ise, dağılımı normal olan değişkenler için tanımlayıcı istatistikler; ortalama ± standart sapma olarak gösterildi. Parametrelerin, referans değerlerinin orta noktasına göre karşılaştırılmasında Mann-Whitney U testi kullanıldı. Parametreler arasındaki ilişki değerlendirilirken Spearman korelasyon analizi kullanıldı. $p<0,05$ için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

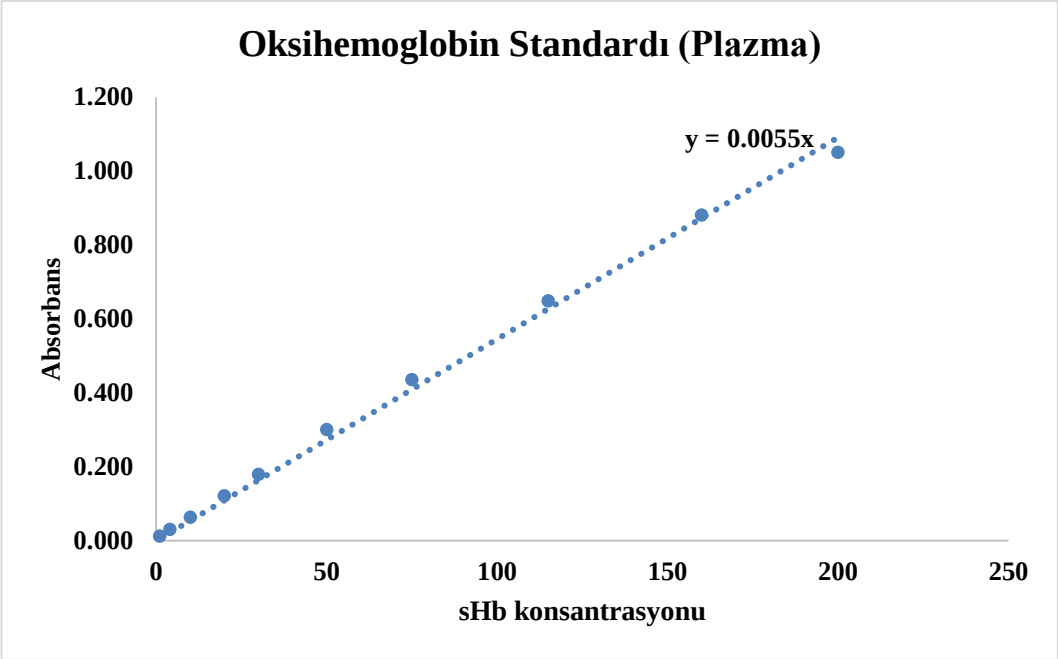
4. BULGULAR

4.1. YÖNTEM OLUŞTURMA VE DEĞERLENDİRME BULGULARI



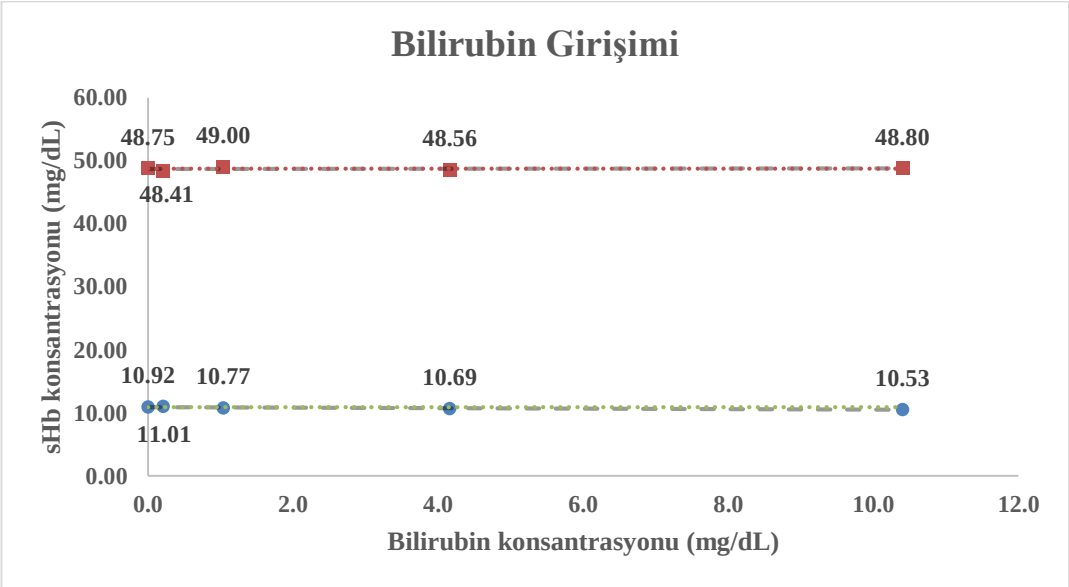
Şekil 4.1. FTS'de oksihemoglobin standardı.

FTS'de 10 seviyedeki (1, 4, 10, 20, 30, 50, 75, 115, 160 ve 200 mg/dL) oksihemoglobin standartlarının, konsantrasyonlarına göre absorbans grafikleri çizildi. Buna göre, faktör değeri 178,6 (10000/56) olarak bulundu.



Şekil 4.2. Plazmada oksihemoglobin standardı

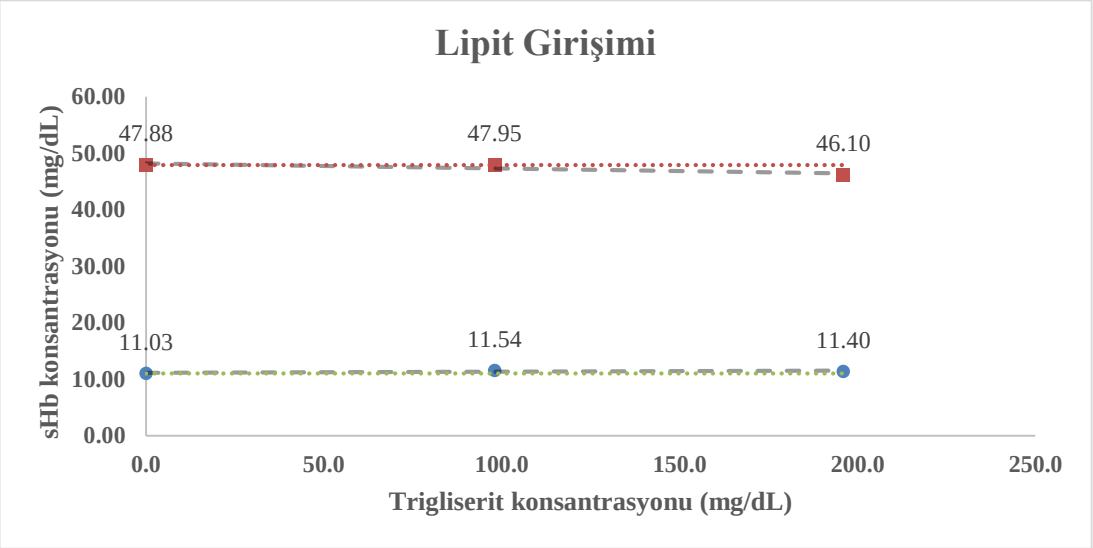
Plazmada yapılan 10 seviyede (1, 4, 10, 20, 30, 50, 75, 115, 160 ve 200 mg/dL) oksihemoglobin standartlarının konsantrasyonlarına göre absorbans grafikleri çizildi. Buna göre, faktör değeri 181,8 (10000/55) olarak bulundu.



Şekil 4.3. Plazmada bilirubin girişiminin değerlendirilmesi

Noktalı çizgiler ilk okumaya göre çizilen doğrusal çizgiler. Kesik soluk siyah çizgiler tüm değerlerin eğim çizgileridir.

Plazmada yaklaşık 10 mg/dL'lik sHb standardının artan bilirubin konsantrasyonlarında (0, 0,2, 1, 4, 10 mg/dL TB) sırasıyla 10,92, 11,01, 10,77, 10,69 ve 10,53 olarak değiştiği görülmüştür (ilk okumaya göre yüzde farklılıklar sırasıyla; 0,8, -1,4, -2,1, -3,7). Plazmada yaklaşık 50 mg/dL'lik sHb standardının ise aynı lipit konsantrasyonlarında sırasıyla 48,75, 48,41, 49,00, 48,56 ve 48,80 olarak değiştiği görülmüştür (ilk okumaya göre yüzde farklılıklar sırasıyla; -0,7, 0,5, -0,4, 0,1).



Şekil 4.4. Plazmada lipit girişiminin değerlendirilmesi

Noktalı çizgiler ilk okumaya göre çizilen doğrusal çizgiler. Kesik soluk siyah çizgiler tüm değerlerin eğim çizgileridir.

Plazmada (TG 32 mg/dL) yaklaşık 10 mg/dL'lik sHb standardının artan lipit konsantrasyonlarında (0, 100, 200 mg/dL TG) sırasıyla 11,03, 11,54, 11,40 olarak değiştiği görülmüştür (ilk okumaya göre yüzde farklılıklar sırasıyla; 4,6, 3,4). Plazmada yaklaşık 50 mg/dL'lik sHb standardının ise aynı lipit konsantrasyonlarında sırasıyla 47,88, 47,95, 46,10 olarak değiştiği görülmüştür (ilk okumaya göre yüzde farklılıklar sırasıyla; 0,1, -3,9).

4.2. ÖLÇÜLEN PARAMETRELERLE İLGİLİ BULGULAR

Çalışmamızdaki 18 hastayla ilgili genel özellikler ve EKMO uygulamalarıyla ilgili bazı veriler tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. Çalışmadaki hastaların genel özellikleri ve EKMO uygulamalarıyla ilgili bazı veriler

Cinsiyet (sayı, (%))		Yaş (yıl) ort ± SS	EKMO süresi medyan (min - maks)	EKMO tipi (sayı, (%))	
K 4 (22)	E 14 (78)	52,86 ± 13,34	4 (2-19) gün	VA 16 (87)	VV 2 (13)

Çalışmadaki 18 hastanın, 4'ü (yaklaşık % 22) kadın (K), 14'ü erkek (E) (yaklaşık % 78) hastalardan oluştuğu görüldü. Çalışmadaki tüm hastaların yaşlarının 52,86 ± 13,34 olduğu saptandı. 18 hastanın EKMO'da kalış sürelerinin 4 (2-19) gün olduğu tespit edildi. Tüm hastaların 16'sına (yaklaşık % 87) VA EKMO uygulanmıştır. Diğer 2 hastaya ise VV EKMO uygulanmıştır.

Tablo 4.2. Parametrelerin referans değerlere göre karşılaştırılması.

	Medyan (min-maks)	**Referans değer orta noktası**	***p* değeri**
sHb (mg/dL)	6,01 (2,13-171,03)	5	*≤ 0,000*
NO (µM)	10,88 (4-55,5)	38,55	*≤ 0,000*
Laktat (mM)	26,5 (1,4-180)	1,3	*≤ 0,000*
LDH (U/L)	370,5 (127-14356)	172,5	*≤ 0,000*
Hp (g/L)	0,32 (0,08-2,67)	1,15	*≤ 0,000*
CRP (mg/L)	106 (1,9-367,2)	2,5	*≤ 0,000*

Laktat, LDH, Hp ve CRP değerleri, Ankara Üniversitesi, İbni Sina Araştırma ve Uygulama Hastanesi, Merkez Laboratuvarındaki referans değerlerinin orta noktalarına göre karşılaştırıldıklarında; laktat, LDH ve CRP'nin anlamlı yüksek (her üçü için de $p \leq 0,000$), Hp'nin ise anlamlı düşük oldukları bulundu ($p \leq 0,000$). sHb ve NO değerlerinin karşılaştırılması sırasıyla, ELSO kılavuzundaki (1) ve literatürdeki (168) normal değerinin orta noktalarına göre yapıldı ve anlamlı yüksek oldukları saptandı ($p \leq 0,000$).

Tablo 4.3. Korelasyon tablosu

Correlations

			sHb	NO	Laktat	LDH	Hp	CRP
Spearman's rho	sHb	Correlation Coefficient	1,000	,308**	,634**	,405**	,173	,219*
		Sig. (2-tailed)	.	,002	,000	,000	,220	,029
		N	100	100	74	100	52	99
	NO	Correlation Coefficient	,308**	1,000	,247*	,189	,117	,157
		Sig. (2-tailed)	,002	.	,034	,060	,407	,120
		N	100	100	74	100	52	99
	Laktat	Correlation Coefficient	,634**	,247*	1,000	,168	-,119	,430**
		Sig. (2-tailed)	,000	,034	.	,153	,484	,000
		N	74	74	74	74	37	73
	LDH	Correlation Coefficient	,405**	,189	,168	1,000	,192	,037
		Sig. (2-tailed)	,000	,060	,153	.	,173	,717
		N	100	100	74	100	52	99
	Hp	Correlation Coefficient	,173	,117	-,119	,192	1,000	,057
		Sig. (2-tailed)	,220	,407	,484	,173	.	,687
		N	52	52	37	52	52	52
	CRP	Correlation Coefficient	,219*	,157	,430**	,037	,057	1,000
		Sig. (2-tailed)	,029	,120	,000	,717	,687	.
		N	99	99	73	99	52	99

**. Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

*. Correlation is significant at the 0.05 level (2-tailed).

Çalışmamızda sHb konsantrasyonlarıyla, plazma NO (korelasyon katsayısı (R)= 0,308, *p= 0,002*), laktat (R= 0,634, *p≤ 0,000*), LDH (R= 0,405, *p≤ 0,000*) ve CRP (R= 0,219, *p= 0,029*) seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulunmuştur. Ayrıca NO miktarlarıyla laktat seviyeleri arasında (R= 0,247, *p= 0,034*) ve laktat miktarlarıyla CRP seviyeleri arasında (R= 0,430, *p≤ 0,000*) da anlamlı ilişki bulunmuştur. NO miktarlarıyla LDH seviyeleri arasında anlamlıya yakın ilişki (R= 0,189, *p= 0,060*) bulunmuştur. Hp miktarlarıyla, sHb (R= 0,173, *p= 0,220*) ve CRP (R= 0,057, *p= 0,687*) seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır.

5. TARTIŞMA

EKMO hastalarında hemoliz, EKMO merkezleri arasında sıklığı değişmekle beraber ciddi bir durumdur (20, 21). Hemoliz sonucu açığa çıkan Hb'nin farklı mekanizmalarla vücuda zararlı etkileri olabilir. İlk olarak sHb'nin böbrekler üzerinde zararlı etkileri olabilir. sHb ile renal hasar gelişimi arasındaki ilişki iki mekanizmayla açıklanmıştır. İlk olarak, üriner sHb kaynaklı serbest demir ve hem renal tübüler epitele hasar veren ROT'un üretimini tetikler (169). İkincisi, intratübüler sHb birikimi ve hem, asidik idrarda renal kast oluşumuna neden olarak tübüler lümeni tıkar ve glomerüler filtrasyonu azaltır. Ayrıca intravasküler hemoliz sırasında Hb salınımı, aşırı NO tüketimiyle, guanilat siklaz aktivitesinde azalma, düz kas kasılması, vazokonstrüksiyon ve platelet aktivasyonu/agregasyonuna neden olur (9). Bunun yanında NO'nun sistemik azalışının özafagial spazm ve disfaji, abdominal ağrı, erektil disfonksiyon ve trombozu içeren çeşitli klinik durumlara neden olduğu gösterilmiştir (170-172). Ek olarak sistemik Hb salınımı, sistemik ve pulmoner hipertansiyon, azalmış organ kanlanması ve artmış mortaliteyle de ilişkilidir (173, 174). Ayrıca Hb ve hem direkt olarak da endotelyal hücreleri aktive ederek enflamasyona ve koagülasyona neden olabilir (175). Sonuç olarak bu hastalarda hemoliz gelişimi birçok morbiteye hatta mortaliteye neden olabilir. Bu nedenle bu hastalardaki hemoliz gelişiminin erken ve doğru bir şekilde saptanması önemlidir.

Öncelikle sHb ölçüm yöntemiyle ilgili değerlendirmeler yapılacak olursa; literatürde belirtildiği kadarıyla ideal bir plazma Hb ölçüm yöntemi şu kriterleri karşılamalıdır (136): İnsanlarda plazma hemoglobin değerlerini 0-1000 mg/dL arasında doğru ve kesin bir şekilde ölçebilmeli, artan bilirubin ve lipit konsantrasyonlarından etkilenmemeli, kullanımı kolay olmalı, çok sayıda plazma örneğinin hızlıca ölçümünü sağlamalı, örnekleri seyreltmek gerekmemeli ve düşük örnek hacmi kullanılmalı, tehlikeli kimyasallar kullanılmamalı, hazır ve kolayca temin edilen stabil standartları olmalı ve pahalı olmayan spektrofotometre gerektirmelidir. Ancak plazma hemoglobin ölçümü için henüz böyle bir ölçüm yöntemi yoktur.

sHb ölçüm yöntemlerinin çoğuyla ölçülen plazma hemoglobin konsantrasyonu, arka plandaki plazma bileşenlerinin seviyelerine bağlı olarak, 200-250 mg/dL civarındadır. Bu seviyelerin üstünde çoğu spektrofotometrede doğrusal aralık değerleri aşılır. Her ne kadar şu an için bulunan yöntemlerin hiçbiri yukarıdaki bütün kriterleri tam olarak karşılamasa da bazı yöntemler diğerlerinden üstündür. Genel anlamda Cripps ve Harboe metotları, doğruluk, tekrarlanabilirlik, kolay kullanım, duyarlılık ve lipit etkileşiminden korunma yönlerinden daha güçlüdür (136). Ancak dezavantajları olduğu akıldan çıkarılmamalıdır. Cripps metodu seyreltme gerekmeksizin plazmada 577 nm civarında oksihemoglobin pikini ölçse de şu yönlerden eleştirilebilir: Sadece oksihemoglobini ölçer (165), bu pikin genişliği azdır (33 nm bant genişliği) bu nedenle bant genişliği yaklaşık 2 nm olan spektrofotometreler gereklidir, oksihemoglobin dönüşümü bu piki birkaç saat içinde etkileyebilir ve ticari olarak stabil standartları yoktur. Harboe metodunun yüksek lipit ve methemoglobin seviyelerinde kullanımı güvenilirdir. Ancak Harboe metodunun doğruluğu, normalin üzerindeki bilirubin konsantrasyonlarında etkilenmektedir. Bu durum, hemolizle birlikte sıklıkla bilirubin seviyeleri de yükseldiğinden, dikkate değerdir (66).

Her ne kadar TMB ve benzer kromojenlerin kullanıldığı yöntemler, düşük örnek hacmi gereksinimi ve standartlarıyla birlikte kit formunun bulunması nedeniyle kullanımı yaygın olsa da, direkt optik tekniklere kıyasla 20 plazma örneğinin analizi 8 kat daha uzun sürmektedir ve sonuçların kesinlik ve doğruluk değerleri düşüktür (136). Uygulaması zor olmasa da, çoklu pipetleme ve tam reaksiyon zamanı gereklidir. Tek seferde çalışılabilen plazma örnek sayısı sınırlıdır. Ayrıca kalsiyum şelatlayıcı antikoagülanlarla (ör. sitrat, oksalat ve EDTA), albüminle veya diğer özgül olmayan plazma bileşenleriyle %40'a varan reaksiyon inhibisyonu olasıdır (142). Diğer bir dezavantaj, dar doğrusal aralık (5-50 mg/dL) nedeniyle örneğin Hb konsantrasyonu bu aralığa gelene kadar seyreltilmesi gereksinimidir. HiCN yöntemi gibi bu yöntemde de kimyasal stabilite, kullanma ve imha etme, direkt optik tekniklere göre daha önemlidir.

HiCN yönteminin dezavantajları; tehlikeli kimyasal kullanımı, düşük duyarlılık ve plazma bileşimine bağlı olarak absorbansta kısmi artıştır. Bu yöntemin ana

avantajları; stabil uluslararası kabul gören HiCN standartlarının varlığı, HiCN'nin 540 nm'de geniş piki nedeniyle geniş bant genişliği olan daha ucuz spektrofotometreler kullanılabilmesi, Hb'nin genel formlarının çoğunu hızlıca HiCN'ye çevirebilmesi, tam kan total hemoglobin ölçümünde kabul edilen metot olmasıdır (136, 141).

Ek olarak plazma Hb ölçümünde şu noktalara dikkat edilmesi gerekir. Öncelikle hemoliz takibi amacıyla Hb ölçümlerinde, fizyolojik pıhtılaşma süreci eritrositlerden Hb salınımını artırdığından, serum kullanımından kaçınılmalıdır (165). Tam kan total Hb ölçümünde kullanılan kooksimetreler ve hemoglobin analizörleri, plazma Hb konsantrasyonlarının ölçümünde yeterli değildirler. 541 nm oksihemoglobin piki, 577 nm pikinden, daha geniş olsa da (fakat yaklaşık % 7 daha küçük), direkt arka plan düzeltmesini güçleştiren daha fazla spektral etkileşimden dolayı, sadece plazma hemoglobininin göreceli ölçümlerinde kullanılmalıdır. Sadece 2 dalga boyu ölçümünü kullanan yöntemlerde ve özellikle de sadece tek dalga boyunda ölçüm yapılan yöntemlerde (HiCN gibi) spektral etkileşim direkt olarak düzeltilemediğinden daha çok göreceli plazma Hb konsantrasyonlarının raporlanmasında kullanılmalıdır (136).

Sonuç olarak, her ne kadar direkt optik teknikler plazma Hb ölçümünde daha az kullanılmasına rağmen, Cripps ve Harboe yöntemleri gibi bazıları, kimyasal eklemeli tekniklere göre, daha güvenli, kullanımı kolay, pratik ve doğrudur. Seyreltme gerekmeksizin plazma örneklerinde kullanılabilen, Cripps tarafından tanımlanan yöntem, 9 metodun (7 optik ve 2 kimyasal (TMB ve HiCN yöntemleri)), 11 parametre üzerinden (doğruluk, kesinlik, duyarlılık, bilirubin girişimi, lipit girişimi, kolay kullanım, test süresi, gerekli malzeme, genel kullanım ve kalibrasyon gibi) karşılaştırıldığı sistematik derlemede en yüksek puanı almıştır (136). Bu nedenle çalışmamızdaki hastaların sHb ölçümlerinin de Cripps yöntemiyle yapılması uygun görüldü. Bu yöntemle ilgili bazı kısıtlılıklar şu şekilde engellenebilir. İlk olarak ticari standartlarının olmaması ve spektrofotometreler arasında oluşabilecek farklılık, total hemoglobin ölçümünde referans yöntem (HiCN yöntemi) kullanan geçerli hemoglobin analizörleriyle, taze izole edilmiş Hb ile oluşturulan standart kalibrasyon eğrisi kullanılarak engellenebilir. İkincisi, her ne kadar 577 nm civarındaki pik total

plazma hemoglobinini ölçmemesine rağmen özellikle ölçüm öncesinde tüpün alt-üst çevrilmeleriyle çoğu hemoglobin oksijene forma dönüştürülebilir (137) ve bunun dışında bir kimyasal çevrim yoktur. Üçüncüsü Porter ve ark. (176), oksihemoglobinin (15-150 mg/dL) 37ºC'de 6 saat inkübasyon sonucunda, methemoglobinine dönüşümle 578 nm'deki absorbansında % 4-5,2 azalma olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca oda ısısında 10 saat inkübasyondan sonra veya 14 güne kadar 4ºC'de buzdolabında inkübasyondan sonra oksihemoglobin konsantrasyonunda anlamlı azalma görülmemiştir. Bu nedenle, oksihemoglobin ölçüm tekniklerini kullanmayla ilişkili hata, muhtemelen düşüktür. Ayrıca biz de bu verilerle uyumlu olarak çalışmamızda, 3 saat oda ısısında inkübasyonla yaklaşık 10 mg/dL ve 50 mg/dL'sHb konsantrasyonlarında çok küçük değişimler olduğunu gözlemledik (yüzde fark sırasıyla ≤2,3, ≤0,8). Ek olarak methemoglobin oluşumu, 625-635 nm'deki methemoglobin pikinin zamana bağlı artışından, gözlenebilir (165).

Çalışmamızda yöntem değerlendirmesinde ilk olarak girişimsiz ortam (FTS)'da standart eğrisi oluşturuldu. Daha sonra da asıl hasta ölçümlerinin yapılacağı plazmada standart eğrisi oluşturuldu. Sonuç olarak FTS'de ve plazmada oluşturulan standart eğrilerinde birbirine yakın faktör değerleri bulundu (sırasıyla 178,6 ve 181,8). Ayrıca her iki ortamdaki aynı standartların absorbans değerleri de birbirine benzer olarak bulundu. Bu durum kullanılan yöntemin özgül olmayan plazma girişiminden etkilenmediğini kısmen göstermektedir. Ayrıca bulunan bu faktör değerleri orijinal yazarın (138) önerdiği ve literatürdeki (136) değerlere (sırasıyla 181,7 ve 177,6) de oldukça yakındır. Yaklaşık 200-250 mg/dL seviyelerinin üzerinde, 576,5 nm'deki absorbans değerleri spektrofotometrenin doğrusal okuma aralığının dışına çıktığından standart grafiklerini hazırlarken en yüksek sHb konsantrasyonu 200 mg/dL olarak seçildi (bu konsantrasyonda FTS ve plazmada 576,5 nm'deki absorbans değerleri sırasıyla 1,780 ve 1,764). 200 mg/dL seviyesinin üzerinde sHb içeren numune varlığında, FTS'de dilüsyonla örnek seyreltilerek absorbansının spektrofotometrenin doğrusal okuma alanına indirilmesi faydalı olabilir.

Yaklaşık 577 nm'deki oksihemoglobin pikinin bilirubinin ve lipitlerin en fazla absorbans verdiği bölgenin uzağında olduğundan, bu dalga boyunda Hb ölçümü

yapan yöntemlerin bilirubin ve lipit girişiminden diğer yöntemlere göre daha az etkilendiği belirtilmiştir (136). Çalışmamızda bilirubin ve lipit girişimleri 10 mg/dL ve 50 mg/dL sHb seviyelerinde değerlendirildi. Çünkü 10 mg/dL sHb seviyesi ELSO'ya göre normal aralığın aşıldığı değerdir, 50 mg/dL sHb seviyesi ise ELSO'ya göre nedeni araştırılması gereken patolojik yüksek değerdir (1). Bilirubin etkileşimi değerlendirilirken, albüminle kompleks oluşturup özellikle 460-464 nm civarındaki absorbans pikiyle optik sHb ölçüm yöntemlerine girişim oluşturması nedeniyle, farklı bilirubin konsantrasyonlarının hazırlanmasında, indirekt bilirubin kullanıldı (136). Çalışmamızdaki bilirubin üst sınırı, daha yüksek seviyelerdeki bilirubinin özellikle düşük sHb seviyelerindeki (10 mg/dL) girişim etkisi belirginleştiğinden, yaklaşık 10 mg/dL olarak alındı. Lipit girişiminin değerlendirilmesinde ise ClinOleic % 20'lik intravenöz lipit solüsyonu kullanıldı. Literatürde, spektrofotometrik tekniklere lipit girişiminin özellikle şilomikronlardan kaynaklandığı belirtilmektedir(177). Tam olarak şilomikron partiküllerine benzemese de intravenöz lipit solüsyonları lipit girişiminin değerlendirilmesinde sıklıkla (Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nün girişim rehberlerinde (EP7-A2)) kullanılmaktadır (178). Çalışmamızda lipit girişimi yaklaşık 200 mg/dL lipit seviyelerine kadar değerlendirildi. Bu seviyede lipit varlığında, özellikle yaklaşık 50 mg/dL seviyesinde sHb düzeylerinde lipit eklenmeyen tüpe göre minimal girişim gözlenmiştir (sHb ölçümleri yüzde farkı % 3,9). Yaklaşık 10 mg/dL sHb içeren 10 plazma örneğinde % CV çalışması yaptığımızda bu seviyedeki % CV'nin 0,713 olduğu bulundu. Bu bağlamda bu farklılığın büyük bir kısmının lipit girişiminden kaynaklandığı söylenebilir. 200 mg/dL seviyesinin üzerinde lipit varlığında, özellikle yüksek seviyedeki sHb düzeylerinde 576,5 nm'deki absorbansın spektrofotometrenin doğrusal okuma aralığının üzerine çıkıldığından kullanımına dikkat edilmelidir. Bununla beraber 200 mg/dL'den daha yüksek konsantrasyonlarda lipit içerdiği düşünülen lipemik örnekler, okuma öncesinde FTS ile seyreltilip maksimum absorbans değerleri spektrofotometrenin doğrusal okuma aralığına getirilebilir. Ancak sHb konsantrasyonun analitik okuma sınırlarında kalması için seyreltme işlemi 2-3 katı aşmamalıdır (177). Sonuç olarak Cripps metodu sHb ölçümünde 10 mg/dL total bilirubin ve 200 mg/dL lipit konsantrasyonlarında güvenle kullanılabilir. Bu şekilde yöntem değerlendirmesi tamamlandıktan sonra, EKMO uygulanan

hastaların ölçülen sHb değerleriyle, diğer parametreleri arasındaki ilişki değerlendirildi.

Çalışmamızda öncelikle EKMO hastalarının sHb seviyeleri değerlendirildiğinde, EKMO hastalarındaki sHb seviyelerinin yüksek olduğu saptandı. Bu veriler literatürdeki EKMO uygulaması sonrası sHb seviyelerinde artış olduğunu gösteren çalışmalarla uyumludur (179). Çalışmamızda 23 örnekte sHb seviyelerinin 10 mg/dL'nin üzerinde, 4 örnekte 50 mg/dL'nin üzerinde olduğu görülmüştür. Ayrıca hemoliz değerlendirilmesinde rutinde kullanılan diğer parametreler LDH ve Hp'dir. Çalışmamızda EKMO hastalarındaki LDH seviyelerinin yüksek, Hp seviyelerinin ise düşük olduğu görülmüştür. Bu veriler hemolitik durumlarda gözlenen LDH ve Hp değişimleriyle uyumludur (180). Ayrıca korelasyon tablosu incelendiğinde sHb seviyeleriyle LDH seviyeleri arasında aynı yönlü anlamlı orta düzey ilişki olduğu görülmektedir. Ancak bir diğer hemolitik parametre olan Hp seviyeleriyle, sHb seviyeleri arasında anlamlı bir korelasyon bulunmadı. Ricci ve ark. KPB hastalarındaki hemolizi değerlendirdikleri çalışmalarında (181) da çalışmamıza benzer şekilde sHb seviyeleriyle LDH seviyeleri arasında aynı yönlü anlamlı orta derece korelasyon bulunmuştur. Ayrıca çalışmamıza benzer şekilde bu çalışmada da, sHb ve Hp arasında anlamlı korelasyon bulunmamıştır. LDH, hemoliz takibinde sıklıkla kullanılan bir belirteçtir. Özellikle izoenzim (LDH 1 ve LDH 2) tayiniyle hemoliz takibindeki özgüllüğü ve duyarlılığı daha da artırılabilir. Literatürde Hp'nin sHb ilişkisiyle ilgili kafa karıştırıcı sonuçlar olduğu görülmektedir (182). Bu durum ilk olarak Hp'nin önemli bir akut faz reaktanı olmasından kaynaklanabilir (106). Hemoliz durumlarında Hb'yi bağlayarak karaciğerde CD163 aracılı endositozu gerçekleşen Hp yeniden dolaşıma verilmeyerek yıkılır. Bu şekilde hemolizle kan seviyesi azalan Hp için pozitif bir geri-besleme mekanizması bulunmamaktadır. Karaciğerdeki günlük sabit sentezi ancak enflamasyon durumlarında artmaktadır (103). Gerçekten de bizim çalışmamızdaki hastaların yüksek CRP seviyeleri varlığıyla gösterilen enflamatuvar durum bu uyumsuzluğu kısmen açıklayabilir. Ancak aşağıda değinildiği şekilde Hp ile CRP arasında da anlamlı ilişki bulunmaması kafaları daha da karıştırmaktadır. İkincisi, Hp'nin kişiden kişiye değişen tipine (Hp 1 ve Hp 2) bağlı olarak kandaki miktarı ve sHb bağlayıcı kapasitesi değişmektedir (100). Bu nedenle hem referans aralığı geniştir hem de Hp 2

formu polimerize olarak daha düşük afiniteyle ve daha az miktarda Hb bağlamaktadır. Yani aynı kan seviyesine sahip farklı Hp formlarının farklı sHb süpürücü aktivitesi olabilmektedir. Ek olarak ilerleyen kısımlarda daha ayrıntılı değindiğimiz şekilde hastalara farklı miktarlarda kan ürünü verilmesi de bu uyumsuzluğun nedeni olabilir. Sonuç olarak ELSO, EKMO hastalarının hemoliz takiplerinin sHb düzeylerine göre yapılmasını önermektedir (1). Bu veri temel alınıp, sHb seviyeleriyle korelasyonları incelendiğinde; hastaların LDH düzeylerine bakılarak hemoliz düzeyi hakkında orta düzeyde fikir sahibi olunabilir. Hp seviyelerinin hemolizde azaldığı bir gerçektir ancak hastaların Hp seviyelerine bakılarak hemoliz seviyeleri hakkında yorum yapmak uygun olmayabilir.

Çalışmamızda EKMO hastalarındaki NO düzeyi düşük olarak bulunmuştur. Bu durum hemoliz sonucu eritrositlerden açığa çıkan arginaz-1 etkisinden kaynaklanabilir. Hemoliz, eritrositlerden Hb yanında NO sentezi için substrat olan, L-arginini ornitine dönüştüren, arginaz-1 salınımıyla sonuçlanır. Dolayısıyla normal şartlarda NO sentezine gidebilecek arginin bu etkiyle ornitine dönüşür. Bu yüzden hemoliz, sistemik NO biyoyararlanımının düşmesine neden olur (80, 183). Bu gözlemlerle uyumlu olarak, orak hücreli anemi hastalarında hemolitik atak sırasında pulmoner basınç artarken, arginin/ornitin oranının anlamlı olarak azaldığı belirtilmiştir (184). Ayrıca korelasyon tablosuna bakıldığında sHb seviyeleriyle NO düzeyleri arasında aynı yönlü düşük seviyeli anlamlı korelasyon olduğu bulunmuştur. Bu veriler, benzer yöntemle, literatürdeki sHb ve NO arasındaki ilişkiyi inceleyen yayınlarla uyumludur (185). Benzer şekilde orak hücreli anemi hastalarında, NO tüketiminin ölçülen plazma Hb seviyeleriyle yüksek derecede ilişkili (R= 0,92) olduğu bulunmuş ve Hb'nin yıkımıyla plazma NO tüketici aktivitenin azaldığı belirtilmiştir (79). Hemoliz sonucu açığa çıkan sHb'nin NO seviyelerini birkaç şekilde düşürdüğü belirtilmiştir. Öncelikle O_2Hb'nin, NO'nun güçlü süpürücüsü olduğu gösterilmiştir (9). O_2Hb'nin ve NO'nun hızlı (6-8 X 10^7 $M^{-1}.s^{-1}$) ve geri dönüşümsüz reaksiyonu, Hb'nin methemoglobine ve NO'nun nitrata (NO_3^-) dönüşümüyle sonuçlanır. Bu reaksiyonun hızlı ve geri dönüşümsüz olması nedeniyle çok az miktardaki Hb'nin NO'yu tamamen inhibe ederek endotelyal fonksiyon bozukluğu oluşturabileceği belirtilmiştir. 10 mg/dL'nin üzerindeki Hb'nin, NO bağımlı aort halka dilatasyonunu tamamen inhibe etmek için yeterli olduğu

gösterilmiştir (79). Normal fizyolojik koşullarda NO ve Hb arasındaki bu reaksiyon, eritrosit membranı ve endotel arasındaki çok sayıda engel sayesinde, yaklaşık 650 kat azaltılır (186). Dahası yukarıda belirtildiği şekilde hemoliz sonucu eritrositlerden arginaz-1 de salınır. Bu nedenle NO biyoyararlanımı daha da düşer. Ek olarak deoksiHb ile NO arasında da S-nitrozile Hb oluşumuyla sonuçlanan tepkime gerçekleşebilir ancak bu reaksiyon hem yavaş (10^7 $M^{-1}.s^{-1}$) hem de geri dönüşümlüdür (79). Bu bilgiler ışığında sHb seviyeleriyle NO miktarları arasında ters yönlü bir korelasyon olması beklenilebilirdi. Ancak bunun için NO ölçüm yönteminin biraz detaylandırılması gerekir. Aslında Griess metodunda (167) direkt olarak NO ölçümü yerine onun metabolitleri ölçülmektedir. Bu yöntemle, ortamdaki nitrit (NO_2^-) miktarı direkt olarak ölçülür. Ortamdaki nitrat (NO_3^-) ise kadmiyum etkisiyle nitrite indirgenerek indirekt olarak ölçülür. Bu şekilde NO miktarı olarak belirtilen aslında ortamdaki NO metabolitlerinin miktarıdır. Hemoliz sonucu açığa çıkan sHb etkisiyle NO'nun nitrata dönüşür. Nitrat da kadmiyum etkisiyle nitrite indirgenerek ölçülür. Dolayısıyla ortamdaki sHb miktarı arttıkça NO metabolitlerinin miktarı da arttığından, çalışmamızda bu iki parametre arasındaki ilişkinin aynı yönlü olmasının nedeni bu durum olabilir.

Kan laktat seviyelerinin, organ kanlanmasının ve anaerobik metabolizmanın iyi bir belirteci olduğu düşünülmektedir (154). Çalışmamızda hastaların laktat değerleri oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Bu veriler mekanik dolaşım uygulanan hastalardaki yüksek laktat seviyelerini gösteren çalışmalarla uyumludur (187-189). Bu çalışmalarda hastalardaki yüksek laktat seviyelerinin mortaliteyle ilişkili olduğu da belirtilmiştir. Ancak bu çalışmalardaki yüksek laktat seviyeleri arasında farklılıklar gözlenmektedir. Bu uyumsuzluğun nedeni çeşitli EKMO uygulanan hastalara verilen kan ürünlerini miktarının farklılığı olabilir. Çünkü beklemiş kan ürünleri uygulaması kan laktat seviyelerini yükselten önemli bir nedendir (190). Çalışmamızda her hastaya EKMO uygulandığı süre boyunca günlük ortalama 1,43 ünite eritrosit süspansiyonu ve 1,45 ünite taze donmuş plazma verildiği görülmüştür. Ayrıca korelasyon analiziyle laktat seviyeleriyle sHb seviyeleri arasında aynı yönlü anlamlı orta düzey ilişki olduğu gözlendi. sHb etkisiyle azalan NO özellikle mikrovasküler dolaşımda bozulmaya neden olarak doku kanlanmasında ve dolayısıyla doku oksijenasyonunda bozulmaya neden olabilir. Bununla bağlantılı

olarak sHb seviyeleriyle laktat düzeyleri arasında aynı yönlü korelasyon ortaya çıkmış olabilir. Benzer şekilde hastaların laktat seviyeleriyle NO seviyeleri arasında da aynı yönlü anlamlı zayıf korelasyon bulundu. Daha önce belirtildiği şekilde bu korelasyonun aynı yönlü olması, NO yerine metabolitlerinin (nitrit ve nitrat) ölçümünden kaynaklanmış olabilir.

Çalışmamızda, EKMO hastalarının CRP seviyeleri oldukça yüksek olarak bulunmuştur. Bu durum literatürdeki EKMO hastalarındaki CRP seviyeleriyle değerlendiren çalışmalarla uyumludur (191, 192). Bu yüksek CRP seviyeleri üzerinde birçok faktör etkili olabilir. Öncelikle kan ve EKMO yapay yüzeyinin direkt teması özellikle kompleman aktivasyonuna yol açar (55). Ek olarak fazla miktarda hem varlığında, *in vitro* nötrofil aktivasyonunun ve göçünün tetiklendiği ve çeşitli organlarda enflamatuvar birikimler olduğu bildirilmiştir (175, 193). Bu bilgilerle uyumlu olarak korelasyon analiziyle de hastaların CRP seviyeleriyle sHb seviyeleri arasında aynı yönlü anlamlı düşük düzeyli ilişki bulunmuştur. Benzer şekilde CRP seviyeleriyle laktat seviyeleri arasında da aynı yönlü anlamlı orta düzey ilişki bulunmuştur. Ancak Hp seviyeleriyle CRP seviyeleri arasında anlamlı ilişki bulunmamıştır. Daha önce değinildiği şekilde Hp'nin alt tiplerinin etkisi veya hastalara verilen kan ürünlerini farklılığı bu durumun nedeni olabilir.

Aşağıda önemine değindiğimiz bu çalışmanın birtakım kısıtlılıkları da bulunmaktadır. İlk olarak 18 hastanın 100 örneğinden yola çıkarak bütün EKMO hastalarıyla ilgili yorumlarda bulunmak güçtür. Ancak bu sayıdaki örneklerin toplanması bile yaklaşık 6 aylık bir zaman almıştır. İkincisi çalışmamızda bir kontrol grubunun bulunmaması da önemli bir kısıtlılıktır. Ancak çalışmamızdaki verilerin birbirleriyle ilişkisi sadece korelasyonla değerlendirildiğinden bu şekildeki bir çalışma dizaynında kontrol grubuna ihtiyaç yoktur. Yine de daha fazla örnek sayısının yer aldığı ve randomize kontrollü bir çalışma dizaynıyla daha fazla ve daha güvenilir çıkarımlar yapılabilir. Üçüncüsü çalışmamızdaki hastalara verilen kan ürünlerinin ölçülen parametreler üzerinde farklı şekillerde ve miktarlarda etkisi olabilir. Ek olarak kan alma zamanıyla kan ürünü verilme zamanı arasındaki süre de hesaba katıldığında öngörülmesi güç sonuçlar ortaya çıkabilir. Bununla beraber korelasyon tipi bir çalışma dizaynında bu etkilerin minimal olduğu da bir gerçektir.

Ancak parametrelerin referans değerlerine göre karşılaştırılmasına etkisi olabileceği unutulmamalıdır.

Sonuç olarak ekstrakorporeal dolaşım uygulanan hastalarda hemoliz gelişimi birçok morbiteye hatta mortaliteye neden olabilir. Bu nedenle, bu hastalardaki hemoliz gelişiminin erken ve doğru bir şekilde saptanması önemlidir. EKMO alanında uluslararası rehberler yayınlayan ELSO, bu hastalarda hemoliz takibinin sHb ölçümüyle yapılmasını önermektedir. Bu nedenle bu çalışma, sHb ölçümüyle ilgili bu ihtiyacı karşılayarak, EKMO hastalarında hemolizle ilişkili morbiditeyi ve mortaliteyi azaltabilmesi nedeniyle önemlidir. Ayrıca çalışmamızın başında hemoliz sonucu açığa çıkan sHb NO biyoyaralanımını azaltarak özellikle doku kanlanmasının gerçekleştiği mikrovasküler dolaşımı bozup kan laktat seviyelerini artırabileceği varsayımında bulunmuştuk. Çalışmamızdaki EKMO hastalarından elde ettiğimiz sHb, NO ve laktat verileri bu varsayımımızla uyumlu sonuçlar ortaya koymuştur. Bu nedenle bu çalışma, EKMO uygulanan hastalarda sHb, NO ve laktat arasındaki ilişkiyi gösteren, bildiğimiz kadarıyla ilk çalışma olması nedeniyle de önemlidir. Daha fazla hasta ve örnek sayısının yer aldığı ve randomize kontrollü bir çalışma dizaynıyla elde edilecek benzer sonuçlar, hastalara uygulanabilecek hemolizden koruyucu önlemleri veya hemoliz sonucu açığa çıkan sHb seviyelerini düşürücü yaklaşımları veya hemolizle azalan NO seviyelerini artırıcı uygulamaları teşvik edilerek hastaların morbiditelerinde ve mortalitelerinde azalma sağlanabileceği konusunda yol gösterici olabilir.

6. SONUÇLAR

1. Direkt optik teknikler plazma Hb ölçümünde daha az kullanılmasına rağmen, Cripps yöntemi, kimyasal eklemeli tekniklere göre, daha güvenli, kullanımı kolay, daha pratik ve doğrudur.

2. Cripps yöntemiyle plazmada oluşturulan standart eğrisinde elde edilen faktör değeri (181,8) 200 mg/dL sHb seviyelerine kadar güvenle kullanılabilir.

3. Cripps metodu, 10 mg/dL total bilirubin ve 200 mg/dL lipit konsantrasyonlarına kadar, sHb ölçümünde güvenle kullanılabilir.

4. EKMO hastalarının sHb, LDH, laktat ve CRP seviyelerinin yüksek, NO metabolitlerinin ve Hp seviyelerinin düşük olduğu görülmüştür.

5. EKMO hastalarındaki sHb seviyeleriyle ilişkileri incelendiğinde, hastaların LDH düzeylerine bakılarak, hastaların hemoliz düzeyi hakkında orta düzeyde fikir sahibi olunabilir. Ancak hastaların Hp seviyelerine bakılarak hemoliz düzeyleri hakkında yorum yapmak uygun olmayabilir.

6. Hemoliz, özellikle O_2Hb'nin direkt NO ile tepkimesiyle veya arginaz-1 salınımıyla NO biyoyararlanımında azalmaya neden olabilmektedir.

7. sHb etkisiyle azalan NO özellikle mikrovasküler dolaşımda bozulmaya neden olarak doku kanlanmasında ve dolayısıyla doku oksijenasyonunda bozulmaya ve hastaların laktat seviyelerinde yükselmeye neden olabilir.

8. Bazı kısıtlılıklarına rağmen bu çalışma, EKMO uygulanan hastalarda sHb, NO ve laktat arasındaki ilişkiyi gösteren, bildiğimiz kadarıyla ilk çalışmadır. Daha fazla hasta ve örnek sayısının yer aldığı ve randomize kontrollü bir çalışma dizaynıyla elde edilecek benzer sonuçlar, bu parametrelerdeki üzerinden olabilecek tedavi uygulamalarını teşvik edilerek, hastaların morbiditelerinde ve mortalitelerinde azalma sağlanabileceği konusunda yol gösterici olabilir.

ÖZET

Ekstrakorporeal Yaşam Desteğindeki Hastalarda Optimum Biyokimyasal Takip: Hemoliz Kriterleri ve Anaerobik Metabolizma

Amaç: Bu çalışmada, mg/dL seviyesinde hemoglobin ölçümü yapabilen bir yöntemle, EKMO uygulanan hastaların serbest plazma hemoglobin seviyelerini belirlemek ve elde edilen bu serbest plazma hemoglobin seviyeleriyle, hastaların nitrik oksit, laktat, laktat dehidrogenaz ve haptoglobin miktarları arasındaki ilişkiyi değerlendirmek, amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Bu çalışma, toplam 18 hastanın, EKMO'ya bağlı olduğu süre boyunca alınan toplam 100 örneğiyle yapıldı. Hastalardan, EDTA'lı kan örneği alınarak, santrifüjle plazması ayrıldı ve 1250, 350 ve 300 µL hacimlerde üç parçaya bölündü. İlk kısımda sHb ölçümü ve biyokimyasal analizler (LDH, CRP, TG, TB, DB) yapıldı. Diğer iki kısımda, sırasıyla Hp ve NO testleri çalışıldı. Hastaların günlük laktat sonuçlarının ise verileri kullanıldı. Oksihemoglobin izolasyonu için EDTA'lı kan örneği santrifüj edilerek alttaki hücresel kısım alındı. 3 defa soğuk FTS ile yıkanarak daha sonra distile su ile hemolize edildi. Elde edilen oksihemoglobin çözeltisiyle öncelikle değişen konsantrasyonlarda (1, 4, 10, 20, 30, 50, 75, 115, 160 ve 200 mg/dL), FTS'de ve plazmada, standart eğrileri oluşturuldu. Daha sonra farklı bilirubin (yaklaşık 0, 0,2, 1, 4, 10 mg/dL TB) ve lipit (yaklaşık 0, 100, 200 mg/dL TG) konsantrasyonlarının, yaklaşık 10 ve 50 mg/dL' sHb seviyeleri üzerindeki etkileri değerlendirildi.

Bulgular: FTS'de ve plazmada, konsantrasyonlarına göre absorbans grafikleri çizilen oksihemoglobin standart eğrilerinden, sırasıyla 178,6 ve 181,8 faktör değerleri elde edildi. Daha sonra plazmada yaklaşık 10 mg/dL'lik sHb standardının artan bilirubin (0, 0,2, 1, 4, 10 mg/dL TB) ve lipit konsantrasyonlarında (0, 100, 200 mg/dL TG) sırasıyla 10,92, 11,01, 10,77, 10,69, 10,53 ve 11,03, 11,54, 11,40 olarak değiştiği görüldü. Plazmada yaklaşık 50 mg/dL'lik sHb standardının ise benzer bilirubin ve lipit konsantrasyonlarında sırasıyla 48,75, 48,41, 49,00, 48,56, 48,80 ve 47,88, 47,95, 46,10 olarak değiştiği görüldü. EKMO hastalarının sHb, LDH, laktat ve CRP seviyelerinin anlamlı yüksek ($p\leq 0,000$), NO metabolitlerinin ve Hp seviyelerinin anlamlı düşük ($p\leq 0,000$) olduğu görüldü. sHb konsantrasyonlarıyla, plazma NO (R= 0,308, $p= 0,002$), laktat (R= 0,634, $p\leq 0,000$), LDH (R= 0,405, $p\leq 0,000$) ve CRP (R= 0,219, $p=0,029$) seviyeleri arasında anlamlı korelasyon bulundu. Ayrıca NO miktarlarıyla laktat seviyeleri arasında (R= 0,247, $p= 0,034$) ve laktat miktarlarıyla CRP seviyeleri arasında (R= 0,430, $p\leq 0,000$) da anlamlı ilişki bulundu.

Sonuçlar: Kimyasal eklemeli tekniklere göre, Cripps yöntemi, daha güvenli, kullanımı kolay, daha pratik ve doğrudur. Bu yöntemle plazmada oluşturulan standart eğrisinden elde edilen faktör değeri, 200 mg/dL sHb seviyelerine kadar güvenle kullanılabilir. 10 mg/dL TB ve 200 mg/dL lipit konsantrasyonlarına kadar girişim düzeyi düşüktür. EKMO hastalarının, referans değerinin orta noktalarına göre, sHb ve LDH seviyelerinin anlamlı yüksek, NO ve Hp seviyelerinin ise düşük olduğu görüldü. Ayrıca bu hastalarda, doku oksijenasyonu (laktat) ve enflamasyon

(CRP) belirteçleri de referans değerlerinin orta noktalarına göre anlamlı yüksek bulundu. Korelasyon analizine göre, sHb seviyeleriyle ilişkisi incelendiğinde, hastaların LDH düzeylerine bakılarak, hastaların hemoliz düzeyi hakkında orta düzeyde fikir sahibi olunabilir. Ancak hastaların Hp seviyelerine bakılarak hemoliz düzeyleri hakkında yorum yapmak uygun olmayabilir. Hemoliz, özellikle O_2Hb'nin direkt NO ile tepkimesiyle veya arginaz-1 salınımıyla NO biyoyararlanımında azalmaya neden olabilmektedir. sHb etkisiyle azalan NO özellikle mikrovasküler dolaşımda bozulmaya neden olarak doku kanlanmasında ve dolayısıyla doku oksijenasyonunda bozulmaya ve sonuç olarak da hastaların laktat seviyelerinde yükselmeye neden olabilir.

Anahtar Sözcükler: EKMO, hemoliz, laktat, NO, sHb.

SUMMARY

Optimal Biochemical Follow up on Patients in Extracorporeal Life Support: Hemolysis Criteria and Anaerobic Metabolism

Aim: In this study, it was aimed that determine the free plasma hemoglobin levels of ECMO applied patients with a method capable of measuring mg/dL levels of hemoglobin and with the obtained free plasma hemoglobin levels, assess the relationship between patients' nitric oxide, lactate, lactate dehydrogenase and haptoglobin amounts.

Materials and Methods: This study, was conducted with a total of 18 patients' 100 samples taken during ECMO was connected. A blood sample was taken from the patient, plasma was separated by centrifugation and divided into three parts in 1250, 350 ve 300 µL volumes. In the first part, fHb measurement and biochemical analysis (LDH, CRP, TG, TB, DB) was performed. In the other two part NO and Hp tests were studied respectively. The data of patients' daily lactate results were used. For oxyhemoglobin isolation, blood samples with EDTA were centrifuged, bottom cellular part was taken and it was washed three times with cold PBS then hemolyzed with distilled water. First standards at varying concentrations (1, 4, 10, 20, 30, 50, 75, 115, 160 and 200 mg/dL) was prepared with obtained oxyhemoglobin solution, standard curve was created in the PBS and plasma. Then it was evaluated that different bilirubin (about 0, 0.2, 1, 4, 10 mg/dL TB) and lipids concentrations' (about 0, 100, 200 mg/dL TG) effects on about 10 and 50 mg/dL fHb containing in the solutions.

Results: In PBS and plasma, the oxyhemoglobin standards' graph was plotted according to the absorbance to concentration, respectively 178.6 and 181.8 factor values were obtained. Then in plasma, it has been shown to vary that about 10 mg/dL sHb standard's at increased bilirubin (0, 0.2, 1, 4, 10 mg/dL TB) and lipid concentrations (0, 100, 200 mg/dL, TG) 10.92, 11.01, 10.77, 10.69, 10.53 and 11.03, 11.54, 11.40 respectively. In plasma, it has been shown to vary that about 50 mg/dL sHb standard's at the same bilirubin and lipid concentrations 48.75, 48.41, 49.00, 48.56, 48.80 and 47.88, 47.95, 46.10 respectively. SHb It has been seen that ECMO patients' sHb, LDH, lactate and CRP levels were significantly higher ($p \leq 0{,}000$), NO metabolites and Hp levels were significantly lower ($p \leq 0{,}000$). It was found that there were significant correlation with SHb concentrations between plasma NO (R= 0.308, $p = 0.002$), lactate (R= 0.634, $p \leq 0{,}000$), LDH (R= 0.405, $p \leq 0{,}000$) and CRP (R= 0.219, $p = 0.029$) levels. Also it was found that there were significant relationship between the NO amounts and lactate levels (R= 0.247, $p = 0.034$) and between CRP levels and the amount of lactate (R= 0.430, $p \leq 0{,}000$).

Conclusions: According to the chemical additive technique, Cripps method is more secure, easier to use, more practical and accurate. Factor value which was generated in the plasma, obtained from the standard curve by this method, can be safely used up to the 200 mg/dL levels of fHb. Up to the 10 mg/dL TB and 200 mg/dL lipid

concentrations level of interference is low. Hemolytic indicators of ECMO patients (SHB, NO, LDH, and HP) were significantly different. In addition, tissue oxygenation (lactate) and inflammation (CRP) markers were found significantly elevated. According to correlation analysis, examining the relationship between fHb levels, looking at patients LDH may be had moderate level an idea about patients hemolysis levels. However, looking at patients Hp level may not be suitable to comment on the hemolysis levels. Particularly a direct reaction of O_2Hb with NO or arginase-1 release, hemolysis may lead to reduction of bioavailability of the NO. By effect of fHb, NO reduction, particularly as microvascular circulation, may cause the deterioration of tissue perfusion and tissue oxygenation and as a result, the increase in lactate levels of patients.

Key Words: ECMO, fHb, hemolysis, lactate, NO.

KAYNAKLAR

1. ELSO Guidelines for Cardiopulmonary Extracorporeal Life Support, Extracorporeal Life Support Organization, Version 1.3 November 2013, Ann Arbor, MI, USA www.elsonet.org.

2. Masalunga C, Cruz M, Porter B, Roseff S, Chui B, Mainali E. Increased hemolysis from saline pre-washing RBCs or centrifugal pumps in neonatal ECMO. J Perinatol. 2007;27(6):380-384.

3. Betrus C, Remenapp R, Charpie J, Kudelka T, Brophy P, Smoyer WE, Lin JJ. Enhanced hemolysis in pediatric patients requiring extracorporeal membrane oxygenation and continuous renal replacement therapy. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2007;13(6):378-383.

4. Wang S, Krawiec C, Patel S, Kunselman AR, Song J, Lei F, Baer LD, Undar A. Laboratory Evaluation of Hemolysis and Systemic Inflammatory Response in Neonatal Nonpulsatile and Pulsatile Extracorporeal Life Support Systems. Artif Organs. 2015.

5. Paluszkiewicz A, Kellner J, Elshehabi M, Schneditz D. Effect of hemolysis and free hemoglobin on optical hematocrit measurements in the extracorporeal circulation. ASAIO J. 2008;54(2):181-184.

6. Gbadegesin R, Zhao S, Charpie J, Brophy PD, Smoyer WE, Lin JJ. Significance of hemolysis on extracorporeal life support after cardiac surgery in children. Pediatr Nephrol. 2009;24(3):589-595.

7. Ballas SK. Lactate dehydrogenase and hemolysis in sickle cell disease. Blood. 2013;121(1):243-244.

8. Schaer DJ, Vinchi F, Ingoglia G, Tolosano E, Buehler PW. Haptoglobin, hemopexin, and related defense pathways-basic science, clinical perspectives, and drug development. Front Physiol. 2014;5:415.

9. Rother RP, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin: a novel mechanism of human disease. JAMA. 2005;293(13):1653-1662.

10. Vermeulen Windsant IC, Hanssen SJ, Buurman WA, Jacobs MJ. Cardiovascular surgery and organ damage: time to reconsider the role of hemolysis. J Thorac Cardiovasc Surg. 2011;142(1):1-11.

11. Kraut JA, Madias NE. Lactic acidosis. N Engl J Med. 2014;371(24):2309-2319.

12. Haydin S, Ündar A. Yaşam destek sistemlerinin Dünya'daki gelişmeleri ve Türkiye'deki son durum. (Turkish). Updates on extracorporeal life support in the world and challenges in Turkey (English). 2013;13(6):580-588.

13. Hill JD, O'Brien TG, Murray JJ, Dontigny L, Bramson ML, Osborn JJ, Gerbode F. Prolonged extracorporeal oxygenation for acute post-traumatic respiratory failure (shock-lung syndrome). Use of the Bramson membrane lung. N Engl J Med. 1972;286(12):629-634.

14. Zapol WM, Snider MT, Hill JD, Fallat RJ, Bartlett RH, Edmunds LH, Morris AH, Peirce EC, 2nd, Thomas AN, Proctor HJ, Drinker PA, Pratt PC, Bagniewski A, Miller RG, Jr. Extracorporeal membrane oxygenation in severe acute respiratory failure. A randomized prospective study. JAMA. 1979;242(20):2193-2196.

15. Gattinoni L, Kolobow T, Damia G, Agostoni A, Pesenti A. Extracorporeal carbon dioxide removal (ECCO2R): a new form of respiratory assistance. Int J Artif Organs. 1979;2(4):183-185.

16. Gattinoni L, Pesenti A, Mascheroni D, Marcolin R, Fumagalli R, Rossi F, Iapichino G, Romagnoli G, Uziel L, Agostoni A, et al. Low-frequency positive-pressure ventilation with extracorporeal CO2 removal in severe acute respiratory failure. JAMA. 1986;256(7):881-886.

17. UK collaborative randomised trial of neonatal extracorporeal membrane oxygenation. UK Collaborative ECMO Trail Group. Lancet. 1996;348(9020):75-82.

18. Peek GJ, Mugford M, Tiruvoipati R, Wilson A, Allen E, Thalanany MM, Hibbert CL, Truesdale A, Clemens F, Cooper N, Firmin RK, Elbourne D. Efficacy and economic assessment of conventional ventilatory support versus extracorporeal membrane oxygenation for severe adult respiratory failure

(CESAR): a multicentre randomised controlled trial. Lancet. 2009;374(9698):1351-1363.

19. Skinner SC, Hirschl RB, Bartlett RH. Extracorporeal life support. Semin Pediatr Surg. 2006;15(4):242-250.

20. Lafc G, Budak AB, Yener AU, Cicek OF. Use of extracorporeal membrane oxygenation in adults. Heart Lung Circ. 2014;23(1):10-23.

21. Abrams D, Combes A, Brodie D. Extracorporeal membrane oxygenation in cardiopulmonary disease in adults. J Am Coll Cardiol. 2014;63(25 Pt A):2769-2778.

22. Pettignano R, Fortenberry JD, Heard ML, Labuz MD, Kesser KC, Tanner AJ, Wagoner SF, Heggen J. Primary use of the venovenous approach for extracorporeal membrane oxygenation in pediatric acute respiratory failure. Pediatr Crit Care Med. 2003;4(3):291-298.

23. Rich PB, Awad SS, Crotti S, Hirschl RB, Bartlett RH, Schreiner RJ. A prospective comparison of atrio-femoral and femoro-atrial flow in adult venovenous extracorporeal life support. J Thorac Cardiovasc Surg. 1998;116(4):628-632.

24. Mielck F, Quintel M. Extracorporeal membrane oxygenation. Curr Opin Crit Care. 2005;11(1):87-93.

25. Sidebotham D, McGeorge A, McGuinness S, Edwards M, Willcox T, Beca J. Extracorporeal membrane oxygenation for treating severe cardiac and respiratory failure in adults: part 2-technical considerations. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2010;24(1):164-172.

26. Leschinsky BM, Itkin GP, Zimin NK. Centrifugal blood pumps--a brief analysis: development of new designs. Perfusion. 1991;6(2):115-121.

27. Wright G. Mechanical simulation of cardiac function by means of pulsatile blood pumps. J Cardiothorac Vasc Anesth. 1997;11(3):299-309.

28. Haworth WS. The development of the modern oxygenator. Ann Thorac Surg. 2003;76(6):S2216-2219.

29. Peek GJ, Killer HM, Reeves R, Sosnowski AW, Firmin RK. Early experience with a polymethyl pentene oxygenator for adult extracorporeal life support. ASAIO J. 2002;48(5):480-482.

30. Khoshbin E, Roberts N, Harvey C, Machin D, Killer H, Peek GJ, Sosnowski AW, Firmin RK. Poly-methyl pentene oxygenators have improved gas exchange capability and reduced transfusion requirements in adult extracorporeal membrane oxygenation. ASAIO J. 2005;51(3):281-287.

31. Palatianos GM, Foroulis CN, Vassili MI, Astras G, Triantafillou K, Papadakis E, Lidoriki AA, Iliopoulou E, Melissari EN. A prospective, double-blind study on the efficacy of the bioline surface-heparinized extracorporeal perfusion circuit. Ann Thorac Surg. 2003;76(1):129-135.

32. Koster A, Sanger S, Hansen R, Sodian R, Mertzlufft F, Harke C, Kuppe H, Hetzer R, Loebe M. Prevalence and persistence of heparin/platelet factor 4 antibodies in patients with heparin coated and noncoated ventricular assist devices. ASAIO J. 2000;46(3):319-322.

33. Geissler HJ, Allen SJ, Mehlhorn U, Davis KL, de Vivie ER, Kurusz M, Butler BD. Cooling gradients and formation of gaseous microemboli with cardiopulmonary bypass: an echocardiographic study. Ann Thorac Surg. 1997;64(1):100-104.

34. Despotis GJ, Joist JH, Hogue CW, Jr., Alsoufiev A, Joiner-Maier D, Santoro SA, Spitznagel E, Weitz JI, Goodnough LT. More effective suppression of hemostatic system activation in patients undergoing cardiac surgery by heparin dosing based on heparin blood concentrations rather than ACT. Thromb Haemost. 1996;76(6):902-908.

35. Baird CW, Zurakowski D, Robinson B, Gandhi S, Burdis-Koch L, Tamblyn J, Munoz R, Fortich K, Pigula FA. Anticoagulation and pediatric extracorporeal membrane oxygenation: impact of activated clotting time and heparin dose on survival. Ann Thorac Surg. 2007;83(3):912-919; discussion 919-920.

36. Lawson DS, Walczak R, Lawson AF, Shearer IR, Ing R, Schulman S, Kern F, Jaggers J. North American neonatal extracorporeal membrane oxygenation (ECMO) devices: 2002 survey results. J Extra Corpor Technol. 2004;36(1):16-21.

37. Agati S, Ciccarello G, Salvo D, Turla G, Undar A, Mignosa C. Use of a novel anticoagulation strategy during ECMO in a pediatric population: single-center experience. ASAIO J. 2006;52(5):513-516.

38. Hirsh J, Raschke R, Warkentin TE, Dalen JE, Deykin D, Poller L. Heparin: mechanism of action, pharmacokinetics, dosing considerations, monitoring, efficacy, and safety. Chest. 1995;108(4 Suppl):258S-275S.

39. Oliver WC. Anticoagulation and coagulation management for ECMO. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2009;13(3):154-175.

40. Muntean W. Coagulation and anticoagulation in extracorporeal membrane oxygenation. Artif Organs. 1999;23(11):979-983.

41. Koster A, Weng Y, Bottcher W, Gromann T, Kuppe H, Hetzer R. Successful use of bivalirudin as anticoagulant for ECMO in a patient with acute HIT. Ann Thorac Surg. 2007;83(5):1865-1867.

42. Doll N, Kiaii B, Borger M, Bucerius J, Kramer K, Schmitt DV, Walther T, Mohr FW. Five-year results of 219 consecutive patients treated with extracorporeal membrane oxygenation for refractory postoperative cardiogenic shock. Ann Thorac Surg. 2004;77(1):151-157; discussion 157.

43. Beiderlinden M, Eikermann M, Boes T, Breitfeld C, Peters J. Treatment of severe acute respiratory distress syndrome: role of extracorporeal gas exchange. Intensive Care Med. 2006;32(10):1627-1631.

44. Smedira NG, Moazami N, Golding CM, McCarthy PM, Apperson-Hansen C, Blackstone EH, Cosgrove DM, 3rd. Clinical experience with 202 adults receiving extracorporeal membrane oxygenation for cardiac failure: survival at five years. J Thorac Cardiovasc Surg. 2001;122(1):92-102.

45. Schuerer DJ, Kolovos NS, Boyd KV, Coopersmith CM. Extracorporeal membrane oxygenation: current clinical practice, coding, and reimbursement. Chest. 2008;134(1):179-184.

46. Extracorporeal Life Support Registry Report (International Summary). Ann Arbor, MI: Extracorporeal Life Support Organization; 200830.

47. Haile DT, Schears GJ. Optimal time for initiating extracorporeal membrane oxygenation. Semin Cardiothorac Vasc Anesth. 2009;13(3):146-153.

48. Ko WJ, Lin CY, Chen RJ, Wang SS, Lin FY, Chen YS. Extracorporeal membrane oxygenation support for adult postcardiotomy cardiogenic shock. Ann Thorac Surg. 2002;73(2):538-545.

49. Sidebotham D, McGeorge A, McGuinness S, Edwards M, Willcox T, Beca J. Extracorporeal membrane oxygenation for treating severe cardiac and respiratory disease in adults: Part 1--overview of extracorporeal membrane oxygenation. J Cardiothorac Vasc Anesth. 2009;23(6):886-892.

50. Suzuki T. Additional lung-protective perfusion techniques during cardiopulmonary bypass. Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2010;16(3):150-155.

51. Marasco SF, Lukas G, McDonald M, McMillan J, Ihle B. Review of ECMO (extra corporeal membrane oxygenation) support in critically ill adult patients. Heart Lung Circ. 2008;17 Suppl 4:S41-47.

52. Fiser SM, Tribble CG, Kaza AK, Long SM, Zacour RK, Kern JA, Kron IL. When to discontinue extracorporeal membrane oxygenation for postcardiotomy support. Ann Thorac Surg. 2001;71(1):210-214.

53. Thelin S, Bagge L, Hultman J, Borowiec J, Nilsson L, Thorelius J. Heparin-coated cardiopulmonary bypass circuits reduce blood cell trauma. Experiments in the pig. Eur J Cardiothorac Surg. 1991;5(9):486-491.

54. Videm V, Svennevig JL, Fosse E, Semb G, Osterud A, Mollnes TE. Reduced complement activation with heparin-coated oxygenator and tubings in coronary bypass operations. J Thorac Cardiovasc Surg. 1992;103(4):806-813.

55. Plotz FB, van Oeveren W, Bartlett RH, Wildevuur CR. Blood activation during neonatal extracorporeal life support. J Thorac Cardiovasc Surg. 1993;105(5):823-832.

56. Rastan AJ, Lachmann N, Walther T, Doll N, Gradistanac T, Gommert JF, Lehmann S, Wittekind C, Mohr FW. Autopsy findings in patients on postcardiotomy extracorporeal membrane oxygenation (ECMO). Int J Artif Organs. 2006;29(12):1121-1131.

57. Murphy DA, Hockings LE, Andrews RK, Aubron C, Gardiner EE, Pellegrino VA, Davis AK. Extracorporeal membrane oxygenation-hemostatic complications. Transfus Med Rev. 2015;29(2):90-101.

58. Lubnow M, Philipp A, Dornia C, Schroll S, Bein T, Creutzenberg M, Diez C, Schmid C, Pfeifer M, Riegger G, Muller T, Lehle K. D-dimers as an early marker for oxygenator exchange in extracorporeal membrane oxygenation. J Crit Care. 2014;29(3):473 e471-475.

59. Downard CD, Betit P, Chang RW, Garza JJ, Arnold JH, Wilson JM. Impact of AMICAR on hemorrhagic complications of ECMO: a ten-year review. J Pediatr Surg. 2003;38(8):1212-1216.

60. Wittenstein B, Ng C, Ravn H, Goldman A. Recombinant factor VII for severe bleeding during extracorporeal membrane oxygenation following open heart surgery. Pediatr Crit Care Med. 2005;6(4):473-476.

61. Conrad SA, Rycus PT, Dalton H. Extracorporeal Life Support Registry Report 2004. ASAIO J. 2005;51(1):4-10.

62. Burket JS, Bartlett RH, Vander Hyde K, Chenoweth CE. Nosocomial infections in adult patients undergoing extracorporeal membrane oxygenation. Clin Infect Dis. 1999;28(4):828-833.

63. Camboni D, Akay B, Sassalos P, Toomasian JM, Haft JW, Bartlett RH, Cook KE. Use of venovenous extracorporeal membrane oxygenation and an atrial septostomy for pulmonary and right ventricular failure. Ann Thorac Surg. 2011;91(1):144-149.

64. Mols G, Loop T, Geiger K, Farthmann E, Benzing A. Extracorporeal membrane oxygenation: a ten-year experience. Am J Surg. 2000;180(2):144-154.

65. Kasirajan V, Smedira NG, McCarthy JF, Casselman F, Boparai N, McCarthy PM. Risk factors for intracranial hemorrhage in adults on extracorporeal membrane oxygenation. Eur J Cardiothorac Surg. 1999;15(4):508-514.

66. McPherson RA PM. Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods. 22nd ed2011.

67. Lippi G, Cervellin G, Favaloro Emmanuel J, Plebani M. In Vitro and In Vivo Hemolysis, An Unresolved Dispute in Laboratory Medicine2012.

68. Lippi G, Plebani M, Di Somma S, Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. Crit Rev Clin Lab Sci. 2011;48(3):143-153.

69. Lippi G, Blanckaert N, Bonini P, Green S, Kitchen S, Palicka V, Vassault AJ, Plebani M. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med. 2008;46(6):764-772.

70. Lictman M.A. BE, Kipps J.T. Williams Hematology. Seventh edition. ed: The McGraw-Hill Medical; 2006.

71. Bratosin D, Mazurier J, Tissier JP, Estaquier J, Huart JJ, Ameisen JC, Aminoff D, Montreuil J. Cellular and molecular mechanisms of senescent erythrocyte phagocytosis by macrophages. A review. Biochimie. 1998;80(2):173-195.

72. Somervaille T. Disorders of Hemoglobin: Genetics, Pathophysiology, and Clinical Management. Journal of the Royal Society of Medicine. 2001;94(11):602-603.

73. Reeder BJ. The redox activity of hemoglobins: from physiologic functions to pathologic mechanisms. Antioxid Redox Signal. 2010;13(7):1087-1123.

74. Maines MD. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 1997;37:517-554.

75. (Ed) CC. Radical Reactions of Haem Proteins.: BMJ Books/Intensive Care Society; 2002.

76. Tsemakhovich VA, Bamm VV, Shaklai M, Shaklai N. Vascular damage by unstable hemoglobins: the role of heme-depleted globin. Arch Biochem Biophys. 2005;436(2):307-315.

77. Davies KJ. Protein damage and degradation by oxygen radicals. I. general aspects. J Biol Chem. 1987;262(20):9895-9901.

78. Jarolim P, Lahav M, Liu SC, Palek J. Effect of hemoglobin oxidation products on the stability of red cell membrane skeletons and the associations of skeletal proteins: correlation with a release of hemin. Blood. 1990;76(10):2125-2131.

79. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. Nat Med. 2002;8(12):1383-1389.

80. Morris CR, Kato GJ, Poljakovic M, Wang X, Blackwelder WC, Sachdev V, Hazen SL, Vichinsky EP, Morris SM, Jr., Gladwin MT. Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease. JAMA. 2005;294(1):81-90.

81. Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT, Kuo L. Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96(15):8757-8761.

82. Minneci PC, Deans KJ, Zhi H, Yuen PS, Star RA, Banks SM, Schechter AN, Natanson C, Gladwin MT, Solomon SB. Hemolysis-associated endothelial dysfunction mediated by accelerated NO inactivation by decompartmentalized oxyhemoglobin. J Clin Invest. 2005;115(12):3409-3417.

83. Vaughn MW, Huang KT, Kuo L, Liao JC. Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. J Biol Chem. 2000;275(4):2342-2348.

84. Edwards AD. The pharmacology of inhaled nitric oxide. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed. 1995;72(2):F127-130.

85. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. Nature. 1980;288(5789):373-376.

86. Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. Nature. 1987;327(6122):524-526.

87. Halliwell B, Gutteridge JMC. Free radicals in biology and medicine. Oxford: Oxford University Press; 1999.

88. Moncada S, Higgs EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. Br J Pharmacol. 2006;147 Suppl 1:S193-201.

89. Özkan M, Yüksekol İ. Nitrik Oksit ve Akciğerler. Türk Toraks Dergisi. 2003;4(1):88-94.

90. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. N Engl J Med. 1993;329(27):2002-2012.

91. Strijdom H, Chamane N, Lochner A. Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. Cardiovasc J Afr. 2009;20(5):303-310.

92. Roberts RA, Laskin DL, Smith CV, Robertson FM, Allen EM, Doorn JA, Slikker W. Nitrative and oxidative stress in toxicology and disease. Toxicol Sci. 2009;112(1):4-16.

93. 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.

94. Vercaemst L. Hemolysis in cardiac surgery patients undergoing cardiopulmonary bypass: a review in search of a treatment algorithm. J Extra Corpor Technol. 2008;40(4):257-267.

95. Kameneva MV, Undar A, Antaki JF, Watach MJ, Calhoon JH, Borovetz HS. Decrease in red blood cell deformability caused by hypothermia, hemodilution, and mechanical stress: factors related to cardiopulmonary bypass. ASAIO J. 1999;45(4):307-310.

96. Gladwin MT, Kim-Shapiro DB. Storage lesion in banked blood due to hemolysis-dependent disruption of nitric oxide homeostasis. Curr Opin Hematol. 2009;16(6):515-523.

97. Koch CG, Li L, Sessler DI, Figueroa P, Hoeltge GA, Mihaljevic T, Blackstone EH. Duration of red-cell storage and complications after cardiac surgery. N Engl J Med. 2008;358(12):1229-1239.

98. Graversen JH, Madsen M, Moestrup SK. CD163: a signal receptor scavenging haptoglobin-hemoglobin complexes from plasma. Int J Biochem Cell Biol. 2002;34(4):309-314.

99. Melamed-Frank M, Lache O, Enav BI, Szafranek T, Levy NS, Ricklis RM, Levy AP. Structure-function analysis of the antioxidant properties of haptoglobin. Blood. 2001;98(13):3693-3698.

100. Buehler PW, Vallelian F, Mikolajczyk MG, Schoedon G, Schweizer T, Alayash AI, Schaer DJ. Structural stabilization in tetrameric or polymeric hemoglobin determines its interaction with endogenous antioxidant scavenger pathways. Antioxid Redox Signal. 2008;10(8):1449-1462.

101. Langlois MR, Delanghe JR. Biological and clinical significance of haptoglobin polymorphism in humans. Clin Chem. 1996;42(10):1589-1600.

102. Wobeto VPdA, Zaccariotto TR, Sonati MdF. Polymorphism of human haptoglobin and its clinical importance. Genetics and Molecular Biology. 2008;31:602-620.

103. Nielsen MJ, Moestrup SK. Receptor targeting of hemoglobin mediated by the haptoglobins: roles beyond heme scavenging. Blood. 2009;114(4):764-771.

104. Schaer CA, Schoedon G, Imhof A, Kurrer MO, Schaer DJ. Constitutive endocytosis of CD163 mediates hemoglobin-heme uptake and determines the noninflammatory and protective transcriptional response of macrophages to hemoglobin. Circ Res. 2006;99(9):943-950.

105. Azarov I, He X, Jeffers A, Basu S, Ucer B, Hantgan RR, Levy A, Kim-Shapiro DB. Rate of nitric oxide scavenging by hemoglobin bound to haptoglobin. Nitric Oxide. 2008;18(4):296-302.

106. Jain S, Gautam V, Naseem S. Acute-phase proteins: As diagnostic tool. J Pharm Bioallied Sci. 2011;3(1):118-127.

107. Buehler PW, Abraham B, Vallelian F, Linnemayr C, Pereira CP, Cipollo JF, Jia Y, Mikolajczyk M, Boretti FS, Schoedon G, Alayash AI, Schaer DJ. Haptoglobin preserves the CD163 hemoglobin scavenger pathway by shielding hemoglobin from peroxidative modification. Blood. 2009;113(11):2578-2586.

108. Reeder BJ, Grey M, Silaghi-Dumitrescu RL, Svistunenko DA, Bulow L, Cooper CE, Wilson MT. Tyrosine residues as redox cofactors in human hemoglobin: implications for engineering nontoxic blood substitutes. J Biol Chem. 2008;283(45):30780-30787.

109. Ascenzi P, Bocedi A, Visca P, Altruda F, Tolosano E, Beringhelli T, Fasano M. Hemoglobin and heme scavenging. IUBMB Life. 2005;57(11):749-759.

110. Altruda F, Poli V, Restagno G, Argos P, Cortese R, Silengo L. The primary structure of human hemopexin deduced from cDNA sequence: evidence for internal, repeating homology. Nucleic Acids Res. 1985;13(11):3841-3859.

111. Paoli M, Anderson BF, Baker HM, Morgan WT, Smith A, Baker EN. Crystal structure of hemopexin reveals a novel high-affinity heme site formed between two beta-propeller domains. Nat Struct Biol. 1999;6(10):926-931.

112. Mattu RK, Trevelyan J, Needham EW, Khan M, Adiseshiah MA, Richter D, Murray RG, Betteridge DJ. Lipoprotein lipase gene variants relate to presence and degree of microalbuminuria in Type II diabetes. Diabetologia. 2002;45(6):905-913.

113. Tenhunen R, Marver HS, Schmid R. The enzymatic conversion of heme to bilirubin by microsomal heme oxygenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 1968;61(2):748-755.

114. Hayashi S, Omata Y, Sakamoto H, Higashimoto Y, Hara T, Sagara Y, Noguchi M. Characterization of rat heme oxygenase-3 gene. Implication of processed pseudogenes derived from heme oxygenase-2 gene. Gene. 2004;336(2):241-250.

115. Noguchi M, Yoshida T, Kikuchi G. Identification of the product of heme degradation catalyzed by the heme oxygenase system as biliverdin IX alpha by reversed-phase high-performance liquid chromatography. J Biochem. 1982;91(5):1479-1483.

116. Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. Science. 1987;235(4792):1043-1046.

117. Vile GF, Basu-Modak S, Waltner C, Tyrrell RM. Heme oxygenase 1 mediates an adaptive response to oxidative stress in human skin fibroblasts. Proc Natl Acad Sci U S A. 1994;91(7):2607-2610.

118. Maines MD. Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. FASEB J. 1988;2(10):2557-2568.

119. Applegate LA, Luscher P, Tyrrell RM. Induction of heme oxygenase: a general response to oxidant stress in cultured mammalian cells. Cancer Res. 1991;51(3):974-978.

120. Little HN, Neilands JB. Binding of haematin by human serum albumin. Nature. 1960;188:913-915.

121. Sears DA. Disposal of plasma heme in normal man and patients with intravascular hemolysis. Journal of Clinical Investigation. 1970;49(1):5-14.

122. Balla G, Jacob HS, Eaton JW, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemin: a possible physiological mediator of low density lipoprotein oxidation and endothelial injury. Arterioscler Thromb. 1991;11(6):1700-1711.

123. Gozzelino R, Jeney V, Soares MP. Mechanisms of cell protection by heme oxygenase-1. Annu Rev Pharmacol Toxicol. 2010;50:323-354.

124. Rajagopal A, Rao AU, Amigo J, Tian M, Upadhyay SK, Hall C, Uhm S, Mathew MK, Fleming MD, Paw BH, Krause M, Hamza I. Haem homeostasis is regulated by the conserved and concerted functions of HRG-1 proteins. Nature. 2008;453(7198):1127-1131.

125. Egler RA, Fernandes E, Rothermund K, Sereika S, de Souza-Pinto N, Jaruga P, Dizdaroglu M, Prochownik EV. Regulation of reactive oxygen species, DNA damage, and c-Myc function by peroxiredoxin 1. Oncogene. 2005;24(54):8038-8050.

126. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). J Biol Chem. 1969;244(22):6049-6055.

127. Schrader M, Fahimi HD. Peroxisomes and oxidative stress. Biochim Biophys Acta. 2006;1763(12):1755-1766.

128. Lubos E, Loscalzo J, Handy DE. Glutathione peroxidase-1 in health and disease: from molecular mechanisms to therapeutic opportunities. Antioxid Redox Signal. 2011;15(7):1957-1997.

129. Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function. Physiol Rev. 2002;82(1):47-95.

130. Holmgren A. Thioredoxin and glutaredoxin systems. J Biol Chem. 1989;264(24):13963-13966.

131. Arner ES, Holmgren A. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biochem. 2000;267(20):6102-6109.

132. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, Chen S, Corpe C, Dutta A, Dutta SK, Levine M. Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention. J Am Coll Nutr. 2003;22(1):18-35.

133. Herrera E, Barbas C. Vitamin E: action, metabolism and perspectives. J Physiol Biochem. 2001;57(2):43-56.

134. Zhou H, Beevers CS, Huang S. The targets of curcumin. Curr Drug Targets. 2011;12(3):332-347.

135. Kalantari H, Das DK. Physiological effects of resveratrol. Biofactors. 2010;36(5):401-406.

136. Malinauskas RA. Plasma hemoglobin measurement techniques for the in vitro evaluation of blood damage caused by medical devices. Artif Organs. 1997;21(12):1255-1267.

137. Kahn SE, Watkins BF, Bermes EW, Jr. An evaluation of a spectrophotometric scanning technique for measurement of plasma hemoglobin. Ann Clin Lab Sci. 1981;11(2):126-131.

138. Cripps CM. Rapid method for the estimation of plasma haemoglobin levels. J Clin Pathol. 1968;21(1):110-112.

139. Lawrence A. Kaplan AJP. Clinical Chemistry. 5th ed2009. 1200 p.

140. Harboe M. A method for determination of hemoglobin in plasma by near-ultraviolet spectrophotometry. Scand J Clin Lab Invest. 1959;11:66-70.

141. Moore GL, Ledford ME, Merydith A. A micromodification of the Drabkin hemoglobin assay for measuring plasma hemoglobin in the range of 5 to 2000 mg/dl. Biochem Med. 1981;26(2):167-173.

142. Standefer JC, Vanderjagt D. Use of tetramethylbenzidine in plasma hemoglobin assay. Clin Chem. 1977;23(4):749-751.

143. Maddison L, Karjagin J, Tenhunen J, Kirsimagi U, Starkopf J. Moderate intra-abdominal hypertension leads to anaerobic metabolism in the rectus abdominis muscle tissue of critically ill patients: a prospective observational study. Biomed Res Int. 2014;2014:857492.

144. F. G. Biyokimya. 2 ed: Nobel Tıp Kitapevleri; 2013.

145. Leverve XM. From tissue perfusion to metabolic marker: assessing organ competition and co-operation in critically ill patients? Intensive Care Med. 1999;25(9):890-892.

146. RK. M. Harper's Biochemistry. 29th ed: The McGraw-Hill Companies; 2012. 928 p.

147. Brooks GA. Lactate shuttles in nature. Biochem Soc Trans. 2002;30(2):258-264.

148. Leverve XM. Energy metabolism in critically ill patients: lactate is a major oxidizable substrate. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1999;2(2):165-169.

149. Lonergan JT, Behling C, Pfander H, Hassanein TI, Mathews WC. Hyperlactatemia and hepatic abnormalities in 10 human immunodeficiency virus-infected patients receiving nucleoside analogue combination regimens. Clin Infect Dis. 2000;31(1):162-166.

150. Mustafa I, Roth H, Hanafiah A, Hakim T, Anwar M, Siregar E, Leverve XM. Effect of cardiopulmonary bypass on lactate metabolism. Intensive Care Med. 2003;29(8):1279-1285.

151. Vary TC. Sepsis-induced alterations in pyruvate dehydrogenase complex activity in rat skeletal muscle: effects on plasma lactate. Shock. 1996;6(2):89-94.

152. Handy J. The origin and interpretation of hyperlactataemia during low oxygen delivery states. Crit Care. 2007;11(1):104.

153. Stewart PA. Modern quantitative acid-base chemistry. Can J Physiol Pharmacol. 1983;61(12):1444-1461.

154. Ronco JJ, Fenwick JC, Tweeddale MG, Wiggs BR, Phang PT, Cooper DJ, Cunningham KF, Russell JA, Walley KR. Identification of the critical oxygen

delivery for anaerobic metabolism in critically ill septic and nonseptic humans. JAMA. 1993;270(14):1724-1730.

155. Zhang H, Vincent JL. Oxygen extraction is altered by endotoxin during tamponade-induced stagnant hypoxia in the dog. Circ Shock. 1993;40(3):168-176.

156. Levato F, Martinello R, Campobasso C, Porto S. LDH and LDH isoenzymes in ovarian dysgerminoma. Eur J Gynaecol Oncol. 1995;16(3):212-215.

157. Fiume L, Manerba M, Vettraino M, Di Stefano G. Inhibition of lactate dehydrogenase activity as an approach to cancer therapy. Future Med Chem. 2014;6(4):429-445.

158. Kushner I. The phenomenon of the acute phase response. Ann N Y Acad Sci. 1982;389:39-48.

159. Valkanova V, Ebmeier KP, Allan CL. CRP, IL-6 and depression: a systematic review and meta-analysis of longitudinal studies. J Affect Disord. 2013;150(3):736-744.

160. Maekawa Y, Nagai T, Anzai A. Pentraxins: CRP and PTX3 and cardiovascular disease. Inflamm Allergy Drug Targets. 2011;10(4):229-235.

161. Baumann H, Gauldie J. Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation. Mol Biol Med. 1990;7(2):147-159.

162. Baumann H, Gauldie J. The acute phase response. Immunol Today. 1994;15(2):74-80.

163. Ridker PM, Glynn RJ, Hennekens CH. C-reactive protein adds to the predictive value of total and HDL cholesterol in determining risk of first myocardial infarction. Circulation. 1998;97(20):2007-2011.

164. Ridker PM, Cushman M, Stampfer MJ, Tracy RP, Hennekens CH. Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease in apparently healthy men. N Engl J Med. 1997;336(14):973-979.

165. Fairbanks VF, Ziesmer SC, O'Brien PC. Methods for measuring plasma hemoglobin in micromolar concentration compared. Clin Chem. 1992;38(1):132-140.

166. Doumas BT, Kwok-Cheung PP, Perry BW, Jendrzejczak B, McComb RB, Schaffer R, Hause LL. Candidate reference method for determination of total bilirubin in serum: development and validation. Clin Chem. 1985;31(11):1779-1789.

167. Durak I, Kavutcu M, Kacmaz M, Avci A, Horasanli E, Dikmen B, Cimen MY, Ozturk HS. Effects of isoflurane on nitric oxide metabolism and oxidant status of guinea pig myocardium. Acta Anaesthesiol Scand. 2001;45(1):119-122.

168. Ghasemi A, Zahediasl S, Azizi F. Reference values for serum nitric oxide metabolites in an adult population. Clin Biochem. 2010;43(1-2):89-94.

169. Zager RA, Gamelin LM. Pathogenetic mechanisms in experimental hemoglobinuric acute renal failure. Am J Physiol. 1989;256(3 Pt 2):F446-455.

170. Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M, Conklin JL. The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. Gastroenterology. 1995;109(4):1241-1248.

171. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. Lancet. 1987;2(8567):1057-1058.

172. Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. Br J Haematol. 2004;126(1):133-138.

173. Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. J Appl Physiol (1985). 1993;74(4):1769-1778.

174. de Figueiredo LF, Mathru M, Solanki D, Macdonald VW, Hess J, Kramer GC. Pulmonary hypertension and systemic vasoconstriction may offset the benefits of acellular hemoglobin blood substitutes. J Trauma. 1997;42(5):847-854; discussion 854-846.

175. Wagener FA, Eggert A, Boerman OC, Oyen WJ, Verhofstad A, Abraham NG, Adema G, van Kooyk Y, de Witte T, Figdor CG. Heme is a potent inducer of inflammation in mice and is counteracted by heme oxygenase. Blood. 2001;98(6):1802-1811.

176. Porter GA. Spectrophotometric method for quantitative plasma hemoglobin resulting from acute hemolysis. J Lab Clin Med. 1962;60:339-348.

177. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. Biochem Med (Zagreb). 2014;24(1):57-67.

178. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP7-A2 [ISBN 1-56238-584-4]. Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

179. Gray BW, Haft JW, Hirsch JC, Annich GM, Hirschl RB, Bartlett RH. Extracorporeal life support: experience with 2,000 patients. ASAIO J. 2015;61(1):2-7.

180. Kupesiz A, Celmeli G, Dogan S, Antmen B, Aslan M. The effect of hemolysis on plasma oxidation and nitration in patients with sickle cell disease. Free Radic Res. 2012;46(7):883-890.

181. Ricci Z, Pezzella C, Romagnoli S, Iodice F, Haiberger R, Carotti A, Cogo P. High levels of free haemoglobin in neonates and infants undergoing surgery on cardiopulmonary bypass. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2014;19(2):183-187.

182. Vermeulen Windsant IC, de Wit NC, Sertorio JT, Beckers EA, Tanus-Santos JE, Jacobs MJ, Buurman WA. Blood transfusions increase circulating plasma free hemoglobin levels and plasma nitric oxide consumption: a prospective observational pilot study. Crit Care. 2012;16(3):R95.

183. Schnog JJ, Jager EH, van der Dijs FP, Duits AJ, Moshage H, Muskiet FD, Muskiet FA. Evidence for a metabolic shift of arginine metabolism in sickle cell disease. Ann Hematol. 2004;83(6):371-375.

184. Gladwin MT, Sachdev V, Jison ML, Shizukuda Y, Plehn JF, Minter K, Brown B, Coles WA, Nichols JS, Ernst I, Hunter LA, Blackwelder WC, Schechter

AN, Rodgers GP, Castro O, Ognibene FP. Pulmonary hypertension as a risk factor for death in patients with sickle cell disease. N Engl J Med. 2004;350(9):886-895.

185. Rusak T, Misztal T, Piszcz J, Tomasiak M. Nitric oxide scavenging by cell-free hemoglobin may be a primary factor determining hypertension in polycythemic patients. Free Radic Res. 2014;48(2):230-238.

186. Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA, Lancaster JR, Jr. Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. J Biol Chem. 1998;273(30):18709-18713.

187. Lin CY, Chen YC, Tsai FC, Tian YC, Jenq CC, Fang JT, Yang CW. RIFLE classification is predictive of short-term prognosis in critically ill patients with acute renal failure supported by extracorporeal membrane oxygenation. Nephrol Dial Transplant. 2006;21(10):2867-2873.

188. Li C-L, Wang H, Jia M, Ma N, Meng X, Hou X-T. The early dynamic behavior of lactate is linked to mortality in postcardiotomy patients with extracorporeal membrane oxygenation support: A retrospective observational study. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery. 2015;149(5):1445-1450.

189. Luo XJ, Wang W, Hu SS, Sun HS, Gao HW, Long C, Song YH, Xu JP. Extracorporeal membrane oxygenation for treatment of cardiac failure in adult patients. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2009;9(2):296-300.

190. Burda G, Trittenwein H, Carole H, Trittenwein G. Testing of extracorporeal membrane oxygenation circuit related hemolysis using long-term stored packed red cells and fresh frozen plasma. Artif Organs. 2004;28(5):496-499.

191. Rungatscher A, Merlini A, De Rita F, Lucchese G, Barozzi L, Faggian G, Mazzucco A, Luciani GB. Diagnosis of infection in paediatric veno-arterial cardiac extracorporeal membrane oxygenation: role of procalcitonin and C-reactive protein. Eur J Cardiothorac Surg. 2013;43(5):1043-1049.

192. Enger T, Philipp A, Videm V, Lubnow M, Wahba A, Fischer M, Schmid C, Bein T, Muller T. Prediction of mortality in adult patients with severe acute lung failure receiving veno-venous extracorporeal membrane oxygenation: a prospective observational study. Crit Care. 2014;18(2):R67.

193. Graca-Souza AV, Arruda MA, de Freitas MS, Barja-Fidalgo C, Oliveira PL. Neutrophil activation by heme: implications for inflammatory processes. Blood. 2002;99(11):4160-4165.

EKLER

EK 1: Etik Kurul Kararı

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ekstrakorporeal yaşam desteğindeki hastalarda optimum biyokimyasal takip: Hemoliz kriterlri ve anaerobik metabolizma
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Morfoloji Binası 06100 Sıhhıye/ANKARA
	TELEFON	0312 595 82 27
	FAKS	0312 310 63 70
	E-POSTA	etik@medicine.ankara.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof.Dr.Aslıhan AVCI			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI				
	DESTEKLEYİCİ				
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZI VE TÜRÜ	FAZ 1	☐		
		FAZ 2	☐		
		FAZ 3	☐		
		FAZ 4	☐		
		Gözlemsel ilaç çalışması	☐		
		Tıbbi cihaz klinik araştırması	☐		
		İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları	☐		
		İlaç dışı klinik araştırma	☐		
		Diğer ise belirtiniz: Laboratuvar çalışması			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒	ÇOK MERKEZLİ ☐	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

ASLI GİBİDİR

17 Ekim 2014

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul baskanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ekstrakorporeal yaşam desteğindeki hastalarda optimum biyokimyasal takip: Hemoliz kriterlri ve anaerobik metabolizma
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	30.09.2014	3	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	☐	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	☐	
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	☐	
	İLAN	☐	
	YILLIK BİLDİRİM	☐	
	SONUÇ RAPORU	☐	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	☐	
	DİĞER:	☐	

KARAR BİLGİLERİ	**Karar No:16-697-14**	**Tarih: 13 Ekim 2014**
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyasına ait: İlk başvuru dosyasında belirtilen laktatdehidrojenaz (LDH), laktat, haptoglobulin, hemoglobin, hematokrit, CRP, lipid ve bilirubin panel tetlerinin sehven "rutin" olarak yazıldığı; LDH, laktat, haptoglobulin, CRP, lipid ve bilirubin panel testlerinin BAP desteğiyle günlük olarak yapılması isteği ve NO ölçümünün çalışmaya eklendiği, ilgili tetkikler hakkında çalışmanın giriş bölümündeki ifadelerin düzenlenmesi; laktat dehidrojenaz, laktat, haptoplobulin, CRP, lipid ve biliburin panel testlerinin Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbni Sina Hastanesi Merkez Laboratuarında çalışılacağı; serbest plazma hemoglobin ölçümü ile ilgili Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Prof.Dr.Zuhal Yurtaslan Araştırma Laboratuarında ön çalışma yapıldığı, destekleyici kuruluş olarak Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine destek başvurusunda bulunulacağı hakkında alınan protokol değişikliği (30.09.2014, versiyon 3) incelenerek uygun bulundu.

ASLI GİBİDİR

17 Ekim 2014

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Ekstrakorporeal yaşam desteğindeki hastalarda optimum biyokimyasal takip: Hemoliz kriterlri ve anaerobik metabolizma
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof.Dr.Mehmet MELLİ

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof.Dr.Mehmet MELLİ	Farmakoloji	A.Ü.Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Cihan YURDAYDIN	Gastroenteroloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Mehmet GÜREL	Genel Cerrahi	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	izinde
Prof.Dr.Tanju ÖZÇELİKAY	Farmakoloji	A.Ü.Eczacılık Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Cem ATBAŞOĞLU	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Serdar ÖZTÜRK	Tıbbi Biyokimya	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Serap SİVRİ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Zarife ŞENOCAK	Hukuk	A.Ü.Hukuk Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Prof.Dr.Banu ÇAKIR	Halk Sağlığı	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☒	izinde
Prof.Dr.Güngör UTKAN	Tıbbi Onkoloji	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☐	H☒	izinde
Doç.Dr.A. Ruhi SOYLU	Biyofizik	H.Ü. Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Doç.Dr.Derya ÖZTUNA	Biyoistatistik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Yrd.Doç.Dr.Nüket KUTLAY	Tıbbi Genetik	A.Ü. Tıp Fakültesi	E☐	K☒	E☐	H☒	E☒	H☐	
Uz.Dr.Önder İLGİLİ	Tıp Tarihi ve Etik	A.Ü.Tıp Fakültesi	E☒	K☐	E☐	H☒	E☒	H☐	
Mühübe SUTAY	İşletme	-	E☐	K☒	E☐	H☒	E☐	H☒	Şehir dışında

*:Toplantıda Bulunma

ASLI GİBİDİR

17 Ekim 2014

Etik Kurul Başkanının
Unvanı/Adı/Soyadı:Prof.Dr.Mehmet MELLİ
İmza:

Not: Etik kurul başkanının her sayfada imzasının olması gerekmektedir.

EK 2: Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın .....

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda "**Ekstrakorporeal Yaşam Desteğindeki Hastalarda Optimum Biyokimyasal Takip: Hemoliz Kriterleri ve Anaerobik Metabolizma**" adında bir çalışma yapılmaktadır. Bu araştırma amaçlı bir çalışmadır.

Kalp-akciğer cihazı (ekstrakorporeal yaşam destek cihazı) gibi tıbbi cihazların kullanımına bağlı belirli oranlarda alyuvar (eritrosit) harabiyeti (hemoliz) olabilmektedir. Hastaların, yüksek miktarda hemolize maruz kalmaları, başta böbrek işlev bozukluğu hatta böbrek yetmezliği üzere, tansiyon yüksekliği, kan pıhtılaşmasında bozulma gibi birçok hastalığa, hatta ciddi boyutlarda olursa ölüme sebep olabilir. Bu yüzden, bu hastalarda hemolizin hassas şekilde takip edilmesi gerekmektedir. Rutin hemoliz takibinde kullanılan laktat dehidrojenaz ve haptoglobulin gibi belirteçlerin çeşitli kısıtlılıkları vardır. Çeşitli sebeplerle hasarlanan eritrositlerden açığa çıkan, hemoglobin (kanda oksijen taşınmasından sorumlu protein) ölçümü (fHb) ekstrakorporeal yaşam desteğindeki hastaların takibinde sıklıkla kullanılan bir belirteçtir. Bu çalışmanın amacı, hastaların rutin takiplerinde kullanılan verileri kullanarak muhtemel hemoliz sebeplerinin aydınlatılmasını sağlamak ayrıca daha da önemlisi fHb ölçümü ve hemoliz yüzdesi (kan sonuçlarının ve fHb sonucuyla hesaplanacaktır) gibi değerli belirteçlerin bu hastaların rutin takibinde kullanılmasını sağlamaktır.

Bu araştırmada, sizin günlük rutin takipte kullanılan laktat dehidrojenaz (LDH), laktat, haptoglobulin, hemoglobin, hematokrit, C-Reaktif Protein (CRP), lipit paneli ve bilirubin paneli gibi testleriniz Ankara Üniversitesi, Cebeci Hastanesi Merkez Laboratuvarında normal şekilde çalışılacaktır. **Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde sizden günlük takipler sırasında fazladan 1 tüp kan alınarak Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında yukarıda bahsedildiği gibi hemoliz takibinde kullanılan fHb miktarı ölçülecek ve hemoliz yüzdesi hesaplanacaktır.** Bu kan örnekleri, siz ekstrakorporeal yaşam desteğine bağlı olduğunuz süre boyunca günlük kan alımları sırasında birer defa alınacaktır. Adı geçen testler araştırma amaçlı testlerdir. Bu araştırmada sizin vücudunuza zarar verecek herhangi bir ek girişimsel işlem yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmanız zorunlu değildir, tamamen sizin isteğinize bağlıdır. İstediğiniz zaman, herhangi bir cezaya veya yaptırıma maruz kalmaksızın, hiçbir hakkınızı kaybetmeksizin araştırmaya katılmayı reddedebilirsiniz veya araştırmadan çekilebilirsiniz. Araştırmaya dahil olma şartları;

- 18 yaş üstünde olma
- 65 yaş altında olma
- Gönüllü olarak aydınlatılmış onam formunu imzalamış olma
- ECMO uygulanabilme kriterlerini karşılama

Bu şartları yerine getiremeyen, araştırmaya katılmak istemeyen ya da araştırmaya katılmış olup daha sonra çekilmek isteyen gönüllüler araştırma kapsamına alınmayacaktır.

Bu araştırmaya katılıp katılmamanız rutin takip veya tedavi sonucunuzu etkilemeyecektir. Herhangi bir rahatsızlık oluşturacak işleme tabi tutulmayacaksınız. Bu araştırma nedeniyle hiçbir risk ya da rahatsızlığa maruz bırakılmayacaksınız. Bu araştırma sizin için hiçbir ek risk taşımamaktadır.

Sizden alınmış olan kanlarda, yukarıda adı geçen araştırma amaçlı testler haricinde hiçbir ek çalışma yapılmayacaktır, genetik analiz vb. değerlendirmelere tabi tutulmayacaktır. Kanlarınız Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı haricinde hiçbir yere götürülmeyecektir, ülke dışına gönderilmeyecektir.

Araştırmaya katılmaya karar vermeniz halinde size veya sosyal güvenlik kurumunuza (Emekli Sandığı, SGK, Yeşil Kart, özel sigorta vb.) herhangi bir ek mali yük getirilmeyecektir. Bunun yanında, araştırmaya katılmanız da size ek bir mali fayda sağlamayacaktır. **Ancak araştırmada yer almanız,**

yukarıda belirtildiği şekilde tıbbi yönden, hemoliz değerlendirmesi bakımından, daha güvenilir takip edilmenizi sağlayacaktır.

Araştırmacılar, Etik Kurul, Sağlık Bakanlığı ve diğer ilgili sağlık otoriteleri, araştırmaya katılmanız halinde orijinal tıbbi kayıtlarınıza erişebileceklerdir, ancak bu bilgileriniz kesinlikle gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla siz veya yasal temsilciniz söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız. İlgili mevzuat gereğince kimliğinizi ortaya çıkaracak bütün kayıtlar gizli tutulacaktır, kamuoyuna açıklanmayacaktır; araştırma sonuçlarımızın bilimsel ortamda yayımlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacaktır.

Bu araştırmaya ilk etapta 30 hastanın katılması öngörülmektedir.

Bu araştırmayla ilgili her türlü sorunuz ve sorununuzla ilgili Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı araştırma görevlilerinden **Dr. Metin GENÇ**'le 24 saat iletişime geçebilirsiniz. Kendisine ulaşabileceğiniz **telefon numarası 0537 586 2986**'dır. Elektronik ileti adresi **genc.metin@hotmail.com**'dur.

OLUR FORMU:

Ben .....

Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana, yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı. Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabileceğimi ve kendi isteğime bakılmaksızın araştırmacı tarafından araştırma dışı bırakılabileceğimi biliyorum.

Söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Hastanın Adı Soyadı:	**Tarih:** ... / ... / 2014	**İmza**
Adres:	**Telefon:** 0 .... 0	
Doktor Adı Soyadı: Araş. Gör. Dr. Metin GENÇ	**Tarih:** ... / ... / 2014	**İmza**
Adres: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Morfoloji Yerleşkesi Dekanlık Binası 1. Kat Sıhhiye/ANKARA	**Telefon:** 0 537 5862986 0 312 5958268	
(Varsa)Tanıklık Eden Adı Soyadı:	**Tarih:** ... / ... / 2014	**İmza**
Adres:	**Telefon:** 0 .... 0	