

T.C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SANTRİFÜGASYON, DONDURMA ÇÖZDÜRME ve TEKRAR SANTRİFÜGASYON İŞLEMLERİNİN ÖZELLİKLİ KOAGÜLASYON PARAMETRELERİNE ETKİSİ ve BU ETKİLERİN PROKOAGÜLAN FOSFOLİPİDLERLE İLİŞKİSİ

PINAR VATANSEVER

UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. GONCAGÜL HAKLAR

İSTANBUL 2017

TEŞEKKÜR

Tezimi tamamlama sürecimde bana yardımcı olan;

Nezaket ve güler yüzünü hiç esirgemeyen danışman hocam Prof. Dr. Goncagül Haklar başta olmak üzere, Prof. Dr. Önder Şirikçi, Uzm. Dr. Rana Turkal, Uzm. Dr. Tülay Çevlik, 5 seneyi paylaştığım arkadaşlarım Dr. Ali Yaman, Dr. Dilber Çoban Ramazan ve Dr. Erhan Üner'e, örnekleri toplama ve analiz etme sürecinde yardımlardan dolayı; Fatma Varol, Güner Ekşi ve Gurbet Senem'e, asistanlığım boyunca çalışmaktan memnuniyet duyduğum laboratuvarımızın tüm çalışanlarına,

Tez aşamasına gelme yolunda eğitimime katkılarından dolayı;

Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer, öğretim üyelerimiz Prof. Dr. Süha Yalçın, Prof. Dr. Goncagül Haklar, Prof. Dr. Önder Şirikçi, Doç. Dr. Betül Karademir ve Yrd. Doç. Dr. Saime Batırel'e

Hayatın anlamını öğrenmemi sağlayan biricik oğluma ve sevgili eşime,

Tüm hayatım boyunca destekleriyle her zaman yanımda olan, bulunduğum yere gelmemi sağlayan canım anneme, babama ve bilime adım atmamda bana örnek olan ablama,

Sonsuz teşekkürler…

ÖZET

Özellikli koagülasyon testleri maliyetleri yüksek olduğundan rutin olarak çalışılmamakta, yeterli örnek sayısına ulaşılana kadar plazmaları ayrılıp dondurularak saklanmaktadır. Bu örnekler için preanalitik faktörler göz önünde bulundurulmalıdır. Dolaşımdaki hücrelerden (trombosit, eritrosit, lökosit) ve damar endotelinden kaynaklanan prokoagülan fosfolipitler ise koagülasyon testlerinin sonuçlarını etkilemektedir. Çalışmamızda örnek hazırlama sırasındaki santrifügasyon ile dondurma sonrası çözdürme işlemlerinin ve prokoagülan fosfolipitlerin özellikli koagülasyon testlerine etkisini incelenmeyi amaçladık.

Çalışmamıza yaş aralığı 25-35 olan, sigara ve koagülasyon parametrelerini etkileyecek ilaç kullanımı olmayan 30 sağlıklı gönüllü alındı. Sitratlı tüpe alınan örneklerden tek santrifüj grubu için 1500xg'de 15 dakika, çift santrifüj grubu 30 dakika santrifüj edilerek elde edilen plazma örnekleri porsiyonlandı. Örneklerin bir kısmı taze çalışıldı, -20 ºC'de 24 saat dondurulan diğer örnekler ise 37ºC su banyosunda 5 veya 15 dakikada çözdürüldü. Üçüncü alt gruba ise 5 dakikalık çözdürme işlemi sonrasında resantrifüj işlemi uygulanarak çalışıldı.

Çalışmamızda belirlediğimiz faktör testlerinin (V, VIII, IX, X) prokoagülan fosfolipitlerden etkilenmediği görüldü. Labil olan faktör V ve faktör VIII'in santrifügasyon, dondurma ve çözdürme işlemlerinden etkilendiği, faktör IX, X, protein C, protein S ve trombin jenerasyon testlerinin değişken koşullarda stabil olduğu gözlemlendi. Faktör II testinde önerilen tek santrifüje göre çift santrifüjün daha uygun olduğu saptandı. APCR testi için çift santrifüj işlemi uygunken, lupus antikoagülan testinde özellikle önerilen çift santrifüj işleminin tek sanrifüj işlemine göre test sonuçlarında anlamlı fark yaratmadığı saptandı.

Anahtar kelimeler: Özellikli koagülasyon, prokoagülan fosfolipitler, preanalitik faktörler.

SUMMARY

Specific coagulation markers are generally aliquoted, stored and batch analyzed for economic efficiency. Preanalytical factors should be carefully considered for these samples. The presence of pro-coagulant phospholipids derived from circulating (platelets, white blood cells, red blood cells) and non-circulating (endothelial) cells within the vasculature may affect the results. In our study, we aimed to look for the effect of centrifugation, freezing, thawing conditions and procoagulant phospholipid concentrations on specific coagulation markers.

Blood samples were drawn from 30 non-smoking healthy donors into citrated tubes. None of the donors had a known coagulation defect or were treated with drugs that might affect coagulation function. Samples were centrifuged at 1500xg for 15 minutes, once or twice and aliquoted. Some of the plasma samples were analyzed fresh or frozen at -20°C for 24 h. For observing the effects of thawing and re-centrifugation, frozen samples were thawed in a 37°C thermostat controlled water bath in a duration of 5 and 15 minutes and analyzed, whereas some were re-centrifuged before analysis.

We observed that spesific coagulation test results (FV, FVIII, FIX and FX) were not affected from the procoagulant phospholipid concentrations. Centrifugation, freezing and thawing significantly affect FV and FVIII measurements, whereas factor IX, X, protein C, protein S and thrombin generation tests were stable. Double centrifugation seemed appropriate for factor II assay although single cenrifugation was suggested by manufacturer. Also for APCR, double centrifugation must be preffered. Finally, lupus anticoagulant test were found stable for each condition.

Key words: Spesific coagulation tests, procoagulant phospholipids, preanalytical factors

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR……i

ÖZET……..ii

SUMMARY……..…iii

İÇİNDEKİLER…….……iv

TABLO DİZİNİ…….……v

ŞEKİL DİZİNİ……..vi

SEMBOL VE KISALTMALAR……..vii

1. GİRİŞ VE AMAÇ……1
2. GENEL BİLGİLER……..3
   - 2.1. LABORATUVAR SÜREÇLERI VE PREANALITIK EVRE……3
   - 2.2. HEMOSTAZ……6
     - 2.2.1. Primer Hemostaz……..6
     - 2.2.2. Sekonder Hemostaz……..8
       - 2.2.2.1. Ekstrinsik Yolak……9
       - 2.2.2.2. İntrinsik Yolak……....10
       - 2.2.2.3. Ortak Yolak……..10
     - 2.2.3. Antikoagülasyon Sistemi……..…12
       - 2.2.3.1. Trombin oluşumundan önce antikoagülasyon…….……12
       - 2.2.3.2. Trombin oluşumu sonrası antikoagülasyon……..…12
       - 2.2.3.3. Fibrinoliz……..12
   - 2.3. TANIDA KULLANILAN ÖZELLİKLİ KOAGÜLASYON TESTLERİ…….14
     - 2.3.1. Koagülasyonu Değerlendiren Testler……14
     - 2.3.2. Trombofili Testleri……15
     - 2.3.3. Trombin Jenerasyon Testi……..……15
     - 2.3.4. Prokoagülan Fosfolipid Testi…….……..15
   - 2.4. KOAGÜLASYON TESTLERİ ve PREANALİTİK FAKTÖRLER……16
     - 2.4.1. Örnek alımı……..…..16
     - 2.4.2. Örnek Taşınması……18
     - 2.4.3. Örnek Ayrılması ve Saklanması……18
3. GEREÇ ve YÖNTEM…….……21
   - 3.1. ÖZELLİKLİ KOAGÜLASYON TESTLERİ…….…..……23
     - 3.1.1. Faktör Testleri……..……23
     - 3.1.2. Protein C Testi……..24

3.1.3. Protein S Testi……25
3.1.4. Aktive Protein C Rezistansı……25
3.1.5. Lupus Antikoagülan Testi……25
3.1.6. Mikropartikül Analizi……26
3.1.7. Trombin Jenerasyon Testi……26
3.2. PT ve aPTT……27
3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM……28
4. BULGULAR……30
5. TARTIŞMA……42
KAYNAKLAR……48

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Koagülasyon kaskadında görevli proteinler……9

Tablo 2. Sık çalışılan sekonder hemostaz testleri ve önerilen laboratuvar işlemleri…...19

Tablo 3. Santrifüj, dondurma ve çözdürme koşullarına göre çalışılacak örneklerin gruplandırması…….….22

Tablo 4. Faktör testlerinin ölçüm yöntemleri……..24

Tablo 5. Faktör II testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……...30

Tablo 6. Faktör V testinde testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*)ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……...…31

Tablo 7. Faktör VIII testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*)ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri…….……...……31

Tablo 8. Faktör IX testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*)ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……...……32

Tablo 9. Faktör X testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*)ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……...……32

Tablo 10. Lupus antikoagülan testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (**) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……...…..33

Tablo 11. Aktive protein C rezistansı testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (**) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……..33

Tablo 12. Protein C testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*)ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……34

Tablo 13. Protein S testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri……34

Tablo 14. Kişisel biyolojik varyasyon ve analitik varyasyon değerleri……...……35

Tablo 15. Özellikli koagülasyon testleri için hesaplanan total değişim limiti (TCL) ve referans değişim değerleri (RCV) ile bağıl hata yüzdesinin (RBP) karşılaştırılması…...37

Tablo 16. Prokoagülan fosfolipit (PFL) testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşula göre hesaplanan P değerleri…….38

Tablo 17. Fosfolipit partikül konsantrasyonu ile faktör testlerinin ilişkisi için hesaplanan regresyon katsayısı ve P değerleri……...….38

Tablo18. Trombin Jenerasyon Testinde grupların kendi içinde bazal örneklere göre karşılaştırması……...……40

Tablo 19. Faktör VIII'in hafif eksikliği için hesaplanan bağıl hata yüzdesi (RBP) değeri ile total değişim limiti (TCL) ve referans değişim değerinin (RCV) karşılaştırılması….41

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Toplam test süreçlerinde preanalitik, analitik ve postanalitik evre……4

Şekil 2. Primer Hemostaz……...…7

Şekil 3. Koagülasyon kaskadı……..11

Şekil 4. Fibrinoliz (t-PA: doku plazminojen aktivatörü)……..…13

SEMBOL ve KISALTMALAR

PT : Pıhtılaşma zamanı (prothrombin time, PT)

aPTT : Aktive parsiyel tromboplastin zamanı (activated partial thromboplastine time)

INR : International normalized ratio

TT : Trombin zamanı (thrombin time)

APC-R : Aktive protein C rezistansı

ATIII : Antitrombin III

LA : Lupus antikoagülan,

vWF : von Willebrand faktör

IQC : İç kalite kontrol (internal quality control)

EQA : Dış kalite kontrol (external quality assurance)

ADP : Adenozin difosfat

PFA : Platelet fonksiyon analizörü

Gla : Gama karboksiglutamil

HMWK : Yüksek molekül ağırlıklı kininojen (high molecular weight kininogen)

TFPI : Doku faktörü yolağı inhibitörü (tissue factor pathway inhibitor)

t-PA : Doku plazminojen aktivatörü (tissue plasminogen activator)

RBP : Bağıl hata yüzdesi (relative bias percentage)

TCL : Total değişim sınırı (total change limit)

RCV : Referans değişim değeri (reference change value)

CVi : Biyolojik varyasyon

CVa : Analitik varyasyon

ETP : Endojen trombin potansiyeli

VI : Hız indeksi (velocity index)

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde kullanılan modern laboratuvar teknikleri ve otomatize cihazlar sayesinde biyokimya testleri oldukça hızlı şekilde çalışılmakta ve sonuçlandırılmaktadır. Hastaların etkin tedavi alabilmeleri açısından, üretilen sonuçların doğruluğu tıbbi laboratuvarlarda total kalite yönetimiyle garanti edilmektedir. Total kalite yönetimi, testin istendiği andan, hasta sonucunun yorumlandığı ana kadar tüm laboratuvar test süreçlerinin kontrolünü sağlar. Son yıllarda gelişen analitik teknikler ve ölçüm yöntemleri ile kimyasalların standardizasyonu analiz sürecindeki hataların azalmasında büyük rol oynamıştır. Ayrıca, kalite kontrol programları analitik hataların belirlenmesi ve düzeltilmesinde etkili olmuştur. Total kalite daha çok analitik evre odaklı olsa da, son yıllarda yapılan çalışmalar hataların çoğu zaman bu süreç dışındaki etkenlerden kaynaklandığını göstermiştir.

Laboratuvar test süreçleri preanalitik, analitik ve postanalitik olmak üzere üç aşamada incelenmektedir. Preanalitik evre, testin klinisyen tarafından istenmesiyle başlar; hastanın hazırlanması, örneğin alınması, taşınması, işlenmesi ve cihazda analiz edilmesine kadar geçen tüm aşamaları kapsar. Analitik evre örneğin analizörde çalışılması ve manuel olarak uygulanan prosedürleri (dilüsyon, ekstraksiyon vb.) içerir. Postanalitik evre ise sonuçların doğru olarak rapor edildiği ve yorumlandığı, panik değerlerin belirlenip bildirildiği, sonuçların kliniklere zamanında ulaşmasının sağlandığı süreçtir. Laboratuvar test süreçlerinde meydana gelen hataların yaklaşık %80'lik kısmı preanalitik evrede gerçekleşmektedir. Preanalitik değişkenler kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler olarak iki grupta incelenir. Hastadan örneğin alındığı bölge ve hastanın postürü, örnek alım şekli, kan alınan tüp ve kullanılan antikoagülan, örneğin alındığı zaman ve örneği etiketleme, gebelik durumu, egzersiz/diyet, sigara/alkol kullanımı, örneğin laboratuvara taşınma şekli ve laboratuvarda yapılan işlemler kontrol edilebilir değişkenlerdir. Yaş, cinsiyet ve ırk gibi biyolojik faktörler ise kontrol edilemeyen değişkenleri oluşturur.

Koagülasyon testleri antikoagülan kullanan hastaların tedavi takibinde, kanama bozukluğu düşünülen hastalarda tanıyı desteklemek amacıyla, cerrahi öncesi hastaların hemostatik durumunu değerlendirmede ve karaciğer yetmezliğinde sıkça istenmektedir. Ayrıca, tüketim koagülopatisi, pulmoner emboli, acil cerrahi müdahaleler ve doğum gibi durumlarda acil olarak istenen testler arasındadır. Rutin koagülasyon testleri pıhtılaşma zamanı (prothrombin time, PT), aktive parsiyel tromboplastin zamanı (activated partial thromboplastine time, aPTT), trombin zamanı (thrombin time, TT), fibrinojen ve D-dimer'i kapsar. Koagülasyon faktörleri, faktör inhibitörleri, protein-C, protein-S, aktive protein C rezistansı (APC-R) antitrombin III (ATIII), lupus antikoagülan, von Willebrand faktör (vWF) ve trombosit fonksiyon testleri ise özellikli koagülasyon testleridir. Rutin koagülasyon testleri pek çok laboratuvarda çalışılmaktadır. Özellikli koagülasyon testleri ise rutine göre daha az sayıda hastadan istenen ve kit maliyetleri yüksek olan testlerdir. Dolayısıyla bu testler kit içeriğini karşılayacak sayıya ulaşılana kadar saklanıp, büyük hastanelerin merkez laboratuvarlarında topluca çalışılmaktadır. Klinisyenin gerekli gördüğü durumlarda, küçük ölçekli merkezlerde takip edilen hastalardan alınan kan örnekleri merkez laboratuvarlara taşınmaktadır. Gerek aynı merkezde toplanıp çalışma anına kadar saklanması, gerekse küçük merkezlerden kan örneklerinin taşınması koagülasyon testlerinde preanalitik hataların sıkça görülmesine sebep olmaktadır. Özellikli koagülasyon testleri klinisyene tanıda çok önemli bilgiler verdiğinden bu faktörlerin analizini etkileyen herhangi bir hata hastanın tedavisini aksatabilmekte veya yanlış/gereksiz tedavi almasına sebep olabilmektedir.

Bu çalışmada amacımız özellikli koagülasyon testlerinin dondurma, çözdürme ve santrifügasyon işlemlerinden nasıl etkilendiğini araştırmak, pratikte bu testlerin uygun saklama ve çalışma koşullarını belirlemeye katkıda bulunmaktır.

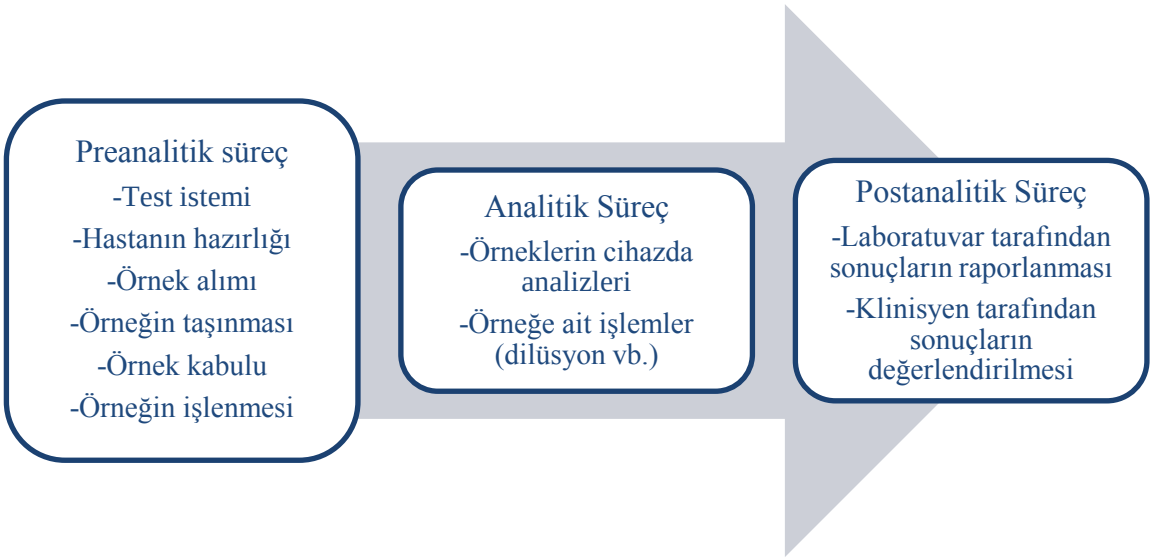
2. GENEL BİLGİLER

2.1. LABORATUVAR SÜREÇLERİ VE PREANALİTİK EVRE

Toplam test süreci klinisyen tarafından hastadan test istemiyle başlayarak, hastanın hazırlanması, örneğin alınması, ilgili laboratuvara taşınması, işlenmesi, analiz edilmesi ve sonuçların hasta yararına değerlendirilmesine kadar geçen tüm süreci kapsar. Laboratuvar hataları bu süreçteki çalışma düzenine ve evrelerinin yönetimine bağlıdır. Laboratuvar hatası, tamamlanması istenen planlı bir işin, toplam test sürecinin herhangi bir evresinde uğradığı aksaklık olarak tanımlanır (International Organization for Standardization, ISO/TS 22367). Klinik laboratuvarların tanıda karar verdirici görevi oldukça fazladır (100 olgunun yaklaşık 70'inde). Dolayısıyla bu alanda yapılan hatalar tanının gecikmesine, atlanmasına veya yanlış bir klinik değerlendirmeye sebep olabilmektedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde toplam tıbbi hataların yaklaşık %44 kadarının tanı birimleri (radyoloji ve klinik laboratuvar) kaynaklı olduğu gösterilmiştir ve bunlar önlenebilir hatalardır (1).

Analitik hatalar çalışılan yöntem, çalışan teknisyen ve cihaz gibi faktörlerden kaynaklanabileceğinden dolayı bu evre daha çok laboratuvarın kontrolündedir. Preanalitik ve postanalitik evrede klinisyen, örneği alan hemşire, hasta, örneğin taşınmasını sağlayan personel, hasta bilgilerini kaydeden personel gibi pek çok değişken devreye girdiğinden bu evredeki hatalar daha karmaşık olabilmektedir. 1947 yılında Belk ve Sunderman (2) tarafından yapılan yayınla başlayıp, 1990'lara kadar devam eden süreçte analitik hatalar üzerine yoğunlaşılmıştır (3). Çalışmaların başladığı ilk yıllarda analitik hatalar milyon test başına 167 binlerdeyken, 1997'de Witte ve arkadaşlarının (4) verilerine göre 447'ye kadar düşmüştür. Gelişen teknoloji, yöntem ve cihazların stadardizasyonu, kullanıcı eğitimleri gibi faktörler bu düşüşte oldukça etkilidir. Ayrıca analitik yöntemlerin doğruluğunu ve standardizasyonunu sağlamak için geliştirilen dış kalite (external quality assurance, EQA) ve iç kalite kontrol (internal quality control, IQC) programları, bu evredeki hataların belirlenip düzeltilmesi açısından faydalı olmuştur.

Analitik hatalardaki azalmaya rağmen test sonuçlarında görülen tutarsızlıklar, son yıllarda yapılan çalışmaları preanalitik ve postanalitik evreler üzerinde yoğunlaştırmıştır. Plebani ve Carraro 1997'de laboratuvar hataları hakkında kapsamlı bir çalışma sunmuşlardır. Bu çalışmada acil laboratuvara gelen 40.490 test isteği 3 ay süre ile izlenmiş preanalitik hata oranı % 68, analitik hata oranı %13 ve postanalitik hata oranı %18 olarak belirlenmiştir. Çalışma verilerine göre preanalitik hata açısından en sık sebebin örnek alım kaynaklı olduğu görülmüştür (%20) (5). Örnek alımında yapılan en sık hata ise infüzyon yolundan örnek alınması ve yanlış tüpe örnek alınması şeklindedir. Örnek üzerine yanlış kişiye ait barkodun yapıştırılması preanalitik hatalar içinde %2 oranında görülmüştür. Bu oran diğer hatalara göre daha düşük olsa da preanalitik hatalar içinde hasta açısından olumsuz sonuçlara sebebiyet verecek önemli bir hata kaynağıdır. Diğer hata kaynakları ise klinisyenin yanlış test isteği girmesi, alınan örneklerin uygun koşullarda taşınmaması olarak belirtilmiştir. Çalışmada, analitik evrede raporlanan hatalar en sık örnekte interferans, cihaz kaynaklı rastlantısal hata ve analitik metodun test için spesifik olmayışı şeklindedir. Postanalitik evrede hasta sonuçlarının yanlış girilmesi, klinisyen ve laboratuvarın iletişim problemleri, test sonucunun yanlış yorumlanması gibi hatalar kaydedilmiştir.



Şekil 1. Toplam test süreçlerinde preanalitik, analitik ve postanalitik evre.

Toplam test süreçlerinde görülen hataların sonuçları incelendiğinde, hasta tedavisi veya bakımında az sıklıkta olumsuz etki raporlanmıştır. Ross ve Boone'un 336 hasta ile yaptığı çalışmada, hastaların %70 kadarının tıbbi karar aşamasında hatadan hiç etkilenmediği görülmüştür. %23 kadar hastada ise örnek tekrarı gibi ekstra prosedürler eklenmiş olup tıbben hastaya olumsuz bir geri dönüşü olmamıştır. Ancak, örnek tekrarları hastane açısından ek maliyetlere sebep olmuştur. Hastaların %7'si ise uygun olmayan tıbbi bakıma maruz kalmışlardır (6).

Toplam test süreçlerinde, tıbbi hataların en aza indirilmesi ve hasta güvenliğinin sağlanması açısından, laboratuvarın kalite yönetiminde uyguladığı kriterler büyük önem taşımaktadır. Bu sürecin sadece laboratuvar değil, multidisipliner bir çalışma olarak ele alınması sürecin yönetimini kolaylaştırmaktadır. Sonuç olarak hataların azaltılması için pek çok çalışma verilerinden derlenerek yapılması gerekenler;

- Süreç analizinin yapılması ve hata cinsinin belirlenmesi
- Laboratuvar örnek kabul/red kriterlerinin belirlenmesi ve uygulanması
- Analitik süreçler için düzenli olarak kalite kontrol takibi yapılması
- İletişim kurulması ve geri bildirimlerin alınması
- Personelin sürekli ve güncel eğitimi

şeklinde önerilmektedir (7).

2.2. HEMOSTAZ

Hemostaz, kanın vasküler kompartmanda akışkanlığını sağlayan antitrombotik faktörlerle, hasarlanma durumunda pıhtıyı oluşturan protrombotik faktörlerin birbiriyle dengede bulunma durumudur. Primer hemostaz, sekonder hemostaz (koagülasyon sistemi) ve fibrinoliz olmak üzere birbiriyle yakından ilişkili üç aşamada incelenir. Hemostazın temel amacı endotel bütünlüğünü bozan vasküler hasarı onarmak, endotel yapısının yeniden iyileşmesine katkıda bulunmak, kan kaybını azaltmak ve vasküler devamlılığı sağlamaktır. Bu sistemin hipofonksiyonu kanama diyateziyle, hiperfonksiyonu ise intravasküler koagülasyon ve tromboza eğilimle sonuçlanmaktadır (8).

Hemostaz primer ve sekonder olarak iki başlık altında incelenir.

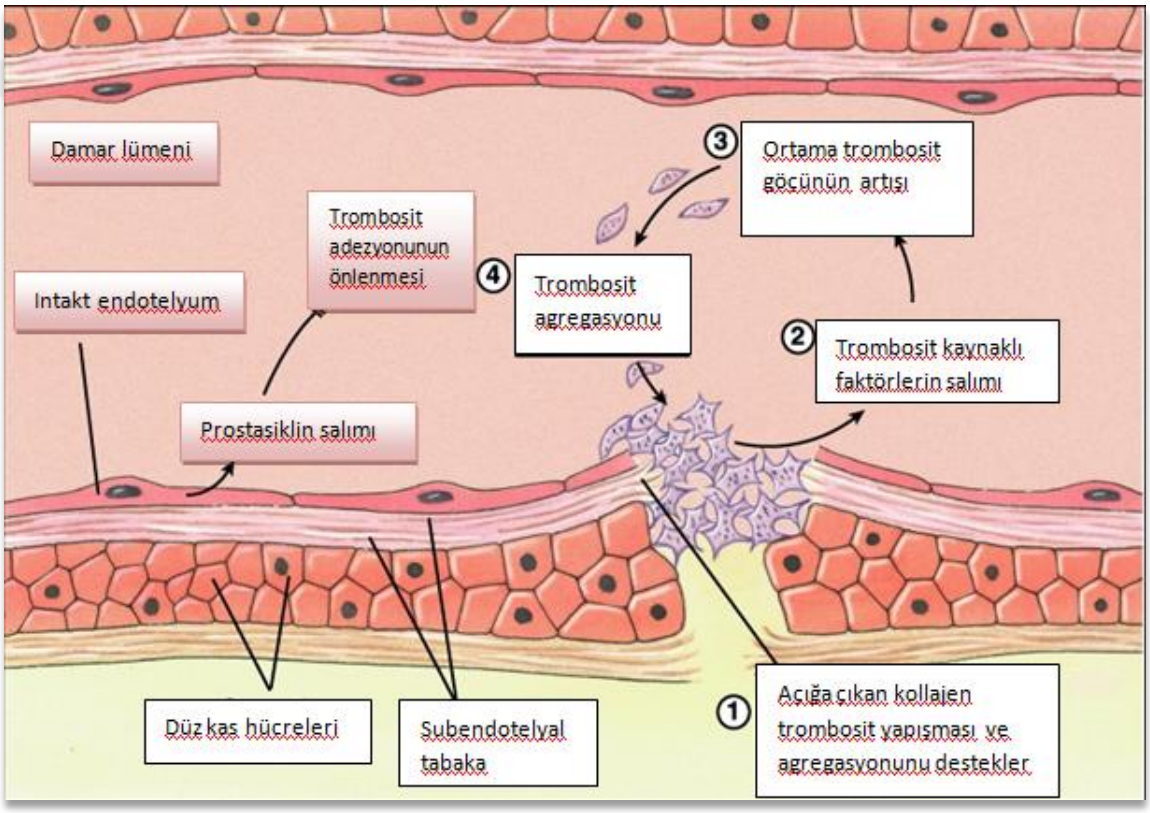
2.2.1. Primer Hemostaz

Primer hemostaz, vasküler travmaya cevaben endotel kaynaklı vazoaktif ajanların, trombositlerin ve von Willebrand faktörün (vWF) etkisiyle primer trombotik tıkacın oluşum sürecidir. Kapiller kan kaybını durdurmada esas önceliğe sahiptir. Travmaya ilk yanıt, küçük ve orta büyüklükteki damarların nöral, kimyasal ve mekanik olarak uyarılması sonucunda gerçekleşen vazokonstrüksiyondur. Bu süreçte damar endoteli prokoagülan ve antikoagülan ajanların sentezi, salınması, trombosit fonksiyonlarının düzenlenmesi ve koagülasyonun gerçekleşmesi açısından kilit roldedir (8).

Yaralanmayı takip eden ilk saniyelerde, endotel hücrelerden salınan vWF bölgeye trombosit göçünü sağlar. Travma sonucu ortaya çıkan subendotelyal kollajene yüzey reseptörleri (glikoprotein Ia/IIa ve Ib-IX) aracılığıyla trombosit adezyonu gerçekleşir. Aktive olan trombositlerin alfa granüllerinden salınan vWF bölgeye diğer trombositlerin yığılmasını yani agregasyonu sağlar. Delta granüllerden ise vazoaktif aminler (serotonin, epinefrin), adenin nükleotitleri (ADP) ve kalsiyum salınır. ADP, trombosit yüzeyindeki glikoprotein 2b/3a'yı aktifleştirerek agregasyonu kolaylaştırırken, vazoaktif ajanlar da vazokonstriksiyonu devam ettirirler. Dolaşımdaki fibrinojenin de yapıya katılmasıyla primer trombotik tıkaç oluşumu tamamlanır. Bu tıkaç zayıftır ve

stabilize edilmesi için yapısındaki fibrinojenin fibrine dönüşümü gereklidir. Fibrin oluşumu ise koagülasyon kaskadının devreye girdiği sekonder hemostaz ile sağlanır.

Primer hemostazın ana bileşenleri trombositler ve vasküler endotelyumdur (Şekil 2). Bu yoldaki patolojiler trombositlerin sayısına, fonksiyonlarına ve sekretuvar özelliklerine bağlıdır. Ayrıca damar endotelini tutan hastalıklar (ateroskleroz, vaskülitler vb.) da hemostatik dengeyi bozmaktadır.



Şekil 2. Primer Hemostaz

Primer hemostaz temel olarak trombositler tarafından modüle edildiğinden klinik değerlendirmede kullanılan testler trombositlerin sayı, fonksiyon ve aktivitesinin araştırılmasını kapsar. Trombositlerin sayısını belirlemede kan sayımı analizlerinden faydalanılır. Trombositlerde sekresyon bozukluklarından şüpheleniliyorsa alfa ve delta granülleri incelenir. Trombosit aktivitesi ise adezyon ve aggregasyon testleri yapılarak değerlendirilir.

- Vasküler fonksiyon testleri: Kanama zamanı, platelet fonksiyon analizörü (PFA) testleri.
- Adezyon ve agregasyonu değerlendiren testler: Von Willebrand faktör antijen testi, ristosetin indüksiyon testleri.

2.2.2. Sekonder Hemostaz (Koagülasyon)

Sekonder hemostaz, koagülasyon sistemi aracılığıyla fibrin oluşumu olarak tanımlanır. Bu sistemin aktive olmasındaki temel amaç sulu ortamda çözünebilir fibrinojeni, çözünürlüğü daha düşük olan fibrin polimerlerine dönüştürerek stabil bir fibrin ağı oluşturmaktır. Böylece primer hemostazda oluşan zayıf trombotik tıkaç bu evrede sağlamlaştırılmaktadır. Dolayısıyla sekonder hemostaz, primer hemostazın durdurmakta yetersiz kaldığı daha büyük yaralanmalarda önemli rol oynar. Sekonder hemostaz ekstrinsik, intrinsik ve ortak yolak olarak birbirine bağlı üç aşamadan meydana gelir. Ekstrinsik yolak hızlı devreye giren yoldur ve sekonder hemostazın başlatıcısı rolündedir. İntrinsik yolak ise daha yavaş devreye giren, koagülasyon reaksiyonlarının yayıldığı evredir. Ekstrinsik ve intriksik yolaklarda görevli proteinler ve aktivatörleri farklıdır, ancak her iki yol trombinin oluştuğu (fibrin sentezine gidecek son basamak) ortak yolakta birleşmektedir (9).

Tablo 1. Koagülasyon kaskadında görevli proteinler

Faktör	İsim	Özellikleri
Faktör I	Fibrinojen	
Faktör II	Protrombin	Gla* içeren protein
Faktör III	Doku Faktörü	Transmembranal protein
Faktör IV	Kalsiyum	
Faktör V	Proakselerin	Protein kofaktör
Faktör VII	Prokonvertin	Gla içeren endopeptidaz
Faktör VIII	Antihemofilik Faktör	Protein kofaktör
Faktör IX	Christmas Faktörü	Gla içeren endopeptidaz
Faktör X	Stuart Faktörü	Gla içeren endopeptidaz
Faktör XI	Tromboplastin	Endopeptidaz
Faktör XII	Hageman Faktörü	Endopeptidaz
Faktör XIII	Transglutaminaz	Transpeptidaz
Protein C	Protein C	Gla içeren endopeptidaz
Protein S	Protein S	Gla içeren kofaktör
AT III	Antitrombin III	Trombin inhibitörü

**Gla: gama karboksi glutamil.* (Gürdöl F., Tıbbi Biyokimya, 2. Baskı ©2017, Nobel Tıp Kitapevleri)

2.2.2.1. Ekstrinsik Yolak

Bu yol yapısında 263 aminoasit bulunduran bir transmembran protein olan doku faktörü (faktör III) ile başlar. Normal fizyolojik koşullarda bu protein dolaşımdaki hücrelerle temas halinde bulunmaz. Ancak endotelin hasarlandığı durumlarda bu proteinin glikozillenmiş aminoasit kısmı açığa çıkar. Dolaşımda bulunan faktör VII, faktör III'e bağlanarak bir kompleks oluşturur ve kendi de aktiflenmiş olur. Ortamda bulunan kalsiyumun (faktör IV) da yapıya katılmasıyla faktör X için gerekli aktivasyon kompleksi meydana gelir. Aynı zamanda aktive olan faktör VII, intrinsik yolaktaki faktör IX'u da aktive ederek iki yolağın birbirine bağlanmasını ve koagülasyon

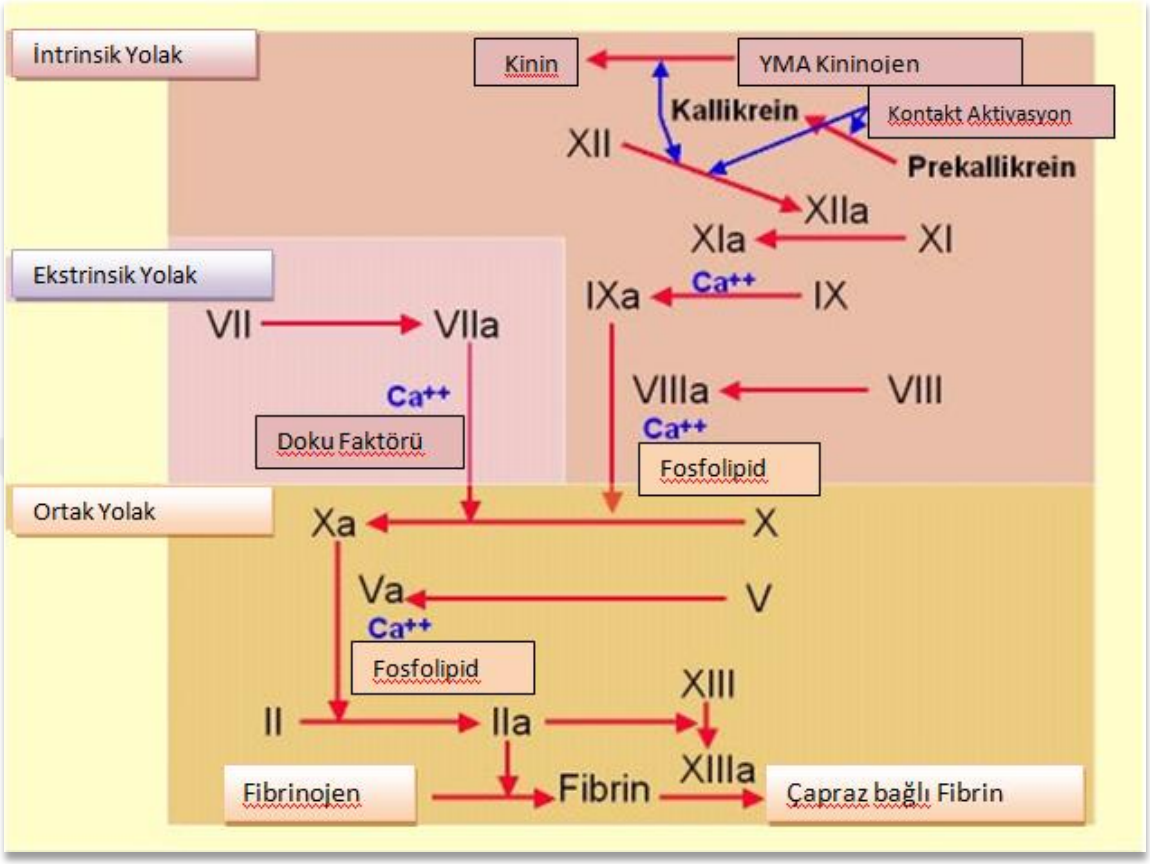
reaksiyonlarının intrinsik yolak üzerinden devam etmesini destekler. Ortak yolakta oluşan Faktör Xa, faktör V varlığında protrombinin trombine dönüşmesini katalizler. Oluşan trombin feed-back mekanizmayla faktör XI, faktör VIII ve faktör V aracılığıyla koagülasyon reaksiyonlarının intrinsik yolak üzerinden yayılmasını sağlar (propagasyon). (9)

2.2.2.2. İntrinsik Yolak

Bu yolağın başlatıcısı damar yaralanması sonucu ortaya çıkan anyonik yapılar, yani fosfolipitlerdir. Faktör XII bu yapılara bağlanarak aktifleşir ve faktör XI ile yüksek molekül ağırlıklı kininojen (HMWK) ile kompleks oluşturur. Bu kompleks prekallikreinin kallikreine dönüşümünü sağlar. Kallikrein ve oluşan FXI, faktör XII'nin daha fazla aktive olmasını sağlar. Faktör XI aynı zamanda ekstrinsik yolda görevli faktör VII tarafından da aktive edilebilir böylece ekstrinsik yol ve intrinsik yol birleşmiş olur. Aktive faktör XI'in faktör IX'u, aktive faktör IX'un ise faktör VIII (kofaktör) ile beraber faktör X'u aktifleştirmesiyle intrinsik yol ortak yola devam eder. (9)

2.2.2.3. Ortak yolak

Ortak yolak protrombinin trombine dönüşümünün gerçekleştiği ve fibrinin stabilize edildiği aşamadır. Trombin başlıca fibrin oluşumu, koagülasyonun inhibisyonu, yara iyileşmesi ve enflamasyonda görev alan bir serin proteazdır. Aktive faktör X (FXa) protrombinin trombine proteolizini sağlar. Oluşan trombin polimer haldeki fibrinojeni fibrin monomerlerine ayırırken bir yandan da faktör XIII'ü aktifleştirir. Aktive faktör XIII glutamil-lizil çapraz bağını oluşturan bir aminotransferaz olup, fibrin monomerleri arasındaki çapraz bağların oluşumunu katalizler. Tüm bu olayların sonucunda çapraz bağlı sağlam bir fibrin ağı elde edilmiş olur (Şekil 3).



Şekil 3. Koagülasyon kaskadı.

Sekonder hemostazın değerlendirilmesi için koagülasyon testlerinden yararlanılır. Ekstrinsik yolak için protrombin zamanı (prothrombin time, PT), intrinsik yol için aktive parsiyel tromboplastin zamanı (activated partial thromboplastine time, aPTT) ve fibrinojenden fibrin oluşumunun değerlendirilmesi için trombin zamanı (thrombin time, TT) kullanılmaktadır. Bu testler genel olarak koagülasyonu *in vitro* ortamda taklit ederek geliştirilmiş testlerdir. Dolayısıyla bu testlerde görülen anormal sonuçlar ilgili yollardaki faktörlerin işlev ve miktarı hakkında da bilgi vermektedir. Bu noktada tanısal amaçlı özellikli koagülasyon testlerinden de yararlanılır.

2.2.3. Antikoagülasyon Sistemi

Normal fizyolojik koşullarda, koagülasyonun lokalize tutulmasında pıhtılaşma reaksiyonları için ortam hazırlayan trombositler etkilidir. Ayrıca bir zincir reaksiyonla birbirlerini aktive eden faktörlerin endotel yüzeyinde yayılmasının engellenmesi gerekir. Bu durum kanama kontrol altına alındıktan sonra doğal antitrombotik ajanların devreye girmesiyle sağlanır.

2.2.3.1. Trombin oluşumundan önce antikoagülasyon

Koagülasyon kaskadının başlatıcısı rolünde olan ekstrinsik yolak uyarıldığında eş zamanlı olarak doku faktörü yolağı inhibitörü (tissue factor pathway inhibitor, TFPI) salınır. Bu inhibitörün görevi doku faktörü/faktör VIIa kompleksi üzerinden koagülasyonun etkisinin azaltılması, yani koagülasyon faktörlerinin sürekli olarak aktive edilmesinin engellenmesidir. Sonuç olarak ekstrinsik yolak ile oluşan bir miktar trombin ve faktör VII'nin önceki etkileriyle koagülasyon kaskadı intrinsik yolak üzerinden devam eder (10).

2.2.3.2. Trombin oluşumu sonrası antikoagülasyon

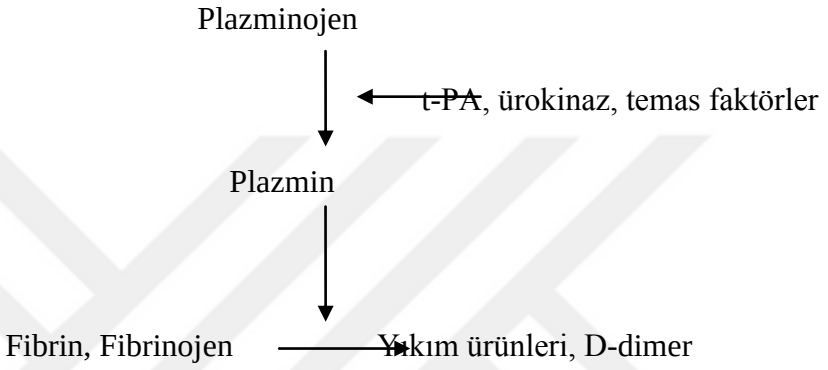
Trombin oluşumuyla antitrombin III aktiflenir ve aktive faktör VII ile aktive faktör X'un inaktivasyonunu sağlar. Antitrombinin bu etkisi diğer koagülasyon sistemi reaksiyonlarına göre yavaştır, dolayısıyla koagülasyon proteinlerinin fonksiyonlarını tamamlamaları için gerekli süre sağlanmış olur.

Trombin aynı zamanda endotel kaynaklı trombomodulin ile oluşturduğu kompleks üzerinden protein C/S sistemini aktifleştirir. Aktif protein C'nin işlerlik kazanması için plazmada bulunan kofaktörü protein S'e ihtiyacı vardır. Protein C/S sistemi ise etkisini aFV ve aFVIII'in oluşmasını engelleyerek gösterir (10).

2.2.3.3. Fibrinoliz

Fibrinoliz, fibrin oluşumu sonrası devreye girer ve oluşan hemostatik tıkaçtaki fibrinin çözünmesi işlemidir. Başlıca plazmin olmak üzere pek çok proteinin görev aldığı bir seri

reaksiyonu içerir. Plazminojen, doku plazminojen aktivatörü (tissue plasminogen activator, t-PA) ve ürokinaz tarafından aktif formu olan plazmine dönüştürülür. Oluşan plazmin hem fibrin, hem de fibrinojen üzerinden etkisini gösterir. Fibrinojenin proteolizi sonucunda uzun zincirli X, Y ve daha kısa zincirli D, E fragmanları oluşur (Fibrinojen yıkım ürünleri). Plazminin fibrini yıkmasıyla ise D-Dimer ortaya çıkar (10).



Şekil 4. Fibrinoliz (t-PA: doku plazminojen aktivatörü)

2.3. TANIDA KULLANILAN ÖZELLİKLİ KOAGÜLASYON TESTLERİ

Rutin koagülasyon testleri (PT ve aPTT) tarama amacıyla ve tedavi takibinde sık kullanılan testlerdir. Özellikli koagülasyon testleri ise PT ve aPTT sonuçları normal sınırlarda olmayan hastalardan tanı amacıyla istenen ileri tetkiklerdir. Koagülasyon faktörleri ve spesifik faktör inhibitör testleri sekonder hemostaz bozukluklarının teşhisinde kullanılmaktadır. Trombotik hastalıkların tanısında ise doğal antikoagülan ve fibrinoliz sürecinde görevli ajanların ölçümünden faydalanılmaktadır.

2.3.1. Koagülasyonu Değerlendiren Testler

Bu gruptaki testler, doğumsal (konjenital) veya edinsel koagülasyon bozukluklarında tanıya yardımcı olan testlerdir. Tarama testlerinde uzama saptanan hastalarda genellikle faktör eksikliği veya inhibitör etkisi düşünülür. Edinsel faktör eksikliklerinde azalan senteze (karaciğer yetmezliği) veya faktörlerin tüketimine (yaygın damar içi pıhtılaşma) bağlı olarak PT ve aPTT'nin genelde birlikte uzaması beklenir. Bu patolojilerde birden çok faktör eksikliği görülebilmektedir. Doğumsal koagülasyon bozukluklarında ise genelde tek bir faktör eksikliğine bağlı olarak izole PT ve aPTT uzaması görülmektedir (11). Bu durumda özellikli koagülasyon testleri istenmeden önce karışım testi ile uzamanın sebebi araştırılır.

İzole PT uzamasında faktör II, V, VII testleri ve inhibitörleri bakılmaktadır. Ekstrinsik yolakta faktör eksiklikleri nadir görülmektedir. Özellikle vitamin K eksikliğinde ekstrinsik yolaktaki proteinler etkilendiğinden, PT normalden uzundur.

İzole aPTT uzamasında ise faktör VIII, IX, XI testleri, inhibitörleri ve lupus antikoagülan testleri sık istenen testlerdir. Bu yolakta en sık faktör VIII eksikliği görülmektedir (Hemofili A, 1:5000 insidans). Faktör IX eksikliği de toplumda sık görülen faktör eksikliklerindendir (Hemofili B). Hemofili C'de ise faktör XI eksiktir.

2.3.2. Trombofili Testleri

Bu grupta antikoagülan sistemde görevli ajanların doğumsal veya edinsel eksiklik ve mutasyonlarının bakıldığı testler bulunur. Protein C, protein S, antitrombin III, aktive protein C rezistansı ve beraberinde istenen genetik testler venöz tromboemboli riskiyle ilişkili olduğundan klinikte trombofili paneli adı altında sıkça istenen testlerdir (12).

2.3.3. Trombin Jenerasyon Testi

Global hemostaz testidir. Rutin koagülasyon testleri pıhtı oluşumuna dayalıdır ve oluşan trombin miktarı %5 civarı iken test tamamlanmış olur. Trombin jenerasyon testi ise *in vitro* ortamda trombin oluşumu ve yıkımını monitörize etmeyi sağlar. Dolayısıyla prokoagülan ve antikoagülan ajanlar arasındaki dengeyi gösterir. Klinikte kullanımı çok yaygın olmamakla beraber hemofili hastalarında perioperatif dönemde kanama eğilimini değerlendirmede, kişiye özel antikoagülan tedavi seçiminde, tromboemboli rekürrensini tahmin etmede kullanımı ile ilgili çalışmalar mevcuttur (13).

2.3.4. Prokoagülan Fosfolipid Testi

Prokoagülan fosfolipitler başlıca fosfatidil serin olmak üzere, fosfatidil etanolamin gibi fosfolipitlerden oluşan, mikropartiküllerin içeriğinde bulunan ve hücre yüzey bileşenleri olarak görev yapan anyonik bileşiklerdir. Mikropartiküller apoptoz veya inflamasyon gibi uyaranlarla hücre yüzeyinden ayrılan fosfolipitlerden zengin mikroveziküllerdir. Yapılan çalışmalarda mikropartiküllerin prokoagülan aktivitelerinin olduğu, immün yanıtta, tümör büyümesi ve anjiyogenez gibi durumlarda rol oynadığı ortaya konmuştur (14). Mikropartikül içeriğindeki fosfolipitlerin ölçümü özellikle son yıllarda kardiyovasküler patolojiler, otoimmün hastalıklar ve kanserle ilişkilendirilmiştir. Klinikte, hastaların vasküler patolojiler açısından risk faktörünü belirlemede ve tedavi takibinde kullanılmaya başlanmıştır.

2.4. KOAGÜLASYON TESTLERİ ve PREANALİTİK FAKTÖRLER

Preanalitik hatalar örneğin alınmasından analiz anına dek her aşamada ortaya çıkabilmektedir. Bu hataların çoğu anlaşılabilir ve önlenebilir olsa da bazıları klinik hatalara da sebep olabilmektedir. Hatanın ciddiyeti çalışılan teste, testi çalışan laboratuvar personeline ve klinisyenin farkındalığına bağlıdır. Özellikli koagülasyon testleri tanı amaçlı kullanıldığından, hatalı sonuç vermek oldukça ciddi problemler doğurabilir. Yanlış pozitif sonuçlar hastaların gereksiz yere tanı almasına, ya da yanlış negatif sonuçlar hastanın klinik durumunun kaçırılmasına neden olabilir. Her iki durum da hem hasta, hem de sağlık sistemi açısından problem yaratmaktadır. Örneğin normal bir PT yada aPTT sonucunu uzamış olarak değerlendirmek, klinisyenin gereksiz yere özellikli koagülasyon testleri istemesine neden olacaktır. Bu durum hem zaman kaybına, hem de kaynakların gereksiz tüketimine sebep olabilmektedir. Öte yandan patolojik bir test sonucunun normal değerlendirilmesi, hastanın gerekli tedaviye ulaşamaması, tanı alamaması, invaziv işlemler sırasında yaşamı tehdit eden kanama riski gibi çok ciddi medikal sorunlar yaratabilir. Antikoagülan ilaç takibinde istenen rutin koagülasyon testlerinde yanlış sonuçlar üretilmesi ilaç dozunun yanlış ayarlanmasına sebep olabilir. Sonuçta hasta tromboz veya kanama riskiyle karşı karşıya kalabilir (15).

Güncel laboratuvar rehberleri preanalitik hataların azaltılmasında ve örnek reddi kriterlerinin belirlenmesinde önemli rol oynamaktadır. Bu rehberler sayesinde doğru tüp kullanımı, doğru kan alım teknikleri, uygun saklama koşulları gibi etkenler belirlenerek hataların azaltılması sağlanabilmektedir (16).

2.4.1. Örnek alımı

Örnek alımında herşeyden önce ilk kontrol edilmesi gereken örneğin doğru kişiden alınıp alınmadığı olmalıdır. Hasta bilinçliyse örnek alınırken ismi sorulmalı, bilinçli değilse kimlik bilgileri doğrulanmalı, basılan barkoddaki isimle eşleştirilmeli ve kan alındıktan sonra örnek üzerine hemen bu barkod yapıştırılmalıdır. Barkod bilgilerinde hastanın ismi, soy ismi, testin hangi klinik tarafından istendiği, tüp bilgisi, örneğin alındığı saat ve gideceği laboratuvarın bilgilerinin bulunması gereklidir. Hastadan örnek

alınırken, turnikenin uzun süre tutulması hemokonsantrasyona ve koagülasyon mekanizmasının tetiklenmesine sebep olabilir. Bu yüzden turnike 1 dakikadan uzun süre tutulmamalıdır (17).

Koagülasyon testleri için kullanılan tüplerde antikoagülan olarak sitrat uygundur. Sitrat kandaki kalsiyumu geri dönüşümlü olarak bağlayarak kanın pıhtılaşmasını engeller. Bu etki geri dönüşümlü olduğu için plazma kogülasyon proteinlerinin aktive olmasını engellemez ve *in vitro* ölçümlerin yapılmasını sağlar. Etilen diamin tetraasetik asit (EDTA) kullanımı kalsiyumu geri dönüşümsüz bağladığından koagülasyonun tamamen inhibe olmasına neden olur, dolayısıyla koagülasyon testlerinde kullanılmaz. Tüplerde kullanılan sitrat konsantrasyonu %3.2 ve %3.8 olarak iki şekilde belirlenmiştir. Rutin ve özellikli koagülasyon testlerinde %3.2 (109 mM) sitrat içeren tüpler tavsiye edilmektedir (16). Çünkü daha yüksek konsantrasyondaki sitratın, rutin koagülasyon testlerinde hafifçe uzamaya sebep olabildiği görülmüştür. Ayrıca antijen bakılan yani miktar tayini yapılan testlerde (fibrinojen gibi) örnekteki dilüsyon etkisine bağlı olarak hafif düşüklükler de saptanmıştır. %3.8 (128 mM) sitrat içeren tüpler, antiplatelet tedavi (ör: Aspirin, PFA 100) takibinde kullanılan testler için önerilmektedir (18). Diğer antikoagülanlarla kontaminasyonu engellemek açısından sitratlı tüpe örnek alımı EDTA veya heparinli tüpten önce olmalıdır. İdeal olan örnek alım sırası: kuru tüp, sitratlı tüp, EDTA veya heparinli tüp şeklindedir (19). Tüpten tüpe aktarımdan kesinlikle kaçınılmalı, bu şekilde alındığı belirlenen örnekler laboratuvar tarafından reddedilmelidir. Örnek alındıktan sonra 3-6 kez alt üst edilerek tüpteki antikoagülan ile homojen karışımının sağlanması gerekir. Tüplerin şiddetli çalkalanması *in vitro* hemolize ve faktör aktivasyonuna neden olacağından kaçınılması gereken bir durumdur. Vakumlu tüp ile alınan örnekler vakumun izin verdiği seviyeye kadar yani optimal miktarda örnek alımını sağlarlar. Ancak tüp dolmadan çekildiğinde istenen miktarın altında dolum gerçekleşir. Eksik miktarda örnek tüpte bulunan fazla miktardaki sitrat ile dilüe olacağından rutin koagülasyon testlerinin uzamasına sebep olur (16) Kantitatif ölçümü yapılan testlerin ise dilüsyonel olarak miktarını azaltmış olur. Santral venöz yoldan alınan örnekler kısmen pıhtılı, hemolizli, bazen de infüzyon sıvısının karışması

sebebiyle dilüe olabilmektedir. Örneğin bu yoldan alınması gerekiyorsa infüzyon yolunun kapalı olduğundan emin olunmalı, 10 dakika beklenmeli, 5 mL kan alınarak analiz için kullanılmamalı ve daha sonra alınan ikinci örnek gönderilmelidir. Hemolize sebebiyet vermesi nedeniyle enjektörle alım önerilmemektedir (20).

2.4.2. Örnek Taşınması

Örnekler alındıktan sonra aynı gün içerisinde çalışılacaksa dondurulmamalıdır. 15-22^{o}C arasındaki sıcaklıklarda taşımak uygundur. PT ve aPTT için bekleme süresi maksimum 4 saattir ve bu süre içinde örneklerin kapaklarının kapalı tutulması gerekir. Heparin tedavi takibi için bakılan aPTT ölçümünün 1 saat içinde yapılması önerilir, çünkü heparin etkisi plateletlerle nötralize edilebilmektedir. Faktör aktivitesinin kaybolma ihtimaline karşı labil faktörlerin (FV, FVIII) bekletilmeden laboratuvara transportu ve ölçümünün sağlanması önerilir (21).

2.4.3. Örnek Ayrılması ve Saklanması

PT ve aPTT bazlı koagülasyon testleri için genelde örneğin tek sefer santrifüjü yeterlidir. Ancak bazı testlerin (ör. lupus antikoagülan) trombositlerden etkilenmemesi için örneğin iki kez santrifüj edilmesi önerilir. Santrifüj için sıcaklık kontrollü cihazların kullanımı ve cihaz içi sıcaklığın 15-22^{o}C'a ayarlanması uygundur. Soğutmalı santrifüj kullanımında, platelet aktivasyonuna neden olması sebebiyle, çok düşük sıcaklıklardan kaçınılmalıdır. Koagülasyon testlerinde santrifüj deviri 1500xg, süresi 10-15 dakika olarak optimize edilmiştir. Daha yüksek devirler örnekte hemoliz olmasına neden olabilir. Santrifüj cihazının içinde örnek varken kapağın sık açılıp kapanması örneğin sürekli karışmasına sebep olacağından bir işlem bitmeden diğer işleme geçilmemesi önemlidir. Genelde primer tüpten çalışma ve dondurma işlemi sonrası çalışmalarda tek santrifüj yeterli olmaktadır. Ancak bazı testler için çözdürme işlemi sonrasında tekrar santrifüj işlemi önerilmektedir (Tablo 2). Çift santrifüj işlemi, ilk ayırmadan kalan ve dondurma çözdürme işlemi sonrasında plazmaya karışabilen hücre kalıntılarını da uzaklaştırmaktadır. Bu noktada dondurulup çalışılacak tüm testler için çift santrifüj yapılması laboratuvarlar işlemlerini standardize edeceğinden önerilebilir (22).

Dondurma sonrası önerilen saklama süresi koagülasyon testleri için -20^{o}C'de 2-4 hafta olmalıdır. Örnekler -80^{o}C'de bekletilecekse aylarca, hatta 1 seneye kadar saklanabilmektedir. Çalışma anında çözdürme işlemi için laboratuvarlarda genelde etüv veya su banyosu kullanımı ile oda sıcaklığında bekletme yöntemleri uygulanmaktadır. Ancak homojen bir sıcaklık dağılımı için önerilen çözdürme yöntemi su banyosudur. Oda sıcaklığında çözdürme işlemi bekleme süresi uzun olduğundan uygulanmamalıdır. Çözdürme işleminin uzun sürmesi koagülasyon faktörlerin aktive olmasına neden olacağından test sonuçlarını etkilemektedir. Etüvde sıcaklık kontrolü yapmak su banyosuna göre daha zordur, sıcaklık aniden yükselebilir ve 37^{o}C üzerideki sıcaklıklarda plazma koagülasyon proteinleri inaktifleşmeye başlar. İdeal yöntem 37^{o}C'de 5-10 dakika su banyosunda çözdürmek ve örneği bekletmeden çalışmaya almaktır (15).

Tablo 2. Sık çalışılan sekonder hemostaz testleri ve önerilen laboratuvar işlemleri

Testler	**Çalışma Yöntemi**	**Örnek Tipi (önerilen)**
PT/INR, APTT, TT, Fibrinojen	Primer tüp Pıhtılaşma bazlı test	Sitratlı tüp Tek santrifüj
D-Dimer	Primer veya sekonder tüp ELISA aglütinasyon	Sitratlı tüp Tek santrifüj
Faktör analizleri (II,V,VII,VIII,IX,X,XI,XII) Faktör inhibitor analizleri	Sekonder tüp Pıhtılaşma bazlı test	Sitratlı tüp Tek santrifüj
Protein C Protein S Antitrombin	Sekonder tüp Pıhtılaşma bazlı test veya Kromojenik yöntem	Sitratlı tüp Tek santrifüj
Aktive Protein C Rezistansı	Sekonder tüp Pıhtılaşma bazlı test	Sitratlı Tüp Çözdürme sonrası ikinci Santrifüj
Lupus Antikoagülan	Sekonder tüp Pıhtılaşma bazlı test	Sitratlı Tüp Çözdürme sonrası ikinci Santrifüj

Preanalitik faktörlerin koagülasyon testlerinde yapılan tanısal hatalarda çok önemli rolü vardır. Ancak bu evrede yapılan hataların çoğu kliniğe yansımadan farkedilmekte ve hastalar açısından problem yaratmamaktadır. Bazı kaynaklara göre bu rakamlar örneğin Amerika'da her sene 900-2074 hastadan birinde ya da başka bir bakışla her 214-8316 laboratuvar sonucundan birinde saptanmıştır (23).

Hataların önüne geçilmesinde yapılan işlemle ilgili personelin (kan alan sağlık personelinden, örneği kabul eden veri giriş elemanı ve çalışan teknisyene kadar) doğru ve güncel eğitimi almasının sağlanması çok önemlidir. Çalışılan sonuçlarda klinik olarak bir uyumsuzluktan şüphelenildiğinde örnek incelenmeli, gerekirse yeniden çalışılmalı, hatta bazı durumlarda farklı test ve farklı yöntemler kullanılmalıdır. Kalite kontrol programlarının etkin kullanımı laboratuvar kaynaklı hataları büyük ölçüde engeller. Ayrıca test istemi yapılırken ilaç kullanımı, diyet gibi değişkenlere dikkat edilmesi ve koşulların belirlenmesinde laboratuvar-klinik iletişimi önemli rol oynar. Laboratuvarların kabul-red kriterlerini belirlemesi ve etkin olarak uygulanması yapılan hataların azalmasında etkendir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma 07.03.2017 tarihi ve SAG-C-TUP-070317-0088 proje numarası ve 09.2016.639 protokol numaralı etik kurulu ile kabul edilmiş olup Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından desteklenmiştir.

Çalışmamızda yazılı onam formu alınmış 30 gönüllüden, sitratlı Vacutainer™ tüplere (%3.2, 109 mM sitrat, Becton Dickenson, ABD) alınan kanlar kullanıldı. Çalışma grubundaki gönüllüler sigara kullanımı olmayan, koagülasyon ve trombosit fonksiyonlarını etkileyecek ilaç kullanmayan, herhangi bir koagülasyon defekti olmayan, 25-35 yaş arasındaki sağlıklı yetişkinler olarak belirlendi. Tam kan örnekleri 1500xg'de 15 dakika santrifüj edildi ve plazmalarından çalışma için her hastanın kendi havuzu oluşturuldu. Hemen çalışılacak (bazal) örnekler tek ve çift santrifüj olarak iki gruba ayrıldı ve dondurulmadan direkt çalışıldı. Dondurma ve çözdürme etkisine bakılacak diğer örnekler eppendorflara porsiyonlanarak -20^{o}C'de saklandı. Çözdürme aşaması 5 dakika ve 15 dakika süre ile su banyosunda bekletilerek çözdürme şeklinde iki gruba ayrıldı. Tüm parametreler için tek ve çift santrifüj edilecek örnekler gruplandırılarak çözdürme sonrası yeniden çalışıldı (Tablo 3). Çalışma dizayn edilirken, analiz edilecek parametrelerin dondurma, çözdürme ve santrifüj kriterleri Klinik Laboratuvar ve Standartları Enstitüsü (Clinical Laboratory and Standarts Institute, CLSI) tarafından yayınlanan güncel H21A5 kitapçığı (Ocak 2008) kılavuz alındı.

Tablo 3. Santrifüj, dondurma ve çözdürme koşullarına göre çalışılacak örneklerin gruplandırması (n=10).

1. Grup	Tek santrifüj ile örneğin hazırlanması ve hemen çalışılması (Tek santrifüj bazal)
2. Grup	Tek santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 5 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme ve çalışma
3. Grup	Tek santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 5 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme, çözdürme sonrası tekrar santrifüj ve çalışma
4. Grup	Tek santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 15 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme ve çalışma
5. Grup	Çift santrifüj ile örneğin hazırlanması ve hemen çalışılması (Çift santrifüj bazal)
6. Grup	Çift santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 5 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme ve çalışma
7. Grup	Çift santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 5 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme, çözdürme sonrası tekrar santrifüj ve çalışma
8. Grup	Çift santrifüj ile örneğin hazırlanması, -20^{o}C'de 24 saat dondurma sonrası 15 dakika 37^{o}C su banyosunda çözdürme ve çalışma

Faktör II, V, VIII, IX, X; protein C, protein S, aktive protein C rezistansı, lupus antikoagülan testleri ile PT ve aPTT testleri SB. Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan STA StAR (Diagnostica

Stago, Fransa) otomatize koagülasyon cihazı ile çalışılmıştır. Firma tarafından sağlanan STA Compact (Diagnostica Stago, Fransa) cihazında mikropartikül analizi yapılmıştır. Trombin jenerasyon testi ise otomatize trombogram metoduyla (calibrated automated thrombogram assay) florometrik olarak ölçülmüştür (Fluoroskan Ascent Reader, Thermo Scientific, ABD). Kullanılan tüm reaktifler ticari kit olarak temin edilmiştir.

3.1. ÖZELLİKLİ KOAGÜLASYON TESTLERİ

3.1.1. Faktör Testleri

Faktör analizi için test edilecek örnek ile ölçümü yapılacak olan faktörden eksik, ancak diğer faktörlerin bulunduğu liyofilize insan plazması (immunodepleted plasma) cihazda 1:10 oranında karıştırılır. Daha sonra test ortamına koagülasyon kaskadınının hangi yolağı aktif edilecekse gerekli reaktifler eklenir ve inkübe edilir. Eksik olduğu düşünülen faktör koagülasyon kaskadının intrinsik yolağındaysa aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) bazlı, ekstrinsik yolağında ise protrombin zamanı (PT) bazlı ölçüm yapılır ve sonuçlar kalibratör eğrisi üzerinden hesaplanır. Kalibratör eğrisi, referans materyalin 4 seri dilüsyonunun ölçümüyle elde edilir. Saniye ve yüzde aktivitenin logaritmik ilişkisi kalibrasyon eğrisini oluşturur. Saniye cinsinden ölçümü yapılan hasta sonuçları bu eğri üzerinden yüzde aktiviteleri hesaplanarak verilir. 1:10 dilüsyon standart dilüsyon olup, sonuç %5'ten düşük olduğu takdirde 1:5, %150'den yüksek olduğu takdirde 1/40 dilüsyonla otomatik olarak tekrar edilir. Faktörlerin ölçüm yöntemleri ve referans aralıkları Tablo 4'te özetlenmiştir.

Tablo 4. Faktör testlerinin ölçüm yöntemleri

Faktör	**Reaktif**	**Ölçüm yöntemi**	**Referans Aralık**
Faktör II	Faktör 2'den fakir liyofilize plazma Neoplastine, CaCl2 (STA Deficient II)	PT bazlı	70-120 %
Faktör V	Faktör V'den fakir liyofilize plazma Neoplastine, CaCl2 (STA Deficient V)	PT bazlı	70-120 %
Faktör VIII	Faktör 8'den fakir liyofilize plazma Sefalin, CaCl2 (STA Deficient XIII)	aPTT bazlı	60-150 %
Faktör IX	Faktör 9'dan fakir liyofilize plazma Sefalin, CaCl2 (STA Deficient IX)	aPTT bazlı	60-150 %
Faktör X	Faktör 10'dan fakir liyofilize plazma, Neoplastine, CaCl2 (STA Deficient X)	PT bazlı	70-120 %

3.1.2. Protein C Testi (STA Stachrom Protein C)

Protein C testi kromojenik kompleksin kolorimetrik ölçümüne dayanır. Hasta plazması protein C aktivatörü olan bir venomdan türevlendirilmiş reaktifle karıştırılır. Daha sonra aktive protein C içeren plazmaya oligopeptit yapıda kromojenik bir substrat eklenir. Reaksiyon sonucu ortaya çıkan paranitroanilin 405 nanometre dalgaboyunda kolorimetrik olarak ölçülür. Protein C miktarı oluşan maddenin renk yoğunluğu ile

doğru orantılıdır. Sonuçlar yüzde olarak verilir. Bu test için normal referans aralığı 70-130 % olarak belirlenmiştir.

Örnek + Protein C aktivatörü (venom) → Aktive protein C

Aktive Protein C + Kromojenik substrat → paranitroanilin (405 nm)

3.1.3. Protein S Testi (STA Liatest Free Protein S)

Protein S seviyesi immünotürbidimetrik yöntemle ölçülmektedir. Bu yöntemde protein S'e spesifik antikorla bağlı latex mikropartiküller içeren reaktif ile hasta plazması karıştırılır. Plazmada bulunan serbest protein S'e bağlanan antikorlar, mikropartiküllerin de yardımıyla örnekte süspansiyon oluşturan bir antijen antikor kompleksi oluşturur. Analiz edilen örnekteki türbidite değişiminin (artışının) fotometrik ölçümü protein S miktarını verir. Sonuçlar yüzde olarak hesaplanır.

3.1.4. Aktive Protein C Rezistansı (APCR, Sta Clot APCR System)

Bu yöntemde hasta plazması dilüe edilerek faktör V eksik liyofilize plazma ile kalsiyum bulunan ortamda karıştırılır. Daha sonra spesifik olarak sadece faktör 10'u aktive eden bir venomdan derive edilen reaktif eklenir. Burada amaç pıhtılaşma zamanını ortak yoldan itibaren aktive edip kaskadın daha öncesindeki faktörlerden gelecek etkileri azaltmaktır. Sağlıklı bireylerde aktive protein C faktör 5'i inhibe ederek koagülasyon kaskadını kontrol altında tutan proteinlerden biridir. Faktör 5'te bir mutasyon olduğunda aktive edilmiş protein C'nin etki süresi uzayacağından, pıhtılaşma süresi azalacaktır. Pıhtılaşma süresi 120 saniye ve üzeri olan bireylerde APCR negatif; 120 saniyenin altında olan bireylerde APCR pozitif kabul edilir.

3.1.5. Lupus Antikoagülan Testi (Lupus Anti-coagulant Sensitive aPTT Reagent)

Lupus antikoagülanı fosfolipidler üzerinde inhibitör etkiye sahip olduğundan aPTT bazlı ölçüm yöntemi kullanılmaktadır. Klasik aPTT testinden farkı reaktifin lupus antikoagülanı için hassaslaştırılmış olmasıdır. Bu yöntemde hasta plazması sefalin ve

aktivatör içeren reaktifle karıştırılarak inkübe edilir. Kalsiyum klorür eklenmesiyle pıhtılaşma başlar. Pıhtı oluşumunun bittiği an saniye cinsinden kaydedilir.

3.1.6. Mikropartikül Analizi

Bu yöntemde örnekteki fosfolipit etkisi araştırıldığından, koagülasyon tetikleyicisi olarak içinde fosfolipit partikül içermeyen reaktifler kullanılmaktadır. Hasta örneği protrombin ve faktör V içeren fosfolipidlerden fakir reaktifle karıştırılıp inkübe edilir. Koagülasyon kaskadı faktör Xa'dan itibaren aktiflenir ve pıhtılaşma zamanı ölçülür. Birimi saniye cinsinden olup 61-83 saniye arasında normal kabul edilmektedir.

3.1.7. Trombin Jenerasyon Testi

Bu yöntem *in vitro* ortamda trombin oluşumunun gözlenmesine dayanır. Bunun için hasta plazması ve kalibratör iki ayrı ölçüm kuyucuğunda fosfolipit ve doku faktörü içeren bir reaktifle karıştırılır. Su banyosunda 37^{o}C'de 5 dakika inkübe edilir. Daha sonra test ortamına reaksiyon başlatıcısı olarak kalsiyum klorür ve trombine spesifik floresans özellikli substrat eklenir. Oluşan trombin-substrat kompleksinin sürekli ölçümü hastanın trombogramını verir. Trombositten zengin ve fakir plazmaların trombogramlarının değerlendirilmesi klinik olarak farklıdır.

Sonuçlar zamana karşı trombin oluşum miktarının bir grafiği olarak verilir (trombogram). Değerlendirmede eğri altında kalan alan olan endojen trombin potansiyeli ve hız indeksi (velocity index, VI) baz alınır. Endojen trombin potansiyeli birim zamanda oluşan ve yıkılan trombin miktarına denk gelmektedir. Hız indeksi ise eğrinin oluşmaya başladığı an, tepe noktasındaki pik yüksekliği ve bu noktaya ulaşılan süreden türeyen bir hesaplamadır.

VI =[pik yüksekliği/(tepe noktasına varış süresi-eğri oluşumu başlangıç zamanı)]

3.2. PT ve aPTT

PT ve aPTT optik ve mekanik olarak iki şekilde ölçülmektedir. Laboratuvarımızda rutin olarak mekanik yöntemle yapılan ölçüm metodu tercih edilmektedir. *In vitro* ortamda intrinsik yolağı başlatmak için kontakt faktörlere benzeyen negatif yüklü sefalin veya kaolin ile kalsiyum klorür kullanılmaktadır. Ekstrinsik yolakta ise başlatıcı olan doku faktörüne benzeyen neoplastin ve kalsiyum klorür kullanılmaktadır. Reaktifler ve hasta plazması karıştırılarak 37^{o}C'de içinde metal bilye bulunan küvetlerde inkübe edilir. Metal bilye, reaksiyonun başlangıcında bir mıknatıs aracılığıyla ileri geri hareket ettirilmekteyken, *in vitro* koagülasyon süreci sonunda oluşan fibrin ağı tarafından durdurulur. Sonuçta bu hareket değişiminde kaydedilen süre saniye cinsinden PT veya aPTT sonucu olarak hesaplanır.

Protrombin zamanı intrinsik ve ortak yoldaki faktörlerin (II, V, VII, X) eksiklikleri, faktör inhibitörlerinin varlığı, bu faktörler üzerinden etki eden terapötik ajanların izlemi (vitamin K antagonistleri) ve fibrinojen seviyesi hakkında bilgi vermektedir.

Tromboplastin (doku faktörü ve fosfolipidler)+ $CaCl_2$+ Hasta plazması → Fibrin

Aktive parsiyel tromboplastin zamanı ekstrinsik ve ortak yoldaki faktörlerin eksiklikleri, faktör inhibitörlerinin varlığı, heparin tedavi takibi, lupus antikoagülan gibi nonspesifik antikor varlığı ve fibrinojen seviyesi ölçümlerinde kullanılmaktadır.

Kontakt faktörü+ Fosfolipidler+ Hasta plazması →Faktör XIIa + F XI a

$CaCl_2$+ FXIIa+ FXIa+aktive olan diğer faktörler → Fibrin oluşumu

3.3. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM

Çalışmamızda elde ettiğimiz verilerin istatistiksel analizinde Microsoft Office Excel 2007 ve SPSS statistics 17.0 paket programları kullanıldı. Formül kullanılan hesaplamalarda Microsoft Office Excel 2007'den faydalanıldı. SPSS statistics 17.0 programı ise faktör testlerinde ve trombin jenerasyon testinde istatistiksel anlamlılık için kullanıldı. Aynı program prokoagülan fosfolipitler ve faktörlerin regresyon analizinde de kullanıldı.

Özellikli koagülasyon testlerinde, farklı koşullardaki ölçümlerin bazal koşula göre istatistiksel anlamlılığını değerlendirmek için gruplar arasında ANOVA testi uygulandı. Daha sonra analitik ve klinik hata değerleriyle karşılaştırmak üzere bağıl hata yüzdeleri (relative bias percentages- RBP) hesaplandı. Hesaplamalarda üretici firmanın uygun santrifüj (tek veya çift) önerisi doğrultusunda taze çalışılan örnekler bazal koşul olarak alındı.

RBP= [(örnek konsantrasyonu-bazal konsantrasyon) / bazal konsantrasyon]x100

Analitik hatayı değerlendirmek için total değişim sınırı (total change limit, TCL) hesaplandı. Bu değer aynı kişiye ait örnekteki analitin stabilitesini incelemek amacıyla kullanılmaktadır (24). Dolayısıyla biyolojik varyasyona ve ölçümde kullanılan cihazın analitik varyasyonuna bağlıdır. Çalışmamızda total değişim limiti (TCL), bağıl hata yüzdesi (RBP) ile kıyaslanarak analitlerin stabilitesi analitik açıdan değerlendirildi

$$TCL= \sqrt{(2.77xCVa)^2+ (0,5xCVi)^2}$$

Klinik hatayı değerlendirmede ise aynı testler için referans değişim değeri (reference change value, RCV) hesaplandı. Bu değer aynı hastaya ait farklı zamanlarda alınmış örneklerin ölçümlerindeki değişimi belirtmektedir (25). Kişisel biyolojik varyasyondan ve cihazın ölçüm anındaki analitik varyasyonundan etkilenmektedir.

Z katsayısı ise çalışma için kabul edilen güven aralığı değeridir. Çalışmamızda Z katsayısı 1,96 olarak alınarak yüzde 95 güven aralığı kabul edildi. Farklı zamanlarda

aynı hastaya ait ölçümlerin değişim değerini yansıtan RCV, klinik hata sınırlarını değerlendirmekte kullanıldı.

$$RCV = \sqrt{2} \times Z \times \sqrt{(CVa^2 + CVi^2)}$$

Bu hesaplarda kullanılan biyolojik varyasyon (CVi) değerleri Westgard'ın güncel biyolojik varyasyon tablolarından, burada bulunmayan testlerin varyasyonu ise (faktör II, protein C, protein S, lupus) ise Wada ve ark. (26) çalışmasından alındı. Analitik varyasyon (CVa) ise çalıştığımız cihazda, testlerin kendine ait iç kalite kontrol örneklerinin uygun konsantrasyonlarının 30 günlük ölçüm verilerinden elde edildi.

Prokoagülan fosfolipitler ve faktör testleri arasındaki ilişki lineer regresyon testi ile incelendi.

Trombin jenerasyon testinde endojen trombin potansiyeli (ETP) ve hız indeksi (velocity index, VI) parametreleri için grupların normalite testi Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı ve tüm gruplar normal dağılım gösterdi. Gruplar ise kendi içinde karşılaştırılırken parametrik tekrarlı ölçümler testi uygulandı.

Tüm analizlerde istatistiksel anlamlılık seviyesi olarak 0.05 kullanılmış olup, $P>0.05$ olması durumunda anlamlı farklılığın olmadığı, $P<0.05$ olduğu durumda anlamlı farkın olduğu kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmamızda 25-35 yaş aralığında 30 sağlıklı gönüllüden sitratlı tüplere alınan ve farklı koşullarda çalışılmak üzere porsiyonlanıp dondurulan örneklerden elde edilen sonuçlar kullanılmıştır. Buna göre elde ettiğimiz ölçümlerden hesaplanan istatistiksel veriler bu bölümde anlatılmış ve tablo oluşturularak özetlenmiştir.

Faktör II testinde, tek santrifüj grubundaki 2., 3. ve 4. koşulların ortalamaları, bazal koşulun ortalamasına göre değerlendirildiğinde istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır (P<0.05). Çift santrifüj grubunda ise anlamlı fark saptanmamıştır (P>0.05). Çift sanrifüj grubundaki diğer koşullara bakıldığında bazal koşula göre istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır (P>0.05, Tablo 5).

Tablo 5. Faktör II testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul(*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Faktör II (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	95.5±7.6	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	78.7±7.6	**0.01**
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	82.8±7.9	**0.02**
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	68.1±13.5	**0.01**
	5	Çift Santrifüj Bazal	97.6±5.7	0.99
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	86.9±7.7	0.27
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	86.7±5.6	0.29
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	85.1±11.7	0.07

Faktör V testinde, bazal koşulda çalışılan örnek ile diğer koşullarda çalışılan örnekler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır (P>0.05).

Tablo 6. Faktör V testinde testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Faktör V (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	78.4 ±15.8	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	77.1 ±15.6	1.0
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	82.2 ±18.2	1.0
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	69.4 ±14.7	0.9
	5	Çift Santrifüj Bazal	77.9 ±17.8	1.0
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	82.3 ±22.2	1.0
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	90.3 ±16.4	0.8
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	84 ±17.5	1.0

Faktör VIII testinde, çift santrifüj sonrası 15 dakikada çözdürülen örnekler ile, tek santrifüj edilen ve taze çalışılan örnek arasında anlamlı fark vardır ($P<0.05$). Diğer koşullarda çalışılan örnekler, bazal koşula göre anlamlı fark göstermemiştir (Tablo 7).

Tablo 7. Faktör VIII testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşula (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Faktör VIII (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	92.9±22.2	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	86.5±34.1	1.00
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	89.6±31.3	1.00
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	76.1±24	0.87
	5	Çift Santrifüj Bazal	88.7±27.9	1.00
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	84.2±35.9	1.00
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	61.9±22.1	0.20
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	52±15.9	**0.03**

Faktör IX testinde bazal koşul ve diğer koşullar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark yoktur ($P>0.05$, Tablo 8).

Tablo 8. Faktör IX testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Faktör IX (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	103.5±22	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	113.4±15.4	0.87
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	109.4±18.1	0.99
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	90.1±12	0.60
	5	Çift Santrifüj Bazal	113.6±14.1	0.86
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	115.3±15.5	0.74
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	114.1±14.6	0.83
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	101.4±17	1.00

Faktör X testinde bazal koşul ile diğer koşullar karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P>0.05, Tablo 9).

Tablo 9. Faktör X testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Faktör X (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	90.2±15	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	86.1±15.7	0,99
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	85.8±15.2	0,99
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	90.7±16.2	1,0
	5	Çift Santrifüj Bazal	99.8±15.7	0,88
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	99.6±17.7	0,89
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	103.7±16.4	0,57
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	101.7±16.2	0,78

Lupus antikoagülan testinde bazal koşul ile diğer koşullar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmamıştır (P>0.05, Tablo 10).

Tablo 10. Lupus antikoagülan testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (**) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
LA (saniye) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	33.5±2.9	1.00
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	33.5±2.7	1.00
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	34.7±3.2	0.99
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	33.5±2.7	1.00
	5	Çift Santrifüj Bazal	33.7±2.8	**
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	35.3±3.1	0.93
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	35.0±2.8	0.98
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	35.3±2.9	0.91

Aktive protein C rezistansı testinde hem çift, hem tek sanrifüj grubunda 15 dakikada çözdürülen örnekler için $P<0.05$ olarak hesaplanmıştır. Bu iki grup bazal koşul ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmıştır. Diğer koşullarda çalışılan örnekler açısından anlamlı bir fark bulunamamıştır (Tablo 11).

Tablo 11. Aktive protein C rezistansı testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (**) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
APCR (saniye) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	149.2±14.6	1.00
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	168±16.8	0.60
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	175±11.1	0.18
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	194±17	**0.001**
	5	Çift Santrifüj Bazal	150.6±9.4	**
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	173.3±10.9	0.26
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	171.7±20.7	0.35
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	195.7±45.2	**0.02**

Protein C testinde bazal koşul ve diğer koşullar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 12).

Tablo 12. Protein C testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Protein C (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	107.5±15.8	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	106.7±13.3	1.00
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	110.7±18	1.00
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	97.7±17	0.88
	5	Çift Santrifüj Bazal	108.9±15.6	1.00
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	114.8±17.4	0.97
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	112.1±14.2	0.99
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	106.4±19.1	1.00

Protein S testinde bazal koşul ve diğer koşullar arasında anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 13).

Tablo 13. Protein S testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (*) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
Protein S (%aktivite) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	78.4±15.8	*
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	77.1±15.6	1.00
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	82.2±18.2	1.00
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	69.4±16.8	0.94
	5	Çift Santrifüj Bazal	77.9±14.7	1.00
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	82.3±17.9	1.00
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	90.3±22.2	0.79
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	84±16.4	0.99

Tüm testler için kişisel biyolojik varyasyon ve analitik varyasyon değerleri ile test sonuçlarının medyan değerleri Tablo 14'de gösterilmektedir. Bu değerlere göre, testlerin analitik olarak kabul edilebilir değişim sınırlarını belirlemek açısından TCL değerleri ve klinik karar verme aralığını belirlemek için RCV değerleri hesaplanarak Tablo 15'de özetlenmiştir.

Tablo 14. Kişisel biyolojik varyasyon ve analitik varyasyon değerleri

Test	Medyan	*CVi %	*CVa %
Faktör II	95.0	12.9	5.1
Faktör V	127	3.6	5.5
Faktör VIII	92	4.8	2.4
Faktör IX	109	9.1	9.6
Faktör X	93	5.9	0.6
LA	33.9	7.1	0.4
APCR	148.1	7.6	11.4
Protein C	107	7.6	4.5
Protein S	73	7.6	4.9

**CVi: biyolojik varyasyon, CVa: analitik varyasyon*

Faktör II testinde tek santrifüj grubunda dondurup saklama sonrası 37°C su banyosunda 5 ve 15 dakikalık çözdürme işlemleri için TCL değerlerinin aşılmış olduğu, ancak tek santrifüj sonrası dondurulan ve çözdürmeyi takiben resantrifüj edilen grup ile çift santrifüj gruplarında TCL ve RCV değerlerinin aşılmamış olduğu görülmüştür. Bu veriler ile Faktör II testinin klinik değerlendirme açısından çift santrifüj edilerek çalışılmasının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır. Faktör V ölçümlerinde tek santrifüj grubunda dondurulup saklama sonrası 37°C su banyosunda 5 ve 15 dakika çözdürülen örneklerde TCL aşılmıştır. Ayrıca diğer koşullar için hem TCL, hem RCV değerleri aşılmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde FV testi için örneklerin taze çalışılması gerektiği sonucuna varılmıştır. Faktör VIII testi için tek santrifüj grubunda dondurulup saklama sonrası 37°C su banyosunda 5 dakika çözdürme ardından resantrifüj edilen örneklerin çalışmaları kabul edilebilir değerlerde sonuçlanmıştır. Ayrıca çift santrifüj edilip dondurulup saklandıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakikada çözdürme işlemleri de tercih edilebilir. Faktör IX'un koşullardan fazla etkilenmediği, sadece tek santrifüj edilip dondurulup saklanan örneklerin 37°C su banyosunda 15 dakikada çözdürme sonrasında TCL'yi aşan değerlerin elde edildiği görülmüştür. Faktör X testinde tüm koşullar TCL'yi aşsa da klinik karar verme kıstas olarak alındığında tüm koşulların kabul edilebilir olduğu sonucuna varılmıştır. Çift santrifüjün önerildiği lupus antikoagülan testi, farklı santrifüj ve çözdürme işlemlerinden

etkilenmemiştir. Aktive protein C rezistans testinde sadece çift santrifüj edilip dondurulup saklama sonrası 37°C su banyosunda 5 dakikada çözüldürülen örneklerin bağıl hata yüzdeleri analitik ve klinik olarak kabul edilebilir sınırlardadır. Son olarak protein C ve protein S tüm koşullarda stabil görünmektedir.

Tablo 15. Özellikli koagülasyon testleri için hesaplanan total değişim limiti (TCL) ve referans değişim değerleri (RCV) ile bağıl hata yüzdelerinin (RBP) karşılaştırılması.

Testler	TCL(%)	RCV(%)	Tek santrifüj (%RBP)			Çift santrifüj (%RBP)		
			5dk	5 dk R	15 dk	5dk	5 dk R	15 dk
FII	15.6	38.4	-17.8	-14.7	-29.8	-9.5	-10.2	-10.6
FV	15.5	18.3	-16.1	-16.5	-39.2	-41.3	-37.9	-66.0
FVIII	7.1	14.9	-11.1	-4.0	-18.8	-7.5	-30.9	-47.2
FIX	26.8	36.5	0.0	-2.3	-23.4	3.5	0.5	-12.5
FX	3.4	16.4	-4.4	-6.2	-10.8	5.2	4.3	7.2
LA	3.7	19.8	0.1	0.4	0.3	0.6	0.5	0.6
APCR	31.8	37.9	32.7	33.9	66.6	26.7	45.3	60.7
Protein C	12.9	24.4	0.5	3.4	-9.5	6.6	3.8	-4.2
Protein S	14.0	25.0	0.0	4.3	-10.8	4.7	13.9	6.6

Pembe renkli kutucuklar sadece TCL'yi. mavi renkli kutucuklar hem TCL hem RCV'yi aşan RBP değerlerini göstermektedir.

Prokoagülan fosfolipit analizi için çift santrifüj önerilmektedir. Buna göre tek santrifüj edilip dondurulup saklandıktan sonra 37°C su banyosunda 5 ve 15 dakikada çözdürülen örnekler, çift sanrifüj edilip taze çalışılan örnekler ile karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmıştır (P<0,05). Tek santrifüj edilip taze çalışılan ve dondurulup saklandıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakikada çözdürülüp resantrifüj edilen örnekler için anlamlı fark bulunamamıştır. Çift santrifüj grubundaki 3 koşulda da anlamlı fark yoktur (Tablo 16).

Tablo 16. Prokoagülan fosfolipit (PFL) testinde tüm koşullar için ortalama ve standart sapma değerleri ile bazal koşul (**) ile karşılaştırılarak hesaplanan P değerleri.

Test	Koşul	Grup Açıklaması	Ort±SS	P
PFL (saniye) n=10	1	Tek Santrifüj Bazal	79.4±4.7	0.98
	2	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	62.1±9.4	**0,01**
	3	Tek Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	77.1±8.3	0.71
	4	Tek Santrifüj,15 dakikada çözdürme	57.9±5.3	**0.01**
	5	Çift Santrifüj Bazal	82.2±6.9	**
	6	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme	81.3±5.7	1.00
	7	Çift Santrifüj, 5 dakikada çözdürme, resantrifüj	85.8±7.3	0.94
	8	Çift Santrifüj,15 dakikada çözdürme	78.5±6.2	0.93

Fosfolipit partikül konsantrasyonu ile faktör testleri arasındaki ilişki lineer regresyon analizi ile incelenmiştir (Tablo 17). Sonuçlara göre örneklerdeki fosfolipit miktarının baktığımız faktör testlerini analitik olarak etkilemediği saptanmıştır.

Tablo 17. Fosfolipit partikül konsantrasyonu ile faktör testlerinin ilişkisi için hesaplanan regresyon katsayısı ve P değerleri.

Test	R^2	Denklem	P
FV	0.347	y=1.35x	0.85
FVIII	0.224	y=1.02x	0.49
FIX	0.627	y=1.39x	0.28
FX	0.18	y=1.23x	0.85

Trombin jenerasyon testinde tüm koşullar için endojen trombin potansiyeli (ETP) ve hız indeksi (VI) değerlendirilmiştir. Tek santrifüj edilen örnekler için alt gruplarda hem ETP, hem de VI arasında anlamlı fark görülmemiştir (P=0.47 ve P=0.25). Çift santrifüj grubunda, endojen trombin potansiyeline bakıldığında anlamlı fark görülürken (0.02), hız indeksi için anlamlı fark saptanmamıştır (P=0.13). Alt grupların kendi arasındaki karşılaştırmalarına bakıldığında, taze çalışılan örnekler ile dondurulup saklandıktan sonra 37°C su banyosunda 5 dakikada çözülen örnekler için P değeri 0.003 olarak hesaplanmıştır. Diğer koşullar için hem tek, hem çift santrifüj gruplarının alt grup verilerinde anlamlı fark görülmemiştir (Tablo 18).

Tablo18. Trombin Jenerasyon Testinde grupların kendi içinde bazal örneklere göre karşılaştırması.

	TEK SANTRİFÜJ					ÇİFT SANTRİFÜJ					P***
	BAZAL	5dk	5dk resantrifüj	15 dk	P*	BAZAL	5 dk	5dk resantrifüj	15 dk	P*	
ETP (nmol/L)	2760±336	2603±590	2588±387	2353±1252	0.467	2765±417	2359±424	2406±339	2691±514	0.022**	0.227
VI	117.8±15.6	108.6±40.4	103.3±31.4	95.6±38	0.245	112.8±36	90.8±37.4	95.9±29	102.8±29	0.134	0.240

Veriler ortalama±standart sapma olarak sunulmuştur

* Grupların kendi içinde parametrik tekrarlı ölçümler testi ile karşılaştırıldığında bulunan P değeri

** Ek olarak çift santrifüj grubundaki bazal ve 5 dk çözdürülmüs örneklerin eşleşmiş student t-testi ile karşılaştırılmasında P değeri 0.003 olarak bulunmuştur.

*** Tek santrifüj ve çift santrifüj bazal örneklerin kendi içinde eşleşmiş student t-testi ile karşılaştırıldığında bulunan P değeri.

Hafif faktör eksikliği olan hastalardan fazla miktarda kan almamak açısından, laboratuvar ortamında sağlıklı gönüllülerden aldığımız plazma örneklerinin bir kısmı ilgili faktör açısından eksik plazma ile 1:3 oranında dilüe edilerek patolojik örnekler hazırlandı. Faktör VIII'in hafif eksikliğini yansıtan bu örneklerin ölçümünden elde edilen bağıl hata yüzdesinin TCL ve RCV ile karşılaştırılması tablo 19'da gösterilmiştir. Buna göre faktör VIII'in hafif eksikliğinde analitik ölçüm limiti aşılsa bile, klinik hata açısından karar verme limiti olan RCV değerinin aşılmadığı görülmektedir.

Tablo 19. Faktör VIII'in hafif eksikliği için hesaplanan bağıl hata yüzdesi (RBP) değeri ile total değişim limiti (TCL) ve referans değişim değerinin (RCV) karşılaştırılması.

Test	**TCL(%)**	**RCV(%)**	**Tek santrifüj (%RBP)**		
			5dk	5 dk R	15 dk
FVIII (hafif eksiklik) (%aktivite) n=10	2.6	27.5	*	7.7	*

5. TARTIŞMA

Koagülasyon testleri gerek tanıya yardımcı olmak için, gerekse tedavi takibinde kullanılan ve klinik laboratuvarlarda sıkça çalışılan testlerdir. Birinci basamak testlerinde anormal sonuçlar saptanan hastalardan özellikli koagülasyon testleri için alınan örneklerin doğru çalışılması, hastanın pıhtılaşma bozukluğu hakkında klinisyene somut bir ipucu vereceğinden çok önemlidir. Birinci basamak testler sıkça çalışılan testler olduğundan aynı gün içerisinde, 2-4 saat gibi bir sürede bekletilmeden çalışılmaktadır. Ancak özellikli koagülasyon testlerinin günlük test istemleri rutin koagülasyon testlerine göre daha azdır. Bu testlerin çoğu hasta sayısı fazla olan hastanelerin merkez laboratuvarlarında bile kit sayısını karşılayacak sayıda hastaya ulaşıldığında çalışılmaktadır. Bu durum hem kitlerin stabilitesinin zamanla sınırlı oluşu, hem de yüksek maliyetlerinden kaynaklanmaktadır. Küçük ölçekli sağlık kurumlarında ise özellikli koagülasyon testleri çalışılmak üzere merkez laboratuvarlara yönlendirilmektedir. Dolayısıyla hem hastanenin kendi bünyesinde alınan örnekler, hem de çevresindeki sağlık merkezlerinden taşınan örneklerin stabilitesi test sonuçlarını etkilemektedir. Çalışmamızda koagülasyon testlerinin saklama ve çalışma koşullarının klinik olarak hasta sonuçlarına etkisini araştırmayı hedeflediğimizden, sonuçlarımızı değerlendirirken istatistiksel anlamlılık yerine testlerin bağıl hata yüzdelerini (RBP) hesaplayıp, bu değerleri analitik hata sınırı olan total değişim limitleri (TCL) ve klinik farklılık sınırları olan referans değişim değerleri (RCV) ile karşılaştırdık.

Santrifüj, sekonder ve özellikli koagülasyon testlerinde trombositlerin etkisini azaltmak yani *in vitro* test ortamında primer hemostazın katılımını inhibe etmek açısından önemlidir. Bu testler için trombositten fakir plazma tercih edilmelidir. Trombositlerin filtre edilmesi durumunda faktör kaybı da yaşanacağından, santrifüj işlemi uygun görülen kriterlerde yapılmalıdır. Caroll ve arkadaşlarının yapığı bir çalışmaya göre tüm koagülasyon testleri için trombosit miktarı litrede $10x10^9$ u geçmemelidir (27). Trombositlerin daha çok etkilediği testler, özellikle lupus antikoagülan, APC-R, mikropartikül testleri için örnek hazırlığında çift santrifüj önerilmektedir. Çalışmamızda, tek ve çift santrifüj edilen taze plazma örneklerinin

sonuçlarına bakıldığında özellikle APC-R testi için çift santrifüj işleminin önemli olduğu görülmektedir. Çift santrifüj önerilen lupus antikoagülan testinde çalışmamızda tek ve çift santrifüj grupları açısından anlamlı fark bulunamamıştır. Santrifüj açısından lupus antikoagülan testi bizim sonuçlarımıza göre stabildir. Faktör testlerinde genel olarak taze çalışılan örneklerde gruplar arasında çift ve tek santrifüj açısından anlamlı farklar saptanmamıştır. Faktörler açısından santrifüj işlemlerinde görülen farklar dondurma ve çözdürme işlemlerinin de eklenmesiyle değişiklik göstermektedir.

Koagülasyon testlerinin genel olarak bekletilmeden çalışılması önerilmektedir. Beklemesi gerekiyorsa ağzı kapalı şekilde oda sıcaklığında saklanmalı 4 saat içinde çalışılmalıdır. Bekleme süresince buzdolabına tutulmamalı, taşınma sürecinde ise buz üstüne konmamalıdır. Yapılan çalışmalar faktör VII'nin 2-8ºC'de aktive olabildiğini ve PT sonuçlarının beklenenden kısa ölçülmesine sebebiyet verdiğini göstermiştir (28). Özellikli koagülasyon testlerinin saklama koşullarıyla ilgili literatürde az sayıda çalışma yapılmıştır. Yapılan çalışmalar genelde kan bankasında uzun süreler bekleyen örneklerde saklama koşullarının etkisinin araştırılması şeklindedir. Yapılan kapsamlı bir çalışmada (29) sağlıklı gönüllülerden elde edilen örneklerde (plazmaferez) rutin koagülasyon testleri, fibrinoliz testleri, faktör II, V, VII, VIII, IX, X, XI ve XII için saklama koşulları araştırılmıştır. Buna göre testlerin -24ºC altındaki sıcaklıklarda 3 ay; -80ºC altındaki sıcaklıklarda ise yaklaşık 18 ay kadar stabil olduğu belirlenmiştir. Ancak transfüzyon odaklı bu tip çalışmarda, kullanılan antikoagülan cinsi (citrate phosphate dextrose adenine-CPDA) ve gönüllülerden alınan kan hacminin yüksek oluşu, rutinde alınan örneklerin durumunu tam olarak yansıtmamaktadır. Bizim çalışmamızda rutinde sitratlı tüplere alınan ve daha sonra çalışılmak üzere plazması ayrılıp, porsiyonlanıp dondurulan örnekler kullanılmıştır. Bu açıdan çalışmamız klinik laboratuvarlarda yapılan özellikli koagülasyon testlerinin rutin çalışma şartlarını daha iyi yansıtmaktadır. Dolayısıyla faktör eksikliği öntanısı alan hastalar açısından, çalışmamızda elde ettiğimiz veriler daha anlamlı olabilir.

Faktör II testi sonuçlarımıza göre çift santrifüj ile, tek santrifüj grubundaki çözdürme sonrası resantrifüj kabul edilebilir. Diğer koşullar için analitik hata ve klinik farklılık sınırları aşıldığından trombositlerin mümkün olduğunca santrifüj işlemi ile uzaklaştırılması daha uygun görünmektedir.

Hem analitik, hem klinik hata sınırlarını aştığından, çalışma bulgularımıza göre faktör V'in taze olarak çalışılmasını önermekteyiz. Faktör VIII çözdürme koşullarından ziyade, santrifüjden daha çok etkilenmiş gibi görünmektedir. Faktör VIII'in çift santrifüjde ve tek santrifüj grubundaki örneklerin resantrifüjünde iyi sonuçlar verdiği görülmüştür. Yapılan çalışmalarda da faktör V ve VIII'in fazla bekletilmeden çalışılması önerilmiştir (30). Ancak bu çalışmada dondurma ve çözdürme etkisi değil, taze alınan örneklerin gün içinde çeşitli koşullarda (buzdolabı veya oda sıcaklığı) bekletilmesine bakılmıştır. Labil olan faktör V ve faktör VIII çözdürme sırasında degrade olabileceğinden dondurulup çözdürülen örneklerde çözdürme zamanının sıkı takip edilmesine dikkat çekilmiştir (31). Faktör IX testi her iki grupta da 15 dakikalık çözdürme işlemleri dışında hem analitik, hem klinik olarak kabul edilebilir değerlerdedir. Çözdürme işlemleri, koagülasyon testleri için yayınlanan kılavuzda (H21A5) su banyosunda 5, en fazla 10 dakika olarak belirlenmiştir. 15 dakikalık çözdürme işlemi faktör IX'un inaktivasyonu sebebiyle diğer koşullardan anlamlı olarak farklı sonuçlar elde edilmesini açıklayabilir. Bunlar çok kısa zaman dilimleri olmasına rağmen bazı testlerde ciddi hatalara sebebiyet verdiği tarafımızdan gösterilmiştir. Bu nedenle zamanlamaya uymak çok önemlidir. Benzer şekilde faktör X testinde analitik olarak bağıl hata yüzdeleri yüksek olsa da, saklama ve işleme koşullarının klinik bir hataya sebebiyet vermeyeceği sonucuna varmaktayız.

Aktive protein C rezistansı testi için, hem yapılan çalışmalar *(Favloro&Lippi 2012)*, hem de H21A5 kaynak kitabına göre çift santrifüj edilerek trombositlerin mümkün olduğunca uzaklaştırılması önerilmektedir. Çalışmamızda çift santrifüj grubu ve tek santrifüj grubundaki çözdürme sonrası resantrifüj kriterlerinden elde ettiğimiz sonuçlar bu kaynaklar ile uyumlu bulunmuştur. Tek santrifüj bu test için uygun değildir.

Lupus antikoagülan testi için önerilen çift santrifüj kriterinin aksine sonuçlarımız bu testin bizim çalıştığımız koşullardan fazla etkilenmediğini göstermektedir. Lupus antikoagülan testi için örnek hazırlığı sırasında örnekte kalan trombositlerin testi etkilediği bilinmektedir. Bu etkileşim trombosit kaynaklı fosfolipitlerin pıhtılaşma süresini azaltması ile sonuçlanmaktadır. Bir derlemede (32) bu etkileşimin pıhtılaşma bazlı testlerde, dilüe Russel viper venom testine (dRVVT) göre daha fazla olduğundan bahsedilmektedir. Ayrıca örnekteki lupus antikoagülan cinsinin de dondurma ve çözdürmeden etkilendiği, bazı zayıf antikorların bu sırada kaybolabileceği ve bunun test sonuçlarında yanlış negatiflikle sonuçlanacağından söz edilmektedir. Bu test için plazma örneğinde $10x10^9$ /L'den daha az mikarda trombosit kabul edilebilir. Yapılan çalışmalar çoğunlukla hasta kaynaklı çalışmalar olup, bizim çalışmamızda sağlıklı gönüllülerden elde ettiğimiz örneklerde dondurma ve çözdürme etkisi görülmemiş olabilir. Ayrıca klinik değerlendirmede hastalar için lupus antikoagülan pozitifliği en az iki farklı testle değerlendirilmeli denildiğinden, bu testte hasta bazında da farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Dolayısıyla preanalitik açıdan da farklı kategorizasyonlarla yeni çalışmalar yapılması daha uygundur.

Çalışmamızda protein C ve protein S için analitik olarak farklı koşullar arasında anlamlı farklar saptanmamıştır. Stabil olduğunu düşündüğümüz bu testler sonuçları açısından da klinik bir hataya sebebiyet vermemekte ve hastalar açısından olumsuz bir sonucun alınmayacağını düşündürmektedir. H21A5 kılavuzunda da yer alan kapsamlı bir çalışmada (29) -20ºC'de protein C'nin 18 ay, protein S'in de 6 ay stabil olduğu ortaya konmuştur. Bu testler ile ilgili yayınlar daha çok saklama koşulları üzerine olup kaynak kılavuzda da protein C ve S için çift sanrifüjün etkisinden özellikle bahsedilmemiştir.

Prokoagülan fosfolipitler trombosit yüzeyinde de bulunduğundan bu test için mümkün olduğunca trombositlerin uzaklaştırılması gerekmektedir. Dolayısıyla bu test için çift santrifüj önerilmektedir. Çalışmamızda prokoagülan fosfolipit ve faktör testlerinin ilişkisini incelendiğinde anlamlı bir ilişki tespit edilememiştir. Bir derlemede

dolaşımdaki mikropartiküllerin en çok trombosit kaynaklı olduğu daha sonra eritrositler, granülositler, endotel hücreleri gibi hücrelerde bulunduğu gösterilmektedir (33). Faktör testleri için trombositten fakir plazma tercih edildiğinden, fosfolipitlerin *in vitro* ortamda bu testleri etkilemeyeceği düşünülebilir. Yine başka bir derlemede mikropartikül içeriğindeki fosfolipitlerin esas olarak doku faktörünün prokoagülan aktivitesini arttırdığı, tenaz ve protrombinaz komplekslerinin etkinliğini azalttığından bahsedilmiştir (34). Yine aynı derlemede sağlıklı gönüllülerin dolaşımdaki mikropartikül seviyelerinin düşük olduğu belirtilmiştir. Çalışmamızı sağlıklı gönüllüler ile planladığımızdan ve trombositten fakir plazmada çalıştığımızdan, örneklerdeki fosfolipit miktarının faktör testlerini etkileyecek düzeyde olmadığı çalışma sonuçlarımızda görülmektedir.

Trombin jenerasyon testinde, mevcut yöntem için trombositten fakir ve trombositten zengin plazma örnekleri tercih edilmektedir. Çalışmamızda tüm testler için aynı kişilerden örnek almayı hedeflediğimizden ve örnek hacminin de belli bir sınırda tutulması gerektiğinden, trombin jenerasyon testini diğer testler gibi trombositten fakir plazmada yapmayı hedefledik. Ayrıca baktığımız parametreler primer hemostaz ile alakalı olmadığından, hemostazın koagülasyon kısmını yansıtması açısından trombositten fakir örneklerle çalışılması gerekmekteydi. Trombin jenerasyon testinde endojen trombin potansiyeli (ETP) ve diğer parametrelerden hesaplanan hız indeksi (VI) için kişilerin kendi örnekleri arasındaki ölçümlerde santrifüj koşulları ve çözdürme koşulları açısından anlamlı farklar saptanmadı.

Sağlıklı gönüllülerden alınan örneklerin dilüsyonu ile oluşturulan patolojik örneklerin faktör VIII ölçümünde, en uygun koşul olan 5 dakika çözdürme sonrası resantrifüj işlemi uygulandı. Bu parametreyi çalışmaktaki amacımız, faktör VIII'in ciddi eksikliği olan hastalarda, yapılan ölçümün hastanın kliniğinin kaçırılmasına imkan tanımayacak kadar belirgin olduğu, fakat hafif eksikliklerde preanalitik koşulların hasta sonucunun etkilenmesine neden olup olmayacağını araştırmaktı. Verilerimize göre analitik limit değerlerinin aşıldığı görüldü. Ancak klinik hata sınır değerlerin aşılmadığı

dolayısıyla faktör VIII'in hafif eksikliği olan hastalarda klinik karar verme noktasında problem yaratmayacağı sonucuna varıldı.

Çalışmamızın zayıf yanlarından biri, sağlıklı gönüllülerin yanı sıra, faktör eksikliği tanısı alan hastaların çalışmaya dahil edilememesi olabilir. Aynı anda çok sayıda değişkene bakıldığından, gönüllülerden alınan kan hacminin fazla oluşu hastalardan aynı miktarda kan alımı için kısıtlayıcı bir faktördü. Bu noktada sağlıklı gönüllülerden alınan plazma örnekleri teorik olarak faktör eksikliği yaratacak şekilde dilüe edilerek, en sık faktör eksikliği olan faktör VIII'in çalışılması gerçekleştirildi. Başka bir kısıtlayıcı faktör ise karşılanan kit miktarı, dolayısıyla test sayılarının sınırlandırıcı etkisi sebebiyle ölçümlerin tekrarlı yapılamaması olabilir. Son olarak çalışmamızda prokoagülan fosfolipitler ile tüm testler eş zamanlı çalışılamadığından, sadece belli sayıda faktör testiyle bu fosfolipitlerin etkisini ilişkilendirebildik.

Çalışmamızın güçlü yanı aynı anda bir çok özellikli koagülasyon parametresini farklı koşullarda değerlendirerek, kılavuz bilgileri ve kit bilgilerinin pratikte bir tıbbi biyokimya laboratuvarında yapılan rutin çalışmalar ile karşılaştırmaktı. Kullanılan santrifüjün ve su banyosunun nitelikleri, örnekleri ayırmada insan faktörünün eklenmesi gibi değişkenler laboratuvar çalışmalarını sıklıkla etkileyen preanalitik değişkenlerdir. Ayrıca, literatürdeki çalışmalarda santrifüj koşulları ve saklama koşullarının koagülasyon parametrelerine etkilerinin genelde ayrı ayrı incelendiği görülmektedir. Bu açıdan bakıldığında, çalışmamızda, klinik laboratuvarların rutin işleyişinde karşılaşılabilecek preanalitik hataları daha iyi simüle ettiğimizi düşünmekteyiz.

Sonuç olarak özellikli koagülasyon testleri santrifüj, dondurma ve çözdürme işlemlerinden etkilenen testlerdir. Klinik laboratuvarlarda taze alınan örnekler aynı gün içinde çalışılmayacaksa mutlaka uygun santrifüj işlemi ile plazmalarının ayrılması ve çalışma anına dek uygun derecede dondurulması gerekmektedir. Çalışma anında örneklerin çözdürülmesi için tercihen su banyosu kullanılmalı, çözdürme süresi dikkatlice takip edilmelidir.

KAYNAKLAR

1. Graber, M.L. et al. Diagnostic error in Internal Medicine. Archives of Internal Medicine. 2005;165.
2. Belk WP, Sunderman FW. A survey of the accuracy of chemical analyses in clinical laboratories. Am J Clin Pathol. 1947;17:853–61.
3. Mario Plebani. Diagnostic errors and Laboratory medicine-Causes and Strageties. Journal of International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, eJIFCC2015 Vol26 No1pp007-014.
4. Witte DL, VanNess SA, Angstadt DS, Pennell BJ. Errors, mistakes, blunders, outliers, or unacceptable results: how many? Clin Chem. 1997 Aug;43(8Pt 1):1352-6.
5. Plebani M, Carraro P. Mistakes in a stat laboratory: types and frequency. Clin Chem. 1997;43(8Pt 1):1348-51.
6. Ross JW, Boone DJ. Assessing the effect of mistakes in the total testing process on the quality of patient care [Abstract 102]. In:Martin L, Wagner W, Essien JDK, eds. 1989 Institute of Critical Issues in Health Laboratory Practice. Minneapolis, MN: DuPont Press, 1991.
7. Mario Plebani. Exploring the iceberg of errors in laboratory medicine. Clinica Chemica Acta 404 (2009) 16-23.
8. Richard McPherson, Matthew Pincus. Henry's Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods, 22nd Edition © Saunders 2012.
9. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E.Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fifth Edition. Copyright© 2012 by Saunders, ELSEVIER.
10. Gürdöl F., Tıbbi Biyokimya, 2. Baskı ©2017, Nobel Tıp Kitapevleri.
11. Harrison İç Hastalıkları El Kitabı (Harrison's Manual of Medicine, 17th edition). Çev. Op. Dr. Barış Demiriz, Uzm. Dr. Itır Şirinoğlu Demiriz. © 2011 Nobel Tıp Kitabevleri.

12. Kandice Kottke-Marchant, Bruce H. Davis. Laboratory Hematology Practice. Blackwell Publishing © 2012.
13. Armando Tripodi. Thrombin Generation Assay and Its Application in the Clinical Laboratory. Clinical Chemistry, April 2016.
14. Owens AP, Mackman N. Microparticles in hemostasis and thrombosis. Circ Res. 2011 May 13;108(10):1284-97.
15. Emmanuel J. Favloro, Dorothy M. Funk, Guiseppe Lippi. Pre-Analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. LabMed. 2012; 43(2): 1-10.
16. CLSI, Collection, Transport and Processing of Blood Specimens for Testing Plasma-Based Coagulation Assays and Molecular Hemostasis Assays: Approved Guideline. 5th ed. CLSI document H21A5. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute; 2008.
17. CLSI. Procedures for the Collection of Diagnostic Blood Specimens by Venipuncture; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document H3-A6. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2007.
18. CLSI/NCCLS. Tubes and Additives for Venous Blood Specimen Collection; Approved Standard—Fifth Edition. CLSI/NCCLS document H1-A5. Wayne, PA: NCCLS: 2003.
19. Michael Cornes, Edmée van Dongen-Lases, Kjell Grankvist, Mercedes Ibarz, Gunn Kristensen, Giuseppe Lippi, Mads Nybo and Ana-Maria Simundic. Order of blood draw: Opinion Paper by the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for the Preanalytical Phase (WG-PRE). Clinical Chemistry and Laboratory Medicine 2016-0426.
20. Powers JM. Obtaining blood samples for coagulation studies from a normal saline lock. Am J Crit Care. 1999;8:250-253.
21. van Geest-Daalderop JH, Mulder AB, Boonman-de Winter LJ, Hoekstra MM, van den Besselaar AM. Preanalytical variables and off-site blood collection: influences on the results of the prothrombin time/international normalized ratio

test and implications for monitoring of oral anticoagulant therapy. Clin Chem. 2005;51(3):561-568.

22. Lippi G, Salvagno GL, Poli G, Guidi GC. Influence of centrifugation temperature on routine coagulation testing. Clin Chem. 2006;52:537-538.
23. Plebani M., Lippi G. To err is human. To misdiagnose might be deadly. Clin Biochem. 2010; 43: 1-3.
24. Oddoze C., Lombard E., Portugal H. Stability of 81 analytes in human whole blood, in serum and in plasma. Clinical Biochemistry 45(2012) 464-469.
25. Kutasz E, Lazzati JM, Maceiras M, Zaidma V, Rubinstein M, Chaler AE. Clinically Useful Samples and Reference Change Value. Clin Chem. Lab. Med. August 2014.
26. Wada Y, Kurihara M, Toyofuku M, Kawamura M, Iida H, Kayamori Y, Kinoshita S, Hamasaki N. Analytical goals for coagulation tests based on biological variation. Clin Chem Lab Med. 2004 Jan;42(1):79-83.
27. Carroll WE, Wollitzer AO, Harris L, et al. The significance of platelet counts in coagulation studies. J Med. 2001;32:83-96.
28. Omaran S, Hallouda M, Essawi F, et al. Effect of cold storage on the haemostatic cascade system. Transfus Sci. 1996;17(3):407-414.
29. Woodhams B, Giradot O, Blanco M, Collesse G, Gourmelin Y. Stability of coagulation proteins in frozen plasma. Blood Coag Fibrinolysis. 2001;12(4):229-236.
30. Wolfgang Heil, Regina Grunewald , Martin Amend and Michael Heins. Influence of Time and Temperature on Coagulation Analytes in Stored Plasma. Clin Chem Lab Med 1998; 36(7):459–462.
31. Favaloro EJ. Pre-analytical variables in coagulation testing. Blood Coagul Fibrinolysis 2007;18:86–89.
32. Armondo Tripodi. Laboratory Testing for Lupus Anticoagulants: A review of affecting Results, Clinical Chemistry 53:9 1629-1635.
33. Shosaku Nomura, Michiomi Shimizu. Clinical significance of procoagulant microparticles. Journal of Intensive Care (2015) 3:2.

34. Olivier Morel, Florence Toti, Bénédicte Hugel, Babé Bakouboula, Laurence Camoin-Jau, Françoise Dignat-George, Jean-Marie Freyssinet. Procoagulant Microparticles Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2006;26:2594-2604.