

VILNIAUS UNIVERSITETO MEDICINOS FAKULTETO
FIZIOLOGIJOS, BIOCHEMIJOS, MIKROBIOLOGIJOS IR
LABORATORINĖS MEDICINOS KATEDRA

MAGISTRO BAIGIAMASIS DARBAS

**HEMOLIZĖS ĮTAKOS KRAUJO KREŠĖJIMO TYRIMAMS REZULTATŲ
ĮVERTINIMO ANALIZĖ**

Magistrantė MONIKA MURAŠKAUSKAITĖ _____
(parašas)

Darbo vadovas
dr., doc. D. Vitkus _____
(parašas)

VU MF Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir
laboratorinės medicinos katedros vedėja
hab.dr., prof. Z. A. Kučinskienė leidžiama ginti _____
(parašas)

Darbo įteikimo data _____

Registracijos Nr. _____

2017 m., Vilnius

TURINYS

TURINYS.....	2
SANTRUMPOS.....	3
LENTELIŲ IR PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS.....	4
ĮVADAS.....	6
DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI.....	7
1. LITERATŪROS APŽVALGA.....	8
1.1.Hemolizė.....	8
1.1.1.Hemolizės samprata ir nustatymas.....	8
1.1.2.Dažniausios hemolizę sąlygojančios priežastys.....	10
1.2.Kraujo krešėjimas.....	14
1.2.1. Kraujo krešėjimo samprata.....	14
1.2.2. Kraujo krešėjimo etapai.....	17
2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI.....	21
2.1. Tyrimo objektas.....	21
2.2. Tiriamojo mėginio paruošimas.....	22
2.3. Hemolizės sukėlimas tiriamajame mėginyje.....	22
2.4. Tyrimo metodai.....	22
2.5. Tyrimo duomenų analizei taikyti metodai.....	24
3. TYRIMO REZULTATAI.....	26
3.1.Hemolizės įtaka protrombino komplekso (SPA) aktyvumui.....	26
3.2.Hemolizės įtaka aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) aktyvumui	29
3.3.Hemolizės įtaka fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje.....	33
3.4.Hemolizės įtaka d – dimerų koncentracijai kraujo plazmoje.....	36
4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS.....	38
IŠVADOS.....	40
SANTRAUKA.....	41
SUMMARY.....	42
LITERATŪROS SĄRAŠAS	44
PRIEDAI	

SANTRUMPOS

ADF - adenoindifosfatas

ADTL – aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas

ALT - alaninaminotransferazė

AST - aspartataminotransferazė

ATF - adenointrifosfatas

cAMF – ciklinis adenomonofosfatas

CLSI (angl. *Clinical and Laboratory Standards Institute*) - klinikinių ir laboratorijų standartų institutas

D-DI – D - dimerai

DIK – diseminuota intravazalinė koaguliacija

FDP – fibrino degradacijos produktai

LDH - laktatdehidrogenazė

NO – azoto oksidas

PG₁ – prostaciklinas 1

PG₂ – prostaciklinas 2

SPA (angl. *Stago Prothrombin Assay*) - protrombino kompleksas

STH – somatotropinis hormonas

TF (angl. *tissue factor*) – audinių faktorius

t-PA – plazminogeno aktyviklis

u-PA – urokinazės plazminogeno aktyviklis

vWF – von Willebrando faktorius

LENTELIŲ IR PAVEIKSLŲ SĄRAŠAS

Lentelės:

- 1 lentelė. „Hemolizės skirstymas indeksais“ (10 psl.);
- 2 lentelė „Krešėjimą skatinantys ir slopinantys veiksniai“ (14 psl.);
- 3 lentelė „Bandymų schema“ (19 psl.);
- 4 lentelė „Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo aprašomoji statistika“ (23 psl.);
- 5 lentelė „Koreliacijos matrica tarp kintamųjų“ (27 psl.);
- 6 lentelė „Aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) aprašomoji charakteristika“ (27 psl.);
- 7 lentelė „Fibrinogeno koncentracijos kraujo plazmoje aprašomoji statistika“ (30 psl.);
- 8 lentelė „Koreliacijos matrica tarp kintamųjų“ (33psl.);
- 9 lentelė „D - dimerų koncentracijos kraujo plazmoje aprašomoji statistika“ (34 psl.);
- 10 lentelė „Koreliacijos matrica tarp kintamųjų“ (36psl.).

Paveikslai:

- 1 pav. „Hemoglobino koncentracija kraujo plazmoje (mg/dL)“ (9 psl.);
- 2pav. „Kraujo plazmos krešėjimo schema“ (10 psl.);
- 3 pav. „Krešėjimo sistemos modelis“ (13 psl.);
- 4 pav. „Hemolizės įtaka protrombino komplekso (SPA) aktyvumui kraujo plazmoje“ (25 psl.);
- 5 pav. „Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo pokyčiai tarp pradinių ir skirtingo laipsnio hemolizuotų mėginių“ (26 psl.);
- 6 pav. „Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo pokyčių procentinė išraiška“ (26 psl.);
- 7 pav. „ADTL mėginių ištiriamumo vaizdinė išraiška“ (28 psl.)
- 8 pav. „Hemolizės įtaka aktyvintojo dalinio tromboplastino laikui ADTL) kraujo plazmoje“ (29 psl.)
- 9 pav. „Aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokyčiai tarp pradinių ir skirtingo laipsnio hemolizuotų mėginių“ (30psl.)
- 10 pav. „Hemolizės įtaka fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje“ (32 psl.);
- 11 pav. „Fibrinogeno koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška“ (33 psl.);

12 pav., „Fibrinogeno koncentracijos pokyčių procentinė išraiška“ (33 psl.);

13 pav. „Hemolizės įtaka d - dimerų koncentracijai kraujo plazmoje“ (35 psl.);

14 pav. „D – dimerų koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška“ (36 psl.);

15 pav. „D - dimerų koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška“ (37 psl.).

ĮVADAS

Pastarąjį laikotarpį vis daugiau dėmesio skiriama laboratorijose atliekamų tyrimų kokybei užtikrinti [51]. 1999 metais paskelbtoje publikacijoje „Klysti yra žmogiška: saugesnė sveikatos priežiūra“ (JAV medicinos institutas) teigiama, jog kiekvienais metais dėl klaidų medicinoje miršta nuo 40 000 iki 98 000 žmonių [49]. Šis pranešimas tapo iššūkiu sveikatos priežiūros sistemai ir sukėlė didelį pacientų, medikų, įvairių organizacijų bei draugijų susirūpinimą tarptautiniu lygmeniu. Asmens sveikatos priežiūros įstaigose įvairių procesų taikymas ir kontrolė, tikėtina, sumažintų klaidų tikimybę sveikatos priežiūros teikiamų paslaugų sferoje.

Pagrindinė klinikinės laboratorijos funkcija yra užtikrinti tyrimų kokybę, tyrimų rezultatų tikslumą bei patikimumą, o tai priklauso nuo daugybės veiksnių [52]. Nustatyta, kad net 70 proc. tyrimų procese aptinkamų klaidų įvyksta iki ištyrimo etapo [30]. Iki ištyrimo etapo įvykę klaidos tai – nepakankamas mėginio tūris, klaidingai pažymėti ar apibūdinti mėginiai, sukrešę ar net apskritai prarasti mėginiai [41]. Viena dažniausių mėginių atmetimo priežasčių yra hemolizuoti mėginiai [15]. Įvykus hemolizei, ląsteliniai komponentai patekę į kraujo plazmą ar serumą gali klaidingai padidinti tam tikrų analizių, tokių kaip kalio, laktatdehidrogenazės (LDH), aspartataminotransferazės (AST) ir kitų, vertes.

Nors hemolizės įtaka įvairioms tiriamosioms analitėms žinoma jau seniai, tačiau nepakanka išsamesnių tyrimų, kokią įtaką skirtingi hemolizės laipsniai gali turėti kraujo krešėjimo sistemos tiriamiems rodikliams.

Šio darbo tikslas - ištirti skirtingų hemolizės laipsnių įtaką dažniausiai atliekamiems kraujo krešėjimo tyrimams.

DARBO TIKSLAS IR UŽDAVINIAI

Darbo tikslas – ištirti skirtingų hemolizės laipsnių įtaką dažniausiai atliekamiems kraujo krešėjimo tyrimams.

Darbo uždaviniai:

1. Nustatyti aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokyčius esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamųjų mėginių kraujo plazmoje;
2. Nustatyti protrombino komplekso (SPA) aktyvumo pokyčius esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamųjų mėginių kraujo plazmoje;
3. Nustatyti fibrinogeno koncentracijos pokyčius esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamųjų mėginių kraujo plazmoje;
4. Nustatyti d – dimerų koncentracijos pokyčius tiriamųjų mėginių kraujo plazmoje esant skirtingiems hemolizės indeksams.

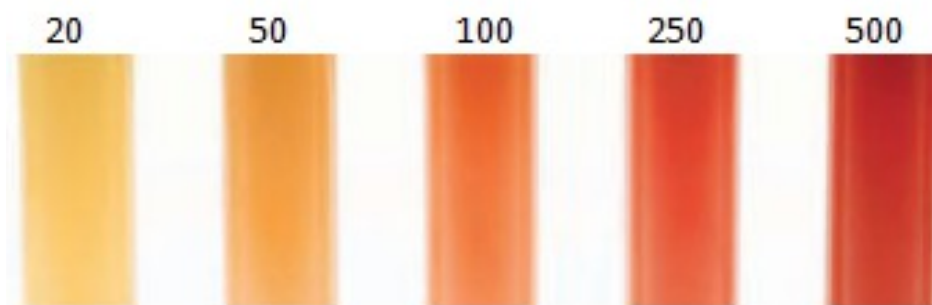
1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1. Hemolizė

1.1.1. Hemolizės samprata ir nustatymas

Hemolizė (*lot.* hemo – kraujas; lysis – išlaužti) – tai hemoglobino ir kitų viduląstelių komponentų patekimas į plazmą, sąlygotas ląstelės – eritrocito – membranos pažeidimo ar plyšimo.

Hemolizė gali būti aptinkama vizualiai. Matoma hemolizė gali būti esant laisvojo hemoglobino koncentracijai kraujo plazmoje ar serume nuo 0,1 iki 0,3 g/L. Esant nurodytoms ir didesnėms laisvojo hemoglobino koncentracijoms tiriamajame mėginyje gali būti matoma silpnai rausvo atspalvio ar ryškiai raudonos spalvos pavidalu. Tokiuose mėginiuose gali būti nuo 0,5 proc. suirusių eritrocitų ir daugiau [47, 7, 50]. Esant mažesnėms laisvo hemoglobino koncentracijoms kraujo plazmoje ar serume nei 0,1 g/L, vizualiniu būdu hemolizės aptikti negalime, tačiau tai nereiškia, jog hemolizės mėginyje nėra.



1 pav. Hemoglobino koncentracija kraujo plazmoje (mg/dL)

(šaltinis: <http://blog.fisherbioservices.com/avoiding-hemolysis-in-blood-sample-collection-and-processing>)

Ilgą laiką hemolizė buvo nustatoma vizualiai, tačiau jau gana seniai žinoma, jog tai yra nepatikimas būdas jai identifikuoti [29].

Vizualinį hemolizės vertinimą indeksais tyrinėjo Hawkins ir kiti. Jų atlikti tyrimai parodė, jog medicinos personalo hemolizės vertinimas vizualiniu būdu, yra nepatikimas būdas hemolizei aptikti, be to, mėginio tipas taip pat gali duoti skirtingus tyrimų rezultatus [31, 19, 52]. Simundic ir kiti atliko tyrimą, kurio metu tyrėjai bandė palyginti hemolizės, ikterijos ir lipemijos nustatymą vizualiniu ir automatiniu būdais. Pagrindinė šio tyrimo išvada ta, jog vizualiai apžiūrint mėginius, ikterijos, lipemijos ir hemolizės aptikimo galimybės yra daug mažesnės negu atliekant automatizuotą vertinimą [45]. Padidėjusi bilirubino koncentracija gali sumažinti tikimybę aptikti hemolizuotus mėginius. Vis dėlto, daugelyje laboratorijų vis dar plačiai naudojamas hemolizuotų mėginių aptikimas ir vertinimas vizualiniu būdu.

Tobulėjant technologijoms bei daugėjant duomenų apie mėginių vertinimo vizualiai trūkumus, laboratorijose vis daugiau diegiama automatizuota vertinimo sistema. Automatizuotos sistemos pritaikymas klinikinėje laboratorijoje turi daug teigiamų pusių: padidėja produktyvumas, sumažėja klaidų skaičius, aptinkami ir mažai hemolizuoti mėginiai, o tai didina tyrimų tikslumą, plačiąja prasme – ir bendrą laboratorijų darbo kokybę [45].

Hemolizėms aptikti atliekamas spektrofotometrija grįstas tyrimas. Spektrofotometriškai hemolizės aptikimas dažniausiai atliekamas 400 – 800 nm bangos ilgyje. Indeksai nustatomi remiantis atliktais spektrofotometrinių matavimų rezultatais bei naudojantis analizatoriuje esančiomis programuotomis formulėmis. Gauti rezultatai yra proporcingi laisvo hemoglobino koncentracijai kraujyje [45]. Laisvas hemoglobinas mėginiuose gali trikdyti vyksti cheminėms reakcijoms, kadangi keičia molinės ekstinkcijos koeficientą. Hemoglobinas labai stipriai absorbuoja 415 nm ilgio bangas. Todėl hemolizės poveikyje didėja absorbcijos intervalas ir tai akivaizdžiai didina tiriamųjų analizių vertes [43, 53]. Tačiau kokybiškiems automatizuotiems tyrimams atlikti būtina standartizacija. Nyderlandų mokslinė grupė pasiūlė hemolizės, lipemijos ir ikterijos paveiktus mėginius vertinti pagal sistemą su nustatytais serumo rodiklių ribinėmis reikšmėmis [42].

Žinoma, jog hemolizės laipsniai, priklausomai nuo laisvo hemoglobino koncentracijos mėginiuose, gali būti įvairūs, todėl nustatomi analizatoriumi ir yra išreiškiami indeksais (1lentelė) [36].

1 lentelė. Hemolizės skirstymas indeksais

Hemolizės indeksas	Laisvo hemoglobino kiekis (mg/dL)	Vizualinis apibūdinimas
Nėra hemolizės	<30	-
1+	≥30	-
2+	≥100	Rausvas
3+	≥200	Raudonas
4+	≥500	Tamsiai raudonas

Vis dėlto, dažniausiai gamintojai atliekamų tyrimų reagentų rinkinių metodikų aprašuose pateikia leistinas, neturinčias poveikio tiriamajai analizei, reikšmes. Literatūroje pateikiama didžiausia leistina laisvo hemoglobino koncentracija plazmoje ir serume skiriasi – plazmoje ≤ 20 mg/L; serume ≤ 50 mg/L [30, 47, 33, 50].

1.1.2. Dažniausiai aptinkamos hemolizę sąlygojančios priežastys

Hemolizę gali sąlygoti ne tik hemoglobino atsipalaidavimas, tačiau ir laikant ėminių netinkamomis sąlygomis iš trombocitų ar granulocitų atsipalaidavę komponentai, kurie sąlygoja kalio ir fosforo klaidingai padidėjusias vertes mėginiuose [30]. Deja, hemolizuotų ėminių, esant ne hemoglobino, o kitų komponentų atsipalaidavimui, vizualiai neaptinkame.

Hemolizė turi įtakos įvairiems klinikinėje laboratorijoje tiriamiesiems rutiniams rodikliams. Pavyzdžiui, esant hemolizei tiriamajame mėginyje AST aktyvumą nustatysime padidėjusį. Aspartataminotransferazės aktyvumas eritrocitų viduje yra apie 40 kartų didesnis negu plazmoje. Hemolizės poveikyje, esant laisvo hemoglobino koncentracijai $> 1,5$ g/L, stebėsime klaidingai padidėjusį aspartataminotransferazės (AST) aktyvumą, nors paciento AST aktyvumas bus nepakitęs. Kalio koncentracija kraujo plazmoje 25 kartus mažesnė negu eritrocituose, todėl esant net vizualiai neaptinkamai hemolizei, jo koncentracija klaidingai padidės. Kalio koncentracijos padidėjimą galime įtarti tiriant viso kraujo mėginius, kuriuose sumažėjusi gliukozės koncentracija (laikant mėginius kambario temperatūroje). O,

pavyzdžiui, bendrojo baltymo tyrimo rezultatai bus padidėję nežymiai, nors hemoglobinas pats yra baltymas. Teigiama, jog geležies padidėjimas nėra reikšmingas, kadangi išėjusi geležis iš ląstelių yra surišama porfirino. Tik labai padidėjusios hemoglobino koncentracijos turi įtakos šlapimo rūgšties sumažėjimui serume [43, 53].

Ne tik nustatytas kalio, laktatdehidrogenazės (LDH), aspartataminotransferazės (AST) koncentracijos padidėjimas, tačiau ir padidėjusi netiesioginio bilirubino koncentracija bei pakilęs retikulocitų indeksas gali būti įvykusios hemolizės žymenimis [53].

Atlikti tyrimai rodo, jog hemolizė gali turėti įtakos keletui krešėjimo sistemos analičių [30]. Tačiau tyrimo rezultatus gali veikti ne laisvas hemoglobinas plazmoje, o daugelis kitų medžiagų, patekusių iš kraujo ląstelių po jų suirimo. Panašu, jog didžiausią reikšmę tyrimo rezultatams turi iš suirusių ląstelių išėję vidiniai komponentai, leukocitų arba trombocitų kiekis [32]. Giuseppe Lippi su kitais tyrėjais nustatė, jog iš suirusių ląstelių išėję vidiniai komponentai turi įtakos protrombino laikui, kuris pailgėja, D – dimerų - padaugėja, aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) 0,9 % sutrumpėja, o fibrinogeno koncentracija plazmoje – sumažėja [34].

Atliekant rutininius tyrimus svarbi pozicija, kurioje pacientas būna, kuomet imamas kraujo ėminys. Giuseppe Lippi su kitais tyrėjais bandė išsiaiškinti, kokią įtaką gali turėti paciento padėtis tiriamosioms kraujo krešėjimo analitėms (ADTL, SPA ir fibrinogenui). Tiriamosios analitės buvo nustatomos pacientams esantiems 20 minutes sėdimose pozicijoje, 25 minutes pusiau gulimoje padėtyje ir 20 minučių gulintiems pacientams. Tyrimo metu pastebėti skirtumai tarp sėdimos ir pusiau gulimos padėties pacientų kraujyje - SPA sumažėjimas ir fibrinogeno koncentracijos padidėjimas. Visų tiriamųjų analičių tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai skyrėsi tarp gulinčių ir pusiau gulomis esančių pacientų. Tyrimas puikiai iliustruoja pozicijos kraujo paėmimo metu svarbą.

Hemolizę gali sąlygoti daug įvairių priežasčių. Svarbios tiek *in vitro*, tiek *in vivo* vykstančios hemolizės, tačiau šioje literatūrinėje apžvalgoje bus apžvelgiamos *in vitro* įvykusios hemolizės priežastys.

Kaip jau minėta, hemolizės gali būti *in vitro* ir *in vivo*. Neskaitant paveldimų, *in vivo* vykstančių hemolizių, labai svarbios yra iki ištyrimo etapo sukeltos hemolizės [39].

Kaip minėta anksčiau, hemolizės sukelti trikdžiai - ne vien tik laisvo hemoglobino, bet ir kitų ląstelės komponentų patekimas į kraujo plazmą ar serumą - skatina kai kurių analičių

padidėjusį aktyvumą arba atvirkščiai – sukliamas skiedimo efektas, analičių aktyvumas mažėja. Be hemoglobino, eritrocitus sudaro baltymai, fermentai, lipidai, angliavandeniai. Daugelis iš jų sąveikauja su tyrime naudojamais reagentais, o tai taip pat sąlygoja netikslūs tyrimo rezultatus [30]. Spektrofotometriniai ar cheminiai trikdžiai analitinio proceso metu lemia iškreiptus rezultatus [33, 34]. Dėl optinės absorbcijos padidėjimo, ypač matuojant 415, 540 ir 570 nm ilgio bangomis, hemoglobinas absorbuoja daug stipriau [45].

Analizuojant tyrimų kokybę paveikti galinčius veiksnius, pastebėta, jog timpos užveržimo laikas, imant tiriamąją medžiagą, gali turėti įtakos hemolizės susidarymui mėgintuvėliuose [36]. Dėl timpos užveržimo, trunkančio ilgiau nei vieną minutę, kalis pereina iš audinių ląstelių į kraują, todėl tai sąlygoja klaidingai padidėjusią kalio koncentraciją kraujyje. Taip pat didėja ir bendro baltymo, aspartataminotransferazės bei bilirubino koncentracijos kraujyje. Tačiau tai tik viena iš daugelio hemolizę galinčių sukelti priežasčių.

Nors literatūros šaltiniai nurodo, jog viena iš iki tyrimo etapo klaidų gali būti mėgintuvėlio maišymas, purtymas, o per intensyvus mėgintuvėlio maišymas gali sukelti ėminio hemolizę [17], tačiau kiti literatūriniai šaltiniai paneigia maišymo/purtymo reikšmę tiriamosioms analitėms. Gabriel Lima – Oliveira su kitais kolegomis paskelbė publikaciją „Effects of vigorous mixing of blood vacuum tubes on laboratory test results“, urioje atlikti mėgintuvėlių purtymo/maišymo testai. Pirmosios tiriamosios grupės ėminiai buvo apverčiami 5 kartus; kitos tiriamosios grupės ėminiai buvo energingai purtomi 2 – 5 sekundes. Tyrimo metu nustatytos vertės 35 biocheminiams rodikliams ir bendrojo kraujo tyrimo rodikliams. Šio atlikto tyrimo rezultatai parodė, jog tarp tiriamųjų grupių statistiškai reikšmingų skirtumų negauta [34].

In vitro hemolizė priklauso nuo mėginių paėmimo ir paruošimo ištyrimui sąlygų. Ypač svarbu adatos parinkimas kraujo ėmimo metu, kaip ir kiek kartų mėgintuvėlis apverčiamas po paėmimo, kiek laiko praėjo po ėminio paėmimo iki nucentrifugavimo. Kai kuriuose šaltiniuose išskiriama 50 priežasčių, sukeliančių hemolizę *in vitro* [2].

Paolo Carraro, Giuseppe Servidio ir Mario Plebani (Paduvos universiteto ligoninės laboratorinės medicinos departamentas) atliko tyrimą, kurio metu nustatė skirtingus hemolizės laipsnius 505 mėginiuose. 64 proc. mėginių laisvo hemoglobino koncentracija kraujo plazmoje buvo <50 mg/l, 31 proc. vidutiniškai hemolizuoti ir 5 proc. mėginių, kuriuose laisvo hemoglobino koncentracija kraujo plazmoje siekė 300 mg/l ir daugiau. Hemoglobino koncentracija kraujyje buvo nustatoma kolorimetriniu metodu [48]. Šių hemolizių sukėlimo

dažniausia priežastis buvo kraujo ėmimo pobūdis: daugiausia hemolizuotų mėginių gauta kraują pritraukiant švirkštu, tai sudarė 30,7 proc. hemolizuotų mėginių, „Peteliške“ imtas kraujas sudarė 20 proc. hemolizuotų mėginių, kraujas paimtas iš intraveninio kateterio – 16,5 proc., o iš infuzinio kateterio – 11, 5 proc. hemolizuotų mėginių. *In vivo* hemolizė, apvertimų skaičius po kraujo paėmimo ir kitos autorių nustatytos priežastys sudarė nedidelę procentinę dalį. Šio tyrimo duomenys parodo kraujo paėmimui naudojamų priemonių svarbą.

Nepakankamas mėgintuvėlio užpildymas – tai dar vienas svarbus veiksnys. Klinikinių ir laboratorijų standartų institutas (angl. *CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute*) rekomenduoja remtis šiuo principu: mėgintuvėliuose turi likti apie ketvirtadalis neužpildytos vietos, kad kraujas galėtų lengvai maišytis su antikoaguliantu. Teigiama, jog mėgintuvėlius reikia užpildyti $\pm 10\%$ nuo nurodyto tūrio, tačiau ši taisyklė netinka kraujo krešėjimo sistemos tyrimams skirtiems mėgintuvėliams. Nepakankamai pripildytas mėgintuvėlis gali klaidingai pailginti protrombino laiko (PT) ir aktyvintojo dalinio trombolastino laiko (ADTL) rezultatus [36].

Vienas svarbesnių veiksnių turinčių įtakos hemolizės susidarymui – tai temperatūros pokyčiai. Kuomet tiriamieji mėginiai gabenami į laboratoriją, gali praeiti nemažai laiko. Esant žemoms temperatūroms, kraujo ėminiuose gali susidaryti vandens kristalai, kurie ardo eritrocitų membraną, o tokie mėginiai, įvykus ląstelių lizei, užteršiami hemoglobinu ir yra nebetinkami tyrimams atlikti [46].

Kai hemolizuoti mėginiai atvežami į laboratoriją, galima paprašyti naujo mėginio, tačiau atlikto tyrimo duomenimis apie 30 % apklaustųjų laboratorijos specialistų niekada arba retai prašo naujo mėginio, jeigu mėginys silpnai ar nežymiai hemolizuotas [41, 45]. Naujo mėginio užsakymas galėtų būti geriausias sprendimas, tačiau ne visada įmanoma tai atlikti.

Galimi ir kiti veiksniai, galintys sukelti eritrocitų hemolizę – tai rankų venų trapumas, adatos pozicija bei dydis, netinkamo mėgintuvėlio pasirinkimas, hematomo. Imant viso kraujo mėginius gali susidaryti turbulentinis kraujo judėjimas, kuris sąlygoja eritrocitų plyšimą bei hemolizę [39]. Hemolizę paskatinti gali ir mėginio nucentrifugavimas dar neįvykus pilnam sukresėjimui [53].

Kadangi apie 70 % klinikinių sprendimų yra priimama remiantis laboratorinių tyrimų rezultatais, todėl be galo svarbu išvengti klaidų, kurios sąlygotų neteisingus medicinos personalo sprendimus ir taip tiesiogiai pakenktų pacientų sveikatai [28, 41, 45].

Tad nors hemolizės įtaka įvairioms tiriamosioms analitėms žinoma jau seniai, tačiau vis dar trūksta išsamesnių tyrimų, kokią įtaką skirtingi hemolizės lygiai gali turėti kraujo krešėjimo sistemos tiriamiems rodikliams. Aktualu ir tai, kokiems hemolizės indeksams esant, tiriamųjų mėginių kokybė nenukenčia ir gali būti naudojami kaip patikimi rodikliai, kliniciams priimant svarbius klinikinius sprendimus.

1.2.Kraujo krešėjimas

1.2.1.Kraujo krešėjimo samprata

Kraujas yra specializuotas skystas jungiamasis audinys, sudarytas iš kraujo plazmos ir joje esančių kraujo ląstelių: eritrocitų (raudonųjų kraujo kūnelių), leukocitų (baltųjų kraujo kūnelių) bei trombocitų (kraujo plokštelių). Kraujo ląstelės sudaro 37 proc. – 54 proc. viso kraujo tūrio. Likusią kraujo tūrio dalį sudaro kraujo plazma [42]. Kraujo plazma pasižymi daugeliu savybių, tačiau viena svarbiausių – apsauginė. Dėka kraujo plazmos gebėjimo krešėti - žmogus mirtinai nenukraujuoja.

Kraujo krešėjimas - organizmo gynybinės sistemos dalis [5]. Tai sudėtinga sistema, kuri veikianti dvejopai - kraujagyslėse palaiko skystą formą, o patekus į išorę – sukreša [8].

Kraujo krešėjimas nevyktų be tam tikrų kraujavimo stabdymo sistemos elementų. T1ai audiniai, kraujagyslės sienelė, trombocitai bei krešėjimo faktoriai bei fibrinolizės sistema [25,40]. Balansas tarp kraujavimo stabdymo, susidarant krešuliui, ir fibrinolizės, vadinamas hemostaze [48]. Krešėjimo procesus gali paveikti kraujo krešėjimą skatinantys ir slopinantys veiksniai (2 lentelė).

2 lentelė. Krešėjimą skatinantys ir slopinantys veiksniai

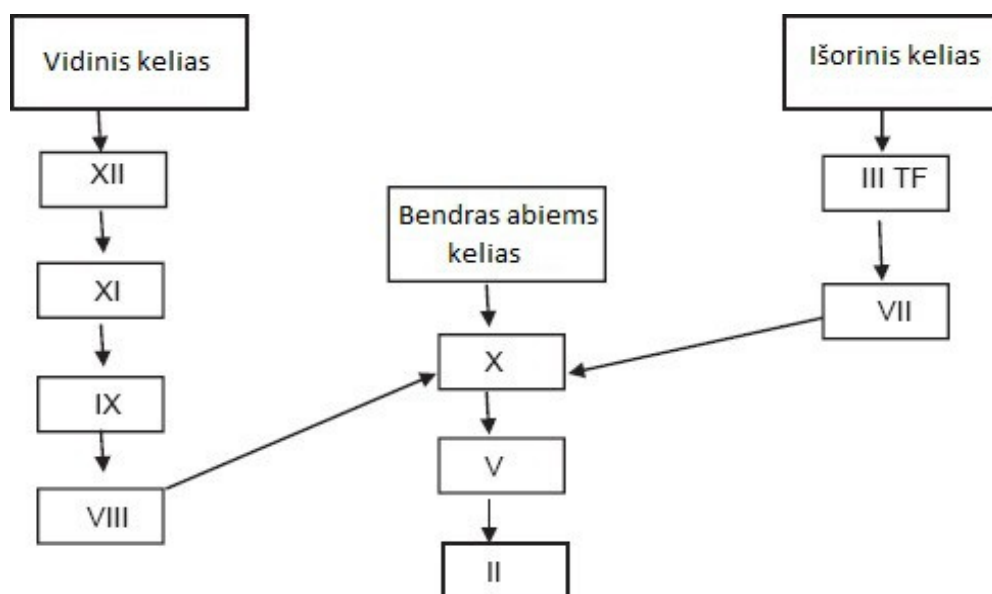
(šaltinis: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260295/table/T1/>)

Vieta	Krešėjimą skatina	Krešėjimą slopina
Kraujagyslės sienelė	Pažeistas endotelis	Heparinas
	TF	Trombomodulinas
	Kolagenas	Audinių plazminogeno aktyviklis
Cirkuliuojantys elementai	Trombocitai	Antitrombinas
	Trombocitus aktyvinantis faktorius	C ir S baltymai
	Protrombinas	Plazminogenas
	Fibrinogenas	
	vWF	

Dauguma kraujo krešėjime dalyvaujančių faktorių yra baltymai. Šie baltymai yra sintetinami kepenyse, o kai kurių faktorių sintezei yra reikalingas K vitaminas (II, VII, IX, X faktoriai, C, S baltymai) [26].

1964 metais D. Macfarlane ir E. Davie suformulavo kraujo plazmos krešėjimo kaskados teoriją [26]. Manyta, jog kraujo plazmos krešėjimas vyksta dviem keliais – vidiniu ir išoriniu, kurie abu skatina X krešėjimo faktorių, taip inicijuodami bendro abiemis kelio aktyvavimą.

Išorinis kelias laikomas pirmu homeostazės etapu, tarpininkaujant plazmai; pažeistas endotelis atpalaiduoja audinių faktorių [14]. Vidinis kelias yra lygiagretus trombino aktyvavimo būdas, atpalaiduojant XII krešėjimo faktorių (2pav.)

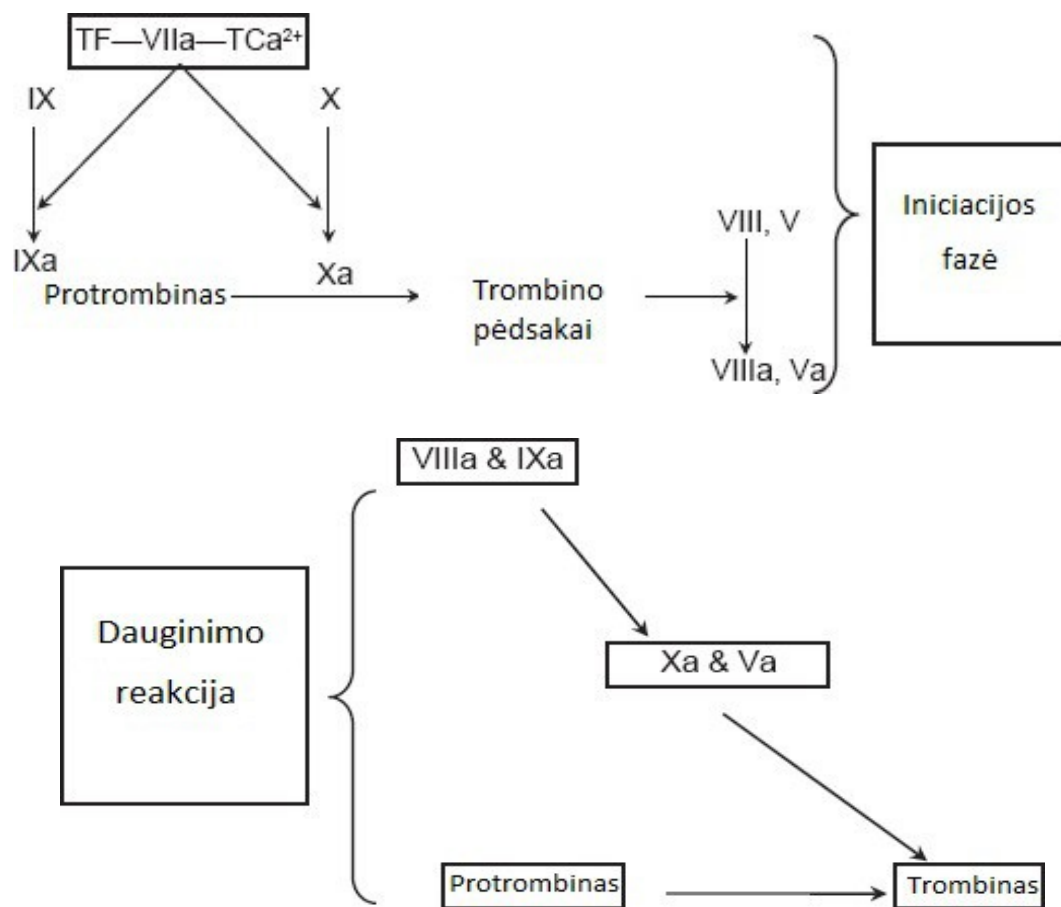


2 pav. Kraujo plazmos krešėjimo schema

(šaltinis: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260295/figure/F1/>)

Šiuo metu kai kurie autoriai pateikia naujesnį krešėjimo proceso modelį, kurį sudaro trys etapai. Tai iniciacijos reakcijos, amplifikacijos (dauginimo/sklidimo fazė) reakcijos ir stabilizacija (3 pav.) [40, 28]. Iniciacijos metu išskiriamas audinių faktorius pažeistose kraujagyslėse, jis sąveikauja su VII a faktoriumi, o tai aktyvina IX ir X faktorius. Amplifikacijos metu pirmojo etapo metu susidaręs trombinas aktyvina V ir VIII faktorius. Šie veikdami kaip kofaktoriai ir aktyvina IX ir X faktorius, skatinamas trombocitų aktyvinimas. Stabilizacijos metu dėl padidėjusio trombino kiekio yra aktyvinamas XIII faktorius, kuris

sąlygoja fibrino stabilumą bei stiprumą sujungdamas fibrino polimerus kovalentiniais ryšiais [22].



3 pav. Krešėjimo sistemos modelis

(šaltinis: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4260295/figure/F2/>)

Dažniausiai krešėjimo procesas reguliuojamas keleto komponentų, kurie riboja krešulio formavimąsi, taip mažindami trombozių tikimybę [40]. Tačiau dėl tam tikrų kraujo krešėjimo sutrikimų gali prasidėti kraujavimai dėl menkiausių priežasčių [26]. Todėl aktyvinami krešėjimą skatinantys komponentai. Invazinės procedūros, traumos, citokinai ar infekcijos gali sukelti kraujo krešėjimo disbalansą, o hipoksija, hipotermija, metabolinė acidozė tik pablogina situaciją [5].

1.2.2. Kraujo krešėjimo etapai

Kraujo krešėjimo procesas vyksta keliais etapais. Pirmasis iš jų – pirminė hemostazė. Fiziologiškai sveikame organizme, dinaminė pusiausvyra išsilaiko tarp aktyvinamųjų ir

slopinamųjų hemostazės mechanizmų, trombocitų adhezija slopinama NO, PGI₂ bei kraujo srovės [25, 43]. Pirminė hemostazė, dalyvaujant kraujagyslės sienelai, trombocitams bei kai kuriems plazmos baltymams, prasideda iš karto įvykus pažeidimui. Tuoj pat po pažeidimo kraujagyslė susitraukia – įvyksta vazokonstrikcija, toliau pirminės hemostazės metu dalyvaujantys trombocitai pakinta morfologiškai ir biochemiškai – jie aktyvinami trombocitų agregavimą skatinančiomis medžiagomis - tai kolagenas, trombinas, adenzindifosfatas (ADP), azoto oksidas (NO), o trombocitų agregacijai įvykus, ji stabdoma veikiant prostaciklinams PGI₁, PGI₂ [43]. Tokie suaktyvinti trombocitai išskiria adrenalina, serotoniną, trombocitų faktorius, paveikiamas kraujagyslių endotelis. Esant didesniems pažeidimams- vyksta trombocitų adhezija prie subendotelinių jungiamojo audinio elementų. Toks procesas nevyktų be adhezijos molekulių ir trombocitų receptorių. Adhezijos molekulės – tai adhezijos baltymai – fibrinogenas ir von Willebrand‘o faktorius (vWF). Von Willebrand‘ o faktorius yra glikoproteinas esantis kraujo plazmoje, gaminamas megakariocitų, endotelyje ir subendotelyje [40]. Von Willebrand‘o faktorius jungiasi prie trombocitų membranose esančių receptorių ir taip perneša VIII faktorių į pažeidimo vietą. Galiausiai įvyksta negrįžtamoji agregacija, tai yra, išskiriamos trombocitų agregavimą skatinančios medžiagos, tokios kaip tromboksanas A₂, serotoninas, adenzindifosfatas (ADP), adenzintrifosfatas (ATP), serotoninas, kurių poveikyje susidaro trombocitų kamštis, taip laikinai mažindamas kraujagyslės pažeidimą [40].

Pirminė hemostazė trunka apie 3 – 5 minutes. Pažymėtina, jog trombocitų adhezija sumažėja sergant tokiomis ligomis kaip idiopatinė trombocitopeninė purpura (ITP), makroglobulinemija, esant įgimtai trombocitopatijai, uremijai bei mielominei ligai [6, 2, 11]. Trombocitų agregaciją gali slopinti ir įvairių medikamentų vartojimas, pavyzdžiui, aspirinas, kortikosteroidai, antihistamininiai preparatai, diazepamai, kokainas, ibuprofenas, dipiridamolas, pirimidino dariniai, β laktaminiai antibiotikai. Tačiau trombocitų agregacija gali ir didėti. Trombocitų agregaciją skatina gliukozės koncentracijos sumažėjimas kraujyje bei padidėjusios kortizolio, somatotropinio hormono (STH), prolaktino koncentracijos kraujyje [1, 6].

Antrasis kraujo krešėjimo proceso etapas – antrinė hemostazė. Antrinė hemostazė aktyvinama tuomet, kai pažeidimas yra didesnis negu pirminės hemostazės metu. Antrinės hemostazės galutinis rezultatas – netirpaus kraujo baltymo fibrino susidarymas [26]. Tai pati svarbiausia krešėjimo procese vykstanti trombino katalizuojama reakcija. Šio antrojo kraujo krešėjimo proceso metu aktyvinami krešėjimo faktoriai veikiantys kaskados principu. Kraujo krešėjimo metu plazmoje esantys neaktyvūs faktoriai yra aktyvinami vienas po kito [5].

Krešėjimo kaskadą inicijuoja XII (Hagemano) faktorius arba VII faktorius. Kraujo krešėjimo kaskada gali veikti per vidinį ir išorinį kelius, taip pat gali veikti ir per bendru abiemis keliams būdu. Visais išvardintais atvejais susidaro X, V faktorių ir kalcio kompleksas, dar vadinamas protrombinaze. Susidaręs protrombinazės kompleksas protrombiną – II faktorių – verčia aktyviu trombinu – II a faktoriumi, kuris veikia fibrinogeną – I faktorių, taip sudarymas netirpų baltymą fibriną. Fibrino susidarymu yra baigiama antrinė hemostazė [43]. Tokiu būdu gali būti atliekami ADTL, SPA tyrimai.

Antrinė hemostazė trunka apie keletą minučių. Per kelias minutes aktyvinama ir fibrinolizė, taip pat ir trombolizė, taip skatinamas krešulio suardymas [25].

Antrinės hemostazės metu susidaręs krešulys sustabdo kraujavimą, tačiau galiausiai krešulys turi būti pašalintas, antraip sutriktų kraujotaka. Šiuo atveju aktyvinama fibrinolizės sistema [26].

Fibrinolizė - tai fermentinė sistema, kuri, fermento plazmino įtakoje, išardo fibrino peptidinius ryšius, hidrolizuoja krešulį. fermento plazmino pagalba ištirpdo krešulį. Fibrinolizės sistema svarbi ne vien dėl to, jog ištirpdo krešulį, ji taip pat atnaujina kraujotaką bei kraujagyslės vientisumą. Čia veikia plazminogenas, kuris veikiamas plazminogeno aktyvatoriaus (t - PA) arba urokinazės plazminogeno aktyvatoriaus u-PA, esančio kraujagyslių endotelyje, virsta plazminu [40]. Plazminas suskaido fibrine esančius peptidinius ryšius, hidrolizuojamas krešulys bei fibrinogenas, susidarant fibrinogeno ir fibrino degradacijos produktams. Susidarę fibrinogeno ir fibrino degradacijos produktai (FDP) slopina fibrino antikoaguliacines savybes – tai nuslopina fibrino polimerizaciją bei inaktyvina trombiną [25]. Fibrinolizės sistemos aktyvumas *In vivo* yra įvertinamas kliniškai nustatant fibrino ir fibrinogeno degradacijos produktus (FDP) [9].

Tipiniais fibrino degradacijos produktais laikomi D dimerai. Jie sudaryti iš dviejų fibrinogeno molekulių D fragmentų, kurie sujungti γ grandinės liekanų [25]. D dimerai yra antrinės hiperfibrinolizės žymenys, gali būti naudojami plaučių embolijos, DIK, giliųjų venų trombozės diagnostikoje [10, 26]. D – dimerų koncentracija kraujo plazmoje neturėtų viršyti 0, 50 $\mu\text{g/ml}$.

2. TYRIMO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Tyrimo objektas

Tyrimas atliktas Vilniaus universiteto Medicinos fakulteto Fiziologijos, biochemijos, mikrobiologijos ir laboratorinės medicinos katedros praktiniame padalinyje – Vilniaus universiteto ligoninės Santaros klinikų Laboratorinės medicinos centro (VUL SK LMC) Biochemijos laboratorijoje.

Tyrimams atlikti buvo sudarytos keturios tiriamosios grupės: pradinio matavimo ir keturių skirtingų hemolizės laipsnių (hemolizės indeksų 1+, 2+, 3+, 4+) poveikyje (3 lentelė).

3 lentelė. Bandymų schema

Grupės Nr.	Grupės paskirtis	Hemolizės indeksas	Naudoto hemolizuojančio tirpalo tūris (μl)	Mėginių skaičius
1	Pradiniai matavimai	-	-	160
2	1 tiriamoji	1+	5	40
3	2 tiriamoji	2+	12,5	40
4	3 tiriamoji	3+	25	40
5	4 tiriamoji	4+	60	40

Tyrimams pasirinktos analitės: protrombino komplekso aktyvumas (SPA), aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL), fibrinogenas ir D - dimerai.

Krešėjimo analitės buvo nustatomos STA Compact[®] (Diagnostica Stago, France) analizatoriumi. Hemolizės indeksai nustatyti Architect[®] c8000 (Abbott Park, Illinois, JAV) analizatoriumi.

Tyrimo metu atlikta 2080 matavimų – 640 hemolizės indeksams nustatyti ir 1440 krešėjimo analitėms įvertinti. Viso ištirtų mėginių - 160.

Tyrimas atliktas 2017 metais.

2.2. Tiriamojo mėginio paruošimas

Tiriamiesiems mėginiams paruošti buvo naudojami rutininiais krešėjimo tyrimams paimti kraujo likučiai. Pakankamiems mėginio tūriams gauti buvo maišomi skirtingų pacientų kraujo mėginių likučiai, turintys vienodas tiriamųjų analizių vertes.

Vienam tiriamajam mėginiui gauti naudoti dviejų pacientų kraujo likučiai. Mėginių kraujo likučiai buvo homogeniškai išmaišyti ir nucentrifuguojami 10 min. 3000 g. Iš tokiu būdu paruošto kraujo mėginio nustatėme pradinius - protrombino komplekso aktyvumą (SPA), aktyvintąjį dalinį tromboplastino laiką (ADTL), fibrinogeno bei D – dimerų koncentracijas kraujo plazmoje.

2.3. Hemolizės sukėlimas tiriamajame mėginyje

Homogeniškai išmaišytas tiriamasis mėginys padalintas po 1000 μ l į 4 Eppendorf tipo mėgintuvėlius. Skirtingo laipsnio hemolizei mėginiuose sukelti buvo naudojamas ląstelių struktūrą ardantis - lizuojantis tirpalas (angl. *ARCHITECT Cyclosporine Whole Blood Precipitation Reagent*) skirtingais tūriais mėgintuvėliuose (3 lentelė).

2.4. Tyrimo metodai

Aktyvintajam daliniam tromboplastino laikui (ADTL), protrombino komplekso (SPA) ir fibrinogeno nustatymui taikytas chronometrinių tyrimų matavimo principas – elektromagnetinė klampumo kitimo krešulio detekcija. Klampumo pokytis nustatomas elektromagnetinių sensorių pagalba. Naudojamos specialios kiuvetės, kuriose esantis plieno rutuliukas juda veikiamas dviejų aktyvuotų spiralių. Rutuliukas juda į kairę – dešinę, kol galiausiai sustoja. Šio judėjimo amplitudę fiksuoja chronometras.

Protrombino komplekso (SPA) tyrimo principą sudaro krešėjimo laiko matavimas, esant faktorių pertekliui, išskyrus II, VII ir X faktorius, kurie yra gaunami iš tiriamosios plazmos.

Tyrimui atlikti naudoti šie reagentai:

1. Triušio smegenų audinių ir jaučio plazmos tromboplastino mišinys, kuriame nėra II, VII ir X faktorių, jaučio plazmoje yra fibrinogeno ir V faktoriaus - jie reikalingi, kad vyktų reakcija;

2. STA[®] - CaCl₂ 0,025 mol/l;
3. STA[®] - Owren-Koller buferis;
4. STA[®] - Routine Control N+P kokybės kontrolei atlikti.

Aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) tai bendras krešėjimo sistemos aktyvumo atrankinis tyrimas, įvertinantis XII, XI, X, IX, VIII, V, II krešėjimo faktorių ir fibrinogeno aktyvumą kraujo plazmoje. ADTL tyrimas STA[®] analizatoriais atliekamas remiantis gamintojo nurodytu Langdell R. D. *et al* ir Larrieu M. J., Weiland C metodu []. ADTL sąlygoja plazmos rekalcifikaciją dalyvaujant standartizuotam kefalino kiekiui (trombocitų pakaitalui) ir siliciui. Tokiu būdu įvertinamas XII, XI, X, IX, VIII, V, II, I faktorių aktyvumas. Trombocitų aktyvumas nevertinamas.

Tyrimui atlikti naudojami šie reagentai:

1. STA[®] - PTT. Reagentas pagamintas iš triušių smegenų audinio, sudėtyje turi kefalino bei silicio buferinėje terpėje. Paruošimas naudojimui: reagentas sumaišomas su 5 ml distiliuoto vandens ir paliekamas 30 minučių kambario temperatūroje (18 – 25^o C). Homogeniškam tirpalui gauti, buteliukas apverčiamas 5 – 10 kartų.

1. STA[®] - CaCl₂ 0,025 mol/l;
2. STA[®] - STA[®] -. Routine Control N+P kokybės kontrolei atlikti.

Fibrinogenas nustatomas STA analizatoriumi, Klauso (*angl.* Clauss) metodu. Tyrimo principas - skiestos plazmos krešėjimo laikas tiesiogiai priklauso nuo fibrinogeno koncentracijos plazmoje.

Tyrimui atlikti naudojamo reagentai:

1. STA[®] – Fibrinogen;
2. STA[®] - Owren-Koller;
3. STA[®] -. Routine Control N+P kokybės kontrolei atlikti.

D – dimerų koncentracijai kraujo plazmoje nustatyti taikytas imunoturbidimetrinis metodas. Tyrimo principas paremtas mikrodalelių suspensijos drumstumo pakitimu, kuris atsiranda, kai latekso mikrodalelių suspensija yra sumaišoma su tiriamąja plazma. Vykstant antikūno – antigeno reakcijai, įvyksta latekso mikrodalelių agliutinacija, kuri didina reakcijos terpės drumstumą. Drumstumo padidėjimas yra išmatuojamas fotometriškai, taikomas bichromatinis optinio tankio matavimas, esant atitinkamai 405 nm ir 540 nm bangų ilgiams.

Tyrimui atlikti naudoti šie reagentai:

1. TRIS buferis;

2. Mikrolatekso dalelių, padengtų dviem skirtingais pelės monokloniniais antikūnais prieš žmogaus D – dimerus, stabilizuota suspensija su jaučio albuminu;
3. STA[®] - Owren-Koller;
4. STA[®] - Liatest Control N + P kokybės kontrolei atlikti.

Hemolizės indeksų nustatymas mėginiuose atliktas spektrofotometriniu metodu naudojant 340 nm ilgio bangas. Analizatorius atlieka 4 – 5 matavimus, iš kurių tyrimo rezultatuose pateikiamas vidurkis. Skirtingo laipsnio hemolizės skirstomos atitinkamais indeksais, atsižvelgiant į laisvo hemoglobino koncentraciją, esančią tiriamojoje kraujo plazmoje, pavaizduotas 1 lentelėje.

2.5. Tyrimo duomenų analizei taikyti metodai

Tyrimo duomenų statistinė analizė atlikta naudojant RStudio statistinį paketą RStudio 1.0.143 versija. Šapiro – Wilko (*angl.* Shapiro –Wilk test) testas taikytas patikrinimui, ar duomenys pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį, duomenys laikomi pasiskirstę pagal normalųjį skirstinį esant $p > \alpha$ reikšmėms. Netenkinant normalumo sąlygos, taikytas Vilkoksono (*angl.* Wilcoxon) testas priklausomoms imtims. Duomenys statistiškai reikšmingai skiriasi esant $p < \alpha$ prielaidai. Porinis t kriterijus (*angl.* Paired t-test) taikytas tyrimo rezultatų analizei taikytas tyrimo rezultatų analizei tarp grupių. Tyrimo duomenų skirtumai imtyse laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$. Tyrimo duomenų koreliacijai patvirtinti ar atmesti atliktas Pirsono (*angl.* Pearson) ir Spirmeno (*angl.* Spearman) koreliacijos koeficientų skaičiavimas.

Matematiniams skaičiavimams atlikti naudota Microsoft Excel programa.

3. TYRIMO REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

3.1. Hemolizės įtaka protrombino komplekso (SPA) aktyvumui

Siekiant ištirti skirtingo hemolizės laipsnio įtaką protrombino komplekso (SPA) aktyvumui kraujo plazmoje, ištirta 40 mėginių. Skirtingų laipsnių hemolizuotuose mėginiuose SPA matavimai buvo atliekami du kartus, iš kurių apskaičiuotas vidurkis.

Iš viso atlikta 520 matavimų: 40 matavimų pradiniam protrombino komplekso (SPA) aktyvumo nustatymui, 80 matavimų stebint protrombino komplekso aktyvumą hemolizės poveikyje esant 1+ indeksui, 80 matavimų stebint protrombino komplekso aktyvumą hemolizės poveikyje esant 2+ indeksui, 80 matavimų stebint protrombino komplekso aktyvumą hemolizės poveikyje esant 3+ indeksui ir 80 matavimų stebint protrombino komplekso aktyvumą hemolizės poveikyje esant 4+ indeksui. Hemolizės indeksų nustatymui atlikta 160 matavimų.

Apskaičiuoti vidurkiai tiriamose grupėse: pradinių duomenų – 73, 78%±32,456%; esant 1+ hemolizės indeksui - 69,99%±29,775%; esant 2+ hemolizės indeksui - 66,28%±34,024%; esant 3+ hemolizės indeksui – 63,31%±27,104%; esant 4+ hemolizės indeksui - 64,51%±40,630%, rodo, jog hemolizės poveikyje tiriamosios analizės aktyvumas pakito, t.y., mažėjo, palyginti su pradiniais duomenimis (4 lentelė; 4 pav.).

Atliekant tyrimo duomenų statistinę analizę, paaiškėjo, jog gauti tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai skiriasi tarp lyginamų grupių, t.y., skirtingi hemolizės laipsniai, vertinami hemolizės indeksais (1+, 2+, 3+, 4+), turi įtakos tiriamosios analizės – protrombino komplekso (SPA) - aktyvumui kraujo plazmoje (4 lentelė).

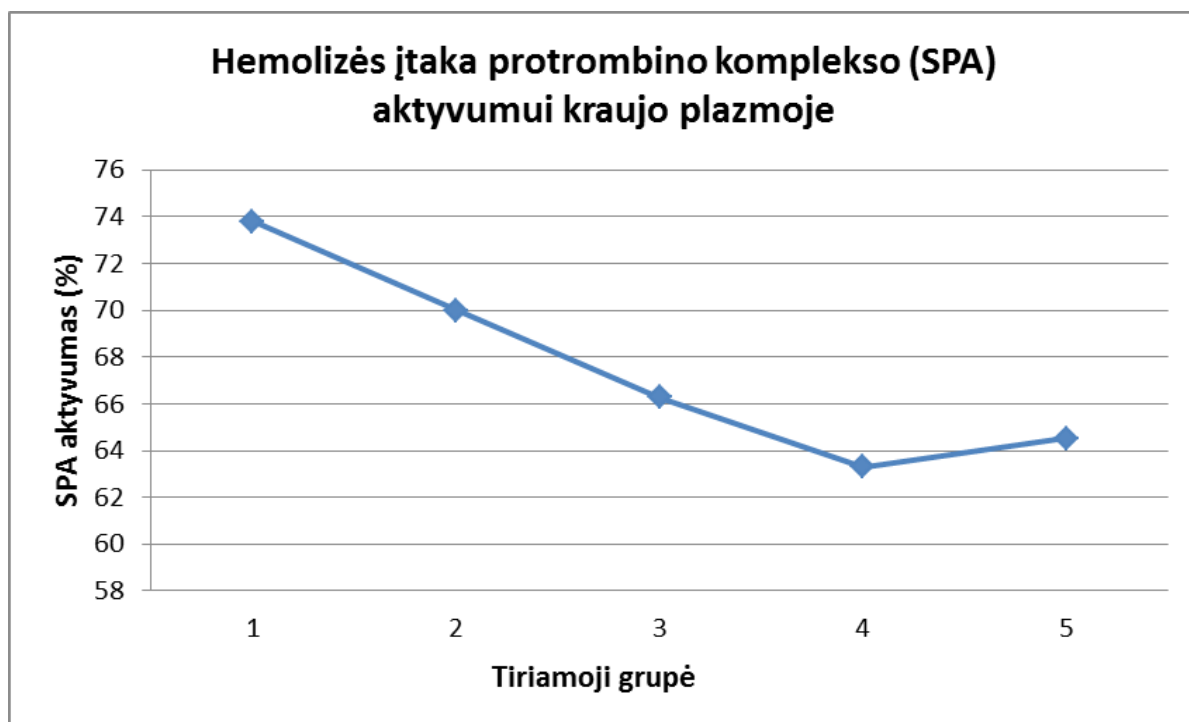
4 lentelė. Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo aprašomoji statistika

Grupės nr.	Hemolizės indeksas	N	Vidurkis (%)	p-reikšmė	Dispersija (s ²)	Standartinis nuokrypis (SD)	Standartinė paklaida (SE)
Pradiniai duomenys	-	40	73,78	0,3885	1053,435	32,456	5,132
1 (tiriamoji)	1+	40	69,99	0,0105	886,570	29,775	4,708
2 (tiriamoji)	2+	40	66,28	<0,0001	1157,640	34,024	5,379
3 (tiriamoji)	3+	40	63,31	<0,0001	734,649	27,104	4,286

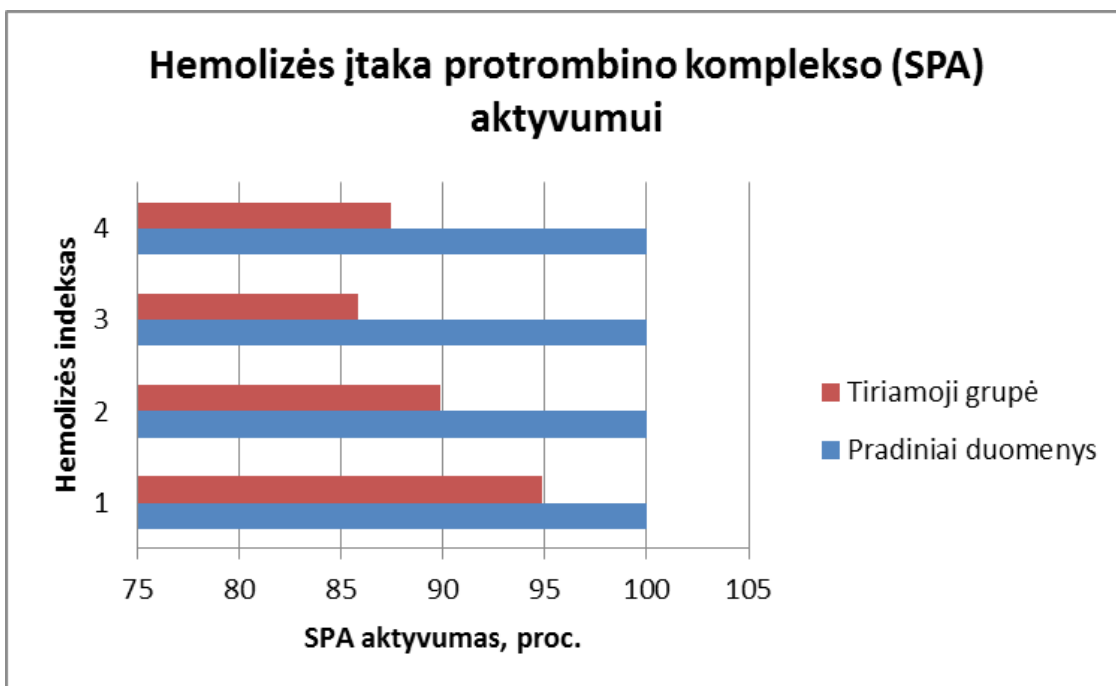
4 (tiriamoji)	4+	40	64,51	<0,0001	1650,826	40,630	6,424
------------------	----	----	-------	---------	----------	--------	-------

*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$

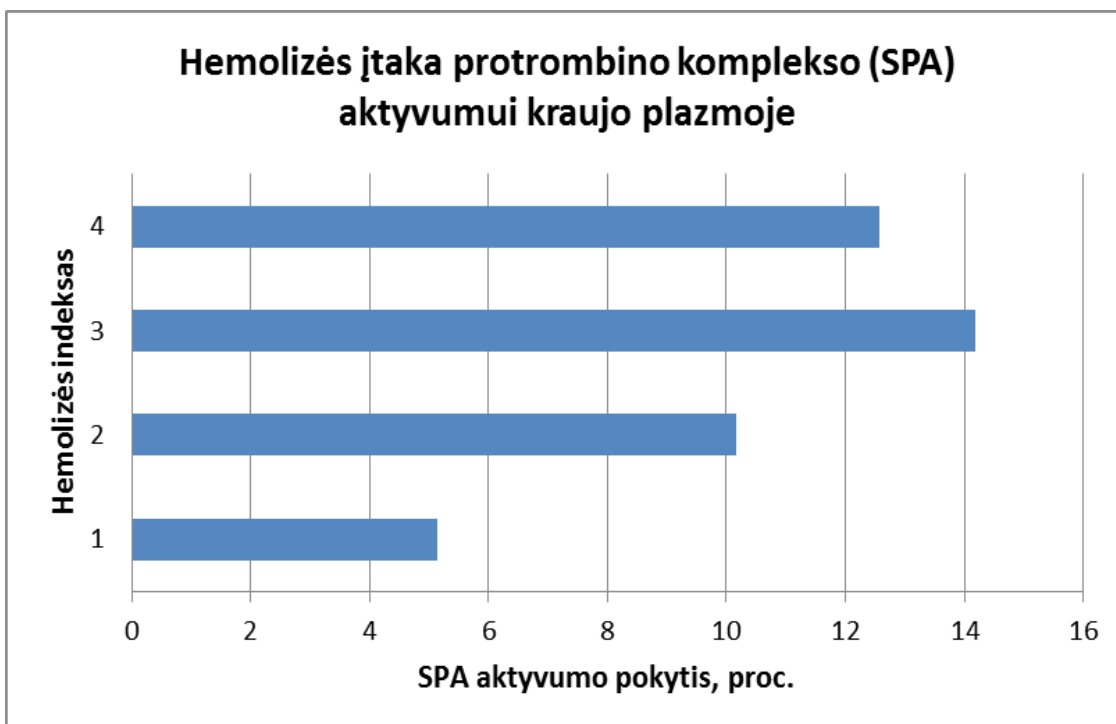
Esant hemolizės indeksui 1+ tiriamajame mėginyje protrombino komplekso (SPA) aktyvumas buvo 69,98 %, t.y., pakito vidutiniškai 5,17 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis. Hemolizės indeksu 2+ poveikyje protrombino komplekso (SPA) aktyvumas buvo 66,28 %, t.y., vidutiniškai pakito 10,17 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis. Esant hemolizės indeksui 3+, tiriamajame mėginyje protrombino komplekso (SPA) aktyvumas buvo 63,31 %, t. y., sumažėjo 14,19 proc. ($p < 0,05$), o hemolizės indeksu 4+ poveikyje – 64,51 %, arba 12,56 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis (4, 5, 6 pav.).



4 pav. Hemolizės įtaka protrombino komplekso (SPA) aktyvumui kraujo plazmoje



5 pav. Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo pokyčiai tarp pradinių ir skirtingo laipsnio hemolizuotų mėginių



6 pav. Protrombino komplekso (SPA) aktyvumo pokyčių procentinė išraiška

Gauti statistinės analizės rezultatai rodo, jog tyrimo kintamieji koreliuoja. Apskaičiuoti koreliacijos koeficientai pateikiami 5 lentelėje.

5 lentelė. Koreliacijos matrica tarp kintamųjų

Hemolizės indeksas	p-reikšmė	PI (95%)	Koreliacijos koeficientas
1+	<0,0001	0,931;0,980	0,963
2+	<0,0001	0,807; 0,943	0,894
3+	<0,0001	0,962; 0,989	0,979
4+	<0,0001	0,717; 0,913	0,841

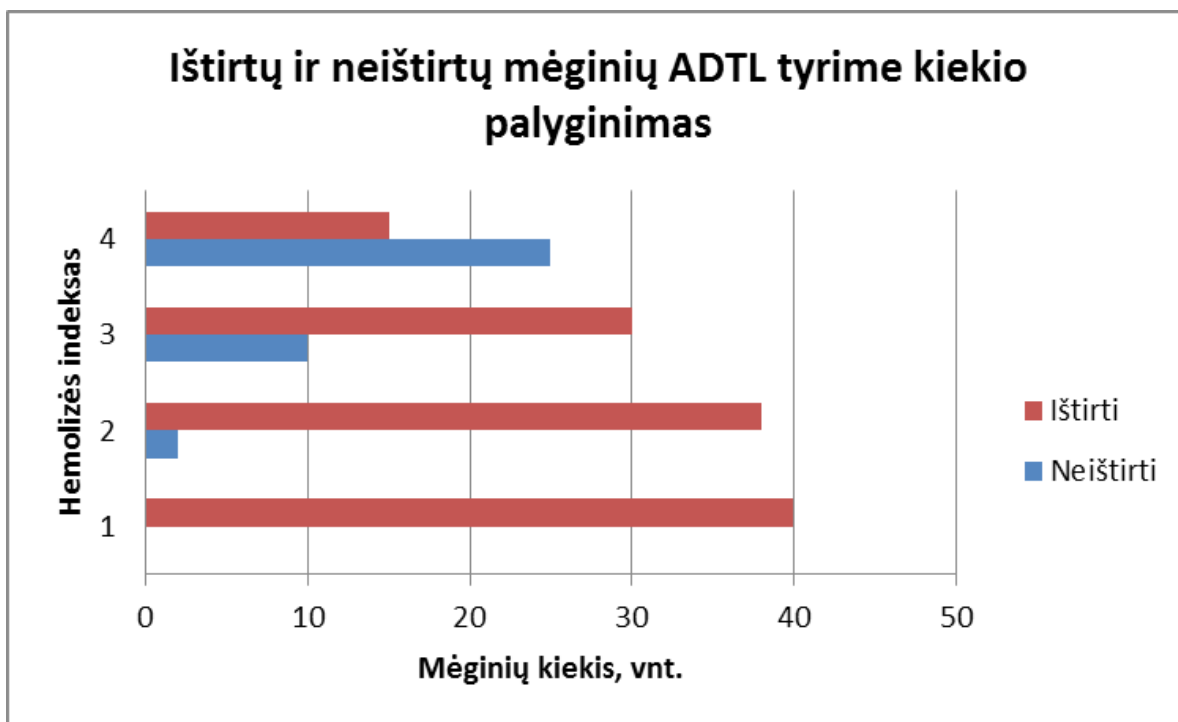
*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$

4.2. Hemolizės įtaka aktyvintojo dalinio tromboplastino laikui (ADTL) kraujo plazmoje

Siekiant nustatyti skirtingų hemolizės indeksų poveikį aktyvintojo dalinio tromboplastino laikui (ADTL) kraujo plazmoje, ištirta 40 mėginių. Iš viso atlikta 520 matavimų: 40 matavimų pradiniam aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) nustatymui, 80 matavimų stebint aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokytį hemolizės poveikyje esant 1+ indeksui, 80 matavimų stebint aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokytį hemolizės poveikyje esant 2+ indeksui, 80 matavimų aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokytį hemolizės poveikyje esant 3+ indeksui ir 80 matavimų stebint aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokytį hemolizės poveikyje esant 4+ indeksui.

Skirtingų laipsnių hemolizuotuose mėginiuose ADTL tyrimai buvo atliekami du kartus, iš kurių išvestas vidurkis. Iš viso hemolizės laipsnio nustatymui atlikta 160 matavimų.

Svarbu pažymėti, kad prie tam tikrų hemolizės indeksų tiriamosios analizės aktyvumo nustatyti nepavyko, ADTL vertės nustatytos 38 mėginiuose esant 2+ hemolizuotiems mėginiams, 30 mėginių 3+ hemolizuotiems mėginiams, 15 mėginių 4+ hemolizuotiems mėginiams (7 pav.).



7 pav. ADTL mėginių ištiriamumo vaizdinė išraiška

Apskaičiuoti vidurkiai tiriamose grupėse: pradinių duomenų – $41,70s \pm 6,97s$; esant 1+ hemolizės indeksui – $43,10s \pm 10,41s$; esant 2+ hemolizės indeksui – $44,40s \pm 9,62s$; esant 3+ hemolizės indeksui – $37,10s \pm 9,33s$; esant 4+ hemolizės indeksui – $31,70s \pm 15,14s$.

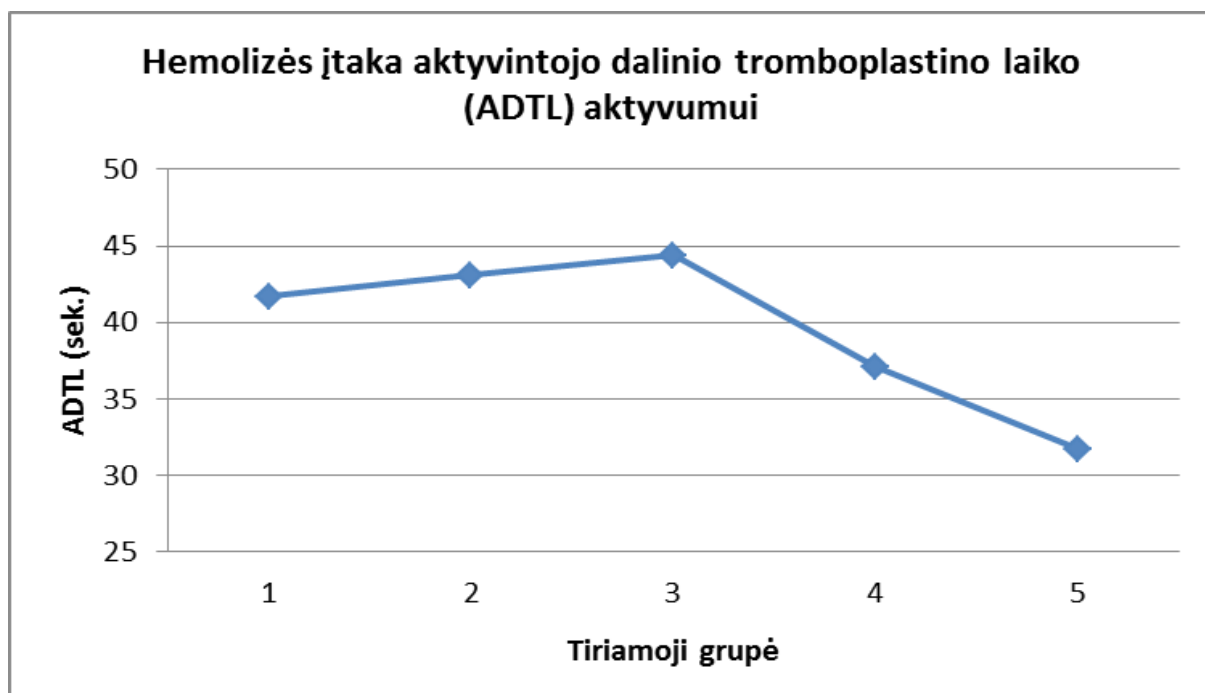
Iš apskaičiuotų vidurkių matome, jog hemolizės poveikyje tiriamosios analizės aktyvumas pakito, t.y., didėjo prie 1+ ir 2+ hemolizių, o prie 3+ ir 4+ hemolizių - mažėjo, palyginti su kontroline grupe (6 lentelė; 8 pav.).

6 lentelė. Aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) aprašomoji charakteristika

Grupės nr.	Hemolizės indeksas	N	Vidurkis (s)	p-reiškė	Dispersija (s^2)	Standartinis nuokrypis (SD)	Standartinė paklaida (SE)
Pradiniai duomenys	-	40	41,70	0,322	48,531	6,97	1,115
1 (tiriamoji)	+1	40	43,10	0,146	108,308	10,41	1,646
2 (tiriamoji)	+2	38	44,40	0,071	92,583	9,62	1,561
3 (tiriamoji)	+3	30	37,10	0,345	80,414	9,33	1,704

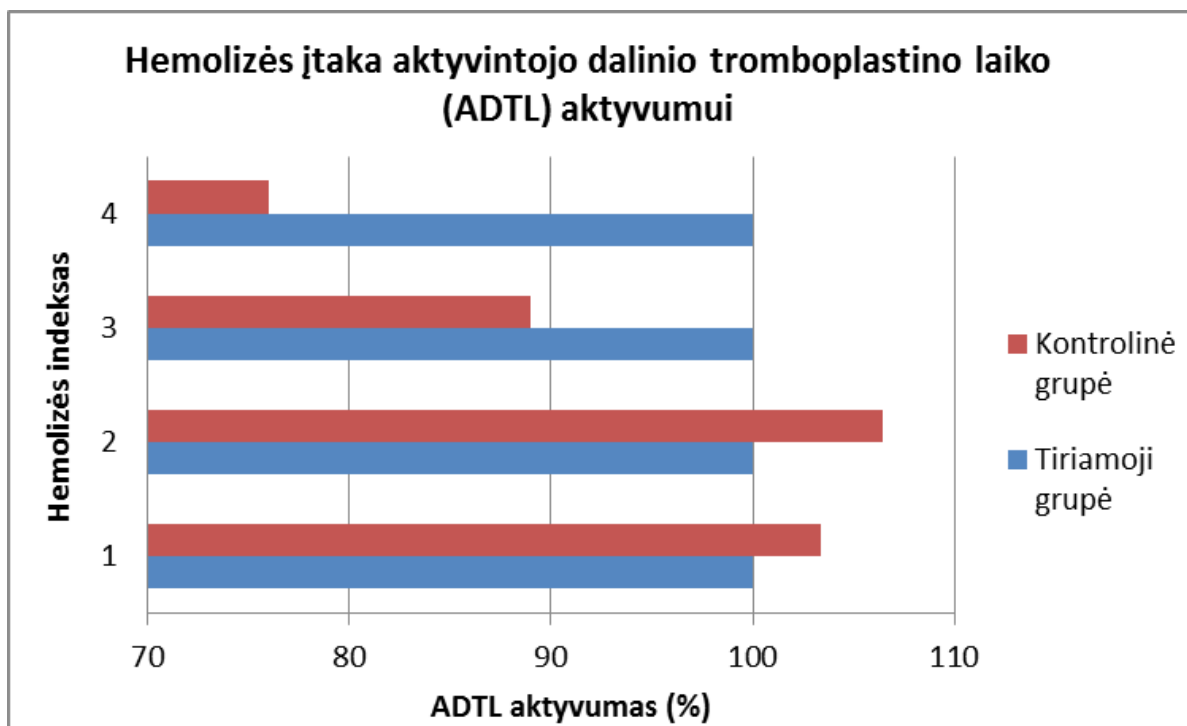
4 (tiriamoji)	+4	15	31,70	0,715	229,235	15,14	3,909
------------------	----	----	-------	-------	---------	-------	-------

*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$



8 pav. Hemolizės įtaka aktyvintojo dalinio tromboplastino laikui kraujo plazmoje

Esant hemolizės indeksui 1+ tiriamajame mėginyje aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) buvo 43, 1 s., t.y., padidėjo vidutiniškai 3, 36 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis. Esant hemolizės 2+ indeksui tiriamajame mėginyje aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) buvo 44,40 s., t.y., vidutiniškai padidėjo 6, 47 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis. Esant hemolizės indeksui 3+, tiriamajame mėginyje aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) buvo 37,10 s., t. y., sumažėjo 11, 03 proc. ($p < 0,05$), o hemolizės indeksui 4+ – 31, 70 s., t.y., sumažėjo 23,98 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis (8 pav.).



9 pav. Aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) pokyčiai tarp pradinių ir skirtingo laipsnio hemolizuotų mėginių

Remiantis atlikto tyrimo duomenimis, aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) kito esant skirtingiems hemolizės laipsniams tiriamuose mėginiuose, tačiau atlikus tyrimo duomenų statistinę analizę, paaiškėjo, jog gauti tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai nesiskiria tarp tiriamųjų grupių. Tačiau tokiai prielaidai patvirtinti trūksta tyrimo duomenų - didžiojoje dalyje mėginių tiriamosios analizės (ADTL) aktyvumo kraujo plazmoje išmatuoti nepavyko. (7 pav).

4.3. Hemolizės įtaka fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje

Siekiant nustatyti skirtingo laipsnio hemolizės poveikį fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje, iširta 40 mėginių. Skirtingų laipsnių hemolizuotuose mėginiuose fibrinogeno koncentracijos matavimai tiriamajame mėginyje buvo atliekami du kartus, iš kurių apskaičiuotas vidurkis.

Iš viso atlikta 520 matavimų: 40 matavimų pradinei fibrinogeno koncentracijai nustatyti, 80 matavimų stebint fibrinogeno koncentracijos kitimus hemolizės poveikyje esant 1+ indeksui, 80 matavimų stebint fibrinogeno koncentracijos kitimus hemolizės poveikyje esant 2+ indeksui, 80 matavimų stebint fibrinogeno koncentracijos kitimus hemolizės poveikyje esant 3+ indeksui ir 80 matavimų stebint fibrinogeno koncentracijos kitimus hemolizės poveikyje esant 4+ indeksui. Hemolizės indekso nustatymui atlikta 160 matavimų.

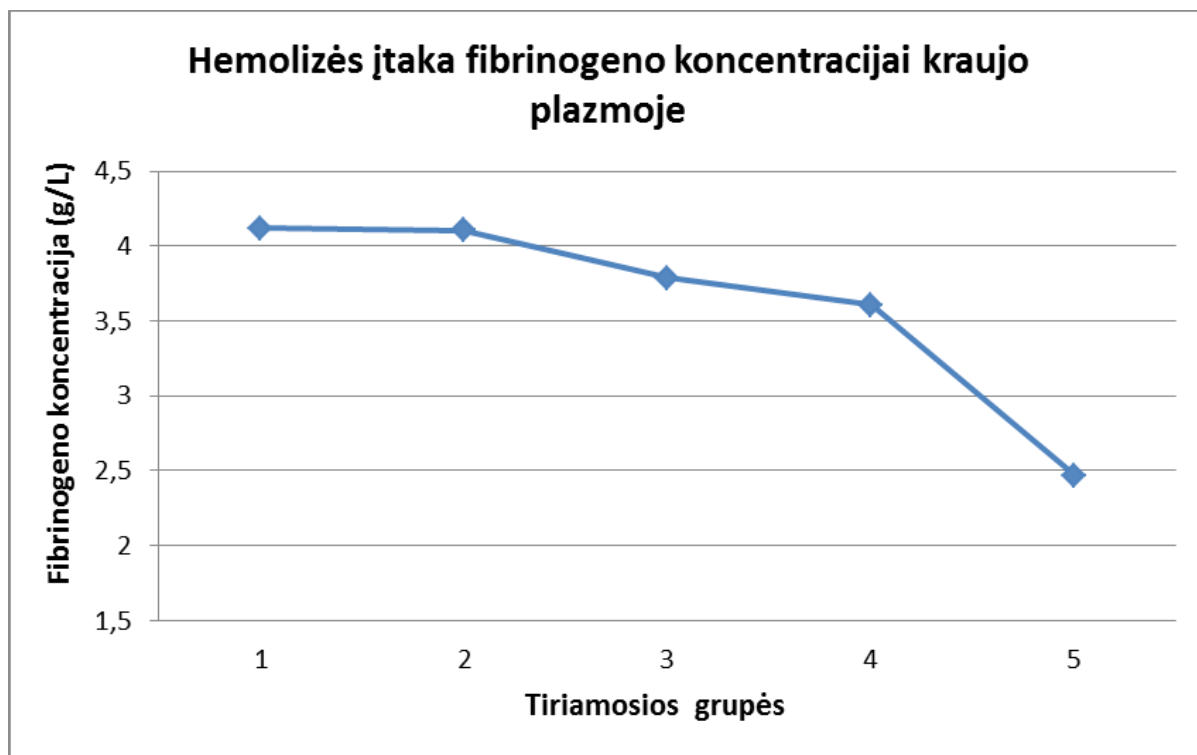
Apskaičiuoti vidurkiai tiriamose grupėse: pradinių duomenų – 4, 19 g/L \pm 0, 976 g/L; esant 1+ hemolizės indeksui – 4, 106 g/L \pm 0, 936 g/L; esant 2+ hemolizės indeksui – 3, 785 g/L \pm 1, 043 g/L; esant 3+ hemolizės indeksui – 3, 607 g/L \pm 1, 118 g/L; esant 4+ hemolizės indeksui – 2, 471 g/L \pm 1, 069 g/L. Iš apskaičiuotų vidurkių matome, jog hemolizės poveikyje tiriamosios analizės koncentracija pakito, t.y., mažėjo, palyginti su kontroline grupe (7 lentelė; 10 pav.).

Atliekant tyrimo duomenų statistinę analizę, paaiškėjo, jog gauti tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai skiriasi, t.y., skirtingi hemolizės laipsniai, vertinami hemolizės indeksais (1+, 2+, 3+, 4+), turi įtakos tiriamosios analizės – fibrinogeno - koncentracijai kraujo plazmoje (9 lentelė).

7 lentelė. Fibrinogeno koncentracijos kraujo plazmoje aprašomoji statistika

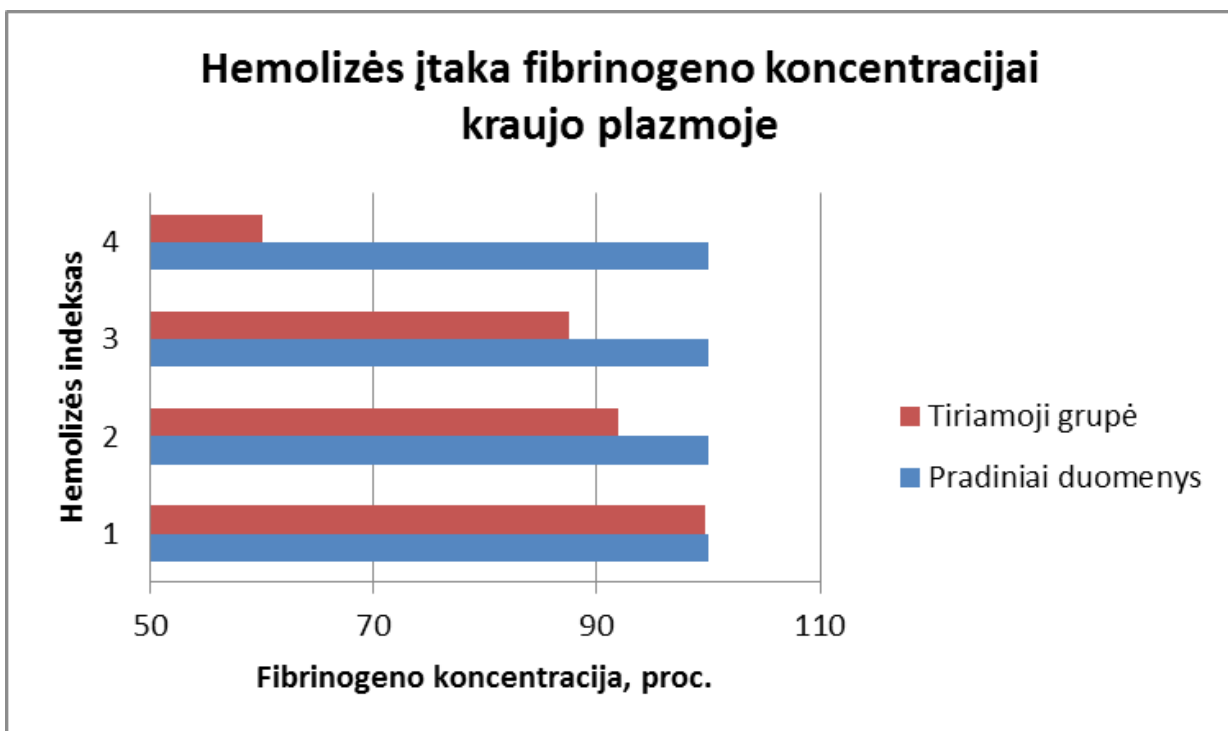
Grupės nr.	Hemolizės indeksas	N	Vidurkis (g/L)	p-reikšmė	Dispersija (s ²)	Standartinis nuokrypis (SD)	Standartinė paklaida (SE)
Pradiniai duomenys	-	40	4,119	0,3885	0,951	0,976	0,154
1 (tiriamoji)	1+	40	4,106	0,01049	0,877	0,936	0,148
2 (tiriamoji)	2+	40	3,785	<0,0001	1,087	1,043	0,165
3 (tiriamoji)	3+	40	3,607	<0,0001	1,251	1,118	0,179
4 (tiriamoji)	4+	40	2,471	<0,0001	1,144	1,069	0,169

*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$

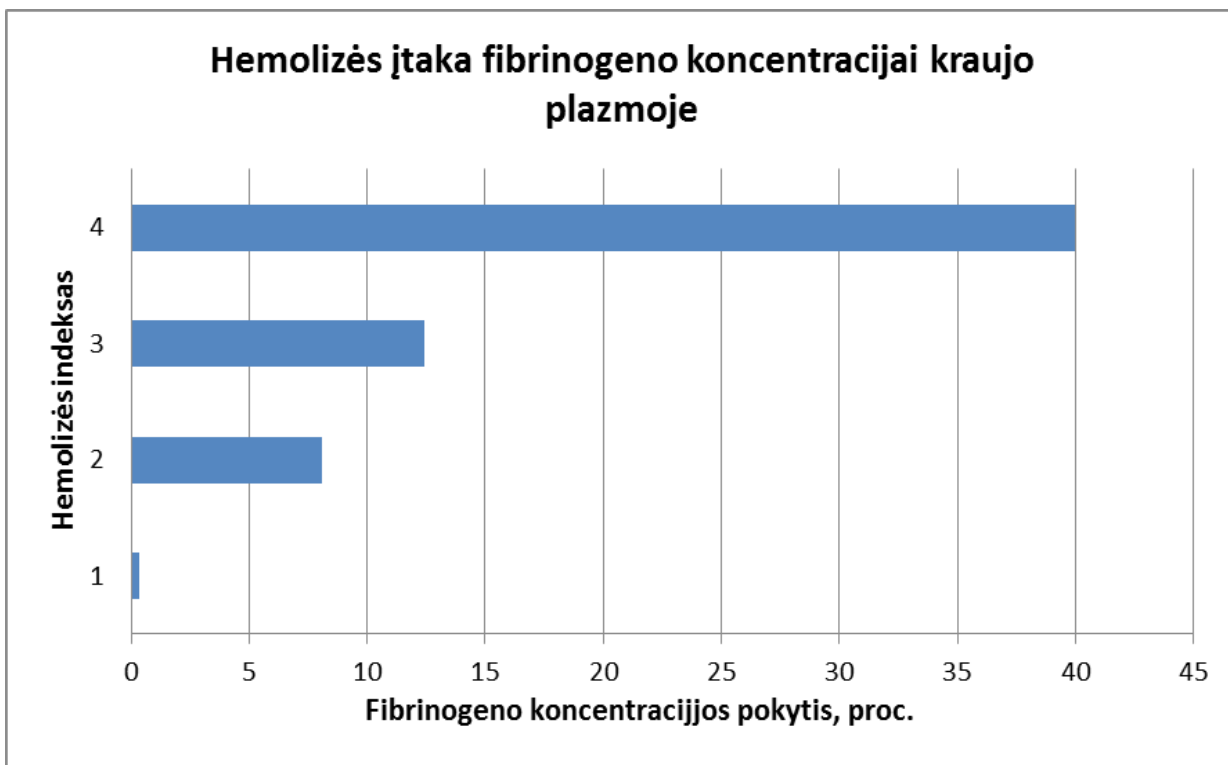


10 pav. Hemolizės įtaka fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje

Esant hemolizės indeksui 1+, tiriamajame mėginyje fibrinogeno koncentracija buvo 4,106 g/l, t.y., sumažėjo 0,32 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis. Esant hemolizės indeksui 2+ fibrinogeno koncentracija buvo 3,785 g/l, t.y., sumažėjo vidutiniškai 8,11 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis. Esant hemolizės indeksui 3+ tiriamajame mėginyje fibrinogeno koncentracija buvo 3,607 g/L, t.y., sumažėjo 12,43 proc. ($p < 0,05$), o esant 4+ hemolizei fibrinogeno koncentracija tiriamajame mėginyje buvo 2,471 g/l, kas atitinka – 40 proc. ($p < 0,05$) mažesnę rezultatą, palyginti su pradiniais duomenimis. (10, 11 pav.).



11 pav. Fibrinogeno koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška



12 pav. Fibrinogeno koncentracijos pokyčių procentinė išraiška

Gauti statistinės analizės rezultatai rodo, jog tyrimo kintamieji koreliuoja. Apskaičiuoti koreliacijos koeficientai pateikiami lentelėje (8 lentelė).

8 lentelė. Koreliacijos matrica tarp kintamųjų

Hemolizės indeksas	p-reikšmė	PI (95%)	Koreliacijos koeficientas
1+	<0,0001	0,850; 0,956	0,919
2+	<0,0001	0,571; 0,860	0,749
3+	<0,0001	0,376; 0,778	0,615
4+	<0,0001	0,347; 0,764	0,594

*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$

4.4. Hemolizės įtaka D – dimerų (D-DI) koncentracijai kraujo plazmoje

Siekiant nustatyti skirtingo laipsnio hemolizės poveikį d – dimerų koncentracijai kraujo plazmoje, ištirta 40 mėginių. Skirtingai hemolizuoti mėginiai buvo tiriami du kartus, iš kurių apskaičiuotas vidurkis.

Iš viso atlikta 520 matavimų: 40 matavimų pradiniam d – dimerų koncentracijos nustatymui, 80 matavimų stebint d – dimerų koncentracijos pokyčius hemolizės poveikyje esant 1+ indeksui, 80 matavimų stebint d – dimerų koncentracijos pokyčius hemolizės poveikyje esant 2+ indeksui, 80 matavimų stebint d – dimerų koncentracijos pokyčius hemolizės poveikyje esant 3+ indeksui ir 80 matavimų stebint d – dimerų koncentracijos pokyčius esant hemolizės indeksui 4+. Hemolizės indeksų nustatymui mėginiuose atlikta 160 matavimų.

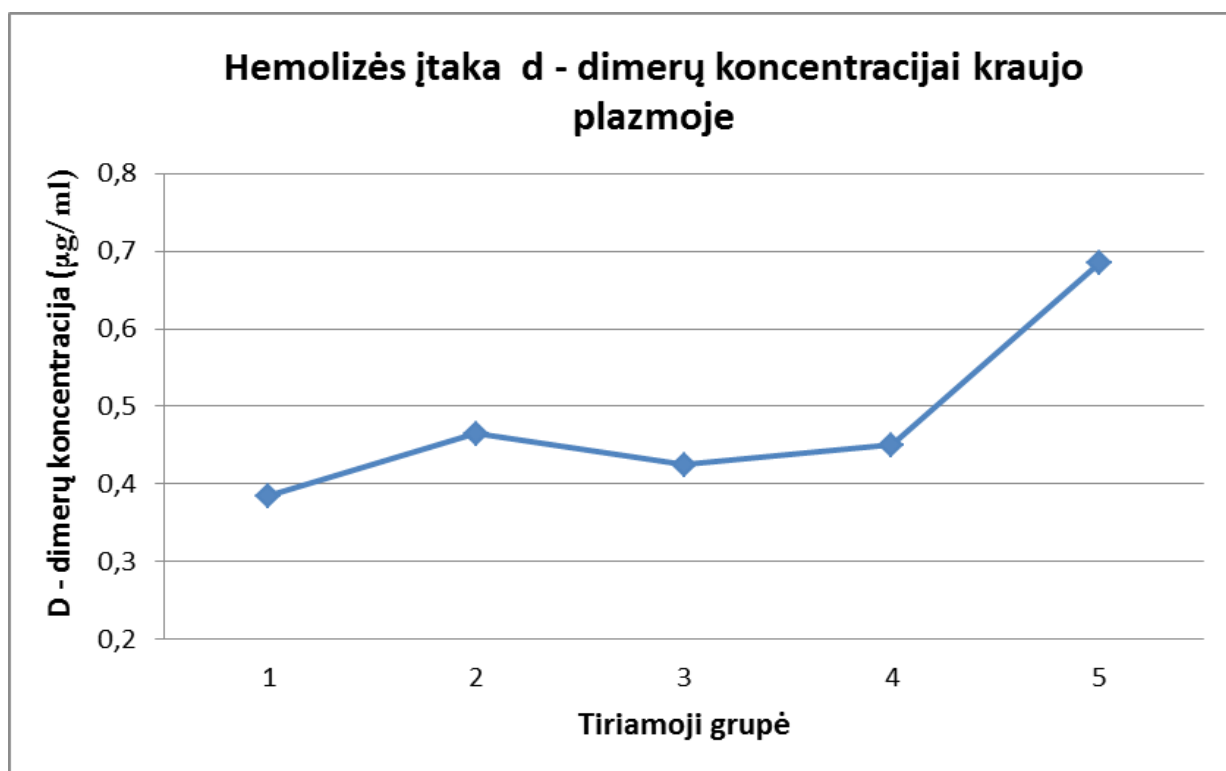
Apskaičiuoti vidurkiai tiriamose grupėse: pradinų duomenų – $0,449 \mu\text{g/ml} \pm 0,257 \mu\text{g/ml}$; esant 1+ hemolizės indeksui – $0,462 \mu\text{g/ml} \pm 0,250 \mu\text{g/ml}$; esant 2+ hemolizės indeksui – $0,473 \mu\text{g/ml} \pm 0,249 \mu\text{g/ml}$; esant 3+ hemolizės indeksui – $0,544 \mu\text{g/ml} \pm 0,221 \mu\text{g/ml}$; esant 4+ hemolizės indeksui – $0,652 \mu\text{g/ml} \pm 0,263 \mu\text{g/ml}$.

Apskaičiuoti vidurkiai tiriamosiose grupėse rodo, jog hemolizės poveikyje tiriamosios analitės – D – dimerų – koncentracija kraujo plazmoje pakito, t.y., didėjo, palyginti su pradinėmis D - dimerų koncentracijomis tiriamuose mėginiuose (9 lentelė; 13 pav.).

9 lentelė. D - dimerų koncentracijos kraujo plazmoje aprašomoji statistika

Grupės nr.	Hemolizės indeksas	N	Vidurkis (µg/ml)	p-reikšmė	Dispersija (s ²)	Standartinis nuokrypis (SD)	Standartinė paklaida (SE)
Pradinė (kontrolė)	-	40	0,449	0,200	0,456	0,257	0,107
1 (tiriamoji)	+1	40	0,462	0,084	0,746	0,250	0,137
2 (tiriamoji)	+2	40	0,473	0,112	1,013	0,249	0,016
3 (tiriamoji)	+3	40	0,544	0,011	0,625	0,221	0,125
4 (tiriamoji)	+4	40	0,652	<0,0001	0,773	0,263	0,139

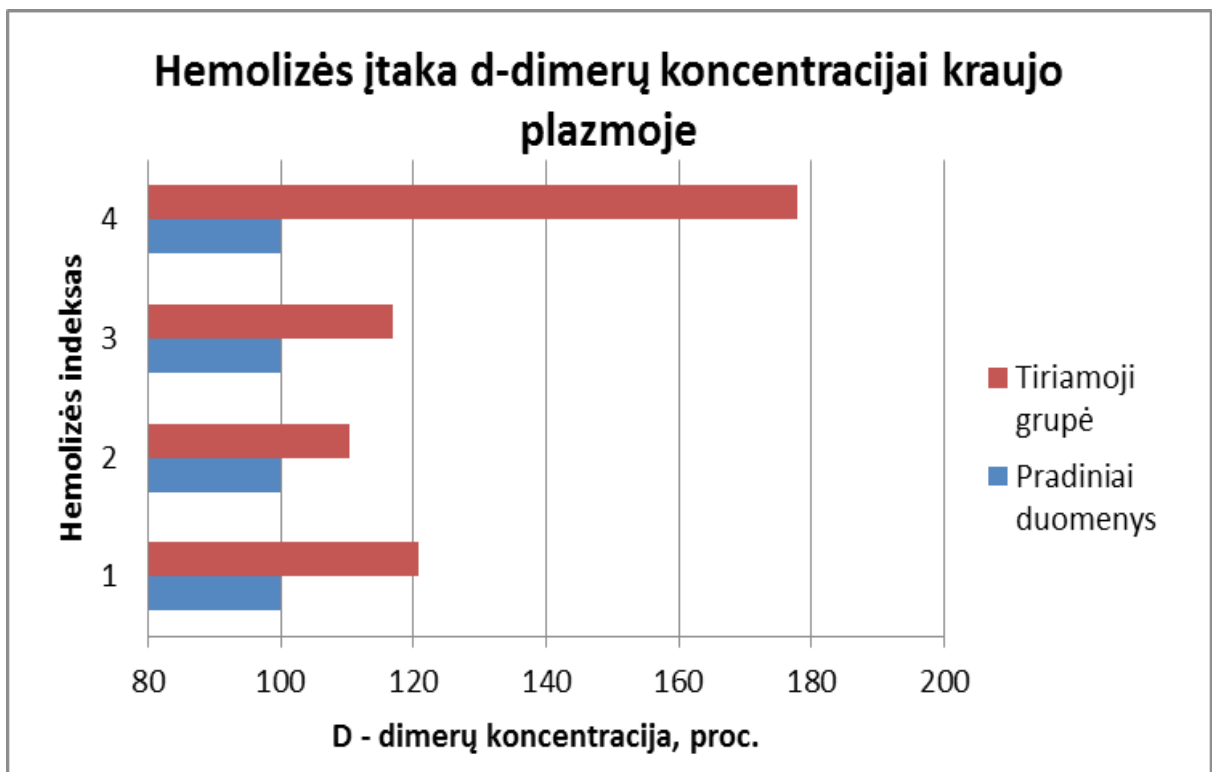
*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai patikimi, kai $p < 0,05$



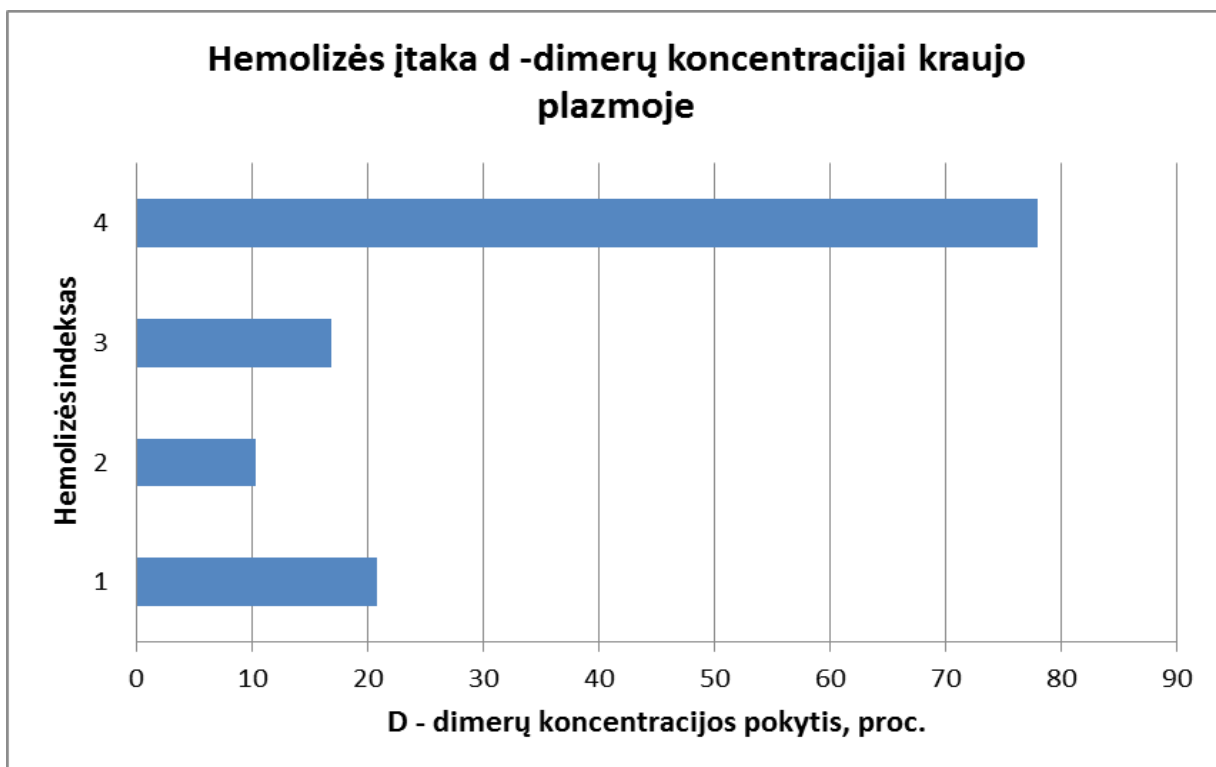
13 pav. Hemolizės įtaka D - dimerų koncentracijai kraujo plazmoje

Esant hemolizės indeksui 1+ tiriamajame mėginyje d - dimerų koncentracija buvo 0,465 µg/ml, t.y., padidėjo 20,78 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis.

Hemolizės indekso 2+ poveikyje d - dimerų koncentracija buvo 0,425 $\mu\text{g/ml}$, t.y., padidėjo vidutiniškai 10,39 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis. Esant hemolizės indeksui 3+ tiriamajame mėginyje d - dimerų koncentracija buvo 0,450 $\mu\text{g/ml}$, t.y., padidėjo 16,88 proc. ($p < 0,05$), o hemolizės indekso 4+ poveikyje – 77,92 proc. ($p < 0,05$), kas atitinka 0,685 $\mu\text{g/ml}$, palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis (13 pav.).



14 pav. D – dimerų koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška



15 pav. D - dimerų koncentracijos pokyčių, esant skirtingiems hemolizės indeksams tiriamuose mėginiuose, procentinė išraiška

Atliekant tyrimo duomenų statistinę analizę, paaiškėjo, jog gauti tyrimo rezultatai statistiškai reikšmingai skiriasi, t.y., turi įtakos tiriamosios analizės – d - dimerų – koncentracijos pokyčiams kraujo plazmoje, esant hemolizių indeksams 3+ ir 4+ (9 lentelė). Prie hemolizės indeksų 1+ ir 2+ tyrimo rezultatai nesiskiria statistiškai reikšmingai, t.y., šių hemolizės indeksų įtaka tiriamajai analizei nestebima (11 lentelė). Gauti statistinės analizės duomenys rodo, jog tyrimo kintamieji koreliuoja tarp grupių. Apskaičiuoti koreliacijos koeficientai pateikiami lentelėje (10 lentelė).

10 lentelė. Koreliacijos matrica tarp kintamųjų

Hemolizės indeksas	p-reikšmė	Koreliacijos koeficientas
1+	<0,0001	0,627
2+	<0,0001	0,677
3+	<0,0001	0,607
4+	0,018	0,382

*tyrimo rezultatai laikomi statistiškai reikšmingi, kai $p < 0,05$

4. TYRIMO REZULTATŲ APTARIMAS

Literatūros šaltiniuose teigiama, jog SPA bei fibrinogeno koncentracijai hemolizė įtakos neturi [21]. Tačiau pastebėta, jog kai kurių hemolizuotų mėginių ADTL tyrimo reikšmės yra klaidingai normalios hemolizės poveikyje. Kituose literatūros šaltiniuose teigiama, jog tiriant ADTL ir SPA, yra statistiškai reikšmingų skirtumų tarp hemolizuotų ir nehemolizuotų mėginių [17]. Taip pat yra duomenų, jog hemolizės poveikyje iš suirusių ląstelių išėję vidiniai komponentai turi įtakos protrombino laikui, kuris pailgėja, d – dimerų - padaugėja, aktyvintojo dalinio tromboplastino laikas (ADTL) sutrumpėja, o fibrinogeno koncentracija plazmoje – sumažėja [34]. Literatūroje minimi atvejai, kuomet hemolizės poveikyje d – dimerų koncentracija padidėja ir tai sutampa su atliktais kitų mokslininkų tyrimais [55, 13, 35].

Mūsų atlikti tyrimai rodo, jog SPA ir fibrinogeno koncentracijos statistiškai reikšmingai skiriasi tarp skirtingai hemolizuotų ir nehemolizuotų mėginių, d – dimerų koncentracijos mėginiuose padidėja, ypač prie 3+ ir 4+ hemolizių ir tai statistiškai reikšmingi rezultatai. Didžioji dauguma ADTL tyrimų rezultatų buvo mažesni už minimumą, todėl analizatorius jų neišmatavo.

Kaip žinia, be hemoglobino, eritrocitus sudaro baltymai, fermentai, lipidai, angliavandeniai, o daugelis iš jų taip pat sąveikauja su tyrime naudojamais reagentais, todėl naudojamas reagentas taip pat gali turėti įtakos tyrimo rezultatams [30, 21]. Pavyzdžiui, naudojant STA - Cephascreen reagentą, statistiškai reikšmingų skirtumų tarp hemolizuotų ir nehemolizuotų mėginių nerasta. Tačiau pastebėta, jog atliekant ADTL tyrimą, naudojant STA – PTT reagentą gali sumažinti ADTL tyrimo rezultatus [21].

Tačiau nederėtų atmesti ir naudoto reagento hemolizei sukelti poveikio tiriamosioms analitėms tikimybės. Atlikti tyrimai liudija apie etanolio įtaką fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje (mažina), fibrinolizės sistemai (padidina aktyvumą), skatinama trombocitų aktyvacija [47]. Etanolis arba jo metabolitai slopina trombocitų agregaciją, mažina ląstelinio cAMP, didina ląstelių inozitolio-1,4,5-trifosfato koncentraciją, kas sukelia ląstelinio Ca²⁺ koncentracijos pokyčius, o susidarius šių koncentracijų pokyčiams aktyvinami trombocitai. Laisvas hemoglobinas netiesiogiai aktyvina trombocitus [3]. Hemolizės metu, suyrant raudonosioms kraujo ląstelėms, išlaisvinamas ADF. Išlaisvintas ADF taip pat suriša PDX receptorių, esančius endotelio ląstelių paviršiuje ir skatina azoto oksido (NO) gamybą [46]. Toks NO padidėjimas kraujotakoje laikinai padidina trombocitų kiekį kraujyje [44].

Gali būti, jog mūsų tyrimo metu naudoto hemolizuojančio tirpalo sudėtyje esančio metanolio veikimo mechanizmas ir poveikis tiriamosioms analitėms panašus į etanolio sukeltą poveikį.

IŠVADOS

Atlikus eksperimentą ir išanalizavus tyrimų duomenis nustatyta, jog:

1. Skirtingo laipsnio hemolizė turi įtakos protrombino komplekso (SPA) aktyvumui: esant hemolizės indeksui 1+ tiriamajame mėginyje protrombino komplekso (SPA) aktyvumas vidutiniškai sumažėjo 5,17 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis; esant hemolizės indeksui 2+ protrombino komplekso (SPA) aktyvumas vidutiniškai sumažėjo 10,17 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis; esant hemolizės indeksui 3+, tiriamajame mėginyje protrombino komplekso (SPA) aktyvumas sumažėjo vidutiniškai 14,19 proc. ($p < 0,05$), o esant hemolizės indeksui 4+ - sumažėjo visutiniškai 12,56 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais tyrimo duomenimis.
2. Hemolizės įtakos aktyvintojo dalinio tromboplastino laiko (ADTL) aktyvumui nustatyti nepavyko, kadangi daugelis jų nebuvo išmatuoti dėl minimalaus aktyvumo (< 20 s.). Išmatuotiems tyrimų rezultatams hemolizės įtaka nestebima.
3. Skirtingo laipsnio hemolizė turi įtakos fibrinogeno koncentracijai kraujo plazmoje – t.y., mažėja: esant hemolizės indeksui 1+ tiriamajame mėginyje fibrinogeno koncentracija sumažėjo vidutiniškai 0,32 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis; esant hemolizės indeksui 2+ fibrinogeno koncentracija sumažėjo vidutiniškai 8,11 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis; esant hemolizės indeksui 3+ tiriamajame mėginyje fibrinogeno koncentracija sumažėjo vidutiniškai 12,43 proc. ($p < 0,05$), o esant 4+ hemolizei fibrinogeno koncentracija tiriamajame mėginyje sumažėjo vidutiniškai 40 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis.
4. D – dimerų koncentracija esant skirtingo laipsnio hemolizėms mėginiuose didėja, tačiau statistiškai reikšmingi rezultatai stebimi esant 3+ ir 4+ hemolizėms tiriamuose mėginiuose: esant hemolizės indeksui 3+ tiriamajame mėginyje d - dimerų koncentracija padidėjo vidutiniškai 16,88 proc. ($p < 0,05$), o hemolizės indekso 4+ poveikyje – 77,92 proc. ($p < 0,05$), palyginti su pradiniais duomenimis.

SANTRAUKA

Paskutiniu metu vis daugiau dėmesio skiriama laboratorijose atliekamų tyrimų kokybei užtikrinti.

Laboratorijoje atliekamų tyrimų kokybė, rezultatų tikslumas bei patikimumas priklauso nuo daugybės veiksnių.

Nustatyta, kad net 70 proc. laboratorijoje aptinkamų klaidų įvyksta iki ištyrimo etapo metu. Kaip bebūtų, dažniausia mėginių atmetimo priežastis yra hemolizuoti mėginiai.

Nors hemolizės įtaka įvairioms tiriamosioms analitėms žinoma jau seniai, tačiau trūksta išsamesnių tyrimų, kokią įtaką turi skirtingi hemolizės laipsniai dažniausiai atliekamiems kraujo krešėjimo tyrimams.

Dėl šios priežasties mes nusprendėme ištirti, kokią įtaką turi skirtingi hemolizės laipsniai dažniausiai laboratorijoje atliekamiems kraujo krešėjimo tyrimams – SPA, ADTL, fibrinogenui ir d – dimerams.

Tyrimo metu iš viso ištirta 160 mėginių, kuriems buvo sukelta skirtingo laipsnio (1+, 2+, 3+, 4+) hemolizė. Hemolizei gauti naudotas lizuojantis tirpalas.

Tyrimo metu gauti rezultatai parodė, jog esant skirtingo laipsnio hemolizei (1+, 2+, 3+, 4+) SPA aktyvumas ir fibrinogeno koncentracija kraujo plazmoje mažėja statistiškai reikšmingai, o d – dimerų koncentracija kraujo plazmoje – didėja. Pastarųjų statistiškai reikšmingi skirtumai gauti esant 3+ ir 4+ hemolizės laipsniams tiriamuose mėginiuose. Taip pat mūsų tyrimai parodė, jog skirtingo laipsnio (1+, 2+, 3+, 4+) hemolizė neturi poveikio ADTL aktyvumui kraujo plazmoje.

Gauti tyrimo rezultatai įrodo, jog hemolizė turi įtakos laboratorijoje atliekamiems kraujo krešėjimo tyrimams, todėl labai svarbu apsvarstyti net ir silpnai hemolizuotų mėginių atmetimo galimybę.

SUMMARY

Recently, a lot more attention is dedicated to ensure the quality of laboratory testing.

The quality, accuracy and reliability of investigations carried out in the laboratory depend on many factors.

It was found that as much as 70 percent of errors that are discovered in the laboratory occur in pre-analytical phase. However, the main reason for specimen rejection is hemolysed specimens.

Although hemolysis influence of various analytes has been known, the lack of thorough research influences different degrees of hemolysis usually performed in blood coagulation tests.

For this reason, it was decided to investigate the influence of hemolysis degrees usually conducted from specimens of blood coagulation- SPA, APTT, fibrinogen and d-dimer.

During the study, a total of 160 analysed specimens were caused by varying levels of (1+, 2+, 3+, 4+) hemolysis using lysing solution.

The study results showed that, with varying degrees of hemolysis (1+, 2+, 3+, 4+) SPA activity and fibrinogen concentration in blood plasma decreases significantly whereas dimer concentration in plasma is increasing. Statistically significant differences were obtained 3+ and 4+ of hemolysis specimen. Also, our research has shown that varying levels (1+, 2+, 3+, 4+) of hemolysis does not affect the APTT activity in plasma.

The obtained results prove that hemolysis affects laboratory research of blood coagulation therefore it is essential to consider even slightly hemolysed samples with a possibility of rejection.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Achneck HE, Sileshi B., Parikh A., Milano CA, Welsby IJ, Lawson JH. Pathophysiology of bleeding and clotting in the cardiac surgery patient: from vascular endothelium to circulatory assist device surface. *Circulation*. 2010 Nov 16; 122(20):2068-77.
2. Adiga U., Yogish S. Hemolytic index – A tool to measure hemolysis in vitro. *IOSR Journal of Biotechnology and Biochemistry (IOSR-JBB)*. 2016; Jan – Feb: 45 – 52.
3. Bogle RG., Coade SB., Moncada S., Pearson JD, Mann GE. Bradykinin and ATP stimulate L-arginine uptake and nitric oxide release in vascular endothelial cells. [Biochem Biophys Res Commun](#). 1991 Oct 31;180(2):926.
4. Bombeli T., Spahn DR, Br J. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *Anaesth*. 2004 Aug; 93(2):275-87.
5. Bombeli T., Spahn DR., Br J. Updates in perioperative coagulation: physiology and management of thromboembolism and haemorrhage. *Anaesth*. 2004 Aug; 93(2):275-87.
6. Budrionienė R. Vitamino K poveikis kai kuriems žmogaus organizmo procesams. *Laboratorinė medicina* 2012, t. 14, Nr. 3(55), p. 147–153.
7. Burns ER, Yoshikawa N. Hemolysis in serum samples drawn by emergency department personnel versus laboratory phlebotomists. *Lab Med* 2002;33:378–80.
8. Carraro P, Servidio G, Plebani M. Hemolyzed specimens: a reason for rejection or a clinical challenge? *Clin Chem*.2000;46:306-307.
9. Cesarman-Maus G, Hajjar KA. Molecular mechanisms of fibrinolysis.. *Br J Haematol*. 2005 May; 129(3):307-21.
10. Colvin BT, Sang V. Physiology of haemostasis. 2004 Jul; 87 Suppl 1:43-6.
11. Cox SR, Dages JH, Jarjoura D, Hazelett S. Blood samples drawn from IV catheters have less hemolysis when 5-mL (vs 10-mL) collection tubes are used. *J Emerg Nurs* 2004;30:529–33.
12. ČEPULIENĖ R. Kraujo morfologija ir funkcijos. Vilnius: Vilniaus pedagoginio universiteto I – kla; 2007:5-7.
13. Favaloro J., Dorothy M.; Lippi G. ,Pre-analytical Variables in Coagulation Testing Associated With Diagnostic Errors in Hemostasis. *Lab Med*. 2012;43(2):1-10.

14. From normal to pathological hemostasis.. Can J Anaesth. 2006 Jun; 53(6 Suppl):S2-11.
15. Gimenez-Marin A., Rivas-Ruiz F., Perez-Hidalgo Mdel M., MolinaMendoza P. Pre-analytical errors management in the clinical laboratory: a five-year study. Biochem Med (Zagreb) 2014;24:248–57.
16. Glick MR, Ryder KW, Glick SJ, Woods JR. Unreliable visual estimation of the incidence and amount of turbidity, hemolysis, and icterus in serum from hospitalized patients. Clin Chem 1989;35:837-9.
17. [Goyal T.](#), [Schmotzer Ch. L.](#), Am J. Validation of Hemolysis Index Thresholds Optimizes Detection of Clinically Significant Hemolysis. Clin Pathol (2015) 143 (4): 579-583.
18. Grybauskas P. Kraujo krešėjimo sistemos struktūra ir krešulio susidarymo biologinė esmė. Ultragarsinė koaguliometrija. Kaunas: KMA Kardiologijos institutas; 1998; 155-63.
19. Hawkins R. Discrepancy between visual and spectrophotometric assessment of sample haemolysis. Ann Clin Biochem 2002;39:521-2.
20. Heiligers-Duckers C., Peters NA, Dijck JJ, Hoeijmakers JM, Janssen MJ. Low vacuum and discard tubes reduce hemolysis in samples drawn from intravenous catheters. Clin Biochem 2013;46:1142–4.
21. [Helms CC](#), [Marvel M](#), [Zhao W.](#), [Stahle M.](#), [Vest R.](#), [Kato GJ](#), et al. Mechanisms of hemolysis-associated platelet activation. [Thromb Haemost.](#) 2013 Dec;11(12):2148-54.
22. Hoffman M., Monroe DM. Coagulation 2006: a modern view of hemostasis. Hematol Oncol Clin North Am. 2007. 21(1):1-11.
- 23.** http://www.bd.com/vacutainer/pdfs/techtalk/TechTalk_Jan2004_VS7167.pdf [žiūrėta 2017-05-25]
24. Janavičiūtė G., Jatužis D. Laboratorinis tiesioginių geriamųjų antikoagulantų poveikis. Laboratorinė medicina 2015; t. 17, Nr. 2(66), p. 82–90.
25. Kozlovaitė V. Trombocitų funkcijos ir krešėjimo sistemos aktyvumo pokyčiai gydant širdies ritmo sutrikimus radijo dažnine abliacija: daktaro disertacija. Biomedicinos mokslai, medicina 07B. Kaunas; 2006.

26. Kučinskienė Z. A. Klinikinės biochemijos ir laboratorinės diagnostikos pagrindai. Vilnius: Vilniaus universiteto I - kla; 2008. 290 – 306 p.
27. Laga AC., Cheves TA., Sweeney JD. [The effect of specimen hemolysis on coagulation test results AM J Clin Pathol.](#) 2006 Nov;126(5):748-55.
28. Lasne D., Jude B., Susen S, Can J. From normal to pathological hemostasis. Anaesth. 2006 Jun; 53(6 Suppl):S2-11.
29. Lasne D., Jude B., Susen S., Triplett DA. Coagulation and bleeding disorders: review and update. Clin Chem. 2000 Aug; 46(8 Pt 2):1260-9.
30. Lippi G., Blanckaert N., Bonini P., Green S., Kitchen S., Palicka V., et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Med 2008;46:764–72.
31. Lippi G., Blanckaert N., Bonini P., Green S., Kitchen S., Palicka V., et al. Haemolysis: an overview of the leading cause of unsuitable specimens in clinical laboratories. Clin Chem Lab Me 2008; 46(6): 764–72.
32. Lippi G., Montagnana M., Salvagno GL, Guidi GC. Interference of blood cell lysis on routine coagulation testing. Arch Pathol Lab Med 2006;130:181–4.
33. Lippi G., Plebani M., Di Somma S., Cervellin G. Hemolyzed specimens: a major challenge for emergency departments and clinical laboratories. Crit Rev Cl Lab Sci 2011;48:143–53.
34. Lippi G., Salvagno GL, Montagnana M., Brocco G., Guidi GC. Influence of hemolysis on routine clinical chemistry testing. Clin Chem Lab Med 2006;44:311–6.
35. Lippi G., Avanzini P., Zobbi V. Influence of mechanical hemolysis of blood on two D-dimer immunoassays. [Blood Coagulation and Fibrinolysis.](#) 2012 Jul;23(5):461-3.
- 36.** Lutomski DM., Bower RH. The Effect of Thrombocytosis on Serum Potassium and Phosphorus Concentrations. Article in **The American Journal of the Medical Sciences.** 1994; 307(4):255.
37. Marshall A. Lichtman, Thomas J. Kipps, Uri Seligsohn, Kenneth Kaushansky, Josef T. Prchal. Williams hematology. 8th edition [prieiga per internetą: <http://accessmedicine.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1581§ionid=108080365>, paskutinį kartą žiūrėta 2016-05-29]

38. Mongirdienė A. Trombocitų funkcijos tyrimo galimybės. *Medicina (Kaunas)* 2007; 43 (10): 767-777.
39. Mrazek C., Simundic AM, Wiedemann H, Krahmer F., Felder TK, Ulrike Kipman, et al. . The relationship between vacuum and hemolysis during catheter blood collection: a retrospective analysis of six large cohorts. *Clin Chem Lab Med* 2017 Jan 20.
40. [Palta S.](#), [Saroa R.](#), [Palta A.](#) Overview of the coagulation system. *Indian J Anaesth* 2014 Sep-Oct; 58(5): 515–523.
41. Plebani M., Sciacovelli L., Aita A., Chiozza ML. Harmonization of pre-analytical quality indicators. *Biochem Med (Zagreb)* 2014;24:105–13.
42. Previtali E., Bucciarelli P., Passamonti SM, Martinelli I. Risk factors for venous and arterial thrombosis. *Blood Transfus.* 2011 Apr; 9(2):120-38.
43. Sabaliauskienė Z. Trombocitų agregacijos ir homocisteino koncentracijos kraujyje pokyčių biologinė reikšmė ūmių išeminių galvos smegenų kraujotakos sutrikimų metu: daktaro disertacija. Biomedicinos mokslai, biologija 01B. Kaunas; 2009.
44. Salem R. O., Laposata M. Effects of Alcohol on Hemostasis *American Journal of Clinical Pathology.* 2005 Jun 123 Suppl:S 96-10.
45. Simundic AM, Nikolac N., Ivankovic V., Ferenec-Ruzic D., Magdic B., Kvaternik M., Topic E. Comparison of visual vs. automated detection of lipemic, icteric and hemolyzed specimens: can we rely on a human eye? *Clin Chem Lab Med* 2009; 47:1361-5.
46. Stonys R., Vitkus D. Preanalizinių veiksnių svarba: mėginių gabenimo sąlygų bandomasis tyrimas Lietuvos laboratorijose. *Laboratorinė medicina.* 2014, t. 16, Nr. 1(61), p.14–23.
47. Thomas L. Haemolysis as influence and interference factor. *eJIFCC vol 13(4).* [žiūrėta 2017-02-28] prieiga per internetą: <http://www.ifcc.org/ejifcc/vol13no4/130401002.htm>
48. Thornton P., Douglas J. Coagulation in pregnancy. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2010 Jun; 24(3):339-52.
49. Valstybinė akreditavimo sveikatos priežiūros veiklai tarnyba prie Sveikatos apsaugos ministerijos. [Žiūrėta 2017-02-21] prieiga per internetą: <http://www.vaspvt.gov.lt/node/123>

50. Vermeer HJ, Thomassen E, Jongea N. Automated Processing of Serum Indices Used for Interference Detection by the Laboratory Information System. *Clin Chem* 2005; 51:244-7.
51. Vitkus D. Kokybės valdymo klinikinės chemijos laboratorijoje metodai – tradiciniai ir modernieji. *Laboratorinė medicina* 2009; 1(41): 26–32.
52. Wiwanitkit V. Types and frequency of preanalytical mistakes in the first Thai ISO 9002:1994 certified clinical laboratory, a 6-month monitoring. *BMC Clinical Pathology* 2001;1:5.
53. Wooley A., Golmard JL, Kitchen S.. Effects of haemolysis, icterus and lipaemia on coagulation tests as performed on Stago STA-Compact-Max analyser. *International journal of laboratory hematology* 2016 Aug 38; 4:375-388.