

Çinko Düzeylerinin Ölçümünde Matris Seçimi

Matrix Selection for Measurement of Zinc Levels

Sema Kardeşler[®], Fatma Demet Arslan[®], İnanç Karakoyun[®], Banu İşbilen Başok[®], Ayfer Çolak[®]

Cite as: Kardeşler S, Arslan FD, Karakoyun İ, İşbilen Başok B, Çolak A. Çinko düzeylerinin ölçümünde matris seçimi. Forbes J Med. 2020;1(3):79-83.

ÖZ

Amaç: Çinko, büyüme geriliği, immün yetmezlik, infertilite, nörolojik bozukluk, akrodermatitis enteropatika tanısı gibi durumlarda sıklıkla kullanılan bir testtir. Çinko düzeylerinin ölçümünde diğer testlerle birlikte analiz edilme kolaylığı ve serum eldesinde kullanılan kan alma tüplerinin maliyet etkinliği nedeniyle sıklıkla serum matrisi tercih edilmektedir. Çalışmamızda doğru ve güvenilir çinko sonuçları için standart pıhtı aktivatörlü jelli ve eser element için özel üretilmiş heparinli jelsiz tüplerdeki serum ve plazma çinko sonuçları karşılaştırılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Çalışmaya rastgele seçilmiş 27 hasta dahil edildi. Hastalardan eş zamanlı hem pıhtı aktivatörlü jelli tüplere (SST) (SST II Advance, Vacuette, Becton Dickinson and Company, Amerika), hem de sodyum heparin içeren eser element tüplerine (NH) (NH Trace Elements Sodium Heparin, Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Avusturya) kan alındı. Santrifüj sonrası elde edilen serum ve plazma örneklerinde çinko düzeyleri kolorimetrik yöntem ile otoanalizörde ölçüldü. Serum ve plazma çinko düzeyleri arasındaki bias biyolojik varyasyon kaynaklı izin verilebilir bias kriterine göre değerlendirildi ve regresyon analizi yapıldı.

Bulgular: Serum ve plazma çinko düzeylerinin ortalaması ve standart sapması sırasıyla 49.0 ± 11.5 µg/dL ve 46.4 ± 12.0 µg/dL olarak bulundu ve arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı ($p=0.012$). Ayrıca serum ve plazma arasındaki bias %6,8 olup, izin verilebilir biasın (%3,3) üzerindeydi ve klinik olarak anlamlı kabul edildi. Sistematik ya da rastlantısal hata saptanmadı.

Sonuç: Eser elementler ölçümü için kullanılacak kan alma tüpleri seçilirken yapısal farklılıklar ve matris etkisi nedeniyle oluşabilecek farklılıklar göz önünde bulundurulmalıdır.

Anahtar kelimeler: Çinko, plazma, serum, örnek toplama

ABSTRACT

Objective: Measurement of blood zinc levels is frequently used in the diagnosis of a few conditions such as growth retardation, immunodeficiency, infertility, neurological disorder, and acrodermatitis enteropathica. The serum matrix is the most preferred one to determine zinc levels due to the ease of analysis with other tests and cost-effectiveness of blood collection tubes used to obtain serum samples. In our study, we aimed to compare serum and plasma zinc test results for accurate and reliable zinc measurement in plain tubes with clot activator and gel and in heparin-free tubes, which specifically produced for trace element analysis.

Method: Twenty-seven randomly selected patients were included in the study. Blood samples drawn simultaneously from patients were pipetted into tubes with clot activator and gel (SST) (SST II Advance, Vacutainer, Becton Dickinson and Company, USA) as well as into trace element tubes with sodium heparin (NH) (NH Trace Elements Sodium Heparin, Vacuette, Greiner Bio-One GmbH, Austria). After the centrifugation process, zinc levels in serum and plasma samples were analyzed by colorimetric method using an autoanalyzer. Bias between serum and plasma zinc levels was evaluated according to the allowable bias criterion based on biological variation and regression analysis performed.

Results: The mean and standard deviation of serum and plasma zinc levels were 49.0 ± 11.5 µg/dL and 46.4 ± 12.0 µg/dL, respectively, and a statistically significant difference was determined ($p=0.012$) in between. Besides, the bias between serum and plasma was 6.8%, which was above the allowable bias (3.3%) and considered as clinically significant. No systematic or random errors detected.

Conclusions: When selecting a blood collection tube for trace element analysis, the structural differences between tubes and the matrix effect should be considered carefully.

Keywords: Zinc, plasma, serum, specimen collection

Received/Geliş: 30.11.2020
Accepted/Kabul: 07.12.2020
Publication date: 30.12.2020

Sema Kardeşler
SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği,
İzmir - Türkiye
✉ sema.kardesler@saglik.gov.tr
ORCID: 0000-0003-0345-8175

F.D. Arslan 0000-0003-0766-0303
İ. Karakoyun 0000-0002-7057-171X
B. İşbilen Başok 0000-0002-1483-997X
A. Çolak 0000-0003-4910-0128
SBÜ Tepecik Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya Kliniği,
İzmir, Türkiye



GİRİŞ

Çinko (Zn) demirden sonra hem vücudumuzda hem intrasellüler olarak en fazla bulunan eser elementtir.¹ Yaklaşık %85'i kas ve kemikte, %11'i deri ve karaciğerdedir. Plazmada çinkonun çoğu albumin ve alfa-2 makroglobuline bağlı bulunur.² Enzim kofaktörü olarak hücre büyümesi, gelişim ve diferansiyasyon, DNA sentezi ve RNA transkripsiyonu gibi çeşitli biyolojik fonksiyonlarda görev alır. Yara iyileşmesi, kemik mineralizasyonu, tiroid fonksiyonu, kan pıhtılaşması, fetal büyüme, immun sistem, oksidatif stres, apoptozis, bilişsel fonksiyonda kritik öneme sahiptir.^{3,4} Proteinlerde, hücre membranlarında, nükleik asit ve ribozomlarda yapısal element olarak da bulunur.⁵

Zn ölçümü, büyüme geriliği, immun yetmezlik, infertilite, nörolojik bozukluk, akrodermatitis enteropatik gibi hastalık durumunda sık yapılan bir testtir. Nadir de olsa toksisitesi gastrointestinal belirtiler oluşturabilir.⁶ Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsünün (CLSI) "İz Element Tayininde Preanalitik Değişimin Kontrolü-C38-A" isimli kılavuzunda, eser element ölçümü için tam kan, serum ve plazma matrislerinden herhangi birini önerse de buradaki temel unsur kullanılan malzemenin ekzojen kaynaklı olarak kontaminasyona neden vermemesidir. Kontaminasyonu önlemek için özel üretilmiş eser element tüpleri tercih edilmelidir.⁷ Birçok laboratuvar da Zn ölçüm için diğer testlerle birlikte analiz kolaylığı ve maliyet etkinliği nedeniyle rutin biyokimyasal testlerin çalışıldığı serum tüpleri kullanılmaktadır. Bu çalışmada, rutinde kullanılan tüplerdeki serum Zn ile eser element ölçümü için özel üretilmiş tüplerdeki plazma Zn sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır.

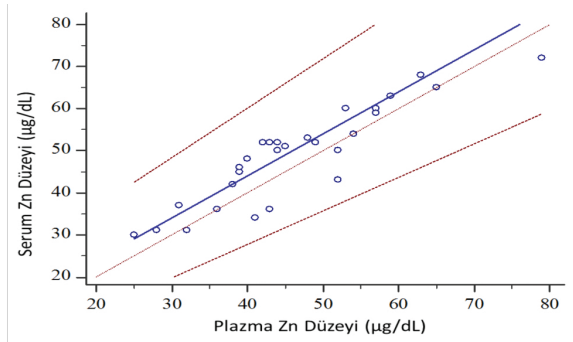
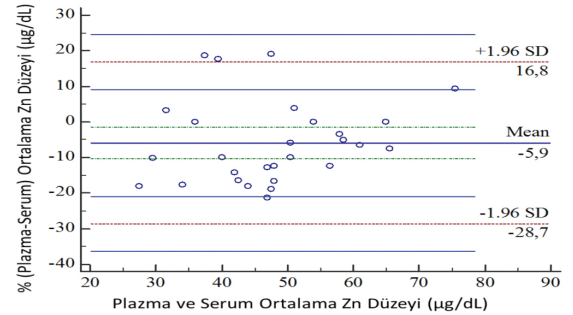
GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışmaya rastgele seçilmiş 27 hasta dahil edildi. Hastalardan eşzamanlı hem pıhtı aktivatörlü jelli tüplere (SST) (SST II Advance, Vacuteiner, Becton Dickinson and Company, ABD) hem sodyum heparin içeren eser element tüplerine (NH) (NH Trace Elements Sodium Heparin, Vacuette, Grenier Bio-One GmbH, Avusturya) kan alındı. Tüplerin fiziksel özellikleri Tablo 1'de belirtildi. SST tüpleri

kanının pıhtılaşması için 30 dk. oda sıcaklığında bekletildikten sonra, NH tüpleri ise bekletilmeden 1.200 g'de 10 dk. santrifüj edildi. Elde ettiğimiz serum ve plazma Zn düzeyleri otoanalizörde (AU 5800, Beckman Coulter Inc., ABD) kolorimetrik yöntem (Sentinel Diagnostic, İtalya) ile çalışıldı. Serum ve plazma Zn düzeyleri arasındaki bias, biyolojik varyasyon kaynaklı izin verilebilir bias kriterine göre değerlendirildi. Sonuçlar arasındaki farkın istatistiksel anlamlılığı verilerin dağılımına göre paired T test ile analiz edildi. Sonuçlar arasındaki ilişki Pearson korelasyon testi, Passing&Bablok regresyon analizi ile değerlendirildi ve Blant&Altman grafiği ile görselleştirildi (Grafik 1).

Tablo 1. Pıhtı aktivatörlü jelli tüp (SST) ve sodyum heparin içeren eser element (NH) tüplerinin fiziksel özellikleri.

	SST	NH
Ayırıcı jel	Polimer jel	Yok
İç kaplama	Silikon	Yok
Tüp duvarı	Polietilen tetrafla	Polietilen tetrafla
Pıhtı aktivatörü	Silika	Yok
Rubber Stopper	Silikon	Brom butil
Antikoagülan	Yok	Sodyum heparin



Grafik 1. Serum ve plazma Zn düzeyleri için Passing&Bablok Regresyon analizi ve Blant&Altman grafiği.

Çalışma için etik kurul onayı alınmıştır (Tarih: 06.10.2016, Karar No: 2016/26-32).

BULGULAR

Serum ve plazma Zn düzeyleri sırasıyla $49,0 \pm 11,5$ $\mu\text{g/dL}$ ve $46,4 \pm 12,0$ $\mu\text{g/dL}$ olarak bulundu ve arasında anlamlı fark saptandı ($p=0,012$). Ayrıca serum ve plazma arasındaki bias %6,8 olup, izin verilebilir biasın (%3,3) üzerindeydi ve fark klinik açıdan anlamlı kabul edildi. Bununla birlikte, regresyon analizine göre serum ve plazma Zn değerleri arasında sistematik ya da rastlantısal hata saptanmadı, hatta güçlü bir ilişki olduğu belirlendi. Serum ve plazma Zn sonuçlarının istatistiksel karşılaştırma bulguları Tablo 2’de gösterildi.

Tablo 2. Serum ve plazma örneklerindeki çinko (Zn) düzeyleri, bias ve p değerleri.

	Serum	Plazma
Ortalama \pm Standart sapma ($\mu\text{g/dL}$)	$49,0 \pm 11,5$	$46,4 \pm 12$
Bias (%)	Serum ve plazma Zn düzeylerinin karşılaştırması	
p değeri	6,8	
Regresyon denklemi	0,012	
Eğim (%95 güven aralığı)	$y=4,000+1,000x$	
Kesim değeri (%95 güven aralığı)	0,800-1,173	
Korelasyon katsayısı (p değeri)	-4,434-13,200	
	0,904 (<0,001)	

TARTIŞMA

Zn düzeyi ölçümü amacıyla yapılan çeşitli matris karşılaştırma çalışmalarında farklı sonuçlar elde edilmiştir. Bir çalışmada, Mona Sandberg ve ark.,⁸ kolorimetrik yöntemle Zn ölçümünde serum (71,9 $\mu\text{mol/L}$) (pıhtı aktivatörlü tüp, Vacuette, Grenier Bio-One GmbH) ve plazma (74,5 $\mu\text{mol/L}$) (lityum heparin, Barricor LH Plasma tube, Becton, Dickinson and Company) arasında anlamlı farklılık bulamamışlardır. Barroso ve ark.’nın⁹ alev atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle yaptıkları çalışmada, serum (77,8 $\mu\text{g/dL}$) (SST tube, Terumo Corporation) ve plazma (77,4 $\mu\text{g/dL}$) (Na heparin trace element tube, Becton Dickinson and Company) Zn düzeyleri arasında anlamlı fark gösterilmemiştir. Yine alev atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile yapılan bir çalışmada, serum ile plazma arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.¹⁰ Wei-je ve ark.¹¹ atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile yaptıkları çalışmada, serum (87,3 $\mu\text{g/dL}$) ve plazma (89,6 $\mu\text{g/dL}$) arasında anlamlı farklılık bulamamışlardır. Foley ve ark.¹² serumda plazmadan %16 daha yüksek Zn düzeyi bulmuşlar ve bunun pıhtılaşma sırasında trombositlerden Zn’nun salınmasının nedeni ile olduğunu belirtmişlerdir. Yapılan çalışmalarda, trombositin Zn içeriğinin plazmanın 30-60 katı olduğu gösterilmiştir.^{13,14} Kasperek ve ark. da,¹⁵ plazmaya göre serumda ortalama 20 ng/mL daha yüksek Zn düzeyi bulmuşlardır. Kraus ve ark.¹⁶ santrifüjden sonraki ilk 8 saatte serum (Sarstedt S-Monovette Z-gel) Zn değerlerini plazmaya göre (Sarstedt S-Monovette LH-Gel ve Sarstedt S-Monovette Metal Analysis) %2,3 ve %1,6 yüksek saptamışlardır. Ivanova ve ark.¹⁷ istatistiksel olarak anlamlı olmasa da serum (70,0 $\mu\text{g/dL}$) (Trace Element Tube Serum, Becton Dickinson and Company) ve plazma (70,2 $\mu\text{g/dL}$) (Trace Element Tube, K2 EDTA, Becton Dickinson and Company) Zn sonuçlarını, Li Heparinli plazmaya (67,0 $\mu\text{g/dL}$) (Barricor Li Heparin, Becton, Dickinson and Company) göre daha yüksek bulmuşlardır. Serumdaki yüksekliği pıhtılaşma sırasında eritrosit ve trombositlerden salınımına, EDTA’lı tüpteki yüksekliği de antikoagülan EDTA’dan Zn’nun sızmasına bağlamışlardır. Daha düşük plazma Zn konsantrasyonunun fazla heparin ya da sitrat kullanımına bağlı olduğunu söyleyen çalışmalar vardır.¹⁸⁻²⁰ Ancak, başka bir çalışmada, heparin kullanımının plazma Zn düzeyini etkilemediğini belirttilmiştir.²¹

Çalışmamızda, serum Zn düzeyini plazmadan %6,8 daha yüksek bulduk. Tablo 1’de belirttiğimiz gibi her iki tüp için de ortak olan özellik tüpün duvar yapısı olan “polietilen tetraflat (PET)”dır. Her 2 tüpün duvar yapısı PET olduğundan, bu interferansın nedeninin, jelli tüpte serumda bulunan Zn’nun separatör jel, silika, silikon, “rubber stopper” dan emilimi ya da bu maddelerden serum Zn salınımı ve pıhtı oluşumu sırasında trombositlerden kaynaklanan Zn olabileceğini düşündük. “Rubber stopper”, kan alma tüplerine uyacak şekilde boyutlandırılmış ve antikoagülan türüne veya separatör jelin varlığına göre renk kodu olan kauçuk tıpa olup, üretiminde Ca, Al, Mg, Zn kullanılmaktadır. Ancak, bu elementlerin kanla temas etmediğini bildiren yayınlar da vardır.^{17,22}

Ayrıca pıhtılaşma sürecinde trombositlerden salınan Zn'nun fibrine bağlanması da sonucu etkileyebilir.²³

SONUÇ

Heparin içeren ve jel bulunmayan eser element tûpünde jel, silika, silikon gibi katkı maddeleri olmaması ve serumdan farklı olarak fibrin oluşmadığından bu tûpün kullanımında olası interferans kaynakları azalmaktadır. Eser element ölçümlerinde klinik yarar açısından jelli pıhtı aktivatörlü tûplerinin kullanımı yaygın olsa da, özel olarak üretilen tûplerin kullanımının daha yararlı olacağı düşüncesindeyiz.

Etik Kurul Onayı: Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurul onayı alındı (06.10.2016/26-32).

Çıkar Çatışması: Yok.

Finansal Destek: Yok.

Hasta Onamı: Yok.

Ethics Committee Approval: Dokuz Eylül University Non-Interventional Research Ethics Committee approval was obtained (06.10.2016/26-32).

Conflict of Interest: None.

Funding: None.

Informed Consent: None.

KAYNAKLAR

1. Miller LV, Hambidge KM, Naake VL, et al. Size of the zinc pools that exchange rapidly with plasma zinc in humans: alternative techniques for measuring and relation to dietary zinc intake. *J Nutr.* 1994;124(2):268-76. doi.org/10.1093/jn/124.2.268. PMID: 8308576.
2. Taylor A. Detection and monitoring of disorders of essential trace elements. *Ann Clin Biochem.* 1996;33(Pt 6):486-510. doi.org/10.1177/000456329603300603. PMID: 8937580.
3. Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, et al. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: Zinc signaling. *J Biol Inorg Chem.* 2011;16(7):1123-34. doi.org/10.1007/s00775-011-0797-4. Epub 2011 Jun 10. PMID: 21660546; PMCID: PMC3176402.
4. Faure P. Protective effects of antioxidant micronutrients (vitamin E, zinc and selenium) in type 2 diabetes mellitus. *Clin Chem Lab Med.* 2003;41(8):995-8. doi.org/10.1515/CCLM.2003.152. PMID: 12964803.
5. Truong-Tran AQ, Ho LH, Chai F, et al. Cellular zinc fluxes and the regulation of apoptosis/gene-directed cell death. *J Nutr.* 2000;130(5S Suppl):1459S-66S. doi.org/10.1093/jn/130.5.1459S. PMID: 10801960.
6. Rifai N, et al. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* six edition. 2018; p.713.
7. Lockitch G, Fasset J, Gerson B, et al. Control of preanalytical variation in trace-element determinations; approved guideline. 1997, NCCLS document C38-A. NCCCLAS, Pensilvania.
8. Sandberg M. Hur ska man diagnostisera zinkbrist?. How to diagnose zinc deficiency? Wågsäter Linköpings universitet | Medicinska fakulteten Examensarbete. 15 hp Biomedicinska analytikerprogrammet Vårterminen 2016.
9. Barroso I, Farinha R, Guimarães JT. Proper zinc evaluation in clinical practice: Effect of sample type and its stability. *Clin Biochem.* 2018;59:93-5. doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2018.07.001. Epub 2018 Jul 4. PMID: 30111511.
10. Kosman DJ, Henkin RL. Plasma and serum zinc concentrations. *Lancet.* 1979;1(8131):1410. doi.org/10.1016/S0140-6736(79)92047-6. PMID: 87873.
11. Chen WJ, Zhao CY, Zheng TL. Comparison of zinc contents in human serum and plasma. *Clin Chim Acta.* 1986;155(2):185-7. doi.org/10.1016/0009-8981(86)90282-2. PMID: 3698315.
12. Foley B, Johnson SA, Hackley B, et al. Zinc content of human platelets. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1968;128(1):265-9. doi.org/10.3181/00379727-128-32993. PMID: 5656702.
13. Marx G, Korner G, Mou X, et al. Packaging zinc, fibrinogen, and factor XIII in platelet alpha-granules. *J Cell Physiol.* 1993;156(3):437-42. doi.org/10.1002/jcp.1041560302. PMID: 8360253.
14. Vu TT, Fredenburgh JC, Weitz JI. Zinc: an important cofactor in haemostasis and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2013;109(3):421-30. doi.org/10.1160/TH12-07-0465. Epub 2013 Jan 10. PMID: 23306381.
15. Kasperek K, Kiem J, Iyengar GV. Concentration differences between serum and plasma of the elements cobalt, iron, mercury, rubidium, selenium and zinc determined by neutron activation analysis. *The Science of the Total Environment.* 1981;17:133-43. doi.org/10.1016/0048-9697(81)90179-0
16. Kraus FB, Ludwig-Kraus B. Measuring zinc on the Roche cobas c502 analyzer-Validation, comparison, and pre-analytic aspects. *Journal of clinical laboratory analysis.* 2018;32(1): e22169. doi.org/10.1002/jcla.22169
17. Ivanova I, Atanasova B, Vodenicharov V, et al. Blood collection tubes: An aspect of preanalytical variations of copper and zinc analyses. *International Journal of Current Medical and Pharmaceutical Research.* 2017; 2081-4. doi.org/10.24327/23956429.ijcmpr20170159
18. Smith JC Jr, Lewis S, Holbrook J, et al. Effect of heparin and citrate on measured concentrations of various analytes in plasma. *Clin Chem.* 1987;33(6):814-6. PMID: 3594823.
19. Makino T. A potential problem on comparison of plasma with serum for zinc content. *Clin Chem.* 1983;29/6:1313-4.
20. Smith JC, Holbrook JT, Danford DE. Analysis and evaluation of zinc and copper in human plasma and

- serum. *J Am Coll Nutr.* 1985;4(6):627-38. doi.org/10.1080/07315724.1985.10720105. PMID: 4078201.
21. English JL, Hambidge KM, Goodall MJ Evaluation of some factors that may affect plasma or serum zinc concentrations. In *Trace Elements in Man and Animals 6*, 1988, (pp. 459-460). Springer, Boston, MA. doi.org/10.1007/978-1-4613-0723-5_159
22. van den Besselaar AM, van Dam W, Sturk A, et al. Prothrombin time ratio is reduced by magnesium contamination in evacuated blood collection tubes. *Thromb Haemost.* 2001;85(4):647-50. PMID: 11341499.
23. Henderson SJ, Xia J, Wu H, et al. Zinc promotes clot stability by accelerating clot formation and modifying fibrin structure. *Thromb Haemost.* 2016;115(3):533-42. doi.org/10.1160/TH15-06-0462. Epub 2015 Oct 22. PMID: 26489782.