

Ispitivanje parametara hemolize kod pacijenata na izvantjelesnoj membranskoj oksigenaciji

Vrzić, Darija

Master's thesis / Diplomski rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Faculty of Medicine Osijek / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Medicinski fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:152:577454>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-19**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Medicine Osijek](#)



SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Darija Vrzić

**ISPITIVANJE PARAMETARA
HEMOLIZE KOD PACIJENATA NA
IZVANTJELESNOJ MEMBRANSKOJ
OKSIGENACIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

MEDICINSKI FAKULTET OSIJEK

DIPLOMSKI SVEUČILIŠNI STUDIJ MEDICINSKO

LABORATORIJSKA DIJAGNOSTIKA

Darija Vrzić

**ISPITIVANJE PARAMETARA
HEMOLIZE KOD PACIJENATA NA
IZVANTJELESNOJ MEMBRANSKOJ
OKSIGENACIJI**

Diplomski rad

Osijek, 2022.

Rad je ostvaren u: Kliničkom bolničkom centru Zagreb, Kliničkom zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjelu za hitnu laboratorijsku dijagnostiku i pretrage uz bolesnika.

Mentor rada: doc. dr. sc. Vatroslav Šerić, mag. med. biochem.

Rad ima 49 listova, 6 tablica i 11 slika.

ZAHVALA

Najviše zahvaljujem svom suprugu Dejanu i sinovima Luki i Marku na strpljenju i bezrezervnoj podršci. S vama sve, bez vas ništa.

Veliko hvala mojim roditeljima, Darku i Štefici, na svakoj molitvi, riječima utjehe i ohrabrenja.

Također se zahvaljujem mentoru docentu Vatroslavu Šerić, na prihvaćanju mentorstva i savjetima.

I na kraju, ali ne i manje bitno, hvala mojim hitnjacima, a posebno magistrama Ivani i Ani na pomoći i razumijevanju tijekom studija.

„Ulaganje u znanje uvijek plaća najbolji interes.“

Benjamin Franklin.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
1.1. Intravaskularna hemoliza.....	1
1.2. Izvantjelesna membranska oksigenacija.....	4
1.2.1. Vensko-venski ECMO	8
1.2.2. Vensko-arterijski ECMO.....	9
1.2.3. Hibridni oblici ECMO potpore	9
2. CILJ.....	14
3. MATERIJAL I METODE	15
3.1. Ustroj studije.....	15
3.2. Materijal.....	15
3.3. Metode	16
3.3.1. Spektrofotometrijska Harboe metoda.....	16
3.3.2. Automatizirana metoda mjerenja serumskih indeksa.....	17
3.4. Statističke metode.....	19
4. REZULTATI.....	21
4.1. Obilježja cijelog uzorka	21
4.2. Uzorak s višim stupnjem ikterije	23
4.3. Uzorak s interferencijom (LI) u dozvoljenim rasponima	25
4.4. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda kod nasumičnog odabira uzoraka pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori.....	28
5. RASPRAVA	31
6. ZAKLJUČAK	35
7. SAŽETAK	36
8. SUMMARY	37
9. LITERATURA	38
10. ŽIVOTOPIS.....	43

KRATICE

ECMO - izvantjelesna membranska oksigenacija (prema engl. *Extracorporeal membrane oxygenation*)

NO - dušikov oksid

LDH - laktat dehidrogenaza

ROS - reaktivne kisikove vrste

1 O₂ - atomarni kisik

OH· - hidroksilni slobodni radikal

NET - neutrofilne ekstracelularne zamke

ARDS - akutni respiratorni distress sindrom (prema engl. *Acute respiratory distress syndrome*)

RPM - broj okretaja u minuti (prema engl. *Run per minute*)

PaO₂/FiO₂ - omjer parcijalnog arterijskog tlaka kisika i udjela kisika u udahnujoj smjesi (prema engl. *Partial arterial pressure of oxygen/fraction of inspired oxygen ratio*)

PEEP - pozitivan tlak na kraju izdisaja (prema engl. *Positive end-expiratory pressure*)

DIK - diseminirana intravaskularna koagulopatija

ACT - aktivirano vrijeme zgrušavanja (prema engl. *Activated clotting time*)

IVD - *in vitro* dijagnostika (prema engl. *In Vitro Diagnostics*)

FDA - američka Agencija za hranu i lijekove (prema engl. *U.S. Food and Drug Administration*)

CE - oznaka europske sukladnosti (prema engl. *European Conformity*)

POCT - pretrage uz krevet bolesnika (prema engl. *Point of Care Testing*)

1. UVOD

Hemoglobin, protein nazvan krvnom bojom, nalazi se unutar eritrocita i značajne količine slobodnog hemoglobina (izvan eritrocita) normalno nisu prisutne u plazmi. Intravaskularna hemoliza je stanje dezintegracije krvnih stanica i posljedično otpuštanje slobodnog hemoglobina u plazmu. Hemoglobin otpušten u plazmu premašuje sposobnost vezanja specifičnih bjelančevina (npr. haptoglobina, globulina koji se normalno nalazi u plazmi u koncentracijama oko 1,0 g/l) te dolazi do hemoglobinurije. Nevezani se hemoglobin reapsorbira u stanicama bubrežnih kanalića, gdje se željezo pretvara u hemosiderin, kojega se dio ponovno iskorištava, a dio odlazi mokraćom kako se ljušte epitelne stanice bubrežnih kanalića.

Intravaskularna hemoliza može nastati kao posljedica patoloških stanja kao što su neželjena reakcija antigen-antitijelo, hemolitičke anemije, trovanja te primjene različitih terapijskih postupaka kao što su hemodijaliza, izvantjelesna membranska oksigenacija (ECMO, prema engl. *Extracorporeal membrane oxygenation*), ugradnja srčanih zalistaka i slično. Do danas i uz trenutno dostupne tehnologije, hemoliza je neizbježna nuspojava svake izvantjelesne cirkulacije, osobito kada je potreban visok protok krvi za potporu respiratornog ili srčanog zatajenja, kao tijekom ECMO potpore. Biološki gledano, klasične promjene povezane s hemolizom su: porast laktat dehidrogenaze i fosfata, pad hemoglobina, smanjenje haptoglobina, povećanje nekonjugiranog bilirubina i hiperkalijemija u teškim oblicima.

Budući da je povišenje vrijednosti laktat dehidrogenaze potpuno nespecifično, haptoglobin je često već snižen, a povećanje nekonjugiranog bilirubina je odgođeno, određivanje vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi predstavlja ključni biološki biljeg za procjenu stupnja hemolize.

1.1. Intravaskularna hemoliza

Hemoglobin je tetramer koji se sastoji od dvaju parova globinskih polipeptidnih lanaca. Jedna molekula hemoglobina sadrži 4 molekule hema. Hem se sintetizira u mitohondrijima eritroblasta. Svaka od tih molekula veže se za jednu molekulu globina. Na hem otpada 4 % molekule hemoglobina dok polipeptid globin čini 96 % cjelokupne molekule hemoglobina.

Osnovne funkcije hemoglobina su unutarnje disanje, prijenos kisik iz pluća u tkiva te ugljikova dioksida natrag iz tkiva u pluća. Hemoglobin također sudjeluje u prijenosu dušikova oksida (NO) koji je vrlo jaki vazodilatator.

Prerano raspadanje eritrocita, hemoliza, je oslobađanje hemoglobina i drugih unutarstaničnih sastojaka eritrocita u izvanstaničnu tekućinu. Lokalizaciju hemolize određuju težina i oblik promjene eritrocita. Hemoliza može nastati intravaskularno (*in vivo*) i ekstravaskularno (*in vitro*). Razaranje eritrocita od strane makrofaga, tzv. ekstravaskularna hemoliza, posljedica je aktivacije makrofaga specifičnim imunoglobulinima na površini eritrocita kao i zbog fizičkih promjena u samoj strukturi membrane eritrocita. Ona je češća i uzrokovana je nepravilnim uzorkovanjem krvi, nepravilnim rukovanjem ili centrifugiranjem (1, 2).

Ako je eritrocit jako oštećen u cirkulaciji nastati će intravaskularna hemoliza, što se u normalnim uvjetima rijetko događa. Oštećeni se eritrociti u većini slučajeva odstranjuju ekstravaskularnom hemolizom u mononuklearnom-makrofagnom sustavu koštane srži, jetre i slezene. Životno ugrožavajuće stanje, intravaskularna hemoliza, dominantni je način destrukcije eritrocita u nekim hemolitičkim stanjima i poremećajima kao što su ABO inkompatibilne transfuzijske reakcije, komplementom inducirane hemolize u paroksizmalnoj noćnoj hemoglobinuriji, hemolizi prisutnoj kod umjetnih srčanih zalistaka, primjene različitih terapijskih postupaka poput hemodijalize ili ECMO potpore gdje je neizbježna nuspojava zbog izvantjelesne cirkulacije kada je potreban visok protok krvi za potporu respiratornog ili srčanog zatajenja, pri traumatskom oštećenju eritrocita u cirkulaciji poput „marš hemoglobinurije“ ili djelovanjem vanjskog bakterijskog toksina kod sepse.

U ukupnom postotku svih hemoliziranih uzoraka intravaskularna hemoliza zauzima 3,2 % (1, 2). Karakteristične promjene u intravaskularnoj hemolizi su hemoglobinemija, hemoglobinurija te hemosiderinurija i methemalbuminemija uz snižen haptoglobin te povišen LDH. Intravaskularna hemoliza rezultira pojavom slobodnog hemoglobina u plazmi čija koncentracija često premašuje sposobnost vezanja na specifične proteine poput haptoglobina. Organizam nastoji kompenzirati ubrzano propadanje eritrocita. Koštana srž ima sposobnost povećati stvaranje eritrocita do 6 puta iznad normale, odnosno organizam je sposoban kompenzirati anemiju sve dok se životni vijek eritrocita ne skрати ispod 20 dana. U intravaskularnoj hemolizi dolazi do oslobađanja toksičnih komponenti hemoglobina i hema, koji su tipično sadržani unutar eritrocita, u cirkulaciju. Primarni akutni patofiziološki odgovor na izvanstanični hemoglobin u plazmi je povišeni krvni tlak te prooksidacijski toksični učinak

koji se javlja u vaskularnom i bubrežnom tkivu kao i porast tlaka u plućnoj arteriji. Sustav kojim se ograničava toksični učinak komponenti eritrocita obuhvaća topive proteine plazme, među kojima su najvažniji haptoglobin i hemopeksin.

Haptoglobin, prva linija obrane, ireverzibilno se veže za oslobođeni hemoglobin. Tako nastali kompleks brzo se uklanja iz cirkulacije endocitozom posredovanom receptorima (CD-163 receptori čistači) te razgrađuje u jetri što posljedično dovodi do smanjenja plazmatskoga haptoglobina. Slobodni hemoglobin može nadići taj sustav i uzrokovati pojačanu potrošnju endogenoga dušikovog oksida (NO) te formiranje methemoglobina. Hemopeksin je protein akutne faze, primarno eksprimiran u jetri, koji veže hem, a nastali se kompleks uklanja endocitozom posredovanom receptorima (3). Slobodni hemoglobin autooksidira u methemoglobin i sudjeluje u pseudoperoksidaznom ciklusu stvarajući reaktivne kisikove vrste (ROS). Hem, koji sadrži željezo, također sudjeluje u stvaranju ROS-a Fentonovom reakcijom pri čemu nastaju sekundarni produkti redukcije molekule kisika. Ovom reakcijom superoksidni anion i vodikov peroksid uzajamno reagiraju dajući bezopasni hidroksilni ion i dvije vrlo reaktivne molekule, atomarni kisik (1 O_2) i hidroksilni slobodni radikal ($\text{OH}\cdot$), najopasniji kisikov derivat.

Svojim djelovanjem hem i slobodni hemoglobin mogu izazvati vaskularnu disfunkciju i upalu. Prvi mehanizam štetnoga djelovanja je poremećaj u ravnoteži između NO-a, važnoga regulatora vazodilatacije i vazokonstrikcije, i ROS-a. NO i oksihemoglobin mogu brzo i ireverzibilno reagirati, ali budući da hemoglobin nije slobodan nego je odijeljen u eritrocitima taj je proces obično ograničen. Kod intravaskularne hemolize hemoglobin cirkulira slobodan ili u obliku mikrovezikula. Mikrovezikule mogu brzo reagirati s NO-om. Zbog smanjene biodostupnosti NO-a nastaje vazomotorna nestabilnost, disfunkcija endotela i sistemska vazokonstrikcija što posljedično uzrokuje povećanje sistemskog vaskularnog otpora te dovodi do povećanja sistoličkoga, dijastoličkoga i prosječnoga arterijskog krvnog tlaka sa smanjenim ili nepromijenjenim srčanim minutnim volumenom, smanjene perfuzije bubrega i drugih organa (3). NO inhibira agregaciju trombocita i ekspresiju endotelnih adhezijskih molekula, pa smanjena biodostupnost NO-a tijekom hemolize može dovesti do aktivacije trombocita i sustava hemostaze. NO također utječe na koagulacijsku kaskadu inhibirajući faktor XIII. Hem i hemoglobin mogu posredovati u aktivaciji urođenoga imunostnoga sustava uzrokujući migraciju makrofaga i neutrofila u pluća i oslobađanje neutrofilnih ekstracelularnih zamki (NET). Taj proces inducira aktivaciju upale, tromboze i odlaganje fibrina (3).

1.2. Izvantjelesna membranska oksigenacija

Izvantjelesna membranska oksigenacija (ECMO, prema engl. *Extracorporeal Membrane Oxygenation*) tehnika je pružanja produžene izvantjelesne cirkulacijske ili respiracijske potpore tijekom koje se s pomoću posebnog uređaja venska krv odvodi iz organizma, oksigenira i zatim vraća u organizam. Osnovni cilj ECMO-a jest zadovoljavajuća opskrba tkiva kisikom i odstranjivanje ugljikova dioksida u bolesnika s teškim oblicima zatajivanja rada srca ili pluća, kada su refraktarni na konvencionalno liječenje (4). Ovakav oblik potpore primjenjuje se primarno kod bolesnika sa životno ugrožavajućim oblicima zatajivanja rada srca ili pluća. U današnje vrijeme indikacije za ECMO potporu su značajno proširene te obuhvaćaju određene bolesnike s ireverzibilnim oštećenjem ciljnih organa, zastojem srca, kao i bolesnike podvrgnute rizičnim postupcima u intervencijskoj kardiologiji (5). Postupak je prvi puta uspješno primijenjen 1971. godine kod bolesnika s traumatskim akutnim respiratornim distress sindromom (ARDS, prema engl. *Acute respiratory distress syndrome*). ECMO potpora je nezaobilazno sredstvo u liječenju teške kardiorespiratorne disfunkcije u svim dobnim skupinama pacijenata više od 3 desetljeća. Od 2015. godine Organizaciji za izvantjelesno održavanje života prijavljeno je > 78 000 slučajeva, a broj centara koji prijavljuju u ovu međunarodnu bazu podataka, sada prelazi 300 na globalnoj razini, te se stalno povećava (6).

Osnovne dijelove ECMO sustava čine: mehanička krvna pumpa koja vrši izvantjelesni protok krvi, membranski oksigenator u kojem se odvija izmjena plinova, cijevi i kanile kroz koje se odvija prijenos krvi iz bolesnika do membranskog oksigenatora i natrag u bolesnika, kao i mješalac plinova te grijalica jedinica. Zahvaljujući negativnom tlaku koji stvara mehanička pumpa deoksigenirana venska krv odvodi se iz organizma preko „pristupne“ kanile postavljene u venski dio cirkulacije. Pumpa zatim potiskuje krv prema oksigenatoru u kojem se krv obogaćuje kisikom, uz istodobno odstranjivanje ugljikova dioksida. U situacijama kada je potrebno održavati temperaturu krvi i tijela na određenoj razini, krv obogaćena kisikom usmjerava se u izmjenjivač topline, gdje se zagrijava ili hladi. Potom se preko „povratne“ kanile odvija povrat bilo u arterijski ili venski dio cirkulacije.

ECMO krugovi mogu varirati od jednostavnih do složenih i mogu uključivati razne monitore protoka krvi i tlaka, kontinuirani monitoring zasićenja oksihemoglobinom, mjesta pristupa krugu i most koji povezuje venski pristup i arterijsku infuziju na krajevima kruga. Krv je izložena velikoj površini dok se kreće kroz ECMO krug, uzrokujući značajan gubitak topline,

pa se kod djece na ECMO potpore krv izravno zagrijava kako bi održala tjelesnu temperaturu. ECMO krugovi moraju biti funkcionalni i prenosivi i u idealnom slučaju treba pokušati ograničiti veličinu umjetne površine kruga. Kada je krv izložena nebiološkim površinama kruga, pokreće se složeni biološki odgovor koji uključuje i put koagulacije i put upalnog odgovora. ECMO krugovi mogu uključivati most od cijevi koji povezuje proksimalni venski pristupni ekstremitet kruga s proksimalnim arterijskim infuzijskim ekstremitetom kruga. Ovaj most se koristi za recirkulaciju krvi kroz krug ako se pacijent mora privremeno ukloniti iz potpore. Pacijent se može isključiti iz ECMO kruga kako bi se utvrdilo može li se održati odgovarajuća izmjena plinova i hemodinamika dok se protok nastavlja kroz most. ECMO krugovi mogu biti pripremljeni s kristaloidima za relativno brzo korištenje i sigurno pohranjeni do 30 dana. Ako vrijeme dopušta, većina pedijatrijskih pacijenata dobiti će ECMO krug pripremljen s krvlju. Sastav krvi obično sadrži mješavinu eritrocita, albumina, svježe smrznute plazme, nefrakcioniranog heparina i kalcija.

Osnovna komponenta ECMO kruga je mehanička pumpa. Poluokluzivne valjkaste pumpe bile su standard desetljećima, ali su u današnje vrijeme uglavnom zamijenjene novim centrifugalnim pumpama. ECMO pumpa mora osigurati protok prikladan za pacijenta (obično 75 – 150 mL/kg/min za dojenčad i djecu), unutar sigurnog raspona tlakova kako bi se izbjegla hemoliza. Izlazni tlak je funkcija brzine pumpe i otpora cijevi, kanile i arterijskog tlaka pacijenta. Rizik kod visokog izlaznog tlaka je puknuće kruga. Krug bi trebao izdržati tlak od 600 mm Hg, ali se 300 mm Hg smatra gornjom sigurnom granicom za većinu primjena. Rizik niskog ulaznog tlaka je hemoliza. Centrifugalna pumpa, u kojoj rotor koji se okreće stvara protok i tlak, zamjenjuje valjkastu pumpu. Smještena je ispred oksigenatora. Pomoću centrifugalne pumpe krv se preko dovodne linije usmjerava u oksigenator. Za razliku od valjkastih pumpi, motor centrifugalne pumpe je lagan i malen, komponente se ne troše, a perfuzijski tlak je ograničen brojem okretaja u minuti (RPM, prema engl. *Run per minute*), tako da je tlak u povratnom vodu nizak, a puknuće kruga iznimno rijetko. Potencijalni problemi glave centrifugalne pumpe uključuju stagnaciju i zagrijavanje u glavi crpke, što dovodi do stvaranja tromba pri niskim protocima ili ako je izlazni vod začepljen, te hemolizu kada je ulazni vod začepljen. Nove generacije centrifugalnih pumpi za dugotrajnu upotrebu imaju rupu u središtu rotora koja rješava probleme stagnacije, tromboze i zagrijavanja. Kada je venska linija začepljena, rotor se nastavlja vrtjeti, evakuirajući krv iz glave pumpe i stvarajući vakuum što uzrokuje kavitaciju i hemolizu. To se događa u sekundi (milisekunde pri visokim okretajima), tako da nijedan regulacijski sustav nije dovoljno brz da spriječi kavitaciju. Problem

se može minimizirati ugradnjom sklopivog mjehura u vensku liniju da djeluje kao mini rezervoar regulacijom broja okretaja pumpe na temelju senzora ulaznog tlaka, što sprječava nastavak usisavanja kada je vod začepljen više od nekoliko sekundi. Hemoliza može biti uzrokovana stvaranjem topline i tromba u glavi pumpe, stagnirajućim ili turbulentnim zonama protoka krvi u glavi pumpe, oksigenatoru ili drugim mjestima u krugu, posmičnim naprezanjem uzrokovanim velikim brzinama protoka krvi, prekomjernim usisom i trombozom kruga. Istraživanja pokazuju da je jedan od mogućih razloga nastanka hemolize stvaranje mikro mjehurića zraka u pumpi zbog razvoja visokog negativnog tlaka u dovodnoj liniji (7). Rizik nastanka tromba smanjuje se ujednačenim jednosmjernim strujanjem i manjom stagnacijom, dok smanjeni stres smicanja umanjuje hemolizu.

Ovisno o konfiguraciji ECMO potpore, drenažna ili dovodna linija dovodi neoksigeniranu krv u oksigenator, a spaja se na vensku (dovodnu) kanilu koja ulazi u izabranu venu ili desni atrij. Povratna ili odvodna linija odvodi oksigenu krv iz oksigenatora, a spaja se na arterijsku (odvodnu) kanilu koja izlazi iz kanilirane arterije ili ascendentne aorte. Unutrašnji promjer kanile dominantno određuje otpor protoku krvi koji se eksponencijalno povećava povećanjem protoka. Kao i druge komponente modernog ECMO kruga, vaskularne kanile su doživjele značajne promjene dizajna koje su poboljšale učinkovitost protoka krvi kao i ukupni učinak. Jednoluminalne kanile se koriste za osiguravanje venskog i arterijskog pristupa kod pacijenata koji su podvrgnuti V-A ECMO potpori ili venskog pristupa na više mjesta za pacijente podvrgnute V-V ECMO potpori. Većina kanila proizvedena je od biokompatibilnog poliuretana, koji može biti obložen heparinom ili ne-heparinskim polimerima koji mogu smanjiti aktivaciju trombocita i upalni odgovor na sučelju krv-kanila (8). Većina je kanila ojačana žicom koja je dizajnirana da spriječi okluziju. Osim toga, neke imaju savitljivu žicu duž duljine stijenke kanile koja se može koristiti za prilagođavanje kuta umetanja i položaja unutar srca kada se koristi tijekom ECMO-a otvorenog prsnog koša. Dostupne su različite konfiguracije vrha kanile. Dvoluminalne kanile pružaju vensku potporu preko jednog jugularnog venskog pristupa. Krv se pacijentu vadi kroz jedan lumen, a zatim se vraća pacijentu kroz manji lumen. Pravilno pozicioniranje vrha kanile u blizini donjeg kavoatrijalnog spoja neophodno je za optimalnu izvedbu kanile. Odvodni i povratni otvori za krv prostorno su odvojeni kako bi se smanjila recirkulacija krvi unutar ECMO kruga, te poboljšala oksigenacija tijekom V-V ECMO potpore (9). Ehokardiografsko ili fluoroskopsko snimanje potrebno je za provjeru pravilnog postavljanja kanile.

Ekstrakorporalna izmjena kisika i ugljikova dioksida odvija se jednostavnom difuzijom unutar umjetnog pluća ili membranskog oksigenatora, koji sadrži snopove umjetnih kapilara ili šupljih vlakana koji služe kao kanali za krv, plin i vodu. Svježi plin usmjerava se u lumen vlakna, dok krv prolazi izvana, a termoregulirana voda teče kroz susjedne kanale. Oksigenator je uređaj za izmjenu plinova, dodavanje kisika i uklanjanje ugljikova dioksida iz krvi. Izmjena plinova u oksigenatoru ovisi o protoku krvi, brzini protoka zraka i koncentraciji kisika. Razinu kisika koji se isporučuje iz oksigenatora primarno definiraju brzina protoka krvi i koncentracija kisika koji ulazi u oksigenator. Razinu ugljikova dioksida definira brzina protoka kisika. Površina i miješanje krvnog puta određuju maksimalan kapacitet oksigenacije bilo kojeg uređaja za izmjenu plina. Protok oksigenatora definiran je količinom nezasićene (75 %) krvi koja može biti gotovo potpuno zasićena (95 %) u minuti. U samim začetima primjene ECMO potpore membrane oksigenatora bile su napravljene od polietilena. U idućim godinama primat preuzimaju silikonske membrane. Membrana oksigenatora sadrži milijune mikropora sačinjenih od vlakana hidrofobnih polimera kroz čiji lumen teče kisik, a oko njih protječe krv. Ovakvim se načinom izbjegava direktni kontakt krvi i plina. Difuzija i prijenos plinova kroz membranu oksigenatora ovise o površini membrane i gustoći hidrofobnih vlakana, kao i o visini protoka krvi koja ulazi u oksigenator te brzini protoka kisika kroz oksigenator. Kolobow umjetno pluće standardni je oksigenator koji se koristi za ECMO aplikacije. Sastoji se od ravnog ojačanog omotača od silikonske gume omotane oko žičane mreže u spiralnoj zavojnici. Protok krvi i plina u protustrujnim smjerovima unutar silikonskog pluća i izmjena plinova odvija se difuzijom kroz membranu. Ovaj membranski oksigenator vrlo je učinkovit u izmjeni kisika i ugljikova dioksida, ali je potrebno imati na raspolaganju različite veličine. Za manja pluća sa silikonskom membranom potreban je poseban izmjenjivač topline. Silikonska pluća imaju visoku otpornost na protok što ograničava maksimalni protok krvi koji bi se inače mogao postići kroz uređaj i čini ih manje prikladnim za upotrebu s centrifugalnim pumpama. Po prirodi svog dizajna i visoke otpornosti, silikonski oksigenator mnogo je teže odzračiti, pa mu je potrebno dulje vrijeme za punjenje i teži je za transport. Unatoč tim ograničenjima, Kolobow membranska pumpa za pluća desetljećima je služila potrebama ECMO sustava. Napredak u tehnologiji omogućio je izradu membrane oksigenatora od polimetilpentenskih šupljih vlakana čime je omogućena bolja oksigenacija krvi na manjoj površini. Glavni cilj u dizajnu potrošnog materijala za ECMO potporu jest proizvesti dijelove ECMO sustava što manjih površina s visokom učinkovitošću koji će omogućiti visoku kompatibilnost s krvlju a sve u svrhu sprječavanja komplikacija koje mogu nastati djelovanjem koagulacijske kaskade i imunološkog sustava. Kompaktnijim oksigenatorima i optimiziranjem protoka krvi moguće je smanjiti

površinu membrane i izmjenjivača topline, čime se smanjuje njihov potencijal za stvaranje tromba i aktivaciju upale. Mali primarni volumen omogućuje korištenje jednog uređaja za sve pacijente, a ovi se krugovi mogu ostaviti sastavljeni i napunjeni kristaloidima. Oksigenatori nove generacije sadrže integrirani uređaj za izmjenu topline, što omogućuje preciznu kontrolu tjelesne temperature bez potrebe za dodatnim komponentama. Rano iskustvo u radu sa polimetilpentenskim oksigenatorima pokazalo je da su robusni i dugotrajni, s ograničenjem upalnog odgovora i smanjenim potrebama za transfuzijom, što ih čini vrlo prikladnim za dugotrajnu upotrebu (10). Uređaj koji u oksigenator isporučuje određeni postotak te željenu brzinu protoka kisika je elektronski mješalac plinova. Temperaturu krvi koja prolazi kroz oksigenator kontrolira grijaća jedinica.

Tri su različita načina ECMO potpore:

- vensko-venski (V-V)
- vensko-arterijski (V-A)
- hibridni oblici ECMO potpore.

Odluka o primjeni nekog od navedenih načina primarno ovisi o srčanoj funkciji.

1.2.1. Vensko-venski ECMO

Primjenom V-V ECMO načina rada venska se krv iz bolesnika odvodi preko pristupne kanile, koja je najčešće pozicionirana u femoralnu venu, te se potom oksigenirana krv vraća u venski sustav povratnom kanilom smještenom u unutarnjoj jugularnoj veni. Na ovaj se način osigurava oksigenacija i uklanjanje ugljikova dioksida iz venske krvi, a ujedno smanjuje razina potrebne mehaničke ventilacije te minimizira rizik od ozljede pluća (11). Budući da se oksigenirana krv ponovno vraća u venski dio cirkulacije, ovaj način konfiguracije ne osigurava hemodinamsku potporu te se primjenjuje kod bolesnika bez značajnije srčane disfunkcije kojima je potrebna isključivo respiracijska potpora. Učestalost komplikacija prilikom primjene V-V ECMO potpore znatno je niža jer za razliku od V-A ECMO načina omogućuje potporu fiziološke hemodinamike uz minimalni rizik od neželjnog tromboembolijskog događaja a ujedno ne postoji potreba za kanilacijom arterija (12).

1.2.2. Vensko-arterijski ECMO

Kod primjene V-A ECMO-a oksigenirana se krv vraća u organizam preko povratne kanile koja se postavlja u jednu od velikih arterija. Ovakvim se načinom potpore, kao i kod standardnoga kardiopulmonalnoga premoštenja, zaobilazi srce i pluća te preuzima ili podržava cirkulacijska funkcija srca. Isto tako, V-A ECMO istodobno može preuzeti ili poduprijeti funkciju izmjene plinova u krvi. Time je sustavni arterijski protok rezultat protoka u cirkulacijskome krugu i vlastita izbačaja lijeve klijetke. Primjenu nalazi kod lijevostranog i desnostranog srčanog zatajenja (13). Dva su oblika V-A ECMO-a, centralni i periferni.

Kod centralnog V-A ECMO-a kanile se postavljaju u centralne strukture (desna pretklijetka i uzlazna aorta) otvorenim kirurškim pristupom. Primjenjuje se nakon kardiokirurških zahvata u slučajevima otežanog odvajanja bolesnika od stroja za izvantjelesni krvotok ili kod teških oblika kardiorespiratornog zatajivanja, kada su potrebni visoki protoci za postizanje dostatne perfuzije tkiva (14).

Perifernim V-A ECMO-om kaniliraju se velike periferne krvne žile (najčešće u femoralnoj regiji), bilo perkutanom pristupom ili kirurškom preparacijom. Ovakva konfiguracija osigurava pretežno cirkulacijsku potporu te nije indicirana kod bolesnika s respiratornom insuficijencijom (15). Kod bolesnika u kardiorespiratornom arestu, periferni V-A ECMO s malim kanilama koje se postavljaju perkutanom putem, tzv. niskoprotočni vensko-arterijski ECMO, omogućuje vrlo brzi početak hemodinamske potpore (16).

1.2.3. Hibridni oblici ECMO potpore

Ukoliko tijekom ECMO potpore perfuzija i oksigenacija postanu neadekvatne, ako se ne ispunjavaju terapijski ciljevi ili nastanu komplikacije kao rezultat postavljene kanilacije kao što je diferencijalna hipoksemija nužno je uzeti u obzir i druge modalitete kanilacije. Optimalna dostava kisika kao i perfuzija ciljnih organa ostvaruje se na način da se u ECMO cirkulacijski krug dodaje dodatna kanila koja se postavlja u venu ili arteriju ovisno o hemodinamskim parametrima bolesnika. Dodatna kanila tijekom ECMO potpore povećava rizik od krvarenja zbog kontinuirane antikoagulantne terapije poglavito u arterijskoj vaskulaturi. Osim vaskularnih komplikacija, izbor treće ili četvrte kanile osigurava dodatno ulazno mjesto za

infekciju ili trombozu. S fiziološke strane, povrat krvi u venski sustav je uvijek veći u odnosu na arterijski sustav zbog izostanka otpora u venskoj cirkulaciji. Upravo zbog toga, na jednu od povratnih linija treba biti postavljen senzor protoka i stezaljka kojom se omogućava ili ograničava dostava krvi u određenu povratnu kanilu. Minimalni protok do svake kanilirane krvne žile trebao bi biti najmanje 1 l/min kako bi se izbjegao nastanak tromba (17). Ukoliko dođe do pogoršanja hemodinamskog stanja bolesnika te razvoja znakova kardiogenog šoka, kao rezultat zatajenja desne ili lijeve strane srca, kod bolesnika na V-V ECMO potpori nužno je osigurati cirkulacijsku potporu. Ovakva se potpora postiže dodavanjem arterijske kanile u ECMO sustav. Navedena ECMO konfiguracija (opisana kao veno-arterijsko-venska (VA-V ECMO) potpora) pruža potporu cirkulaciji putem arterijske kanile uvedene preko femoralne arterije ili arterije subklavije (18). U situacijama kada V-A ECMO potpora ne osigurava dovoljnu količinu oksigenirane krvi u gornjem dijelu tijela bolesnika („Harlekin sindrom“ ili „Sindrom sjever/jug“), dodatna dovodna kanila može se uvesti u jugularnu venu i na taj način dostaviti oksigeniranu krv u plućnu cirkulaciju (V-AV ECMO hibridni pristup). Dostava oksigenirane krvi preko desne klijetke i plućne cirkulacije može učinkovito popraviti diferencijalnu hipoksemiju (19).

Kako je ECMO visoko rizičan i financijski skup postupak, prije donošenja odluke o početku liječenja kod svakog je bolesnika nužno obaviti individualnu procjenu rizika i koristi od primjene samog postupka. Indikacije za cirkulacijsku potporu, odnosno primjenu V-A ECMO modaliteta navedene su u Tablici 1. Primjena V-V ECMO modaliteta indicirana je u slučajevim koji su navedeni u Tablici 2.

Tablica 1. Indikacije za primjenu V-A ECMO.

Kardiogeni šok: akutni koronarni sindrom, fulminantni miokarditis, sepsa s dubokom depresijom srca, masivna plućna embolija

Nakon kardiokirurških zahvata: nemogućnost odvajanja od kardiopulmonalne premosnice

Nakon transplantacije srca: primarno zatajenje transplantata

Terminalna faza kroničnog srčanog zatajenja: kao premosno liječenje do transplantacije srca, implementacije uređaja za mehaničku potporu cirkulaciji (VAD, prema engl. *Ventricular assist device*) koja može biti privremena ili konačna metoda liječenja

Refraktorni srčani zastoj (> 10 min)

Periproceduralna preventivna podrška za visokorizične perkutane koronarne intervencije

Tablica 2. Indikacije za primjenu V-V ECMO.**Hipoksično zatajenje dišnog sustava s $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ na $\text{FiO}_2 > 90\%$ i/ili Murray rezultat 3-4 unatoč optimalnoj skrbi tijekom > 6 sati**

-50 %-tni rizik od smrti udružen je s $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 150$ uz $\text{FiO}_2 > 0,9$ i/ili s Murrayjevim zbrojem 2 – 3

- 80 %-tni rizik od smrti udružen je s $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2 < 100$ uz $\text{FiO}_2 > 0,9$ i/ili s Murrayjevim zbrojem 4 – 6 tijekom 6 sati i dulje

CO₂ zadržavanje na mehaničkoj ventilaciji unatoč visokom platou tlaka (> 30 cm H₂O)**Teški sindromi curenja zraka****Potreba za intubacijom bolesnika na popisu za transplantaciju pluća****Trenutni srčani ili respiratorni kolaps (plućna embolija, blokiran dišni put koji ne reagira na optimalnu njegu).**

Rizik od smrti procjenjuje se na temelju vrijednosti omjera parcijalnog arterijskog tlaka kisika i udjela kisika u udahnutoj smjesi, $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, prema engl. *The ratio of arterial oxygen partial pressure /fractional inspired oxygen*).

Murrayjev zbroj je bodovni sustav koji se temelji na četiri parametra: omjeru $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$, pozitivnom tlaku na kraju izdisaja (PEEP, prema engl. *Positive end-expiratory pressure*), dinamičkoj popustljivosti pluća, broju plućnih kvadranta s alveolarnom infiltracijom na radiogramu prsnih organa, a upućuje na težinu respiracijske insuficijencije (20). Kod procjene reverzibilnog oštećenja plućne funkcije treba uzeti u obzir etiologiju osnovne bolesti, dob bolesnika, prethodno stanje kao i samo trajanje mehaničke ventilacije.

Apsolutnu kontraindikaciju za primjenu ECMO potpore imaju bolesnici s ireverzibilnim oštećenjem ciljnih organa koji nisu kandidati za transplantaciju srca ili pluća, odnosno neki drugi oblik potpore (terminalna maligna bolest, neposvjedočeni kardiorespiratorni arrest, teško oštećenje središnjega živčanog sustava) kao i nesuradljivi bolesnici. Relativne kontraindikacije vezane su za primjenu antikoagulantne terapije, manifestno krvarenje te visoku dob bolesnika. Kod nemogućnosti primjene nefrakcioniranog heparina (UFH, prema engl. *Unfractionated heparin*) zbog heparinom inducirane trombocitopenije (HIT, prema engl. *Heparin induced thrombocytopenia*) indicirana je primjena drugih antikoagulansa poput bivalirudina ili argatrobana. Zahvaljujući sustavu kanila i dijelovima uređaja obloženima antikoagulansom ECMO postupak se kratkotrajno može provoditi i bez upotrebe sustavne antikoagulacije, što

omogućuje njegovu primjenu u bolesnika s manifestnim krvarenjem koje se ne može zaustaviti odgovarajućim postupcima.

Pojedini oblici ECMO-a imaju specifične kontraindikacije. Periferni V-A ECMO ne smije se primjeniti u slučajevima teške periferne vaskularne bolesti, kao i aneurizme abdominalne aorte s trombotskim masama. V-V ECMO kontraindiciran je pri teškom desnostranom ili lijevostranom zatajivanju srca i kod teške plućne hipertenzije (srednji tlak u plućnoj arteriji > 50 mmHg) (21). Zbog kanulacije V-A ECMO može dovesti do perforacije ili disekcije arterije, ishemije ekstremiteta distalno od kanile ili se može razviti pseudoaneurizma na mjestu postavljanja. Zabilježeni su i slučajevi stvaranja tromba u srčanim šupljinama zbog zastoja (staze) krvi u slučajevima slabe kontraktilnosti (22). Rizik od nepovoljnog ishoda primjenom ECMO potpore povećava se razmjerno dobi, ali unatoč tome dobna granica nakon koje se ne preporučuje primjena ovog oblika potpore nije jasno definirana (23).

Kao invazivan i tehnički vrlo složen postupak koji narušava cjelovitost krvožilnih stijenki i upleće se u brojne fiziološke procese, komplikacije liječenja primjenom ECMO potpore dijele se u dvije glavne skupine:

- komplikacije vezane za cirkulacijski krug (mehaničke)
- komplikacije vezane za bolesnika (medicinske).

Mehaničke komplikacije uključuju trombozu, zračnu embolizaciju, disfunkciju pojedinih dijelova cirkulacijskoga kruga i prenizak ili potpuni prekid protoka krvi. Prisutnost malih ugrušaka (do 5 mm) unutar sustava česta je pojava i najčešće ne zahtijeva intervenciju, nego kontinuirano praćenje. Kod većih i/ili rastućih ugrušaka, potrebno je zamijeniti pojedine ili sve sastavnice cirkulacijskoga kruga jer mogu dovesti do poremećaja rada pumpe ili oksigenatora, sustavne tromboembolije ili pak razvoja diseminirane intravaskularne koagulopatije (DIK). Životno ugrožavajuća komplikacija, prodor zraka u cirkulacijski krug, rijetka je, ali zahtijeva trenutačno klemanje kanila i zaustavljanje protoka (24).

Krvarenje kao najčešća komplikacija vezana uz bolesnika, pojavljuje u 10 - 30 % slučajeva (25, 26). Uz sustavnu heparinizaciju povećanom riziku od krvarenja doprinose i trombocitopenija, poremećaj funkcije trombocita i relativni nedostatak faktora zgrušavanja, kao posljedica kontakta krvi s umjetnim materijalom unutar cirkulacijskog kruga. Kod liječenja klinički značajnih krvarenja cilj je smanjivanje ciljnih vrijednosti aktiviranoga vremena zgrušavanja (ACT, prema engl. *Activated clotting time*) ili privremeno ukidanje heparina te, ako je potrebno, transfuzija krvi, nadoknada trombocita te faktora zgrušavanja (27). Kod

sustavne primjene UFH-a moguća je pojava heparinom inducirane trombocitopenije praćene sklonošću trombozi. U tim se slučajevima UFH mora zamijeniti drugim antikoagulansom poput direktnih inhibitora trombina, bivalirudina ili argatrobana (28). Uz krvarenje, sljedeća najvažnija skupina komplikacija su infekcije. Rizik od infekcije proporcionalno se povećava trajanjem ECMO potpore zbog prisutnosti intravaskularnih kanila, a teško stanje bolesnika, kao i dugotrajna potpora, dodatno povećavaju rizik (29). Učestalost neuroloških komplikacija varira između 4 i 37 %, ovisno o bolesnikovoj dobi. Neurološke komplikacije u svim dobnim skupinama povećavaju stopu bolničke smrtnosti (30). Prema podacima registra Organizacije za izvantjelesno održavanje života, neurološke su komplikacije najčešće u novorođenačkoj dobi, u obliku intrakranijalnoga krvarenja (11 %), epileptičnih napadaja (7 %) i ishemijskoga moždanog udara (3,5 %). U odrasloj je dobi češća pojava ishemijskoga moždanog udara (4 %), a zatim slijede epileptični napadaji te intrakranijalno krvarenje s podjednakom učestalošću (2 %) (31).

Rast u području ECMO transporta paralelan je s rastom ostalih ECMO sklopova. Specifični sklopovi koji sadrže manje, biokompatibilnije komponente proširili su mogućnosti transporta pacijenata na ECMO potpori. Pojednostavljenje kruga korištenjem polimetilpentenskih membranskih oksigenatora i centrifugalnih pumpi omogućilo je sigurnije kretanje pacijenata od ustanova koje ne pružaju ECMO potporu do centara opremljenih za pružanje podrške pacijentima tijekom duljeg razdoblja.

2. CILJ

Cilj ovog istraživanja je ispitati može li automatizirana metoda mjerenja indeksa hemolize na biokemijskom analizatoru, zamijeniti dosada korištenu spektrofotometrijsku Harboe metodu za mjerenje koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi.

3. MATERIJAL I METODE

3.1. Ustroj studije

Studija je ustrojena kao presječno istraživanje. Presječno istraživanje najjednostavniji je oblik biomedicinskog istraživanja. S obzirom na načelo raspodjele ispitanika pripada u opažajna (opservacijska) istraživanja. U tako dizajniranim studijama istraživač ne odlučuje koji će ispitanici biti izloženi nekom utjecaju. Na uzorku populacije prikupljaju se podatci u jednoj vremenskoj točki – sadašnjosti. Presječno istraživanje stoga se naziva i fotografskim (prema engl. *snapshot study*) jer „snima“ stanje u jednome trenutku. Pogodno je za ispitivanje zastupljenosti bolesti (prevalencija - udio trenutno oboljelih u populaciji), za ispitivanje valjanosti novih dijagnostičkih testova te izloženosti odnosno neizloženosti nekom čimbeniku rizika. Može i ne mora imati kontrolnu skupinu.

Presječno istraživanje ima dvije velike prednosti:

- cijena
- brzina

S druge strane, slabo je uporište za procjenu uzročne povezanosti, što predstavlja i glavni nedostatak ovog tipa istraživanja (32).

3.2. Materijal

Za ovo istraživanje ukupno su prikupljena 192 uzorka anonimne ostatne litij heparinske plazme pacijenata podvrgnutih ECMO potpori te 30 nasumično odabranih uzoraka pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori.

Anonimni humani ostatni uzorci litij heparinske plazme pacijenata na ECMO potpori pohranjeni su na -20 °C kroz period ne duži od 6 mjeseci. Nakon jednokratnog odmrzavanja na sobnoj temperaturi, uzorci su homogenizirani miješanjem na Vortex mješalici te potom centrifugirani na 2000 g kroz 10 minuta. Za svaku od dvije ispitivane metode pripremljeno je 200 µL plazme. Prvo se pristupilo mjerenju serumskih indeksa (lipemija, hemoliza, ikterija) na

automatiziranom biokemijskom analizatoru, a potom pripremi uzorka za mjerenje slobodnog hemoglobina na spektrofotometru te nakon toga analizi.

Ostatna anonimna litij heparinska plazma nasumično odabranih uzoraka pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori nakon odrađenih rutinskih analiza odvojena je u plastičnu epruvetu, te je potom centrifugirana na 2000 g kroz 10 minuta. Za svaku od dvije ispitivane metode pripremljeno je 200 μ L plazme. Prvo se pristupilo mjerenju serumskih indeksa (lipemija, hemoliza, ikterija) na automatiziranom biokemijskom analizatoru, a potom pripremi uzorka za mjerenje slobodnog hemoglobina na spektrofotometru te nakon toga analizi.

U prikupljenom materijalu nije bilo uzoraka s izmjerenom apsorbancijom > 2500 te nije bilo potrebe za razrijeđivanjem fiziološkom otopinom i ponovnog mjerenja kao niti izmjerenih apsorbancija s predznakom minus (-).

3.3. Metode

3.3.1. Spektrofotometrijska Harboe metoda

Mjerenje koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi spektrofotometrijskom Harboe metodom na 3 valne duljine: 380, 415 i 450 nm.

a) Uređaj

UV Spektrofotometar BioMate – 3, (Thermo Fisher Scientific, USA).

b) Načelo mjerenja

Slobodni hemoglobin u plazmi oksidira se natrijevim karbonatom u oksihemoglobin. Apsorbancija stvorenog oksihemoglobina mjeri se na valnoj duljini od 415 nm, a nespecifične apsorbancije na valnim duljinama 450 i 380 nm.

c) Načelo postupka za izračunavanje rezultata

Slobodni hemoglobin (mg/L) = $836 \times [(2 \times A_{415}) - A_{380} - A_{450}]$

Vrijednosti apsorbancija s predznakom minus (-) su prihvatljive, potrebno je paziti na promjenu predznaka u izračunu.

d) Biološki referentni intervali / granične / preporučene vrijednosti

Referentne vrijednosti: 10-50 mg/L.

e) Uzorak

Litij – heparinizirana plazma.

f) Vrsta spremnika i dodatka

Antikoagulans u epruveti je litij heparin – spremnik sa zelenim čepom.

g) Potrebni reagensi

Matična otopina natrijevog karbonata (Na_2CO_3) koncentracije 10 g/L.

Radna otopina 0,1 g/L priprema se iz matične otopine tako da se u odmjerne tikvici 100 μL matične otopine nadopuni redestiliranom vodom do 10 mL. Rok upotrebe tako pripremljene otopine je neograničen.

h) Postupak pripreme uzorka

U plastičnu epruvetu optipetira se 200 μL plazme te se potom doda 2 mL radne otopine Na_2CO_3 , tako dobivena smjesa uzorka i otopine se promiješa, prelije u plastičnu mjernu kivetu i analizira.

i) Postupak mjerenja

Na glavnom izborniku izabrati *Stored Tests* – strelicom ↓ doći na program PROBA (datum 16.12.20) potvrditi s tipkom *Enter* te stisnuti *Run Test* – staviti kivetu sa slijepom probom u držač kiveta, spustiti poklopac spektrofotometra i pokrenuti *Measure Blank*. Nakon zvučnog signala koji označava kraj mjerenja kivetu s prethodno pripremljenim uzorkom postaviti u držač kiveta, spustiti poklopac spektrofotometra te nakon zvučnog signala (mjerenje traje nekoliko sekundi) očitati apsorbancije na sve tri valne duljine.

j) Postupak kontrole kvalitete

Laboratorij sudjeluje u vanjskoj procjeni kontrole kvalitete rada dva puta godišnje.

k) Mjerna sljedivost

Uređaj je umjeren od strane ovlaštenog servisa dana 03.12.2021.

3.3.2. Automatizirana metoda mjerenja serumskih indeksa

Mjerenje indeksa hemolize, ikterije i lipemije automatiziranom spektrofotometrijskom metodom. Uzorci u kojima je prisutna neka od navedenih interferencija asporbiraju različite valne duljine.

a) Uređaj

Abbott Alinity c system (Abbott Laboratories, IL, USA).

b) Načelo mjerenja

Mjerenje serumskih indeksa omogućuje procjenu prisutnosti lipida, hemoglobina i bilirubina u lipemičnim, hemoliziranim i ikteričnim uzorcima.

Procjena se temelji na mjerenju apsorbancije:

- turbidimetrija za lipide (lipemija)
- crvena boja za hemoglobin (hemoliza)
- žuta boja za bilirubin (ikterija).

0,9 % fiziološka otopina predstavlja referentni fotometrijski test koji sustav koristi za procjenu indeksa svakog pojedinog uzorka.

c) Načelo postupka za izračunavanje rezultata

Slobodni hemoglobin (mg/L) = izmjereni indeks hemolize x 10

d) Uzorak

Litij – heparinizirana plazma.

e) Vrsta spremnika i dodatka

Antikoagulans u epruveti je litij heparin – spremnik sa zelenim čepom.

f) Potrebni reagensi

0,9 % fiziološka otopina.

Za automatiziranu metodu mjerenja serumskih indeksa nema pripreme uzorka. Uređaj svaki serumski indeks mjeri u pojedinačnoj kivetu.

g) Postupak mjerenja

Automatizirani sustav prvo mjeri apsorbanciju na četiri para valnih duljina:

- A1 (500 nm/524 nm)
- A2 (572 nm/604 nm)

- A3 (628 nm/660 nm)
- A4 (524 nm/804 nm).

Potom primjenjuje matematičku formulu za određivanje relativnih interferirajućih koncentracija:

- lipemija = $M (a_{01} \times A1 + a_{02} \times A2 + a_{03} \times A3 + a_{04} \times A4)$
- hemoliza = $M (a_{05} \times A1 + a_{06} \times A2 + a_{07} \times A3 + a_{08} \times A4)$
- ikterija = $M (a_{09} \times A1 + a_{10} \times A2 + a_{11} \times A3 + a_{12} \times A4)$.

M je korekcija za diluciju uzorka:

$(\text{volumen reagensa} + \text{volumen uzorka}) / \text{volumen uzorka}$.

Konstante su dio automatiziranog sustava i koriste se za izračun serumskih indeksa te ih nije moguće definirati od strane krajnjeg korisnika (laboratorija).

Konstante su specifične za svaki pojedini serumski indeks:

- lipemija: a01, a02, a03, a04
- hemoliza: a05, a06, a07, a08
- ikterija: a09, a10, a11, a12.

h) Postupak kontrole kvalitete

Kontrola kvalitete se provodi svakodnevno međusobnom usporedbom vrijednosti izmjerenih serumskih indeksa na automatiziranim biokemijskim analizatorima unutar Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku kroz programsko rješenje QC Bionet.

i) Mjerna sljedivost

Uređaj podliježe preventivnom godišnjem servisu od strane ovlaštenog proizvođača. Preventivni servis na uređaju učinjen je prema Planu preventivnog održavanja.

3.4. Statističke metode

Kategorijski podatci su predstavljani apsolutnim i relativnim frekvencijama. Numerički podatci opisani su medijanom i granicama interkvartilnog raspona. Normalnost raspodjele numeričkih varijabli testirana je Shapiro - Wilkovim testom. Razlike numeričkih varijabli između dviju zavisnih skupina (dva mjerenja) testirane su Wilcoxonovim testom. Slaganje u

metodama ispitalo se Passing - Bablock regresijskom analizom, a značajnost razlike Bland – Altman analizom. Povezanost numeričkih varijabli, čija raspodjela ne slijedi normalnu, ocjenjena je Spearmanovim koeficijentom korelacije Rho. Sve P vrijednosti su dvostrane. Razina značajnosti je postavljena na $\text{Alpha} = 0,05$. Za statističku analizu korišten je statistički program MedCalc® Statistical Software version 20.111 (*MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium; <https://www.medcalc.org>; 2022*).

4. REZULTATI

Ovim istraživanjem kojim su se uspoređivale dvije metode za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi ukupno je analizirano 222 uzorka.

Od ukupnog broja uzoraka, 192 uzorka su uzorci pacijenata podvrgnutih ECMO potpori. Ostalni anonimni uzorci litij heparinske plazme pacijenata podvrgnutih ECMO potpori do analize pohranjeni su na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, kroz period ne duži od 6 mjeseci. Analiza sva prikupljena 192 uzorka napravljena je kroz period od 5 dana, u mjesecu lipnju 2022. Preostalih 30 uzoraka su nasumično odabrani uzorci pacijenata s vidljivo prisutnom hemolizom uzrokovanom predanalitičkom pogreškom prilikom uzorkovanja venske krvi i koji nisu podvrgnuti ECMO potpori. Uzorci nasumično odabranih pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori nakon odrađenih rutinskih analiza pripremljeni su za analizu koja je napravljena istog dana. Analiza svih 30 uzoraka napravljena je kroz period od 3 dana u mjesecu lipnju 2022.

U svim su uzorcima, nakon predanalitičke faze koja je ista za obje metode, prvo izmjerene vrijednosti serumskih indeksa (lipemija, hemoliza, ikterija) na automatiziranom biokemijskom analizatoru, te potom vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi Harboe metodom na spektrofotometru.

4.1. Obilježja cijelog uzorka

Za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi, istraživanje je provedeno na 192 uzorka, metodom HARBOE i izraženo putem indeksa hemolize.

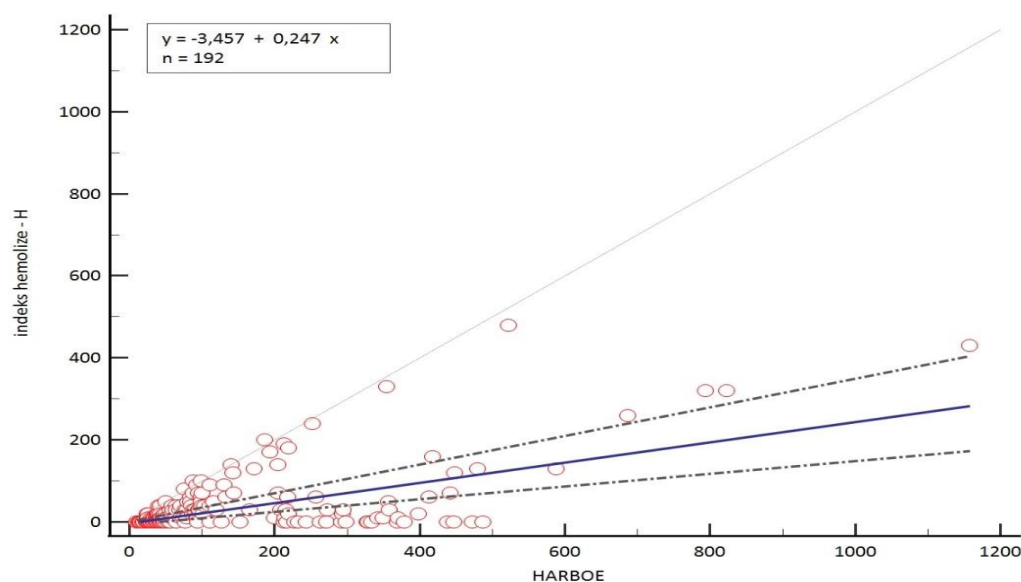
Uočavamo da se apsolutno odstupanje jedne metode od druge kreće do 100 %. Značajno su više vrijednosti slobodnog hemoglobina izmjerene HARBOE metodom (Wilcoxonov test, $P < 0,001$) u odnosu na indeks hemolize (Tablica 3).

Tablica 3. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda.

	Broj uzoraka	Medijan (interkvartilni raspon)	<i>P</i> *	Raspon od najmanje do najveće vrijednosti
HARBOE	192	78 (38 – 214)	< 0,001	10 – 1158
Indeks hemolize	192	10 (0 – 40)		0 – 480
Apsolutno odstupanje (%)	192	84 (57 – 100)		0 - 100

*Wilcoxonov test

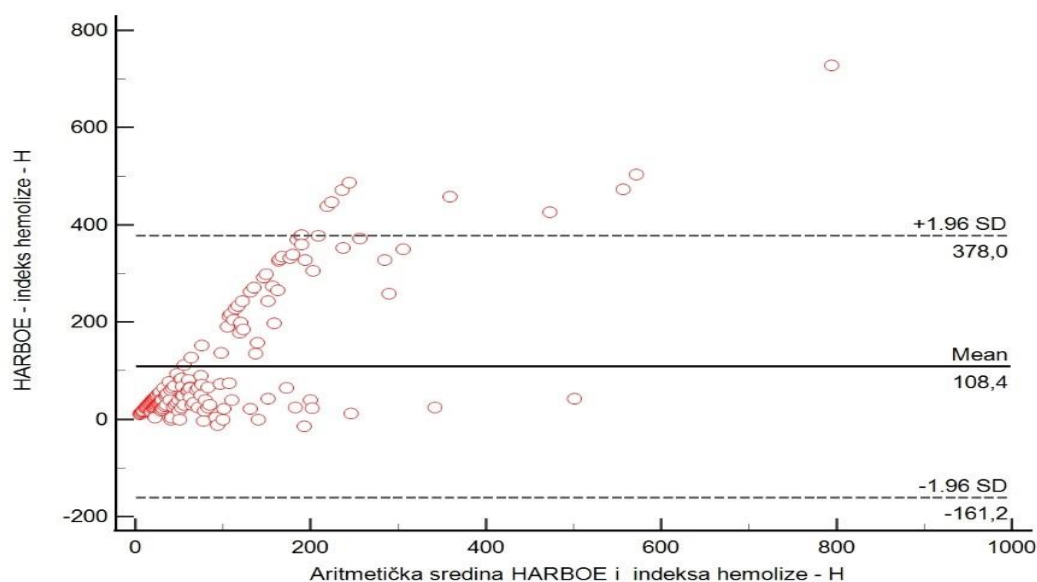
Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost metoda, koja je slaba, pozitivna i značajna (Rho = 0,460; 95 % interval pouzdanosti od 0,341 do 0,565; $P < 0,001$). Nije zadovoljen uvjet primjene Pasing – Bablock regresije, da ne postoji značajno odstupanje od linearnosti (Cusum test, $P = 0,02$) (Slika 1).



Slika 1. Prikaz Passing – Bablok regresijske analize (točke predstavljaju mjerenja; puna plava crta – regresijski pravac; isprekidana crta – granice 95 % raspona pouzdanosti regresijskog pravca; sitno isprekidana crta - pravac $y = x$).

Da bismo ispitali je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna, koristili smo se Bland–Altmanovom analizom. Srednja vrijednost razlike je 108,4 (uz 95 % raspon pouzdanosti od 88,8 do 127,9; $P < 0,001$), odnosno postoji značajna razlika u vrijednostima

slobodnog hemoglobina u plazmi iskazanog metodom HARBOE i indeksom hemolize (Slika 2).



Slika 2. Bland-Altmanova usporedba dviju metoda (HARBOE vs. indeks hemolize).

4.2. Uzorak s višim stupnjem ikterije

Za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi, istraživanje je provedeno na 41 uzorku, metodom HARBOE i izraženo putem indeksa hemolize.

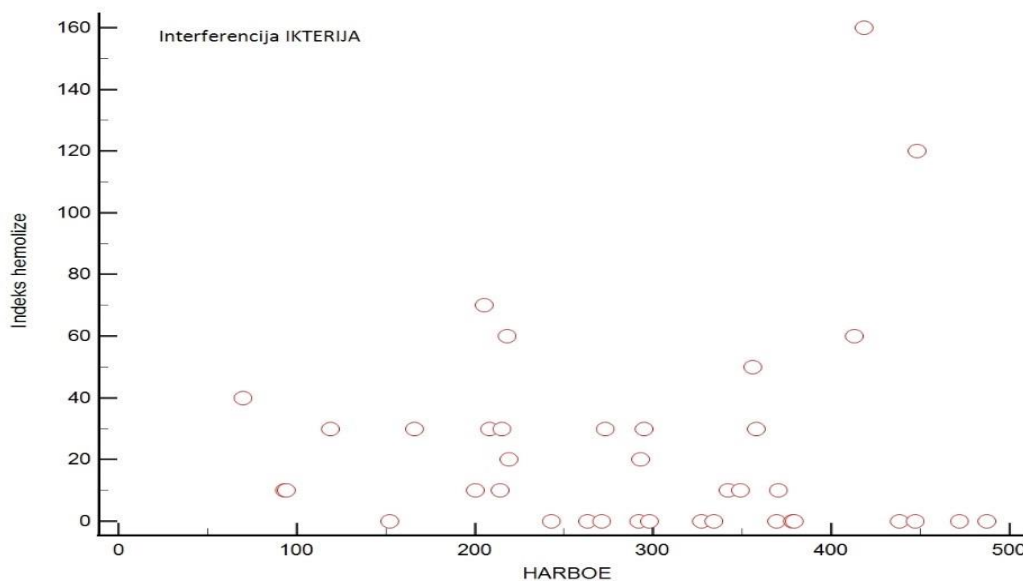
Uočavamo da se apsolutno odstupanje jedne metode od druge kreće od 42 % do 100 %. Značajno su više vrijednosti slobodnog hemoglobina izmjerene HARBOE metodom (Wilcoxonov test, $P < 0,001$) u odnosu na indeks hemolize (interferencija: ikterija) (Tablica 4).

Tablica 4. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda.

Interferencija - ikterija	Broj uzoraka	Medijan (interkvartilni raspon)	P^*	Raspon od najmanje do najveće vrijednosti
HARBOE	41	295 (213 – 370)	< 0,001	70 – 487
Indeks hemolize	41	10 (0 – 30)		0 – 160
Apsolutno odstupanje (%)	41	95 (86 – 100)		42 – 100
Stupanj ikterije	41	9 (7 – 15)		5 - 26

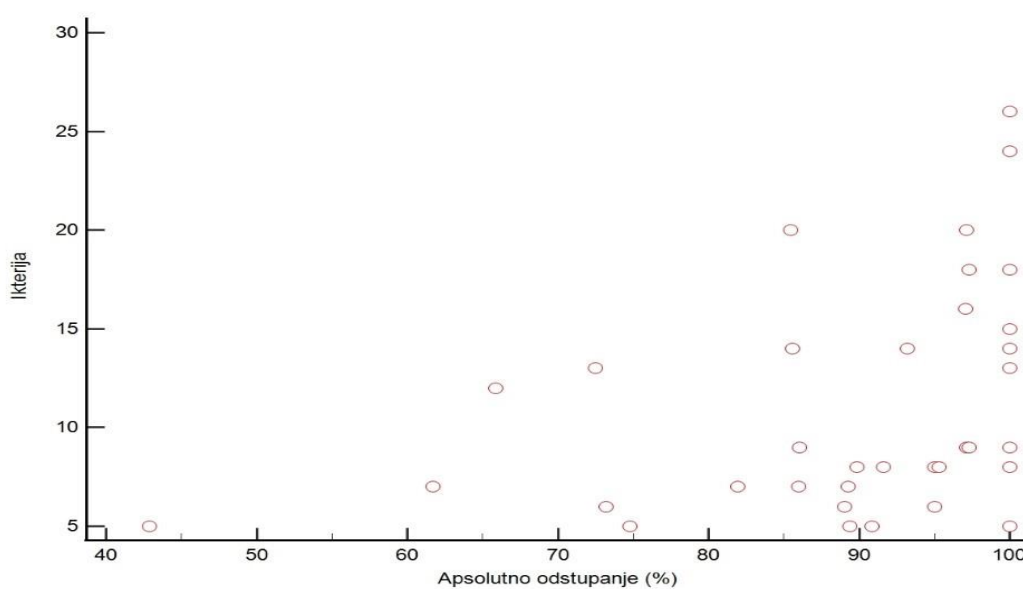
*Wilcoxonov test

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost metoda, koja je bez značajnosti ($Rho = -0,212$; 95 % raspon pouzdanosti od $-0,487$ do $0,103$; $P = 0,18$). (Slika 3).



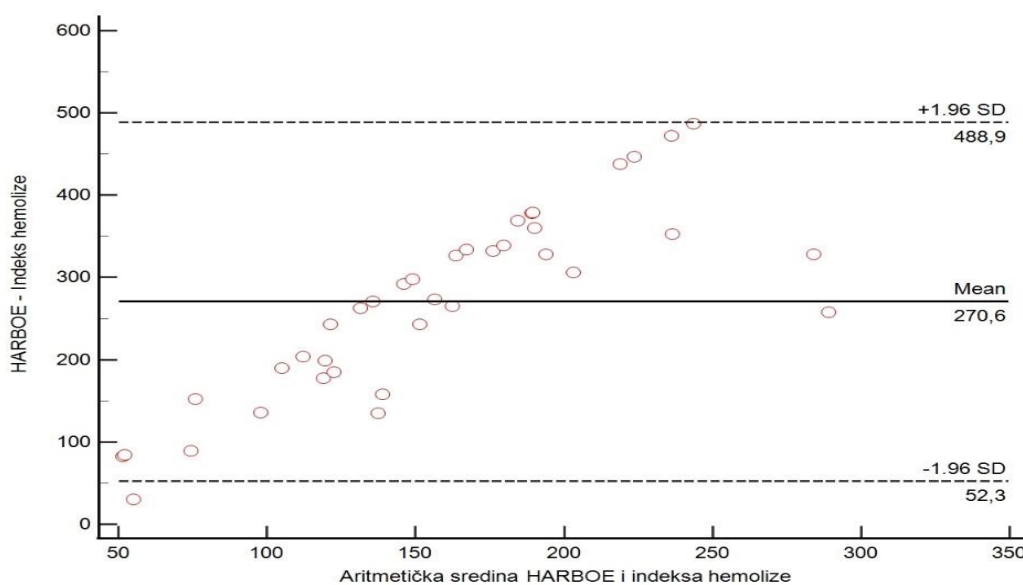
Slika 3. Povezanost vrijednosti slobodnog hemoglobina izmjerene metodama HARBOE i indeksom hemolize (interferencija: ikterija).

U značajnoj su vezi apsolutno odstupanje i stupanj ikterije, odnosno što je veći stupanj ikterije to je veće apsolutno odstupanje (Spearmanov koeficijent korelacije $Rho = 0,465$; $P = 0,002$) (Slika 4).



Slika 4. Povezanost apsolutnog odstupanja (%) sa stupnjem ikterije.

Da bismo ispitali je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna, koristili smo se Bland–Altmanovom analizom. Srednja vrijednost razlike je 270,6 (uz 95 % raspon pouzdanosti od 235,4 do 305,8; $P < 0,001$), odnosno postoji značajna razlika u vrijednostima slobodnog hemoglobina u plazmi iskazanog metodom HARBOE i indeksom hemolize, uz viši stupanj ikterije (Slika 5).



Slika 5. Bland-Altmanova usporedba dviju metoda (HARBOE vs. indeks hemolize).

4.3. Uzorak s interferencijom (LI) u dozvoljenim rasponima

Za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi, istraživanje je provedeno na 149 uzoraka, metodom HARBOE i izraženo putem indeksa hemolize.

Uočavamo da se apsolutno odstupanje jedne metode od druge kreće do 100 %. Značajno su više vrijednosti slobodnog hemoglobina izmjerene HARBOE metodom (razlika je -36; 95 % raspon pouzdanosti razlike -42 do -32; Wilcoxonov test, $P < 0,001$) u odnosu na indeks hemolize (bez interferencije) (Tablica 5).

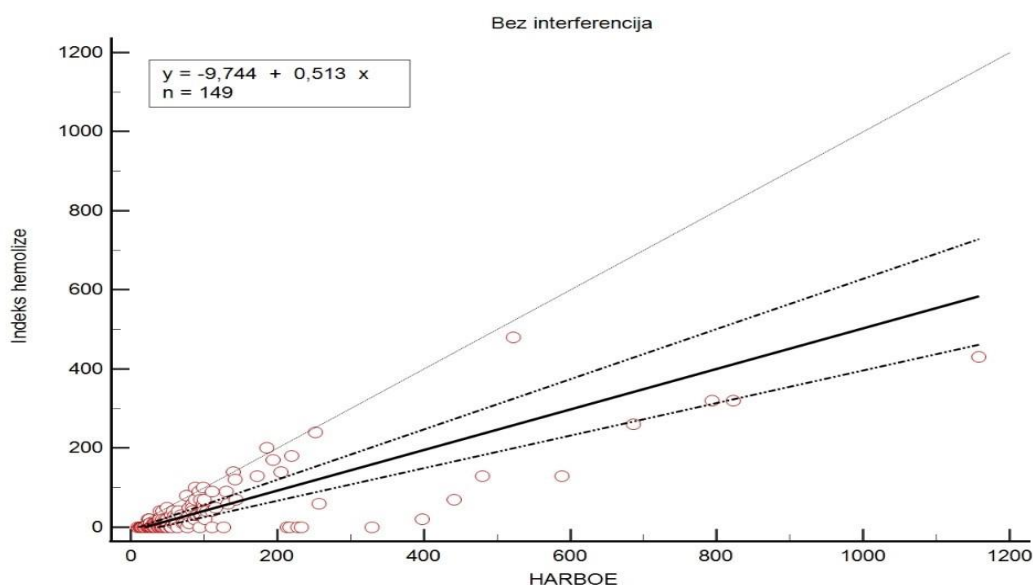
Tablica 5. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda.

Bez interferencije	Broj uzoraka	Medijan (interkvartilni raspon)	<i>P</i> *	Raspon od najmanje do najveće vrijednosti
HARBOE	149	50 (33 – 99)	< 0,001	10 – 1158
Indeks hemolize	149	10 (0 – 40)		0 – 480
Apsolutno odstupanje (%)	149	77 (51 – 100)		0 – 100
Stupanj lipemije	149	1 (0 – 9)		0 - 70
Stupanj ikterije	149	1 (1 – 2)		0 - 4

*Wilcoxonov test

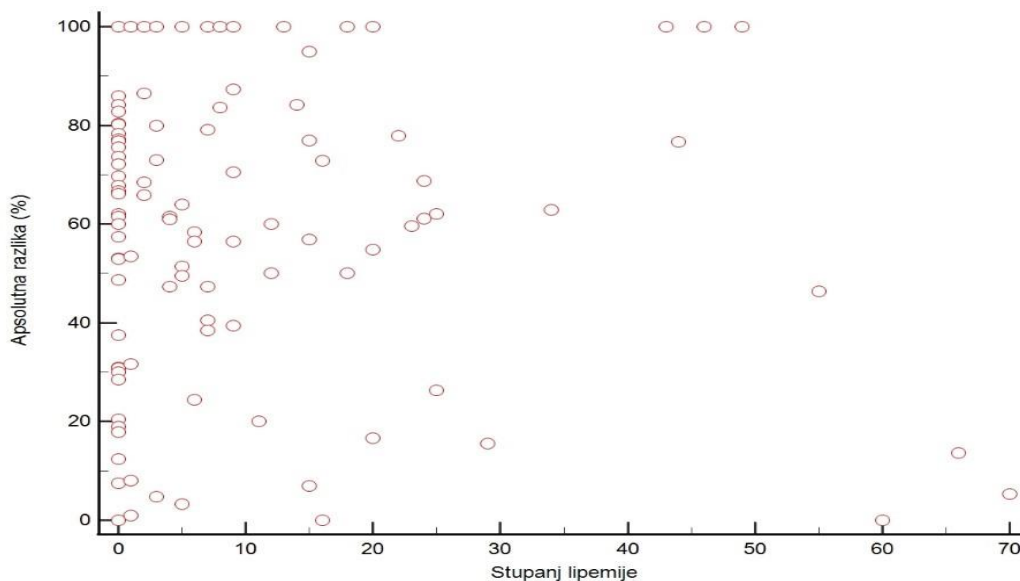
Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost metoda, koja je pozitivna i značajna (Rho = 0,694; 95 % raspon pouzdanosti od 0,600 do 0,769; $P < 0,001$).

Uz zadovoljen uvjet nepostojanja značajnog odstupanja od linearnosti (Cusum test, $P = 0,06$), rezultati Passing - Bablock regresije prikazuje odnos dviju metoda u obliku pravca s pripadnom jednadžbom kojom su definirane vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y, a koje govore o prisutnosti konstantne i proporcionalne razlike dviju varijabli. U slučaju odnosa HARBOE i indeksa hemolize Passing Bablock regresijska analiza rezultirala je jednadžbom pravca: $y = -9,744 + 0,513 x$ (Slika 6).



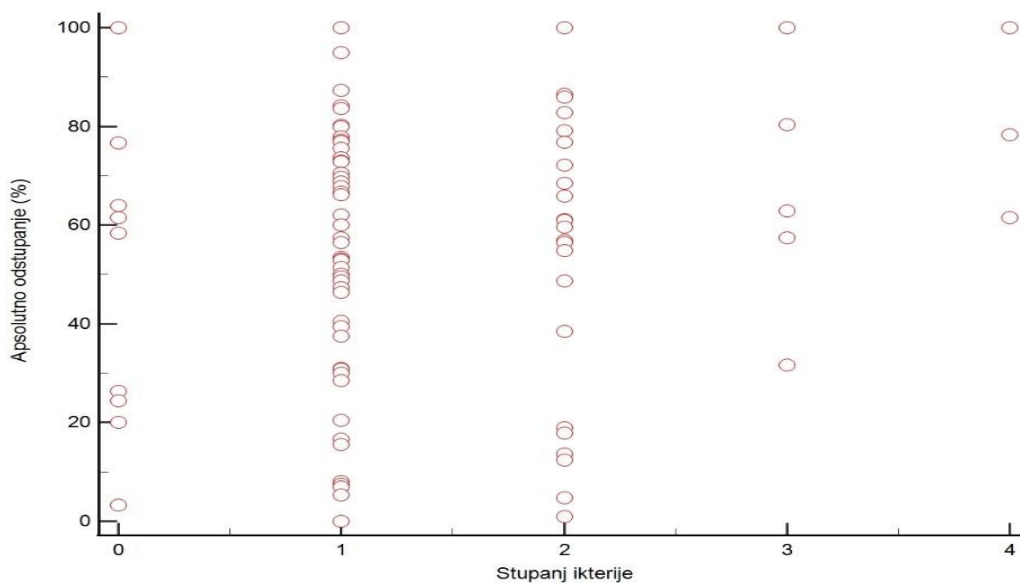
Slika 6. Prikaz Passing – Bablok regresijske analize (točke predstavljaju mjerenja; puna crta – regresijski pravac; isprekidana crta – granice 95 % raspona pouzdanosti regresijskog pravca; sitno isprekidana crta - pravac $y = x$).

U značajnoj su slaboj i negativnoj vezi apsolutno odstupanje i stupanj lipemije, odnosno što je veći stupanj lipemije, to je manje apsolutno odstupanje, i obratno (Spearmanov koeficijent korelacije $Rho = -0,223$; $P = 0,006$) (Slika 7).



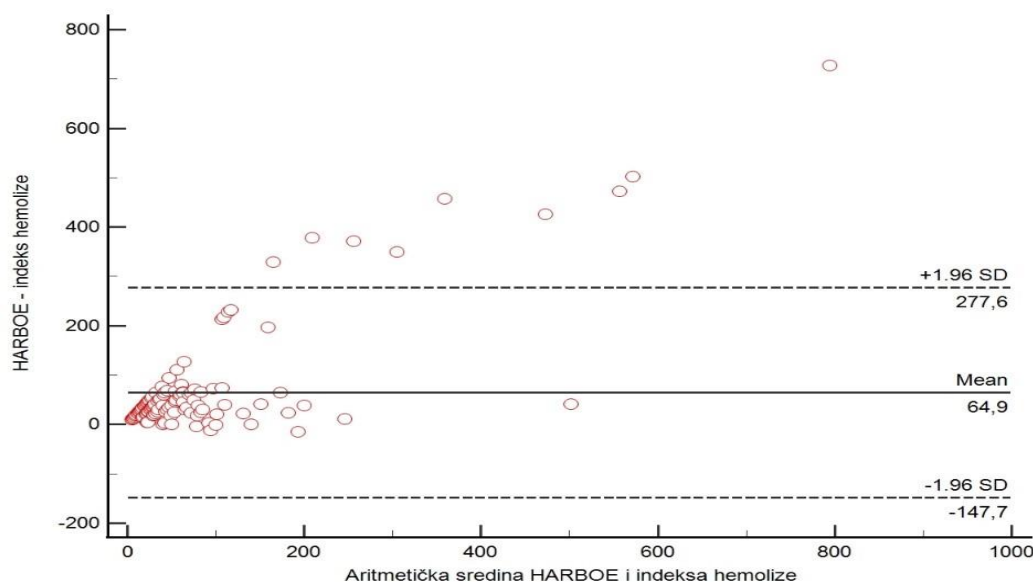
Slika 7. Povezanost apsolutnog odstupanja (%) sa stupnjem lipemije.

Nema značajne povezanosti stupnja ikterije s apsolutnim odstupanjem (Spearmanov koeficijent korelacije $Rho = 0,029$ $P = 0,73$) (Slika 8).



Slika 8. Povezanost apsolutnog odstupanja (%) sa stupnjem ikterije.

Da bismo ispitali je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna, koristili smo se Bland–Altmanovom analizom. Srednja vrijednost razlike je 64,96 (uz 95 % raspon pouzdanosti od 47,4 do 82,5; $P < 0,001$), odnosno postoji značajna razlika u vrijednostima slobodnog hemoglobina u plazmi iskazanog metodom HARBOE i indeksom hemolize, uz viši stupanj ikterije (Slika 9).



Slika 9. Bland-Altmanova usporedba dviju metoda (HARBOE vs. indeks hemolize) (bez interferencije).

4.4. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda kod nasumičnog odabira uzoraka pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori

Za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi kod nasumičnog uzorkovanja, istraživanje je provedeno na 30 uzoraka, metodom HARBOE i izraženo putem indeksa hemolize.

Uočavamo da se apsolutno odstupanje jedne metode od druge kreće od 0,19 % do 100 %. Nema značajne razlike u mjerenju vrijednosti HARBOE metodom u odnosu na indeks hemolize (Tablica 6).

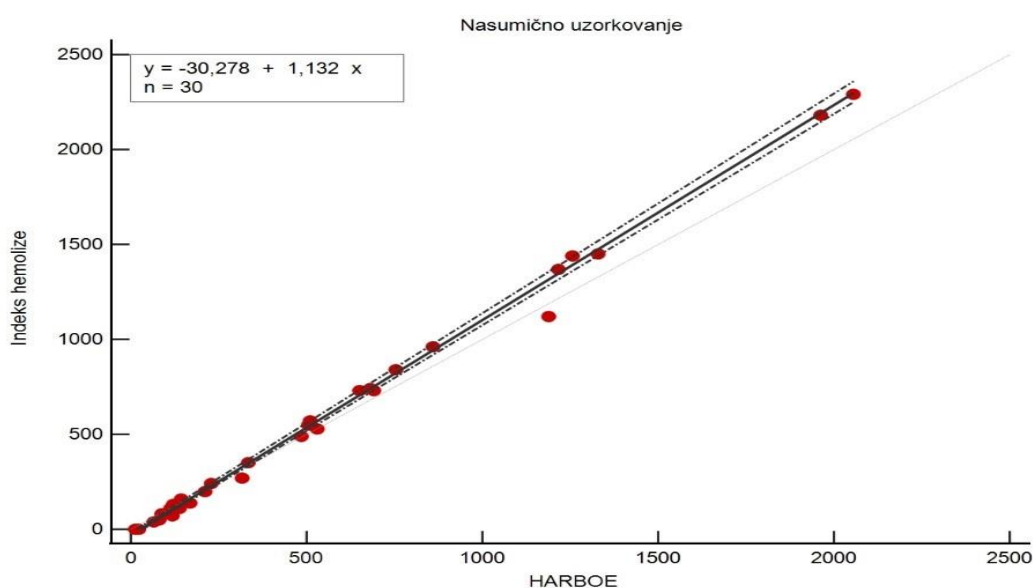
Tablica 6. Vrijednosti slobodnog hemoglobina i apsolutno odstupanje između metoda prilikom nasumičnog odabira.

Nasumični odabir	Broj uzoraka	Medijan (interkvartilni raspon)	<i>P</i> *	Raspon od najmanje do najveće vrijednosti
HARBOE	30	410 (120 – 754)	0,07	12 – 2056
Indeks hemolize	30	420 (110 – 840)		0 – 2290
Apsolutno odstupanje (%)	30	11 (5,8 – 14,8)		0,19 – 100
Stupanj ikterije	30	1 (1 – 1)		0 – 3
Stupanj lipemije	30	3 (0 – 8)		0 - 34

*Wilcoxonov test

Spearmanovim koeficijentom korelacije ocijenjena je povezanost metoda, koja je pozitivna, jaka i značajna (Rho = 0,995; 95 % raspon pouzdanosti od 0,989 do 0,998; $P < 0,001$).

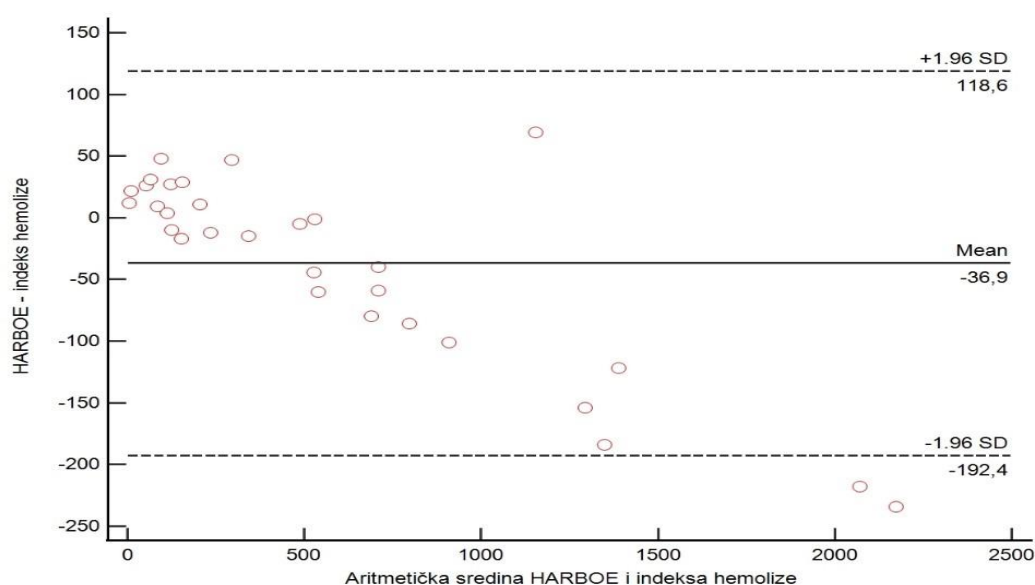
Uz zadovoljen uvjet nepostojanja značajnog odstupanja od linearnosti (Cusum test, $P = 0,91$), rezultati Passing - Bablock regresije prikazuje odnos dviju metoda u obliku pravca s pripadnom jednadžbom kojom su definirane vrijednosti nagiba pravca i odsječka na osi y, a koje govore o prisutnosti konstantne i proporcionalne razlike dviju varijabli. U slučaju odnosa HARBOE i indeksa hemolize Passing Bablock regresijska analiza rezultirala je jednadžbom pravca: $y = -30,278 + 1,132 x$ (Slika 10).



Slika 10. Prikaz Passing – Bablock regresijske analize (točke predstavljaju mjerenja; puna crta – regresijski pravac; isprekidana crta – granice 95 % raspona pouzdanosti regresijskog pravca; sitno isprekidana crta - pravac $y = x$).

Nema značajne povezanosti apsolutne razlike i stupnja ikterije (Spearmanov koeficijent korelacije $Rho = -0,071$, $P = 0,71$), kao niti sa stupnjem lipemije (Spearmanov koeficijent korelacije $Rho = -0,094$, $P = 0,62$).

Da bismo ispitali je li postojeća razlika između dviju metoda statistički značajna, koristili smo se Bland–Altmanovom analizom. Svi rezultati mjerenja, osim dva, nalaze se unutar raspona $\pm 1,96$ standardne devijacije (SD). Srednja vrijednost razlike je $-36,9$ (uz 95 % interval pouzdanosti $-66,5$ do $-7,3$; $P = 0,02$), odnosno značajna je razlika između metoda u mjerenju slobodnog hemoglobina u plazmi iskazanog metodom HARBOE i indeksom hemolize, prilikom nasumičnog uzorkovanja (Slika 11).



Slika 11. Bland-Altmanova usporedba dviju metoda (HARBOE vs. indeks hemolize) (nasumično uzorkovanje).

5. RASPRAVA

Pandemija COVID - 19 koja je u kratkom periodu paralizirala cijeli svijet, najveći je teret stavila na „leđa“ zdravstvenog sustava. U najgorim trenucima kada se svakodnevno veliki broj pacijenata morao podvrgnuti ECMO potpori koja je u tim trenucima bila posljednja šansa za spas velikom broju pacijenata, laboratoriji diljem zemlje i svijeta dali su nemjerljivi doprinos. Zbog izrazito tehnički kompliciranog i financijski skupog postupka pacijentima podvrgnutim ECMO potpori nužno je pratiti trendove u vrijednostima slobodnog hemoglobina u plazmi kako bi se mogao brzo procijeniti stupanj hemolize. Porast u vrijednostima slobodnog hemoglobina u plazmi ukazuje na jednu od češćih komplikacija ECMO potpore, poremećaj u radu neke od komponenti ECMO kruga, prvenstveno mehaničke pumpe za krv.

Neki autori navode sljedeće kriterije za procjenu stupnja hemolize kod pacijenata podvrgnutih ECMO potpori pa s obzirom na izmjerenu vrijednost slobodnog hemoglobina u plazmi razlikujemo:

- bez hemolize (< 100 mg/L)
- blaga hemoliza (100 – 500 mg/L)
- umjerena hemoliza (500 – 1000 mg/L)
- jaka hemoliza (> 1000 mg/L) (33).

Drugi autori smatraju da je takva klasifikacija postavljena prilično empirijski i nije povezana s pojavom kliničkih manifestacija kao što je prevalencija akutnog zatajenja bubrega (34).

Kako je metoda izbora za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi, Harboe metoda, podložna utjecaju ljudskog faktora zbog predanalitičke i analitičke faze koja nije automatizirana kao i zbog činjenice da je potrebno otprilike 30 minuta za izdavanje rezultata (od primitka uzorka, pripreme uzorka i analize), automatizirana metoda mjerenja indeksa hemolize na biokemijskom analizatoru otvara nove mogućnosti s ciljem što bržeg izdavanja nalaza, jer sama analitička faza traje svega par minuta dok predanalitička faza obuhvaća postupak centrifugiranja na 2000 g kroz period od 10 minuta.

Hemoglobin, bilirubin i lipidi posjeduju jedinstvena spektralna svojstva. Hemoglobin apsorbira svjetlost na valnim duljinama između 340 i 440 nm te između 540 i 580 nm s pikom apsorpcije na približno 420 nm. Bilirubin apsorbira svjetlost na valnim duljinama između 400 i 540 nm s karakterističnim pikom na 460 nm te uzrokuje spektrofotometrijsku

interferenciju. Prividna apsorpcija svjetlosti kod lipemije (mutnoće) zapravo je uzrokovana raspršenjem svjetlosti zbog lipida i čestica lipoproteina. Prividna apsorpcija najveća je ispod 400 nm i postupno opada preko vidljivog dijela spektra. Značajno raspršenje svjetlosti još uvijek je prisutno na 700 nm.

Budući da se spektar hemoglobina većim dijelom preklapa sa spektrom bilirubina, vrlo je važan odabir odgovarajućih valnih duljina kao i korekcijskih metoda za precizno mjerenje serumskih indeksa. Bilirubin u uzorku može biti nekonjugiran i/ili konjugiran. Većina studija o bilirubinu kao interferenciji nije testirala oba, konjugirani i nekonjugirani bilirubin, te se općenito pretpostavlja da su ekvivalent. Kako trenutno ne postoji definirana najbolja metoda za mjerenje serumskih indeksa, obaveza je svakog od proizvođača opisati na koji način procjenjuju prisutstvo svake interferencije te pružiti informacije o međusobnim interferencijama indeksa lipemije, hemolize i ikterije. Metode detekcije moraju uzeti u obzir preklapanje spektra apsorpcije hemoglobina, bilirubina i lipemije. Prema CLSI eCLIPSE C56-A smjernicama preporuka je da metoda za mjerenje serumskih indeksa mjeri apsorpciju na najmanje dvije različite valne duljine u mjernom spektru a po mogućnosti uz pik apsorpcije ispitivane interferencije. Za korekciju spektralnog preklapanja hemoglobina, bilirubina i lipida nužno je definirati faktore korekcije, kao i jasno istaknuti vrstu ispitivanog bilirubina u uputama proizvođača (35).

Rezultati ovog istraživanja uz obilježja cijelog uzorka, statistički su obrađeni prema postojanju odnosu nepostojanju interferencija.

Rezultati 192 analizirana uzorka pacijenata podvrgnutih ECMO potpori pokazuju postojanje značajne razlike u vrijednostima slobodnog hemoglobina između dvije ispitivane metode odnosno vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi izmjerene Harboe metodom značajno su više u odnosu na indeks hemolize.

Intereferencija ikterija obuhvatila je 41 uzorak s vrijednošću ukupnog bilirubina > 85 $\mu\text{mol/L}$ (prema unutarnjem protokolu Kliničkog zavoda za laboratorijsku dijagnostiku) što odgovara indeksu ikterije od 5 i više (raspon od 5 do 26). Dobiveni rezultati potvrđuju ikteriju kao značajnu intereferenciju određivanju slobodnog hemoglobina u plazmi. Stupanj ikterije u značajnoj je vezi s apsolutnim odstupanjem kao i značajnost razlike u vrijednostima mjerenog parametra između dviju metoda, odnosno viši stupanj ikterije prati veće apsolutno odstupanje te veća razlika u izmjerenim vrijednostima između metoda (vrijednosti izmjerene Harboe metodom su više u odnosu na indeks hemolize).

Uzorci bez interferencije obuhvatili su 149 analiziranih uzoraka s indeksima ikterije i lipemije unutar dozvoljenih raspona (indeks ikterije < 5 s rasponom od 0 do 4 te indeks lipemije < 125 s rasponom od 0 do 70). I u ovoj grupi uzoraka ikterija je značajna interferencija mjerenju slobodnog hemoglobina u plazmi, te porastom stupnja ikterija raste i odstupanje između dvije ispitivane metode. Ovo istraživanje pokazalo je da lipemija ne predstavlja interferenciju do indeksa lipemije od 70, jer viši stupanj lipemije prati manje apsolutno odstupanje i suprotno.

Nasumično odabranih 30 analiziranih uzoraka pacijenata s vidljivo prisutnom hemolizom i koji nisu podvrgnuti ECMO potpori s indeksima ikterije i lipemije unutar dozvoljenog raspona za Harboe metodu (od 0 do 3 za ikteriju i od 0 do 34 za lipemiju) pokazuju jako dobro slaganje između dvije ispitivane metode bez značajnosti utjecaja ikterije i lipemije na rezultate. Veće odstupanje uočeno je kod uzoraka s vrijednosti slobodnog hemoglobina < 50 mg/L što ne predstavlja klinički značajno odstupanje.

Uzorci s interferencijom lipemije nisu zadovoljili uvjet za statističku obradu jer su od ukupno 192 analizirana uzorka pacijenata podvrgnutih ECMO potpori samo dva uzorka s indeksom lipemije od 125 i više (raspon od 125 do 150), što odgovara koncentraciji triglicerida od 1,41 mmol/L, odnosno zamućenje uzorka uzrokovano je raspršenjem svjetlosti kod prisutnosti čestica lipoproteina i vidljivo je golim okom. Prema CLSI eCLIPSE C56-A smjernicama navedena je koncentracija triglicerida temeljena na diluciji 20 % Intralipida® (ili ekvivalenta) (35).

Kako je ECMO invazivan postupak koji narušava cjelovitost krvožilnog sustava uplećući se pritom u brojne fiziološke procese gdje je krv izložena velikoj umjetnoj površini kroz sustav kanulacije postavlja se pitanje koja je metoda za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi podložnija utjecaju interferencija (ikterije i lipemije) koje su gotovo neizbježne u uzorcima ECMO pacijenata zbog jetrene disfunkcije, infuzija propofola te parenteralne prehrane. Kako su rezultati ovog istraživanja pokazali da postoji značajno odstupanje u rezultatima pacijenata podvrgnutih ECMO potpori između dvije ispitivane metode za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi neizbježno se nameće pitanje da li je metoda mjerenja indeksa hemolize na automatiziranom biokemijskom analizatoru koji analizira nativni uzorak prikladnija od metode izbora, Harboe metode, u kojoj dodatkom matične otopine dolazi do postupka oksidacije i stvaranja oksihemoglobina koji ima najveću apsorpciju u rasponu valnih duljina od 531 do 543 nm. S obzirom na dobivene rezultate slaganja odnosno neslaganja vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi između dviju ispitivanih metoda dokazali smo da postoji

razlika u hemolizi kod ECMO pacijenata i *in vitro* hemolizi uzrokovanoj predanalitičkom pogreškom prilikom uzorkovanja krvi.

Iako neki autori navode rezultate koji govore u korist primjeni indeksa hemolize kao metode za mjerenje koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi kod pacijenata podvrgnutih ECMO potpori, nužno je imati na umu nekoliko ključnih elemenata (36).

Prije uvođenja automatiziranog mjerenja indeksa hemolize kao metode za mjerenje koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi treba osvijestiti da je izvorna svrha indeksa hemolize detekcija stupnja hemolize, uz zadovoljavajuću osjetljivost, koja ima utjecaj na rezultat mjerenja pojedinih analita. Indeks hemolize nije usporediv između biokemijskih platformi različitih proizvođača, što otežava usporedbu između centara koji ne posjeduju isti analizator te onemogućuje izradu smjernica. Na tržištu ne postoji komercijalni kalibracijski i kontrolni materijal, a indeks hemolize nema oznaku *in vitro* dijagnostika (IVD, prema engl. *In Vitro Diagnostics*) odobrenu od strane američke Agencije za hranu i lijekove (FDA, prema engl. *U.S. Food and Drug Administration*) kao ni oznaku europske sukladnosti (CE, prema engl. *European Conformity*) za upotrebu kao metoda za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi. Izazov predstavlja i definiranje kritične vrijednosti koja se smatra patološkom budući da je prema preporukama Organizacije za izvantjelesno održavanje života preporučljivo održavati vrijednost slobodnog hemoglobina u plazmi kod pacijenata podvrgnutih ECMO potpori ispod 100 mg/L što je blizu donjem limitu kvantifikacije indeksa hemolize na pojedinim biokemijskim platformama.

Iako ne u široj upotrebi, na tržištu postoji i POCT uređaj (HemCheck®) za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi iz uzorka pune krvi. To je mali i lagani, prijenosni uređaj sa sučeljem koje je prilagođeno korisniku. Implementacija takvog uređaja na bolničke odjele gdje su pacijenti podvrgnuti ECMO potpori omogućila bi dobivanje nalaza slobodnog hemoglobina unutar nekoliko minuta od uzorkovanja. Ovakav bi uređaj pridonio bržem zbrinjavanju ECMO pacijenata i bržoj odluci o promjeni samog protokola liječenja pacijenta. Ono što ograničava upotrebu ovakvog uređaja s laboratorijskog aspekta je upravo činjenica da uređaj koristi punu krv kao uzorak te nije moguće utvrditi prisutnost interferencije bez određivanja indeksa ikterije i lipemije, tj. određivanja koncentracije bilirubina na automatiziranom biokemijskom analizatoru.

6. ZAKLJUČAK

Ovim radom koji je imao za cilj usporediti dvije metode za mjerenje koncentracije slobodnog hemoglobina u plazmi doneseni su sljedeći najvažniji zaključci:

- kod pacijenata podvrgnutih ECMO potpori značajno su više vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi izmjerene Harboe metodom u odnosu na indeks hemolize
- kod nasumično odabranih uzoraka pacijenata s vidljivom hemolizom koji nisu podvrgnuti ECMO potpori (hemoliza uzrokovana predanalitičkom pogreškom) nema značajne razlike u vrijednostima slobodnog hemoglobina u plazmi izmjerenog Harboe metodom u odnosu na indeks hemolize
- kod pacijenata podvrgnutih ECMO potpori indeks ikterije predstavlja značajnu interferenciju mjerenju slobodnog hemoglobina u plazmi kako u uzorcima s vrijednostima bilirubina $> 85 \mu\text{mol/L}$ (indeks ikterije 5 i više) tako i u uzorcima s indeksima lipemije i ikterije u dozvoljenim rasponima (indeks ikterije do 4)
- budući da ikterija predstavlja interferenciju na koju nije moguće utjecati, a ona značajno utječe na rezultate mjerenja, poželjno je prilikom svakog mjerenja slobodnog hemoglobina u plazmi u uzorku odrediti i vrijednosti ukupnog i direktnog bilirubina
- zbog moguće prisutnosti hemolize uzrokovane neadekvatnim uzorkovanjem krvi kod visokih vrijednosti slobodnog hemoglobina u plazmi koje nisu u skladu s kliničkom slikom i stanjem pacijenta preporučljivo je paralelno odrediti i vrijednost haptoglobina te nalaz izdati uz konzultaciju kliničara
- potrebna su dodatna ispitivanja kako bi se ispitalo koji je točan stupanj lipemije koji interferira s rezultatima mjerenja jer su rezultati do kojih se došlo ovim istraživanjem pokazala da lipemija kao interferencija nije imala značajan utjecaj na rezultate slobodnog hemoglobina u plazmi (do indeksa lipemije 70).

S obzirom na prikazane rezultate razvidno je da je područje primjene ECMO potpore iz perspektive laboratorijske dijagnostike polje koje svakako traži dodatna istraživanja.

7. SAŽETAK

Cilj istraživanja: Usporedba dviju metoda za mjerenje slobodnog hemoglobina u plazmi.

Nacrt studije: Presječno istraživanje.

Materijal i metode: Ukupno su analizirana 222 uzorka ostatne humane litij heparinske plazme, od čega su 192 uzorka pacijenata podvrgnutih ECMO potpori dok su preostalih 30 uzorci s vidljivo prisutnom hemolizom uzrokovanom pogrešnim uzorkovanjem venske krvi. Uzorci pacijenata podvrgnutih ECMO potpori pohranjeni su na -20 °C kroz period ne duži od 6 mjeseci. Uzorci nasumično odabranih pacijenata koji nisu podvrgnuti ECMO potpori nakon odrađenih rutinskih analiza pripremljeni su za analizu koja je napravljena istog dana. Nakon predanalitičke faze koja je ista za obje metode pripremljeno je 200 µL plazme za svaku od metoda te se prvo pristupilo mjerenju serumskih indeksa na automatiziranom biokemijskom analizatoru a potom pripremi uzorka za mjerenje slobodnog hemoglobina Harboe metodom na spektrofotometru te nakon toga analizi. Uzorci su analizirani u lipnju.

Rezultati: Rezultati istraživanja su pokazali da metoda mjerenja indeksa hemolize na automatiziranom biokemijskom analizatoru, iako brža, nije dovoljno pouzdana da bi zamijenila do sada korištenu Harboe metodu. Ikterija, koja je vrlo česta u uzorcima pacijenata podvrgnutih ECMO potpori, predstavlja interferenciju koja značajno utječe na rezultate mjerenja. Zbog spektralnog preklapanja hemoglobina i bilirubina procjena stupnja ikterije u prisutnosti hemolize ili stupnja hemolize u prisutnosti ikterije najteži je izazov za mjerenje serumskih indeksa što je pokazalo i ovo istraživanje.

Zaključak: Kako i dalje ne postoji preporučena metoda za mjerenje serumskih indeksa niti smjernice, odgovore na ova otvorena pitanja moramo potražiti u budućim istraživanjima uz suradnju laboratorija i klinike te adekvatnu potporu proizvođača.

Ključne riječi: ECMO, slobodni hemoglobin u plazmi, Harboe metoda, indeks hemolize, indeks ikterije

8. SUMMARY

Examination of hemolysis parameters in patients with extracorporeal membrane oxygenation

Objectives: Comparison of two methods for measuring free hemoglobin in plasma.

Study Design: Cross-sectional survey.

Material and Methods: A total of 222 samples of human lithium heparin plasma were analyzed, of which 192 samples were from patients undergoing ECMO support, while the remaining 30 were samples with visible hemolysis caused by incorrect sampling of venous blood. Samples from patients undergoing ECMO support were stored at -20 °C for a period not exceeding 6 months. Samples from randomly selected patients who did not undergo ECMO support after finishing routine analysis were prepared for free hemoglobin analysis which was performed on the same day. After the pre-analytical phase, which is the same for both methods, 200 µL of plasma was prepared for each of the methods and the serum indices were first measured on an automated biochemical analyzer, and after that the sample was prepared for measuring free hemoglobin using the Harboe method on a spectrophotometer and after that analysis was performed. The analysis of all 222 samples was done in the month of June 2022.

Results: The research results showed that the method of measuring the hemolysis index on an automated biochemical analyzer, although faster, is not reliable enough to replace the currently used Harboe method. Icterus, which is very common in samples from patients undergoing ECMO support, represents an interference that significantly affects the measurement results. Due to the spectral overlap of hemoglobin and bilirubin, the assessment of the degree of icterus in the presence of hemolysis or the degree of hemolysis in the presence of icterus is the most difficult challenge for the measurement of serum indices, as this research has shown.

Conclusion: As there is still no recommended method for measuring serum indices or guidelines, we must look for answers to these open questions in future research with the cooperation of laboratories and clinics and adequate support from manufacturers.

Key words: ECMO, free hemoglobin in plasma, Harboe method, hemolysis index, icterus index

9. LITERATURA

1. Azman WNW, Omar J, Koon TS, Ismail TST. Hemolyzed Specimens: Major Challenge for Identifying and Rejecting Specimens in Clinical Laboratories. *Oman Medical Journal*, 2019, 34 (2), 94-98. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.5001%2Fomj.2019.19>. Datum pristupa: 23.5.2022.
2. Koseoglu M, Hur A, Atay A, Cuhadar S. Effects of hemolysis on routine biochemistry parameters. *Biochemia Medica* 2011, 21(1), 79-85. Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/64504>. Datum pristupa: 25.5.2022.
3. Rapido F. The potential adverse effects of haemolysis. *Blood Transfus*, 2017, 15, 218-221. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.2450%2F2017.0311-16>. Datum pristupa: 27.5.2022.
4. Bačić G, Tomulić V, Medved I, Zaputović L, Zaninović Jurjević T, Gobi D. Izvantjelesna membranska oksigenacija u odraslih bolesnika, *Cardiologia Croatica* 2017;12(5-6):216-225. Dostupno na adresi: <https://hrcak.srce.hr/185313>. Datum pristupa: 20.5.2022.
5. Extracorporeal Life Support Organisation. ELSO Guidelines for Cardiopulmonary Extracorporeal Life Support, 2013. Dostupno na adresi: <https://www.else.org/ecmo-resources/else-ecmo-guidelines.aspx> (18 November 2016). Datum pristupa: 21.5.2022.
6. Betit P. Technical Advances in the Field of ECMO. *Respiratory Care* September 2018, 63 (9) 1162-1173. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.4187/respcare.06320>. Datum pristupa: 1.6.2022.
7. Lequier L, Horton SB, McMullan M, Bartlett RH. Extracorporeal Membrane Oxygenation Circuitry. *Pediatric Critical Care Medicine*, June 2013 14(5): S7-S12. Dostupno na adresi: <http://dx.doi.org/10.1097/PCC.0b013e318292dd10>. Datum pristupa: 7.6.2022.
8. Mangoush O, Purkayastha S, Haj-Yahia S, et al. Heparin-bonded circuits versus nonheparin-bonded circuits: an evaluation of their effect on clinical outcomes. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2007;31:1058–69. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1016/j.ejcts.2007.01.029>. Datum pristupa: 8.6.2022.
9. Rais-Bahrami K, Walton DM, Sell JE, Rivera O, Mikesell GT, Short BL. Improved oxygenation with reduced recirculation during venovenous ECMO: comparison of two

- catheters. *Perfusion*. 2002;17:415–9. Dostupno na adresi:10.1097/00003246-199510000-00017. Datum pristupa: 9.6.2022.
10. Peek GJ, Killer HM, Reeves R, Sosnowski AW, Firmin RK. Early experience with a polymethyl pentene oxygenator for adult extracorporeal life support. *ASAIO J*. 2002;48(5):480–2. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1097/00002480-200209000-00007>. Datum pristupa: 10.6.2022.
11. Brower RG, Matthay MA, Morris A, Schoenfeld D, Thompson BT, Wheeler A. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and acute respiratory distress syndrome. *N Engl J Med*. 2000;342:1301-8. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1056/NEJM200005043421801>. Datum pristupa: 11.6.2022.
12. Hung V, Vuylsteke A, Valchanov K. Extracorporeal membrane oxygenation: coming to an ICU near you. *Journal of the Intensive Care Society*. 2012;13(1):31-38. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1177/175114371201300110>. Datum pristupa: 13.6.2022.
13. Berman M, Tsui S, Vuylsteke A, et al. Successful extracorporeal membrane oxygenation support after pulmonary thromboendarterectomy. *Ann Thorac Surg*. 2008;86(4):1261-1267. Dostupno na adresi: doi:10.1016/j.athoracsur.2008.06.037. Datum pristupa: 14.6.2022.
14. Rastan AJ, Dege A, Mohr M, Doll N, Falk V, Walther T, et al. Early and late outcomes of 517 consecutive adult patients treated with extracorporeal membrane oxygenation for refractory postcardiotomy cardiogenic shock. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2010;139:302-11. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1016/j.jtcvs.2009.10.043>. Datum pristupa: 15.6.2022.
15. Sidebotham D, McGeorge A, McGuinness S, Edwards M, Willcox T, Beca J. Extracorporeal membrane oxygenation for treating severe cardiac and respiratory disease in adults: Part 1--overview of extracorporeal membrane oxygenation. *J Cardiothorac Vasc Anesth*. 2009 Dec;23(6):886-92. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1053/j.jvca.2009.08.006>. Datum pristupa: 17.6.2022
16. Arlt M, Philipp A, Zimmermann M, Voelkel S, Aman M, Bein T, et al. Emergency use of extracorporeal membrane oxygenation in cardiopulmonary failure *Artif Organs*. 2009 Sep;33(9):696-703. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2009.00860.x>. Datum pristupa: 19.6.2022.

17. Biscotti M, Lee A, Basner RC i sur. Hybrid configurations via percutaneous access for extracorporeal membrane oxygenation: a single centre experience. *ASAIO J* 2014;60(6):635–642. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1097/mat.0000000000000139>. Datum pristupa: 20.6.2022.
18. Ius F, Sommer W, Tudorache I i sur. Venovenous-arterial extracorporeal membrane oxygenation for respiratory failure with severe haemodynamic impairment: Technique and early outcomes. *Interact Cardiovasc Thorac Surg* 2015;20(6):761–7. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1093/icvts/ivv035>. Datum pristupa: 21.6.2022.
19. Sorokin V, MacLaren G, Vidanapathirana PC, Delnoij T, Lorusso R. Choosing the appropriate configuration and cannulation strategies for extracorporeal membrane oxygenation: the potential dynamic process of organ support and importance of hybrid modes. *Eur J Heart Fail* 2017;19:75–83. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1002/ejhf.849>. Datum pristupa: 22.6.2022.
20. Hemmila MR, Rowe SA, Boules TN, Miskulin J, McGillicuddy JW, Haft JW, et al. Extracorporeal life support for severe acute respiratory distress syndrome in adults. *Ann Surg*. 2004 Oct;240(4):595-605. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1097/01.sla.0000141159.90676.2d>. Datum pristupa: 23.6.2022.
21. Schmid C, Philipp A. Extracorporeal Membrane Oxygenation (ECMO). In: Schmid C, Philipp A, editors. *Guidelines for Extracorporeal Circulation*. Heidelberg: Springer Medizin; 2011. p. 84-95. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1055/s-0041-1735490>. Datum pristupa: 25.6.2022.
22. Makdisi G, Wang IW. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *J Thorac Dis*. 2015 Jul;7(7):E166-76. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.17>. Datum pristupa: 27.6.2022.
23. Pranikoff T, Hirschl RB, Steimle CN, Anderson HL 3rd, Bartlett RH. Mortality is directly related to the duration of mechanical ventilation before the initiation of extracorporeal life support for severe respiratory failure. *Crit Care Med*. 1997 Jan;25(1):28-32. Dostupno na adresi: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8989172>. Datum pristupa: 29.6.2022.
24. Hemmila MR, Rowe SA, Boules TN, Miskulin J, McGillicuddy JW, Haft JW, et al. Extracorporeal life support for severe acute respiratory distress syndrome in adults. *Ann Surg*. 2004 Oct;240(4):595-605. Dostupno na

- adresi:<https://doi.org/10.1097/01.sla.0000141159.90676.2d>. Datum pristupa: 30.6.2022.
25. Pranikoff T, Hirschl RB, Steimle CN, Anderson HL 3rd, Bartlett RH. Mortality is directly related to the duration of mechanical ventilation before the initiation of extracorporeal life support for severe respiratory failure. *Crit Care Med*. 1997 Jan;25(1):28-32. Dostupno na adresi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/898>. Datum pristupa: 1.7.2022.
 26. Bartlett RH, Gattinoni L. Current status of extracorporeal life support (ECMO) for cardiopulmonary failure. *Minerva Anesthesiol*. 2010;76:534-40. Dostupno na adresi:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20613694>. Datum pristupa: 2.7.2022.
 27. Makdisi G, Wang IW. Extra Corporeal Membrane Oxygenation (ECMO) review of a lifesaving technology. *Journal of Thoracic Disease*, 01 Jul 2015, 7(7):E166-76. Dostupno na adresi:[10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.17](https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2015.07.17). Datum pristupa: 3.7.2022.
 28. Cornell T, Wyrick P, Fleming G, Pasko D, Han Y, Custer J, Haft J, et al. A case series describing the use of argatroban in patients on extracorporeal circulation. *ASAIO J*. 2007 JulAug;53(4):460-3. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1097/MAT.0b013e31805c0d6c>. Datum pristupa: 4.7.2022.
 29. Schmidt M, Bréchet N, Hariri S, Guiguet M, Luyt CE, Makri R, et al. Nosocomial infections in adult cardiogenic shock patients supported by venoarterial extracorporeal membrane oxygenation. *Clin Infect Dis*. 2012;55(12):1633-41. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1093/cid/cis783>. Datum pristupa: 5.7.2022.
 30. Mateen FJ, Muralidharan R, Shinohara RT, Parisi JE, Scheers GJ, Wijdicks EF. Neurological injury in adults treated with extracorporeal membrane oxygenation. *Arch Neurol*. 2011;68(12):1543-9. Dostupno na adresi: <https://doi.org/10.1001/archneurol.2011.209>. Datum pristupa: 6.7.2022.
 31. Mehta A, Ibsen LM. Neurologic complications and neurodevelopmental outcome with extracorporeal life support. *World J Crit Care Med*. 2013 Nov 4;2(4):40-7. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.5492/wjccm.v2.i4.40>. Datum pristupa: 7.7.2022.
 32. Marušić M. i sur. Uvod u znanstveni rad u medicini. 4. izd. Udžbenik. Zagreb: Medicinska naklada; 2008.
 33. Song L, MacLaren G, Best D, Delzoppo C, Butt W. Hemolysis in Pediatric Patients Receiving Centrifugal-Pump Extracorporeal Membrane Oxygenation Prevalence, Risk Factors, and Outcomes. *Critical Care Medicine*: May 2014 - Volume 42 - Issue 5 - p

1213-1220. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1097/CCM.0000000000000128>.

Datum pristupa: 8.7.2022.

34. Dufour N, Radjou A, Thuong M. Hemolysis and Plasma Free Hemoglobin During Extracorporeal Membrane Oxygenation Support: From Clinical Implications to Laboratory Details. *ASAIO Journal*: March 2020 - Volume 66 - Issue 3 - p 239-246. Dostupno na adresi:<https://doi.org/10.1097/MAT.0000000000000974>. Datum pristupa: 9.7.2022.
35. Merle B. Smith i sur. *CLSI C56-A:2012 Hemolysis, Icterus, and Lipemia/Turbidity Indices as Indicators of Interference in Clinical Laboratory Analysis*, 1st Edition, July 2012, Vol. 32 No.10.
36. Bürkia C, Volleberg M, Brunner D, Schmutz M, Hersberger M. Using the hemolysis index of Abbott's Alinity c for the measurement of plasma free hemoglobin in ECMO patients. *Clinical Biochemistry*, Volume 100, February 2022, Pages 67-70. Dostupno na adresi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000991202100309X>. Datum pristupa: 1.5.2022.

10. ŽIVOTOPIS

OSOBNI PODACI:

Ime i prezime: Darija Vrzić

Datum i mjesto rođenja: 29. svibanj, 1984. Nova Gradiška, Republika Hrvatska

Adresa: Letovanička 32, 10 000 Zagreb

Elektronička pošta: darijavrzic0501@gmail.com

OBRAZOVANJE:

1991. – 1999. Osnovna škola „Antun Mihanović“ Nova Kapela, Batrina

1999. – 2003. Opća Gimnazija Novoj Gradiška

16. siječnja, 2008. godine diplomirala na Zdravstvenom veleučilištu u Zagrebu, smjer Medicinsko laboratorijska dijagnostika

2020. upisala Diplomski sveučilišni studij Medicinsko laboratorijska dijagnostika, Medicinski fakultet u Osijeku

RADNO ISKUSTVO:

2008. – 2009. pripravnički staž KBC Zagreb, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku

2009. – 2011. Stručni suradnik u tvrtki Ventus Medical d.o.o. Zagreb

2011. – 2012. Stručni suradnik u tvrtki Mediva d.o.o. Zagreb

2012. – KBC Zagreb, Klinički zavod za laboratorijsku dijagnostiku, Odjel za hitnu laboratorijsku dijagnostiku i pretrage uz bolesnika

POSEBNA DOSTIGNUĆA:

Nagrada Dekana za najboljeg studenta 2. godine Preddiplomskog stručnog studija Medicinsko laboratorijska dijagnostika, 2006. godine

Strani jezik: Engleski (aktivno u govoru i pismu)

Ostale aktivnosti: Članica HKZR