T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İDRAR VE SERUM KORTİZOL VE KORTİZON SEVİYELERİNİN ÖLÇÜMÜNDE IMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Fatmagül GÜN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2014



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İDRAR VE SERUM KORTİZOL VE KORTİZON SEVİYELERİNİN ÖLÇÜMÜNDE IMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Fatmagül GÜN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman
Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV

KONYA-2014

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

İDRAR VE SERUM KORTİZOL VE KORTİZON SEVİYELERİNİN ÖLÇÜMÜNDE IMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-SIRALI KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METOTLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Fatmagül GÜN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı

Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13102024 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2014

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Bilgi birikimi, bakış açısı, hoşgörüsü ve eğitime verdiği destek ile kendime örnek aldığım ve uzmanlık eğitimim boyunca benden desteğini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Ali Ünlü hocama, danışman hocam Sayın Yrd. Doç. Dr. Hüsamettin Vatansev'e gerek tezimde gerekse eğitim hayatımda bilgi birikimini benimle paylaştığı için, gösterdiği ilgi, destek, hoşgörü ve yol göstericiliğiyle sağladığı katkılardan dolayı sonsuz teşekkür ederim..

Eğitimime olan katkılarından ve her zaman sağladıkları motivasyondan ve hoşgörülerinden dolayı Sayın Yrd. Doç. Dr. Bahadır Öztürk hocama ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Esma Menevşe hocama, iş disiplinini kendime örnek aldığım, iyi niyetli, özverili, çalışkan, derin bilgi birikimi ile gerek tez aşamasında gerekse eğitimim boyunca kendisinden çok şey öğrendiğim, her zaman desteğini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç. Dr. Sedat Abuşoğlu hocama teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi birikimini, tecrübelerini, hoşgörüsünü ve güler yüzünü esirgemeyen, her zaman bize abi şefkati ile yaklaşan Sayın Uzm. Dr. Abdullah Sivrikaya'ya sonsuz teşekkür ederim. Birlikte çalışmaktan her zaman büyük bir keyif aldığım çok değerli arkadaşım Arş. Gör. Dr. Hatice Baran'a, beraber çalıştığım Sayın Uzm. Dr. Fikret Akyürek'e ve Arş. Gör. Beyza Saraçlıgil'e katkılarından dolayı teşekkür ederim. Her zaman yanımda olan ve destek veren, birlikte çalışmaktan mutlu olduğum tüm biyokimya laboratuvarı teknisyen ve personeline sonsuz teşekkür ederim.

Tez çalışmamda, izotopun getirilmesinden, tezimin yazılmasına kadar tüm aşamalarında katkıları bulunan, hayatta sahip olduğum en güzel değerlerden birisi olan, arkadaştan öte, canım kardeşim Anıl Sera Çakmak'a ve değerli eşi Soner Çakmak'a sonsuz teşekkür ederim. Her zaman ve her durumda yanımda olup, destek veren, varlıkları sayesinde kendimi çok şanslı hissettiğim canım aileme, Emine teyzeme, Sevgi Ceren Kahraman'a, üzerimde emeği bulunan ve isimlerini burada sayamadığım herkese sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa no

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
SİMGELER ve KISALTMALAR vi
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 3
2.1. Adrenal bez anatomisi ve fizyolojisi 3
2.2. Steroid biyokimyası 5
2.3. Glukokortikoidler 6
2.4. Kortizol biyosentezi 6
2.5. Kortizol sentezinin düzenlenmesi 9
2.5.1. Kortikotropin salgilatici hormon (CRH) 9
2.5.2. Adrenokortikotrofik hormon (ACTH) 9
2.5.3. Nöroendokrin kontrol 10
2.5.3.1. Sirkadien ritm 10
2.5.3.2. Stres yanıtı 11
2.5.3.3. Feedback inhibisyon 11
2.6. Kortizolün plazmada taşınması 11
2.6.1. Kortikosteroid bağlayıcı globulin (CBG) 12
2.6.2. Albumin 12
2.7. Kortizolün metabolizması 12
2.8. Kortizol ve kortizon şantı 18
2.9. Kortizolün etki Mekanizması ve Etkileri 20
2.9.1. Steroid hormon reseptörleri 20
2.10. Kortizol ile ilişkili hastalıklar 22
2.10.1. Adrenokortikal yetmezlik hastalıkları 22
2.10.1.1. Primer adrenokortikal yetmezlik (Addison hastalığı) 23
2.10.1.2. Sekonder adrenokortikal yetmezlik 23
2.10.1.3. Konjenital adrenal hiperplazi 23
2.10.2. Cushing sendromu 24
2.10.2.1. Cushing hastalığı 25
2.10.2.2. Ektopik ACTH sendromu 25

2.10.2.3. Primer adrenal tümörler 25
2.10.2.4. Klinik belirtiler 26
2.11. Adrenal yetmezlik tanı testleri 27
2.11.1. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın değerlendirilmesinde kullanılan dinamik testler 27
2.11.1.1. İnsülin hipoglisemi (insülin tolerans testi) 27
2.11.1.2. ACTH stimülasyon testleri 28
2.11.1.3. Plazma ACTH düzeyi 29
2.11.1.4. Glukagon testi 29
2.11.1.5. Metirapon testi 29
2.11.1.6. CRH stimülasyon testi 30
2.11.2. Deksametazon supresyon testi 31
2.11.2.1. Düşük doz deksametazon baskılama testi 31
2.11.2.2. Yüksek doz deksametazon baskılama testi 31
2.12. Kortizol ölçümü 31
2.12.1. Kortizol ölçümünde kullanılan yöntemler ve prensipleri 32
2.12.2. Referans ve tercih edilen metotlar 34
2.12.3. Numune 37
2.12.4. Kortizol referans aralıkları 38
2.13. Klinik laboratuvarlarda yöntemlerin değerlendirilmesi 39
2.13.1. Analitik performans parametreleri 39
2.13.2. Performans standartları 40
2.13.3. Yöntem değerlendirme deneylerinin basamakları 40
2.13.4. Yöntem kabul edilebilirliğinin değerlendirilmesi 41
2.14. Metot Validasyonu 41
2.14.1. Doğruluk 41
2.14.2. Analitik aralık (Linearite) 41
2.14.3. Analitik Ölçüm Limitleri 42
2.14.3.1. Limit Of Blank (LOB) 42
2.14.3.2. Limit Of Dedection (LOD) 42
2.14.3.3. Limit Of Quantitation (LOQ) 42
2.14.4. Tekrarlanabilirlik (kesinlik) 42
2.14.5. Geri Kazanım 42
2.14.6. İnterferans (Girişim) 42

2.14.7. Referans Aralık Doğrulama 43
2.14.8. Taşıma (Carryover) 43
2.14.9. Matriks Etkisi 43
2.14.10. Yöntem Karşılaştırma 44
3. MATERYAL VE METOD 45
3.1. Kullanılan cihaz, malzemeler ve kitler 45
3.1.1. Cihazlar 45
3.1.2. Kimyasallar 45
3.1.3. Kitler 46
3.2. Analiz yöntemleri 46
3.2.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ölçüm yöntemi 46
3.2.1.1. Serum 46
3.2.1.2. İdrar kortizol ELISA ölçüm yöntemi 47
3.2.2. İmmunoassay çalışma prensibi 47
3.2.2.2. İdrar 48
3.2.3. LC-MS/MS 48
3.2.3.1. Metot optimizasyonu 48
3.2.3.2. LC-MS/MS parametreleri 50
3.2.3.3. Çalışma prosedürü 52
3.3. Ön işlemlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması 53
3.3.1. BSA hazırlanması 53
3.3.2. Standartların Hazırlanması 53
3.3.2.1. Kortizol standartı 53
3.3.2.2. Kortizon standartı 53
3.3.3. D_4 Kortizol izotop hazırlama prosedürü 53
3.4. Metot validasyonu 54
3.4.1. Linearite (doğrusallık) çalışması 54
3.4.2. Analitik ölçüm limitleri 54
3.4.2.1. Limit of blank (LOB) 54
3.4.2.2. Limit of detection (LOD) 55
3.4.2.3. Limit of quantitation (LOQ) 55
3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması 55
3.4.4. Geri elde çalışması 56
3.4.5. İnterferans çalışması 56

3.4.6. Referans aralık doğrulama çalışması 57
3.4.8. Numune stabilite çalışması 58
3.4.9. Dondurma ve çözmenin etkisinin belirlenmesi 58
3.4.10. Matriks etkisi çalışması 58
3.5. İstatistiksel analiz 60
4. BULGULAR 61
4.1. Linearite çalışması 61
4.2 Analitik ölçüm limitleri 63
4.3. Tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışması 67
4.3.1. Kortizol çalışma içi kesinlik çalışması 67
4.3.2. Kortizol gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışması 70
4.3.3. Kortizol günlerarası kesinlik çalışması 74
4.3.4. Kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışması 78
4.3.5. Kortizon gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışması 81
4.3.6. Kortizon günler arası kesinlik çalışması 85
4.4. Geri elde çalışması 89
4.5. İnterferans çalışması 90
4.6. Referans aralık doğrulama çalışması 95
4.7 Taşıma (carryover) çalışması 97
4.8. Numune stabilite çalışması 99
4.9. Dondurma ve çözmenin etkisinin belirlenmesi 99
4.10. Matriks etkisi çalışması 101
4.11. Metot karşılaştırma çalışması 103
5. TARTIŞMA 119
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 125
KAYNAKLAR 127
ÖZET 134
ABSTRACT 136
EKLER 138
EK A: Etik Kurul Raporu 138
ÖZGEÇMİŞ 139

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar

ACTH: Adrenokortikotropik hormon
AUS: 8 Anilino-1-naftilin sülfonik asit
BHSD: Beta hidroksisteroid dehidrogenaz
BSA: Bovin serum albümin
cAMP: Siklik adenozin mono fosfat
CAP: College of American Pathologists
CBG: Kortizol bağlayıcı globülin
CLIA: Clinical laboratory improvement amendments
CLSI: Clinical laboratory standard institute
CRH: Kortikotropin salgılatıcı hormon
CV: Coefficient of variation
DFE: Dihidrokortizon
DHEA: Dehidroepiandrosteron
DHF: Dihidrokortizol
DOC: Deoksikortikosteron
E: Kortizon
ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay
F: Kortizol
GC: Gaz kromatografisi
GC-MS: Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi
GF: Growth hormon
HHA: Hipotalamus-hipofiz-adrenal aks
HPLC: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
ID-MS: İzotop dilüsyon- kütle spektrometresi
KBY: Kronik böbrek yetmezliği
LC-MS: Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi
LDL: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOB: Limit of blank
LOD: Limit of detection
LOQ: Limit of quantitation

MRM: Multiple-reaction-monitoring

MSH: Melanin stimüle edici hormon

PBS: Phosphate buffered saline

POMC: Proopiyomelanokortin

SD: Standart sapma

StAR: Siteroidojenik akut regülatör protein

T3: Triiyodotronin

T4: Troksin

TE_A: Toplam izin verilen hata

THE: Tetrahidrokortizon

THF: Tetrahidrokortizol

TRH: Tirotropin salgılatıcı hormon

TSH: Tiroit stimüle edici hormon

Simgeler

NaH_2PO_4: Monosodyum fosfat

Na_2HPO_4: Disodyum fosfat

NaCl: Sodyum klorür

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Kortizol vücuttaki en önemli glukokortikoid hormondur. Adrenal korteksin zona fasikülata tabakasından sentezlenir. Kortizol, enerji metabolizması, elektrolit dengesi ve kan basıncının idamesi, immünmodülasyon, stres yanıtı, hücresel çoğalma ve diferansiyasyon gibi birçok hayati faaliyetin düzenlenmesinde önemli görevleri vardır. Bu hormon insan fizyolojisinde önemli rol oynamakla birlikte, birçok hastalığın tanısında da önemli bir markerdır. Hepatik metabolizmasında çok sayıda metabolik dönüşüm söz konusudur. Bunların en önemlisi, kortizolün 5α- ve 5β-redüktaz ile geri dönüşümsüz olarak dihidrokortizole indirgenmesidir. Kortizol, ayrıca, 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz ile biyolojik olarak inaktif olan kortizona dönüştürülür. Bu dönüşüm 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz izoenzimleri tarafından katalize edilir. Doku ve vücut sıvılarındaki kortizol konsantrasyonu 11β-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 ve tip 2 enzimleri ile kontrol altında tutulur. Kortizol ve kortizon için uygulanacak kombine test pek çok bozukluğun değerlendirilmesinde potansiyel olarak faydalı olacaktır.

Geleneksel olarak antikor bazlı yöntemler, serum kortizol analizi için yaygın olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemler kortizon ve diğer steroid metabolitlerden kaynaklanan girişimlere maruz kalabilirler. Bu nedenlerden dolayı kromotografik yöntemlerle kortizol ölçümünün immunoassay yöntemlerden daha doğru olduğu öne sürülmüştür. Kütle spekrometresi bazlı yöntemler son dönemde özellikle kortizol ve kortizon ölçümü için ilgi çekicidir. Kortizol ve kortizon ölçümü için LC-MS\MS tabanlı yöntemler bulunmaktadır. Benzer şekilde idrar kortizol ölçümünde immunoassay yöntemlerin sınırlamaları idrar kortizol düzeyinin ölçülmesinde spesifik kromotografik yöntemlerin gelişmesine ışık tutmuştur. Bu kromotografik yöntemler kortizol ölçümünde sadece interferansı azaltmakla kalmaz, aynı zamanda kortizolün endojen metaboliti olan kortizon ölçümüne de olanak sağlar.

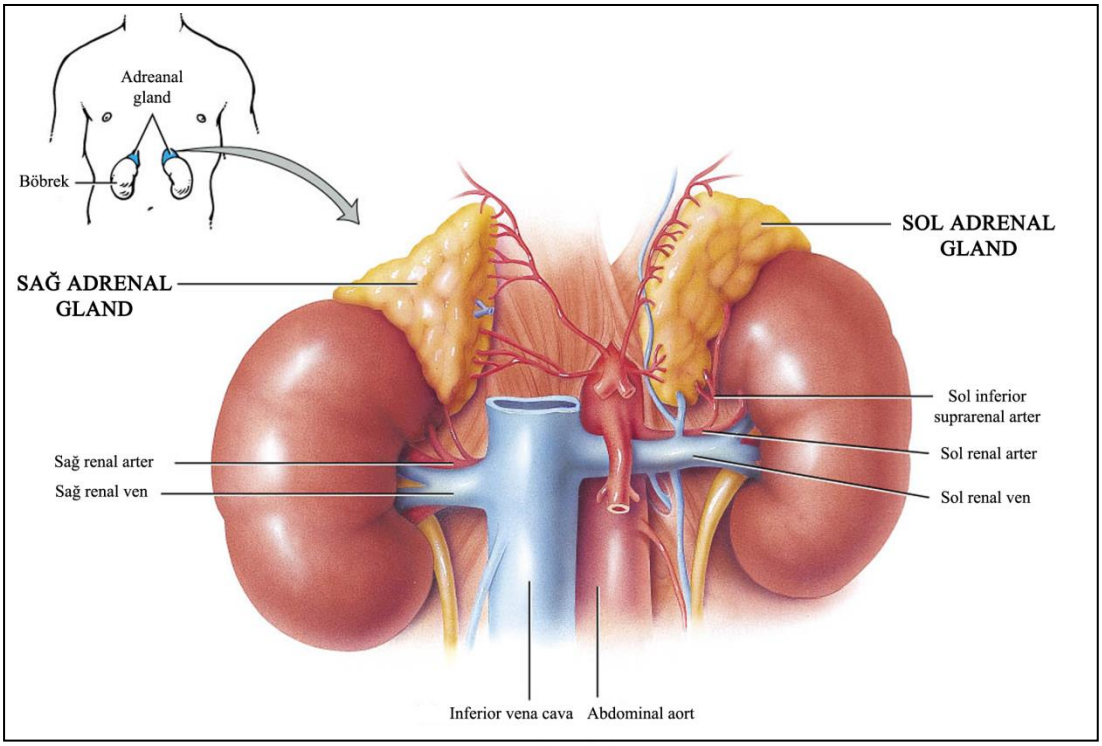
Yöntem değerlendirme çalışmalarında hedef yeni yöntemde olabilecek mevcut hataların oranını saptamaktır. Bu amaçla gerekli protokollere uyularak deneysel çalışmalar gerçekleştirilir. Elde edilen sonuçlara göre yöntemin performansının yeterli olup olmadığına karar verilir. Bir yöntemin performansı; analitik doğruluğu, hassasiyeti, tekrarlanabilirliği, spesifikliği, interferans, linearite

sınırları gibi bir çok açıdan değerlendirilerek ölçülür. Kortizol düzeyinin belirlenmesi pek çok hastalığın tanısında ve takibinde önemlidir. Bu nedenle kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi yüksek olmalıdır. Bu çalışmada serum ve idrar kortizol ve kortizon düzeyin belirlenmesinde analitik interferansın azaltılması ve doğruluğun arttırılması amacıyla Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS)'de CLSI kurallarına uygun yeni bir ölçüm metodu geliştirilmesi planlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, geliştirilen metodun diğer ölçüm yöntemleriyle olan uyumunun, kemilüminesans immunoassay ve ELISA yöntemleri ile karşılaştırılarak belirlenmesi ve klinikteki kullanım potansiyelinin ortaya konulması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenal bez anatomisi ve fizyolojisi

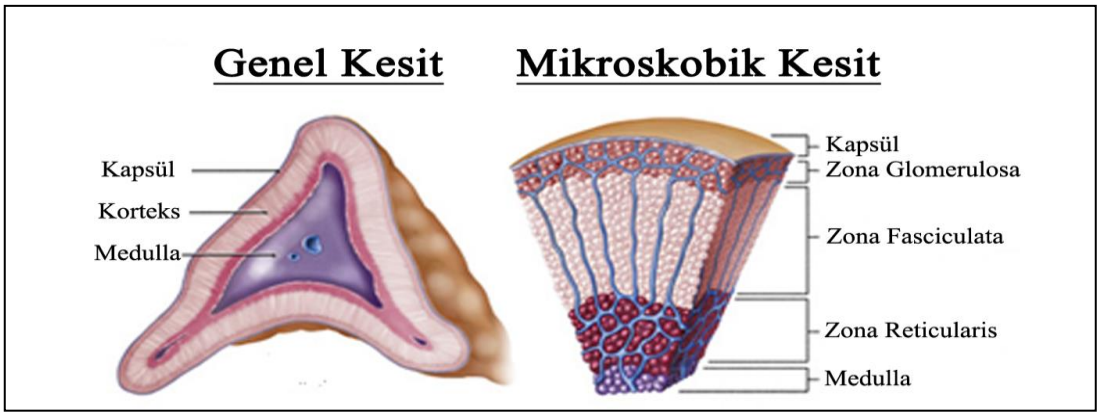
Adrenal bezler (sürrenal gland, glandula suprarenales, böbreküstü bezi) insanda onbirinci torakal vertebra düzeyinde retroperitoneal olarak her iki böbreğin üst kutbunun iç yanına yerleşmiş sarımsı renkteki, endokrin yapıdır (Şekil 2.1) (Baş, 2008). Uzunluğu 3-5 cm olup, kalınlığı da 4-6 mm'dir. Ağırlığı ise yaklaşık olarak 3,5-5 gr'dır (Aktümsek, 2001; Erdoğan, 1996). Esas bezin çevresindeki bağ dokusu içinde sadece korteks dokusu içeren ve glandula suprarenalis accessoriae denilen küçük bezler yer alabilir. Böbrek üstü bezlerinde dışta korteks, içte medulla katmanları bulunur (Castonzo, 1999).



Şekil 2.1. Adrenal glandların şematik görünümü (http://classroom.sdmesa.net/eschmid/Chapter13-Zoo145.htm).

Adrenal korteks; çeşitli hormonların salgılanmasında görevlidir ve yaşam için gereklidir. Çift taraflı olarak çıkarılması durumu yaşamla bağdaşmaz. Korteks dıştan içe doğru farklı tiplerde steroid sentezleyen üç katmandan oluşur. Kapsülün hemen altında yer alan glomeruloza katmanı mineralokortikoidleri, orta kat zona fasikulata glukokortikoidleri ve en içte bulunan zona retikularis katmanı ise seks steroidlerini sentezler (Erdoğan, 1996; Junqueira ve ark, 2005; Wrobel ve ark, 1999).

Adrenal medulla; yaşamsal olarak gerekli bir yapı değildir. Medulla'nın çıkarılması durumunda önemli bozukluklar oluşmaz. Katekolaminleri (adrenalin ve noradrenalin) salgılayan kromaffin hücreler ile tek ya da küçük gruplar halindeki sempatik gangliyon hücrelerinden oluşur, yokluğu kromaffin paragangliyonlar tarafından doldurulur (Aktümsek, 2001; Erdoğan, 1996) (Ozan, 2005).



Şekil 2.2. Adrenokortikal hormonların böbreküstü bezi korteksinin farklı bölgelerinden salınımı (http://imueos.wordpress.com/2010/04/27/adrenal-steroid-hormones/).

Şekil 2.2'de görüldüğü gibi, böbrek üstü bezi medulla (adrenal medulla) ve korteks (adrenal korteks) olmak üzere iki farklı yapıdan oluşur. Bezin %20'sini oluşturan ve merkezde bulunan adrenal medulla sempatik sinir sistemi ile ilişkilidir. Sempatik uyarıyla epinefrin ve norepinefrin hormonlarını salgılar. Adrenal korteks, kortikosteroidler olarak sınıflandırılan tamamen farklı bir grup hormon salgılar. Bu hormonlar kolesterolden sentezlenir, benzer kimyasal formüle sahiptir. Bununla birlikte moleküler yapılarındaki küçük değişiklikler birçok farklı ve önemli işlevleri gerçekleştirmelerine imkan sağlar. Adrenal korteks 3 farklı tabakadan oluşmuştur. Şekil 2.2'de böbrek üstü bezi korteksinin tabakaları görülmektedir.

Bu tabakalar sırasıyla aşağıda açıklanmıştır;

1) Kapsülün hemen altında yer alan zona glomerüloza korteksin yaklaşık olarak %15'ini oluşturur. Bu hücreler adrenal bezde aldosteron salgılayabilen tek hücre grubudur, çünkü aldosteron sentezi için gerekli olan aldosteron sentaz enzimine sahiptirler. Burada renin-anjiotensin sistemi ve potasyum ile aldosteron sentezi düzenlenir (Greenspan ve ark, 2004).

2) Ortada yer alan ve en geniş tabaka şeklinde bulunan zona fasikülata adrenal korteksin hemen hemen %75'ini oluşturur. Bu tabakada kortizol ve kortikosteron gibi glukokortikoidler ve aynı zamanda az miktarda adrenal adrojenler ve östrojenler salgılanır. Bu hücrelerin salgılarının kontrolü büyük ölçüde adrenokortikotropik hormon (ACTH) vasıtasıyla hipotalamus-hipofiz aksı tarafından gerçekleştirilir. ACTH eksikliği ya da fazlalığında zona retikülaris ile birlikte bu tabakada atrofi, hipertrofi ve hiperplazi gerçekleşir. ACTH uyarısı ile zona fasikülata da akut kortizol üretimi gerçekleşirken, zona retikülarisin ACTH uyarısına katkısı ise bazal glukokortikoid salımının devamını sağlamak yönündedir. Clear hücreler olarak bilinen lipit içeriği fazla, büyük hücreler de bu tabakada bulunur (Greenspan ve ark, 2004).

3) Zona retikülaris, korteksin en derin tabakası olup adrenal androjenler dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion ile az miktarda östrojen ve bazı glukokortikoidlerin salgılanmasını gerçekleştirir (Hall, 2010).

Tablo 2.1'de adrenal korteks tabakaları ve bu tabakalardan salgılanan hormonlar ve etkileri özetlenmiştir.

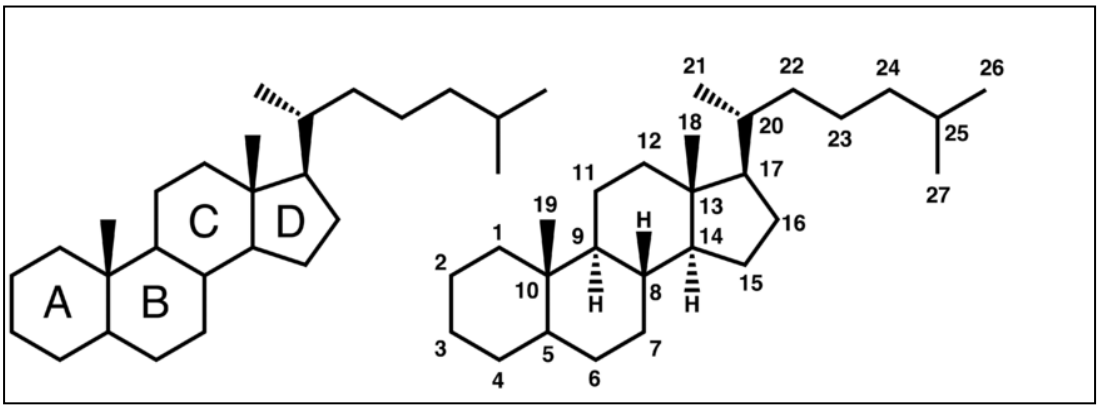
Tablo 2.1. Adrenal glandın anatomisi ve hormonları.

Adrenal Tabaka	Ana Hormonlar	Etki
Korteks		
Zona glomeruloza Zona fasikulata Zona retikularis	Aldosteron Kortizol Dihidroepiandrosteron Androstenedion	Mineralokortikoid Glukokortikoid Adrenal androjen
Medulla	Epinefrin	Katekolamin

2.2. Steroid biyokimyası

Adrenal kortekste üretilen major hormonlar, minerolokortikoidler, glukokortikoidler ve adrenal androjenlerdir. Steroidlerin iskeleti, siklopentanoperhidrofenantren halkasından oluşur (Castonzo, 1999). Fenantren çekirdeği üç-altılı halka yapı (A, B ve C)'den oluşur, siklopentan halkası (D) bu

yapıya bağlanır. Bileşiğin hidrojen atomlarıyla doygunluğunu perhidro ön eki gösterir. Bu gruptaki bileşikleri; kolesterol, safra asitleri, cinsiyet hormonları vitamin D gibi doğal steroidler ve adrenal steroidler oluşturur. Steroid hormonlar, Şekil 2.3'te görüldüğü gibi, 21 (C21 steroid) karbon atomu içerirler ve üç boyutlu moleküllerdir. Atomlarının farklı düzlemde bulunması durumunda izomerleri oluşur (Tietz, 2006).



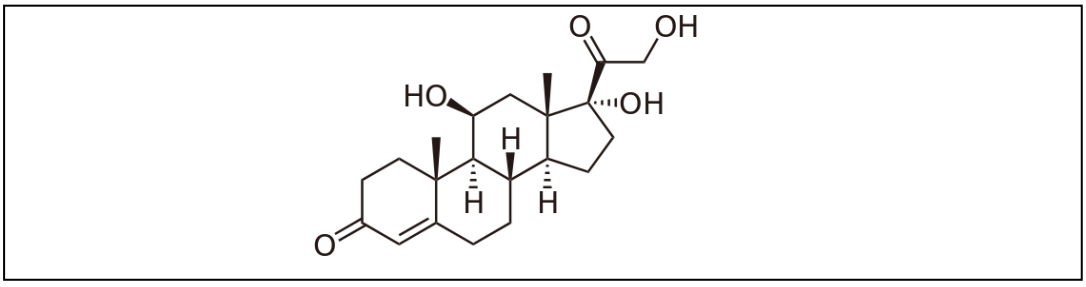
Şekil 2.3. Steroidlerde ortak yapılar ve numaralandırma sistemi (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Steroid_numbering.png).

2.3. Glukokortikoidler

Kortizol, glukokortikoid etkinliği en fazla olan hormondur. Kortizon, kortizolün metabolitidir ve ikinci derecede glukokortikoid etki gösterir. Kortikosteron da zona glomerülozadan salınmasına rağmen glukokortikoid aktivite gösterir. 17α-hidroksilaz enzim defektinde, kortikosteronun glukokortikoid etkinliğinden dolayı, glukokortikoid eksikliğine dair bulgu görülmez (Miller, 2009; Nimkarn ve ark, 2011; Therrell, 2001).

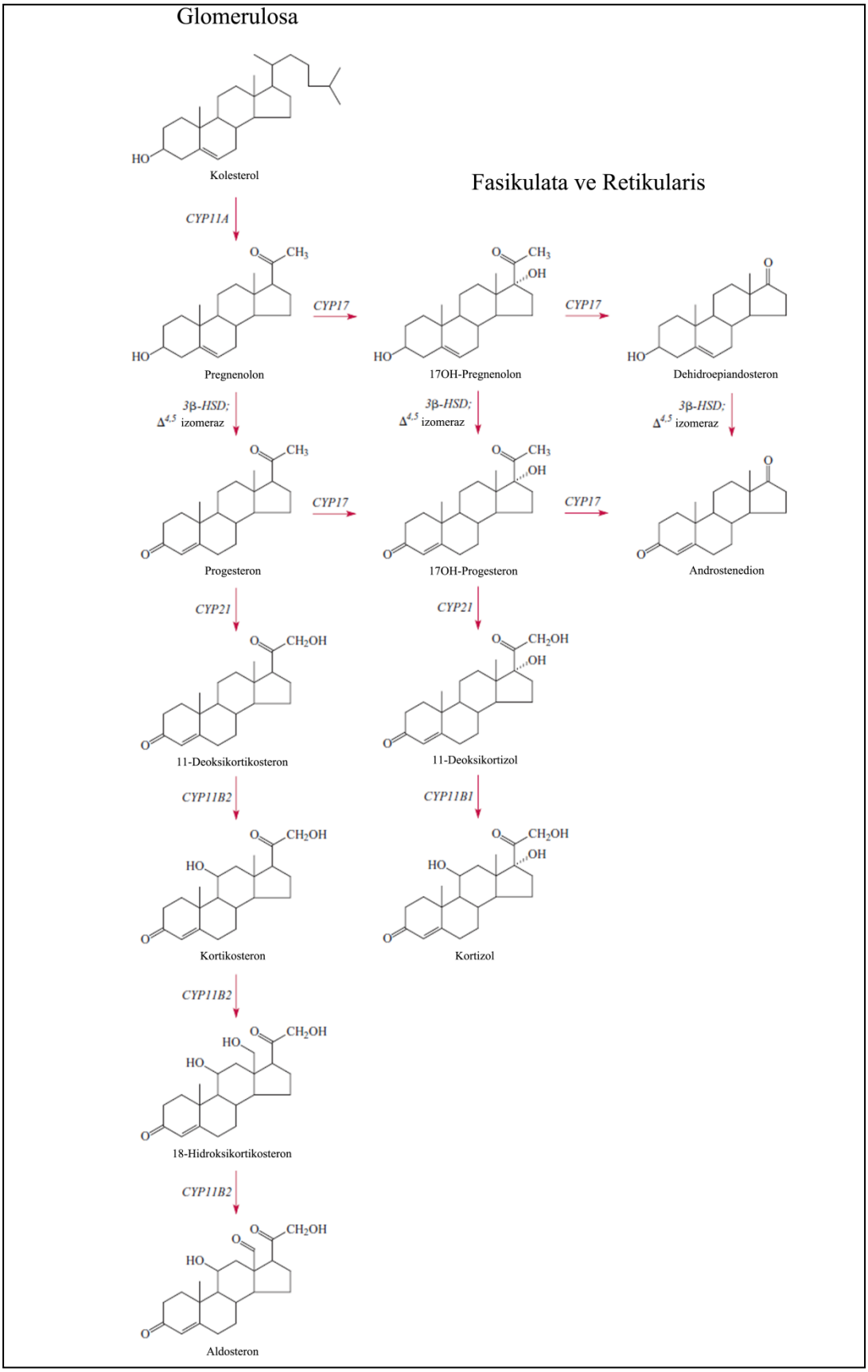
2.4. Kortizol biyosentezi

Tüm steroid hormonlar gibi kortizol sentezi de kolesterolden başlar. Kortizolün moleküler yapısı Şekil 2.4'te verilmiştir.



Şekil 2.4. Kortizolün moleküler yapısı (http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Cortisol2.svg).

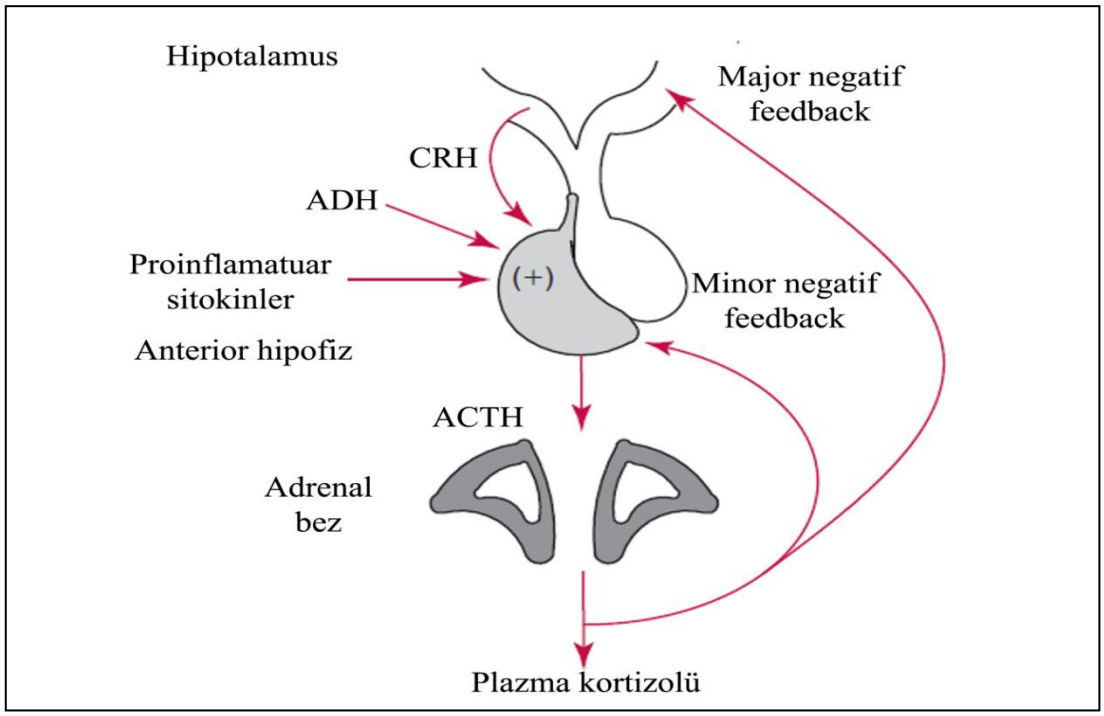
Adrenal bez içinde asetat sentezi olmakla birlikte kolesterolün temel kaynağını plazma lipoproteinleri oluşturur. Adrenal beze gelen kolesterolün %80'i düşük yoğunluklu lipoproteinden (LDL) sağlanır. Steroidojenik akut regülatör protein (StAR), steroidojenik uyarıya yanıtı düzenler. Mitokondri içerisine kolesterol taşınmasını arttırır. Mitokondri içinde gerçekleşen ve adrenal steroid sentezinin hız kısıtlayıcı basamağı olan reaksiyon, kolesterolün ACTH kontrolünde pregnenolona dönüşümüdür. Pregnenolon düz endoplazmik retikulumda CYP17 ile 17 a-hidroksipregnenolona dönüşür. 17 a-hidroksipregnenolon da yine düz endoplazmik retikulumda 3β hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ile 17a-hidroksiprogesterona dönüşür. Reaksiyon 21-hidroksilasyon basamağını içeren mikrozomal CYP21A2 enzimi ile devam eder ve 11 deoksikortizol sentezi gerçekleşir. 11 deoksikortizol oluşumu gerçekleştikten sonra mitokondride CYP11B2 enzimi ile kortizol sentezi tamamlanır (Şekil 2.5) (Greenspan ve ark, 2004).



Şekil 2.5. Kortizol sentez basamakları (Burtis ve ark, 2012).

2.5. Kortizol sentezinin düzenlenmesi

Kortizol salınması hipotalamus-hipofiz-adrenal aks (HHA) sistemi ile düzenlenmektedir (Şekil 2.6). Plazma kortizol düzeyi ACTH ile paralellik gösterir (Greenspan ve ark, 2004).



Şekil 2.6. Kortizol sentezinin düzenlenmesi (Burtis ve ark, 2012).

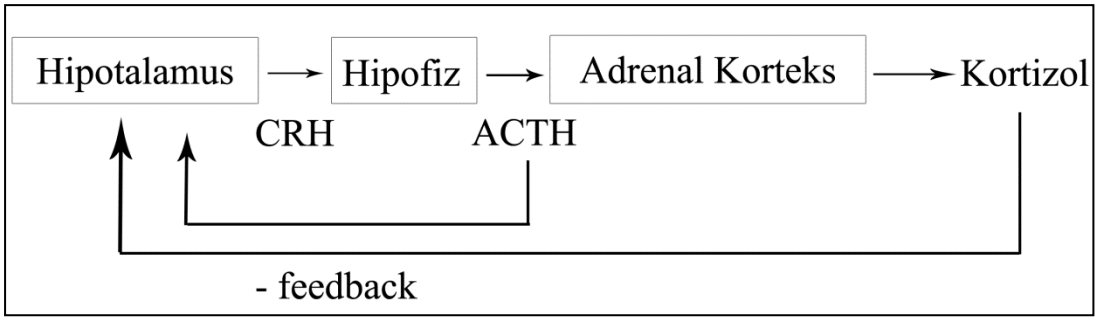
2.5.1. Kortikotropin salgilatici hormon (CRH)

Hipotalamusun paraventriküler nükleusuna yerleşmiş hücrelerinden salınan 41 aminoasit içeren peptit yapıda bir hormondur (Elbüken, 2011). Hipofizdeki spesifik reseptörlerine bağlanarak siklik AMP ve protein kinazları aktive eder. Bunun sonucunda proopiyomelanokortin (POMC) geni transkribe olur ve ACTH salınır. CRH salınımı pulsatildir (White ve ark, 1986).

2.5.2. Adrenokortikotrofik hormon (ACTH)

ACTH ön hipofizden salınan, 39 aa içeren POMC ailesinden peptit yapıda bir hormondur ve zona fasikülatayı uyararak kortizol salınmasına neden olur (Elbüken, 2011). ACTH salınması CRH ve arjinin vazopressin ile uyarılmaktadır (Ghayee ve ark, 2007). Glukokortikoidler hipofiz ve hipotalamus düzeyinde etki göstererek HHA aksı baskılarlar. Erken ve geç feed back etkiler bulunmaktadır. Erken feed back etki

hipofiz düzeyinde olup, CRH yanıtını baskılarken, geç feedback etki ise hem hipofiz hem de hipotalamus düzeyindedir (Şekil 2.7) (Talan, 2010).



Şekil 2.7. Kortizolün feedback düzenlenmesi

ACTH, melanin stimüle edici hormon (MSH) ile yapısal olarak benzerdir. ACTH fazlalığı bu nedenden dolayı cilt renginde koyulaşmaya sebep olabilir (Berenbaum, 2001; Johannsen ve ark, 2006; Kandemir ve ark, 1997). ACTH adrenal korteks membran reseptörüne bağlanır, cAMP üzerinden protein kinazları aktive eder (Çamurdan, 2013). Steroidojenik enzimlerin transkripsiyonu ve translasyonu ACTH etkisiyle artar. Adrenal kortekste serbest kolesterol miktarını ve mitokondri içine kolesterol girişini arttırır (White ve ark, 2000).

ACTH, hormonların sentezinde olduğu kadar salınmasında da etkilidir. Adrenal korteksin kan akımını arttırarak hormonların dolaşıma geçmesini sağlar (Berenbaum ve ark, 2004).

2.5.3. Nöroendokrin kontrol

Nöroendokrin kontrol üç mekanizma ile gerçekleşir. Bunlar, ACTH'ın sirkadian ritmi, HHA aksın stres yanıtı ve kortizolün geri bildirim inhibisyonudur (Greenspan ve ark, 2004).

2.5.3.1. Sirkadien ritm

Kortizol salımının CRH ve ACTH ile düzenlenen diürnal bir ritim vardır. Sabah 04:00-06:00 saatleri arasında salımı en yüksek düzeydedir. Giderek azalarak saat 22:00-02:00 saatleri arasında en düşük düzeye iner. Gündüz ve gece 30-120 dakikalık döngülerle salınır (Çamurdan, 2013). Uyanma ile birlikte salımı azalırken, yemek yeme ve egzersiz sonrasında ise artış gösterir. Uyku-uyanıklık, aydınlık-

karanlık maruziyeti, yeme zamanına bağlı olarak kişinin kendi içinde ve kişiler arasında sirkadien ritimde farklılıklar gözlenebilir. Fiziksel ve psikolojik streslerde, merkezi sinir sistemi ve hipofiz hastalıklarında, Cushing sendromunda, karaciğer hastalığı, kronik böbrek yetmezliği, alkolizm ve siproheptadin gibi ilaçların kullanılması durumunda sirkadien ritm değişebilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.5.3.2. Stres yanıtı

Fizyolojik stres durumunda plazma ACTH ve kortizol düzeyleri artmaya başlar. Stres yanıtı merkezi sinir sistemi yoluyla hipotalamustan CRH, dolaysıyla hipofizden de ACTH salgısını arttırır (Greenspan ve ark, 2004). İmmün sistem de HHA aks düzenlemesinde etkilidir. Sistemik infeksiyonlar ve çeşitli inflamatuar sitokinler HHA aksı aktifleştirerek, CRH ve ACTH üzerinden kortizol salınmasını arttırırlar (Turnbull ve ark, 1999).

2.5.3.3. Feedback inhibisyon

Glukokortikoidler hipofiz ve hipotalamus düzeyinde etki ederek CRH ve ACTH salgısını baskılarlar (Greenspan ve ark, 2004). Sürekli yüksek doz glukokortikoid maruziyetinde CRH ve ACTH düzeyleri baskılanır ve zona retikülaris ve zona fasikülata atrofisi görülebilir (Keller-Wood ve ark, 1984).

2.6. Kortizolün plazmada taşınması

Steroid hormonlar %90-98 oranında spesifik bağlayıcı proteinlere ya da albumine bağlanır. Plazmada serbest olarak sülfatlı ya da glukronid formda dolaşırlar. Kortizol temel olarak kortizol bağlayıcı globuline (CBG) bağlanır (Tietz, 2006). Bağlanma miktarı ve metabolik inaktive edilme hızı kortizolün plazma yarı ömrünü belirler . Bağlı durumda steroidler inaktif haldedir ve bu durum metabolik klirensi geciktirir. Böylece dolaşımdaki kortizol havuzu sağlanmış olur ve plazma serbest kortizolü epizodik dalgalanmalardan korunur (Greenspan ve ark, 2004). Kortizol plazmada %80-90 arasında CBG'ne, %7 oranında albumine bağlanırken, %2-3 oranında serbest olarak bulunur (Tietz, 2006). Serbest fraksiyon biyolojik olarak aktif olan form olup, ACTH ile regüle edilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.6.1. Kortikosteroid bağlayıcı globulin (CBG)

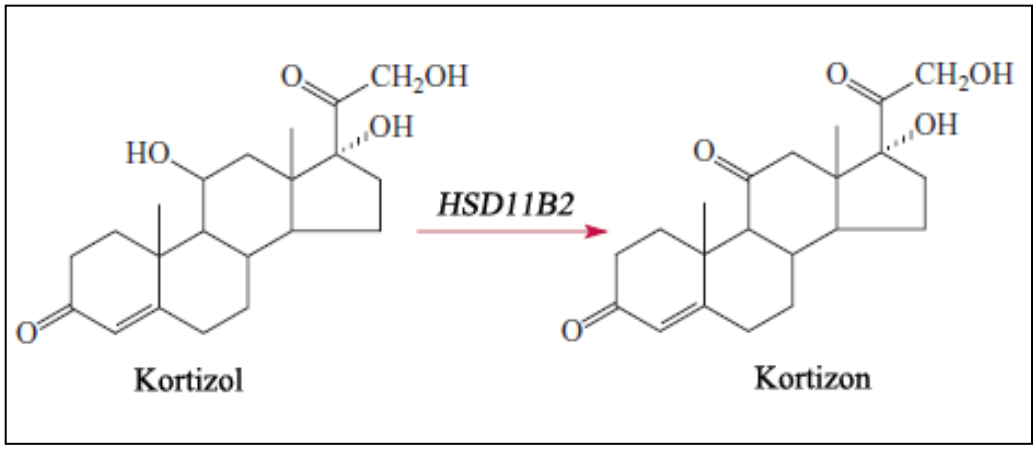
58 kDa ağırlığında 383 aa içeren karaciğerde sentezlenen α_1-globulindir (Hammond ve ark, 1991; Rosner, 1991). Serin protez ailesindendir (Law ve ark, 2006). CBG'nin kortizole bağlanması yüksek afinite ile olur. Yaklaşık olarak 25µg/Lkortizol bağlayabilir (Greenspan ve ark, 2004). Bu değerin üstündeki kortizol değerlerinde göreceli olarak serbest kısım artar (Brien, 1981). CBG konsantrasyonunu östrojenler arttırır. Gebelikte CBG iki-üç kat artar. Kronik aktif hepatitli bazı hastalarda da CBG konsantrasyonu artabilir. Böbrekten kaybın artmasına bağlı olarak nefrotik sendromda, karaciğerde sentezin azalmasına bağlı olarak sirozda, metabolizmanın hızlanmasına bağlı hipertiroidizmde ve glukokortikoid tedavisinde CBG konsantrasyonu düşer. CBG konsantrasyonundaki değişimle birlikte total kortizol konsantrasyonu değişse bile HHA aks normal olduğu sürece serbest kortizol konsantrasyonu değişmez (Tietz, 2006).

2.6.2. Albumin

CBG göre daha düşük afiniteyle daha fazla kortizol bağlar. CBG bağlama kapasitesi doygunluğa ulaşınca albumine bağlanma oranı artar. Sentetik glukokortikoidler albumine daha fazla bağlanır (Greenspan ve ark, 2004).

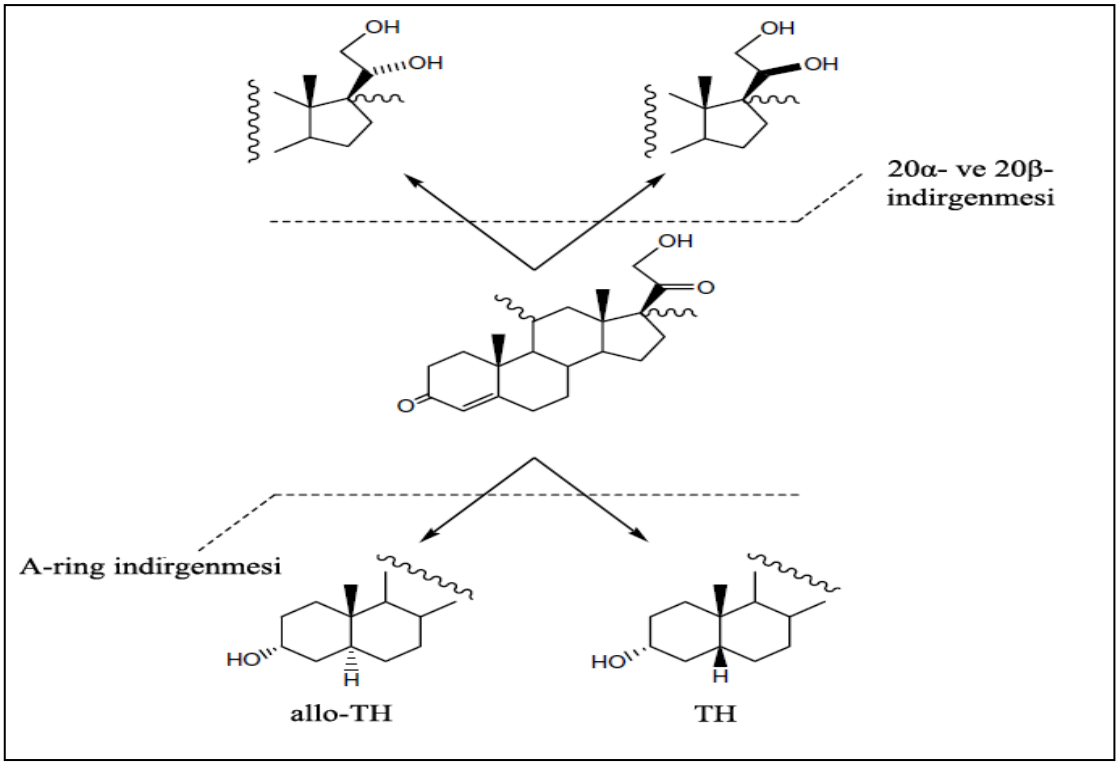
2.7. Kortizolün metabolizması

Steroid metabolizmasında karaciğer, sitokrom P450 enzim sistemi ile birlikte major rol oynar. Böbreğin metabolizmada daha az rolü vardır ama metabolize edilmiş steroidlerin atılımında önemli rol oynar. Steroid hormonların klirensi hidroksilasyon, dehidrojenasyon, çift bağların redüksiyonu ve sülfat ya da glukronid ile konjugasyonunu içerir. Steroidlerin redüksiyonu sonucunda suda çözünür konsantrasyonları artar, ayrıca sülfat ve glukronid konjugasyonu için hidroksil grubu gibi fonksiyonel gruplar sağlanır. Konjugasyon idrardaki çözünürlüğü arttırır ve atılımı sağlar. Konjuge steroidlerin yaklaşık %90'ı böbrekten atılır (Tietz, 2006). Kortizol 11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz (11BHSD) tip 2 enzimi ile kortizona dönüşür (Şekil 2.8).



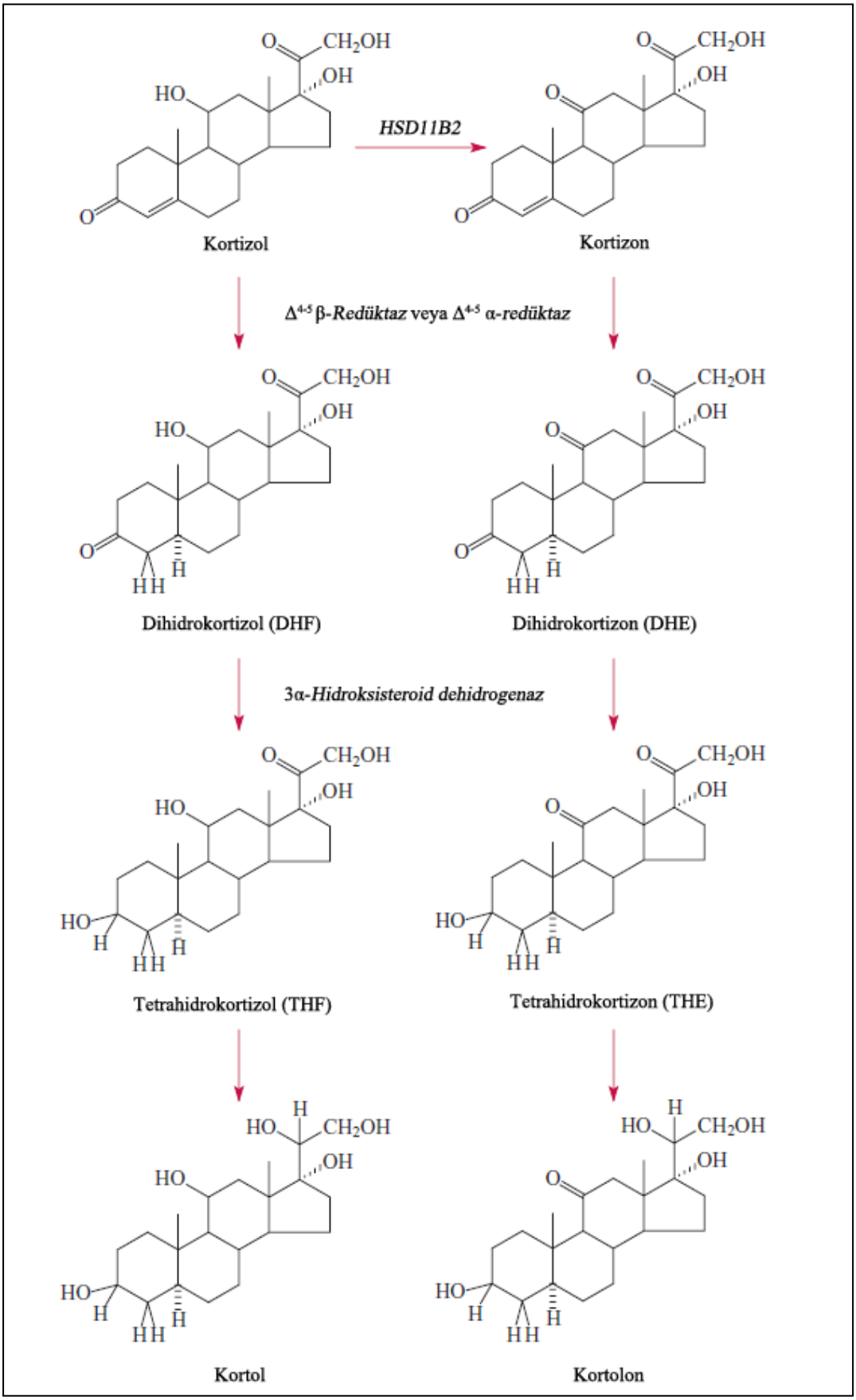
Şekil 2.8. Kortizolün kortizona dönüşümü (Burtis ve ark, 2012)

Bu reaksiyonda 11 hidroksil grubu, iki hidrojenin çıkarılmasıyla 11 okso grubuna dönüştürülür. Kortizonun glukokortikoid aktivitesi yoktur. Kortizon ilaç olarak kullanıldığında NADPH bağlı okso redüktaz olan 11 beta hidroksisteroid dehidrogenaz tip 1 ile karaciğerde kortizole aktive edilir. C4-5 arasındaki çift bağın 5α ya da 5β redüktaz enzimi sayesinde geri dönüşsüz olarak indirgenmesiyle dihidrokortizol (DHF) ve dihidrokortizon (DHE) oluşur. C3'teki keton gruplarının 3 Beta hidroksistreroid dehidrogenaz (3BHSD) enzimi ile indirgenmesi sonucu tetrahidrokortizol (THF) ve tetrahidrokortizon (THE) oluşur. Bunlar kortizol klirensinin büyük bir kısmını oluşturur (~%50) 5α ve 5β redüktaz aktivitesindeki tek fark hidrojenin alfa ya da beta oryantasyonundan kaynaklanır. Normalde beta metaboliti baskındır. (5βTHF : 5aTHF=2:1). THF ve THE'nun 20α-hidroksisterid dehidrogenaz ya da 20β-hidroksisteroid dehidrogenaz ile ileri metabolizmasından α ve β-kortol ve kortolon (kortoik asit) oluşur (Şekil 2.9).



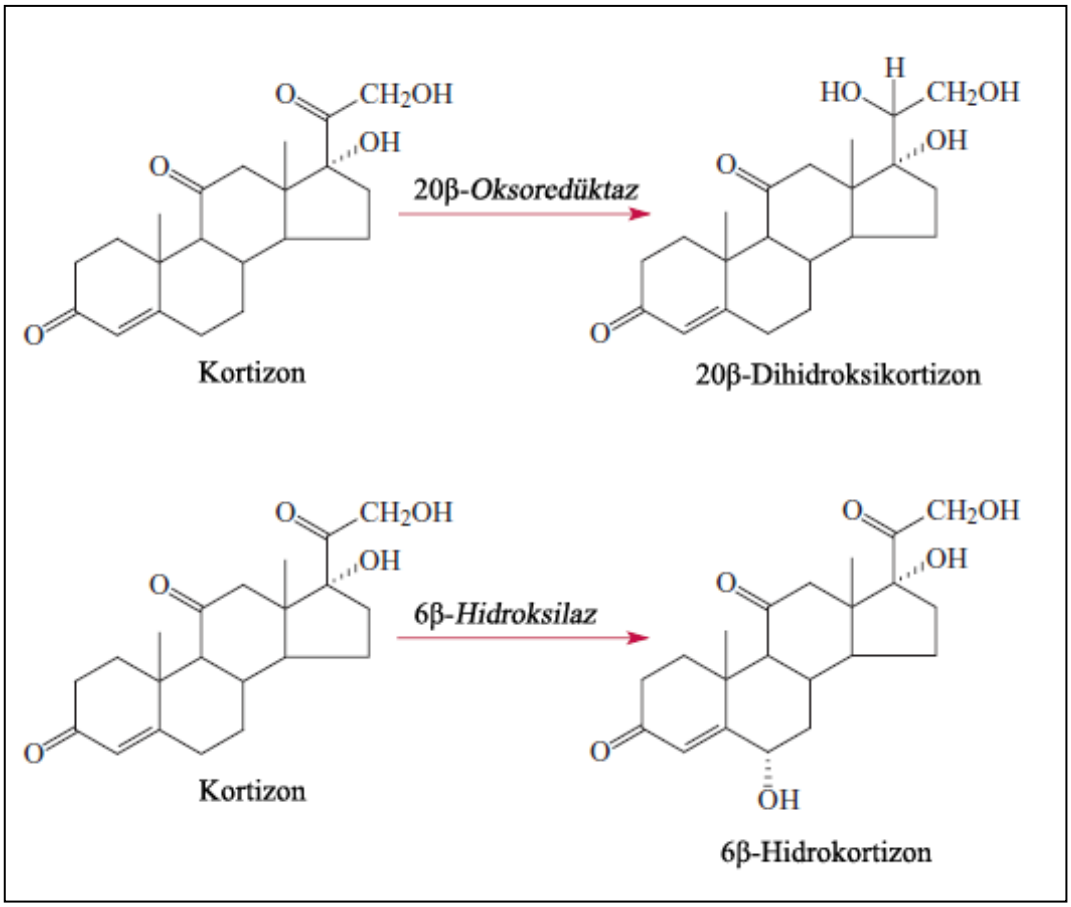
Şekil 2.9. A-ring indirgenmesi (Makin ve ark, 2010)

β-Kortol ve kortolon, kortizol klirensinin %30'nu oluşturur. 17-20 karbon bağlarının açılması ketonları oluşturur ve bunun sonucunda 11-beta hidroksietiokolonalon ve 11-ketoetikolonalon meydana gelir ve kortizol klirensinin %10'nu oluşturur. Kortizolün normalde %1'i serbest kortizol ya da kortizon olarak atılır. Şekil 2.10'da kortizol metabolizması özetlenmiştir.

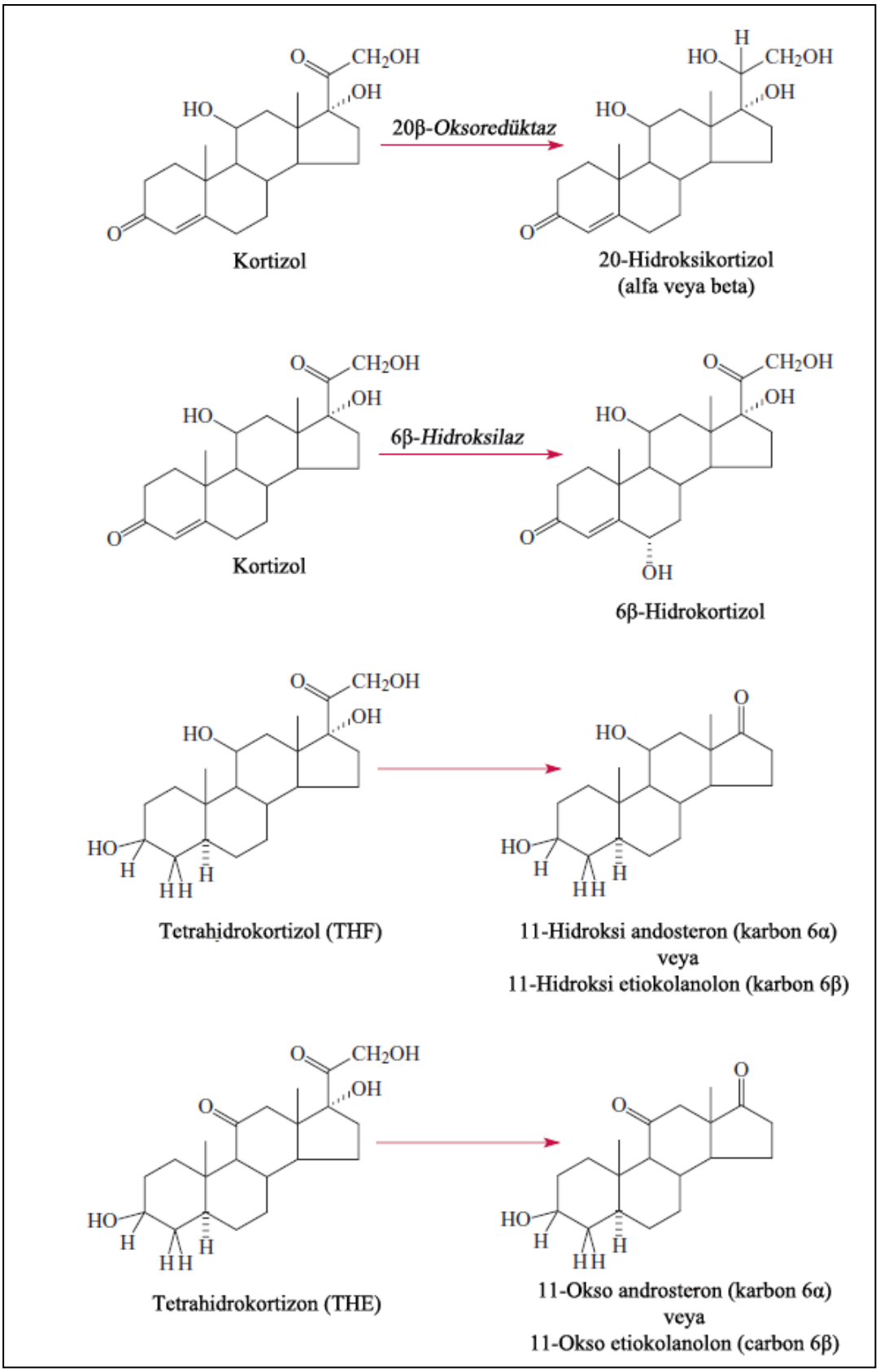


Şekil 2.10. Kortizol metabolizması (Burtis ve ark, 2012)

Minor kortizol metabolitleri 20. karbon ketonunun indirgenmesi sonucu oluşan 20 alfa ve 20 beta hidroksikortizol ve karbon 6'nın hidroksilasyonu sonucunda oluşan 6 hidroksikortizoldür. THF ve THE'deki karbon 17'nin oksidasyonu sonucu ise okso ve hidroksi metabolitler oluşur (Şekil 2.11 ve 12). Birçok kortizol metaboliti %95'ten fazla karbon 3 pozisyonunda glukronik asitle ya da karbon 21 pozisyonunda sülfat ile konjuge edilir. Glukronid metabolitleri sülfatlı metabolitlerden daha baskındır (Tietz, 2006).



Şekil 2.12. Kortizonun minor metabolitleri (Burtis ve ark, 2012)



Şekil 2.11. Kortizolün minor metabolitleri (Burtis ve ark, 2012)

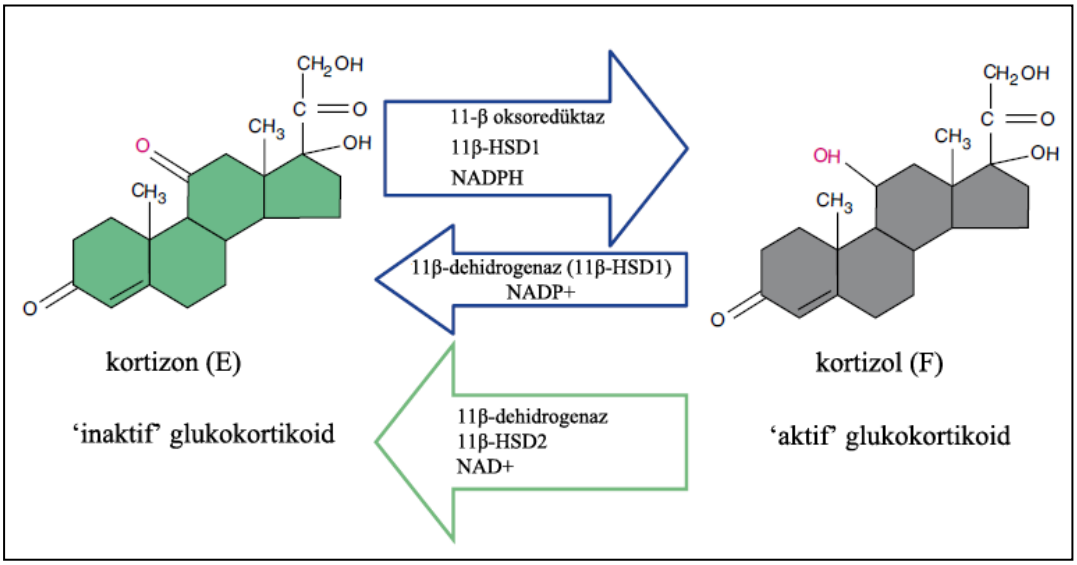
Kortizol metabolizması yaşlılarda ve infantlarda düşüktür. Kronik karaciğer hastalığında bozulur. Hipertroidizmde metabolizma ve atılım hızlanırken, hipotroidizmde ise azalır. Gebelikte CBG düzeyi artar, bundan dolayı metabolizması azalır. Açlık ve anoreksiye nervoza kortizol klirensini azaltan diğer durumlardır. Neonatanlarda, gebelerde, östrojen tedavisi alanlarda, kronik hastalarda ve karaciğer hastalarında kortizolün 6β hidroksikortizole dönüşümü artmıştır. Karaciğerde mikrozomal enzimleri uyaran ilaçlar kortizol metabolizmasını hızlandırır.

2.8. Kortizol ve kortizon şantı

Aldosteron, etkilerini böbrekteki mineralokortikoid reseptörler üzerinden gerçekleştirir. Kortizol hem mineralokortikoid reseptörlere hem de glukokortikoid reseptörlere duyarlılık gösterir. Aldosteron düzeyindeki küçük değişiklikler böbrekte sodyum ve potasyum değişimini etkilerken, kortizol dolaşımda daha yüksek konsantrasyonda bulunmasına rağmen sodyum ve potasyum düzeyini değiştirmez (Greenspan ve ark, 2004). Aldosteron hedef dokularda 11BHSD enzimi, mineralokortikoid reseptörlere kortizolün ulaşmasını bloklar ve aldosteronun spesifik bağlanmasına izin verir (P. M. Stewart ve ark, 1999; White ve ark, 1997).

İnsanda kortizon (E), esas olarak 11BHSD tip 2 enzimi ile kortizolün 11 hidroksil grubunun oksidasyonu sonucu 11 ketona dönüşmesiyle oluşur (Beitins ve ark, 1973). 11BHSD tip 2 mineralokortikoid hedef dokularda, temel olarak böbrek, kolon, ve paratiroid bezde lokalizedir (Roland ve ark, 1996; Paul M. Stewart ve ark, 1995). Kortizolün kortizona major dönüşüm yeri böbrektir (Whitworth ve ark, 1989). Kortizol ve kortikosteron aldosterona eşit affinite ile mineralokortikoid reseptörüne bağlanır (Krozowski ve ark, 1983). 11 BHSD tip 2, kortizol ve kortikosteronu, kortizon ve dihidrokortikosterona dönüştürür, bunlar mineralokortikoid reseptöre daha az affinite gösterir. Tersi şekilde kortizonun kortizole dönüşümü 11BHSD tip 1 aktivitesiyle temel olarak karaciğerde gerçekleşir (Walker ve ark, 1992). Bu enzim glukortikoid reseptörleri ile regüle edilir (Whorwood ve ark, 1992). 11 BHSD enzimi ayrıca deri, merkezi sinir sistemi, yağ doku, ve plasentada da bulunur. Deride aktivitesi bulunduğu için, bu enzim sayesinde kortizonlu kremler etki oluşturur. Yağ dokudaki aktivitesi nedeniyle hiperkortizolizm olmadan metabolik sendromdaki abdominal obeziteye neden olur (Greenspan ve ark, 2004). Yetişkinde plazma kortizolü kortizonun 10 katıdır, ancak fetüste pek çok dokuda 11 BHSD tip 2 enzimi

bulunur (Paul M. Stewart ve ark, 1995) ve kortizon konsantrasyonu kortizolün 3 katından fazladır (ayrıca plesentada da 11 BHSD tip 2 boldur (Beitins ve ark, 1973; Krozowski ve ark, 1983; Nahoul ve ark, 1988; Roland ve ark, 1996; Paul M. Stewart ve ark, 1995; Walker ve ark, 1992; Whitworth ve ark, 1989; Whorwood ve ark, 1992). 11BHSD tip 2 enziminin, fetüsü yüksek konsatrasyondaki kortizol etkilerinden koruduğu ve adrenal gelişime yardımcı olduğu düşünülmektedir (Paul M. Stewart ve ark, 1995). Kortizon fetal dokularda kortizolden daha yaygın olmasına rağmen kortizon seviyesi doğumdan hemen sonra hızla düşer (Murphy, 1981). 11 BHSD tip 2 gen mutasyonuna sahip hastalarda ciddi, bazen ölümcül (Mllford ve ark, 1995; Shackleton ve ark, 1985) hipertansif sendrom olan mineralokortikoid sendrom (Ulick ve ark, 1979) ve düşük doğum ağırlığı (Kitanaka ve ark, 1996) bildirilmiştir. Glisirizik asit ve onun deriveleri ile karbenoksolon 11BHSD enzimini inhibe eder (Greenspan ve ark, 2004). Enzimin inhibe olmasıyla mineralokortikoid reseptörler kortizol ile aşırı aktive olur ve su-tuz retansiyonu ortaya çıkar (White ve ark, 1997). Dolayısıyla kortizol kortizon şantının fetal gelişim ve arteriyal hipertansiyon gelişiminde rolü bulunmaktadır (Morineau ve ark, 1997). Böbrek, kortizolü kortizona inaktive ederken, karaciğer de kortizonu kortizole aktive eder. Böylece kortizol kortizon şantı tamamlanmış olur (Greenspan ve ark, 2004). Şekil 2.13'te 11βHSD aktivitesi gösterilmektedir.



Şekil 2.13. 11βHSD aktivitesi (Makin ve ark, 2010).

Kortizol/kortizon oranı 11 BHSD enzim aktivitesini (Best ve ark, 1997; Mantero ve ark, 1996) ve adrenal fonksiyonu değerlendirmede önemlidir (Lee ve ark, 2014). Kortizol/kortizon oranı ektopik ACTH sendromlu hastalarda da artar. Bunun iki mekanizması vardır. Birincisi çok yüksek olan kortizol sekresyonu 11BHSD enziminin metabolik kapasitesini aşması, diğeri ise dolaşımda yüksek konsantrasyondaki ACTH düzeyinin 11BHSD tip 2'yi inhibe etmesinden kaynaklanır (Walker ve ark, 1992). Cushing sendromunda tipik olarak görülen idrar kortizol/kortizon oranının artması 11 BHSD enziminin doygunluğunu gösteren bir diğer durumdur (Cooper ve ark, 2009; Fong ve ark, 2010; Stiefel ve ark, 2002).

2.9. Kortizolün etki Mekanizması ve Etkileri

2.9.1. Steroid hormon reseptörleri

Steroid hormon reseptörleri nükleer transkripsiyonel faktör ailesindendir. Reseptörde hormonun bağlandığı bölge karboksi terminal kısımdır ve ligand bağlayıcı domain olarak adlandırılır. DNA bağlayıcı kısımda çinko parmaklar bulunur. Ligandına bağlanmamış steroid hormon reseptörü sitozolde bulunur. Hormon, hücre memranından geçerek sitozoldeki reseptörüne bağlanır. Reseptörde konfigürasyon değişikliği gerçekleşir ve nükleusa geçer. Nukleusta DNA'yı bağlar. DNA reseptöre 'spesifik hormon cevap elamanları' bölgesinden bağlanır ve hormonun etkileri ortaya çıkar (Dittmann ve ark, 1990; Kandemir ve ark, 1997; Nimkarn ve ark, 2011; Speiser ve ark, 1992). Kortizol, etkilerini hücre içi reseptörlerine bağlanıp, gen ekspresyonunu değiştirerek gösterir. Hücresel olayları etkilerken cAMP ve Ca^{+2} aracılı sinyalleri kullanır (Bornstein ve ark, 1999). Steroidlerin etkileri ve yapıları hedef dokularda bulunan enzimlerle değişebilir. Örneğin, kortizolün etkileri hedef dokuda 11BHSD enzim aktivitesinin bulunup bulunmamasına göre değişiklik gösterir (Çamurdan, 2013). Çünkü glukokortikoid reseptörler, glukokortikoid bağlamak için özgünlüğe sahip olmasına rağmen aynı durum mineralokortikoid reseptörler için geçerli değildir. Mineralokortikoid reseptörlere kortizol ve kortikosteron gibi glukokortikoidler, aldosterona benzer affinite ile bağlanırlar. Dolayısıyla mineralokortikoid reseptörlerin özgülllüğü kortizol kortizon şantı ile yani 11BHSD enziminin düzgün çalışmasıyla sağlanır (Greenspan ve ark, 2004).

2.9.2. Kortizolün Etkileri

Kortizol, enerji metabolizması, sıvı elektrolit dengesi ve kan basıncının devamlılığı, immünmodülasyon, stres yanıtı, hücresel çoğalma ve farklılaşma gibi birçok yaşamsal olayın düzenlenmesinde görev alır.

Glukoneogenezisi, protein ve lipit katabolizmasını arttırır. Yağ dokusundan yağ asitlerini serbestleştirir. Karaciğer dışında protein yıkımını arttırır. Karaciğere aminoasit girişini sağlayarak glukoneogenezisi ve protein sentezini attırır. Lipolitik etkiler göstermesine rağmen yağ depolanmasının artması glukokortikoidlerin çelişkili etkilerindendir. Bu durum artan insülinin lipojenik etkisinden kaynaklanır (Mert, 2009). Cushing sendromuna özgü yüzde, servikal bölgede, gövde ve karında yağ depolanması görülür.

Fosfoenolpirüvatkarboksikinaz ve glukoz 6 fosfataz gibi glukojenik enzimleri uyararak glukoneogenezi arttırır. Karaciğerde glikojen sentezini attırır. Bunu glikojen sentaz aktivitesini arttırarak gerçekleştirir (Greenspan ve ark, 2004). GLUT 4 reseptörleri vasıtasıyla glukoz uptake'ni azaltır. Böylece insüline zıt etkiler oluşturur (Mert, 2009). Kan şekerini yükseltici etki oluşturur.

Kas dokusu üzerinde katabolik etkileri bulunmaktadır. Buradan elde edilen aminoasitler karaciğerde glukoneogenezde kullanılır. Glukokortikoid eksikliğinde hipoglisemi, fazlalığında ise hiperglisemi, hiperinsülinemi, kas kaybı ve vücudun belli bölgelerinde yağ birikimi görülür (Greenspan ve ark, 2004).

Antiallerjik ve antiinflamatuar etkileri vardır. İnflamasyonda önemli olan araşidonik asit salımını engeller. Bu etkisini lipokortin aracılığıyla gerçekleştirir. Lizozomal membranları stabilize eder ve proteolitik enzimlerin salınmasını önler. Proinflamatuar sitokinler olan TNF-α ve IL-1 sentezini inhibe eder, mast hücre proliferasyonunu ve infeksiyon bölgesine toplanmasını engeller (Mert, 2009).

Eritrosit düzeyine ve hemoglobin konsantrasyonuna etkileri önemsizken, lökositlerin fonksiyonu ve hareketi üzerine önemli etkileri bulunmaktadır. Kemik iliğinden nötrofil salımını arttırıp, damar dışına çıkışı azaltır. Dolaşan nötrofillerin ömrünü uzatır. Böylece intravasküler lökosit sayısını attırır .

Katekolaminler gibi vazokonstruktif maddelerin etkisini arttırarak periferik damar tonus artışına neden olur (Greenspan ve ark, 2004). Anjiotensin II'ye cevabı düzenler. Normal kardiyak fonksiyonların devamı için kortizol gereklidir.

Osteoblastları baskılayarak yeni kemik oluşumunu azaltır, osteoklast sayı ve aktivitesini arttırır (Mert, 2009). Sonuçta kemik rezorpsiyonu artar ve osteoliz görülür.

Fibroblastları baskılayıcı etkisi vardır. Kollajen ve konnektif doku kaybı gelişir. Bunun sonucunda da deri incelmesi, kolay hasarlanma ve yara iyileşmesinde gecikme görülür (Greenspan ve ark, 2004).

Gastrointestinal sistemden kalsiyum absorbsiyonunu ve renal kalsiyum reabsorbsiyonunu azaltır (Mert, 2009). İdrarda kalsiyum atılımı artar. Hiperkalsiüri kortizol artışının önemli bir belirtisidir (Greenspan ve ark, 2004).

Kortizol, glomerüler kan akımını ve glomerüler filtrasyon hızını arttırır (Mert, 2009). Böbrekteki diğer bir etkisi de fosfat sekresyonunu arttırmaktır, serum fosfat düzeyinin düşmesini tübüler fosfat emilimini azaltmak yoluyla sağlar (Greenspan ve ark, 2004). Aldosteron benzeri etkilerle su ve tuz retansiyonu oluşturur (Mert, 2009).

Kortizol tiroid foksiyonlarını da etkiler. TSH sentez ve salmını engeller. TSH'ın TRH'a yanıtı bozulur. Serbest T4(tiroksin) düzeyi normal olmasına rağmen tiroksin bağlayıcı globülin miktarının düşmesine bağlı olarak total T4 düzeyi düşüktür. T4'ten T3'e(triiyodotironin) dönüşümü bozduğundan dolayı total ve serbest T3 düzeyi düşebilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.10. Kortizol ile ilişkili hastalıklar

2.10.1. Adrenokortikal yetmezlik hastalıkları

Adrenokortikal yetmezlikler, korteksin yıkımı ya da fonksiyonun bozulması sonucu gelişen primer yetmezlik ve hipofizden yetersiz ACTH salgılanması sonucu gelişen sekonder yetmezlik olarak sınıflandırılabilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.10.1.1. Primer adrenokortikal yetmezlik (Addison hastalığı)

Primer adrenokortikal yetmezlik, ilk kez Thomas Addison tarafından tanımlanmıştır. Geçmişte en sık görülme nedeni tüberküloz iken günüzmüzde otoimmün ya da idiopatiktir (Nimkarn ve ark, 2011; Therrell, 2001). Otoimmün, adrenal hemoraji, infeksiyonlar, adrenolökodistrofi, metastatik adrenal hastalıklar, ailesel kortizol eksikliği ve konjenital adrenal hipoplazi, kortizol direnci, ilaç kaynaklı ve sepsis gibi ciddi durumlar sonucu gelişebilir (Greenspan ve ark, 2004).

Her iki adrenal kortekste %90'dan fazla kayıp olması sonucunda yetmezlik bulguları ortaya çıkar. Yavaş gelişen yıkım sonucunda kronik adrenal yetmezlik görülürken, pek çok olguda olduğu gibi hızlı gelişen yıkım, krizle ya da krize yakın bir durumla beraberdir. Kortizol salgısının azalması nedeniyle ACTH üzerindeki inhibisyon ortadan kalkar ve plazma ACTH düzeyi yükselir. Bu durum adrenakortikal rezervin en erken ve duyarlı bir belirtecidir (Greenspan ve ark, 2004). Hiperpigmentasyon, halsizlik, yorgunluk, kilo kaybı, anoreksi ve gastrointestinal bozukluklar belirtiler görülebilir. Deri ve mukozal membranlarda görülen yaygın hiperpigmentasyon hastalığın ilk belirtilerindendir. Cerrahi, travma, infeksiyon gibi streslere maruz kalan Addison hastalarında akut kriz gelişebilir.

2.10.1.2. Sekonder adrenokortikal yetmezlik

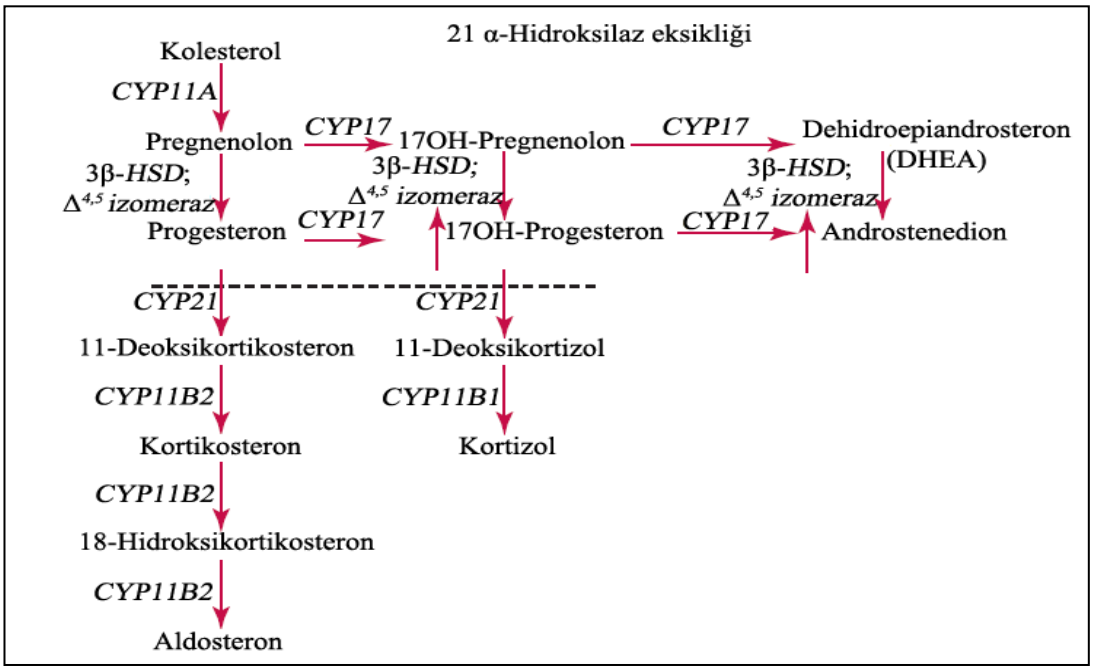
Sekonder adrenokortikal yetmezliğin en sık nedeni eksojen glukokortikoid kullanımıdır. Hipofiz yada hipotalamusta görülen ACTH salgılanmasını azaltan tümörlerde bir diğer nedendir. ACTH düzeyi ve buna bağlı olarak kortizol ve androjen salgılanması da azalmıştır. Aldosteron salgısı genelde normaldir. ACTH düzeyindeki düşüklük nedeniyle zona retikülaris ve fasikülatada atrofi görülür. Bunun sonucunda bazal kortizol salgısı düşer. Hipofiz–adrenal aks ve stres yanıtı bozulur. Özgün belirtiler göstermeyebilir. Stres döneminde kullanılan glukokortikoid dozu arttırılmazsa akut kriz gelişebilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.10.1.3. Konjenital adrenal hiperplazi

Adrenal kortekste kolesterolden kortizol sentezine kadar olan basamaklardaki enzimlerden birisinin genetik defekti sonucunda ortaya çıkan bir durumdur.

Otozomal dominant geçiş gösterir (Miller, 2009; Therrell, 2001). Kortizol ve aldosteron sentez defekti genellikle birlikte görülür ve klinik bulgular bu defektler sonucu ortaya çıkar. Kortizol eksikliği sonucunda ACTH salgılanması uyarılır. Yükselmiş plazma ACTH düzeyi adrenal bezde hiperplazi oluşturur. Yüksek ACTH etkisiyle artmış öncül steroid molüküller androjen yapımına kayar ve virilazasyon görülür. Deoksikortikosteron gibi aldosteron öncülleri de hipertansiyona neden olur (Çamurdan, 2013).

Tüm olguların yaklaşık %90'nını oluşturan ve en sık görülen adrenal hiperplazi nedeni 21-Hidroksilaz eksikliğinden kaynaklanır. Daha az sıklıkla görülen formlar ise 11β-hidroksilaz, 3β-hidroksisteroid dehidrogenaz, 17 a-hidroksilaz, 17-20 liyaz, sitokrom P450 oksidoredüktaz eksikliğidir (Şekil 2.14) (Miller, 2009).



Şekil 2.14. 11β-hidroksilaz eksikliğindeki kortizol üretim defekti (Burtis ve ark, 2012).

2.10.2. Cushing sendromu

Endojen ya da ekzojen glukokortikoidlere uzun süre ve fazla miktarda maruz kalınması sonucu ortaya çıkar. Hipofiz adenomundan kaynaklanan hiperkortizolizm Cushing hastalığı olarak adlandırılır. Eğer hiperkortizolizm adrenal tümörden köken alıyorsa, Cushing sendromu, endokrin organ dışındaki dokuların malign tümörlerinden aşırı ACTH salgılanmasından dolayı gelişiyorsa da buna ektopik ACTH sendromu denir. Cushing sendromu en sık eksojen glukokortikoidlerin

fizyolojik dozların üstünde kullanmasından kaynaklanır. Endojen Cushing sendromunun en önemli nedeni ise hipofizden fazla miktarda ACTH salgılanmasına bağlı olarak gelişen Cushing hastalığıdır (Therrell, 2001).

Cushing sendromu ACTH'a bağımlı ya da ACTH bağımsız olmak üzere ikiye ayrılır. ACTH bağımlı olan tipleri ektopik ACTH sendromu ve Cushing hastalığıdır. Bu tipte zona fasikülata ve retikülaris hiperplazisi görülür. Kortizol, adrostenedion ve deoksikortikosteron (DOC) salgısı artmıştır.

ACTH bağımsız Cushing sendromu, primer adrenal adenom ya da karsinom ya da nodüler adrenal hiperplazi nedenlidir. Bu tipte fazla miktardaki kortizol ACTH salgılanmasını inhibe eder (Elamin ve ark, 2008).

2.10.2.1. Cushing hastalığı

Cushing sendromunun en yaygın tipini oluşturur. Cushing sendromu olgularının %70'ini oluşturur ve kadınlarda daha sıktır (Findling ve ark, 2006). ACTH düzeyinin kortizol ile feedback inhibisyonu ortadan kalkmıştır. ACTH salgılanmaya devam eder. Bu da kronik kortizol artışına neden olur. Sirkadiyen ritim bozulmuştur (Greenspan ve ark, 2004).

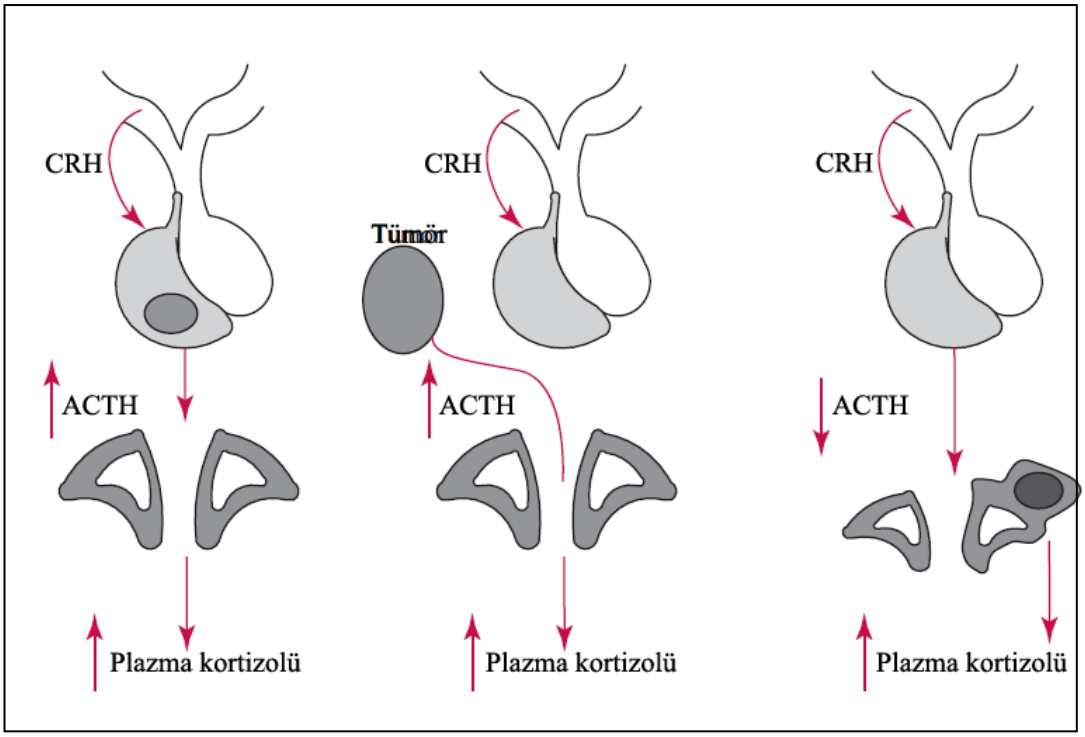
2.10.2.2. Ektopik ACTH sendromu

Bildirilen Cushing sendromu olgularının %15-20'sini oluşturur ve erkeklerde daha sıktır. Hipofiz dışındaki tümörlerden ACTH salgılanması sonucu hiperkortizolizm gelişir. Hiperkortizolizm görülmesine rağmen klinik belirtiler genellikle yoktur. Sıklıkla toraks kaynaklı tümöre sahip hastalarda görülür. Bronşiyal karsinoid ve küçük hücreli akciğer tümörü %50'sini oluşturur. Prognoz birincil tümöre bağlıdır ve kötü seyreder (Findling ve ark, 2005). ACTH salgılanması kortizol ile feedback kontrolden bağımsızdır.

2.10.2.3. Primer adrenal tümörler

Olguların %10'nunda görülür ve çoğu iyi huylu adrenokortikal adenomdur. Kadınlarda daha sıktır. Primer adrenal tümörler ve adenomlar, otonom kortizol salgılanmasına neden olur. Plazma ACTH düzeyi baskılanmıştır ve bunun sonucunda

adrenal kortekste atrofi görülür. Adenomlar genellikle yalnızca kortizol salgılanmasına neden olurlar. Karsinomlar ise hem adrenokortikal hormonları hem de onların öncüllerini salgılar. Bu nedenle karsinomlarda kortizol, androjen ve 11 deoksikortizol seviyesi çoğunlukla yüksektir (Greenspan ve ark, 2004). Şekil 2.15'te Cushing sendromuna neden olan durumlar şematize edilmiştir.



Şekil 2.15. Cushing sendromuna neden olan durumlar (Burtis ve ark, 2012).

2.10.2.4. Klinik belirtiler

Obezite: en yaygın görülen belirtidir. Buffalo sırtı görüntüsünün oluşmasına neden olan boyun ve dorsoservikal bölgede yağ birikimi görülür. Yüzdeki yağ birikimi de aydede yüzünün oluşmasına neden olur.

Deri değişiklikleri: Deride incelme ve konnektif doku atrofisi görülür. Stria, travmalarda kolay hasarlanma ve küçük yaraların zor iyileşmesi görülür.

Hirsutizm: Adrenal androjenlerin aşırı sekresyonundan kaynaklanır ve Cushing sendromlu kadınların %80'inde görülür.

Hipertansiyon: Cushing sendromunun tipik özelliklerinden birisidir ve vakaların hemen hemen %75'inde görülür.

Gonadal bozukluklar, santral sinir sistemi bozuklukları ve psikolojik bozukluklar, kas güçsüzlüğü, osteoporoz, kalsiüriye sekonder gelişen böbrek taşı, susama, poliüri ve büyümenin yavaşlaması diğer klinik belirtileridir.

2.11. Adrenal yetmezlik tanı testleri

Adrenal yetmezlik şüphesi olan hastalarda durumun netleşmesi ve replasman tedavisine başlanması açısından değerlendirme önemlidir. Sabah erken saatlerde alınan (08:00, 09:00) kortizol düzeyi stres dışı endojen kortizol rezervini yansıtır. Bazal kortizol düzeyinin <3 µg/dL olması adrenal yetmezliği işaret ederken, >18µg/dL olması aksın normal olduğunu gösterir ("TEMD Adrenal Korteks,"). Adrenokortikal streoidlerin bazal düzeyleri normal olabileceği için rezerv değerlendirmesinde çeşitli dinamik testlerin uygulanmasına ihtiyaç duyulabilir (Greenspan ve ark, 2004).

2.11.1. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın değerlendirilmesinde kullanılan dinamik testler

HHA aks değerlendirilmesinde çeşitli testler kullanılmaktadır. Bunlar ACTH (1-250 mg) stimülasyon testi, insulin hipoglisemi testi, metirapon testi, glukagon testi ve CRH testidir ("TEMD Adrenal Korteks,").

2.11.1.1. İnsülin hipoglisemi (insülin tolerans testi)

HHA aksın değerlendirilmesinde altın standart bir testtir. Yan etkileri fazladır ancak HHA aksı tamamen değerlendirme imkanı sağlayan önemli bir testtir. Testin prensibi oluşturulan hipoglisemiye alınan kortizol yanıtı esasına dayanır. Hipoglisemi CRH, ACTH ve kortizol salınmasına neden olur. Ayrıca GH aksını da değerlendirme olanağı sunar. Aksın uyarılmasından sonra 20 µg/dL'lik kortizol yanıtı normal olarak kabul edilir (Karaca ve ark, 2010).

2.11.1.2. ACTH stimülasyon testleri

2.11.1.2.i. Kısa (Hızlı) ACTH uyari testi

ACTH stimülasyon testi kosintropin test olarak da bilinir. Adrenal korteksin kortizol sentezleme kapasitesini değerlendirmede kullanılır (Burtis ve ark, 2012). Bu test adrenal rezervin saptanması açısından önemlidir. Primer ve sekonder adrenal yetmezliğin değerlendirilmesinde yaygın kullanılan bir testtir (Greenspan ve ark, 2004). Kosintropin ACTH'ın N terminal bölgesinin 24 aminoasitlik kısmını içeren bir polipeptittir ve biyolojik olarak aktif domain içerir. Diğer adı tetrakosakrin (Synacten)'dir. Kosintropin kortizol salgılanmasının güçlü bir uyaranıdır, yarı ömrü kısa, antijenik özelliği azdır. Uzmanların görüşü, düşük doz kosintropin (1-250 mg) ile 1 saatlik stimülasyon testinin, primer adrenal yetmezlikten ya da ACTH eksikliğinden kaynaklanan adrenal yetmezliği tespit etmede daha duyarlı olabileceği yönündedir (Kazlauskaite ve ark, 2008). Bazı hastalarda 1mg ACTH yanıtı yetersizken, 250 mg ACTH'a normal yanıt alınabilir (Burtis ve ark, 2012). 250 mg ACTH farmakolojik dozda bir uyarı oluştururken, 1 mg'lık ACTH fizyolojik dozda bir uyarı oluşturur. Her iki dozda uygulanmaktadır ("TEMD Adrenal Korteks,"). Açlık şartı bu test için gerekli olmamakla birlikte genel uygulama sabah, aç 1 mg ya da 250 mg lik ACTH'ın intravenöz verilmesi şeklindedir. Uygulama öncesinde ve uygulama sonrasında 30, 60 ve 90. dakikalarda kan alınır. Stimülasyon testi sonrası herhangi bir andaki kortizol düzeyinin 18-20 µg/dL'nin üstünde olması normal yanıt olarak kabul edilir. Düşük doz (1 mg) ACTH stimülasyon testi erken dönem sekonder adrenal yetmezlik tespitinde önemlidir (Dökmetaş ve ark, 2000).

2.11.1.2.ii. Uzun ACTH uyarı testi

Bu test bazı sekonder adrenal yetmezlik tanısında kullanılır. Uzamış uyarı sayesinde atrofik olan adrenallerin kısmen uyarılması sağlanabilir. Depo tetrakosakrin 1 mg olarak intramüsküler olarak uygulanır. 4, 8, 12 ve 24. saatlerde kan alınır. Primer adrenal yetmezlikte herhangi bir cevap alınmazken, sekonder adrenal yetmezlikte giderek artan şekilde cevap oluşur (Elbüken, 2011).

2.11.1.3. Plazma ACTH düzeyi

Adrenal yetmezlik mevcutsa plazma ACTH düzeyi primer ve sekonder yetmezliğin ayrımında önemlidir. Primer adrenal yetmezlik bulunması durumunda plazma ACTH düzeyi referans aralığının üstündedir ve genellikle 200 µg/L'nin üstündedir. Sekonder adrenal yetmezlik durumunda ise plazma ACTH düzeyi normaldir ya da 10 µg/dL'nin altındadır. ACTH düzeyi değerlendirilirken salgılanma kinetiği ve kısa plazma yarı ömrü dikkate alınmalıdır (Arlt ve ark, 2003).

2.11.1.4. Glukagon testi

İntramusküler ve subkutan glukagon uygulanması kortizol ve growth hormon salımını arttırır (Orme ve ark, 1998). Bir gecelik açlık sonrası 1 mg glukagon intramusküler olarak uygulanır ve test öncesinde ve uygulamanın 90, 120, 180, 210 ve 240. dakikalarında kortizol ölçümü için kan alınır. Testin uzun olması ve nispeten aksı daha az uyarması yöntemin dezavantajlarıdır (Karaca ve ark, 2011). İnsülin tolerans testinin kontrendike olduğu durumlarda kullanilabilecek alternatif bir testtir (Staub ve ark, 1979). Test sonucunda elde edilen kortizol değerlerinin >16-18 µg/dL olması sonucun normal olduğunu gösterir ("TEMD Adrenal Korteks,").

2.11.1.5. Metirapon testi

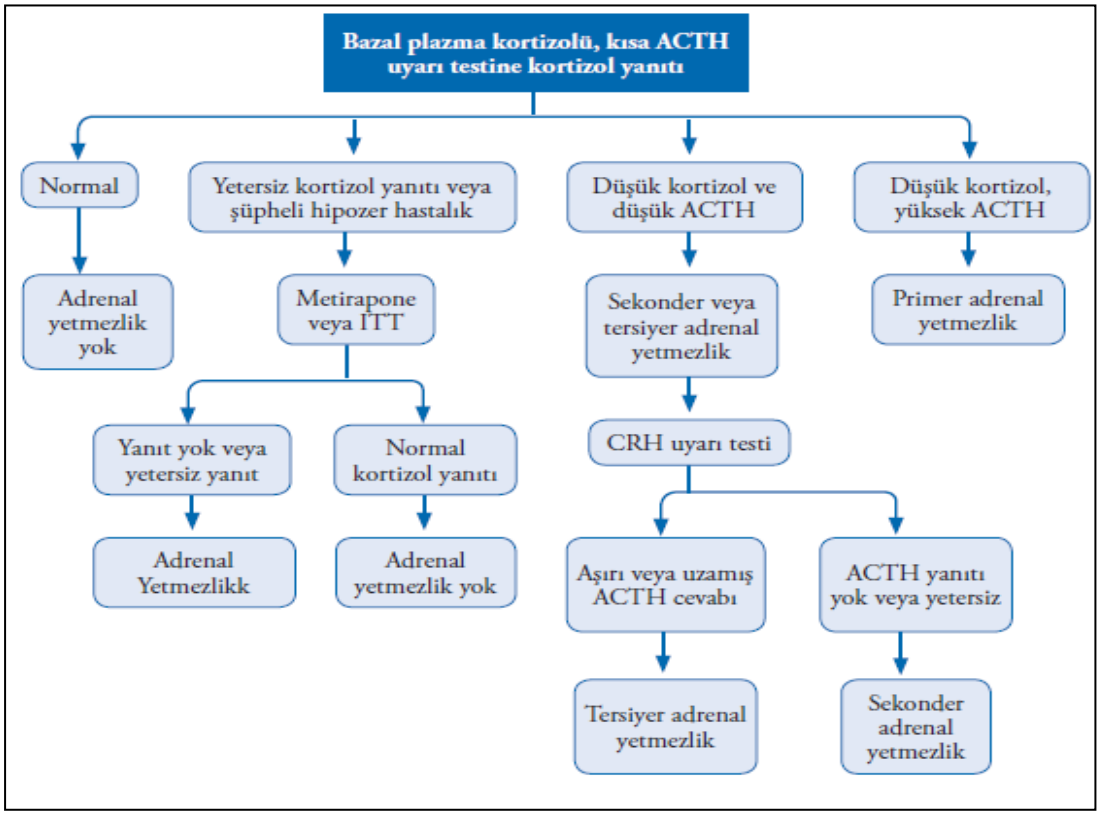
Metirapon, 11 deoksikortizolü kortizole dönüştüren 11β hidroksilaz enzimini inhibe eder ve hipofizden ACTH salımına neden olur. ACTH steroid öncüllerini uyarır ve 11 deoksikortizol düzeyini arttırır. 11 deoksikortizolün ACTH düzeyini baskılayıcı bir etkisi bulunmadığından dolayı ACTH düzeyi baskılanmaz (Courtney ve ark, 2000). Hem hipofiz hem de adrenal rezervi birlikte değerlendirmeye olanak sağlayan bir test olduğu için primer ve sekonder adrenal yetmezlik tanısında kullanılır. Metirapon testi, ACTH stimülasyon testinde normale yakın cevap alınmış, sekonder adrenal yetmezlik şüphesi bulunan hastalarda tercih edilir. Metirapon temin güçlüğü testin yaygınlığını engeller. Gece tek doz (30 mg/kg) metirapon verildikten sonra sabah kortizol ve 11 deoksikortizol düzeyini ölçülür. Kortizolün <10 µg/dL, ve 11 deoksikortizol düzeyinin de >7 µg/dL olması yeterli inhibisyonun gerçekleştiğini gösterir ("TEMD Adrenal Korteks,").

2.11.1.6. CRH stimülasyon testi

CRH stimülasyonu hipofiz bezi foksiyonunun doğrudan seçici bir testidir. Ovine CRH injeksiyonu 60 ile 180 dakika içinde normal bireylerde ACTH salgılanmasını uyarır. Glukokortikoidler bu etkiyi yok eder (ektopik ACTH salımı nedeniyle ya da adrenal adenom sonucu görülen Cushing sendromu gibi). Ancak Cushing hastalığı, kortikotropinoma eksojen CRH'a normal ya da abartılı yanıt oluşturabilir (Tietz, 2006). Özellikle sekonder ve tersiyer adrenal yetmezlik tanısında önemlidir. Sabah bazal düzey için kan alınır ve ardından 1 ug/kg CRH intravenöz olarak uygulanır. ACTH ve kortizol için kan alınır. Kortizol düzeyinin 20 µg/dL, ACTH düzeyinin de 2-4 kat artması normal cevap olarak kabul edilir (Salata ve ark, 1988).

Ayrıca, arjinin vasopressin testi ve sosyal stress testi de uygulanan diğer dinamik testlerdendir (Mert, 2009).

Adrenal yetmezlik düşünülen hastalarda tanısal yaklaşım Şekil 2.16'da gösterilmiştir.



Şekil 2.16. Adrenal yetmezlik düşünülen hastalarda tanısal yaklaşım (UptoDate "Diagnosis of adrenalin sufficiency"den uyarlanmıştır).

2.11.2. Deksametazon supresyon testi

Deksametazonun hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı baskılama esasına dayanır. Serum kortizol ve idrar serbest kortizol düzeyleri ölçülür. Gece verilien 1 mg'lık deksametazon sonrası sabah serum kortizol düzeyi ölçülür. Kortizolün 1.8 µg/dL'nin altında olması beklenir. Obez bireylerde özgüllüğü düşük olup tek başına Cushing sendromu tanısı için yeterli değildir (Aycan ve ark, 2009; Lin-Su ve ark, 2005). Gecelik 1 mg deksametazon supresyon testi fenitoin, fenobarbital ve rifampin gibi deksametazonun metabolizmasını hızlandıran ilaçlara bağlı olarak yalancı negatif, renal yetmezlik, alkolizm ve depresyon durumunda ise yalancı pozitif olabilir (Findling ve ark, 2004).

2.11.2.1. Düşük doz deksametazon baskılama testi

0.5 mg deksametazon verildikten sona 2 ile 6 saatte kortizol düzeyi ölçülür. Kortizolün <1.8 µg/dL olması beklenir. Deksometazonun endojen kortizolün yerini alarak aksı baskılaması esasına dayanır (Aycan ve ark, 2009; Lin-Su ve ark, 2005).

2.11.2.2. Yüksek doz deksametazon baskılama testi

Cushing hastalığı ile ektopik ACTH salgılanmasını ayırt etmek için kullanılır. Kortikotrop hücreler glukokortikoidler ile negatif feedback ile düzenlenir ancak bu etki ektopik ACTH için geçerli değildir, test temel olarak bu prensible çalışır. 6 saatte bir 2 mg deksametazon toplamda 8 doz olacak şekilde verilir. İdrar toplanır ve serum kortizolü için kan alınır. İdrar serbest kortizol atılımı işlem öncesine göre %50'den fazla baskılanmışsa Cushing hastalığı (pozitif) olduğu düşünülür. %90'dan fazla baskılanma ektopik ACTH olma olasılığını ekarte ettirir (Aycan ve ark, 2009; Merke ve ark, 2000).

2.12. Kortizol ölçümü

İsim: Kortizol, hidrokortizon, Compound F, glukokortikoid
Formül: $C_{21}H_{30}O_5$
Molekül ağırlığı: 362.47 g/mol

2.12.1. Kortizol ölçümünde kullanılan yöntemler ve prensipleri

Biyolojik sıvılardaki kortizolün belirlenmesi için çeşitli metotlar kullanılmıştır (Tablo 2.2).

Tablo 2.2. Kortizol ölçüm metotları.

Metot	Analiz Türü	Prensip	Kullanım	Yorumlar
1. Fluoremetri	Kimyasal derivatizasyon	Ekstraksiyon sonrası, etanolik sülfürik asit kortizolü fluorejenik kromojene çevirir	S, P	Önceki metot
2. Yarışmalı protein bağlanması	Radyoassay	Ekstraksiyon sonrası numune kortizol bağlayıcı protein için iyot 125 ile işaretlenir	S	Önceki metot
3. Immunoassay				
(i) Radyoimmuno assay	Yarışmalı radyoassay	Yukarıdaki gibi, iyot yerine kortizole spesifik antikor bağlanır	S, U	Önceki metot
(Homma ve ark) Non-izotopik Immunoassay		Heterojen assay Enzim gibi non-izoto-pik işaretleyici Kullanılır	S, U	
(a) Heterojen		Bağlı ve serbest formu Birbirinden ayıran İşaretleyici gerekir		Yaygın kullanılan metot, ekstraksiyon gerekmez
(b) Homojen		Ayırma gerekli değildir		Yaygın kullanılan metot, ekstraksiyon gerekmez
4. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)	Kromatografik ayrım	Kortizol, diğer bileşikler-den kromatografik olarak ayrılır, UV ya da floresan dedektörle miktarı belirlenir	S, P, U	Ekstraksiyon gerekir, rutin kullanım için uygun değildir, daha az interferans
5. Gaz kromatografisi	Yukarıdaki gibi	Kortizol, türevlendirilir ve kromatografik olarak ayrılır, flame iyonizasyon ile dedekte edilir	S, P, U	Yukarıdaki gibi
6. Gaz kromatografisi-		Yukarıdaki gibi, dedeksi-yon MS ile yapılır	S, P, U	Yukarıdaki

kütle spektrometresi

7. Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi	Yukarıdaki gibi	GC-MS gibi	S, P, U	Aday referans metot

Serum ve idrar kortizol ölçümü için immunoassay metotların uygunluğundan önce, adrenal fonksiyonun değerlendirilmesinde idrar 17 OH kortikosteroid ölçümü kolorimetrik ya da florometrik metotlarla yapılıyordu (Porter ve ark, 1950). Immunoassaylerin gelişmesiyle birlikte bu metotlar kullanılmamaya başladı. Florometrik metot Mattingley tarafından geliştirilmiştir. Bu yöntemde kortizol ekstrakte edilir ve etanolik sülfirik asitle florojenik bir kromojene dönüştürürlür. Plazma kortizol ölçümünde kullanılmış olan bu yöntem günümüzde kullanılmamaktadır (Mattingly, 1962). Bu metotlar yetersiz spesifiteye sahiptir ve ayrıca fazla numune hacmi ve yoğun iş gücü gerektirir. Çeşitli kompetitif protein bağlayıcı testler de ölçümde kullanılmıştır (Turner ve ark, 1973). Ancak daha spesifik testlerin geliştirilmesiyle birlikte çok uzun süre kullanılmamıştır. Klinik laboratuvarlarda kortizol ölçümünde immunoassayler temel ölçüm metodudur. Kortizol ölçümü için izotopik ve nonizotopik immunoassyaler tanımlanmıştır (Price ve ark, 1997). Bu immunoassayler kompetitiftir. Numune içindeki kortizol, işaretlenmiş kortizol ile sınırlı miktardaki anti kortizol antikorları için yarışır. Klinik laboratuvarlarda kullanılan neredeyse tüm immunoassaylerde ekstraksiyon basamağına ihtiyaç yoktur (Tietz, 2006). Başlangıçta bu testlerde; radyoaktif işaretler, sonrasında enzim, lüminesans, kemilüminesans ve floresan işaretler kullanıldı. İdrar ve plazma kortizol seviyesini belirlemek için uygun birçok ticari kit bulunmaktadır. Immunoassaylerin çoğu günümüzde otomatize ya da yarı otomatize analiz platformundadır. Immunoassayler, homojen ya da heterojen olabilir. Heterojen testler, bağlı olmayan fraksiyondan bağlıyı ayırmak için seperasyon basamağı gerektirir. Immunoassaylerin spesifitesi, büyük oranda antikorun özelliklerine bağlıdır. Kortizol düzeyinin belirlenmesinde kromojenik metotlar, immunoassaylere alternatiftir. İnterferansın daha az olması önemli avantajlarıdır fakat bu metotlar çok zaman gerektirir ve rutin analizler için uygun değildir. Klinik laboratuvarlarda sık kullanılan metotlardan birisi yüskek performanslı sıvı kromatografidir (HPLC) (Hariharan ve ark, 1992). Tüm HPLC metotları numuneden kortizol ekstraksiyonunu gerektirir. Bu işlem için sıvı-sıvı ekstraksiyon ya da solid faz ekstraksiyon kolonu kullanılır. Hem normal faz hemde revers (ters çevrilmiş) faz kolonları kromotografik

ölçümlerde kullanılır ve kolondan akan maddeler UV (254 nm) ya da floresan spektroskop ile görüntülenir (Hariharan ve ark, 1992). Diğer kromatografik metotlar gaz kromatografisi (Wotiz ve ark, 1973) ve gaz kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS) (Hsu ve ark, 1994) ya da sıvı kromatografisini kütle spektrometresi (LC-MS) (Shibasaki ve ark, 1997) içerir. Kapiller elektroforez de kullanılan metotlardandır (Schmalzing ve ark, 1995). Gaz kromatografisinde kortizol seviyesi, ekstraksiyon, derivatizasyon basamaklarından sonra flame iyonizasyon ile belirlenir. GC-MS'de kantitasyon kütle spektrometresiyle yapılır. LC-MS dedeksiyonun MS ile yapılması haricinde HPLC'ye benzer bir metottur (Hsu ve ark, 1994).

2.12.2. Referans ve tercih edilen metotlar

Plazma kortizol ölçümü için kusursuz ölçüm metodu izotop dilüsyon kütle spektrometre kullanan gaz kromatografisidir (ID-MS) (Siekmann ve ark, 1982). Bu metotta işaretli kortizol internal standart olarak plazmaya eklenir ve plazma diklorometan ile ekstrakte edilir. Saflaştırmada Sephadex® LH 20 kullanılır, takiben derivatizasyon ve gaz kromatografi ile dedeksiyon yapılır. Plazma kortizol ölçümünde kullanılan referans metot LC-MS'dir (Tai ve ark, 2004). Bu metotta numuneye internal standart eklenir, takiben etil asetat ile ektraksiyon yapılır. LC-MS'de elektrosprey iyonizasyon kullanılır ve seçilmiş görüntüleme ile kortizol iyonları ile izotop işaretli kortizoller kullanılarak kantitasyon yapılır. Kortizol ekstraksiyonun diklorometan ile yapıldığı benzer bir metot da bulunmaktadır (Jung ve ark, 2004). Gue ve arkadaşları numune hazırlığını daha kolay tariflemişlerdir. Bu metotta, internal standart ilave edildikten sonra asetonitril ile karıştırılır, santrifüj edilir ve süpernatant LC-MS'e enjekte edilir (Guo ve ark, 2006). Son çalışmalar işaretli internal standardın dikkatli kullanılmasını önermektedir. Kortizolün doğal izotopu olduğundan interferansa neden olabilir (Duxbury ve ark, 2008). Yüksek doğruluk ve kesinlikteki HPLC metodu, tercih edilen metottur fakat iş gücü ve uzmanlık gerektirir, ayrıca yavaştır. Ektraksiyonun olmadığı direkt immunoassayler laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan metotlardır ve birçoğu otomatizedir (Wild, 2005). Kortizolün %90'ından fazlası proteinlere bağlıdır. Bu direkt yöntemlerde analiz öncesinde, bağlı kısmın ayrılması gereklidir. Metotlar ayrım için 8 anilino-1-naftalin sülfonik asit (Kazlauskaite ve ark), danazol ve salisilat gibi ajanları kullanır. Isı uygulanması ya da pH düşürülmesi de bağlı kortizolün ayrılmasını sağlar. Danazol

gibi ajanlarla yapılan ayırma tekniği, kortikosteroid bağlayıcı globulin (KBG) konsantrasyonuna bağlıdır. Gebelik gibi KBG konsantrasyonun yüksek olduğu durumlarda kortizolün ayrılması tamamlanamayabilir. Ayrıca yüksek konsantrasyonlu serbestleştirici ajanlar, kortizolün antikora bağlanmasını etkileyebilir. İmmunoassaylerde poliklonal ve monoklonal antikorlar kullanılır. Antikor hazırlamak için yaygın kullanılan derivatlar, kortizol 21 hemisüksinat ve kortizol 3 karboksimetiloksim konjugatıdır. Ölçüm prensibi non-izotopik olan ölçümler; fotometri, florasan, kemilüminesans, elektrokemilüminesans ve time resolved florasandır. Tablo 2.3'te yaygın kullanılan otomatik immunoassaylerin bazılarının detayları verilmiştir.

Tablo 2.3. Yaygın kullanılan kortizol ölçüm yöntemleri.

Enstrüman	Prensip	End Point	Üretici
Roche Elecys /E170 modular	Paramanyetik boncuk	Elektro-kemilüminesans	Roche
ACS180and Centaur	Paramanyetik partiküller	Kemilüminesans	Siemens
IMMULITE 2000/2500	Kaplı boncuklar	Kemilüminesans	Siemens
Access/DXI	Paramanyetik partiküller	Alkalin fosfataz	Beckmann
Architect	Paramanyetik partiküller	Kemilüminesans	Abbott
TDX	Floresans polarizasyon	Floresans	Abbott
VITROS ECi	Kaplı boncuklar	Arttırılmış kemilüminesans	Ortho
TOSOH AIa	Manyetik mikroboncuklar	Kinetik floresans	Tosoh
DELFIA	Kaplı mikroplate	Time/resolved floresans	Wallac

Ölçüm heterojen ve homojen (seperasyon gerektirmeyen) olabilir. Roche ve Advia centaur heterojen testlerdir. Yaygın kullanılan sistemler Tablo 2.4'te verilmiştir.

Tablo 2.4. Yaygın kullanılan kortizol ölçüm sistemleri.

	ABD (%)	**İngiltere (%)**
Siemens Advia Centaur	29.3	27.4
Beckman Access/DXI	24.3	11.1
SIEMENSImmulite 2000/2500	11.9	16.7
RocheElcys/E170 modular	11.1	32.1
Abbott Architect	0.7	6.0
Abbott Axsym	4.2	2.0
Diğerleri	1.7	2.8

Siemens, Advia centaur kortizol testi kompetitif immunoassaylerdir. Numunedeki kortizol ve akridinyum esteri ile işaretlenmiş kortizol, poliklonal tavşan antikortizol antikoru için yarışır. Bağlı kortizol salınması için salisilat eklenir. Roche Elecys testi de kompetitif immunoassaydir. Numunedeki kortizol ve rutenyum kompleks ile işaretli kortizol, poliklonal koyun antikortizol antikoru için yarışırlar. Danazol muamelesiyle bağlı kortizol salınır. Abbott floresan polarizasyon testi homojen ölçüme bir örnektir. Yaygın otomatik immunoassaylerin çoğu yeterli performans gösterir. Göreceli olarak Abbott Axsym ve SIEMENSİmmulite 2000 metotları daha düşük performans gösterir. Kortizol immunoassayleri otomatize, kolay ve yaygın kullanılmalarına rağmen çeşitli problemler bildirilmiştir.

Bu problemler şöyledir.

1) Yaygın kullanılan immunoassaylerin ID-MS ya da gaz kromatografisiyle kıyaslandığında pozitif biası olduğu gösterilmiştir (De Brabandere ve ark, 1995). Murfy ve arkadaşları kromatografik pürfikasyon (arındırma) olmadan ölçüm yapan tüm metotların idrar kortizolünü fazla ölçtüğünü göstermiştir (Murphy, 1981).

2) İmmunoassay testler tümüyle serum protein seviyeleri normal olan hastalarda iyi çalışır. Ancak yoğun bakım ünitelerindeki düşük protein seviyeli hastalarda sonuçlar yanıltıcı olabilir. Son çalışmalar, Siemens Advia centaur kortizol testi albumin konsantrasyonunun 24 g/L'den daha düşük olduğu

durumlarda sürekli olarak düşük sonuçlar verdiğini göstermiştir (Barnes ve ark, 2007).

3) Bu testlerde kullanılan antikorlar, prednizol, 11 deoksikortizol ve 21 deoksikortizol gibi steroidlerle çeşitli derecelerde çapraz reaktivite gösterir. Prednizon ve prednizolon alan hastalarda, metirapon testi altındaki hastalarda ve 21 hidroksilaz eksikliği olan hastalarda bu durum problem yaratabilir. Ek olarak hipotalamik-hipofiz aks aktive edilmiş kritik hastalarda immunoassayler farklı sonuçlar verebilir. Bu hastalarda HHA aks stimülasyonu kortizol prekürsörlerini arttırır. Bu da çeşitli derecelerde çapraz reaktiviteye neden olabilir. Bu durum, ACTH ile kortizol salımı sağlanan kritik hastalarda (synacthen testi) 3 yaygın immunoassay ve HPLC metotları karşılaştırılarak gösterilmiştir (Cohen ve ark, 2006). Bu çalışmada Abbott TDX metodu ve immulite 2000 metodu HPLC'den sırasıyla %95 ve %97 daha yüksek sonuç vermiştir.

4) İdrar serbest kortizol düzeyini belirlemek için de çeşitli immunoassayler kullanılır. Bazıları diklorometan ile ekstraksiyondan sonra ölçüm yaparken, bazıları ekstraksiyona ihtiyaç duymaz. Ekstraksiyon yapmadan ölçüm yapan metotlar HPLC'den neredeyse 2 kat yüksek ölçmektedir (Ching ve ark, 2006; Horie ve ark, 2007).

Buna rağmen immunoassay teknikler kabul edilebilir spesifite, sensitivite ve kesinliklerinden ve ayrıca hızlı sonuç vermelerinden dolayı güncel metotlardır. Bu nedenle yaygın olarak kullanılırlar.

2.12.3. Numune

Kan kortizol ölçümü için serum ve heparinize plazma, uygun örneklerdir (Tietz, 2006). Numuneler oda ısısında ya da buzdolabında bir hafta, -20°C'de dondurularak 3 ay saklanabilir. (Burtis ve ark, 2012). Dondurma çözme işleminin kortizol seviyesini önemli şekilde değiştirmediği gözlenmiştir. İdrar serbest kortizol düzeyi immunoassay ya da HPLC metotları ile belirlenebilir. Bu yöntemler metilkloridin kullanıldığı bir ekstraksiyon basamağına gereksinim duyar ve kortizol konsantrasyonu bilinen ekstrakte edilmiş bir idrar ile ekstraksiyonun yeterliliği

izlenir. 24 saatlik idrar örnekleri tercih edilir. Toplama periyodu süresince toplanan numuneler buzdolabında saklanmalıdır. Genellikle, koruyucu olarak borik asit ya da asetik asit içeren toplama kaplarına numune toplama önerilmektedir. Eğer toplanan numuneler aynı gün içinde analiz edilmeyecekse -20 ºC'de dondurulmalıdır (Kaplan ve ark, 2010).

2.12.4. Kortizol referans aralıkları

Kortizol referans aralığı ölçüm yöntemine dayalı olarak değişmektedir (Kaplan ve ark, 2010). Kan kortizol düzeyi ACTH konsantrasyonu ile paralellik gösterir. Gün içinde minimum ve maksimum diurnal ritmi vardır ve epizodiktir. Akşam kortizol konsantrasyonu sabah kortizolünün %50'sinden azdır. Kortizol konsantrasyonunun artması stres, glukokortikoid tedavi, gebelik, depresyon, hipoglisemi ve hipertiroidizm ile ilişkilidir. Kadınlar ve erkekler arasında kortizol konsantrasyonunda fark yoktur ve referans aralığı yaşa bağlı değildir. Kortizolün dolaşımda yaklaşık yarı ömrü 60 dakikadır, dolayısıyla kan konsantrasyonu hızlı değişir (Burtis ve ark, 2012).

2.12.5. Kortizol performans hedefleri

Clinik Labrotaory Improvement Amendments (CLIA) 88 de kabul edilebilir performans kriterleri için güncel hedef %25'tir. Presizyon hedefleri için Fraser ve arkadaşları 300 ug/L kortizolde maksimum SD'nin 23 ug/L olmasını önermişlerdir, CV:%7.6'dır (Fraser ve ark, 1997). Son çalışma verileri, serum ve plazma kortizol ölçümünde laboratuvar içi kesinlik %CV, 100-300 ug/L kortizol konsantrasyonunda farklı üreticiler tarafından %5-12 arasında değiştiğini göstermektedir (Steele ve ark, 2005). 2007 CAP verileri, A.B.D'de en yaygın kullanılan Siemens Advia Centaur testinin analitik hedefleri karşıladığını göstermiştir. Abbott AxSYM ve SIEMENS Immulite 1000 kortizol testlerinin kesinlikleri sırasıyla %12.4 ve %12.6'dır. Yeni SIEMENSImmulite 2000 ve 2500 testleri daha iyi performans gösterir (Kaplan ve ark, 2010).

2.13. Klinik laboratuvarlarda yöntemlerin değerlendirilmesi

Hizmet kalitesinin arttırılması için yeni ya da düzeltilmiş testlerin laboratuvarda uygulamaya geçirilmesi, klinik laboratuvarların en önemli hedeflerindendir. Yöntem seçimi ve değerlendirmesi, yöntemin uygulanmasındaki önemli basamaklardır. Yeni yöntemin rutin uygulamaya girmeden önce, laboratuvar koşullarında uygunluğunun ve performansının değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu, iyi laboratuvar uygulamalarının koşullarındandır.

Yöntem değerlendirmede beş önemli nokta bulunmaktadır. Bunlara uyulduğu zaman başarılı bir yöntem kıyaslaması sağlanır.

1) Tüm işlemlerde klinik perspektifin uygulanması,
2) Analitik hedeflerin belirlenmesi
3) Gerekli verilerin toplanarak, doğru deneylerin tasarlanıp, yapılması
4) Uygun istatistikler kullanılarak hataların doğru hesaplanması
5) Yöntem konusunda tarafsız kararların verilmesi

Değerlendirmede istatistiksel parametrelerden faydalanılır, ancak istatistiksel yeterlilik tek başına yöntemin kabulü için yeterli değildir. Yöntem değerlendiriken laboratuvar maliyeti de göz önünde bulundurulmalıdır. Yine maliyeti de tek başına değerlendirmek doğru olmaz. İhtiyaç, yeni yöntem seçimindeki ilk basamağı oluşturur. Bu gerekliliklerin ayrıntılı olarak belirlenmesi, doğru ve etkin bir yöntem seçimine ve değerlendirilmesine olanak sağlar. Örnek miktarı, tipi, sonuç verme süresi, personel becerisi, test maliyeti, yeterli personel durumu, kalite kontrol, atıklar, güvenlik gibi pratik gereklilikler gözden geçirildikten sonra analitik performansa geçilebilir.

2.13.1. Analitik performans parametreleri

Yöntemin doğruluğu, analitik ölçüm aralığı, gerikazanım, duyarlılık, özgüllük, okuma limitleri, saptama sınırı, girişimden etkilenme durumu, kesinlik, reaktif dayanıklılığı ve sağlamlık gibi parametreleri kapsamaktadır. Bu parametreleri değerlendirme deneyleri yapılarak sonuçların kabul edilip edilemeyeceğine karar verilir.

2.13.2. Performans standartları

Yöntemin tarafsız değerlendirilebilmesi için performans standartlarının belirlenmesi gerekir ve yöntemin geçerliliği bu standartlara göre yapılır. Performans hedeflerinin analitin belli konsantrasyon ve konsantrasyonlardaki toplam izin verilen hata (Shackleton ve ark) düzeyini tanımlaması gerekmektedir. Tam belirlenmiş bir standardın bulunmamasından dolayı performans hedefleri laboratuvarlar arasında farklılık gösterdiği gibi aynı laboratuvarın içinde uygulamadan uygulamaya göre de farklılık gösterebilmektedir.

Analitik hedeflerin oluşturulması için yayımlanmış çeşitli kılavuzlar bulunmaktadır (Barnett, 1968; Fraser ve ark, 1997; Skendzel ve ark, 1985). CLIA tarafından yayımlanmış çeşitli analitlerin laboratuvar performanslarını değerlendirmede kullanılabilecek limitler mevcuttur (Tietz, 2006). Performans standartları belirlendikten sonra aday yöntem seçilir ve değerlendirme için gerekli deneyler yapılır ve veriler toplanır.

2.13.3. Yöntem değerlendirme deneylerinin basamakları

- Öncelikle prosedürün değerlendirilmesi için protokol hazırlanır.
- Değerlendirme sırasında elde edilen tüm veriler raporlanır.
- Yüksek konsantrasyonda analit içeren kontrol materyali ya da serum havuzu uygun diluent ile seyreltilir. Ölçülen değerler ile grafik çizilir ve analitik aralık belirlenir.
- Ölçüm yönteminin kesinlik çalışması yapılır. Tıbbi karar düzeyine yakın materyaller kullanılarak ve gerekli protokollere uyularak yöntemin kesinliği saptanır.
- Yöntem karşılaştırma ve geri kazanım deneyleri ile yöntemin doğruluğu test edilir. Bilimsel olarak en geçerli olan, aday yöntemin referans yöntem ile kıyaslanmasıdır. Geri kazanım deneyleri konsantrasyonu bilinen numunenin üzerine belirli miktarda analit eklenerek çalışılır ve % geri kazanım hesaplanır. Bu orantısal sistematik hatayı verir.
- Yeni yöntemin duyarlılığı kalibrasyon eğrisinin eğiminden faydalanılarak hesaplanır.
- Yöntemin limitleri belirlenir.

- Girişim deneyleri yapılarak yöntemin özgüllüğü saptanır.
- Referans aralık belirlenir.

2.13.4. Yöntem kabul edilebilirliğinin değerlendirilmesi

1) Performans deneyleri ile belirlenen hatalar analitik hedef olarak belirlenmiş hatalarla kıyaslanır.
2) Hesaplanan toplam hata izin verilen toplam hatadan daha düşük olmalıdır.
3) Analitik parametrelerden bir ya da daha fazlası için izin verilen hatadan büyükse kabul edilmemeli ve iyileştirme çalışmaları yapılmalıdır.

2.14. Metot Validasyonu

VALİDASYON (CLSI ve ISO): Bir işlem, süreç, sistem, donanım ya da yöntemin beklendiği şekilde çalıştığını ve kullanım amacını karşıladığını kanıtlama eylemi veya sürecidir.

2.14.1. Doğruluk

Bir analitin ölçülen düzeyinin gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. Hata (bias) ise iki değer arasındaki farkı göstermektedir. Sistematik hata ve rastgele hataların toplamı, toplam hatayı oluşturur (Tietz, 2006). Doğruluk yöntem karşılaştırma, geri elde ve interferans çalışmaları ile belirlenir.

2.14.2. Analitik aralık (Linearite)

Yöntemin örnekte hiç modifikasyon yapılmadan ölçebildiği konsantrasyon aralığıdır. Linearite sınırları kalibrasyon eğrisi çizilerek saptanır. Bir yöntemin analitik aralığı dilüsyon işlemi yapılmadan beklenen değerin % 95-99'unu ölçebilmelidir. CLIA 88'e göre yöntemin analitik aralığı rapor edilebilir aralık olarak da tanımlanmaktadır (Tietz, 2006).

2.14.3. Analitik Ölçüm Limitleri

2.14.3.1. Limit Of Blank (LOB)

Reaktif ve analit haricinde örnek bileşenlerinin ölçümüdür. Toplam hatayı etkilediği için kör ölçümlerinin düzeyi bilinmelidir. Kör ölçüm düzeyinin düşük olması istenmektedir. Bu sayede daha doğru ve kesin ölçüm yapmak mümkün olmaktadır. Kör okumalarının belli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değeridir (Tietz, 2006)

2.14.3.2. Limit Of Dedection (LOD)

Belirli bir olasılıkla saptanabilen en düşük analit miktarıdır (Tietz, 2006)

2.14.3.3. Limit Of Quantitation (LOQ)

Belli bir presizyon ve doğruluk değerinde kantitatif olarak ölçülebilen en küçük analit miktarıdır (Tietz, 2006).

2.14.4. Tekrarlanabilirlik (kesinlik)

Bir analitik yöntemin aynı örneğin ard arda analiz sonuçlarını aynı olarak analiz edebilme gücü, yöntemin kesinliğini verir. Rastgele hatayı belirlemek amacıyla kullanılmaktadır (Tietz, 2006).

2.14.5. Geri Kazanım

Bir analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen miktarda eklenen analiti doğru olarak ölçme kapasitesidir. Geri kazanım ölçümleri ile bir yöntemin doğruluğu hakkında en gerçekçi bilgi elde edilmiş olur. Çünkü içeriği bilinen örneğin matriksinde bulunan tüm bileşiklerin varlığında, analiti ne derece ölçtüğünü gösteririr (Tietz, 2006)

2.14.6. İnterferans (Girişim)

Analitten başka bir bileşiğin etkisi veya örneğin özelliği nedeniyle, ölçülen analit konsantrasyonunda klinik olarak anlamlı bir Bias'ın oluşumudur. (Tietz, 2006)

Klinik Anlamlılık: İnterferans oluşturan bir analitik etkinin, ne kadar büyüklükte olursa klinik olarak anlamlı olduğuna karar verilmelidir.

2.14.7. Referans Aralık Doğrulama

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)' ya göre geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralığı baz alınarak yeni yöntemle karşılaştırmak amacıyla 20 sağlıklı birey numunesi analiz edilir. %10'undan fazlası aralık dışındaysa red edilir.

2.14.8. Taşıma (Carryover)

Otomatize çalışan sistemlerde önceki numuneden sonraki numuneye aktarım olup olmadığını, oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermek için yapılır. Yüksek ve düşük konsatrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutulur. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenir (Westgard ve ark, 2008).

2.14.9. Matriks Etkisi

Standart solüsyon içindeki analit ile plazma gibi biyolojik matriksteki aynı analitin LC-MS/MS analizlerinde farklı yanıtlar oluşturması şeklinde tanımlanmaktadır. Matriks etkisi eş zamanlı salınan endojen fosfolipitler ve ve pek çok farklı bileşikten kaynaklanmaktadır. Matriks etkisi çok değişken olabilir ve tahmin etmek zordur. Hedef analitin iyonizasyonunu etkiler. (Chambers ve ark, 2007)İyonizasyon etkileri teorik olarak çözelti fazında ya da gaz fazında oluşabilir. Biyolojik ekstraklarda ESI ile yapılan çalışmalar, iyon supresyonunun temel nedenini, uçucu olmayan ya da daha az uçucu çözünenden kaynaklanan spey damlacığı özelliklerinin değişimi olarak gösterilmiştir. Bu uçucu olmayan materyaller (tuzlar, iyon eşleştirme ajanları, endojen bileşikler, ilaçlar ve metabolitleri) damlacık oluşumunu ya da damlacık buharlaşma verimliliğini değiştirerek gaz fazında dedektöre ulaşan yüklü iyon miktarını etkiler (Annesley, 2003).

2.14.10. Yöntem Karşılaştırma

Doğruluğu ölçmek amacıyla örnekler iki yöntemde eş zamanlı olarak çalışılır ve sonuçlar karşılaştırılır ve aralarındaki ilişkiyi belirlemek için regresyon analizi yapılır. Metot karşılaştırma çalışmalarında yöntemler arasında görsel değerlendirmeyi saçılım grafiği (scatter plot) ve Bland Altman grafikleri (difference plot) sağlar. İki metot ile elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki farkın ortalamalarına karşı gösterdiği saçılım Bland-Altman uyum grafiği ile değerlendirilir.

Bland Altman grafiği ortalamalar (gerçek değer) ve farklar (hata) arasındaki olası korelasyonun değerlendirilmesine olanak sağlar. Ayrıca Bland – Altman grafiği yanlılığın (farkların sistematik olarak sıfırdan farklı olup olmadığının) ve rastgele hatanın (farkların ne kadar yaygın olduğunun) değerlendirilmesini de sağlar. Grafikteki noktaların, x eksenine yatay uzanan uyum sınırları arasında olması beklenir. Metotlar arasındaki uyumsuzluk ise, işaretlenen noktaların yatay olarak çizilen sıfır ekseninden sapmalarıyla ölçülebilir (Mantha ve ark, 2000).

Klinik çalışmalarda, iki metot arasındaki uyumu incelemede kullanılan yöntemlerden biri de regresyon analizidir. Deming Regresyon ve Passing-Bablok yöntemleri Tip II regresyon yöntemleridir. Deming Regresyonu, X ve Y değişkenlerinden hangisinin bağımlı değişken olarak alınacağının bilinmediği durumlarda, her iki değişkendeki hataların da dikkate alınması gerektiğini belirtir. Passing-Bablok regresyon yöntemi parametrik olmayan Tip II regresyon yöntemidir. Bu yöntemde test metodu ile referans metot (X ve Y metotları) ile elde edilen verilerin bağımsız olduğu kabul edilir.

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan cihaz, malzemeler ve kitler

3.1.1. Cihazlar

- Tandem MS (ABSCIEX API 3200) (Singapur)
- HPLC { (SHIMADZU UFLC; DGU-20 A3 (degasser), LC-20 AD (A pompası) LC20 AD (B pompası) ve SIL-20 AC HT (oto sampler) }(Japonya)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra^{TM} X-2212) (Kazlauskaite ve ark)
- Vortex (Heidolph, Almanya)
- Evaporator (Teknosem TEB 40-WEL WT, Türkiye)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)
- Otomatik Eliza okuyucusu ve yıkayıcısı (Rayto Microplate Washer RT-2600, Rayto Microplate Reader RT-2100C marka, Çin)
- Roche Cobas e 601 (2115-08, İsviçre)

3.1.2. Kimyasallar

- Nitrojen tüpü (Habaş)
- HPLC kolonu (Retsek pinnacle marka DB C8, 50x4,6mm, 3µm)
- Kortizol standardı {Sigma; H4001-5G (Lot: SLBD0859V) }
- Kortizon standartı {Sigma; C2755-1G (Lot: BCBK3819V) }
- İnternal standart {(d_4) (9,11,12,12-D4,%98-d_4,%98) Cambridge DLM-2218-0 (Lot:PR20446)
- Metanol {Sigma: 34885-2,5L-R (lot: S2BD126SV) }
- HPLC grade su {Chemsolute,(Bach no: Q2A085192A) Almanya) }
- Formik asit (HCOOH){Sigma Aldrich, Lot no: 81420 (Kazlauskaite ve ark) }
- Dietil eter {Merck: K43976621 245 (Darmstadt, Almanya) }
- 11 deoksikortizol standardı{LGC; H4001-5G (Lot: 6691)}
- Aldosteron standardı{Sigma; A9477-5MG (Lot: SLBF3506V) }
- Kolesterol{Sigma; C8503-100G (Lot: 060M1200V) }
- NaH_2PO_4 $2H_2O$ (Sigma: 82470, Almanya)
- NaCl (Merck: K40124804 919, Darmstadt, Almanya)

- Na_2HPO_4 (Merck: F1576286 915 Darmstadt, Almanya)
- BSA{Sigma; A9418-10G (Lot108K12772) }

3.1.3. Kitler

- Kortizol serum ELISA kiti{DRG; (Lot43K093-2) Almanya}
- Kortizol idrar ELISA kiti{DRG; (Lot3337) Almanya}
- Kortizol immunoassay kiti{Roche; (Lot174778) Almanya}

3.2. Analiz yöntemleri

3.2.1. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) ölçüm yöntemi

3.2.1.1. Serum

DRG kortizol ELISA kitinin çalışma prensibi kompetitif bağlanma kinetiğine dayanmaktadır. Mikroplate kuyucukları kortizol molekülünün antijenik kısmına karşı geliştirilmiş monoklonal antikorla kaplanmıştır. Kaplı antikorlara bağlanmak için hasta numunesindeki endojen kortizol ve kortizol peroksidaz konjugatı yarışır. inkübasyon sonrasında bağlı olmayan konjugat yıkanır. Bağlı peroksidaz konjugat miktarı, numunedeki kortizol konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Substat solüsyonunu ilave ettikten sonra oluşan renk yoğunluğu, numunedeki kortizol konsantrasyonu ile ters orantılıdır.

ELISA Prosedürü

20 µl standart, kontrol ve numuneler kuyucuklara pipetlendi. 200 µl enzim konjugatı her kuyucuğa eklenerek, 10 saniye karıştırılıp, oda ısısında 60 dakika inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 3 kez yıkama solüsyonu ile yıkanarak her kuyucuğa 100 µl substrat solüsyonu eklendi. 15 dakika oda ısısında inkübe edilip, her kuyucuğa 100 µl stop solüsyonu eklendi. Stop solüsyonu eklendikten sonra 10 dakika içinde 450 nm'de mikroplate okuyucuda okutuldu. Standartlara göre çizilmiş kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak numunelerdeki kortizol konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.1.2. İdrar kortizol ELISA ölçüm yöntemi

Numune içindeki kortizol ile peroksidaz kortizol konjugatı antikortizol antikorları ile kaplanmış mikro kuyucuklara bağlanmak için yarışır. İnkübasyon sonrasında yıkama işlemi ile bağlı olmayan kısım uzaklaştırılır. Substrat solüsyonu ilave edilir ve substrat solüsyonu ile bağlı kısım reaksiyonu sonucunda renklenme gerçekleşir. Stop solüsyonu ilave edilerek reaksiyon durdurulur. Renk yoğunluğu, numunedeki kortizol konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak numunelerin kortizol konsantrasyonları hesaplanır.

ELISA Prosedürü

Her kuyucuğa standartlar ve numune 10 µl pipetlenmiştir. 300 µl konjugat eklenerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. Yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanarak, 100 µl substrat solüsyonu eklendi. Oda ısısında ve karanlıkta 15 dakika inkübe edildikten sonra 100 µl stop solüsyonu eklendi. 5 dakika içinde 450 nm'de absorbansı alındı. Standartlara göre çizilmiş kalibrasyon grafiğinden yararlanılarak numunelerdeki kortizol konsantrasyonları hesaplandı.

3.2.2. İmmunoassay çalışma prensibi

3.2.2.1. Serum

1. İnkübasyon: 20 µL numune, kortizole spesifik biyotinli antikor ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş bir kortizol türevi ile inkübe edilir. Numune içindeki analit konsantrasyonuna ve ilgili immün kompleksin oluşumuna bağlı olarak, işaretli antikor bağlayıcı yer kısmen numune analiti ve kısmen rutenyumlu hapten ile doldurulur. 2. inkübasyon: Streptavidin-kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanmış hale gelir. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Daha sonra bağlanmamış maddeler yıkanarak uzaklaştırılır. Elektrod üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonuna neden olup, bu bir foton sayıcı (photomultiplier) ile ölçülür. Sonuçlar, 2-noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edilir.

3.2.2.2. İdrar

İdrar numunelerinin ekstraksiyonu ve hazırlanması:

600 µl idrar + 3.0 ml diklorometan cam bir tüp içinde 7 dakika boyunca iyice karıştırılarak, fazları ayırmak için 2500×g'de 5 dakika santrifüjlenir. Sulu fazı ve faz ara yüzeyindeki olası kalıntılar uzaklaştırılarak atılır. 1.5 ml diklorometan fazı temiz bir cam tüp içine aktarılıp bir kabın içinde yavaşça bir azot akışına maruz bırakarak kuruyana kadar indirgenir. Kuru kalıntı 300 µL Elecsys Diluent Universal ile sulandırılır ve 1 dakika boyunca 4 kere ara sıra karıştırarak 15-25ºC'de 30 dakika boyunca inkübe edilir. Hazırlanmış numune serum ve plazma numuneleriyle aynı şekilde analiz edilir.

3.2.3. LC-MS/MS

3.2.3.1. Metot optimizasyonu

Çalışmamızda optimum parametreleri belirlemek için en yüksek intensiteye sahip pikleri elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirdik. Uygun mobil fazı belirleme çalışmalarımızda %100'lük metanol ile hazırlanmış standartlar kullanıldı. İlk hazırlanan mobil faz A %0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile yapıldı. İkinci deneme mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile yapıldı. Standartlar farklı olarak %0.1'lik formik asit içeren metanol ile hazırlanarak her iki mobil fazda denendi. En iyi intensite; %100 metanol ile çözülmüş standartların mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile çalışılması ile elde edildi. Formik asitin iyonlaşmayı arttırıcı etkisi nedeniyle denemelerde kullanıldı. Ancak fazla iyonlaşmanın da pik intesitesini olumsuz etkilediğine karar verildi ve standart hazırlamada ve mobil faz A da formik asit çıkarıldı. Cihaz ayarlarını belirlemek için yapılan deneme çalışmalarında belirlenen mobil faz A, mobil faz B ve metanl ile hazırlanmış standartlar kullanıldı.

Cihaz ayarları ile ilgili olarak time denemeleri 150 milisaniye, 200 milisaniye, 250 milisaniye, 400; enjeksiyon volümünü belirlemek için 30 µL, 40 µL ,

60 µL ile; sıcaklık denemeleri 400°C, 500°C, 600°C ile çalışmalar gerçekleştirildi. İonspray voltaj(IS) ile ilgili denemeler, 4500 V ve 5500 V ile gerçekleştirildi.

Akış gradientini belirlemek için yapılan deneme çalışması sonucunda total akış hızı 1mL/dk olarak belirlendi. Total akışta Pompa B'nin yüzdesini belirlemek için %50, %60 ve %80 ile deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Yöntemde kullanılan akış gradienti Şekil 3.1'de gösterilmiştir.(Huang ve ark, 2007; Turpeinen ve ark, 2013)

Metanol ile hazırlanmış standart cihaza enjekte edilerek uygun gaz ayarları ve potansiyel ayarları belirlendi.

Gerçekleştirdiğimiz deneme çalışmaları sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde ettiğimiz koşullar tablo 3.1'de gösterilmiştir.

3.2.3.2. LC-MS/MS parametreleri

Çalışmada kullanılan LC-MS/MS parametreleri Tablo 3.1'de verilmiştir.

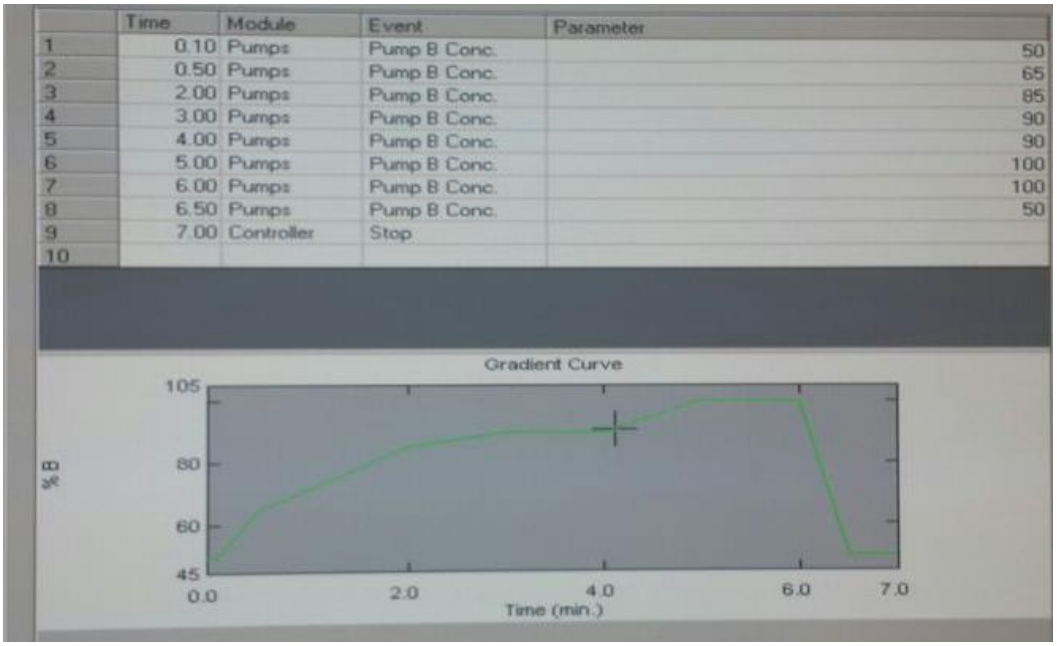
Tablo 3.1. LC-MS/MS parametreleri.

Declustering Potential (DP)	51
Entrance Potential	5
Collision Energy (CE)	35
Collision Cell Exit Potential (CXP)	4
Curtain Gas (Porter ve ark)	10
Collision Gas (CAD)	5
Ionspray Voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	600°C
Ion Source Gas1 (GS1)	50
Ion Source Gas2 (GS2)	60
Interface Heater	On
Ionisation Mode	Elektro Sprey İyonizasyon
Ionisation Source	Turbo Sprey
Collision Gas	N_2
Dwell Time	250 milisaniye
Pompa Modu	Binary Flow
Total Akış	1 mL/dk
Enjeksiyon volume	60 µL
Analiz süresi	7 dk
Kolon	Restek DB C8, 50 x 4,6 mm, 3 µm ters faz
Mobil faz A	HPLC grade su
Mobil faz B	% 0,1'lik formik asit içeren metanol

Kortizol ve kortizon standartları saf metanolde çözdürülüp Q_1 ve Q_3 iyonlarının tayini ABSCIEX API 3200 tandem mass spektrometri cihazında AutoTune algoritması kullanılarak gerçekleştirildi. En yüksek intensiteye sahip Q_1 ve Q_3 iyonları sırayla kortizol için 363.1/121.1 ve 363.1/91, kortizon için 361.1/163 ve 361.1/91.1 olarak belirlendi. İzotop (d_4) için ise en yüksek intensiteye sahip iyonlar (Q1-Q3) 367.2-121.1 olarak belirlendi. Piklerin çıkış süresi kortizol için: 2.5 dk, kortizon için ise 2 dk'dır.

3.2.3.2.i. Akış Gradienti

Çalışmada kullanılan akış gradienti Şekil 3.1'de verilmiştir.

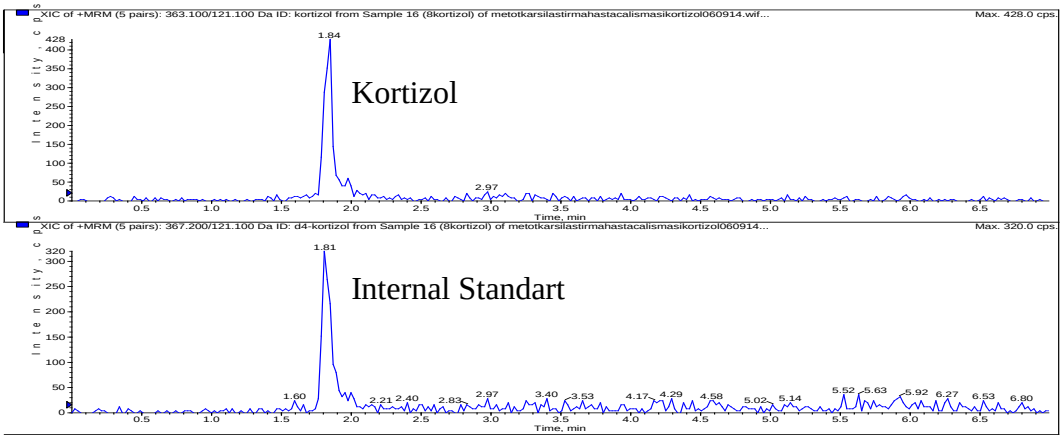


	Time	Module	Event	Parameter
1	0.10	Pumps	Pump B Conc.	50
2	0.50	Pumps	Pump B Conc.	65
3	2.00	Pumps	Pump B Conc.	85
4	3.00	Pumps	Pump B Conc.	90
5	4.00	Pumps	Pump B Conc.	90
6	5.00	Pumps	Pump B Conc.	100
7	6.00	Pumps	Pump B Conc.	100
8	6.50	Pumps	Pump B Conc.	50
9	7.00	Controller	Stop	
10				

Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan akış gradienti.

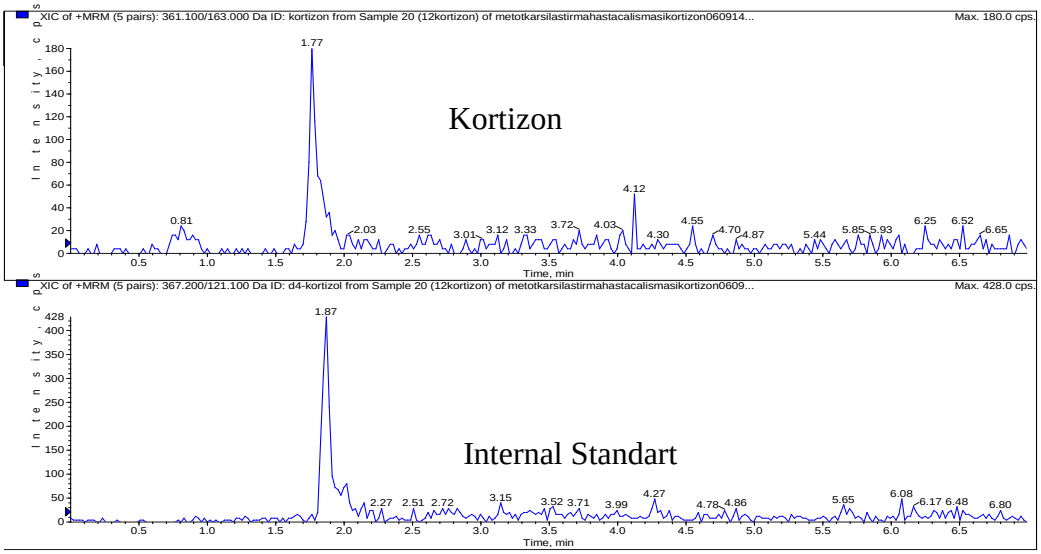
3.2.3.2.ii. Pikler

Çalışmada elde edilen kortizole ve internal standartına ait LC-MS/MS pikleri Şekil 3.2'de gösterilmektedir.



Şekil 3.2. Kortizol ve internal standart (d4-kortizol) pikleri.

Çalışmada elde edilen kortizona ve internal standartına ait LC-MS/MS pikleri Şekil 3.3'te gösterilmektedir.



Şekil 3.3. Kortizon ve internal (d4-kortizol) standart pikleri.

3.2.3.3. Çalışma prosedürü

250 µl örnek ya da standart alınıp üzerine 50 µl internal standart ve 3 ml dietil eter eklenerek 1dk vortekslendi. 13500×g'de 10 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz temiz bir tüpe alındı. Üst fazı alınmış tüpe tekrar 3 ml dietil eter konularak, tekrar 1 dk vortekslendi. 13500×g'de 10 dakika santrifüj edildi. Bunun üst fazı da tekrar üst fazı alınan temiz tüpe ilave edildi. Azot gazı altında uçurularak kurutulan tüplere %0,1 lik formik asit + %50 lik metanolden 200 µl ilave edilerek çözüldü. 200 µl viallere enjekte edilip, viallerin kapakları kapatılarak otosamplere yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi.

3.3. Ön işlemlerde kullanılan çözeltilerin hazırlanması

3.3.1. BSA hazırlanması

Bovin Serum Albumin-Standart Buffer (BSA-PBS), 0.1 M PBS, %1 BSA, %0,9 NaCl, pH 7.4: Çözelti 1.134 g Na_2HPO_4 , 0.302 g NaH_2PO_4 $2H_2O$, 0.9 g NaCl, 1 g sığır serum albumin 100 mL HPLC grade suda çözdürüldü. pH ise NaOH ve HCl kullanılarak 7.4 olarak ayarlandı.

3.3.2. Standartların Hazırlanması

3.3.2.1. Kortizol standartı

Stok 1: liyofilize haldeki kortizol standartı 10 mg/L olacak şekilde saf metanol ile çözüldü.
Stok 2: stok 1'den 1/10 dilüsyon yapılarak 1 mg/L = 1000 µg/L'lik standart elde edildi.
Stok 3: stok 2'den 1/5 dilüsyon yapılarak 200 µg/L'lik standart elde edildi.

3.3.2.2. Kortizon standartı

Stok 1: liyofilize haldeki kortizon standardını 1000 mg/L olacak şekilde saf metanol ile çözüldü.
Stok 2: stok 1'den 1/100 dilüsyon yapılarak 10 mg/L'lik standart elde edildi.
Stok 3: stok 2'ten 1/10 dilüsyon yapılarak 1mg/L=1000 µg/L'lik standart elde edildi.
Stok 4:stok 3'ten 1/5 dilüsyon yapılarak 200 µg/L'lik standart elde edildi.

3.3.3. D_4 Kortizol izotop hazırlama prosedürü

Stok 1: 4000 mg/L. 10 mg D4 kortizol 2.5ml metanol ile çözüldü.
Stok 2: 40 mg/L. Hazırlanan stok 1'den 1000 µl alınıp, 99000 µl metanol eklendi.
Stok 3: 800 µg/L. Stok 2'den 2000 µl alınır, 98000 µl metanol eklendi.

Çalışmada 20 µg/L'lik kortizol izotopu kullanılmıştır. 800 µg/L'lik stok 3'ten 250 µL alınıp, 9750 µL metanol ilave edildi. Böylece 20 µg/L'lik konsantrasyon elde edildi.

3.4. Metot validasyonu

3.4.1. Linearite (doğrusallık) çalışması

Metot validasyonu kapsamında gerçekleştirilen linearite çalışması CLSI EP6-A protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu protokol şunları içermektedir;

Doğrusallığın istatistiksel değerlendirmesi için yapılan çalışmaları içerir.

- Protokol en az 5 örneğin çift çalışılmasını kabul eder
- Önerilen örnek ve tekrar sayısı çalışmanın amacına göre değişir:
- Lineer aralığı belirlemek için 9-11 düzey ve her örneğin 2 veya 4 tekrarlı çalışması önerilmektedir (ilk çalışma için lineer aralığı beklenenden %20-30 daha geniş tutmak gerekir).
- Modifiye yöntem veya laboratuvar içi kurulan yöntemi (in-house) doğrulamak için 7-9 nokta ve her düzeyde 2 veya 3 tekrar çalışma önerilmektedir.
- Laboratuvarda lineer aralığın geçerliliğinin kanıtlanması için 5-7 örnek ve her düzeyde 2 tekrar çalışma önerilmektedir (Westgard ve ark, 2008)
- Bu protokol doğrultusunda kortizol için 10000 µg/L'den, 1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.81, 3.90 ve 1.95 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde, kortizon için ise 1000 µg/L'lik standarttan 200, 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 ve 0.78 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde BSA-PBS ile seri dilüsyon yapıldı ve linearite çalışmasında kullanıldı.

3.4.2. Analitik ölçüm limitleri

Limitler CLSI EP17 protokolüne göre belirlendi (Westgard ve ark, 2008).

3.4.2.1. Limit of blank (LOB)

Limit of blank çalışmasında BSA ön işlemlerden geçirilerek standartlarla birlikte 20 defa okutularak kortizol ve kortizon değerleri hesaplandı.

- Kör örneği ve düşük seviye analit içeren örnek alınır.
- 60 tekrar olacak şekilde 5 gün ölçüm yapılır.

- LOB=Mean (blank) + 1.65S (blank)
- LOD=LOB+ 1.65S (düşük seviye)
- LOQ= Bias (düşük seviye)+ 2S (düşük seviye) olduğu ilk nokta

3.4.2.2. Limit of detection (LOD)

Kromatografik yöntemlerde alt limitlerin sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi.

3.4.2.3. Limit of quantitation (LOQ)

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlendi.

3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması

Kesinlik çalışması CLSI EP5-A protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Bu protokol kapsamında;

- Matriks klinik hasta örneklerine uygun olmalıdır.
- İki konsantrasyon önerilmektedir ancak daha fazlada kullanılabilir.
- Cihazın ölçüm aralığının büyük çoğunluğunu kapsayan konsantrasyonlar seçilmelidir.
- Eğer ikiden fazla konsantrasyon kullanılacaksa tıbbi karar konsantrasyonuna yakın değerler seçilmelidir.
- 20 çalışma günü ve günlük iki çalışma yapılması önerilmektedir (Westgard ve ark, 2008).
- CLSI EP5-A protokülüne uyularak gerçekleştirlen tekrarlanabilirlik çalışmasında kortizol için 500, 200, 25 µg/L'lik sandartlarla, kortizon için 200, 25, 3.125 µg/L'lik standartlarla çalışma içi (gün içi), gün içi çalışmalar arası ve günler arası 20 ölçüm çift çalışılarak tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. Standartlar 20 cam tüpe bölünerek günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılmak üzere donduruldu.

3.4.4. Geri elde çalışması

Geri elde çalışmasında kortizol ve kortizon için 200, 50 ve 12.5 µg/L'lik standartlar kullanıldı. Standartlar 200 µg/L'den başlayarak 0.78 µg/L'ye kadar seri dilüsyonla inildi ve kalibrasyon grafiği bu 9 noktaya göre çizildi.

Kortizol ve kortizon için;

1. Tüpe 900 µl serum havuzundan alınıp, 100 µl BSA eklendi.
2. Tüpe 200 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
3. Tüpe 50 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.
4. Tüpe 12.5 µg/L'lik standarttan 100 µl alınıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.

Ön işlemler tamamlanarak okutuldu ve eklenen standartlara göre %R değerleri hesaplandı.

3.4.5. İnterferans çalışması

Klinik laboratuvarlarda interferans çalışması kapsımında gerçekleştirilen interferans çalışması CLSI EP7-A protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu protokol;

Analit Konsantrasyonu: İnterferans çalışması, analitin 2 farklı tıbbi karar seviyesinde değerlendirilmelidir. Kontrol ve test yapılacak örnek havuzlarının içerdikleri analit miktarları bu seviyelere uygun olmalıdırlar.

İnterferan Konsantrasyonu: Kapsamlı bir interferans çalışmasında interferans yapabilen bir madde, bir laboratuvarın hasta örneklerinde karşılaşılabileceği en yüksek konsantrasyonunda olmalıdır (Westgard ve ark, 2008).

Yukarıdaki belirtilen koşullara dikkat edilerek interferans çalışmasında;

Kortizol için, 11 deoksikortizol, kolesterol ve prednizolon ile kortizon için ise 11 deoksikortizol, kolesterol ve aldosteron ile interferans çalışması yapıldı.

11 deoksikortizolden 0.78-100 µg/L'lik standart, kolesterolden 100-1500 mg/dl'lik standart, aldosterondan 10-200 µg/L'lik standart, predizolondan 10-200 µg/L'lik konsantrasyonlar kullanıldı.

Düşük ve yüksek seviyelerde olmak üzere iki serum havuzu elde edildi. İnterferan madde eklemek için 5 adet tüp alındı.

Düşük düzey serum havuzundan eşit miktarda 1. ve 5. tüpe konuldu. 1. tüpe düşük düzey interferan serum havuzunun %10'nunu geçmeyecek şekilde konuldu. 5. tüpe de aynı miktarda yüksek düzey interferan ilave edildi. 1. ve 5. tüplerde eşit miktarda alınarak 3. tüpe konuldu. 1. ve 3. tüplerden eşit miktarda alınarak 2. tüpe konuldu. 3. ve 5. tüplerden eşit miktarda alınarak 4. tüpe konuldu. Böylece 1. tüpten 5. tüpe kadar artan konsantrasyonlarda (%0, %25, %50, %75 ve %100) interferan içeren tüpler elde edildi. Yüksek seviye serum havuzu içinde aynı işlemler tekrarlandı. Her iki seviye serum havuzu içinde interferan madde kadar BSA ekleyerek birer tüp daha hazırlandı. Kalibrasyon grafiği çizmek için gerekli 3 seviye standart ile (200, 25 ve 0.78 µg/L) tüm bu tüplerin ön işlemlerini tamamlanarak 3'er kez okutuldu. 1. tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada, 2. tekrar interferan konsantrasyonu azalan sırada, 3. tekrar tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada olacak şelikde gerçekleştirildi. Tüm konsantrasyonlarda ve interferanlarda aynı işlem tekrarlandı.

3.4.6. Referans aralık doğrulama çalışması

Referans aralığı doğrulama amacıyla öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere 20 sağlıklı kişiden numune alınıp, ön işlem protokollerine uyularak analiz gerçekleştirildi.

3.4.7. Taşıma (Carryover) çalışması

Taşıma çalışmasında yüksek ve düşük konsatrasyondaki numuneler belirli bir düzen içinde yerleştirilerek okutuldu. Düzenleme şekli aşağıdaki gibidir.

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11
GRUP 1: D2-D3-D6-D7-D8
GRUP 2: D4-D5-D9-D10-D11

Grup 1 düşüklerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, Grup 2 yükseklerden sonra gelen düşük numuneleri içermektedir. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen

hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenir (Westgard ve ark, 2008).

Taşıma çalışmasında kortizol ve kortizon için kullanılan konsantrasyonlar;
Düşük konsantrasyon: 0.78 µg/L
Yüksek konsantrasyon: 200 µg/L'dir.

Kortizol ve kortizon için yukarıdaki konsantrasyonlar kullanılarak taşıma çalışması için gerekli tüpler standart ön işlemlerden geçirilerek, yukarıdaki sıraya göre analiz edildi.

3.4.8. Numune stabilite çalışması

Numune stabilitesini belirlemek amacıyla kortizol ve kortizon için 3 farklı düzeydeki hasta numunesi aynı gün içerisinde standart ön işlemlerden geçirilerek çalışıldı ve 15, 30 ve 45. günlerde çalışılmak üzere porsiyonlanıp, donduruldu. Her çalışma gününde standart ön işlemler yapılarak analiz gerçekleştirildi

3.4.9. Dondurma ve çözmenin etkisinin belirlenmesi

Dondurma ve çözme işleminin kortizol ve kortizon ölçümüne etkisini belirlemek amacıyla düşük ve yüksek düzey olmak üzere farklı konsantrasyonlarda serum havuzu oluşturuldu. 4 defa dondurup çözme işlemi gerçekleştirildi. Çözdürülen numuneler standart ön işlemlerden geçirilerek analiz edildi ve ölçüm sonuçları kaydedildi.

3.4.10. Matriks etkisi çalışması

Kortizol ve kortizon için matriks etkisi çalışması Chambers ve arkadaşlarının yaptığı çalışma protokülüne uygun olarak gerçekleştirildi ve onların % matriks etkisi hesaplamasına uygun olarak hesaplandı. Kortizol için 500, 125 ve 31.25 µg/L'lik standartlar, kortizon için ise 200, 100 ve 25 µg/L'lik standartlar kullanılarak gerçekleştirildi. Bir serum havuzundan kortizol ve kortizon için 3'er tüp olmak üzere 6 tüp, numune hazırlama protokülüne uygun olarak ön işlemden geçirildi. Kortizol için ön işlemden geçirilen 3 tüp azot gazı altında kurutulduktan sonra 200 µl %0.1 formik asit içeren %50'lik metanol ile çözülüp, sırayla 200 µl 500, 150 ve 31.25

µg/L'lik kortizol standartı eklendi. İyice karıştırlıp, 200 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi. Aynı analiz içinde kortizol için herhangi bir ön işlem yapılmadan 3 tüpe 200 µl %0.1 formik asit içeren %50'lik metanol ve sırayla 200 µl 500, 150 ve 31.25 µg/L'lik kortizol standartı eklendi. İyice karıştırlıp, 200 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi.

Kortizon için ön işlemden geçirilen 3 tüp azot gazı altında kurutulduktan sonra 200 µl %0.1 formik asit içeren %50'lik metanol ile çözülüp, sırayla 200 µl 200, 100 ve 25 µg/L'lik kortizon standartı eklendi. İyice karıştırılıp, 200 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi. Aynı analiz içinde kortizon için herhangi bir ön işlem yapılmadan 3 tüpe 200 µl %0.1 formik asit içeren %50'lik metanol ve sırayla 200 µl 500, 150 ve 31.25 µg/L'lik kortizon standartı eklendi. Bu standartlar iyice karıştırılıp, 200 µl viale alınarak analizleri gerçekleştirildi (Chambers ve ark, 2007). Kortizol ve kortizon için ön işlem uygulanan ve uygulanmayan aynı konsantrasyondaki standartların pik alanlarından hesaplama işlemi yapıldı.

3.4.11. Metot karşılaştırma çalışması

EP9-A2: Hasta örneklerini kullanarak yöntem karşılaştırma ve bias hesaplama protokülüdür.

Yöntem karşılaştırmanın gerçekleştirilebilmesi için yöntem gözden geçirilmeli, verilerin işlenmesi için, kayıt ve hesaplama tabloları, gözden geçirme ve detaylı akış şemaları bulunmalıdır. Ek olarak örnek dağılım ve bias grafikleri de bulunmalıdır. Final kısmı değerlendirilen bias için üreticilere önerileri ve rapor formatında bias beklentilerini içermelidir (Westgard ve ark, 2008).

LC-MS/MS, ELISA ve kemilüminesans immunoassay yöntemleri kıyaslamak amacıyla Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarına gelen, rutin istemleri içinde kortizol bulunan hasta serumları, Roche Moduler E-170 otoanalizöründe analiz edildikten sonra artan kalan numuneleri LC-MS/MS 'de analiz edilmek üzere cam tüplere ayrılıp dondurulduk. 2 hafta içinde Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında bulunan ABSCIEX API 3200 Likid kromotografi-kütle spektrometri (LC/MS/MS) cihazında ölçümleri gerçekleştirildi. Aynı numuneler ayrıca Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

(ELISA) çalışması için porsiyonlanıp, dondurulduu. Serum numuneleri ayrılırken, immunoassay sonuçlarına göre referans aralığı içinde, referans aralığının altında ve üstünde olması durumuna göre eşit dağılım yapılmasına özen gösterildi. Aynı şekilde 24 saatlik idrar istemlerinde kortizol bulunan hastalar, Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) ve LC-MS/MS'te çalışılmak üzere porsiyonlanıp, dondurulduu. Metot karşılaştırma çalışmasında 89 serum, 70 idrar numunesi çalışıldı.

3.5. İstatistiksel analiz

MedCalc Versiyon 9.2.0.1 istatistik programı, EP Evaluator Release 8.0.0.171 versiyon ve Excel (2010) programları kulanılarak istatistiksel analiz gerçekleştirildi. Uygulanan tüm yöntemlerde numuneler çift çalışıp, ortalamaları alındı. Yöntem karşılaştırma çalışmasında elde edilen Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), kemilüminesans immunoassay ve LC-MS/MS verilerinin regresyon analizleri gerçekleştirildi. Yöntemler arası mutlak uyumu değerlendirmek amacıyla Bland Altman grafikleri, yöntemleri arası ilişkisel uyumu göstermek amacıyla da Passing Bablok analizleri gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

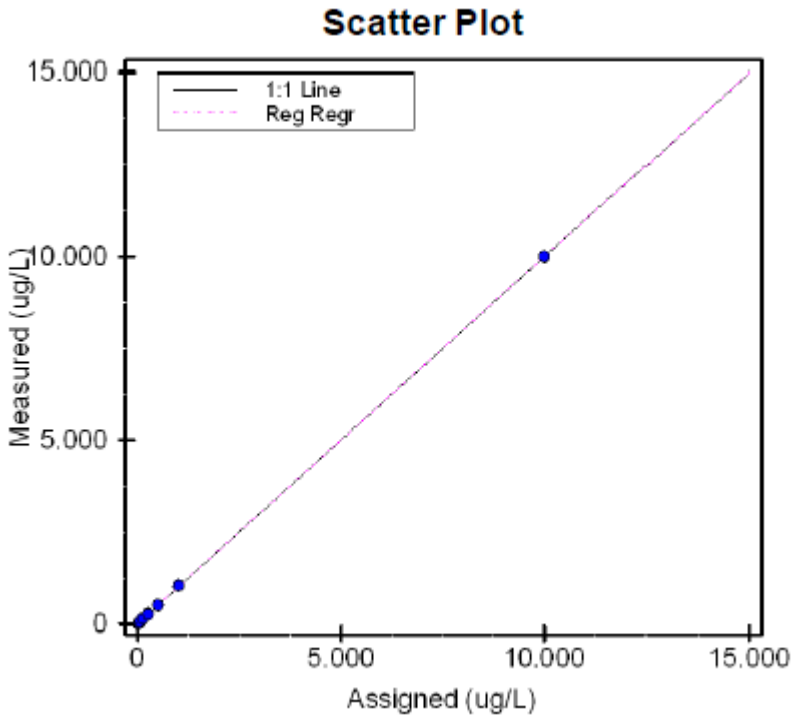
4.1. Linearite çalışması

Kortizol ve kortizon için linearite verileri sırasıyla Tablo 4.1 ve 4.2'de gösterilmektedir.

Tablo 4.1. Kortizol linearite verileri.

Kortizol(µg/L)	Kortizol 1. ölçüm (µg/L)	Kortizol 2. ölçüm (µg/L)	Kortizol 1. ve 2. Ölçüm ortalaması	Dilüsyon No	Uygunluk %
10000	**10030**	**9970**	**10000**	**1**	**100**
1000	**1040**	**1060**	**1050**	**2**	**105**
500	**576**	**414**	**495**	**3**	**99**
250	**274**	**258**	**266**	**4**	**107**
125	**134**	**136**	**135**	**5**	**108**
62.5	**70.5**	**68.5**	**69.5**	**6**	**111**
31.25	**34**	**30.2**	**32.1**	**7**	**103**
15.62	**19.6**	**18**	**18.8**	**8**	**120**
7.81	**11.4**	**8**	**9.69**	**9**	**124**
3.9	**4.44**	**4.78**	**4.61**	**10**	**118**
1.90	**2.60**	**1.94**	**2.27**	**11**	**119**

Tablo 4.1'de kortizolün BSA ile 10000 µg/L'den başlayıp 1.90 µg/L'ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları görülmektedir. Her bir konsantrasyon çift ölçülüp, ortalamaları alındı. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edildi.



Grafik 4.1. Kortizol linearite grafiği ve sonuçların dağılımı.

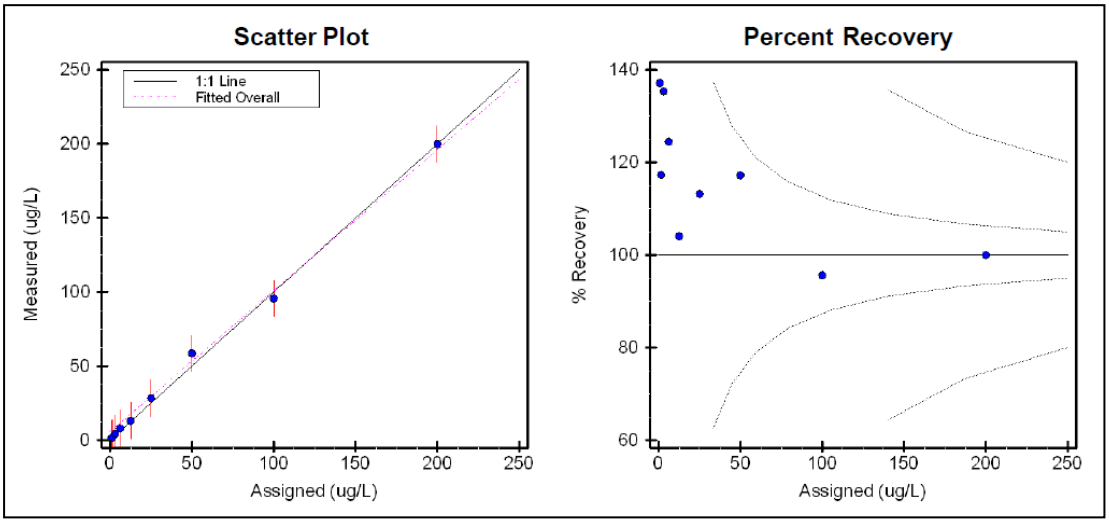
y=0.998x-15.826

r^2 =0.999

Tablo 4.2. Kortizon linearite verileri.

Kortizon (µg/L)	**Kortizon 1. Ölçüm(µg/L)**	**Kortizon 2. Ölçüm(µg/L)**	**Kortizon 1. ve 2. Ölüm ortalaması(µg/L)**	**Dilüsyon no**	**Uygunluk %**
200	**198**	**202**	**200**	**1**	**100**
100	**96.2**	**95**	**95.6**	**2**	**95.6**
50	**61.2**	**56**	**58.6**	**3**	**117.2**
25	**26.6**	**30**	**28.30**	**4**	**113.2**
12.5	**14.7**	**11.3**	**13**	**5**	**104**
6.25	**7.54**	**8.02**	**7.780**	**6**	**124.5**
3.125	**4.04**	**4.420**	**4.230**	**7**	**135.4**
1.56	**1.72**	**1.940**	**1.830**	**8**	**117.3**
0.78	**1.05**	**1.09**	**1.070**	**9**	**137.2**

Tablo 4.2'de kortizonun BSA ile 200 µg/L'den başlayıp 0.78 µg/L'ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları görülmektedir. Her bir konsantrasyon çift okutulup ortalamaları alındı. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edildi**.**



.
Grafik 4.2. Kortizon linearite grafiği ve sonuçların dağılımı.

y=1.0089x-1.6487
r^2=0.997

4.2 Analitik ölçüm limitleri

Kortizol için LC-MS/MS'de BSA ile ve 0.39 µg/L'lik standart ile yapılan okuma sonuçlarına göre tespit edilen kör okuma limiti Tablo 4.3'te gösterilmektedir.

Tablo 4.3. Kortizol kör okuma limiti.

Sensitivity Statistics

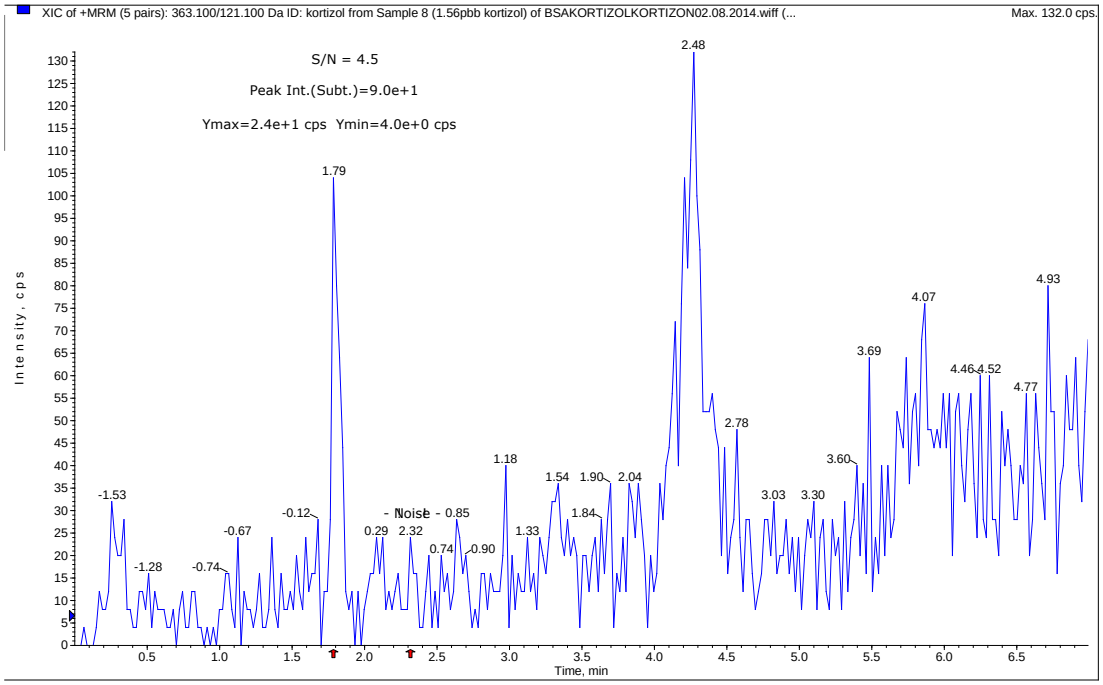
2 SD Limit of Blank (95% Conf): 0,0878 ug/L
Manufacturer's Claim: –
Passes: –

Response Statistics

Concentration	Mean	SD
0	0,10065	0,05807
0,39	0,61670	0,16869

Kortizol için kör okuma limiti %95 güven aralığında 0.0878 ug/L olarak tespit edildi.

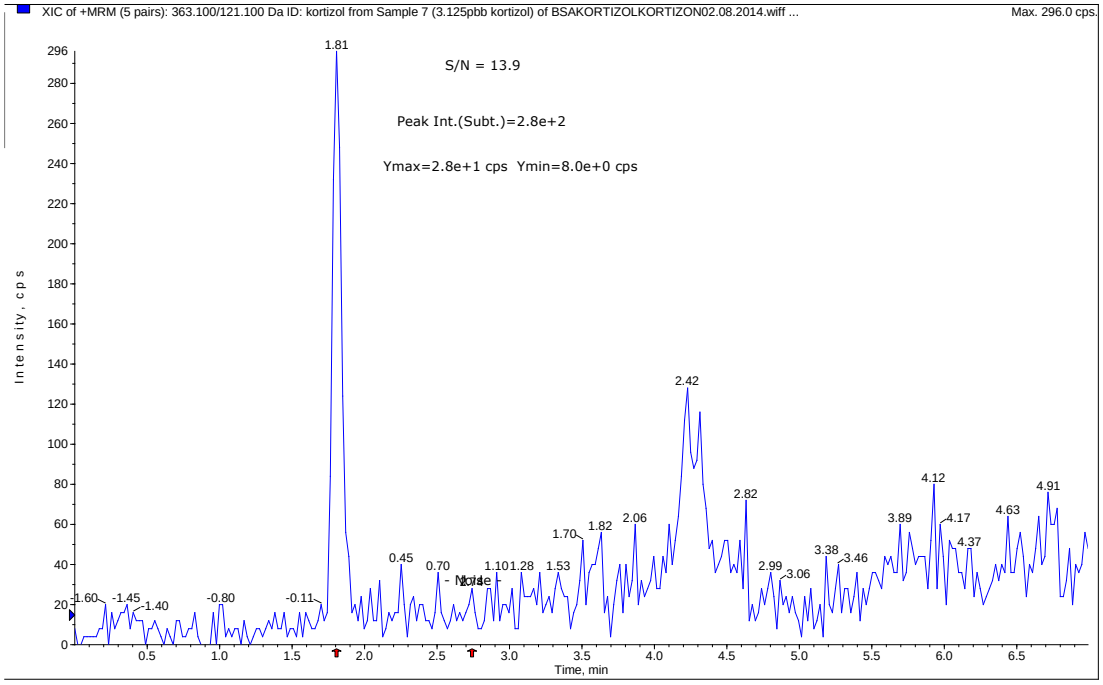
Kortizol için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti Grafik 4.3'te gösterilmektedir.



Grafik 4.3. Kortizol dedeksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Kortizol için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 1.56 µg/L olarak tespit edildi.

Kortizol için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti Grafik 4.4'te gösterilmektedir.



Grafik 4.4. Kortizol kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Kortizol için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti 3.125 µg/L olarak tespit edildi.

Kortizon için LC-MS/MS'de BSA ile ve 0.39 µg/L'lik standartla yapılan okuma sonuçlarına göre tespit edilen kör okuma limiti Tablo 4.4'te görülmektedir.

Tablo 4.4. Kortizon kör okuma limiti.

Sensitivity Statistics

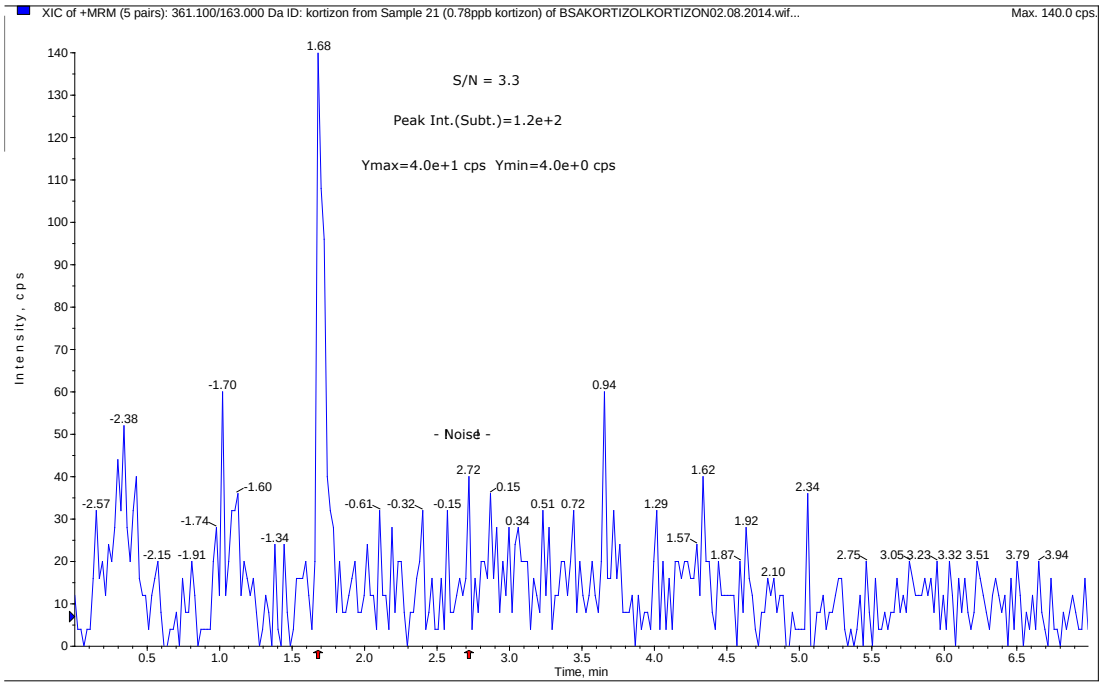
2 SD Limit of Blank (95% Conf): 0,132 ug/L
Manufacturer's Claim: –
Passes: –

Response Statistics

Concentration	Mean	SD
0	0,13379	0,05051
0,39	0,43116	0,07391

Kortizon için kör okuma limiti %95 güven aralığında 0.132 ug/L olarak tespit edildi.

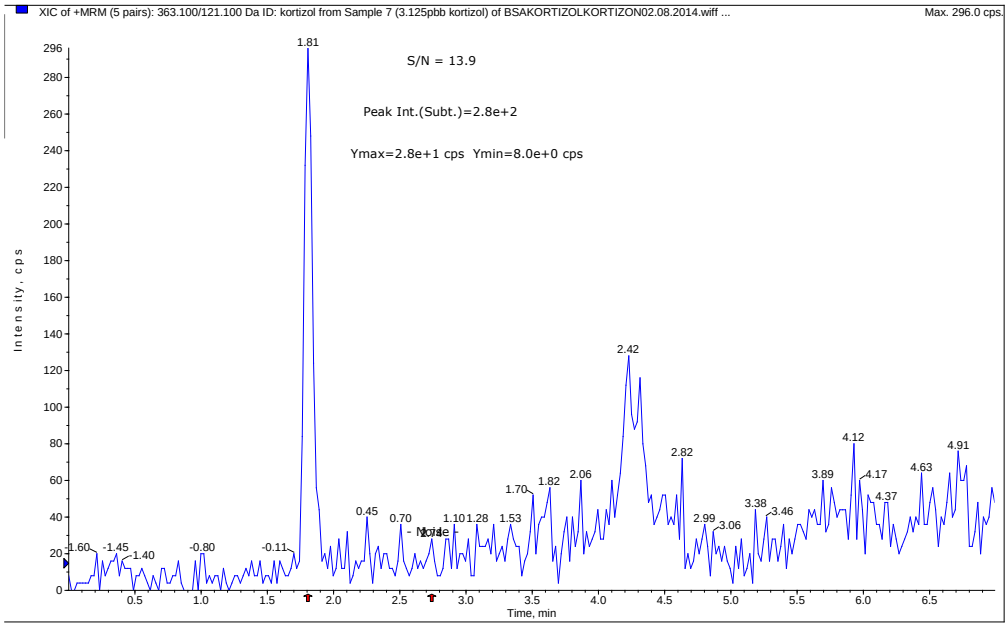
Kortizon için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti Grafik 4.5'te gösterilmektedir.



Grafik 4.5. Kortizon dedeksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Kortizon için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0.78 µg/L olarak tespit edildi.

Kortizon için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti Grafik 4.6'da gösterilmektedir.



Grafik 4.6. Kortizon kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Kortizon için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti 3.125 µg/L olarak tespit edildi.

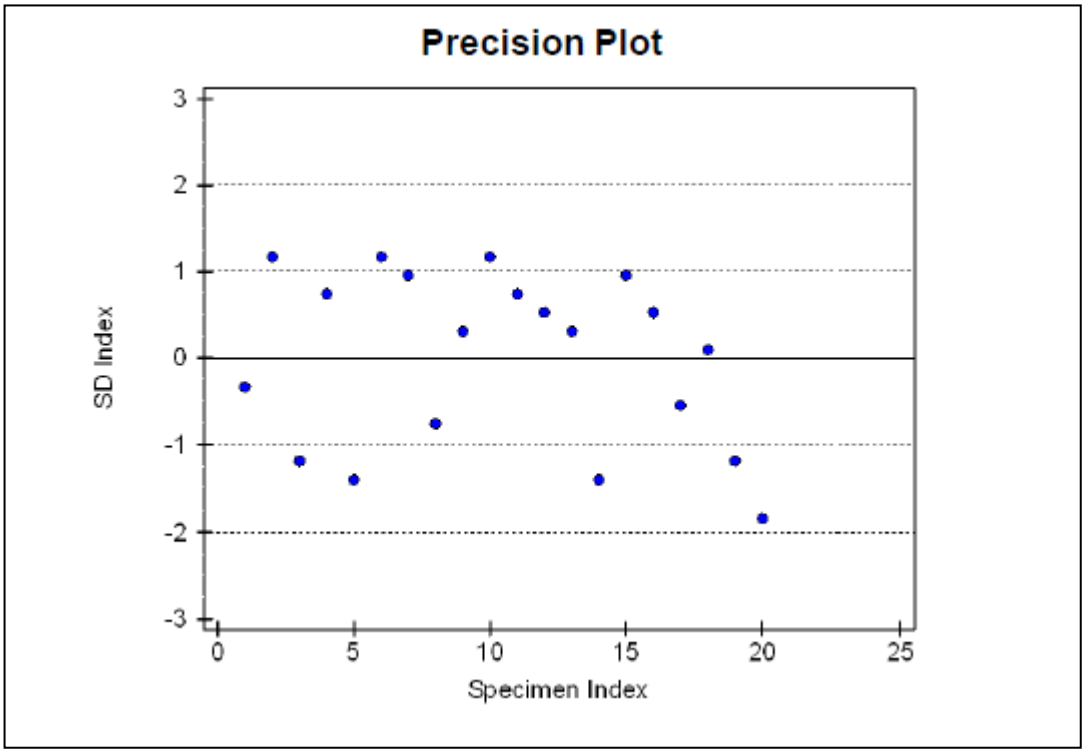
4.3. Tekrarlanabilirlik (kesinlik) çalışması

4.3.1. Kortizol çalışma içi kesinlik çalışması

Kortizol için 500, 200, 25 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ard arda 20 defa okutuldu. 500 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.5'te görülmektedir. Aynı numunenin 2 SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.7'de görülmektedir.

Tablo 4.5. 500 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	502,6 ug/L	95% Confidence for Mean	500,4 to 504,7
Standard Deviation (SD)	4,7	2 SD Range	493,2 to 511,9
95% Confidence for SD	3,5 to 6,8	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	0,9%	Number of Outliers	–

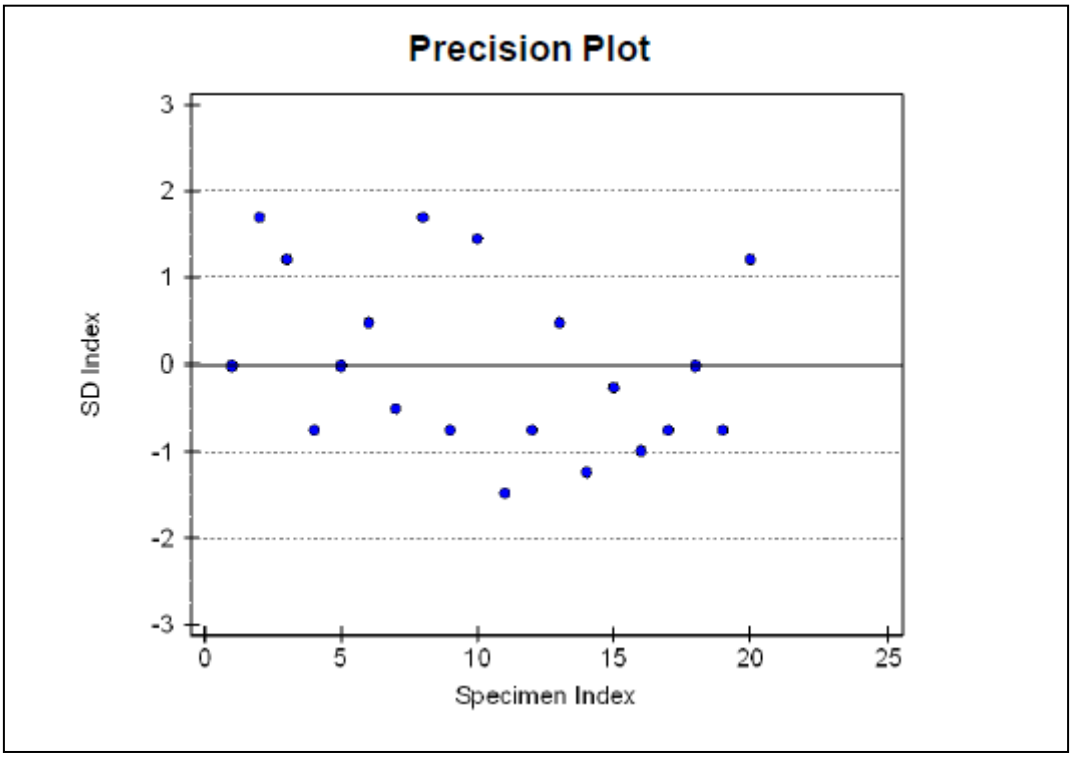


Grafik 4.7. 500 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.6'da gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.8'de gösterilmektedir.

Tablo 4.6. 200 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	202,1 ug/L	95% Confidence for Mean	200,1 to 204,0
Standard Deviation (SD)	4,1	2 SD Range	193,9 to 210,2
95% Confidence for SD	3,1 to 6,0	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	2,0%	Number of Outliers	–

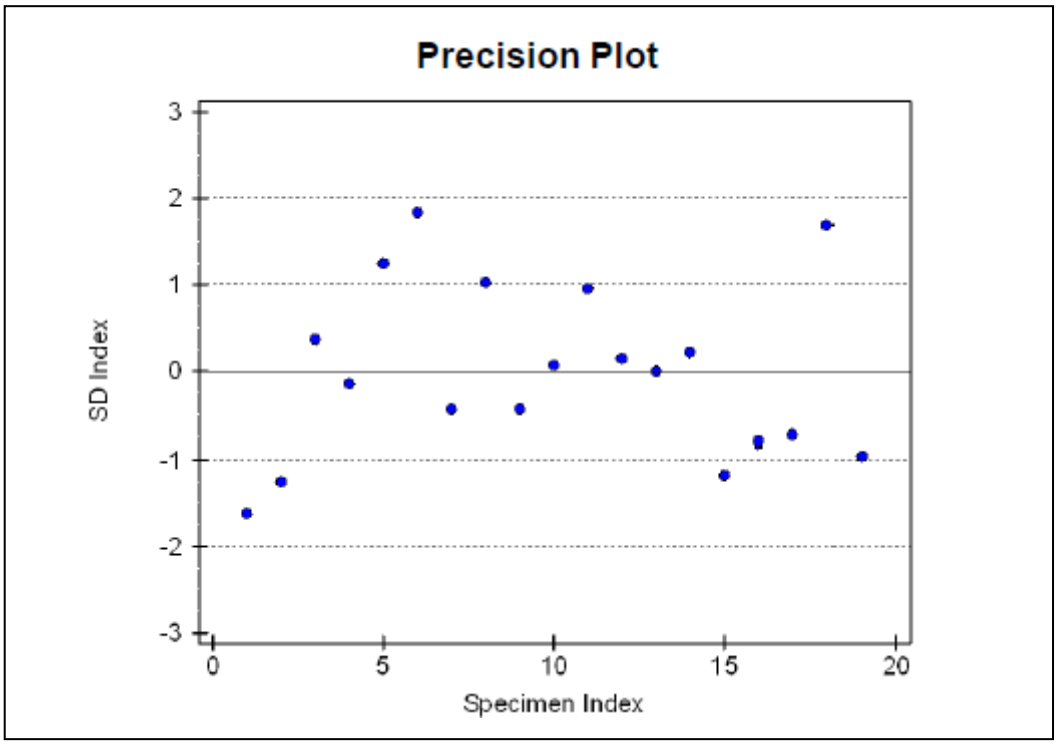


Grafik 4.8. 200 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.7'de gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.9'da gösterilmektedir.

Tablo 4.7. 25 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	25,10 ug/L	95% Confidence for Mean	24,44 to 25,76
Standard Deviation (SD)	1,36	2 SD Range	22,37 to 27,83
95% Confidence for SD	1,03 to 2,02	Number of Specimens (N)	19 of 19
Coefficient of Variation (CV)	5,4%	Number of Outliers	–



Grafik 4.9. 25 µg/L kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Kortizolün çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.8'de gösterilmektedir.

Tablo 4.8. Kortizol çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Konsantrasyon	**Ortalama**	**SD**	**%CV**
500	502.6	4.7	0.9
200	202.1	4.1	2
25	25.10	1.36	5.4

Kortizol çalışma içi kesinlik çalışmasında 500 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD değeri 4.7, %CV 0.9 olarak bulundu. 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 4.1, % CV: 2, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.36, %CV:5.4'tür. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için izin verilen total hata % 22.8 olarak verilmiştir. Çalışma içi SD < 0.25 TE olması gerekmektedir.

500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 500×0.228=114 µg/L'dir. İzin verilen SD: 114÷4= 28.5'dir. 4.7<28.5 olduğu için, 500 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.228=45.6 µg/L'dir. İzin verilen SD: 45.6÷4=11.4'dir. 4.1<11.4 olduğu için 200µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

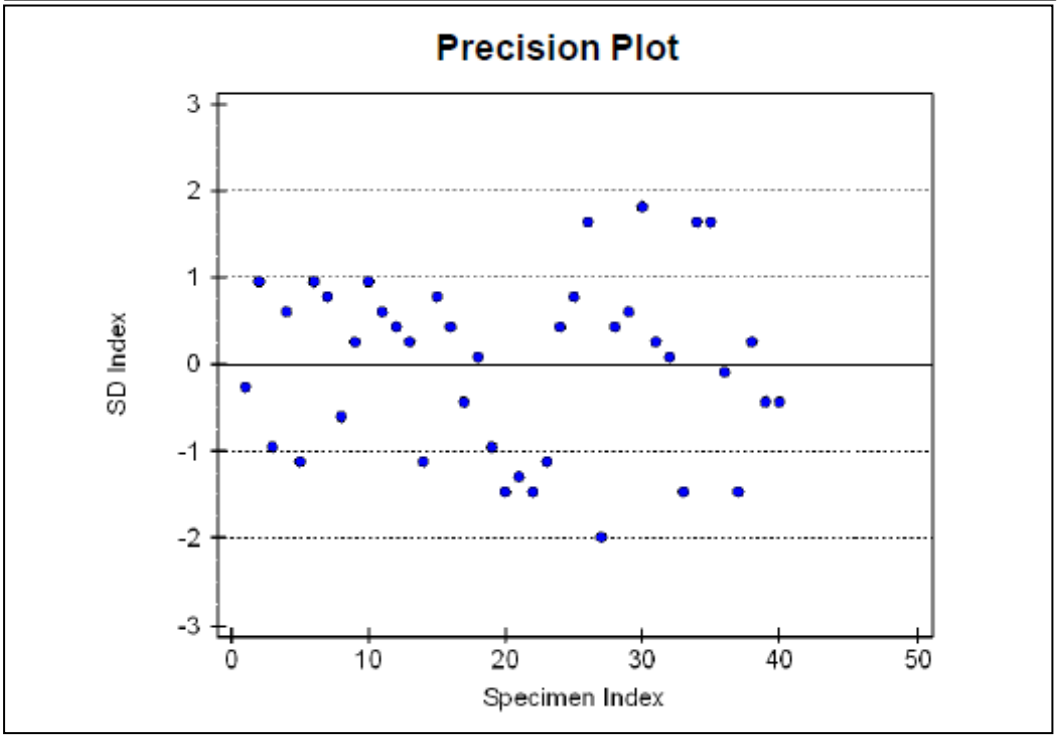
25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.228=5.7µg/L'dir. İzin verilen SD: 5.7÷4=1.425'dir. 1.36<1.425 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.2. Kortizol gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışması

Kortizol için 500, 200, 25 µg/L'lik konsantrasyonlar öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere aynı çalışma içinde ard arda 20'şer defa okutuldu. 500 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.9'da gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.10'da gösterilmektedir.

Tablo 4.9. 500 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	502,5 ug/L	95% Confidence for Mean	500,7 to 504,3
Standard Deviation (SD)	5,8	2 SD Range	490,9 to 514,1
95% Confidence for SD	4,7 to 7,4	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	1,1%	Number of Outliers	–

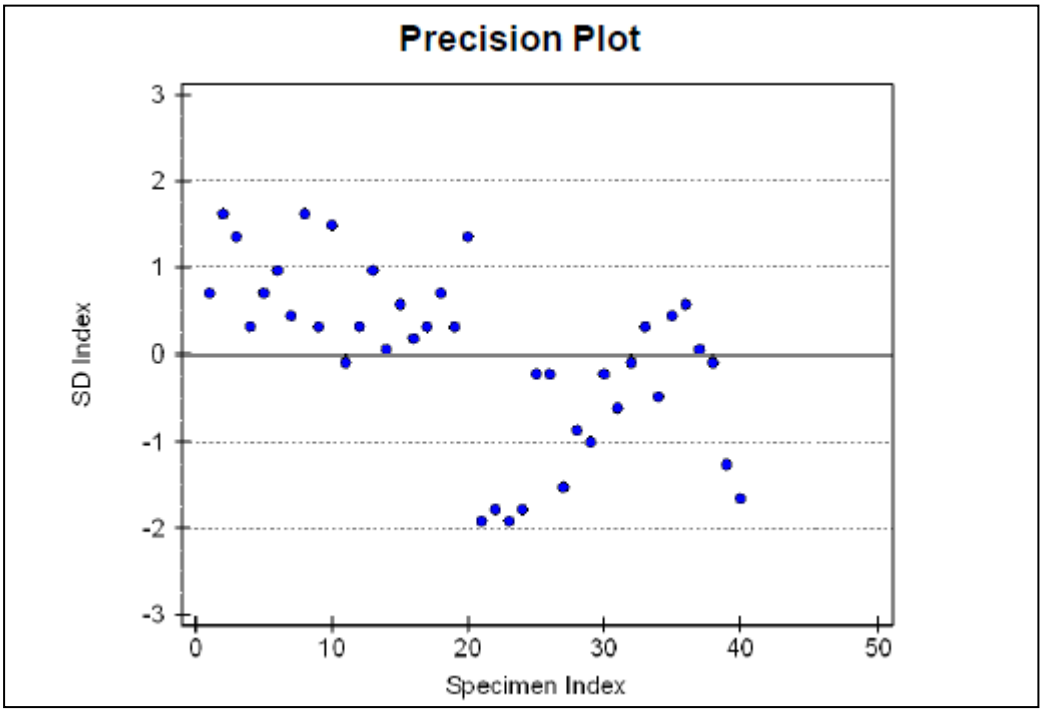


Grafik 4.10. 500 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.10'da gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.11'de gösterilmektedir.

Tablo 4.10. 200 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	196,6 ug/L	95% Confidence for Mean	194,2 to 199,1
Standard Deviation (SD)	7,6	2 SD Range	181,3 to 211,9
95% Confidence for SD	6,3 to 9,8	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	3,9%	Number of Outliers	–

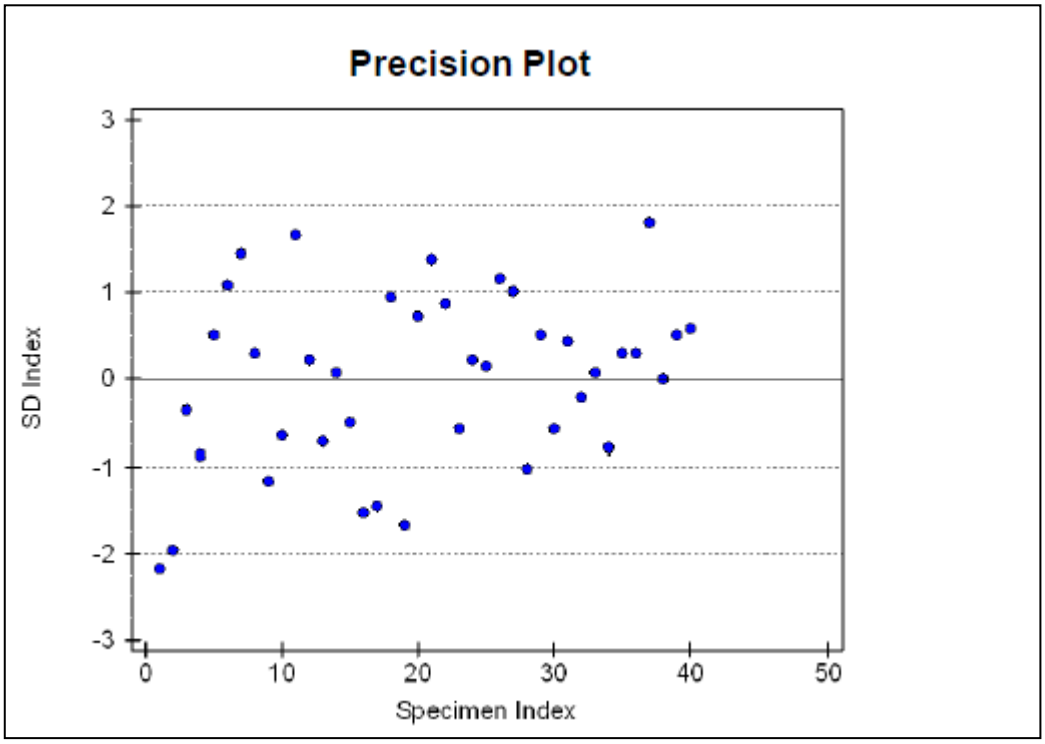


Grafik 4.11. 200 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.11'de gösterilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.12'de gösterilmektedir.

Tablo 4.11. 25 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	26,10 ug/L	95% Confidence for Mean	25,66 to 26,54
Standard Deviation (SD)	1,38	2 SD Range	23,34 to 28,86
95% Confidence for SD	1,13 to 1,77	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	5,3%	Number of Outliers	–



Grafik 4.12. 25 µg/L kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı

Kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.12'de görülmektedir.

Tablo 4.12. Kortizol gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

Konsantrasyon(µg/L)	**Ortalama**	**SD**	**%CV**
500	502.5	5.8	1.1
200	196.6	7.6	3.9
25	26.10	1.38	5.3

Gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışmasında 500 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD değeri 5.8, % CV 1.1, 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 7.6, % CV: 3.9, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.38, % CV:

5.3'tür. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için izin verilen total hata % 22.8 olarak verilmiştir. Çalışma içi SD<0.25 TE olması gerekmektedir.

500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 500×0.228=114 µg/L'dir. İzin verilen SD: 114÷4= 28.5'dir. 5.8<28.5 olduğu için, 500 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.30=45.6 µg/L'dir. İzin verilen SD: 45.6÷4=11.4'dir. 7.6<11.4 olduğu için 200µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

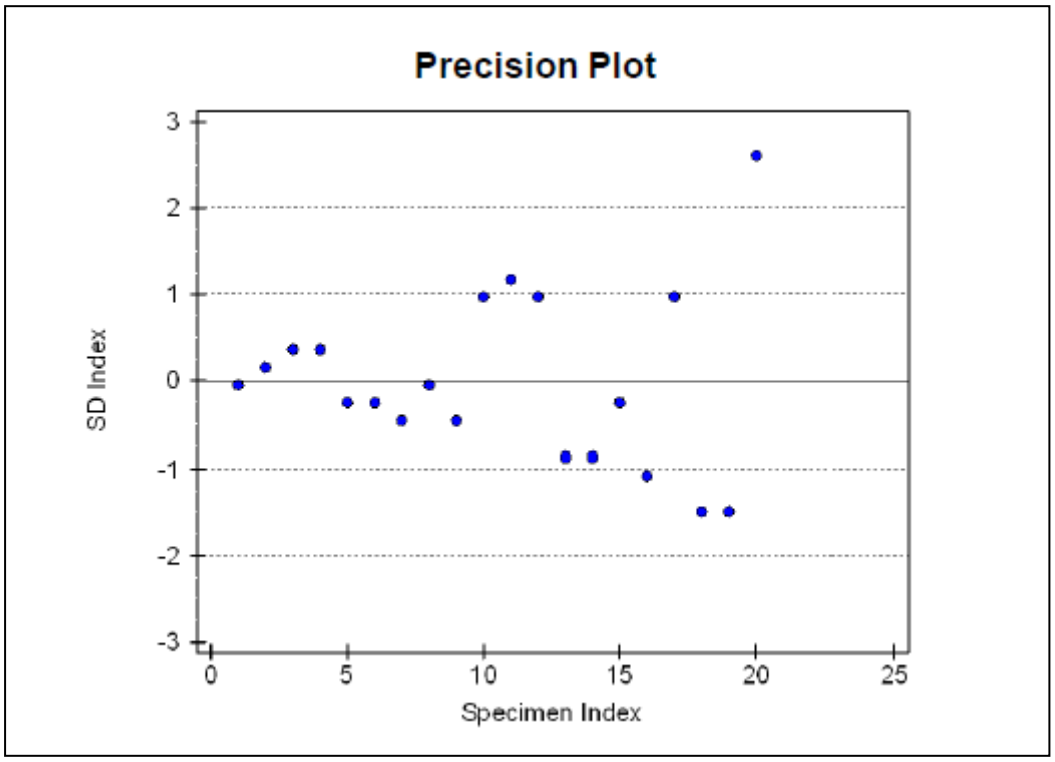
25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.228=5.7 µg/L'dir. İzin verilen SD: 5.7÷4=1.425'dir. 1.38< 1.425 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.3. Kortizol günlerarası kesinlik çalışması

Kortizol için 500, 200, 25 µg/L'lik konsantrasyonlar 20 gün boyunca günde ikişer defa okutulup, ortalamaları alınarak günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. 500 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.13'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.13'de gösterilmektedir.

Tablo 4.13. 500 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	496,3 ug/L	95% Confidence for Mean	494,0 to 498,5
Standard Deviation (SD)	4,9	2 SD Range	486,5 to 506,0
95% Confidence for SD	3,7 to 7,1	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	1,0%	Number of Outliers	–

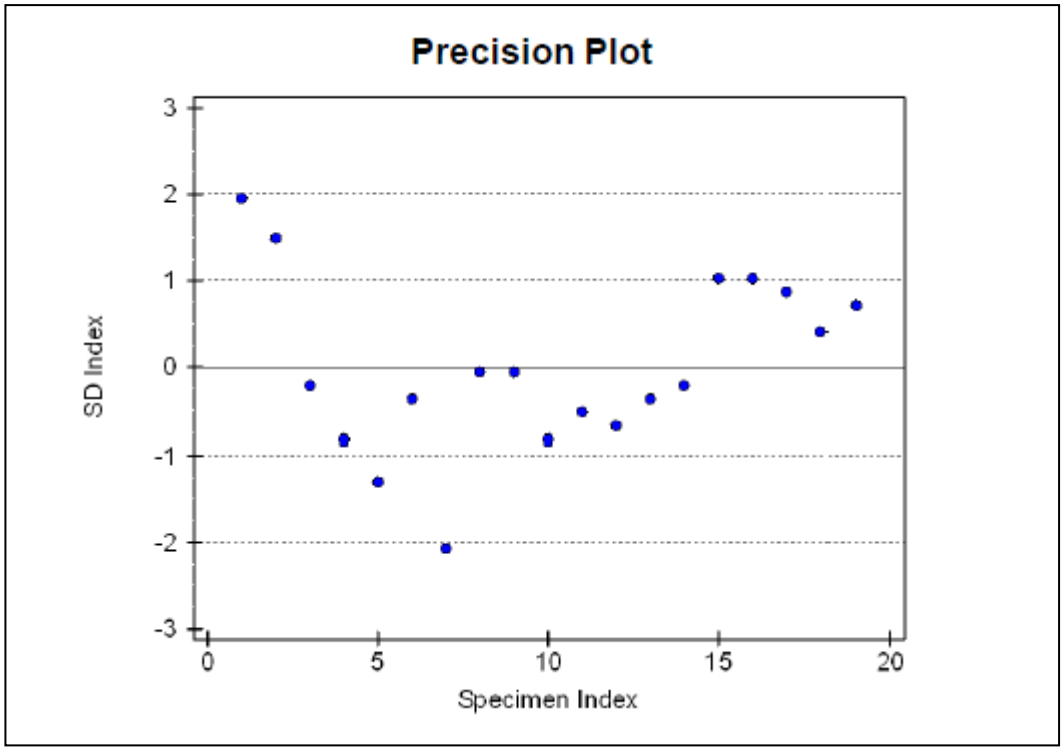


Grafik 4.13. 500 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.14'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.14'de gösterilmektedir.

Tablo 4.14. 200 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	199,4 ug/L	95% Confidence for Mean	196,3 to 202,5
Standard Deviation (SD)	6,5	2 SD Range	186,4 to 212,3
95% Confidence for SD	4,9 to 9,6	Number of Specimens (N)	19 of 19
Coefficient of Variation (CV)	3,2%	Number of Outliers	–

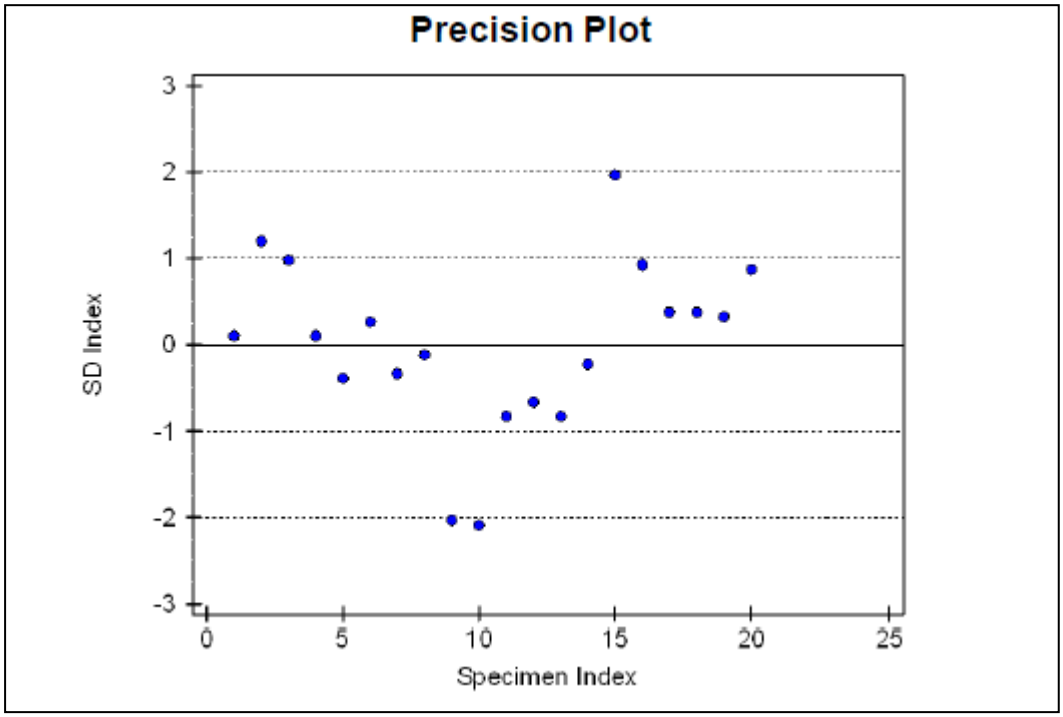


Grafik 4.14. 200 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.15'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.15'de gösterilmektedir.

Tablo 4.15. 25 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	23,91 ug/L	95% Confidence for Mean	23,06 to 24,76
Standard Deviation (SD)	1,82	2 SD Range	20,26 to 27,56
95% Confidence for SD	1,39 to 2,67	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	7,6%	Number of Outliers	–



Grafik 4.15. 25 µg/L kortizol günlerarası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

Kortizol günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasının sonuçları Tablo 4.16'te görülmektedir.

Tablo 4.16. Kortizol günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Konsantrasyon(µg/L)	Ortalama	SD	%CV
500	496	4.9	1
200	199.4	6.5	3.2
25	23.91	1.82	7.6

Günlerarası kesinlik çalışmasında 500 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD değeri 4.9, % CV 1, 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 6.5, % CV: 3.2, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.82, % CV: 7.6 olarak bulundu. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için izin verilen total hata % 22.8 olarak verilmiştir. Günler arası SD<0.33 TE olması gerekmektedir.

500 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 500×0.228=114 µg/L'dir. İzin verilen SD: 114÷3= 38'dir. 4.9<38 olduğu için, 500 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.228=45.6 µg/L'dir. İzin verilen SD: 45.6÷3=15.2'dir. 6.5<15.2 olduğu için 200 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

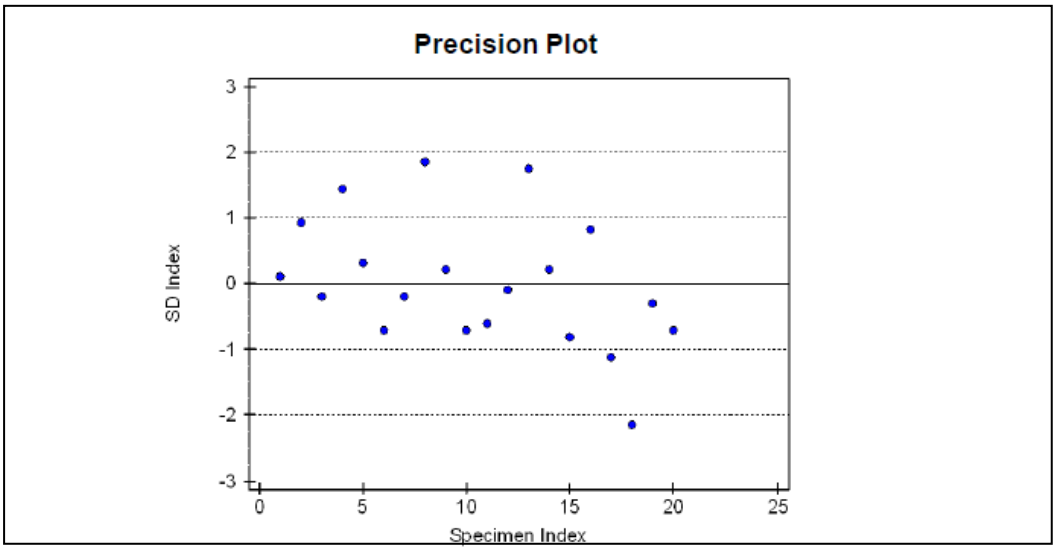
25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.228=5.7 µg/L'dir. İzin verilen SD: 5.7÷3=1.9'dir. 1.82<1.9 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda gün içi çalışmalar arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.4. Kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışması

Kortizon için 200, 25 ve 3.125 µg/L'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ard arda 20 defa okutuldu. 200 µg/L'lik konsantrasyon için çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.17'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.16'da gösterilmektedir.

Tablo 4.17. 200 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	197,9 ug/L	95% Confidence for Mean	193,4 to 202,5
Standard Deviation (SD)	9,7	2 SD Range	178,5 to 217,4
95% Confidence for SD	7,4 to 14,2	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	4,9%	Number of Outliers	–

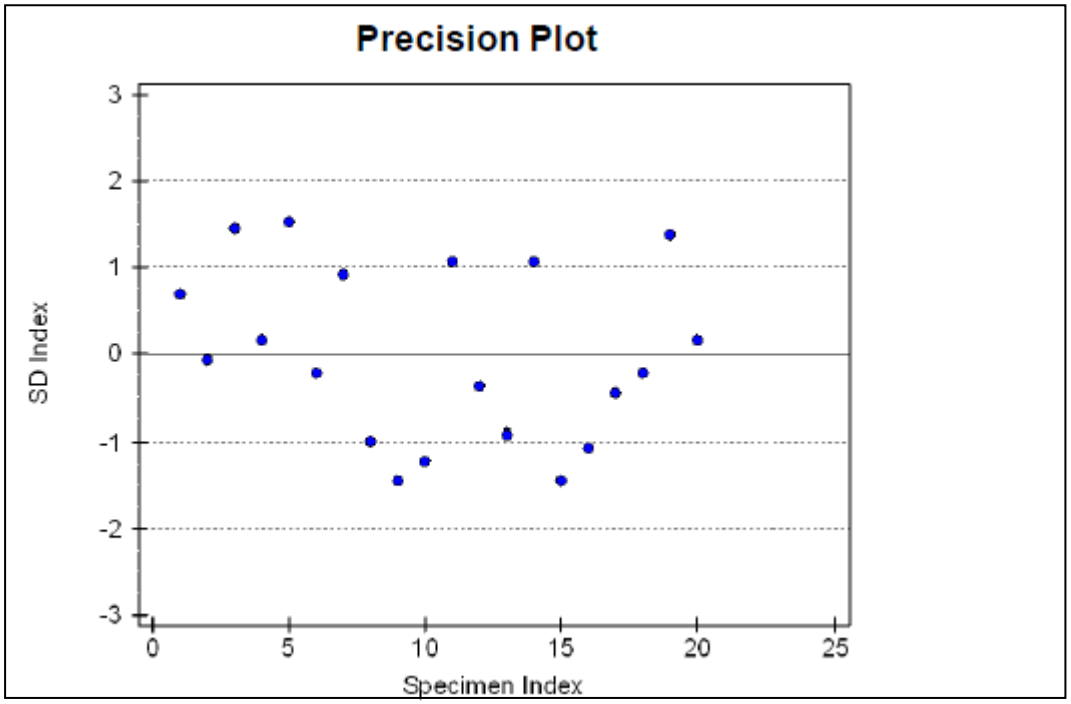


Grafik 4.16. 200 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik konsantrasyon için çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.18'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.17'de gösterilmektedir.

Tablo 4.18. 25 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	26,09 ug/L	95% Confidence for Mean	25,48 to 26,71
Standard Deviation (SD)	1,31	2 SD Range	23,47 to 28,72
95% Confidence for SD	1,00 to 1,92	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	5,0%	Number of Outliers	–

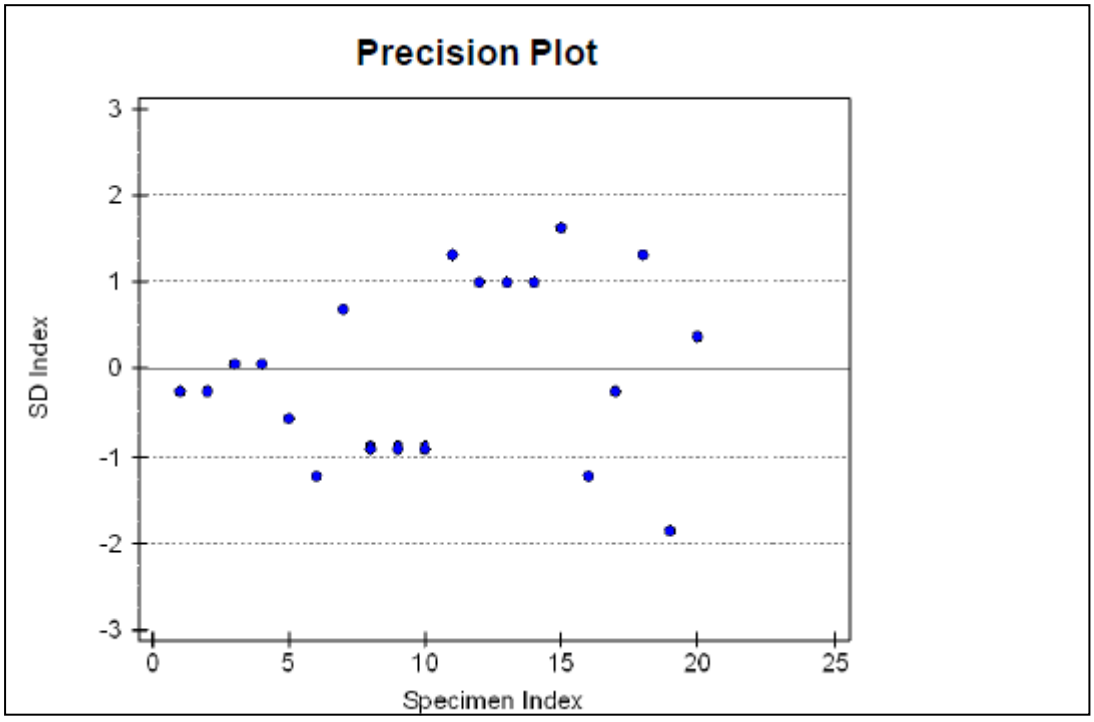


Grafik 4.17. 25 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

3.125 µg/L'lik konsantrasyon için çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.19'da verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.18'de gösterilmektedir.

Tablo 4.19. 3.125 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	3,148 ug/L	95% Confidence for Mean	3,134 to 3,163
Standard Deviation (SD)	0,032	2 SD Range	3,085 to 3,212
95% Confidence for SD	0,024 to 0,046	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	1,0%	Number of Outliers	–



Grafik 4.18. 3.125 µg/L kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200, 25 ve 3.125 µg/L'lik kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4.20'de verilmektedir.

Tablo 4.20. Kortizon çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Konsantrasyon(µg/L)	Ortalama	SD	%CV
200	197.9	9.7	4.9
25	26.09	1.31	5
3.125	3.148	0.032	1

Kortizon çalışma içi kesinlik çalışmasında 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 9.7, % CV: 4.9, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.31, % CV: 5, 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:0.032, % CV:1'dir.

Genel olarak hormonlar için bildirilen kabul edilebilir analitik performans kriteri hedef değerin % 20-25'idir.

Kortizon için ortalama değerimizin % 25'ini izin verilebilir hata kabul edersek 200'ün % 25'i olan 50 µg/Lizin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, Ea'nın ¼'dür. 50 ÷4 = 12.5'dir. $9.7 < 12.5$ olduğu için 200 µg/L kortizon için çalışma içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.25=6.25 µg/L'dir. İzin verilen SD: 6.25÷4=1.56'dır. 1.31<1.56 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

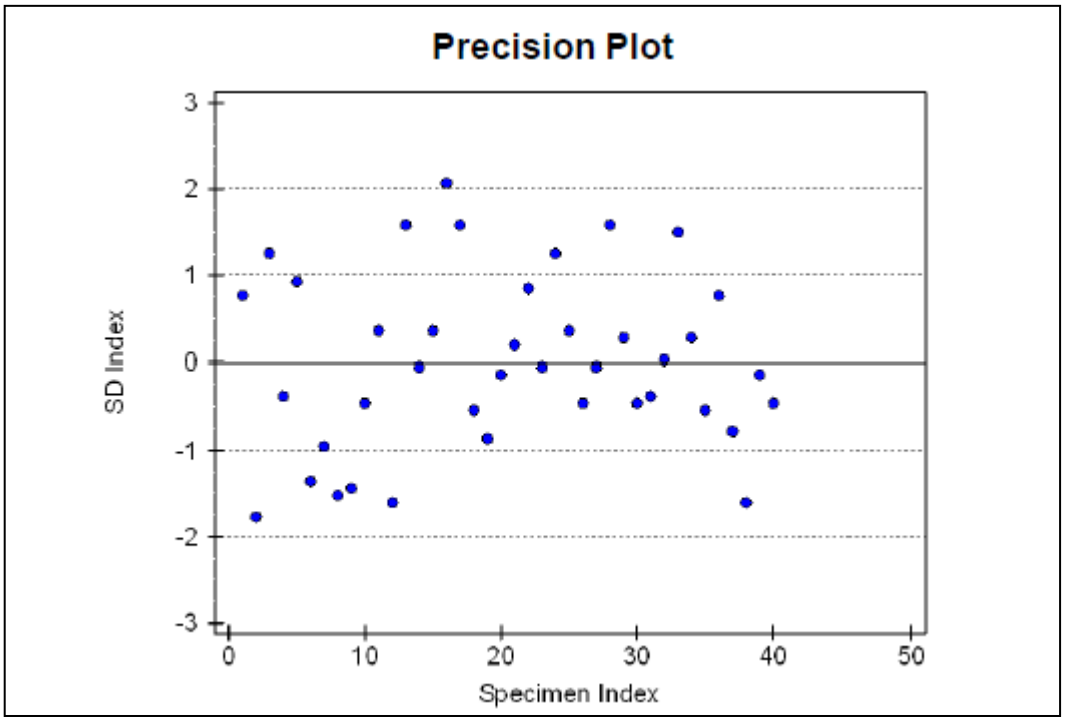
3.125 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 3.125×0.25=0.78 µg/L'dir. İzin verilen SD: 0.78÷4=0.195'dır. 0.032<0.195 olduğu için 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.3.5. Kortizon gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışması

Kortizon için 200, 25 ve 3.125 µg/L'lik konsantrasyonlar öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere aynı çalışma içinde ard arda 20'şer defa okutuldu. 200 µg/L'lik kortizol konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.21'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.19'da gösterilmektedir.

Tablo 4.21. 200 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	196,6 ug/L	95% Confidence for Mean	192,7 to 200,5
Standard Deviation (SD)	12,3	2 SD Range	172,1 to 221,1
95% Confidence for SD	10,0 to 15,7	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	6,2%	Number of Outliers	–

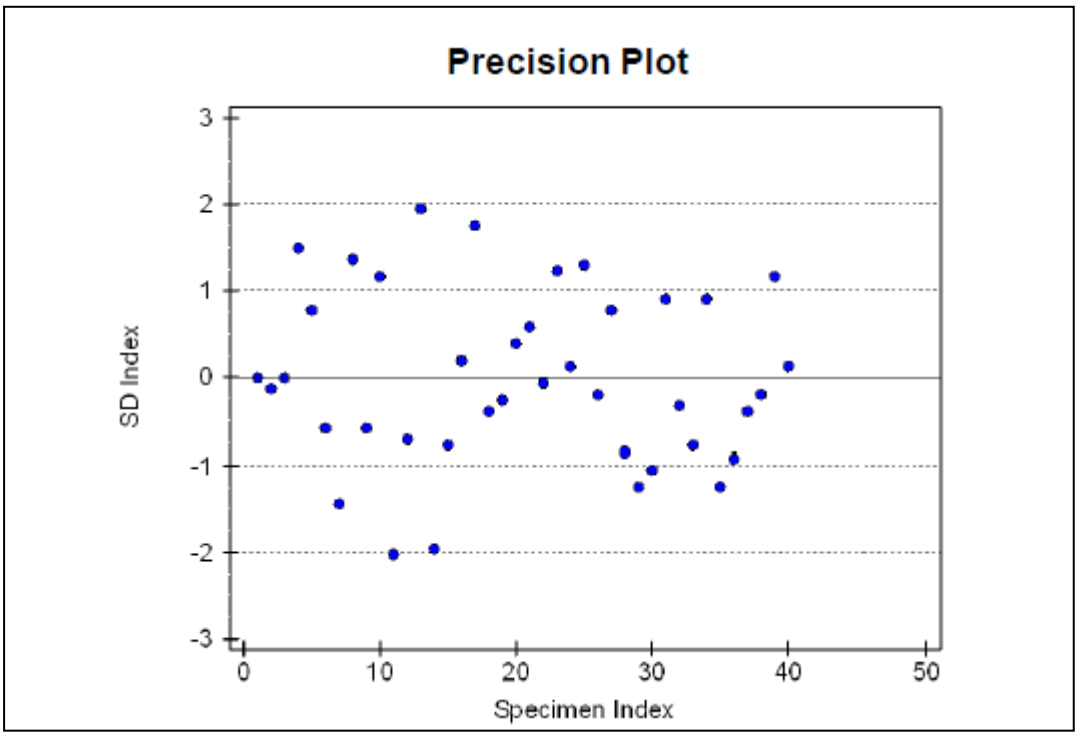


Grafik 4.19. 200 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik kortizon konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.22'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.20'de gösterilmektedir.

Tablo 4.22. 25 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	26,11 ug/L	95% Confidence for Mean	25,62 to 26,60
Standard Deviation (SD)	1,54	2 SD Range	23,03 to 29,18
95% Confidence for SD	1,26 to 1,97	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	5,9%	Number of Outliers	–

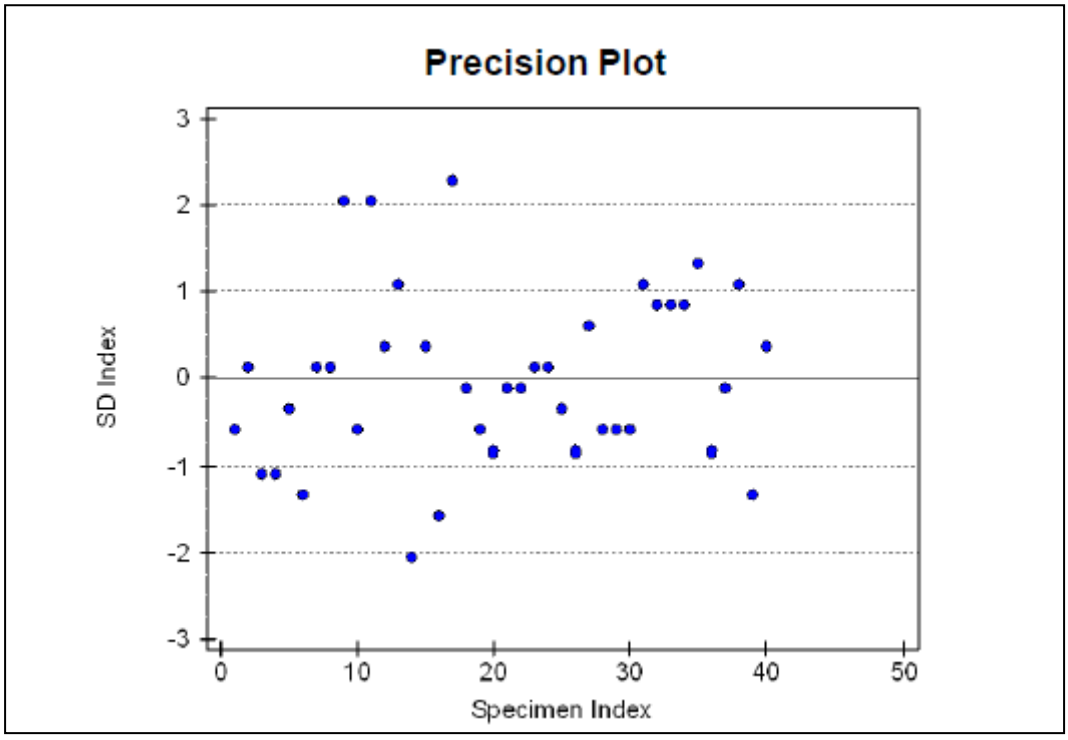


Grafik 4.20. 25 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

3.125 µg/L'lik kortizon konsantrasyonun gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.23'te verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.21'de gösterilmektedir.

Tablo 4.23. 3.125 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	3,145 ug/L	95% Confidence for Mean	3,132 to 3,158
Standard Deviation (SD)	0,042	2 SD Range	3,062 to 3,228
95% Confidence for SD	0,034 to 0,053	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	1,3%	Number of Outliers	–



Grafik 4.21. 3.125 µg/L kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200, 25, 3.125 µg/L'lik kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik çalışması sonuçları Tablo 4.24'te verilmektedir.

Tablo 4.24. Kortizon gün içi çalışmalar arası tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konsantrasyon(µg/L)	Ortalama	SD	%CV
200	196.6	12.3	6.2
25	26.11	1.54	5.9
3.125	3.145	0.042	1.3

Kortizon gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışmasında 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 12.3, % CV: 6.2, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.54, % CV: 5.9, 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:0.042, % CV:1.3'dür.

Kortizon için ortalama değerimizin % 25'ini izin verilebilir hata kabul edersek 200'ün % 25'i olan 50 µg/L izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, Ea'nın ¼'dür. 50 ÷4 = 12.5'dir. 12.3<12.5 olduğu için 200 µg/L kortizon için çalışma içi kesinlik değeri kabul edilebilir düzeydedir.

25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.25=6.25 µg/L'dir. İzin verilen SD: 6.25÷4=1.56'dır. 1.54<1.56 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

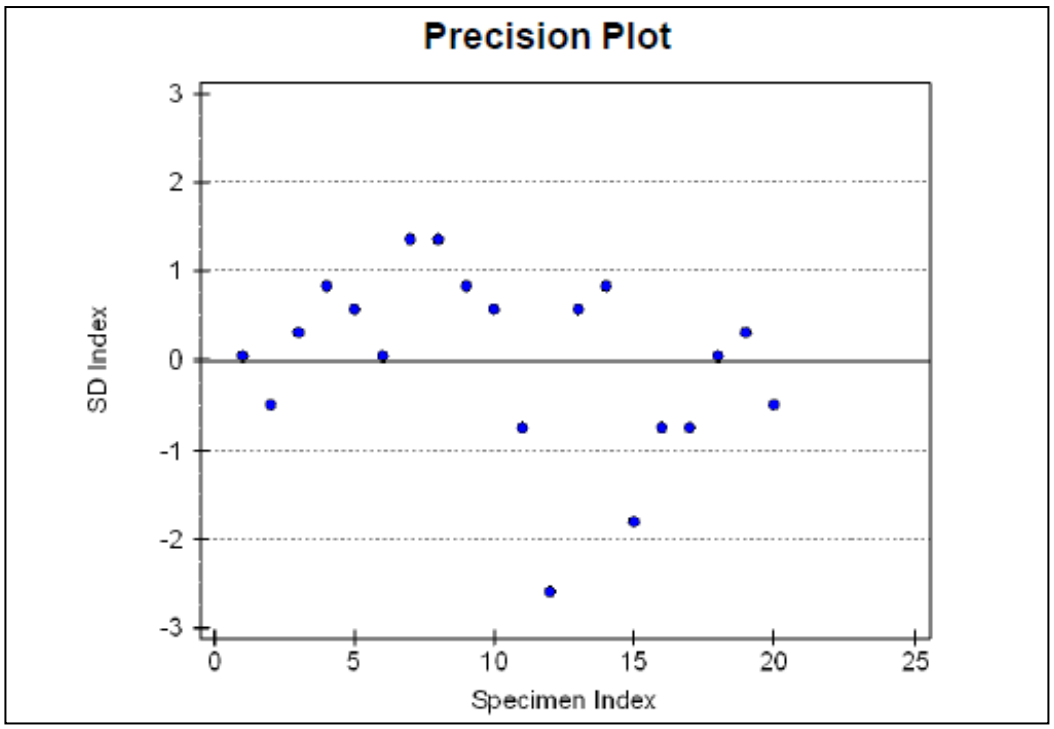
3.125 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 3.125×0.25=0.78 µg/L'dir. İzin verilen SD: 0.78÷4=0.195'dır. 0.042<0.195 olduğu için 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir

4.3.6. Kortizon günler arası kesinlik çalışması

Kortizon için 200, 25 ve 3.125 µg/L'lik konsantrasyonlar 20 gün boyunca günde ikişer defa okutulup, ortalamaları alınarak günler arası tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirildi. 200 µg/L'lik kortizon konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.25'te verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.22'de gösterilmektedir.

Tablo 4.25. 200 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	201,8 ug/L	95% Confidence for Mean	200,1 to 203,6
Standard Deviation (SD)	3,8	2 SD Range	194,2 to 209,5
95% Confidence for SD	2,9 to 5,6	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	1,9%	Number of Outliers	–

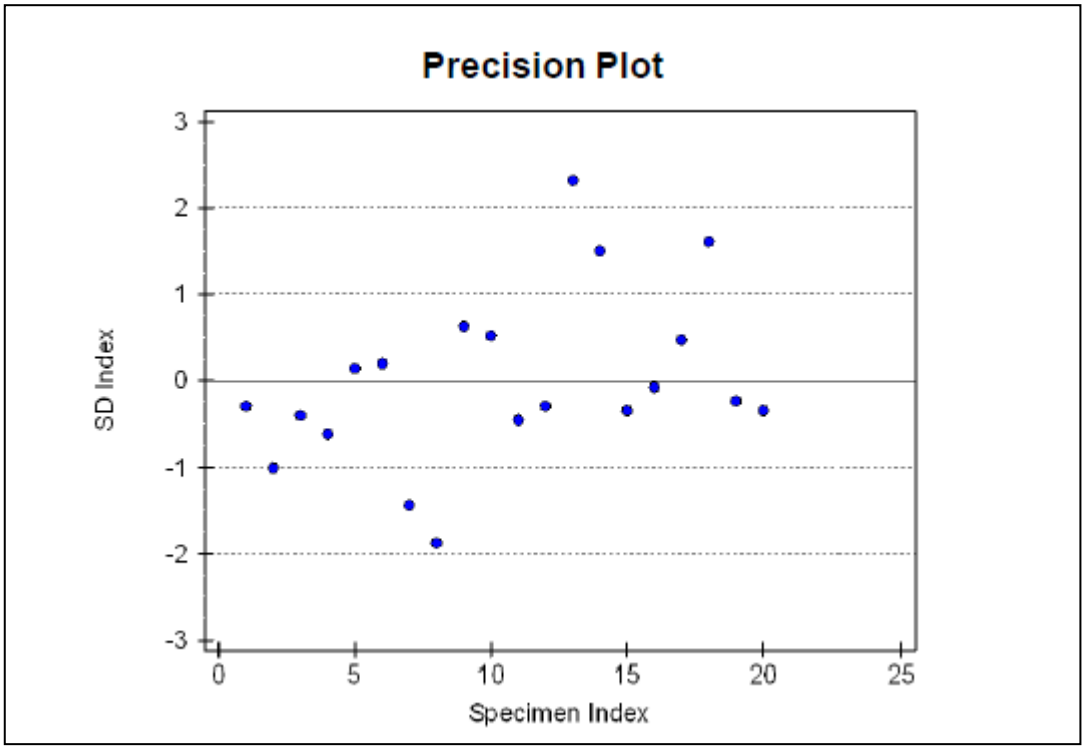


Grafik 4.22. 200 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

25 µg/L'lik kortizon konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.26'da verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.23'de gösterilmektedir.

Tablo 4.26. 25 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

Precision Statistics			
Mean	26,04 ug/L	95% Confidence for Mean	25,18 to 26,90
Standard Deviation (SD)	1,84	2 SD Range	22,37 to 29,71
95% Confidence for SD	1,40 to 2,68	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	7,1%	Number of Outliers	–

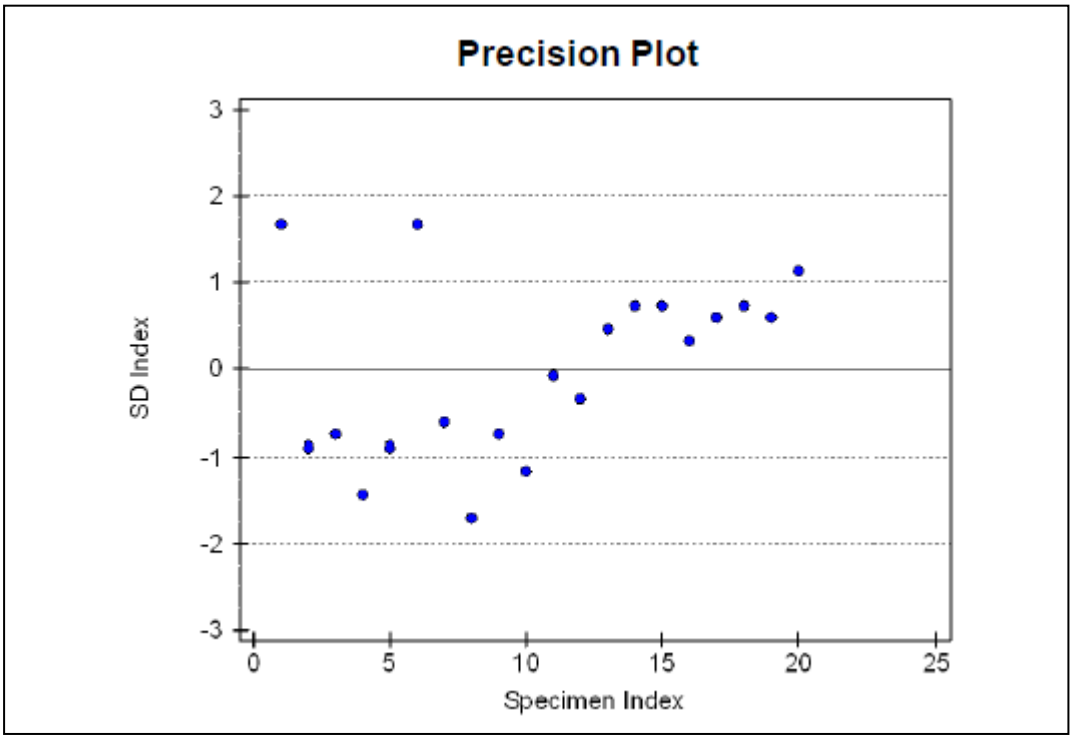


Grafik 4.23. 25 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

3.125 µg/L'lik kortizon konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma verileri Tablo 4.27'de verilmektedir. Aynı numunenin 2SD aralığındaki dağılımı Grafik 4.24'te gösterilmektedir.

Tablo 4.27. 3.125 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları.

Precision Statistics			
Mean	3,116 ug/L	95% Confidence for Mean	3,081 to 3,151
Standard Deviation (SD)	0,074	2 SD Range	2,968 to 3,264
95% Confidence for SD	0,056 to 0,108	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	2,4%	Number of Outliers	–



Grafik 4.24. 3.125 µg/L kortizon günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

200, 25, 3.125 µg/L'lik kortizon konsantrasyonlarının günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 4. 28'de verilmektedir.

Tablo 4.28. Kortizon günler arası tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları

Konsantrasyon(µg/L)	Ortalama	SD	%CV
200	201.8	3.8	1.9
25	26.04	1.84	7.1
3.125	3.116	0.074	2.4

Kortizon günler arası kesinlik çalışmasında 200 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD: 3.8, % CV: 1.9, 25 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:1.84, % CV: 7.1, 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda elde ettiğimiz SD:0.074, % CV:2.4'tür.

Kortizon için ortalama değerimizin % 25'ini izin verilebilir hata kabul edersek günler arası SD<0.33 TE olması gerekmektedir.

200 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 200×0.25=50 µg/L'dir. İzin verilen SD: 50÷3=16.7'dir. 3.8<16.7 olduğu için 200 µg/L'lik konsantrasyonda günler arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

25 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 25×0.25=6.25 µg/L'dir. İzin verilen SD: 6.25÷3=2.08'dir. 1.84<2.08 olduğu için 25 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

3.125 µg/L'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 3.125×0.25=0.78 µg/L'dir. İzin verilen SD: 0.78÷3=0.26'dır. 0.074<0.26 olduğu için 3.125 µg/L'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

4.4. Geri elde çalışması

Kortizol için 200, 50 ve 12.5 µg/L'lik standartlar ile yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Tablo 4.29.'da görülmektedir. Yüzde geri elde edilen oran ise geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplandı.

Tablo 4.29. Kortizol geri elde deney sonuçları.

	Ölçülen değer(µg/L)	Eklenen konsantrasyon(µg/L)	Geri elde değeri(µg/L)	% Recovery
Serum havuzu+BSA	45.6	-		
Serum havuzu+ 200µg/L	65.8	20	20.2	101
Serum havuzu+50 µg/L	50.4	5	4.8	96
Serum havuzu+12.5 µg/L	47	1.25	1.4	112

Kortizol için yapılan geri elde çalışmasında 3 konsantrasyon için % geri elde ortalaması %103 olarak bulundu.

Kortizon için 200, 50 ve 12.5 µg/L'lik standartlar ile yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Tablo 4.30.'da görülmektedir. Yüzde geri elde edilen oran ise

geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplandı.

Tablo 4.30. Kortizon geri elde deney sonuçları.

	Ölçülen değer(µg/L)	Eklenen konsantrasyon(µg/L)	Geri elde değeri (µg/L)	% Recovery
Serum havuzu+BSA	12			
Serum havuzu+200µg/L	32.5	20	20.5	102.5
Serum havuzu+50 µg/L	16.9	5	4.9	98
Serum havuzu+12.5 µg/L	13.2	1.25	1.2	96

Kortizon için yapılan geri elde çalışmasında 3 konsantrasyon için % geri elde ortalaması %98.8 olarak bulundu.

4.5. İnterferans çalışması

Kortizol ve 11 deoksikortizol ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.31'de gösterilmektedir.

Tablo 4.31. Kortizol-11 deoksikortizol interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksek serum havuzu(µg/L)
BSA	45	BSA	145
D1	43.8	Y1	157
D1	45.2	Y1	140
D1	37.2	Y1	147
D2	52	Y2	149
D2	47.1	Y2	145
D2	46.1	Y2	135
D3	42.3	Y3	147
D3	45.2	Y3	134
D3	48.5	Y3	137
D4	41.7	Y4	138
D4	46.8	Y4	133
D4	45.1	Y4	149
D5	43.8	Y5	139
D5	44.1	Y5	142
D5	41.1	Y5	129

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %4.4 , Y5 için %5.7 olarak tespit edildi. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10.26 olarak verilmiştir. Her iki düzey için en yüksek konsatrasyonda interferan içeren tüplerde elde edilen % bias %10.26'dan daha düşük olduğu için kortizol ve 11-deoksikortizol ile yapılan interferans çalışmasında interferansın bulunmadığı tespit edildi.

Kortizol ve prednizolon ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.32'de gösterilmektedir.

Tablo 4.32. Kortizol prednizolon interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksek serum havuzu(µg/L)
BSA	43.4	BSA	227
D1	41.6	Y1	222
D1	41.1	Y1	236
D1	38.1	Y1	235
D2	40.5	Y2	217
D2	41.6	Y2	238
D2	43.5	Y2	244
D3	41.9	Y3	239
D3	36.5	Y3	228
D3	40.7	Y3	222
D4	41.6	Y4	232
D4	42.1	Y4	232
D4	43.7	Y4	237
D5	40	Y5	235
D5	41.4	Y5	241
D5	40	Y5	250

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. Tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %6.9 , Y5 için %6.6 olarak tespit edildi. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10.26 olarak verilmiştir. Her iki düzey için en yüksek konsatrasyonda interferan içeren tüplerde elde edilen % bias %10.26'dan daha düşük olduğu için kortizol ve prednizolon ile yapılan interferans çalışmasında interferansın bulunmadığı tespit edildi.

Kortizol ve kolesterol ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.33'de gösterilmektedir.

Tablo 4.33. Kortizol kolesterol interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksekserum havuzu(µg/L)
BSA	25	BSA	150
D1	27.8	Y1	165
D1	26.9	Y1	119
D1	27.6	Y1	150
D2	25.9	Y2	134
D2	25.1	Y2	138
D2	28.4	Y2	162
D3	23.7	Y3	132
D3	23.3	Y3	147
D3	23.5	Y3	136
D4	25.9	Y4	161
D4	25.6	Y4	151
D4	27.5	Y4	161
D5	30.1	Y5	148
D5	28.1	Y5	150
D5	29.9	Y5	138

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. Tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %6.8 , Y5 için % 3.1 olarak tespit edildi. Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10.26 olarak verilmiştir. Her iki düzey için en yüksek konsatrasyonda interferan içeren tüplerde elde edilen % bias, %10.26'dan daha düşük olduğu için kortizol ve kolesterol ile yapılan interferans çalışmasında interferansın bulunmadığı tespit edildi.

Kortizon ve aldosteron ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.34'te gösterilmektedir.

Tablo 4.34. Kortizon aldosteron interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksek serum havuzu(µg/L)
BSA	8	BSA	12
D1	8.29	Y1	12.6
D1	7.4	Y1	10.8
D1	7.25	Y1	12.1
D2	7.96	Y2	12.3
D2	6.33	Y2	12.2
D2	8.44	Y2	11.8
D3	7.2	Y3	11.3
D3	7.77	Y3	11.8
D3	6.77	Y3	11.7
D4	8.33	Y4	11.7
D4	8.9	Y4	11.9
D4	7.66	Y4	12.4
D5	7.86	Y5	12.2
D5	8.06	Y5	12
D5	8.23	Y5	10.9

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. Tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %6.25 , Y5 için %2.5 olarak tespit edildi.

Kortizon ve kolesterol ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.35'Te gösterilmektedir.

Tablo 4.35. Kortizon kolesterol interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksek serum havuzu(µg/L)
BSA	9.42	BSA	26.3
D1	9.84	Y1	23.1
D1	10.5	Y1	23.7
D1	10.2	Y1	24.8
D2	9.77	Y2	25.6
D2	8.19	Y2	25.7
D2	9.22	Y2	24
D3	9.08	Y3	24.8
D3	6.9	Y3	27.8
D3	8.26	Y3	21.7
D4	8.27	Y4	21.9
D4	8.24	Y4	27.9
D4	8.81	Y4	24.3
D5	10.4	Y5	24.9
D5	10.5	Y5	26.5
D5	9.14	Y5	27.9

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. Tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %6.2 , Y5 için %2.6 olarak tespit edildi.

Kortizon ve 11deoksikortizol ile yapılan interferans çalışma sonuçları Tablo 4.36'da gösterilmektedir.

Tablo 4.36. Kortizon 11 deoksikortizol interferans deney sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu(µg/L)	Tüpler	Yüksekserum havuzu(µg/L)
BSA	13.5	BSA	24.6
D1	14.5	Y1	26.2
D1	14.5	Y1	26.7
D1	14.3	Y1	26.4
D2	15	Y2	28.4
D2	13.2	Y2	24.2
D2	14	Y2	24.4
D3	14.9	Y3	24.2
D3	15.7	Y3	23.6
D3	14.3	Y3	24.3
D4	14.1	Y4	26.1
D4	14.3	Y4	24.4
D4	13.3	Y4	23.7
D5	14.6	Y5	24.9
D5	14.8	Y5	23.6
D5	13.6	Y5	23

Düşük ve yüksek serum havuzundaki 5. Tüplerin okumalarının ortalaması alınarak (her iki seviye için de en yüksek interferan içeren tüp) % biasları hesaplandı. D5 için %5.9, Y5 için %3.2 olarak tespit edildi.

4.6. Referans aralık doğrulama çalışması

Öğleden önce ve öğleden sonra olmak üzere 20 sağlıklı kişiden kan örnekleri alınarak yapılan çalışma sonuçları Mayo Medical Laboratuvarı kortizol referans aralıkları ile karşılaştırıldı.(http://www.mayomedicallaboratories.com/ Erişim tarihi 2014).

Mayo Medical Laboratuvarı kortizol referans aralıkları;

öğleden önce:5-25 µg/dL

öğleden sonra:2-14 µg/dL

Öğleden önce ve öğleden sonra kortizol referans aralık doğrulama sonuçları Tablo 4.37'de görülmektedir.

Tablo 4.37. Öğleden önce kortizol referans aralık doğrulama sonuçları.

Öğleden önce kortizol(µg/dL)	Öğleden sonra kortizol(µg/dL)
6,09	3,39
8,71	2,33
11,2	2,94
5,63	2,93
9,17	5,84
7,13	5,75
13,7	3,68
9,1	3,38
10,2	3,79
5,55	8,45
7,52	4,48
7,75	6,62
5,2	3,95
7,76	2,5
11,6	5,03
10,7	3,46
11,6	6,54
16,8	**14,8**
6,24	6,6
5,17	3,11

Yapılan referans aralığı doğrulama çalışmasında öğleden önce çalışılan tüm sonuçlar referans aralığının içindedir. Uyumsuzluk oranı % 0 olarak tespit edilmiş olup, öğleden önce referans aralığımız uyumlu bulundu. Öğleden sonra çalışılan 20 sonuçtan sadece 1 tanesi referans aralığının dışındadır. Uyumsuzluk oranı %5 olarak tespit edilmiş olup, öğleden sonra referans aralığımız da uyumlu bulundu.

4.7 Taşıma (carryover) çalışması

Kortizol için yapılan taşıma çalışmasının sonuçları Tablo 4.38'de gösterilmektedir.

Tablo 4.38. Kortizol taşıma deney sonuçları.

Carryover Analysis			
High-Low Mean	0,7296	Error Limit	0,8382
Low-Low Mean	0,7552	Passes?	Yes
Carryover	-0,0256		

Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	0,589		
L2	0,342	0,342	
L3	0,69	0,69	
H1	192		
H2	228		
L4	0,837		0,837
H3	201		
H4	213		
L5	0,695		0,695
L6	1,06	1,06	
L7	0,963	0,963	
L8	0,721	0,721	
H5	204		
H6	225		
L9	0,668		0,668
H7	213		
H8	204		
L10	0,668		0,668
H9	206		
H10	201		
L11	0,78		0,78
Mean		**0,7552**	**0,7296**
SD		**0,2794**	**0,0756**

Kortizol için yapılan taşınma çalışması EP-evaluator analizi ile değerlendirildiğinde, -0.0256 olarak tespit edildi.

Kortizon için yapılan taşıma çalışmasının sonuçları Tablo 4.39'da gösterilmektedir.

Tablo 4.39. Kortizon taşıma deney sonuçları.

Carryover Analysis

High-Low Mean	1,0760	Error Limit	0,1999
Low-Low Mean	0,9302	Passes?	Yes
Carryover	0,1458		

Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	0,865		
L2	0,972	0,972	
L3	0,922	0,922	
H1	215		
H2	225		
L4	1,22		1,22
H3	224		
H4	215		
L5	1,15		1,15
L6	0,857	0,857	
L7	0,880	0,880	
L8	1,02	1,02	
H5	181		
H6	195		
L9	1,09		1,09
H7	202		
H8	188		
L10	1,06		1,06
H9	187		
H10	187		
L11	0,86		0,86
Mean		**0,9302**	**1,0760**
SD		**0,0666**	**0,1354**

Kortizon için yapılan taşınma çalışması EP-evaluator analizi ile değerlendirildiğinde , 0. 1458 olarak tespit edildi.

4.8. Numune stabilite çalışması

Kortizol için numune stabilitesinin tespiti için yapılan çalışmanın sonuçları (µg/L) ve ölçümler arasında hesaplanan % biaslar Tablo 4.40'da görülmektedir.

Tablo 4.40. Kortizol numune stabilite çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar.

1.ölçüm (1.gün)	2. ölçüm (15.gün)	3. ölçüm (30. gün)	4. ölçüm (45. gün)	15. gün % bias	30. gün % bias	45. gün % bias
25.1	27.64	23.2	28.2	10.1	7.5	12.3
36.2	38.3	43.6	44.3	5.4	20.4	22
143	149.7	154	152	6.4	7.69	6.2

Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10.26 olarak verilmiştir. Kortizol için 3 seviye ile yapılan numune stabilitesi çalışmasında 30. günde numune stabilitesinin bozulduğu tespit edildi.

Kortizon için numune stabilitesinin tespiti için yapılan çalışmanın sonuçları µg/L) ve ölçümler arasında hesaplanan % biaslar Tablo 4.41'da görülmektedir.

Tablo 4.41. Kortizon numune stabilite çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar.

1. ölçüm (1.gün)	2. ölçüm (15. gün)	3.ölçüm (30. gün)	4. ölçüm (45.gün)	15. gün % bias	30. gün % bias	45. gün % bias
10.3	11.2	15.3	10.4	8.7	48	0.9
1.23	1.36	1.6	1.49	10.5	30	21
28.4	25.3	27.1	22.5	10.9	4.5	4.5

Kortizon için 3 seviye ile yapılan numune stabilitesi çalışmasında 30. günde numune stabilitesinin bozulduğu tespit edildi.

4.9. Dondurma ve çözmenin etkisinin belirlenmesi

Kortizol için dondurma çözmenin etkisini belirlemek için yapılan çalışmanın sonuçları ve ölçümler arasında hesaplanan % biaslar Tablo 4.42'de görülmektedir.

Tablo 4.42. Kortizol dordurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar.

	(µg/L)	1.okuma (µg/L)	2.okuma (µg/L)	3.okuma (µg/L)	4.okuma (µg/L)
Düşük serum havuzu	**52**	55.3	60.1	54	45.2
Yüksek serum havuzu	**155**	168	168	158	168
Düşük serum havuzu % bias		6.3	15	3.8	13
Yüksek serum havuzu % bias		8.3	8.3	1.9	8.3

Wesgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10.26 olarak verilmiştir. Kortizol için 2 seviye ile yapılan dondurma çözmenin etkisinin belirlenmesi çalışmasında 2. okumada bozulma tespit edildi.

Kortizon için dondurma çözmenin etkisini belirlemek için yapılan çalışmanın sonuçları ve ölçümler arasında hesaplanan % biaslar Tablo 4.43'te görülmektedir.

Tablo 4.43. Kortizon dordurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar.

	(µg/L)	1.okuma (µg/L)	2.okuma (µg/L)	3.okuma (µg/L)	4.okuma (µg/L)
Düşük serum havuzu	**18.2**	18.1	19.1	19.4	12.4
Yüksek serum havuzu	**26.5**	25.7	25.4	27.5	20.3
Düşük serum havuzu % bias		1	4.9	6.59	31
Yüksek serum havuzu % bias		3	4.10	3.77	23

Kortizon için 2 seviye ile yapılan dondurma çözmenin etkisinin belirlenmesi çalışmasında 4. okumada bozulma tespit edildi.

4.10. Matriks etkisi çalışması

Kortizol için yapılan matriks etkisi çalışma sonuçları Tablo 4.44' te görülmektedir.

Tablo 4.44. Kortizol matriks etkisi çalışma sonuçları.

	Pik alanı(caunts)	% Matriks etkisi
Mobil faz+500 µg/L kortizol standartı	1.23×10^5	8.1
Serum havuzu +500 µg/L kortizol standartı	1.33×10^5	
Mobil faz+ 125 µg/L kortizol standartı	3.86×10^4	7.5
Serum havuzu + 125 µg/L kortizol standartı	4.15×10^4	
Mobil faz+31.25µg/L kortizol standartı	9.51×10^3	-8.8
Serum havuzu+31.25 µg/L kortizol standartı	8.67×10^3	

$$\% \text{ Matriks etkisi} = \left(\frac{\text{Ektrakte edilen numunenin pik alanı}}{\text{Ektrakte edilmeyen numunenin pik alanı}} - 1\right)\times 100$$

Kortizol ve kortizon için % matriks etkisi yukarıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

Kortizol için % matriks hesabı;

500 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{1.33\times10^5}{1.23\times10^5}$ -1)×100= 8.1

125 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{4.15\times10^4}{3.86\times10^4}$ -1)×100= 7.5

31.25 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{8.67\times10^3}{9.51\times3}$ -1)×100= -8.8

Tablo 4.45. Kortizon matriks etkisi çalışma sonuçları.

	Pik alanı(caunts)	% Matriks etkisi
Mobil faz+200 µg/L kortizon standartı	2.30×10^4	4.7
Serum havuzu +200 µg/L kortizon standartı	2.41×10^4	
Mobil faz+ 100 µg/L kortizon standartı	1.09×10^4	-3.6
Serum havuzu + 100 µg/L kortizon standartı	1.05×10^4	
Mobil faz+25 µg/L kortizon standartı	3.42×10^3	6.7
Serum havuzu +25 µg/L kortizon standartı	3.65×10^3	

Kortizon için % matriks hesabı;

200 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{2.41\times10^4}{2.30\times10^4}$ -1)×100= 4.7

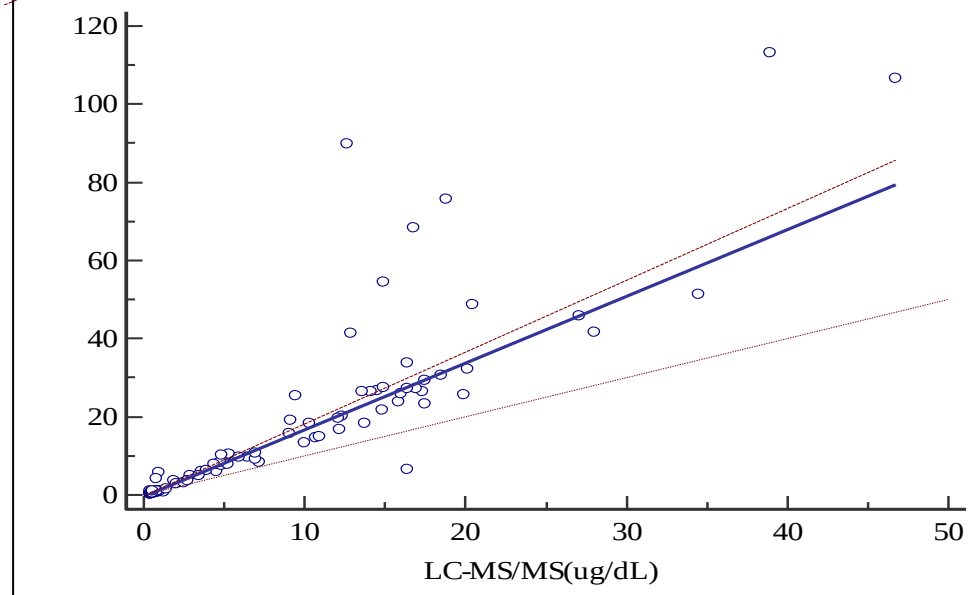
100 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{1.05\times10^4}{1.09\times10^4}$ -1)×100= -3.6

25 µg/L için % matriks etkisi=($\frac{3.65\times10^3}{3.42\times10^3}$ -1)×100= 6.7

4.11. Metot karşılaştırma çalışması

Üç yöntemle elde edilen idrar ve serum kortizol ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Aralarındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla regresyon analizi yapıldı. Üç ölçüm yönteminden elde edilen değerler MedCalc analiz programları ile değerlendirildi. Metotlar arasındaki uyum oranı Bland-Altman grafikleriyle gösterildi. Bland-Altman grafiği (farklar grafiği) Y eksenine iki ölçüm arasındaki fark, X eksenini de LC-MS/MS verileri yazılarak elde edildi.

Serum kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (Roche) yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.25., Grafik 4.26.'da gösterilmektedir.



Variable X	LC_MS_MS LC MS MS
Variable Y	IMMUNOASSAY

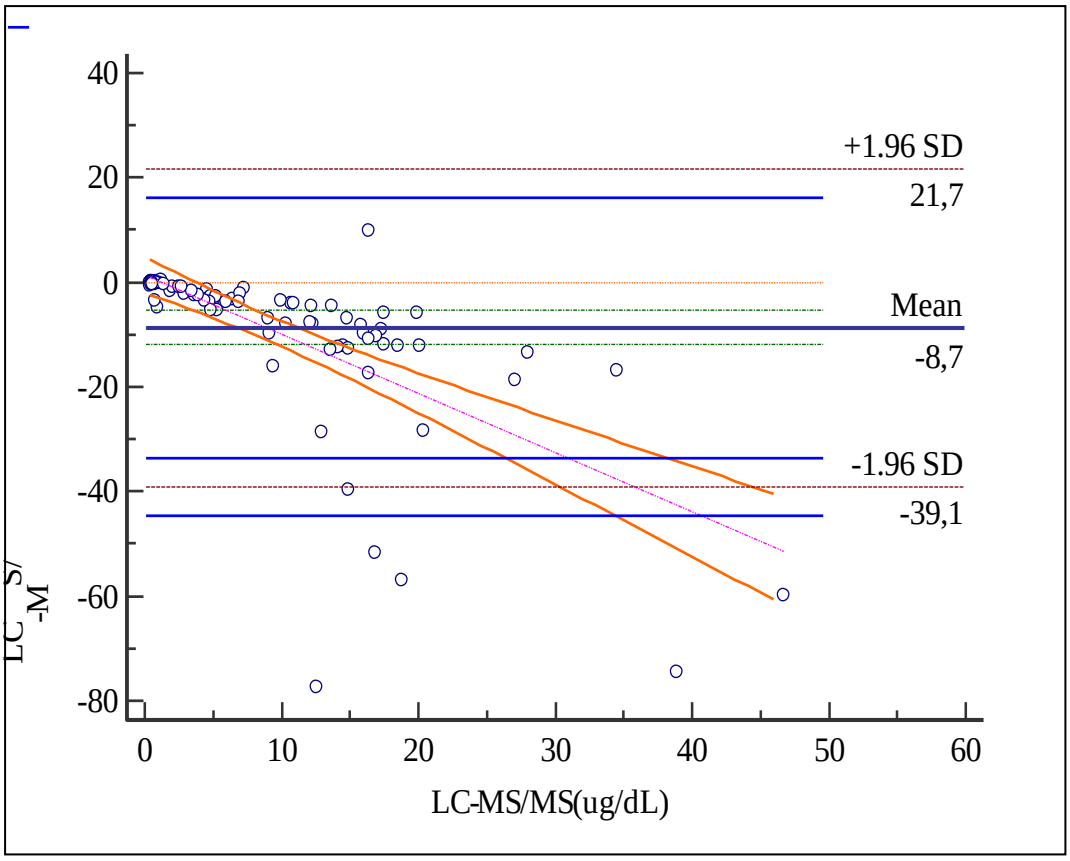
Sample size	89

	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,3570	0,3340
Highest value	46,7000	113,3000
Arithmetic mean	8,9261	17,6338
Median	5,3400	8,4900
Standard deviation	9,2105	22,7592
Standard error of the mean	0,9763	2,4125

Regression Equation

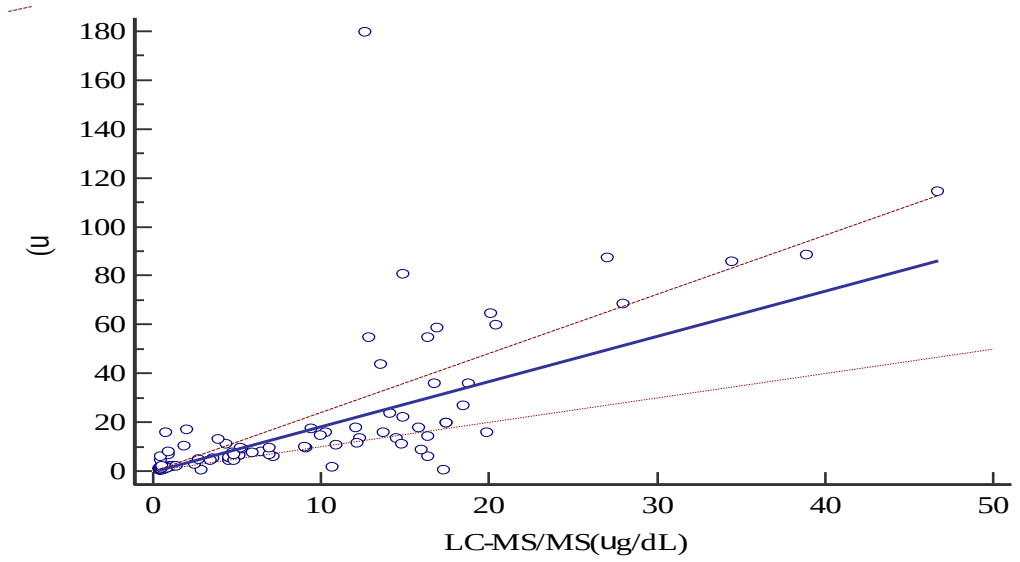
y = -0,404162 + 1,706048 x	
Systematic differences	
Intercept A	-0,4042
95% CI	-0,5933 to -0,2451
Proportional differences	
Slope B	1,7060
95% CI	1,6398 to 1,8396
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	12,5584
± 1.96 RSD Interval	-24,6144 to 24,6144
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,12)

Grafik 4.25. Serum kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.26. Serum kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği.

Serum kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.27.,Grafik 4. 28.'de gösterilmektedir.



Variable X	LC_MS_MS LC MS MS
Variable Y	ELISA

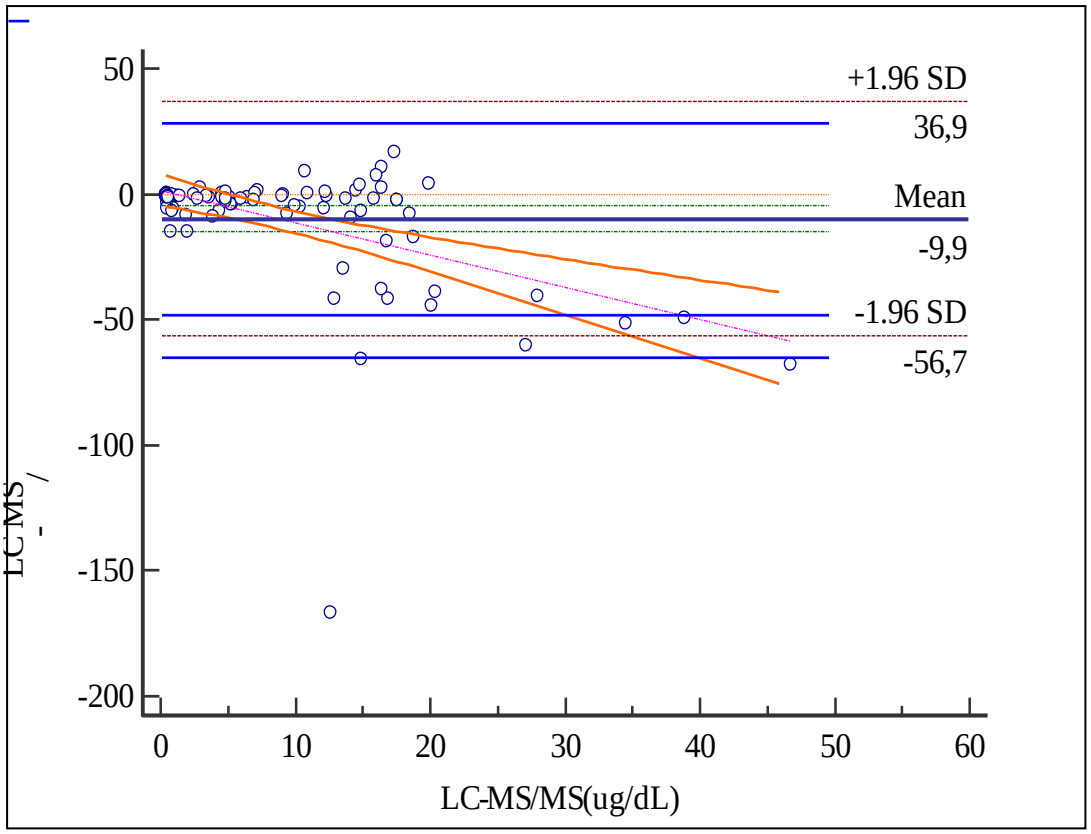
Sample size	89

	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,3570	0,2516
Highest value	46,7000	179,5700
Arithmetic mean	8,9261	18,8079
Median	5,3400	7,9039
Standard deviation	9,2105	29,5384
Standard error of the mean	0,9763	3,1311

Regression Equation

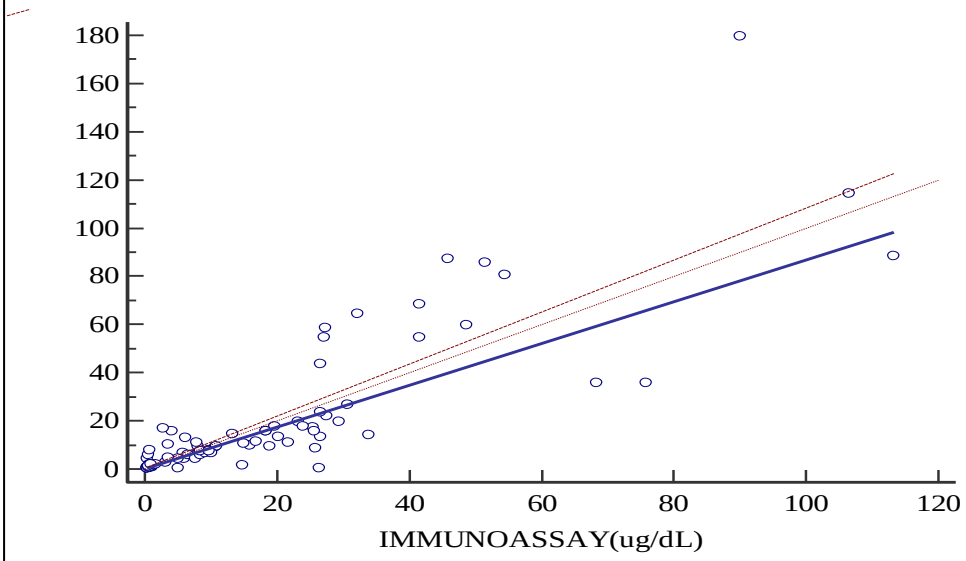
y = -0,421253 + 1,856257 x	
Systematic differences	
Intercept A	-0,4213
95% CI	-3,1303 to -0,002556
Proportional differences	
Slope B	1,8563
95% CI	1,4676 to 2,4159
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	21,3899
± 1.96 RSD Interval	-41,9242 to 41,9242
Linear model validity	
Cusum test for linearity	Significant deviation from linearity (P=0,01)

Grafik 4.27. Serum kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.28. Serum kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin Bland-Altman grafiği.

Serum kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.29., Grafik 4.30.'da gösterilmektedir.



Variable X	IMMUNOASSAY
Variable Y	ELISA

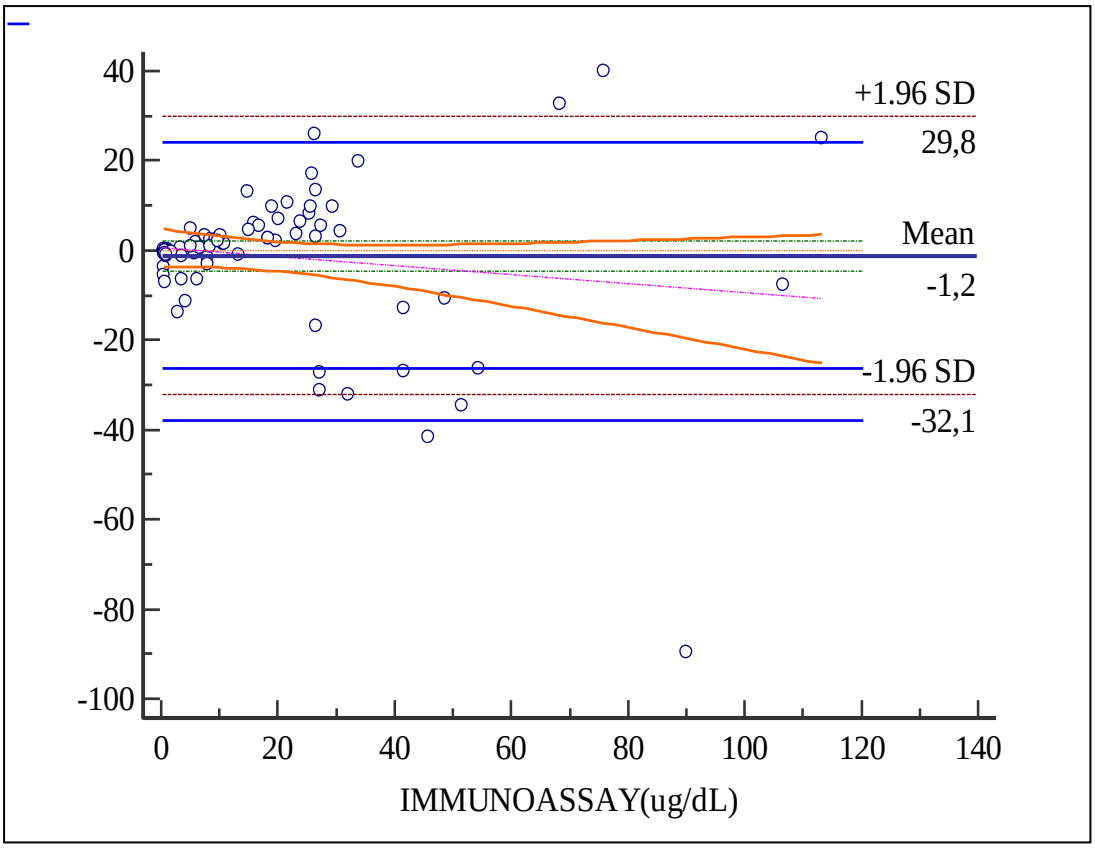
Sample size	89

	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,3340	0,2516
Highest value	113,3000	179,5700
Arithmetic mean	17,6338	18,8079
Median	8,4900	7,9039
Standard deviation	22,7592	29,5384
Standard error of the mean	2,4125	3,1311

Regression Equation

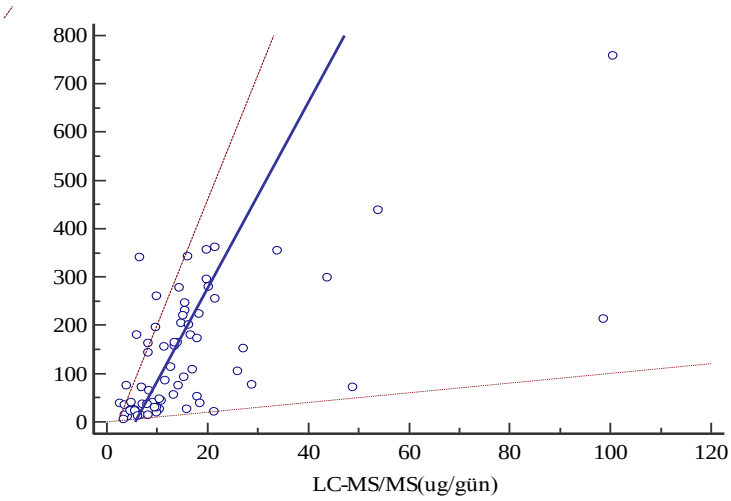
y = 0,137960 + 0,864377 x	
Systematic differences	
Intercept A	0,1380
95% CI	-0,2793 to 0,5002
Proportional differences	
Slope B	0,8644
95% CI	0,7808 to 1,0763
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	16,9822
± 1.96 RSD Interval	-33,2851 to 33,2851
Linear model validity	
Cusum test for linearity	Significant deviation from linearity (P=0,02)

Grafik 4.29. Serum kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.30. Serum kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği.

İdrar kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (Roche) yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.31., Grafik 4.32.'de gösterilmektedir.



Variable X	LCMSMS
Variable Y	IMMUNOASSAY

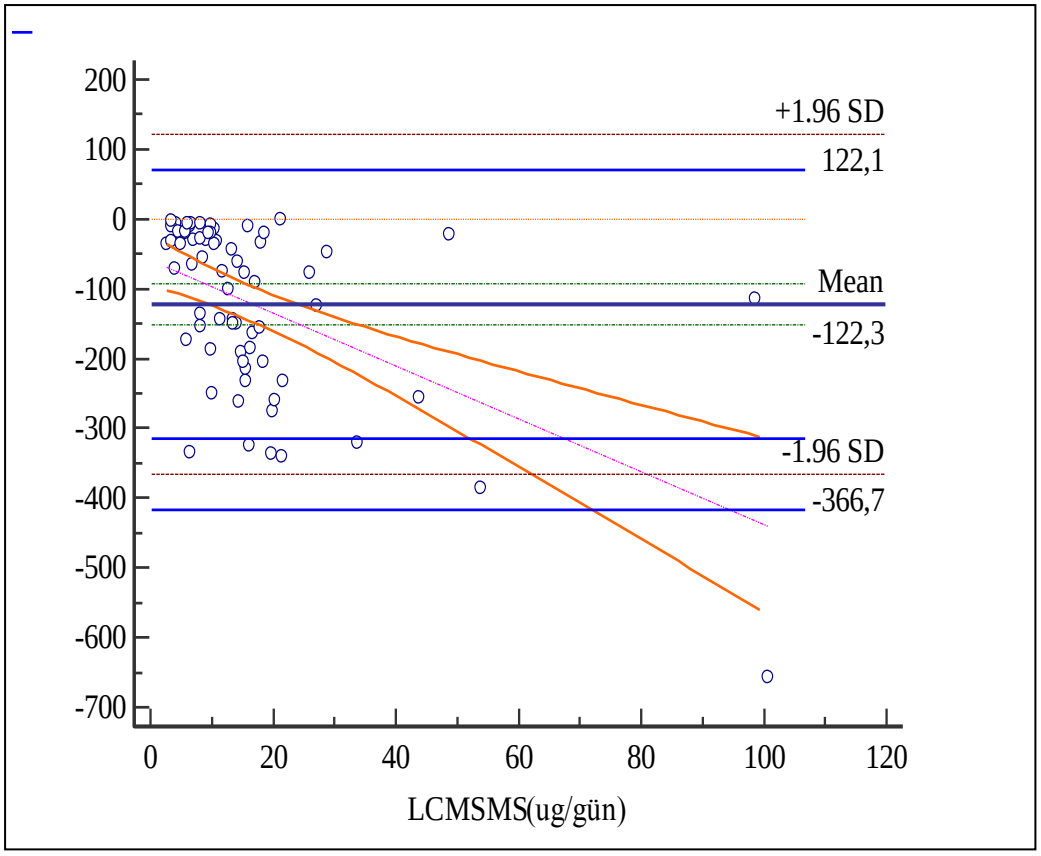
Sample size	70

	Variable X	Variable Y
Lowest value	2,6000	5,8080
Highest value	100,6000	757,2300
Arithmetic mean	16,5686	138,8708
Median	12,9500	89,7300
Standard deviation	17,4356	134,7654
Standard error of the mean	2,0839	16,1075

Regression Equation

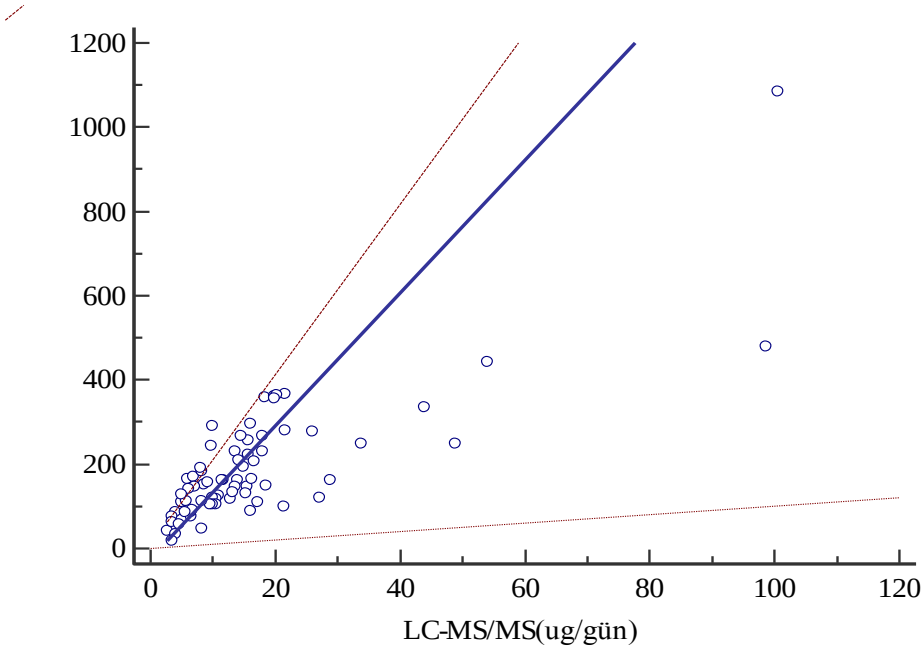
y = -108,820447 + 19,222281 x	
Systematic differences	
Intercept A	-108,8204
95% CI	-195,6000 to -57,0479
Proportional differences	
Slope B	19,2223
95% CI	14,3185 to 25,8900
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	284,0531
± 1.96 RSD Interval	-556,7440 to 556,7440
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,47)

Grafik 4.31. İdrar kortizol LC-MS/MS- kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.32. idrar kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği.

İdrar kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.33.,Grafik 4. 34.'de gösterilmektedir.



Variable X	LCMSMS
Variable Y	ELISA

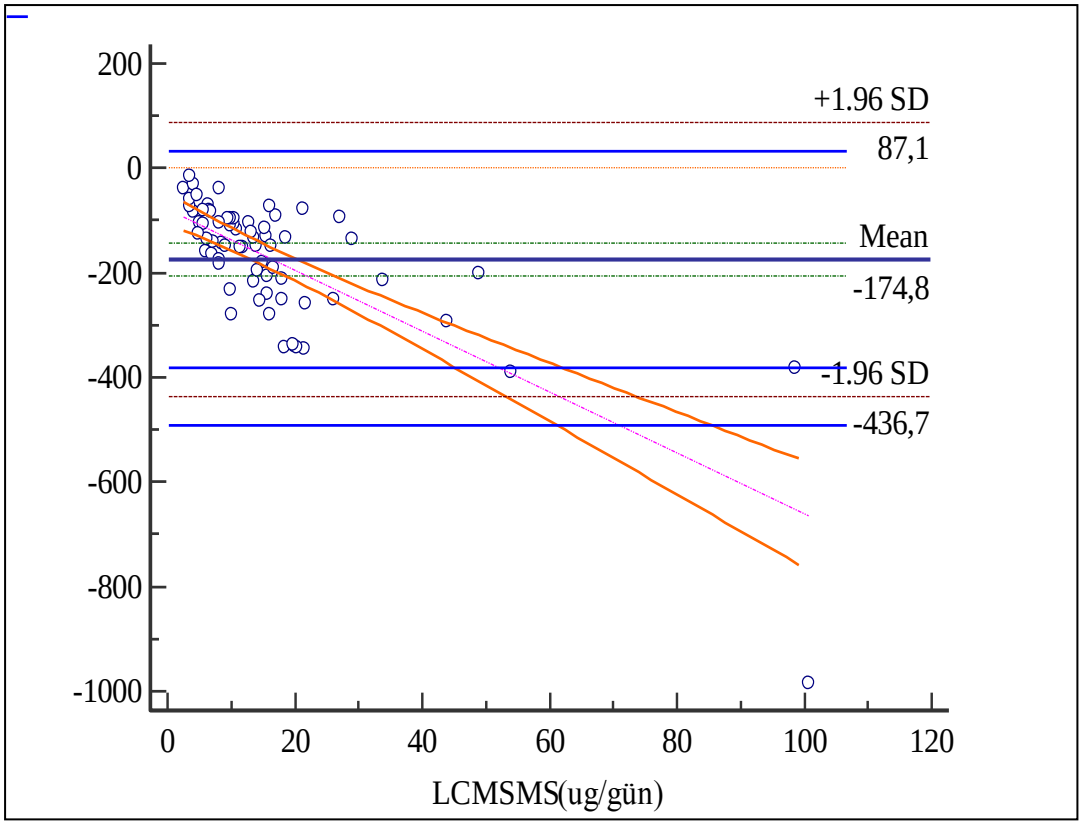
Sample size	70

	Variable X	Variable Y
Lowest value	2,6000	18,3840
Highest value	100,6000	1083,6000
Arithmetic mean	16,5686	191,3491
Median	12,9500	154,4895
Standard deviation	17,4356	147,3622
Standard error of the mean	2,0839	17,6132

Regression Equation

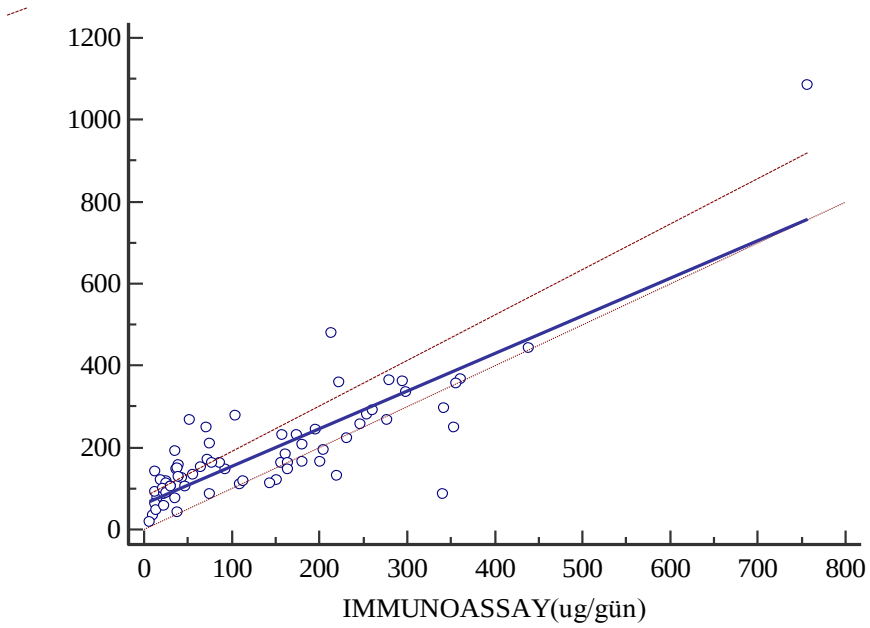
y = -22,207377 + 15,733507 x	
Systematic differences	
Intercept A	-22,2074
95% CI	-70,1573 to 11,4802
Proportional differences	
Slope B	15,7335
95% CI	12,0292 to 20,1923
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	185,0595
± 1.96 RSD Interval	-362,7165 to 362,7165
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,66)

Grafik 4.33. İdrar kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.34. İdrar kortizol LC-MS/MS-ELISA yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği.

İdrar kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin kıyaslamasına ait veriler, Grafik 4.35.,Grafik 4. 36.,'da gösterilmektedir.



Variable X	IMMUNOASSAY
Variable Y	ELISA

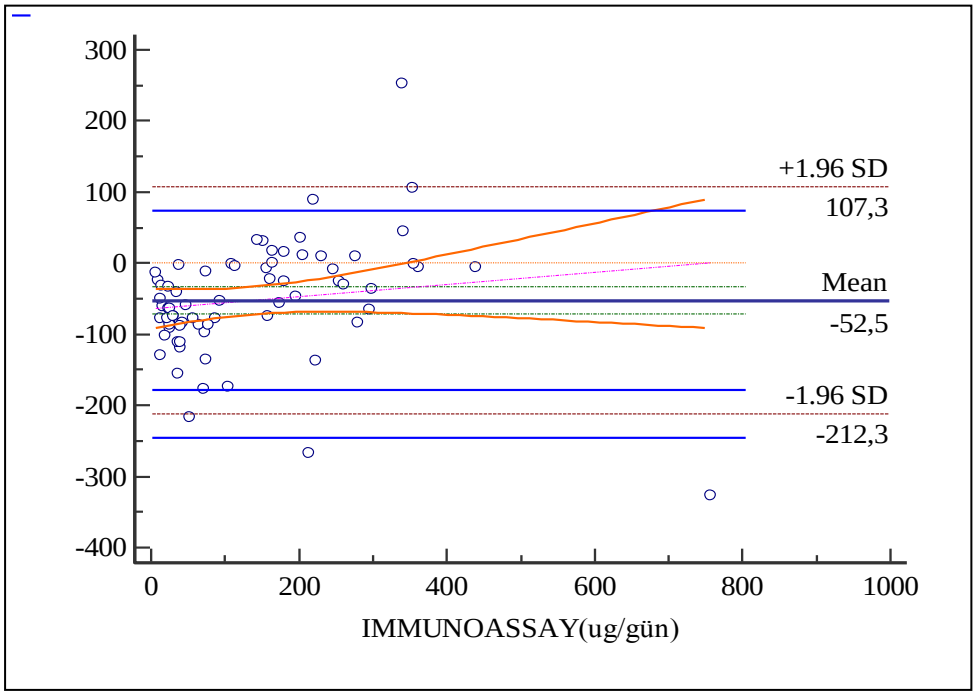
Sample size	70

	Variable X	Variable Y
Lowest value	5,8080	18,3840
Highest value	757,2300	1083,6000
Arithmetic mean	138,8708	191,3491
Median	89,7300	154,4895
Standard deviation	134,7654	147,3622
Standard error of the mean	16,1075	17,6132

Regression Equation

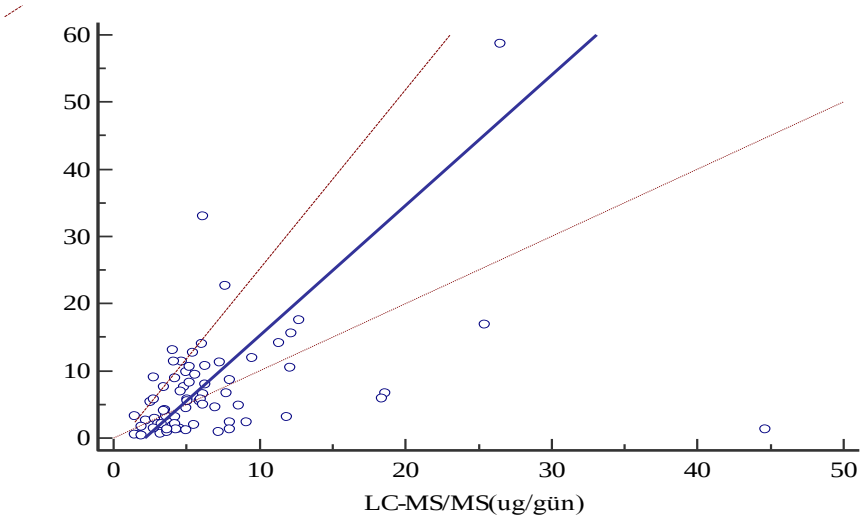
y = 62,447307 + 0,918100 x	
Systematic differences	
Intercept A	62,4473
95% CI	40,6006 to 80,7451
Proportional differences	
Slope B	0,9181
95% CI	0,7808 to 1,1080
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	81,3108
± 1.96 RSD Interval	-159,3692 to 159,3692
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,06)

Grafik 4.35. İdrar kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler.



Grafik 4.36. İdrar kortizol kemilüminesans immunoassay (ROCHE)-ELISA yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği.

Kemilüminesans immunoassayde (ROCHE) kullanılan kalibratör ID-MS izlenebilir olduğu için bu kalibratör ile LC-MS/MS cihazına kalibrasyon yapılıp, metot karşılaştırma çalışmasındaki idrar numuneleri yeniden hesaplandı. Elde edilen değerler MedCalc analiz programları ile değerlendirildi. Sonuçlar grafik 4.37. ve 4.38.'de gösterilmektedir.



Variable X	LCMSMS
Variable Y	IMMUNOASSAY

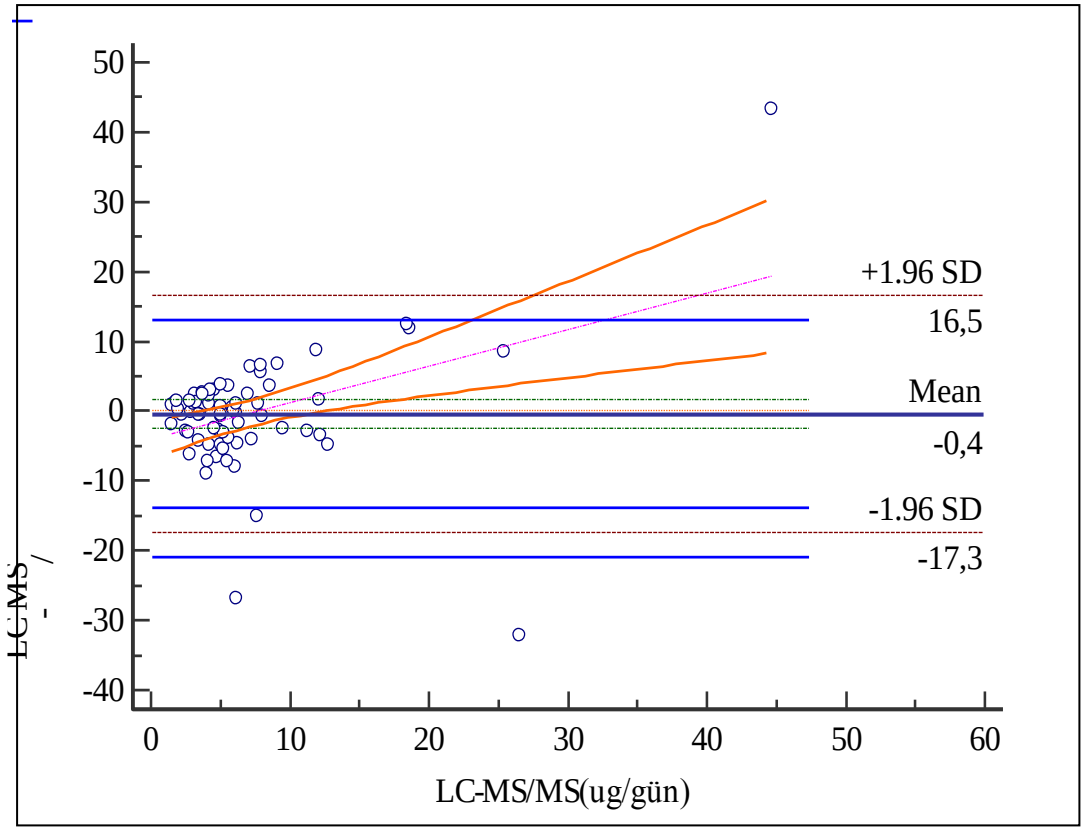
Sample size	70

	Variable X	Variable Y
Lowest value	1,4700	0,3660
Highest value	44,6600	58,7000
Arithmetic mean	6,9383	7,3559
Median	5,0400	5,4800
Standard deviation	6,6297	8,5035
Standard error of the mean	0,7924	1,0164

Regression Equation

y = -4,269295 + 1,941275 x	
Systematic differences	
Intercept A	-4,2693
95% CI	-7,9768 to -1,5938
Proportional differences	
Slope B	1,9413
95% CI	1,3843 to 2,6678
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	12,7605
± 1.96 RSD Interval	-25,0105 to 25,0105
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,30)

Grafik 4.37. İdrar kortizol LC-MS/MS- kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Passing Bablok grafiği ve veriler (ROCHE kalibratöre göre hesaplanmış sonuçlar)



Grafik 4.38. idrar kortizol LC-MS/MS-kemilüminesans immunoassay (ROCHE) yöntemlerinin Bland-Altman Grafiği (ROCHE kalibratöre göre hesaplanmış sonuçlar)

Metot karşılaştırma çalışmasında kullanılan yöntemlerin referans aralıkları Tablo 4.46'da verilmiştir.

Tablo 4.46. Metot karşılaştırma çalışmasında kullanılan yöntemlerin referans aralıkları.

	SERUM(µg/dL)		24 saatlik idrar (µg/gün)
	Öğleden önce	Öğleden sonra	
LC-MS/MS	5-25	2-14	3.5-45
ELISA	5-23	3-15	50-190
ROCHE	6.2-19.4	2.3-11.9	36-137

LC-MS/MS'de kullanılan referans aralıkları Mayo Medical Laboratuvarı'ndan alınmıştır. 24 saatlik idrar kortizolünde ≥18 yaş referans aralığı kullanıldı. (http://www.mayomedicallaboratories.com/ Erişim tarihi 2014).

Yapılan metot karşılaştırma çalışmasında idrar kortizol ölçümünde, 70 hasta çalışıldı. Her yöntem kendi, referans aralıkları içinde değerlendirilerek % uyumlar hesaplandı. İdrar kortizol ölçümünde LC-MS/MS ile kemilüminesans yöntem arasındaki uyum %73 olarak tespit edildi. LC-MS/MS ile ELISA arasındaki uyum ise % 73 olarak tespit edildi. Kemilüminesans immunoassay ile ELISA arasındaki uyum ise %22.4 olarak tespit edildi. İdrar ölçümünde her üç yöntem arasındaki uyum ise %22.4 olarak tespit edildi.

Mayo Medical Laboratuvarı'nda 24 saatlik idrarda kortizon/kortizol oranı normal kişilerde 3:1 ve 2:1 olarak verilmiş, bu oranın < 1 olması 11 BHSD enzim eksikliğini ya da inhibisyonunu nedeniyle olabiliceği bildirilmiştir (http://www.mayomedicallaboratories.com/ Erişim tarihi 2014). LC-MS/MS'te ölçümünü yaptığımız 24 saatlik idrar kortizol ve kortizon ölçümleri sonucunda 70 hastadan 4'nün kortizon/kortizol oranı <1 saptandı.

5. TARTIŞMA

Adrenal korteks metobolizmanın düzenlenmesinde temel rol oynayan çeşitli steroid hormonların kaynağıdır. Bu hormonlarla ilişkili metabolik yolakların aydınlatılması yavaştı, ancak vücuttaki önemli steroid konsantrasyonların ölçülmesiyle mümkün olmaya başladı. Dokuda düşük konsantrasyonda bulunmaları, kimyasal yapılarının birbirine benzer olması ve kompleks yapıya sahip olmaları ölçümlerindeki temel zorlukları oluşturmaktadır. Bu alanda uygun analitik teknikler geliştirmek biyokimyacıların temel görevi olmuştur. Uygun radyo işaretleme, izotopla işaretleme ve rutinde kullanılan immunoassaylerin geliştirilmesiyle sağlanan ilerleme, MS'e bağlı yüksek seçici ayırıcı kromatografi ile daha da artmıştır. Bu analitik metotlar günümüzde tüm önemli adrenokortikal hormonlar, onların öncülleri ve sentetik glukokortikoidlerin analizi için uygundur ve bu konuda geniş aplikasyona sahiptir. Özellikle klinik araştırma ve incelemenin yapıldığı çeşitli doğuştan endokrin hastalıkların incelenmesi, tanı konulması ve tedavi edilmesi gibi durumlarda analizin önemi ve güvenirliği vurgulanmaktadır (Makin ve ark, 2010). GC-MS ve LC-MS/MS steroid analizinde daha spesifik metodlar sağlar. GC-MS ile kortizol analizi ektraksiyon ve türevlendirme basamaklarını gerektirir. Organik bileşiklerin ölçümünde GC-MS uzun zamandır referans metot olarak kabul edilmesine rağmen LC-MS/MS yöntemleri daha yaygın hale gelmektedir. Türevlendirme basamağına ihtiyaç duymaması önemli avantajıdır. Böylece numune hazırlığı büyük ölçüde kolaylaşır. Bu nedenle steroid profili için tercih edilen yöntem olmaya adaydır (Burtis ve ark, 2012).

Rutin laboratuvar uygulamalarında immunoanalizler serum ve idrar kortizol ölçümü için yaygın kullanılan yöntemlerdir ve çoğunlukla otomatize platforma uygundur. Ancak tüm immunoassayler interferansa yatkındır. Hasta serumlarında heterofil antikor bulunması, hatalı sonuçlara neden olabilir. Spesifik antikorlar kullanılmasına rağmen klinik laboratuvarlarda kortizol için kullanılan hemen tüm immunoassayler prednizolon ve diğer steroidler ile çapraz reaktivite göstermektedir. Prednizolona karşı çapraz reaktivite oranı Advia Centaurda %27 Roche sistemlerde %171'e kadar değişir (Roberts ve ark, 2004). Prednisona karşı çapraz reaktivite oranı düşüktür (%0.3-%6.6) fakat prednison vücutta prednisolona dönüşür ve bu nedenle immunoassayler ile kortizol ölçümü prednison ve prednisolon alan

hastalarda uygun değildir. 11 deoksikortizol için çapraz reaktivite oranı Roche sistemlerde %4.5'ten Beckman Accesss analizörde %21.6'ya kadar değişir. Metirapon testi yapılan hastalarda 11 deoksikortizol seviyesi yüksek olabilir ve bu nedenden dolayı immunoassayler kortizol için yanlış yüksek sonuç verebilir. Bazı immunoassaylerin 21 deoksikortizole karşı çapraz reaktivitesi olduğu bilinir. 21 hidroksilaz eksikliği olan hastalarda 21 deoksikortizol seviyesi yüksektir. Bazı interferanslar (örneğin 11 deoksikortizol) numunelerin korbon tetraklorid ile ekstraksiyonu ile ortadan kaldırılabilir. Immunoassaylerin diğer bir kısıtlayıcı noktası ektraksiyon basamağındaki kortizol kaybının izlenmesine olanak sağlayan internal standart kullanılmamasıdır (Kaplan ve ark, 2010). Immunoassayler ile ilgili tüm bu olumsuzluklar nedeniyle kromatografik metotlar geliştirilmiştir. Yapılan karşılaştırma çalışmaları kromatografik yöntemlerin daha doğru ölçüm yaptığını göstermiştir. Ayrıca immunoassaylerde yaşanan karbamazepin interferans problemi de GC-MS ya da LC-MS/MS ile yapılan analizler ile ortadan kaldırılır (Palermo ve ark, 1996). Bu yöntemlerin önemli avantajları interferans problemini ortadan kaldırmaları ve endojen kortizol metabolitlerini ölçebilmeleridir (Taylor ve ark, 2002).

24 saatlik idrar kortizol atılımı tüm kortizol sekresyon oranını yansıtır ve sirkadiyen ritimden etkilenmez. Sadece plazmadaki serbest formu glomerüler filtrasyona uğrar ve değişmeden atılır. Çok az miktarda tübüler reabsorbsiyonu vardır. Bu nedenle idrar kortizol ölçümü kortizol sekresyonunu yansıtır. Tipik olarak ekstraksiyonsuz metotlar oldukça yüksek sonuçlar verir. HPLC analizi ile ekstraksiyonlu metotlar uygulandığında referans aralığı 10-54 µg/L'dir ve LC-MS/MS metodunda da benzer sonuçlar elde edilmiştir (McCann ve ark, 2005). İdrarda serbest kortizol ölçümü ile ilgili problemler tamamlanmamış idrar toplanması ve çapraz reaktivitedir. (özellikle ön ektraksiyon içermeyen metotlarda) Cushing sendromu tanısı için idrar kortizol ölçümünde sensitivitenin %45-%71, spesifitenin de %100 olması raporlanmıştır (Findling ve ark, 2006). Ek olarak kortizolü kortizona çevirerek inaktif hale getiren 11BHSD tip 2 enzimindeki varyasyonlar böbrekten atılan kortizol miktarını önemli derecede etkiler. Bu nedenle idrar kortizol ve kortizon oranlarının ölçülmesinin daha anlamlı olacağı ileri sürülmüştür (Lin ve ark, 1997).

CLSI kurallarına göre LC-MS/MS'te kortizol ve kortizon için validasyon tamamlanmış ve kemilüminesans immunoassay ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırma çalışması yapıldı. Gerçekleştirilen validasyon çalışmasında kortizol için 10000-1.90 µg/L aralığı, kortizon için ise 200-0.78 µg/L aralığı linear bulundu. Lee ve arkadaşlarının yaptıkları validasyon çalışmasında kortizol için 1-500 ng/ml (µg/L) kortizon için 2.5-100 ng/ml (µg/L) aralığı linear bulunmuştur. Yaptığımız çalışmada, kortizolün 10000 µg/L'ye kadar linearitesinin bozulmadığı tespit edildi. Çok yüksek konsantrasyonlarda immunoassay yöntemlerde Hook etkisi ile karşılaşılır. LC-MS/MS analizinin immunoassaylere bir diğer üstünlüğü de çok yüksek konsantrasyonlar da bile linearitesi bozulmadan ölçüm yapılabilmesidir. Linearite çalışmasında elde ettiğimiz korelasyon katsayısı (r^2) kortizol için 0.999, kortizon için ise 0.997 olarak tespit edildi. Lee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada korelasyon katsayısı (r^2) kortizol için 0.999, kortizon için 0.998 olarak bulunmuştur (Lee ve ark, 2014).

Gerçekleştirdiğimiz kesinlik çalışmasında kortizol için sırayla çalışma içi, ve çalışmalar arası CV değerleri 0.9-5.3 ve 1.1-5.3 aralığında kortizon için ise sırayla çalışma içi ve çalışmalar arası CV değerleri 1-5, 1.3-6.2 aralığında tespit edildi. Lee ve arkadaşlarının çalışmasında ise çalışma içi kesinlik kortizol için 1.5-4.5 aralığında, kortizon için ise 1.9-5.8 aralığında, çalışmalar arası kesinlik ise kortizol için 2.7-4.6 aralığında, kortizon için de 3.6-6 aralığında bulunmuştur (Lee ve ark, 2014).

Geri elde çalışmamızda kortizol için 101, 96 ve 112 değerleri, kortizon için 102.5, 98 ve 96 değerleri elde edildi. Lee ve arkadaşları ise kortizol için 99, 96.1 ve 94, kortizon için ise 77.1, 81.6 ve 81.2 değerlerini elde etmişlerdir (Lee ve ark, 2014).

Sinyal gürültü oranı baz alınarak belirlenmiş olan limitler, çalışmamızda kortizol için dedeksiyon limiti 1.56 µg/L, kantitasyon limiti ise 3.125 µg/L olarak, kortizon için dedeksiyon limiti 0.78 µg/L, kantitasyon limiti de 3.125 µg/L olarak tespit edildi. Lee ve arkdaşlarıda dedeksiyon limiti ve kantitasyon limitini sinyal gürültü oranının sırayla >3 ve >10 olmasına göre belirlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada kantitasyon limiti kortizolde 1 ng/ml (µg/L), kortizon için ise 2.5 ng/ml

(µg/L) olarak belirlenmiş. Ancak onlar analizi API 4000'de gerçekleştirirlerken, bizim analizimiz API 3200'de gerçekleştirildi. (Lee ve ark, 2014).

Yöntem karşılaştırma çalışmaları sonucunda idrar ve serum kortizol düzeyleri üç yöntemle analiz edildi. Sonuçlar regresyon analizi ile değerlendirildi. Serum kortizol düzeyi için LC-MS/MS ve kemilüminesans immunoassay ile yapılan karşılaştırma çalışmasında elde ettiğimiz slope: 1.7, intercept:-0.40 olarak tespit edildi. Serum kortizol düzeyi için; LC-MS/MS ve ELISA karşılaştırmasında elde ettiğimiz slope: 1.8, intercept: -0.42 olarak tespit edildi. Serum kortizol düzeyi için kemilüminesans immunoassay ve ELISA ile gerçekleştirdiğimiz karşılaştırma çalışmasında elde ettiğimiz slope: 0.86, intercept: 0.13 olarak tespit edildi. Kushnir ve arakadaşlarının yaptığı LC-MS/MS ve kemilüminesans immunoassay kıyaslamasında elde ettikleri slope: 0.74, intercept: -0.70 olarak bulunmuştur (Kushnir ve ark, 2004). Yöntem karşılaştırma çalışmasında LC-MS/MS 'de 89 hastanın kortizol ve kortizon düzeyleri ölçülmüş olup, Kortizon/kortizol oranı 0.266 olarak tespit edildi. Benzer şekilde Lee ve arkadaşlarının 48 sağlıklı kişi ile yaptıkları çalışmada elde ettikleri kortizon/kortizol oranı 0.225 olarak bulunmuştur (Lee ve ark, 2014). İdrar kortizol düzeyi için LC-MS/MS ve kemilüminesans immunoassay ile yapılan karşılaştırma çalışmasında elde ettiğimiz slope: 19.2, intercept: -108 olarak tespit edildi. İdrar kortizol düzeyi için LC-MS/MS ve ELISA karşılaştırmasında elde ettiğimiz slope: 15.7, intercept: -22.2 olarak tespit edildi. İdrar kortizol düzeyi için kemilüminesans immunoassay ve ELISA ile gerçekleştirdiğimiz karşılaştırma çalışmasında elde ettiğimiz slope: 0.91, intercept: 62.4 olarak tespit edildi. Elimizde LC-MS/MS için referans materyalimiz bulunmadığı için ve kemilüminesans immunoassayde (ROCHE) kullanılan kalibratör ID-MS izlenebilir olduğundan bu kalibratör ile LC-MS/MS'de kalibrasyon yapıldı. Metot karşılaştırma çalışmasındaki idrar numuneleri bu kalibratör değeri ile tekrar hesaplandı. İdrar kortizol düzeyi için ROCHE kalibratörle hesaplanan LC-MS/MS sonuçları ve kemilüminesans immunoassay karşılaştırmasında elde ettiğimiz slope: 1.9, intercept: -4.2 olarak bulundu. Wood ve arkadaşlarının 118 idrar numunesi ile kemilüminesans immunoassay ve LC-MS/MS ile yaptıkları karşılaştırma çalışmasında elde ettikleri denklem; kemilüminesans immunoassay = 1.7920(LC-MS/MS) + 49.1468'dir. (Wood ve ark, 2008). McCann ve arkadaşlarının 121 idrar numunesi ile gerçekleştirdikleri kemilüminesans immunoassay ve LC-MS/MS ile yaptıkları

karşılaştırma çalışmasında elde ettikleri denklem; LC-MS/MS = 0.408 (kemilüminesans immunoassay)+ 2.65'tir. (McCann ve ark, 2005).

İdrar kortizol düzeyleri validasyon çalışmasında immunoassaylerle LC-MS/MS kıyaslandığında immunoassaylerin daha yüksek ölçtüğü, özellikle yüksek konsantrasyonlarda farkın daha da açıldığı gösterildi. Benzer sonuçları Fong ve arkadaşları da elde etmişlerdir. Konsantrasyona bağlı bias immunoassaydeki kortizon çapraz reaktivitesine bağlıdır. Kortizol düzeyleri yükseldikçe metabolitleri ve kortizon seviyesi de artar. Bu da immunoassylerde çapraz reaktiviteye neden olur. Hafif yükseklikler klinik pratikte sık karşılaşılan bir durumdur. Cushing tanısı için idrar serbest kortizol seviyesinin üst referans seviyesinden 4 kat yüksek olması gerekir. Yalancı pozitif immunoassay sonuçlarını elemine etmek için, immunoassaylerde yüksek ölçülmüş idrar kortizol düzeylerinin LC-MS/MS ile araştırılması tavsiye edilmektedir (Fong ve ark, 2010).

Aynı zamanda LC-MS/MS'de eş zamanlı kortizol ve kortizon düzeylerinin belirlenmesi 11BHSD enzim aktivitesinin kalıtsal ya da kazanılmış anormalliklerinin belirlenmesi ve buna bağlı hiperkortizolizm, fazla meyan kökü kullanımına bağlı psödohiperkortizolizmin araştırılmasına da imkan sağlar (Fong ve ark, 2010).

Kronik böbrek yetmezlikli (KBY) hastalar ile sağlıklı kişileri kıyaslayan bir çalışmada kortizon/kortizol oranının kronik böbrek yetmezlikli hastalarda %60 oranında azaldığı tespit edilmiştir. Bu sonuç, KBY hastalarında böbrekte kortizolün kortizona dönüşümünü katalizleyen 11BHSD tip 2 aktivitesinin önemli ölçüde bozulduğunu gösterir. Benzer sonuçlar Vogt ve arkadaşları tarafından da bildirilmiştir. Yaptıkları çalışmada nefrotik sendromlu hastalarda kortizonun idrarla atılım metaboliti olan tetrahidrokortizon düzeyinin azaldığını göstermişlerdir. Bu azalmayı 11BHSD enzimin down regülasyonuna bağlamışlardır. Benzer çalışmalar diyabetli hastalarda da gözlenmiştir. Tüm bu gözlemler doğrultusunda diyabet ve ilişkili komplikasyonların gelişmesinde 11BHSD enzim aktivitesinin rolü olabileceği öne sürülmüştür (Homma ve ark, 2001). Yöntem karşılaştırma çalışmasında 70 hastanın 24 saatlik idrarlarında LC-MS/MS'te kortizol ve kortizon düzeyleri analiz edildi. Mayo Medical Laboratuvarı'nda 24 saatlik idrarda kortizon/kortizol oranı normal kişilerde 3:1 ve 2:1 olarak verilmiş, bu oranın < 1 olması 11 BHSD enzim

eksikliğini ya da inhibisyonunu nedeniyle olabiliceği bildirilmiştir (http://www.mayomedicallaboratories.com/ Erişim tarihi 2014). Bu oran baz alındığında 24 saatlik idrar kortizol ve kortizon ölçümü sonucunda 4 hastanın kortizon/kortizol oranı <1 olarak saptandı.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sunulan çalışmada kortizol ve kortizonun serum ve idrarda miktarlarının tespiti için yeni bir metot geliştirildi. Kortizol vücutta önemli fizyolojik mekanizmaların düzenlenmesinde rol oynayan temel glukokortikoid hormondur. Kortizolün inaktif metaboliti olan kortizon da vücuttaki kortizol-kortizon şantının dengesi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu dengedeki bozukluklar çeşitli patolojilerle birliktedir. Geleneksel olarak kullanılan immunoassay yöntemlerle belirlenen kortizol miktarı, Cushing sendromu, konjenital adrenal hiperplazi, Addison hastalığı, minerelokortioid fazlalığı sendromu gibi çeşitli hastalıkların tanısında kullanılmaktadır. Ancak bu yöntemler ile yapılan kortizol analizinde, kortizon ve diğer endojen steroid metabolitlerinden ve prednizolon gibi sentetik glukokortikoid türevlerinden kaynaklanan interferans bulunmaktadır. Bu durum yöntemin sensitivitesini azaltmaktadır.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda steroid analizlerinde analitik interferansın azaltılması ve doğruluğun arttırılması amacıyla LC-MS/MS tabanlı yöntemler tercih edilmektedir. Gerçekleştirilen çalışmada idrar ve serum kortizol ve kortizon miktarlarını belirlemek için ortaya konulacak yeni yöntem için, CLSI kuralları çerçevesinde metot validasyonu tamamlanmıştır. Elde edilen sonuçlar doğrultusunda LC-MS/MS yönteminin uygulanabilir olduğu ortaya konulmuştur. Yapılan metot karşılaştırma çalışmalarında LC-MS/MS yönteminin idrar ve serum kortizol seviyelerini, antijen-antikor tabanlı immunoassay ve ELISA yöntemlerine göre daha düşük ölçtüğü tespit edilmiştir. Bu durum literatür ile uyumlu olmakla birlikte, antijen-antikor tabanlı testlerdeki interferansın LC-MS/MS yönteminde bulunmamasından kaynaklanmaktadır. LC-MS/MS yönteminin immunoassay yöntemlere göre diğer bir üstünlüğü de, analitik interferansı ortadan kaldırmasıyla birlikte, kortizolün yanında kortizol-kortizon şantı hakkında da bilgi sağlayan kortizon ölçümüne olanak sağlamasıdır.

Deneysel çalışmalardan elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle, geliştirilen yöntemin tüm performans hedeflerini karşıladığı ortaya konuldu. Ancak ön işlem basamaklarının uzun olmasından dolayı rutin analizlerde kullanımı zaman almaktadır. Bunun yanında kritik hastaların tanısında, sahip olduğu yüksek sensitivite sayesinde tanı doğrulamada ve 11-BHSD enzim aktivitesi hakkında

önemli bilgi sağlayan kortizon/kortizol oranını belirlemek için kortizol ve kortizon birlikte ölçülmesinin gerektiği durumlarda kullanım potansiyeli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aktümsek, A. (2001). *Anatomi ve Fizyoloji*. Ankara: Nobel Kitabevi.

Annesley, T. M. (2003). Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem, 49*(7), 1041-1044.

Arlt, W., & Allolio, B. (2003). Adrenal insufficiency. *Lancet, 361*(9372), 1881-1893. doi: 10.1016/s0140-6736(03)13492-7

Aycan, Z., Akbuga, S., ve ark. (2009). Final height of patients with classical congenital adrenal hyperplasia. *Turk J Pediatr, 51*(6), 539-544.

Barnes, S. C., & Swaminathan, R. (2007). Effect of albumin concentration on serum cortisol measured by the Bayer Advia Centaur assay. *Ann Clin Biochem, 44*(Pt 1), 79-82. doi: 10.1258/000456307779595968

Barnett, R. N. (1968). Medical significance of laboratory results. *Am J Clin Pathol, 50*(6), 671-676.

Baş, N. (2008). *Adrenal kitlelerin karakterizasyonunda BT histogram analiz metodunun tanı etkinliğinin değerlendirilmesi.* T.C. Sağlık Bakanlığı Şişli Etfal Eğitim ve Araştırma Hastanesi.

Beitins, I. Z., Bayard, F., ve ark. (1973). The metabolic clearance rate, blood production, interconversion and transplacental passage of cortisol and cortisone in pregnancy near term. *Pediatr Res, 7*(5), 509-519. doi: 10.1203/00006450-197305000-00004

Berenbaum, S. A. (2001). Cognitive function in congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am, 30*(1), 173-192.

Berenbaum, S. A., Korman Bryk, K., ve ark. (2004). Psychological adjustment in children and adults with congenital adrenal hyperplasia. *J Pediatr, 144*(6), 741-746. doi: 10.1016/j.jpeds.2004.03.037

Best, R., & Walker, B. R. (1997). Additional value of measurement of urinary cortisone and unconjugated cortisol metabolites in assessing the activity of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in vivo. *Clin Endocrinol (Oxf), 47*(2), 231-236.

Bornstein, S. R., & Chrousos, G. P. (1999). Adrenocorticotropin (ACTH)- and Non-ACTH-Mediated Regulation of the Adrenal Cortex: Neural and Immune Inputs. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 84*(5), 1729-1736. doi: doi:10.1210/jcem.84.5.5631

Brien, T. G. (1981). Human corticosteroid binding globulin. *Clin Endocrinol (Oxf), 14*(2), 193-212.

Burtis, C. A., Ashwood, E. R., ve ark. (2012). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*: Elsevier Health Sciences.

Castonzo, L. S. (1999). *Fizyoloji*. Ankara: Nobel Kitabevi.

Chambers, E., Wagrowski-Diehl, D. M., ve ark. (2007). Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 852*(1-2), 22-34. doi: 10.1016/j.jchromb.2006.12.030

Ching, S. Y., Lim, E. M., ve ark. (2006). Urine free cortisol analysis by automated immunoassay and high-performance liquid chromatography for the investigation of Cushing's syndrome. *Ann Clin Biochem, 43*(Pt 5), 402-407. doi: 10.1258/000456306778519973

Cohen, J., Ward, G., ve ark. (2006). Variability of cortisol assays can confound the diagnosis of adrenal insufficiency in the critically ill population. *Intensive Care Med, 32*(11), 1901-1905. doi: 10.1007/s00134-006-0389-x

Cooper, M. S., & Stewart, P. M. (2009). 11Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and its role in the hypothalamus-pituitary-adrenal axis, metabolic syndrome, and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab, 94*(12), 4645-4654. doi: 10.1210/jc.2009-1412

Courtney, C. H., McAllister, A. S., ve ark. (2000). The insulin hypoglycaemia and overnight metyrapone tests in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis following pituitary surgery. *Clin Endocrinol (Oxf), 53*(3), 309-312.

Çamurdan, M. O., Yeşilkaya, E. (2013). Adrenal Korteks ve Fonksiyonları. In P. Cinaz, Darendeliler, F., Akıncı, A., Özkan, B., Dündar, B. N., Abacı, A., Akçay T. (Ed.), *Çocuk Endokrinolojisi* (pp. 213-265). Ankara: Nobel Kitabevi.

De Brabandere, V. I., Thienpont, L. M., ve ark. (1995). Three routine methods for serum cortisol evaluated by comparison with an isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry method. *Clin Chem, 41*(12 Pt 1), 1781-1783.

Dittmann, R. W., Kappes, M. H., ve ark. (1990). Congenital adrenal hyperplasia. II: Gender-related behavior and attitudes in female salt-wasting and simple-virilizing patients. *Psychoneuroendocrinology, 15*(5-6), 421-434.

Dökmetaş, H. S., Çolak, R., ve ark. (2000). A comparison between the 1-μg adrenocorticotropin (ACTH) test, the short ACTH (250 μg) test, and the insulin tolerance test in the assessment of hypothalamo-pituitary-adrenal axis immediately after pituitary surgery. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 85*(10), 3713-3719.

Duxbury, K., Owen, L., ve ark. (2008). Naturally occurring isotopes of an analyte can interfere with doubly deuterated internal standard measurement. *Ann Clin Biochem, 45*(Pt 2), 210-212. doi: 10.1258/acb.2007.007137

Elamin, M. B., Murad, M. H., ve ark. (2008). Accuracy of diagnostic tests for Cushing's syndrome: a systematic review and metaanalyses. *J Clin Endocrinol Metab, 93*(5), 1553-1562. doi: 10.1210/jc.2008-0139

Elbüken, G. (2011). *Sağlıklı Popülasyonda Hipotalamus-Hipofiz-Adrenal Aksın Değerlendirilmesinde Kullanılan Bazal ve Uyarılmış Tükrük Kortizol Düzeylerinin Bazal ve Uyarılmış Total Kortizol, Serbest Kortizol ve Serbest Kortizol İndeksi Düzeylerinin Araştırılması.* (Yan Dal Uzmanlık Tezi), Erciyes Üniversitesi, Kayseri.

Erdoğan, H., Hatipoğlu, T., Görgün, M., Ilgaz, C. (1996). *Özel Histoloji*. Ankara: Hatiboğlu Yayınevi.

Findling, J. W., & Raff, H. (2005). Screening and diagnosis of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am, 34*(2), 385-402, ix-x. doi: 10.1016/j.ecl.2005.02.001

Findling, J. W., & Raff, H. (2006). Cushing's Syndrome: important issues in diagnosis and management. *J Clin Endocrinol Metab, 91*(10), 3746-3753. doi: 10.1210/jc.2006-0997

Findling, J. W., Raff, H., ve ark. (2004). The low-dose dexamethasone suppression test: a reevaluation in patients with Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab, 89*(3), 1222-1226. doi: 10.1210/jc.2003-030207

Fong, B. M., Tam, S., ve ark. (2010). Improved liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in clinical utility for the diagnosis of Cushing's syndrome. *Anal Bioanal Chem, 396*(2), 783-790. doi: 10.1007/s00216-009-3247-1

Fraser, C. G., Hyltoft Petersen, P., ve ark. (1997). Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem, 34 (Pt 1)*, 8-12.

Ghayee, H. K., & Auchus, R. J. (2007). Basic concepts and recent developments in human steroid hormone biosynthesis. *Rev Endocr Metab Disord, 8*(4), 289-300. doi: 10.1007/s11154-007-9052-2

Greenspan, F. S., & Gardner, D. G. (2004). *Basic & Clinical Endocrinology*: Lange Medical Books/McGraw-Hill.

Guo, T., Taylor, R. L., ve ark. (2006). Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta, 372*(1-2), 76-82. doi: 10.1016/j.cca.2006.03.034

Hall, J. E. (2010). *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*: Elsevier Health Sciences.

Hammond, G. L., Smith, C. L., ve ark. (1991). Molecular studies of corticosteroid binding globulin structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol, 40*(4-6), 755-762.

Hariharan, M., Naga, S., ve ark. (1992). Simultaneous assay of corticosterone and cortisol in plasma by reversed-phase liquid chromatography. *Clin Chem, 38*(3), 346-352.

Homma, M., Tanaka, A., ve ark. (2001). Assessing systemic 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase with serum cortisone/cortisol ratios in healthy subjects and patients with diabetes mellitus and chronic renal failure. *Metabolism, 50*(7), 801-804. doi: 10.1053/meta.2001.24213

Horie, H., Kidowaki, T., ve ark. (2007). Specificity assessment of immunoassay kits for determination of urinary free cortisol concentrations. *Clin Chim Acta, 378*(1-2), 66-70. doi: 10.1016/j.cca.2006.10.018

Hsu, F. F., Wang, L., ve ark. (1994). Determination of cortisol in human plasma by gas chromatography/negative ion chemical ionization/mass spectrometry. *Anal Biochem, 216*(2), 401-405.

Huang, W., Kalhorn, T. F., ve ark. (2007). Determination of free and total cortisol in plasma and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit, 29*(2), 215-224. doi: 10.1097/FTD.0b013e31803d14c0

Johannsen, T. H., Ripa, C. P., ve ark. (2006). Impaired cognitive function in women with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab, 91*(4), 1376-1381. doi: 10.1210/jc.2005-1959

Jung, P. G., Kim, B., ve ark. (2004). Determination of serum cortisol using isotope dilution-liquid chromatography-mass spectrometry as a candidate reference method. *Anal Bioanal Chem, 380*(5-6), 782-788. doi: 10.1007/s00216-004-2846-0

Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2005). *Basic Histology: Text and Atlas*: McGraw-Hill.

Kandemir, N., & Yordam, N. (1997). Congenital adrenal hyperplasia in Turkey: a review of 273 patients. *Acta Paediatr, 86*(1), 22-25.

Kaplan, L. A., & Pesce, A. J. (2010). *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*: Mosby/Elsevier.

Karaca, Z., Lale, A., ve ark. (2011). The comparison of low and standard dose ACTH and glucagon stimulation tests in the evaluation of hypothalamo-pituitary-adrenal axis in healthy adults. *Pituitary, 14*(2), 134-140. doi: 10.1007/s11102-010-0270-3

Karaca, Z., Tanriverdi, F., ve ark. (2010). Can basal cortisol measurement be an alternative to the insulin tolerance test in the assessment of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis before and after pituitary surgery? *Eur J Endocrinol, 163*(3), 377-382. doi: 10.1530/eje-10-0229

Kazlauskaite, R., Evans, A. T., ve ark. (2008). Corticotropin tests for hypothalamic-pituitary- adrenal insufficiency: a metaanalysis. *J Clin Endocrinol Metab, 93*(11), 4245-4253. doi: 10.1210/jc.2008-0710

Keller-Wood, M. E., & Dallman, M. F. (1984). Corticosteroid inhibition of ACTH secretion. *Endocr Rev, 5*(1), 1-24. doi: 10.1210/edrv-5-1-1

Kitanaka, S., Tanae, A., ve ark. (1996). Apparent mineralocorticoid excess due to 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency: a possible cause of intrauterine growth retardation. *Clin Endocrinol (Oxf), 44*(3), 353-359.

Krozowski, Z. S., & Funder, J. W. (1983). Renal mineralocorticoid receptors and hippocampal corticosterone-binding species have identical intrinsic steroid specificity. *Proc Natl Acad Sci U S A, 80*(19), 6056-6060.

Kushnir, M. M., Neilson, R., ve ark. (2004). Cortisol and cortisone analysis in serum and plasma by atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometry. *Clin Biochem, 37*(5), 357-362. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.01.005

Law, R. H., Zhang, Q., ve ark. (2006). An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol, 7*(5), 216. doi: 10.1186/gb-2006-7-5-216

Lee, S., Lim, H. S., ve ark. (2014). Simultaneous determination of cortisol and cortisone from human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Anal Methods Chem, 2014*, 787483. doi: 10.1155/2014/787483

Lin-Su, K., Vogiatzi, M. G., ve ark. (2005). Treatment with growth hormone and luteinizing hormone releasing hormone analog improves final adult height in children with congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab, 90*(6), 3318-3325. doi: 10.1210/jc.2004-2128

Lin, C. L., Wu, T. J., ve ark. (1997). Urinary free cortisol and cortisone determined by high performance liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab, 82*(1), 151-155. doi: 10.1210/jcem.82.1.3687

Makin, H. L. J., & Gower, D. B. (2010). *Steroid Analysis*: Springer.

Mantero, F., Palermo, M., ve ark. (1996). Apparent mineralocorticoid excess: type I and type II. *Steroids, 61*(4), 193-196.

Mantha, S., Roizen, M. F., ve ark. (2000). Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for bland and altman analysis. *Anesth Analg, 90*(3), 593-602.

Mattingly, D. (1962). A simple fluorimetric method for the estimation of free 11-hydroxycorticoids in human plasma. *Journal of Clinical Pathology, 15*(4), 374-379.

McCann, S. J., Gillingwater, S., ve ark. (2005). Measurement of urinary free cortisol using liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with the urine adapted ACS:180 serum cortisol chemiluminescent immunoassay and development of a new reference range. *Ann Clin Biochem, 42*(Pt 2), 112-118. doi: 10.1258/0004563053492775

Merke, D. P., Keil, M. F., ve ark. (2000). Flutamide, testolactone, and reduced hydrocortisone dose maintain normal growth velocity and bone maturation despite elevated androgen levels in children with congenital adrenal

hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab, 85*(3), 1114-1120. doi: 10.1210/jcem.85.3.6462

Mert, M. (2009). *Cushing Sendromu Tanısında Yeni Bir Tanı Yöntemi Olarak Tükürük Kortizolü.* (Yan Dal Uzmanlık Tezi), İstanbul Üniversitesi, İstabul

Miller, W. L. (2009). The Adrenal Cortex and its Disorders *Brook's Clinical Pediatric Endocrinology* (pp. 283-326): Wiley-Blackwell.

Mllford, D. V., Shackleton, C. H. L., ve ark. (1995). Mineralocorticoid hypertension and congenital deficiency of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in a family with the syndrome of'apparent'mineralocorticoid excess. *Clin Endocrinol (Oxf), 43*(2), 241-246. doi: 10.1111/j.1365-2265.1995.tb01923.x

Morineau, G., Boudi, A., ve ark. (1997). Radioimmunoassay of cortisone in serum, urine, and saliva to assess the status of the cortisol-cortisone shuttle. *Clin Chem, 43*(8 Pt 1), 1397-1407.

Murphy, B. E. (1981). Ontogeny of cortisol-cortisone interconversion in human tissues: a role for cortisone in human fetal development. *J Steroid Biochem, 14*(9), 811-817.

Nahoul, K., Daffos, F., ve ark. (1988). Plasma corticosteroid patterns in the fetus. *J Steroid Biochem, 29*(6), 635-640.

Nimkarn, S., Lin-Su, K., ve ark. (2011). Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am, 58*(5), 1281-1300, xii. doi: 10.1016/j.pcl.2011.07.012

Orme, S. M., Price, A., ve ark. (1998). Comparison of the diagnostic utility of the simplified and standard i.m. glucagon stimulation test (IMGST). *Clin Endocrinol (Oxf), 49*(6), 773-778.

Ozan, H. (2005). *Ozan Anatomi*. Ankara: Nobel Kitabevi.

Palermo, M., Gomez-Sanchez, C., ve ark. (1996). Quantitation of cortisol and related 3-oxo-4-ene steroids in urine using gas chromatography/mass spectrometry with stable isotope-labeled internal standards. *Steroids, 61*(10), 583-589.

Porter, C. C., & Silber, R. H. (1950). A quantitative color reaction for cortisone and related 17, 21-dihydroxy-20-ketosteroids. *Journal of Biological Chemistry, 185*(1), 201-207.

Price, C. P., & Newman, D. J. (1997). *Principles and Practice of Immunoassay*: Macmillan Reference Limited.

Roberts, R. F., & Roberts, W. L. (2004). Performance characteristics of five automated serum cortisol immunoassays. *Clin Biochem, 37*(6), 489-493. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2004.01.009

Roland, B. L., & Funder, J. W. (1996). Localization of 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in rat tissues: in situ studies. *Endocrinology, 137*(3), 1123-1128. doi: doi:10.1210/endo.137.3.8603583

Rosner, W. (1991). Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am, 20*(4), 697-720.

Salata, R. A., Jarrett, D. B., ve ark. (1988). Vasopressin stimulation of adrenocorticotropin hormone (ACTH) in humans. In vivo bioassay of corticotropin-releasing factor (CRF) which provides evidence for CRF mediation of the diurnal rhythm of ACTH. *J Clin Invest, 81*(3), 766-774. doi: 10.1172/jci113382

Schmalzing, D., Nashabeh, W., ve ark. (1995). Capillary electrophoresis-based immunoassay for cortisol in serum. *Anal Chem, 67*(3), 606-612.

Shackleton, C. H. L., Rodriguez, J., ve ark. (1985). CONGENITAL 11β-HYDROXYSTEROID DEHYDROGENASE DEFICIENCY ASSOCIATED

WITH JUVENILE HYPERTENSION: CORTICOSTEROID METABOLITE PROFILES OF FOUR PATIENTS AND THEIR FAMILIES. *Clin Endocrinol (Oxf), 22*(6), 701-712. doi: 10.1111/j.1365-2265.1985.tb00160.x

Shibasaki, H., Furuta, T., ve ark. (1997). Quantification of corticosteroids in human plasma by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry using stable isotope dilution. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl, 692*(1), 7-14.

Siekmann, L., & Breuer, H. (1982). Determination of cortisol in human plasma by isotope dilution-mass spectrometry. Definitive methods in clinical chemistry, I. *J Clin Chem Clin Biochem, 20*(12), 883-892.

Skendzel, L. P., Barnett, R. N., ve ark. (1985). Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests. *Am J Clin Pathol, 83*(2), 200-205.

Speiser, P. W., Dupont, J., ve ark. (1992). Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Journal of Clinical Investigation, 90*(2), 584.

<STATUTE-102-Pg2903.pdf>.

Staub, J. J., Noelpp, B., ve ark. (1979). The short metyrapone test: comparison of the plasma ACTH response to metyrapone and insulin-induced hypoglycaemia. *Clin Endocrinol (Oxf), 10*(6), 595-601.

Steele, B. W., Wang, E., ve ark. (2005). Total long-term within-laboratory precision of cortisol, ferritin, thyroxine, free thyroxine, and thyroid-stimulating hormone assays based on a College of American Pathologists fresh frozen serum study: do available methods meet medical needs for precision? *Arch Pathol Lab Med, 129*(3), 318-322. doi: 10.1043/1543-2165(2005)129<318:tlwpoc>2.0.co;2

Stewart, P. M., & Krozowski, Z. S. (1999). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase. *Vitam Horm, 57*, 249-324.

Stewart, P. M., Whorwood, C. B., ve ark. (1995). Type 2 11β-hydroxysteroid dehydrogenase in foetal and adult life. *J Steroid Biochem Mol Biol, 55*(5–6), 465-471. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0960-0760(95)00195-6

Stiefel, P., Garcia-Morillo, J. S., ve ark. (2002). Role of ketoconazole treatment in urinary-free cortisol-to-cortisone and tetrahydrocortisol-to-tetrahydrocortisone ratios in nonectopic Cushing's syndrome. *Endocrine, 18*(3), 279-284. doi: 10.1385/endo:18:3:279

Tai, S. S., & Welch, M. J. (2004). Development and evaluation of a candidate reference method for the determination of total cortisol in human serum using isotope dilution liquid chromatography/mass spectrometry and liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Anal Chem, 76*(4), 1008-1014. doi: 10.1021/ac034966f

Talan, L. (2010). *Septik Şoktaki Hastalarda, Plazma Kortizol Düzeyinin ve Steroid Tedavisinin Mortalite Üzerine Etkileri.* (Uzmanlık Tezi), Gazi Üniversitesi Ankara.

Taylor, R. L., Machacek, D., ve ark. (2002). Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. *Clin Chem, 48*(9), 1511-1519.

TEMD Adrenal Korteks.

Therrell, B. L. (2001). Newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. *Endocrinol Metab Clin North Am, 30*(1), 15-30.

Tietz, N. (2006). *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics-/[ed. by] Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns*: St. Louis, Mo: Elsevier Saunders.

Turnbull, A. V., & Rivier, C. L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev, 79*(1), 1-71.

Turner, A. K., Carroll, C. J., ve ark. (1973). Simultaneous competitive protein binding assay for cortisol, cortisone, and prednisolone in plasma, and its clinical application. *Clin Chem, 19*(7), 731-736.

Turpeinen, U., & Hamalainen, E. (2013). Determination of cortisol in serum, saliva and urine. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 27*(6), 795-801. doi: 10.1016/j.beem.2013.10.008

Ulick, S., Levine, L. S., ve ark. (1979). A syndrome of apparent mineralocorticoid excess associated with defects in the peripheral metabolism of cortisol. *J Clin Endocrinol Metab, 49*(5), 757-764. doi: 10.1210/jcem-49-5-757

Walker, B. R., Campbell, J. C., ve ark. (1992). Mineralocorticoid excess and inhibition of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in patients with ectopic ACTH syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf), 37*(6), 483-492.

Westgard, J. O., & Barry, P. L. (2008). *Basic Method Validation*: Westgard QC.

White, P. C., Mune, T., ve ark. (1997). 11 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase and the syndrome of apparent mineralocorticoid excess. *Endocr Rev, 18*(1), 135-156. doi: 10.1210/edrv.18.1.0288

White, P. C., New, M. I., ve ark. (1986). Structure of human steroid 21-hydroxylase genes. *Proc Natl Acad Sci U S A, 83*(14), 5111-5115.

White, P. C., & Speiser, P. W. (2000). Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Endocr Rev, 21*(3), 245-291. doi: 10.1210/edrv.21.3.0398

Whitworth, J. A., Stewart, P. M., ve ark. (1989). The kidney is the major site of cortisone production in man. *Clin Endocrinol (Oxf), 31*(3), 355-361.

Whorwood, C. B., Franklyn, J. A., ve ark. (1992). Tissue localization of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor. *J Steroid Biochem Mol Biol, 41*(1), 21-28. doi: http://dx.doi.org/10.1016/0960-0760(92)90220-D

Wild, D. (2005). *The immunoassay handbook*: Gulf Professional Publishing.

Wood, L., Ducroq, D. H., ve ark. (2008). Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two commercial immunoassays. *Ann Clin Biochem, 45*(Pt 4), 380-388. doi: 10.1258/acb.2007.007119

Wotiz, H. H., & Chattoraj, S. C. (1973). The role of gas-liquid chromatography in steroid hormone analysis. *J Chromatogr Sci, 11*(4), 167-174.

Wrobel, K. H., & Suss, F. (1999). On the origin and prenatal development of the bovine adrenal gland. *Anat Embryol (Berl), 199*(4), 301-318.

ÖZET

Kortizol adrenal korteksten salınan ana glukokortikoid hormondur. Vücudun strese karşı gösterdiği yanıtın yanında, karbonhidrat, protein ve lipit metabolizmasında da önemli rol oynar. Temel olarak kortikosteroid bağlayıcı globüline, az miktarda albümine bağlanarak plazmada taşınır. Yaklaşık %5'lik kısmı plazmada serbest olarak bulunur. Serbest kortisol fraksiyon aktif olan formdur ve glomerüler filtrasyona uğrar. Karaciğerde metabolize edilir ve glukronid ve sülfat konjugatı şeklinde atılır. Kortizol metabolizmasının değişimi pek çok patolojik durumla ilişkilidir. Hem hipokortizolizm hem de hiperkortizolizm hastalığa neden olur. Plazma kortizol ve ACTH düzeyi ile birlikte idrar kortizol analizi Cushing sendromunun tanısında önemlidir. İdrardaki kortizol/kortizon oranı ve minerelokortikoid fazlalığı sendromu, konjenital adrenal hiperplazi ve adrenal yetmezliğin tespiti için de önemlidir.

Biyolojik sıvılardaki kortizol düzeyinin ölçümü, rutin biyokimya laboratuvarlarında immunoassaylerle gerçekleştirilmektedir. Kullanım kolaylığı, otomasyon uyumu ve yüksek verim bu yöntemin önemli avantajlarındandır. Ancak immunoassay yöntemlerde sıvı-sıvı ektraksiyon ile interfere edici bileşikler elemine edilmesine rağmen, bu yöntemlerde kortizon ve diğer endojen steroid metabolitlerin ve prednizolon gibi sentetik glukokortikoidlerin interferansı bulunmaktadır. Yöntemin diğer bir kısıtlaması da ektraksiyon sürecinde kortizol kaybını dengeleyen bir internal standartın bulunmamasıdır. İmmunoassay yöntemlerin tüm bu sınırlamaları kortizol ölçümünde spesifik kromatografik yöntemlerin geliştirilmesine ışık tutmuştur. Kromatografik metotlar kortizol ölçümünde sadece interferansı azaltmaz, aynı zamanda kortizolün endojen metaboliti olan kortizon ölçümüne de olanak sağlar. Son çalışmalar, kortizol/kortizon oranının ölçülmesinin, 11BHSD aktivitesinin gösterilmesinde, kortizol ve kortizonun endojen metabolitlerinin oranından daha iyi bir gösterge olduğunu vurgulamıştır. Karşılaştırma çalışmaları kromatografik yöntemlerin kortizol miktarını daha doğru ölçtüğünü göstermiştir. Kromatografik yöntemler immunoassay yöntemlere göre Cushing sendromu ve minerelokortikoid fazlalığı sendromunun tanısında daha iyi bir diagnostik değer sağlamaktadır.

Bu çalışmada, kortizol/kortizon analizinde altın standart metot olarak değerlendirilen LC-MS/MS yönteminin metot validasyonu CLSI kurallarına uygun bir şekilde gerçekleştirildi. Yöntem karşılaştırma amacıyla idrar ve serum kortizol düzeyleri LC-MS/MS, ELISA ve kemilüminesans immunassay yöntemler ile çalışıldı.

Metot validasyon parametreleri kapsamında linearite, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, interferans, referans aralık doğrulama, analitik ölçüm limitleri, taşıma, numune satabilitesi, matriks etkisi, dondurma-çözmenin etkisi ve yöntem karşılaştırma çalışmaları yapıldı. Linearite çalışmasında yöntemimiz kortizol için 10000 ve 1.9 µg/L aralığında, kortizon için 200 ve 0.78 µg/L aralığında lineer olarak bulundu. Tekrarlanabilirlik çalışmasından elde edilen en düşük ve en yüksek %CV değerleri kortizol için sırasıyla 0.9 ile 7.6, kortizon için sırasıyla 1 ile 7.1 bulundu. Kortizol ve kortizon için yapılan interferans çalışmasında elde edilen % bias, izin verilen % Bias'ın altındadır. Kortizol için %103 lük, kortizon için 98.8'lik bir geri elde sağlanırken, kantitasyon limiti kortizolde

3.125 µg/L, kortizonda 3.125, dedeksiyon limiti kortizolde 1.56 µg/L, kortizonda 0.78 µg/L olarak belirlendi. Numune aktarım miktarı kortizolde –0.0256, kortizonda ise 0.1458 olarak tespit edildi. Metot karşılaştırma sonucunda kortizol ölçümlerinin LC-MS/MS ile kemilüminesans immunoassayler ve ELISA arasındaki değerlendirmeler literatür ile uyumlu bulundu. CLSI tarafından belirlenen yöntemin kabul edilebilirlik kuralları göz önüne alınarak yapılan performans değerlendirmesinde LC-MS/MS yöntemi kabul edilebilir bulundu.

ANAHTAR KELİMELER: kortizol, kortizon, LC-MS/MS, immunoassay, metot validasyonu

ABSTRACT

Cortisol is a glucocorticoid hormone that is released from adrenal cortex. It plays an important role in carbohydrate, lipid and protein metabolism besides stress response of body. Cortisol is carried in plasma by binding to corticosteroid-binding globulin basically, and binding to albumin in small amounts. Almost 5% percent of cortisol is free form in plasma. Free cortisol fraction is active form and it is exposed glomerular filtration. It metabolized in liver and excreted as the glucuronide and sulfate conjugates. Alteration of cortisol metabolism is related of various pathological cases. Hypocorticolism and also hypercorticolism cause diseases. Cortisol analysis with level of plasma cortisol and ACTH is important for diagnosis of Cushing syndrome. Cortisol-cortisone ratio in urine and apparent mineralocorticoid excess syndrome are important for determination of congenital adrenal hyperplasia and adrenal deficiency.

Cortisol quantification in biological fluids is done by using immunoassays in routine biochemistry laboratories. Ease of use, automation and high throughput are important advantages of this method. Although, interfering substances are eliminated by liquid-liquid extraction in immunoassay methods, interference of endogen steroid metabolites such as cortison and synthetic glucocorticoid such as prednisolan are present in these methods. Another limitation of method is lack of internal standard that compensates of loss of cortisol during extraction process. These disadvantages of immunoassay methods set light to improvement of specific chromatographic methods. Chromatographic methods do not only reduce interference in cortisol quantification, also they facilitate quantification of cortisone that is an endogen metabolite of cortisol. Recent studies emphasize that quantification of cortisol-cortisone ratio is a better indicator than endogen metabolites ratio of cortisol and cortisone to show 11BHSD activity. Comparative studies show that chromatographic methods measure amount of cortisol more correctly. Chromatographic methods provide better diagnostic value for diagnosis of Cushing syndrome and apparent mineralocorticoid excess syndrome compared to immunoassay methods.

In this study, method validation of LC-MS/MS which is a gold standard method for cortisol/cortisone analysis, was done according to CLSI rules. Cortisol levels in urine and serum were studied with LC-MS/MS, ELISA and immunoassay methods for method comparison.

Linearity, repeatability, recovery, interference, reference internal verification, determination limit of detection and limit of quantification, carry over, sensitivity, specificity, stability of samples, effect of matrix, freezing-thawing studies were done within a context of method validation. Our method was found linear in 1.9-10000 µg/Lrange for cortisol and cortisone lineer in 0.78-200 µg/Lrange. Highest and lowest CV% values obtained in repeatiblity study were 0.9 and 7.6 for cortisol and 1and 7.1 for cortisone respectively. According to results of interference study cortisol and cortisone bias % did not exceed the limit of allowable bias % . While 103 % recovery was acquired for cortisol and 98.8 % for cortisone, quantification limit was determined as 3.125 µg/Lfor cortisol, 3.125 µg/Lfor cortisone, detection limit was determined as 1.56 µg/Lfor cortisol and 0.78 µg/Lfor cortisone. Amount of carry over of samples was found as -0.0256 for cortisol and 0.1458 for

cortisone. Method comparison of cortisol results in LC-MS/MS with ratings between chemiluminescence immunoassay and ELISA were found to be consistent with the literature. LC-MS/MS was found acceptable in evaluation of performance according to acceptable rules of method determined by CLSI.

KEYWORDS: Cortisol, cortisone, LC-MS/MS, immunoassay, method validation

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Fatmagül GÜN
Doğum Yeri : Muğla
Medeni Hali : Bekar
E-posta : fggun@hotmail.com
Adresi : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı, Konya

Eğitim

Lise : Ortaca Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Biyoloji Bölümü
Uzmanlık : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı

Yabancı Dil

İngilizce

Katıldığı Kurslar&Kongreler

Kalite Kılavuzları Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları Ve Değerlendirmeleri Kursu
Laboratuvarların Yeni Gözdesi Kütle Spektrometreleri Ve Klinik Uygulamaları Kursu
Temel Hematolojik Testler Kursu
Klinik Laboratuvarda Elektroforez Uygulamaları Kursu
II. Hücresel Sinir Bilim Günleri
Gebelik Ve Koagülopatiler Sempozyumu

12. Ulusal Klinik Biyokimya Kogresi
24. Ulusal Biyokimya Kongresi
25. Ulusal Biyokimya Kongresi
22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
1st International Congress and Workshop of Forensic Toxicology