T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERUM ANDROSTENEDİON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Kamile YÜCEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERUM ANDROSTENEDİON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Kamile YÜCEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2016

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

SERUM ANDROSTENEDİON ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY VE SIVI KROMATOGRAFİ-TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODLARININ KARŞILAŞTIRILMASI

Kamile YÜCEL

DOKTORA TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Tez Danışmanı
Prof. Dr. Ali ÜNLÜ

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13202041 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2016

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Kamile YÜCEL tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı (Danışman)	Prof. Dr. Ali ÜNLÜ Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi	İmza
Üye	Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi	İmza
Üye:	Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi	İmza
Üye:	Doç. Dr. Aysun TOKER Necmettin Erbakan Üniversitesi Tıp Fakültesi	İmza
Üye:	Doç. Dr. Said Sami ERDEM Sağlık Bilimleri Üniversitesi Konya Eğitim ve Araştırma Hastanesi	İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu …… tarih ve …… sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Hasan Hüseyin DÖNMEZ
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübeleri, yol göstericiliği ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, Yrd. Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV, Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK, Doç. Dr. Esma MENEVŞE ve Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA'ya, eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşşekkür ederim.

Laboratuvarımızda birlikte çalıştığım Oğuzhan TOK, Birgül YEŞİLYURT YALÇIN ve Hatice Müge SAMANCI arkadaşlarıma çalışmalarımdaki katkıları için teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan aileme de teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR i
İÇİNDEKİLER ii
SİMGELER ve KISALTMALAR v
ÖZET vii
SUMMARY ix
ÇİZELGELER DİZİNİ xi
ŞEKİLLER DİZİNİ xii

1. GİRİŞ VE AMAÇ 1

2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. Adrenal korteks hormonları 4
2.1.1. Giriş ve biyomedikal önemi 4
2.1.2. Adrenal korteks hormonları ve sentezi 5
2.1.3. Adrenal Steroidlerin Metabolizması 10
2.2. Androstenedion 10
2.2.1. Androstenedion Referans Aralıkları 11
2.2.2. Androstenedion Klinik Önemi ve İlişkili Hastalıklar 12
2.3. Metot Validasyonu 16
2.3.1. Doğruluk (Accuracy) 17
2.3.2. Doğrusallık (Linearite) 18
2.3.3. Analitik Ölçüm Limitleri 18
2.3.4. Tekrarlanabilirlik (Precision) 18
2.3.5. Analitik Duyarlılık (Analitik Sensitive) 19
2.3.6. Analitik Özgüllük (Analitik Spesifiklik) 19
2.3.7. Geri Elde (Recovery) 19
2.3.8. İnterferans 19
2.3.9. Taşıma (Carry-over) 19
2.3.10. Matriks etkisi 20
2.3.11. Referans Aralık Doğrulama 20

2.3.12. Yöntem Karşılaştırma 20

3. GEREÇ ve YÖNTEM 21

3.1. Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve kitler 21

3.1.1. Cihazlar 21

3.1.2. Kimyasallar 21

3.1.3. Kitler 22

3.2. Analiz Yöntemleri 22

3.2.1. ELISA Çalışma Prensibi 22

3.2.2. İmmunoassay Çalışma Prensibi 23

3.2.3. LC-MS/MS Çalışma Prensibi 23

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması 27

3.3.1. BSA Hazırlanması 27

3.3.2. Standart Hazırlanması 27

3.3.3. 11-Deoksikortizol-D5 İnternal Standart Hazırlanması 28

3.3.4. Mobil Faz Hazırlanışı 28

3.3.5. Steroid Free Serum (SFS) Hazırlanışı 28

3.4. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri 29

3.4.1. Doğrusallık (Linearite) 29

3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri 29

3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision) 29

3.4.4. Geri Elde (Recovery) 29

3.4.5. İnterferans 30

3.4.6. Taşıma (Carryover) 31

3.4.7. Matriks Etkisi 31

3.4.8. Referans Aralık Doğrulama 32

3.4.9. Numune Stabilitesi 32

3.4.10. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi 32

3.5. İstatistiksel Analiz 32

4. BULGULAR 34

4.1. Metot Validasyonu Bulguları 34

4.1.1. Linearite çalışması 34

4.1.2. Analitik ölçüm limitleri....35
4.1.3. Tekrarlanabilirlik (Precision)....37
4.1.4. Geri elde (Recovery)....42
4.1.5. İnterferans....43
4.1.6. Taşıma (Carryover)....48
4.1.7. Matriks etkisi....49
4.1.8. Referans Aralık Doğrulama....50
4.1.9. Numune Stabilitesi....51
4.1.10. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi....52
4.2. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması....52
4.2.1. LC-MS/MS ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması....53
4.2.2. LC-MS/MS ve RIA Yöntemlerinin Kıyaslanması....57
4.2.3. RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması....60
4.2.4. LC-MS/MS, ELISA ve RIA Metodlarının ROC İstatistiği İle Kıyaslanması....64
4.2.5. SPSS İstatistik Sonuçları....68

5. TARTIŞMA....70

6. SONUÇ VE ÖNERİLER....74

KAYNAKLAR....75

EKLER....82
EK A: Etik Kurul Raporu....82

ÖZGEÇMİŞ....83

SİMGELER ve KISALTMALAR

Kısaltmalar

ACTH:	Adrenokortikotropik hormon
AR:	Androjen reseptörü
BHSD:	Beta hidroksisteroid dehidrogenaz
BSA:	Bovin serum albümin
CBG:	Kortizol bağlayıcı globülin
CLSI:	Clinical laboratory standard institute
CRF:	Kortikotropin salıverici faktör
CV:	Coefficient of variation
DHEA:	Dehidroepiandrosteron
DOC:	Deoksikortikosteron
ELISA:	Enzyme-linked immunosorbent assay
ESI:	Elektro Sprey İyonizasyon
FSH:	Folikül stümüle edici hormon
GC:	Gaz kromatografisi
GC-MS:	Gaz kromatografisi- kütle spektrometresi
GNRH:	Gonadotropin releasing hormon
HPLC:	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KAH:	Konjenital adrenal hiperplazi
LH:	Luteinleştirici hormon
LC-MS:	Sıvı kromatografisi- kütle spektrometresi
LOB:	Limit of blank
LOD:	Limit of detection
LOQ:	Limit of quantitation
MRM:	Multiple-reaction-monitoring
PBS:	Standart fosfat tamponu
PKOS:	Polikistik over sendromu
RNA:	Ribonükleik asit
RIA:	Radio immunoassay
SD:	Standart sapma
SHBG:	Seks hormon bağlayıcı globülin

VKI: Vücut kitle indeksi

Simgeler

N_2: Azot

NaCl: Sodyum klorür

NaH_2PO_4: Monosodyum fosfat

Na_2HPO_4: Disodyum fosfat

NaOH: Sodyum hidroksit

ppb: Parts per billion

ppm: Parts per million

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Serum Androstenedion Ölçümünde İmmunoassay ve Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) Metodlarının Karşılaştırılması

Kamile YÜCEL
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA–2016

Adrenal bez, üreme çağındaki ve menapoz dönemindeki kadınlarda androjen ve androjen kaynaklı hormonların major kaynağıdır. Androstenedionun aşırı üretimi adrenal steroid biyosentez eksikliğinden, adrenal ve over kökenli tümörlerden, polikistik over sendromundan, androjenlere karşı artan periferal duyarlılıktan ve üretiminden kaynaklanabilir. İlaveten LC-MS/MS gibi doğru hassas steroid ölçüm yöntemi geliştirmek kompleks bileşikleri ayırabilir ve tek numuneden çoklu steroidlerin ayrımında kullanılabilir.

Bu çalışmada CLSI kurallarına göre yeni likid kromatografi tandem mass kütle spektrometre metodu geliştirildi. Geliştirilen bu metod enzim linked immunoassay (ELISA) ve radioimmuno assay (RIA) metodlarıyla mukayese edildi.

Metod validasyon parametreleri içinde linearite, analitik ölçüm limitleri, tekrarlanabilirlik, gerielde, interferans, taşıma, referans aralık doğrulama, numune stabilitesi, matriks etkisi ve dondurma çözmenin etkisi çalışmaları yapılmıştır.

Androstenedion 50 ng/mL ye kadar lineer bulunmuştur. Kantitasyon limiti 0,195 ng/mL, deteksiyon limiti 0,097 ng/mL dir. Bu metod steroid hormonların interferansından ve matriks etkisiden etkilenmemektedir. Taşıma çalışması için düşük konsantrasyonlu numuneler, yüksek kosantrasyonlu numunelerin önüne ve arkasına sırasıyla dizilip ölçüm yapıldı. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Bu çalışmada elde edilen taşıma değeri 0,026 ng/mL olarak bulundu. Androstenedion için herhangi bir taşıma etkisine rastlanmadı. Androstenedion interferans çalışmasının sonuçları izin verilen % bias sınırları içindeydi ayrıca geri elde yüzdesi de % 88,7 olarak bulundu. Yapılan LC-MS/MS metodu CLSI metod validasyon kurallarına göre kabul edilebilir bulunmutur.

LC-MS/MS ve ELISA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 18,412, intercept -22,87 ve r^2

değeri 0,1033 olarak bulunmuştur. LC-MS/MS ve RIA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 1,085, intercept O,4541 ve r^2 değeri 0,3712 olarak bulunmuştur. RIA ve ELISA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 9,57, intercept -15,5 ve r^2 değeri 0,19 olarak bulunmuştur.

Karşılaştırma çalışmaları, kromatografik metodla androstenedion ölçümünün daha doğru sonuçlar verdiğini göstermiştir. Polikistik over sendromlu hastalarda kromatografik metodlar immuno assaylarla kıyaslandığında daha iyi tanı ve teşhis sağlamaktadır.

Bu yöntemle, LC-MS/MS ile androstenedionun doğru, güvenilir ve hassas ölçümü gerçekletirildi. Elde ettiğimiz kalibrasyon eğrileri verileri bu yöntemin rutinde kullanılabilir olduğunu göstermiştir.

ANAHTAR KELİMELER: Androstenedion, LC-MS/MS, immunoassay, metot validasyonu

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

Comparison of Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) Methods in the Measurement of Serum Androstenedione Levels

Kamile YÜCEL
Department of Medical Biochemistry

PhD THESIS/ KONYA-2016

Adrenal glands are the major source of androgens and androgen hormones in reproductive-age and postmenopausal women. Androstenedione is produced in large vast by both the adrenal glands and gonads. Overproduction of androstenedione can be caused by the lack of adrenal steroid biosynthesis, tumors of ovarian and adrenal origin, polycystic ovarian syndrome, increased peripheral sensitivity to androgens, and increased peripheral production of androgens. In addition to improved accuracy and sensitivity for steroid measurements, liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) can distinguish compounds and can therefore be used to quantify multiplesteroids from one sample.

In this study, a new liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) method was developed according to CLSI rules. The developed method was compared with two immunoassay methods which are enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and radioimmunoassay (RIA).

Linearity, determination of limit of detection and limit of quantification, repeatability, recovery, interference, carry over, reference internal verification, carry over, sensitivity, specificity, stability of samples, effect of matrix, freezing-thawing studies were done within a context of method validation.

The androstenedione assay was linear up to 50 ng/mL. Lower limit of quantitation and lower limit of detection were 0.195 ng/mL and 0.097 ng/mL , respectively. This method was not affected by matrix effect and other steroid hormones interferences. For caryyover studies, low concentrations samples was sequentially injected before and after placing at high concentration samples. Averages and standart deviations of the group were calculated. In this study, the obtained carryover value was determined as 0.026 ng/mL . No significant carryover was obtained for androstenedione. According to

results of interference study androstenedione bias % did not exceed the limit of allowable bias % and 88,7 % recovery was acquired for androstenedione. LC-MS/MS method was found acceptable in evaluation of performance according to acceptable rules of method determined by CLSI.

Method comparison between LC-MS/MS and ELISA was found slope value 18,412, intercept value -22,87 and r^2 value 0,1033. Method comporison between LC-MS/MS and RIA was found slope value 1,085, intercept value 0,4541 and r^2 value 0,3712. Method comparison between RIA and ELISA was found slope value 9,57, intercept value -15,5 and r^2 value 0,19.

Comparative studies show that chromatographic methods measure amount of androstenedione more correctly. Chromatographic methods provide better diagnostic value for diagnosis of polycystic ovary syndrome compared to immunoassay methods.

By this method, accurate, reliable and sensitive measurement of androstenedione was analyzed with LC-MS/MS system. Data from calibration curves reveal that this method can be used in routine procedure.

KEYWORDS: Androstenedione, LC-MS/MS, method validation, immunoassay

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 3.1. LC-MS/MS parametreleri 25
Çizelge 4.1. Androstenedion linearite verileri.....34
Çizelge 4.2. Çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları.....37
Çizelge 4.3. Günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları 40
Çizelge 4.4. Androstenedion geri elde çalışma sonuçları. 43
Çizelge 4.5. Androstenedion-DHEA interferans çalışma sonuçları. 44
Çizelge 4.6. Androstenedion-DHEA interferans çalışması % bias sonuçları. 44
Çizelge 4.7. Androstenedion-aldosteron interferans çalışma sonuçları. 45
Çizelge 4.8. Androstenedion-aldosteron interferans çalışması % bias sonuçları.....46
Çizelge 4.9. Androstenedion-kolesterol interferans çalışma sonuçları.....46
Çizelge 4.10. Androstenedion-kolesterol interferans çalışması % bias sonuçları.....47
Çizelge 4.11. Androstenedion taşıma çalışması sonuçları 48
Çizelge 4.12. Androstenedion matriks etkisi çalışma sonuçları.....49
Çizelge 4.13. Androstenedion referans aralık doğrulama çalışması sonuçları.....50
Çizelge 4.14. Numune stabilite çalışma verileri.....51
Çizelge 4.15. Androstenedion dondurma-çözme etkisi çalışma verileri 52
Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol grubu ortalama ve SD'leri 68

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Steroid sentez basamakları 5
Şekil 2.2. Androstenedionun moleküler yapısı.....10
Şekil 3.1. ELISA çalışma-standart eğrisi 23
Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan akış gradienti 26
Şekil 3.3. Çalışmada elde edilen androstenedion (üstteki pik) ve internal standarda ait (alttaki pik) LC-MS/MS pikleri 27
Şekil 4.1. Androstenedion linearite grafiği 35
Şekil 4.2. Androstenedion EP evaluator linearite grafiği verileri.....35
Şekil 4.3. Androstenedion deteksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N) 36
Şekil 4.4. Androstenedion kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N) 36
Şekil 4.5. 20 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı.....37
Şekil 4.6. 2 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı.....38
Şekil 4.7. 0,3 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı 39
Şekil 4.8. 20 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı 40
Şekil 4.9. 2 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı.....41
Şekil 4.10. 0,3 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik 42
Şekil 4.11. Androstenedion caryyover çalışması EP-evaluator analizi sonucu 49
Şekil 4.12. Androstenedion referans aralık doğrulama EP-evaluator analizi sonucu. 51
Şekil 4.13. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması 53
Şekil 4.14. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri. 54
Şekil 4.15. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman grafiği 55

Şekil 4.16. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve verileri. 56
Şekil 4.17. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması 57
Şekil 4.18. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri. 58
Şekil 4.19. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Bland-Altman grafiği 59
Şekil 4.20. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve verileri 59
Şekil 4.21. Androstenedion RIA ve ELISA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması 60
Şekil 4.22. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri 61
Şekil 4.23. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman grafiği 62
Şekil 4.24. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve verileri 63
Şekil 4.25. LC-MS/MS ROC analiz sonuçları 64
Şekil 4.26. ELISA ROC analiz sonuçları 65
Şekil 4.27. RIA ROC analiz sonuçları 66
Şekil 4.28. LC-MS/MS-ELISA-RIA ROC analiz sonuçları 68

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Adrenal bez böbreğin hemen üzerinde, korteks ve medulla tabakalarından oluşur. Ağırlığının % 90'ını oluşturan adrenal korteks, dıştan içe doğru, zona glomerulosa, zona fasikülata ve zona retikülaris olmak üzere 3 zondan oluşur. Zona glomerulosa aldosteron yapımından sorumlu iken, zona fasikülata ve zona retikülaris kortizol ve androjen üretir (Xing ve ark 2011). Tüm adrenal steroidlerin sentezi kolesterol ile başlar. Androjenler 19 karbonlu steroid hormonlardır. Hem erkek ikincil seks karakterlerinin gelişmesi ve sürdürülmesinde hem de östrojen için prekürsör olarak görev alır. Fiziksel mental stresle miktarları değişebilmektedir (Zhang ve ark 2012, Rege ve ark 2013). Androjenlerin başlıcası androstenedion, dehidroepiandrosteron, dehidroepiandrosteron sülfat, testosterondur, zona fasikülata ve zona retikülariste önemli konsantrasyonlarda bulunmaktadır (Swellam ve ark 2013). Overde ise androjenler stroma, teka ve granulosa hücrelerinden salgılanırlar. Androjenik etkiyi belirleyen temel mekanizmalar dolaşımdaki androjen seviyesi, androjen bağlayan proteinlerin miktarı ve androjenlerin östrojene aromatizasyonla çevrimidir (Ghosh ve ark 2011). Androjenler insan fizyolojisinde önemli rol oynamakla birlikte, birçok hastalığın tanısında önemli belirteçdir (Audet ve ark 2011).

Androstenedion adrenal korteks ve gonadlar tarafından dehidroepiandrostenediondan sentezlenen, daha sonra 17 β-hidroksisteroid enzimi tarafından testosterona ya da aromataz enzimiyle östrona dönüştürülen, kadın ve erkek seks karakterlerinin gelişiminde önemli bir prekürsör olan steroid hormondur (Kulle ve ark 2010). Aşırı androstenedion üretimi hirşutizm ve virilizasyona, polikistik over sendromuna sebep olabilmektedir. Prevalansı % 6-7 arasında, yaygın bir endokrin hastalık olan polikistik over sendromlu kadınlarla yapılan çalışmada çoğunda androstenedion seviyelerinin arttığı gösterilmiştir (Cinar ve ark 2012). Androstenedion seviyelerinin pasif sigara içiciliğinde, meme kanseri olgularında da seviyesinin arttığı bilinmektedir (Soldin ve ark 2011).

Çoğu epidemiyolojik çalışmada serum androjen seviyelerini belirlemek için yaygın olarak immunoassaya dayalı metotlar kullanılmıştır. İmmunoassay yöntemlerde standardizasyon tam olarak sağlanamamaktadır (Garrido ve ark 2012). Bu yöntemlerin kendi içerisindeki metodolojik farklılıkları ve kullanılan kitlerin farklı olması ölçüm sonuçlarını etkilemektedir. Bu etkilere bağlı olarak deteksiyon

limitleri ve referans aralıkları da standardize edilememiştir. İmmunoassay yöntemlerde yetersiz antikor spesifitesi ve moleküler izotopların ayrımının tam yapılamaması sorunu da çözüme kavuşamamıştır. Ayrıca her bir steroid molekülü için ayrı analiz yapma zorunluluğu da analizlerin daha pahalı olmasına neden olmaktadır (Minutti ve ark 2004, Stepman ve ark 2011). Yakın zamana kadar steroidlerin analizinde immunoassay yöntemlere iyi bir alternatif olarak gaz kromotografi-kütle spektrometri (GC–MS) yöntemi altın standart olarak görülmüştür. GC–MS, immunoassayların aksine tek seferde çok sayıda maddenin analizini yapma imkânını sağlamaktadır. Ancak GC–MS' in türevlendirme ve analiz işlemlerinin çok zaman alması, bu metodun rutin amaçlı kulanılmasını zorlaştırmaktadır (Hsing 2007, Annesley 2009). RIA ise heterojen bir immüno ölçümdür ve bu ölçüm antijen-antikor reaksiyonunun özgüllüğünü ve radyoaktif materyalin ölçümünden kaynaklanan duyarlılığın avantajlarını kullanır. Acak işaretleyici olarak radyoaktif madde kullanma, radyoaktif atıkların oluşması ve otomatize cihazlara ulaşma zorluğu bu yöntemin kullanımını sınırlandırmaktadır (Colosi ve ark 2009, Keelan ve ark 2012). Son yıllarda sıvı kromatografı–kütle spektrometri (LC-MS/MS) klinik steroidlerin analizinde önemli bir yer tutmaya balamıştır (Annesley 2008). Yöntem, kullanılan immunassay yönteme alternatif bir teknik olarak önerilmekte ve bu yöntemin duyarlılık ve özgünlüğünün birçok analit için yüksek olduğu belirtilmektedir. LC-MS/MS; rutin kullanım için pratiklik, duyarlılık, özgüllük, kısa sürede sonuç verme ve tek seferde çok sayıda analitin sonucunu verbilme özelliğine sahip olmasıyla diğer yöntemlere göre büyük avantaj sağlamatadır (Annesley 2003, Khajuria ve ark 2007). Ayrıca immünoassay temelli metodlarda androstenedion molekülünün metabolitinin de ölçümlerde interferans oluşturması nedeniyle kütle spektrofotometre ölçümleri daha avantajlı görülmektedir (Richard ve ark 2010).

Serum androjen seviyelerinin belirlenmesi steroid metabolizmasıyla ilgili hastalıkların teşhis ve tedavi sürecinde son derece önemlidir. Bu steroid düzeylerinin spesifik ve hassas metodlarla ölçülmesi tanısal doğruluğu etkilemektedir. Rutin olrak kullanılan metodlar genellikle ELİSA ve RIA metodlarıdır. İmmünoassay temelli çalışmalarda antikor spesifitesindeki yetersizlikler testlerin güvenilirliğini sınırlamaktadır. (Faupel-Badger ve ark 2010, Naessen ve ark 2010). Çalışmamızda analiz süresinin kısaltılması hassasiyet ve güvenilirliğin arttırılması (Annesley 2009,

Fanelli ve ark 2011) amacıyla serum androstenedion düzeylerinin ölçümünde LC-MS/MS cihazında yeni bir ölçüm metodu geliştirip rutin ölçümlerde kullanmayı amaçladık.

Bu çalışmada LC-MS/MS yöntemi ile serum androstenedion testi için metot geliştirme çalışması ve bu yöntemin ELISA ve RIA immünoassay yöntemleriyle kıyaslaması yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenal korteks hormonları

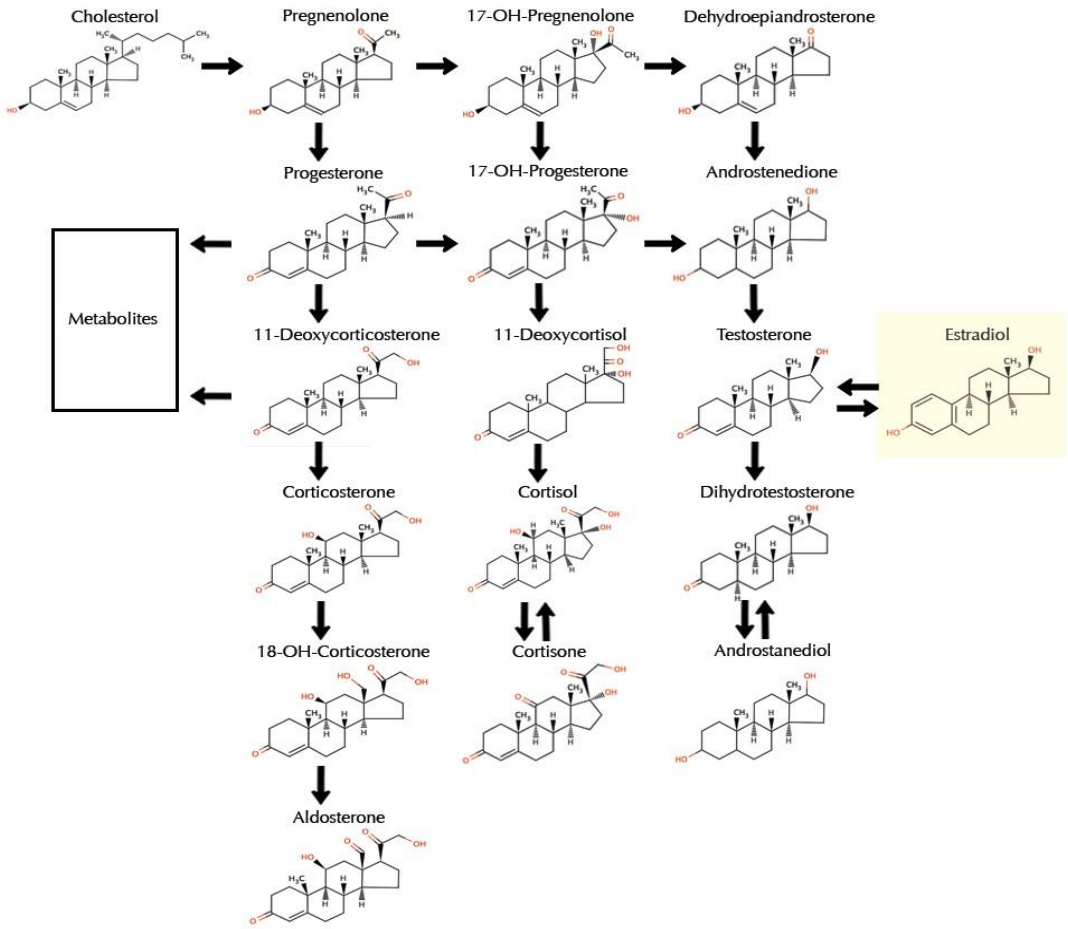
2.1.1. Giriş ve biyomedikal önemi

Böbrek üstü bezleri, yaşam için zorunlu olan ve organizmanın genel fizyolojk düzenini sağlamada iş gören, insanda onbirinci torakal vertebralar hizasında, retroperitoneal olarak her bir böbreğin üst kutbunun hafif iç tarafına yerleşmiş bir çift endokrin organdır. Adrenal bezler piramit şeklindedir ve yaklaşık 2-3 cm genişliğide, 4-6 cm uzunluğundadır. Toplam ağırlıkları insanda 8-15 gr. arasında değişir ve sol böbreküstü bezi sağdakinden daha ağırdır (Xing ve ark 2011).

Fonksiyonel, histolojik ve embriyolojik açıdan birbirlerinden tamamen farklı korteks ve medulla bölümlerinden oluşan böbrek üstü bezinden fizyolojik etkileri farklı hormonlar salgılanmaktadır (Gallo 2016).

Adrenal medulla, akut ve kronik stres yaratan durumlarda (egzersiz, hipoglisemi, korku, soğuk vs.) kana çok fazla katekolamin salgılanır. Bu sebeple adrenal medulla, acil durumlarda kullanılan bir organ olarak kabul edilebilir (Guyton 2007).

Adrenal kortekste az bir kısmı hormonal aktiviteye sahip, birbirinden farklı yapılarda 50 kadar steroid sentez edilmektedir. Hayati önem taşıyan ve hormonal aktivite gösteren steroidler glukokortikoidler, mineralokortikoidler ve adrenal androjenlerdir (Lois ve ark 2014).



Şekil 2.1. Steroid sentez basamakları (www.humpath.com/spip.php?article14158).

2.1.2. Adrenal korteks hormonları ve sentezi

Adrenal korteksin farklı bölgelerinde değişik enzimlerin bulunması nedeniyle farklı spesifik hormonlar sentez edilmektedir. Adrenal kortekste kapsülün hemen altındaki bölge olan zona glomerulosada en önemli mineralokortikoid olan aldosteron sentez edilmektedir. Adrenal korteksin diğer bölümleri olan zona fasikülata ve zona retikülariste glukokortikoidler ile androjenler üretilir (Xing ve ark 2011).

Adrenal korteks tarafından üretilen hormonların öncülü kolesteroldür. Başlagıç maddesi kolesterol olan steroidogenezde görev alan enzimler, mitokondri ve endoplazmik retikulumda bulunmaktadır. Adrenal korteksin her tabakasındaki aktif kortikosteroid sentezi sırasında kolesterol molekülü steroidogenez adı verilen bir dizi değişikliğe uğramaktadır. Kolesterol, 5 ve 6 karbonu arasında bir çift bağ ve 17. pozisyonunda bir sekiz karbonlu alifatik yan grup ihtiva eder (Summers ve ark 2014). Normal koşullarda steroid sentezinde kullanılan kolesterolün büyük bir kısmı

plazma kolesterol esterlerinden elde edilmektedir. Adrenal bez, adrenokortikotropik hormon (ACTH) tarafından uyarıldığında aktif hale geçen kolesterol esterazlar, steroid sentezinde kullanılan kolesterolü açığa çıkarmaktadır (Imrich ve ark 2014).

Kolesterolden pregnenolon oluşumu steroid biyosentezindeki ilk ve hız kısıtlayıcı basamaktır. Tepkimede kolesterolün yan zinciri, sitokrom P_{450} yan zincir ayıran enzimin katalitik etkisi ile ayrılır ve 27 karbonlu kolesterolden 21 karbonlu pregnenolon meydana gelmektedir (Mula-Abed ve ark 2014).

Mineralokortikoidler

Zona glomerülosada sentez edilen mineralokortikoidlerin en etkilisi aldosterondur. Mineralokortikoid aktivitesi olan diğer bileşikler, 11-deoksikortikosteron, kortikosteron ve kortizoldür(Ferrari 2010).

Mineralokortikoidlerin sentezi ve taşınması

Aldosteron sentezinin ilk aşamasında mitokondride pregnenolon sentezlenmektedir. Pregnenolon 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaz (3β -OHSD) ve $\Delta^{5,4}$ izomerazın katalitik etkisi ile progesterona dönüştürülmektedir. Progesteron 21. karbonunda hidroksillenerek aktif Na^{+} tutucu bileşik olan 11-deoksikortikosteron (DOC) oluşmaktadır. Bundan sonraki aşamada, mitokondride 11β-hidroksilazın katalitik etkisi ile kortikosteron elde edilmektedir. Daha sonra 18-hidroksilaz ve 18-hidroksidehidrogenazın etkisi ile aldosteron oluşmaktadır. 18-hidroksidehidrogenaz sadece zona glomerulosa hücrelerinde bulunduğu için aldosteron sentezi, sadece bu bölgede gerçekleşmektedir (Ikushiro ve ark 1992, Ferrari 2010).

En güçlü doğal mineraokortikoid olan aldosteron özgül bir plazma taşıyıcı proteine sahip değilse de albüminle çok zayıf bir birlik oluşturur. (Adams ve ark 2015).

Mineralokortikoidlerin regülasyonu ve fonksiyonu

Zona glomerulosada sentez edilen aldosteronun salgılanması fizyolojik koşullarda ekstrasellüler sıvıdaki potasyum konsantrasyonu ve renin-anjiotensin sistemi tarafından düzenlenmektedir. Ekstrasellüler sıvıda bulunan potasyum iyonları, aldosteron sentezinin son basamağında etkili olan ve zona glomerülosaya özgü potasyuma duyarlı 18-hidroksidehidrogenazın aktivitesini düzenleyerek, aldosteron sentezini doğrudan etkilemektedir. Bir asit proteaz olan renin, böbreğin

jukstaglomerüler hücrelerinde sentez edilen anjiotensinojenden hidroliz ile anjiotensin I oluşumunu sağlamaktadır. Anjiotensin I, doğrudan zona glomerülosayı etkileyen ve güçlü bir vazoaktif madde olan anjiotensin II ye çevrilmektedir. Anjiotensi II, kolesterolden pregnenolon oluşumu ile 18-hidroksilaz ve 18-hidroksidehidrogenazın etkili olduğu tepkimeleri hızlandırarak aldosteron salıverilmesini uyarmaktadır (Spat ve ark 2016).

Glukokortikoidler

Glukokortikoidlerin en etkilisi olan kortizol, 17 α-hidroksilaz enziminin bulunduğu zona fasikülata ve az bir kısmı da zona retikülariste sentez edilmektedir. Metaboliti olan kortizon ikinci derecede önemlidir.

Glukokortikoidlerin sentezi ve taşınması

İnsanda en etkili glukokortikoid olan kortizol, pregnenolondan sentez edilmektedir. 3β-hidroksioksidasyon sonrasında oluşan çift bağın $\Delta^{5,4}$ izomerizasyonu ve sırası ile 17., 21., ve 11. karbonların hidroksilasyonu ile kortizol oluşmaktadır.

Kortizol plazmada proteine bağlı ve serbest şekilde bulunur. Ana plazma bağlayıcı protein transkortin veya CBG dir. Plazma kortizol düzeyi normal sınırlar içindeyken hormonun çoğu CBG tarafından bağlanır. Çok daha az miktarda kortizol albümine bağlanarak taşınır (Özbek 1996).

Glukokortikoidlerin regülasyonu ve fonksiyonu

Kortizolün sentez edilmesi ve salgılanması, hipotalamik kortikotropin salıverici faktör (CRF) ve kontrolü altındaki ACTH tarafından düzenlenmektedir. Hedef organda sentezlenip salıverilen kortizol ise bunların salıverilişini negatif geri beslenme ile durdurmaktadır. ACTH, adrenal kortikal steroid sentezini, kolesterolün adrenal kortikal hücrelere alınışını, depolanmış kolesterol esterlerinin hidrolizini ve kolesterolün yan zincirinin koparılması sonucunda pregnenolon oluşumunu hızlandırarak etkilemektedir. Buna bağlı olarak zona fasikülatada temel steroidlerden kortizol ve kortikosteron oluşumu, zona retikülariste ise dehidroepiandrosteron (DHEA) ve dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-SO_4) gibi androjenlerin sentez hızı artmaktadır (Friedrich ve ark 2008).

Temel glukokortikoid olan kortizol, glukoneogenez enzimlerinin sentezinin hızını arttırarak kan glukoz konsantrasyonlarını hızla yükseltir, glikojen sentazı aktifleştirerek ve glikojen fosforilazın inhibisyonunu sağlayarak karaciğer glikojen miktarını arttırır ve hem kas hem de yağ dokuda insülin direnci oluşturarak kan glukoz seviyesini daha fazla yükseltmektedirler. Kortizolün hipersekresyonu veya farmakolojik dozları; kas, bağ dokusu, kemik ve deri gibi periferal dokularda protein katabolizmasını artırırken, protein sentezini azaltmaktadır.

Birçok dokuda nükleik asit sentezini baskılayan kortizol, karaciğerde RNA sentezini uyarmaktadır. Fizyolojik düzeylerde anabolik etkili olan bu hormon düzeylerinin artması ise katabolizmanın hızlanmasına sebep olmaktadır (Tietz 2006).

Konakçının savunma mekanizmasını etkileyen kortizol, anti-inflamatuvar ve immunosüpresif etki göstererek hücresel immuniteyi bozmaktadır. Glukokortikoidler, bazofiller ve mast hücrelerinin histamin üretmesini inhibe ederek, hipersensitiviteyi bastırmaktadır. Glukokortikoid düşük dozlarda kişinin ruh halini iyileştirebilir, ancak farmakolojik konsantrasyonlarda, psikoza neden olabilmektedir (McGregor 2016).

Adrenal androjenler

Adrenal korteks kökenli başlıca androjenler DHEA, DHEA-SO_4 ve androstenediondur.

Adrenal androjenlerin sentezi ve taşınması

Adrenal korteks tarafından sentezlenen androgenlerin öncül bileşiği DHEA dır. DHEA' ya sülfat (SO_4) grubunun eklenmesi sonucunda oluşan DHEA-SO_4 inaktiftir. Yapıdan sülfat grubunun ayrılmasıyla tekrar aktifleşebilmektedir. DHEA, bir prohormondur ve bu prohormon 3β -OHSD ve $\Delta^{5,4}$ izomerazın katalitik etkisi ile kendinden çok daha aktif bir bileşik olan androstenediona çevrilmektedir. Adrenalde 17α-hidroksiprogesterona (17-OHP) 17,20-liyazın etkisi ile az miktarda androstenedion oluşmaktadır (Van den Ouweland and Kema 2011).

Androstenedionun 17. karbonu indirgenerek en güçlü adrenal androjeni olan testosteron sentez edilmektedir. Bu yolla adrenalde az miktarda testosteron meydana gelmektedir. Adrenal androjenlerin sentezi mitokondri enzimleri gerektirmediğinden endoplazmik retikulumda tamamlanmaktadır (Guyton 2007).

Adrenal androjen sentezinin anatomik lokasizyonu hakkındaki tartışmalar devam etmektedir. Geleneksel olarak, adrenal androjenlerin özellikle zona retikülarisde sentezlendiği bilinmektedir. Bununla birlikte, 17-hidroksilaz aktivitesi daha önce tarif edilmiş, 17,20- liyaz (17,20-desmolaz) enzimatik aktivitesi, 17-alfa-hidroksipregnenolonu DHEA'ya, 17-OHP'yi androstenediona dönüştürmektedir. Bu nedenle androjenler teorik olarak, zona fasikülata ve zona retikülarisin her ikisinin de içinde sentezlenebilir (Ferraldeschi ve ark 2013).

Adrenal korteksin ana ürünü adrenal androjenlerin toplam sentezi 20 ile 25 mg/gün'ü aşmaktadır. Bir yetişkinde DHEA, DHEA-SO_4, androstenedion ve testosteronun sekresyon hızı sırasıyla 6-8 mg/gün, 8-16 mg/gün, 1,5 mg/gün, 0,05 mg/gündür (Onat 2006).

Steroid hormonlar adrenal veya gonadlar gibi sentez edildikleri organlarda depolanmadan plazmaya salıverilmektedir. Adrenal androjenler, DHEA, DHEA-SO_4 ve androstenedion periferde testosterona dönüşerek androjenik etkilerini gösterirler ve androjen reseptörüne (AR) bağlanmaktadır (Labrie ve ark 2005, Shiraishi ve ark 2008).

Adrenal androjenlerin regülasyonu ve fonksiyonu

Adrenal androjen sentezi ve salgılanmasının düzenlenmesi yeterince anlaşılamamıştır. Bir hipofiz adrenal androjen-uyarıcı hormon veya kortikal androjen-uyarıcı hormon varlığı yıllardır araştırılmasına rağmen hala şüphelidir (Imrich 2014). En iyi karakterize edilmiş androstendion ve DHEA sekresyon düzenleyicisi ACTH'dır. Adrenal androjen konsantrasyonlarının diürnal ritmi kortizol değişimleriyle paralellik göstermektedir. Bununla birlikte erkek ve kız çocuklarında prepubertal ve pubertal adrenal androjen sentezindeki normal artış, adrenal androjenlerin ACTH regülasyonu ile açıklanamaz. Çünkü ACTH miktarı puberte öncesi artmamaktadır. Kanıtlar, zona retikülarisin sempatik invervasyonun bulunduğuna ve adrenal androjen salgısını düzenlediğine işaret etmektedir (Imrich ve ark 2014).

Erkeklerde ikincil seks karakteristiklerini (kıllanma ve ses kalınlaşması gibi) düzenleyen androjenler, kadınlarda virilizme sebep olmaktadır. Zayıf androjen olan DHEA ve androstenedion dokularda testosterona çevrilerek etkilerini göstermektedir (Kushnir ve ark 2010, Haring ve ark 2012).

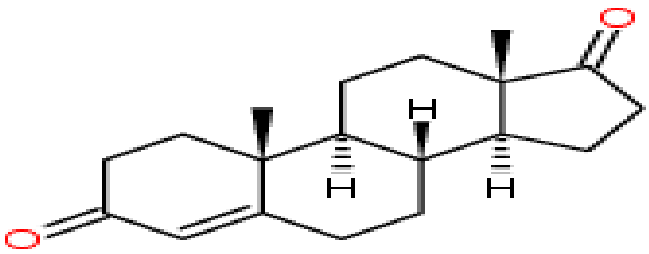
2.1.3. Adrenal Steroidlerin Metabolizması

Steroidlerin inaktif hale getirilmesinde temel organ P_{450} enzim sistemleri sebebiyle karaciğerdir. Kortizolün ve aldosteronun A halkası indirgenmekte ve 3. karbon atomundaki hidroksil grubu glukronik asitle ve az miktarda sülfat ile konjuge edilmektedir. Kortizolün temel metaboliti tetrahidrokortizol 3-glukuronid, aldosteronun temel metaboliti ise tetrahidroaldosteron 3-glukuroniddir (Onat 2006).

Androjenler ise 17-keto bileşikleri halinde atılır. Steroid hormonların atılımının içerdiği basamaklar; hidroksilasyon, dehidrojenasyon, çift bağların indirgenmesi ve sülfat veya glukuronid grupları ile konjugasyondur. Steroidlerin indirgenmesi ve onların sülfat veya glukuronik asitlerle konjugasyonu, idrardaki çözünürlüğünü artırmakta, onların atılımını hızlandırmaktadır. Konjuge steroidlerin yaklaşık % 90'nı böbrek tarafından atılmaktadır (Blouin ve ark 2006).

2.2. Androstenedion

Steroid yapısında, 19 karbonlu bir molekül olan androstenedion, böbreküstü bezinde, testislerde ve overlerde bulunur. DHEA, 3β-OHSD ve $\Delta^{5,4}$ izomerazın katalitik etkisi ile kendinden çok daha etkin bir bileşik olan androstenediona çevrilmektedir. Adrenalde 17α-hidroksiprogesterona 17,20-liyazın etkisi ile az miktarda androstenedion oluşmaktadır. Androstenedionun 17. karbonu indirgenerek en güçlü adrenal androjeni olan testosteron sentez edilmektedir. Bu yolla adrenalde az miktarda testosteron meydana gelmektedir (Leder ve ark 2000, Ferraldeschi ve ark 2013).



Şekil 2.2. Androstenedionun moleküler yapısı (https://en.wikipedia.org/wiki/Androstanedione).

Steroidogenezin ilgili kısımlarında meydana gelen bozukluk, serum androstenedion konsantrasyonunu etkiler. Adrenal kaynaklı androstenedionun üretimi ACTH'ın kontrolü altındadır. Gonadal androstenedion üretimi ise gonadotropinler tarafından kontrol edilir.

Androstenedion adrenal bez ve overler tarafından yaklaşık olarak aynı miktarlarda üretilmektedir. Testosterondan daha az potenttir fakat aşırı konsantrasyonlarda androjenlerin biyolojik etkinliğini gösterir (Reilly and Crouch 2004). Kadınlarda androjen kaynağı adrenal korteks ve overdir. Genellikle, androstenedion ve testosteron over androjen salgısının; dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-SO_4) ise adrenal salgının en iyi belirteci konumundadır. Adrenal bezler, büyük miktarda salgıladıkları DHEA-SO_4'in yanı sıra androstenedion ve DHEA' da salgılamaktadırlar. Normal adrenal bezler tarafından üretilen testosteronun miktarı ise oldukça azdır (Nishii ve ark 2012, Botelho ve ark 2013, Hadrup ve ark 2013).

Androstenedion ve DHEA'nın androjenik aktivitesi hemen hemen yoktur, ancak dokular tarafından biyolojik olarak aktif testosterona dönüştürülebilirler; androstenedionun yaklaşık %5'i, DHEA'nınsa daha az bir kısmı aktif hale dönüştürülmektedir (Miller ve ark 2001, Ford 2013). Bu sebeple, testosteronun anormal artışları genellikle kadında neredeyse tamamı ve erkekte 2/3'ü adrenal korteks androjenlerine ait olduğu söylenmektedir (Friedrich ve ark 2008).

2.2.1. Androstenedion Referans Aralıkları

Pediatrik:

Premature bebekler

26-28 haftalık: 4: 92-282 ng/dL

31-35 haftalık: 4: 80-446 ng/dL

Yeni doğan

1-7 günlük: 20-290 ng/dL

1 ay-1 yıl: <69 ng/dL

Yetişkin:

Erkek: 40-150 ng/dL

Kadın: 30-200 ng/dL (Soldin ve ark 2003).

2.2.2. Androstenedion Klinik Önemi ve İlişkili Hastalıklar

Klinik uygulamalarda konjenital adrenal hiperplazi, kadınlarda virilizasyon, hirşutizm, PKOS gibi durumların teşhis ve tedaviye alınan cevabın izlenmesi amacıyla kullanılır (Newell Fugate ve ark 2014).

Primer ve sekonder adrenal yetmezlik ve over yetmezliğinde miktarı azalırken PKOS, hirşutizm, konjenital adrenal hiperplazi, cushing sendromu, ektopik ACTH üreten malingniteler ve over tümörlerinde miktarı artar (Lacey ve ark 2004, Woolcott ve ark 2010, Ryan ve ark 2014).

Androstenedion ve DHEA, kadınlarda bulunan başlıca androjenlerdir. Kendisi zayıf bir androjen olan androstenedion, normal bir kadında, adrenal glandlardan ve overlerden hemen hemen birbirine yakın miktarlarda üretilir (Janse ve ark 2011). Androstenedion, periferik dokularda testosteron ve dihidrotestosterona dönüşerek hirşutizm patogenezinde rol oynar. Hirşutizm vakalarının yaklaşık % 60 kadarında serum androstenedion konsantrasyonunun yüksek bulunduğu bildirilmektedir (Szulc ve ark 2003, Panidis ve ark 2013). Aynı şekilde obez kadınlarda, androstenedionun yağ dokusunda östrojenlere dönüşümü endometrial hiperplaziden sorumlu olabilir (Audet ve ark 2011, Stolzenberg-Solomon ve ark 2012).

Adrenal yetmezlik

Adrenal yetersizlik, hipotalamus hipofiz patolojileri sebebiyle, adrenal korteksten glukokortikoid ve mineralokortikoidlerin sentezlenme ve salgılanma kusurudur. Adrenal yetmezlik adrenal korteksin bizzat kendisinden kaynaklanıyor ise primer adrenal yetmezlik, ACTH eksikliği sonucu meydana gelmiş ise sekonder adrenal yetmezlik adını alır (Akça ve ark 2003).

Primer adrenal yetmezliğin en yaygın nedeni otoimmün adrenal hastalık, sekonder adrenal yetmezliğin en sık nedenleri ise eksojen glukokortikoid kullanımı ve hipotalamik-hipofizer bölgenin tümörleridir (Günöz 2008).

Konjenital adrenal hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH) adrenal korteksteki kortikosteroid sentezinin oluşmasını engelleyen, bu sebeple de adrenal bezlerde hiperplaziye yol

açan bir grup otozomal resesif kalıtımla geçen enzim eksikliğidir. KAH yeni doğan bebeklerde 1/10.000- 14.000 arasındaki sıklıkta görülür (Schreiner ve ark 2009, Methline ve ark 2013).

Kortizol biosentez yolu ile ilgili enzimlerden birinde (kolesterol yan zincir yıkım enzimi, 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaz, 17-hidroksilaz, 21-hidroksilaz ve 11-hidroksilaz) oluşan bir defekt KAH oluşumdan sorumludur. En sık görülen enzim defekti 21-hidroksilaz eksikliğidir (Dudzinska ve ark 2014). 21- hidroksilaz eksikliğinde ACTH fazlalığı ve kortizol biyosentezindeki metabolik blok, adrenal adrojenler, DHEA, ve androstenedionun fazla üretimi ile sonuçlanır (Sarafoğlou ve ark 2011).

Azalan kortizol sentezi sonucu hipotalamik-hipofizer düzeydeki azalan negatif feedback etkiyle CRH / ACTH artar. Özetle, yüksek ACTH seviyeleri adrenal hiperplaziye ve aşırı androjen üretimine sebep olur (Mula-Abed ve ark 2013). Bu aşırı üretim de doğum sonrası virilizasyon, dış genital organlarda değişen derecelerde hiperpigmentasyon, hızlı büyüme, pubik kılların erken görülmesi, epifizlerin erken kapanması ve kısa erişkin boyu gibi bulgulara neden olmaktadır (Schreiner ve ark 2009, Sarafoğlou ve ark 2011, Ferreira ve ark 2013) .

Polikistik over sendromu

PKOS; günümüzde genç üreme çağındaki kadınlarda sıklıkla görülen ve sosyal yaşamı ileri derecede etkileyebilen, önceleri daha dar açıdan değerlendirilmiş ama son zamanlarda daha ayrıntılı irdelendiğinde tüm vücudu etkileyen multifaktoriyel ve sistemik bir sendrom olarak karşımıza çıkmaktadır. Genellikle adet düzensizliği, tüylenmede artış, akne, infertilite, obezite şeklinde klinik semptomları vardır, fakat zamanla kardiyovasküler ve endokrin sistemi etkileyen uzun dönem kötü sonuçları olabilir. Belirti ve bulgular, kişilerde zamanla değişebildiği gibi bireyler arasında da farklılıklar gösterebilir (Gluszak ve ark 2012, Kruszynsa ve ark 2014).

PKOS'un ilk olarak 1935 yılında Stein ve Leventhal adlı bilim adamları tarafından tanımlandığı kabul edilir. Bu iki bilim adamı yayınladıkları makalede; aşırı tüylenme, adet görememe, gebe kalamama, aşırı kilo alma ve diğer bazı belirtilerden oluşan bir sendrom olarak sunmuşlar ve yumurtalıklarda çok sayıda kistik oluşumdan bahsetmişlerdir. PKOS reprodüktif dönemdeki kadınların % 5-10 unda görülmektedir (Yıldırım ve Memişoğulları 2011, Akın 2012).

PKOS tanı kriterleri

1990 National Institutes of Health (NIH) tanı kriterleri

1. Kronik anovulasyon ve

2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları

* Tanı için bu bulguların aynı anda bulunması gereklidir

2003 Rotterdam tanı kriterleri

1. Oligo-anovulasyon

2. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm bulguları

3. Polikistik overler

*Tanı için yukarıdaki kriterlerden en az ikisinin sağlanması gereklidir

2006 Androgen Excess and PKOS Society tanı kriterleri

1. Hiperandrojenizm (hirsutizm ve/veya hiperandrojenemi)

2. Over disfonksiyonu (oligo-anovulasyon ve/veya polikistik over)

2009 Androgen Excess and PKOS Society tanı kriterleri

1. Klinik ve/veya biyokimyasal hiperandrojenizm

2. Over disfonksiyonu (ovulasyon bozukluğu ve/veya polikistik yumurtalık morfolojisi)

* Tanı için yukarıdaki iki kriterin aynı anda bulunması gereklidir

PKOS tanısı icin kullanılan her üç kriterin de güçlü yanları ve sınırlılıkları bulunmaktadır. Şu anda PKOS için kullanılan geçerli kabul edilen tanı kriterleri hiperandrojenizm (klinik ve/veya biyokimyasal bulgu), oligo-ovulasyon (veya anovulasyon) ve/veya polikistik over bulgularıdır. Bununla beraber, klinik özellikler geniş bir dağılım gösterdiğinden dolayı kadınların fenotipine bağlı olarak PKOS görülme sıklığı da değişkenlik gösterebilmektedir (Evliyaoğlu 2011, Cinar ve ark 2012, Rotterdam ESHRE/ASRM 2004).

PKOS etyopatogenezi ve patofizyolojisi tam olarak aydınlatılamamıştır (Barth ve ark 2010). Fakat genetik yatkınlık, gonadotropin salgı ve over steroid sentez bozukluğu, insülin rezistansı ve kompansatuar hiperinsülinemi, hiperandrojenemi,

enzimatik defektler patogenezde önemli rol oynamaktadır. Son yıllarda en çok suçlanan neden insülin direnci ve buna karşı ortaya çıkan kompansatuar hiperinsülinemidir. PKOS olgularında insülin direnci varlığı ve bunun hiperandrojenizm ile ilişkisi net olarak gösterilmiştir (Pasquali ve ark 2011, Özdemir ve ark 2014). İnsan overleri kendine özgü insülin reseptörleri içermektedir. İnsülinin çeşitli çalışmalarda granüloza ve teka hücrelerinde steroid hormon sentezini uyardığı gösterilmiştir. İnsülinin over dokusunda teka hücre proliferasyonunu, luteinizan hormon reseptör ve insülin benzeri büyüme faktörü-I reseptör düzeyini arttırdığı gösterilmiştir. Luteinleştirici hormon (LH) uyarısına yanıt olarak ovariyen teka hücreleri androjen sentezler. Androjen biyosentezi sitokrom p450c17 enzim sistemi (17α hidroksilaz ve 17,20 liyaz aktiviteleri) ile sağlanır. Sentezlenen androstenediondan, 17 βHSD ile testosteron veya aromataz enzimi ile östron oluşur. Yapılan çalışmalarda in vivo ve in vitro polikistik ovariyen teka hücrelerinin normal teka hücrelerine göre androjenik öncüllerden daha fazla testosteron sentezlediği gösterilmiştir (Yıldırım ve Memişoğulları 2011, Yıldız ve ark 2012, Lerchbaum ve ark 2014).

PKOS patogenezinde bir diğer bozukluk follikülogenezdeki anormalliklerden kaynaklanan fonksiyonel over hiperandrojenizmine bağlı intra overyan androjen fazlalığıdır. Polikistik overler sağlıklı overlerden daha fazla sayıda primer, sekonder ve küçük antral folliküllere sahiptir. PKOS'ta follikül sayısındaki bu artışın nedeni bilinmemektedir. Sağlıklı bayanlarda androjenler eşit miktarlarda hem adrenal bez hem de overlerden salınmaktadır. PKOS'lu bayanlarda ise androjenlerin ana kaynağı özellikle androstenedion salgılayan overlerdir. Dolaşımdaki androstenedion ise periferal dokularda, örneğin adipoz doku ve ciltte testosterona dönüşmektedir. Artmış androjen düzeyi ise karaciğerde üretilen, testosteronu bağlayan protein olan seks hormonu-bağlayıcı globulini (SHBG) azaltmakta, böylece biyolojik olarak aktif olan serbest testosteron düzeyi artmaktadır (Jamal ve ark 2004, Miri ve ark 2014, Tekiş ve ark 20014).

Obezite PKOS'ta sıklıkla görülebilen bir bulgudur. VKI (vücut kitle indeksi) 25 üzeri ise kişi kilolu, VKI 30 üstü ise obez olarak değerlendirilmektedir. Olguların %50'sinden fazlası obezdir. Android obezite şeklinde tanımlanan bu durumda yağ birikimi santraldir (Lerchbaum ve ark 2014). Ayrıca artmış bel/kalça oranı insülin direncine işaret etmektedir. PKOS'lu kadınların, PKOS'lu olmayan benzer yaş

gruplarındaki kadınlara göre metabolik sendrom geliştirme olasılığı dört kat daha fazladır. Obezitenin metabolik sendrom gelişimine katkıda bulunduğu bilinmektedir. PKOS hastalarındaki hormon değişikliklerinin obezite-metabolik sendrom kısır döngüsünü başlatmada etkin rol oynadığı düşünülmektedir. Günümüzde üreme çağındaki kadınların %5-10'unun, infertil kadınların ise %15-20'sinin PKOS'tan etkilendiği tahmin edilmektedir (Kruszynska ve ark 2014, Miri ve ark 2014).

2.3. Metot Validasyonu

Geçerli kılma yani validasyon, işlem, süreç, sistem ya da metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması, kullanım amacını karşılayıp karşılamadığının gösterilmesi için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Metot validasyonu bir hata değerlendirme sürecidir. Analitik hatalar belirlenir, tanımlanır ve değerlendirilir (Westgard 2008, Salihoğlu ve ark 2011). Tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya bir çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Bir laboratuarda kullanılacak her türlü metot rutin analiz için kullanılamadan önce laboratuar koşullarında analiz yapan kişiler tarafından valide edilmesi gerekmektedir.

Metot validasyonun amacı seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte (performansta, kalitede) sonuç verdiğini test etmek ve metodun rutin kullanımı sırasında istenen performansı sağlamasının koşullarını belirlemek ve kontrol altında tutmaktır. Bir metotla yapılan ölçümün sonuçları; laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek ölçülerek ölçüm sonucuna etkileri belirlenmeli ve ölçülmelidir (Ellison ve ark 2000).

Belli bir kalite sistemine uygun çalışan laboratuvarların kullandıkları metotları valide etmeleri gerekmektedir ve akredite laboratuarlar için bu bir gerekliliktir. Kalite sisteminin yaygınlaşması laboratuvarlarda metot validasyonu çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir.

Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansını çeşitli faktörler etkilemektedir. Bu sebeple ölçüm metodunun çok iyi tanımlanması gerekmektedir. Analiz edilen örneğe, analiz edilen bileşenlerin cinsine ve miktarına bağlı olarak farklı metot kullanmak gerekebilmektedir. Belli bir analiz için çok değişik metotlardan hangisinin uygulanacağı analiz edilen örnek cinsine, analiz

edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodunun uygulama kolaylığına, analiz süresine, analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak bir değerlendirme sonucunda belirlenmelidir.

Metot validasyon parametreleri:

Doğruluk (Accuracy)

Analitik aralık (Linearite)

Analitik ölçüm limitleri

Tekrarlanabillirlik (Precision)

Analitik duyarlılık (Analitik sensitive)

Analitik özgüllük (Analitik spesifiklik)

Geri elde (Recovery)

İnterferans

Taşıma (Carry-over)

Matriks etkisi

Referans aralık doğrulama

Yöntem karşılaştırma

2.3.1. Doğruluk (Accuracy)

Doğruluk elde edilen değer ile gerçek değerin yakınlığının ifadesidir. Ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark sistematik hata (bias) olarak tanımlanır (Ellison ve ark 2000). Doğruluğun göstergesi sistemik hatadır. Sistematik hata bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini belirtir. Sistematik hatanın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen referans yani gerçek değer bilinmelidir. Gerçek değer sertifikalı referans materyallerden, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir. Bu üç yöntemde de ortak nokta gerçek değerin birçok laboratuvarda yapılmış ölçümlerin sonucunda elde edilmiş olmasıdır (Westgard 2008, Bal ve ark 2014).

2.3.2. Doğrusallık (Linearite)

Yöntemin hiç düzeltme yapılmadan örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı sonuçlar verme yeteneğidir (Westgard 2008). X eksenine beklenen değerler, Y eksenine ise elde edilen değerler girilerek kalibrasyon grafiği çizilir ve ortaya çıkan çizgi doğru ise yöntem lineerdir. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnekle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve "linear regresyon formülü" ile "korelasyon katsayısı" belirtilir. Bu Şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır.

2.3.3. Analitik Ölçüm Limitleri

Limit of blank (LOB)

Reaktif ve analit haricinde kör okumalarının belli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değeridir. Kör ölçüm düzeyi düşük olması daha doğru ve kesin ölçüm yapmaya izin verir (Westgard 2008).

Limit of dedection (LOD)

Analitle ilişkili sinyalin geri plan karıştırıcı etkenlerden ayrılabildiği en düşük analit miktardır.

Limit of quantitation (LOQ)

Analitin kantitatif olarak güvenilir, doğru ölçümünün yapılabildiği en düşük miktardır.

2.3.4. Tekrarlanabilirlik (Precision)

Bir yöntemde aynı örneğin ard arda çalışılmasıyla metodun aynı sonucu verebilme gücüdür ve yöntemin kesinliğinin göstergesidir. Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını belirlemek için yapılır. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Laboratuvardaki tekrarlanabilirlik koşullarında bir seri ölçüm yapılarak hesaplanır.

2.3.5. Analitik Duyarlılık (Analitik Sensitive)

Analitin konsantrasyonundaki değişime karşılık ölçüm sinyalinde meydana gelen değişikliktir. Yöntemin küçük konsantrasyonları belirleme yeteneğidir. Kalibrasyon eğrisinin eğimi, sensitivitenin göstergesidir.

2.3.6. Analitik Özgüllük (Analitik Spesifiklik)

Analitik özgüllük, bir metodun aranan analiti diğer analitlerin bulunduğu örnek içinde ayırt edebilme yeteneğine denir. Ölçümün sadece istenilen maddeyi ölçmesi istenir.

2.3.7. Geri Elde (Recovery)

Analitik yöntemin konsantrasyonu bilinen miktarda eklenen analiti doğru olarak belirleyebilme yeteneğidir. Geri elde bir yöntemin doğruluğu hakkında bilgi verir. Ölçümünün yapılacağı hasta örneği ve hasta örneğine standart çözelti eklenmiş örnek analiz edilir. Ölçülen miktar ile eklenmiş olan miktar karşılaştırılır.

2.3.8. İnterferans

Analitin ölçümünü etkileyebilecek çeşitli interferansların belirli konsantrasyonlarda ilavesi ile testin etkilenme düzeylerinin araştırılması amaçlanmaktadır. Bu durumun varlığını tespit etmek için örneklerde analiz yapıldıktan sonra, interfere etkisi incelenecek maddeler örneklere ilave edilir ve eklenen analitlerin ölçümü etkileyip etkilemediği hesaplanır.

2.3.9. Taşıma (Carry-over)

Otomatize çalışan sistemler için, önceki numuneden sonraki numuneye herhangi bir aktarım olup olmadığını belirlemek için yapılır. Günümüzdeki teknik imkanlar taşıma hatalarını aza indirmiştir. Çalışmanın yapılması kolaydır. Yüksek ve düşük konsantrasyondaki numuneler belli bir sıra içinde yerleştirilerek ölçüm gerçekleştirilir. Yüksek değerlerden önce gelen düşük değerler ile bir grup oluşturulur. Diğer grup yüksek değerlerden sonra gelen düşük değerlerden oluşur. Belirlenen bu iki grubun ortalamaları ve standart sapmaları hesaplanır. Grupların ortalamaları arasındaki farkın total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenebilir (Westgard ve ark 2008).

2.3.10. Matriks etkisi

Matriks etkisi, LC-MS/MS analizlerinde standart solüsyon içindeki madde ile plazma gibi biyolojik matriksteki aynı analitin farklı yanıtlar vermesi olarak tanımlanır. Matriks etkisinin son derece değişken olması yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinde önemli hatalara neden olmaktadır (Annesley 2007, Chambers ve ark 2007).

Ekstraksiyon olarak Elektro Sprey Ionizasyon (ESI) gerektiren çalışmalarda uçucu olmayan maddeler damla buharlaşmasını değiştirerek detektöre gaz fazında ulaşan yüklü iyon miktarını değiştirmektedir (King ve ark 2000).

2.3.11. Referans Aralık Doğrulama

Referans aralık doğrulama çalışmasının yapılması pahalı ve zordur. Referans aralık doğrulama çalışması için en az 20 sağlıklı birey gerekmektedir. Değerlendirmede aralık dışına çıkanların sayısı %10'u geçmemelidir. Her laboratuvarın kendi referans aralığını belirleme şartı yoktur ama belirlenmiş referans aralığını teyit etmesi gerekir (Westgard 2008).

2.3.12. Yöntem Karşılaştırma

Örnekler iki yöntemde ve aynı zamanda çalışılır, sonuçlar karşılaştırılır ve karşılaştırma için regresyon analizi yapılır. Rapor aralığı içinde en az 40 örnek hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemi ile çalışılır. Sayı ne kadar çok olursa sonuç o kadar sağlıklıdır. İki metot ile elde edilen ölçüm sonuçları arasındaki farkın ortalamalarına karşı gösterdiği dağılım Bland-Altman grafiği ile değerlendirilir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Kullanılan cihazlar, kimyasallar ve kitler

3.1.1. Cihazlar

▪Tandem MS (ABSCIEX API 3200, Singapore)

▪HPLC {Prominence Degaser; DGU-20-A3, Shimadzu, Japonya), LC-20 AD ((A ve B pompası), Shimadzu, Japonya), (Prominence Auto Sampler; SIL-20AC HT, Shimadzu, Japonya)}

▪HPLC Kolon (Restek Pinnacle DB C_8 50x4,6mm, 3µm, Amerika Birleşik Devletleri)

▪Kolon Fırını (CTO-10AS VP, Shimadzu, Japonya)

▪Otomatik Elisa Okuyucusu (CLARIOstar Microplate Reader, Germany)

▪Otomatik Elisa Yıkayıcısı (Rayto RT-2600 + Microplate Washer, Çin)

▪RIA (Gamma Counter Analyzer, PC-RIA-MAS STRATEC, Lot No: DSL 3800, Belçika)

▪Evaporator (Teknosem, TAB 40-WEL WT, Türkiye)

▪Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-2212, Amerika Birleşik Devletleri)

▪Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Germany)

▪Vortex (Heidolph D-91126, Germany)

3.1.2. Kimyasallar

▪İnternal standart 11-deoksikortizol-D_5 {11 Deoxycortisol-2,2,4,6,6-, 98 atom %D, %99, (710784-1MG), (Lot no: TA 2555 V), Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri}

▪Androstenedione standart {10 mg LGC, (CAS No. 152-58-9), (Lot No. 6691), Germany}

▪DHEA standart {Sigma-Aldrich, (CAS No. 50-23-7), (Lot No. SLBD0859V), Amerika Birleşik Devletleri}

▪Aldosteron standardı {(Sigma: A9477-5MG (Lot No: SLBF3506V), Germany}

▪Kolesterol Standart {Sigma-Aldrich, (Lot No. 060 M1200 V), (CAS No. C8503- 100G), Amerika Birleşik Devletleri}

▪Bovin Serum Albumin (BSA) {Sigma-Aldrich, (CAS No. A9418-10G), (Lot. No.108K12772), Amerika Birleşik Devletleri}

▪NaH_2PO_4 $2H_2O$ (Sigma: 82470, Germany)

▪NaCl (Merck: K40124804 919, Darmstadt, Germany)

▪Metanol (CH_4O) {34885-2,5L-R, Sigma-Aldrich, (CAS No. 67-56-1), (Lot. No. SZBD126SV), Amerika Birleşik Devletleri }

▪Dietil Eter ($C_4H_{10}O$) {Merck, (Lot No. K43976621 245), Germany}

▪Formik Asit (HCOOH) { Sigma-Aldrich, (Lot No. 81420), Amerika Birleşik Devletleri}

▪HPLC Grade su {Chemsolute, (Bach No. Q2A085192A), Germany}

▪Yüksek Saflıkta Azot Gazı (Ar Oksijen, Türkiye)

3.1.3. Kitler

▪Androstenedione ELISA Kiti {DRG, (Lot No. 50K074), Germany}

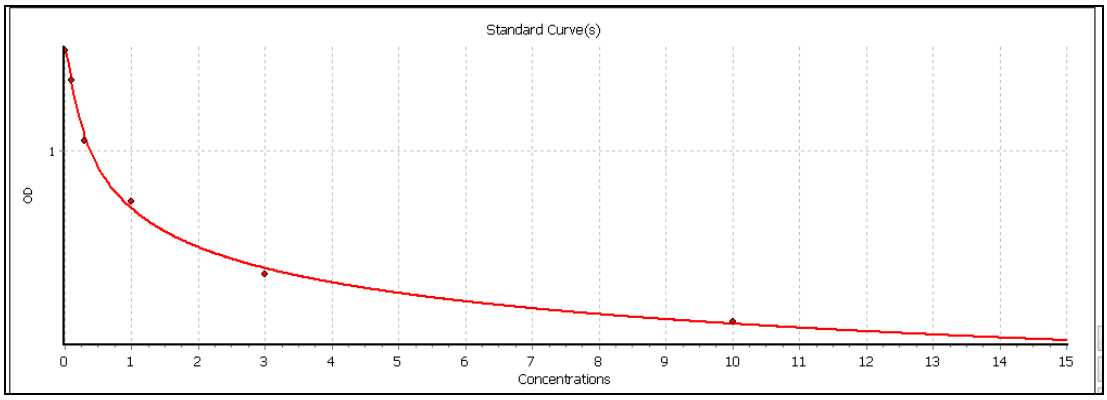
▪Androstenedione RIA Kiti {Beckman Coulter, DSL3800, Prague}

3.2. Analiz Yöntemleri

3.2.1. ELISA Çalışma Prensibi

Çalışmada kullanılan reaktifler oda ısısında 30 dakika bekletilir. Kit kutusundan çıkan miroplateye 20 µL standartlar, kontroller ve hasta serumları pipetlenir. 200 µL enzim konjugatı her kuyucuğa eklenerek 10 saniye karıştırılıp 60 dakika oda ısısında inkübayon yapılır. İnkübasyon sonrası yıkama solüsyonuyla 4 defa yıkama işlemi yapılıp 200 µL substrat solüsyonu eklenir. 30 dakika oda ısısında inkübe edilip her kuyucuğa 100 µL stop solüsyonu eklenir. Stop solisyonu ilavesinden sonra 10 dakika içinde 450 nm'de mikroplate, Rayto RT-2100c okuyucuya konulup okuma işlemi gerçekleştirilir. Altı adet standarda göre çizilmiş kalibrasyon

grafiğinden yararlanılarak numunelerdeki androstenedion konsantrasyonları hesaplanır. Çalışmada standartlar kullanılarak çizilen kalibrasyon grafiği Şekil 3.1.'de verilmiştir.



Şekil 3.1. ELISA çalışma-standart eğrisi

3.2.2. İmmunoassay Çalışma Prensibi

RIA çalışması Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastenesi'nde RIA laboratuvarı olmadığı için akredite bir laboratuar olan Ankalab Laboratuvarı'ndan hizmet alımı şeklinde yapıldı. Beckman Coulter, DSL3800 marka RIA kiti ile serum androstenedion çalışması PC-RIA-MAS STRATEC cihazında çalışılmıştır.

Çalışma prensibi:

Çalışma öncesi kalibratör ve kontroller oda ısısında bekletilir. Kalibratörler, kontroller ve numuneler androstenedion antikoru kaplı tüplere 50 µL pipetlenir. Sonra her bir tüpe 500 µL androstenedion tracer pipetlenir. Tüpler vortekslenir ve tüplerin üzeri kapatılıp 1 saat 37±°C'de bekletilir. Tüm tüplerdeki solüsyon dikkatlice süzülür ve her bir tüpe 2 ml yıkama solüsyonu ilave edilir, süzülür. Okuma işlemi 2 dakika içinde yapılır.

3.2.3. LC-MS/MS Çalışma Prensibi

Cam tüplere 250 µL örnek ya da standart pipetlenir, üzerine 50 µL internal standart (11-deoksikortizol-D_5) ve 3 mL dietil eter eklenerek 2 dk vortekslenir. 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Santrifüj sonrasında üst faz temiz bir tüpe alınır. Üst fazı alınmış tüpe tekrar 3 mL dietil eter konularak, 2 dakika vortekslenir. 4500 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir. Bunun üst fazı da tekrar üst fazı alınan temiz tüpe

ilave edilir. Azot gazı altında uçurularak kurutulan tüplere %0,1' lik formik asit içeren %50'lik metanolden 200 µL ilave edilerek çözülür. 200 µL viallere enjekte edilip, viallerin kapakları kapatılıp otosamplere yerleştirilerek analiz gerçekleştirilir.

LC-MS/MS parametreleri

Optimum parametreleri bulmak için çeşitli çalışmalar yaparak en yüksek intensiteye elde ettiğimiz metodumuzu kaydettik. Uygun mobil fazı bulabilmek için formik asitin iyonlaştırmayı arttırıcı etkisinden faydalandık ve en uygun intensiteyi mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B %0,1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile yapılan çalışmada elde ettik.

Androstenedion saf standardı metanolde çözdürülüp Q1 ve Q3 iyonları ABSCIEX API 3200 tandem mass spektrometre cihazında Auto Tune algoritması kullanılarak belirlendi. En yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırasıyla androstenedion için 287,1/97, izotop (d_5) için ise 352,2/113,1 olarak belirlenmiştir.

Androstenedion C_3 izotopunun (25 µg/L) LC-MS/MS cihazında ESI ile pozitif iyon modda MS/MS tarama metodunda infüzyonu yaptırıldı. Bu tarama ile aralıktaki tüm kütleler tarandı. Androstenedionun kararlı iyonu bu izotopla tespit edilemedi. Yapılan çalışmalar incelendiğinde de androstenedionun C_3 izotopuyla ilgili hiçbir referans çalışmaya rastlanmadı. C_3 izotopu yerine 11-Deoksikortizol-D_5 izotopu ile infüzyon yapıldı ve 11-Deoksikortizol-D_5, in kararlı iyonu ve molekül ağırlığı belirlendi. 11-Deoksikortizol-D5' in precursor iyon 352,2 (m/z), product iyon değeri 113,1 (m/z) olarak tespit edilmiştir.

Ionspray voltaj (IS) ile yapılan denemelerde 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 voltaj ile denemeler yapılmış ve en yüksek intensite 5500 voltajda elde edilmiştir. Sıcaklık denemeleri 300 ^{0}C, 400 ^{0}C, 500 ^{0}C ve 600 ^{0}C ile denemeler yapılmış, en yüksek intensite 600 ^{0}C'de bulunmuştur.

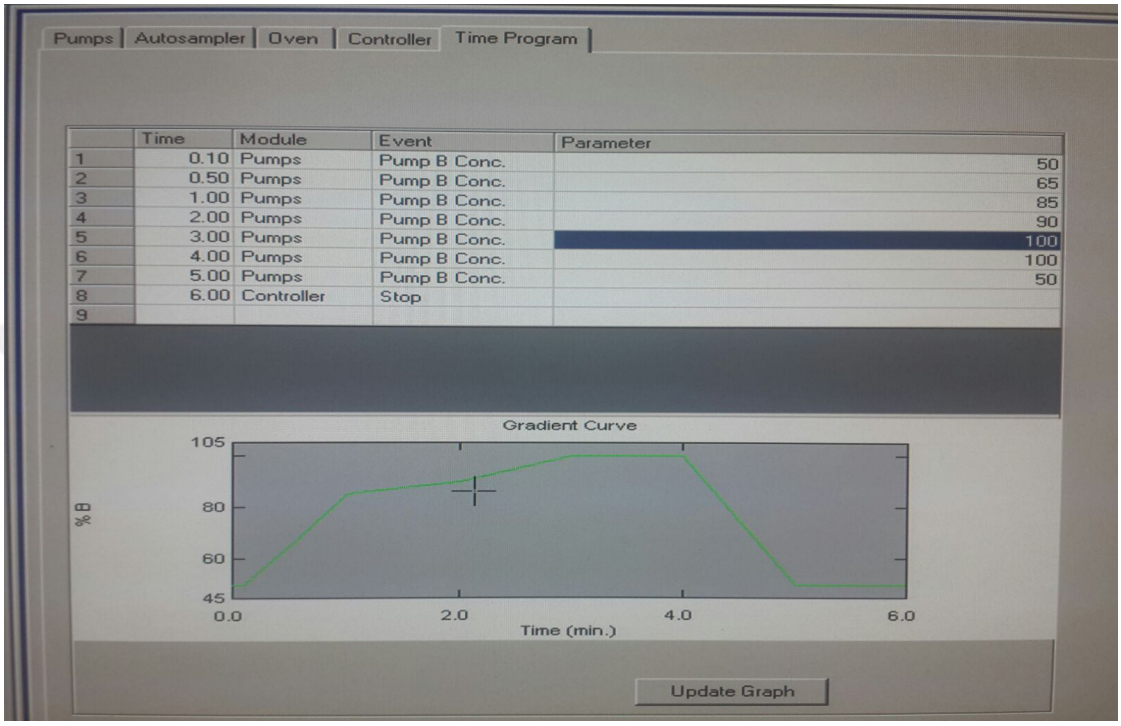
Total flow için 0.4, 0,5, 0.6 ve 0.8 ile denemeler yapıldı. Akışı düşürdükçe piklerin çıkış sürelerinin uzamakta olduğunu gördük. En yüksek intensite 0,5 mL/dk da bulunmuştur. Piklerin çıkış süreleri androstenedion için 3,8 dakikadır. Yapılan bu denemelerin hepsinde her zaman sadece tek bir parametre ile deneme yapılmıştır. Örneğin sıcaklık için deneme yapılırken sadece sıcaklık değeri değiştirilmiş aynı anda diğer parametrelerle deneme yapılmamıştır.

Gerçekleştirdiğimiz deneme çalışmaları sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde ettiğimiz LC-MS/MS parametreleri çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. LC-MS/MS parametreleri

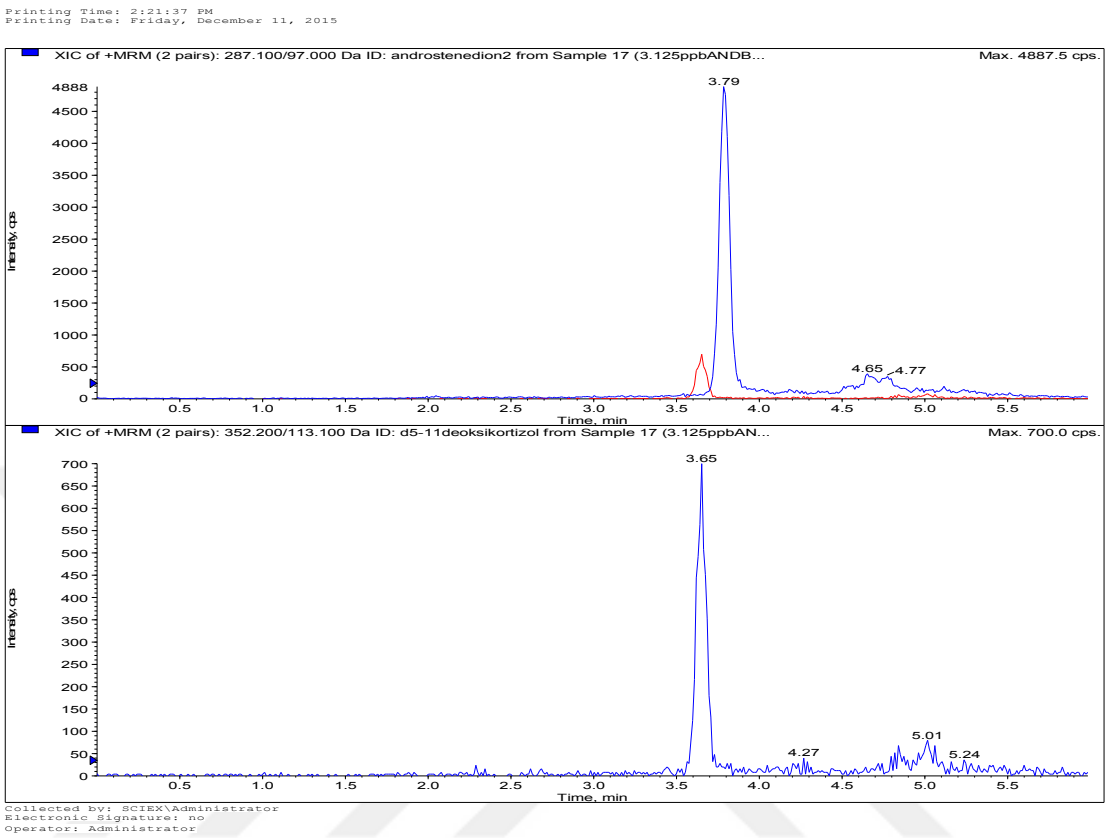
İyonizasyon Modu	Elektro Sprey İyonizasyon
Declustering Potential (DP)	44
Entrance Potential (EP)	7,5
Androstenedion Q1 Mass (Da)	287.1
Androstenedion Q3 Mass (Da)	97
11-deoksikortizol- D5 internal standart Q1 Mass	352,2
11-deoksikortizol- D5 internal standart Q3 Mass	113,1
Collision Energy (CE)	33
Collision Cell Exit Potential (CXP)	4
Curtain Gas (CUR)	10
Collision Gas (CAD)	6
Ionspray Voltage (IS)	5500 V
Temperature (TEM)	600 ºC
Ion Source Gas1 (GS1)	50
Ion Source Gas2 (GS2)	60
Interface Heater	On
Ionisation Source	Turbo Sprey
Collision Gas	N_2 (Azot)
Dwell Time	400 milisaniye
Pompa Modu	Binary Flow
Total Akış	0,5 mL/dk
Enjeksiyon volume	40 µL
Analiz süresi	6 dk
Kolon	Retsek C8, 50x4,6 mm, 3 µm ters faz
Mobil faz A	Su
Mobil faz B	%0,1'lik formik asit içeren metanol

Akış gradientini belirlemek için yapılan deneme çalışması sonucunda total akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlendi. Total akışta Pompa B'nin yüzdesini belirlemek için %50, %60, %80 ve %90 ile deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Yöntemde kullanılan akış gradienti Şekil 3.2'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Çalışmada kullanılan akış gradienti

Çalışmada elde edilen androstenedion ve internal standarda ait LC-MS/MS pikleri Şekil 3.3'de gösterilmiştir.



Şekil 3.3. Çalışmada elde edilen androstenedion (üstteki pik) ve internal standarda ait (alttaki pik) LC-MS/MS pikleri

3.3. Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

3.3.1. BSA Hazırlanması

Bovin Serum Albumin-Standart Buffer (BSA-PBS), 0,1M PBS, %1 BSA, %0,9 NaCl, 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 çözdürülmüştür. pH ise NaOH ve HCl kullanılarak 7,4 olarak ayarlanmıştır.

3.3.2. Standart Hazırlanması

Stok 1 çözeltinin hazırlanışı; Sigma-Aldrich markalı (Lot no: TA 2555 V) liyofilize haldeki 5 mg androstenedion standardı 5 mL saf metanol çözülerek 1000 ppm (parts per million, mg/L)'lik 10 mL androstenedion standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 2 çözeltinin hazırlanışı; 10 mL'lik balon jojeye 100 µL stok 1 çözeltisinden alınıp üzeri metanol ile 1000 mL'ye tamamlanarak 10 mg/L'lik 10 mL androstenedion standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 3 çözeltinin hazırlanışı; 10 mL'lik balon jojeye stok 2 çözeltisinden 200 µL alınıp üzeri 9800 mL metanol ile tamamlanarak 200 ng/mL'lik 10 mL androstenedion standart çözeltisi hazırlandı.

3.3.3. 11-Deoksikortizol-D5 İnternal Standart Hazırlanması

Bu standart dilüsyonlarla 3 stok halinde hazırlanmıştır.

Stok 1 çözeltinin hazırlanışı; Sigma-Aldrich markalı (Lot no: TA 2555 V) 1 mg 11-deoksikortizol internal standart 1 mL metanol ile çözülerek 1000 mg/L'lik 1 mL 11-deoksikortizol internal standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 2 çözeltinin hazırlanışı; 50 mL'lik balon jojeye 500 µL stok 1 çözeltisinden alınıp üzeri metanol ile tamamlanarak 10 mg/L'lik 50 mL 11-deoksikortizol- internal standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 3 çözeltinin hazırlanışı; 100 mL'lik balon jojeye stok 2 çözeltisinden 2000 µL alınıp üzeri metanol ile tamamlanarak 200 ng/mL'lik 100 mL 11- deoksikortizol-internal standart çözeltisi hazırlandı.

Çalışmada kulanmak için stok 3 çözeltisinden bir cam tüpe 500 µL alınıp 9500 µL metanol eklenerek 10 ng/mL'lik 10 mL 11-deoksikortizol- internal standart çözeltisi hazırlandı.

3.3.4. Mobil Faz Hazırlanışı

Mobil Faz A: HPLC grade su

Mobil Faz B: %0,1'lik formik asit içeren metanol (2,5 litre metanolden 2500 µl metanol alınıp yerine 2500 µL formik asit ilave edildi.)

3.3.5. Steroid Free Serum (SFS) Hazırlanışı

100 mL serum havuzu oluşturulur ve buna 4 gr aktif kömür ilave edilip manyetik karıştırıcıda 2 saat karıştırılır. Temiz cam tüplere alınıp 3000 rpm de 3 saat çevrilir. Süpernatant kısmı nuçe erleninden 3 defa süzülerek uzaklaştırılır. Elde ettiğimiz SFS'ları 10 porsiyona bölüp çalışmalarda kullanmak üzere donduruldu.

3.4. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri

3.4.1. Doğrusallık (Linearite)

Metot validasyon kapsamında gerçekleştirilen linearite çalışması CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP6-A protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma ile kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemek amaçlanmıştır.

Hazırlanan 200 ng/mL'lik standarttan BSA-PBS kullanılarak 50 ng/mL, 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,125 ng/mL, 1,56 ng/mL, 0,78 ng/mL, 0,390 ng/mL'lik konsantrasyonlar için seri dilüsyon yapılmış ve linerarite çalışmasında kullanılmıştır.

3.4.2. Analitik Ölçüm Limitleri

Limit of Dedection (LOD)

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranına göre belirlendi. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi.

Limit of Quantitation (LOQ)

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranına göre belirlendi. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlendi.

3.4.3. Tekrarlanabilirlik (Precision)

Tekrarlanabilirlik çalışması CLSI EP5-A protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Çalışmasında androstenedion için 20, 2, 0,3 ng/mL'lik sandartlarla örnek hazırlama protokolüne uygun numuneler hazırlandı. Çalışma içi (gün içi) ve günler arası 20 ölçüm çift çalışılarak tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir.

3.4.4. Geri Elde (Recovery)

Çalışma CLSI EP6-A prokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiş olup, androstenedion için 200, 20 ve 4 ng/mL'lik standartlar kullanıldı.

Androstenedion geri elde çalışması için 4 stok kullanıldı. Bu stoklar numune hazırlama prosedürüne uygun olarak hazırlanıp, cihaza verildi.

1. Tüpe 900 mL serum havuzundan alınıp, 100 mL BSA eklenmiştir.

2. Tüpe 200 ng/mL'lik standarttan 100 µL alınıp, 900 µL serum havuzundan eklenmiştir.

3. Tüpe 20 ng/mL'lik standarttan 100 µL alınıp, 900 µL serum havuzundan eklenmiştir.

4. Tüpe 4 ng/mL'lik standarttan 100 µL alınıp, 900 µL serum havuzundan eklenmiştir.

Bu stoklar numune hazırlama prosedürüne uygun olarak hazırlanıp, cihaza verildi. Birinci tüpte okunan değer ile diğer tüplerde okunan değerler arasındaki fark hesaplanarak geri elde edilen miktar bulundu. Geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması sonucu %R değerleri hesaplandı.

3.4.5. İnterferans

Çalışma CLSI EP7-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Kapsamlı bir interferans çalışmasında interferans yapabilen bir madde, bir laboratuarın hasta örneklerinde karşılaşabileceği en yüksek konsantrasyonunda olmalıdır.

Bu protokole göre androstenedion için DHEA, aldosteron ve kolesterol ile interferans çalışması yapılmıştır.

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen işlemi tamamlanmış artakalan kanlardan serum havuzu oluşturuldu. Düşük ve yüksek seviyelerde olmak üzere androstenedion serum havuzu elde edilmiştir. İnterferan madde eklemek için 5 adet tüp alınmıştır.

İnterferans çalışmasındaki diğer parametreler için metanol ile, 5 µg/L ve 500 µg/L'lik DHEA standartları, 10 ng/mL ve 100 ng/mL aldosteron ve 100 ng/mL ve 1000 ng/mL'lik kolesterol standartları standartları hazırlandı. Düşük ve yüksek seviye serum havuzları hazırlamada 0,2 ng/mL ve 200 ng/mL'lik androstenedion standartları kullanıldı. İnterferans çalışmasındaki işlemler DHEA, kolesterol ve aldosteron için hem düşük düzey hem yüksek düzey serum havuzları kullanılarak yapıldı.

Düşük düzey serum havuzundan eşit miktarda 1. ve 5. tüpe konulmuştur. 1. tüpe düşük düzey interferan serum havuzunun %10'unu geçmeyecek şekilde konulmuştur. 5. tüpe de aynı miktarda yüksek düzey interferan ilave edilmiştir. 1. ve 5. tüplerden eşit miktarda alınarak 3. tüpe konulmuştur. 1. ve 3. tüplerden eşit miktarda alınarak 2. tüpe konulmuştur. 3. ve 5. tüplerden eşit miktarda alınarak 4. tüpe konulmuştur. Böylece 1. tüpten 5. tüpe kadar artan konsantrasyonlarda (%0, %25, %50, %75 ve %100) interferan içeren tüpler elde edilmiştir. Yüksek seviye serum havuzu içinde aynı işlemler tekrarlanmıştır. Her iki seviye serum havuzu içinde interferan madde kadar BSA ekleyerek birer tüp daha hazırlanmıştır. Üç tekrarlı çalışma için, 1. tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada, 2. tekrar interferan konsantrasyonu azalan sırada, 3. tekrar tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada olacak şekilde işlem gerçekleştirilmiştir. Bu prosedür DHEA, kolesterol ve aldosteron için tekrarlanmıştır.

3.4.6. Taşıma (Carry-over)

Çalışma CLSI EP10-A3 protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada androstenedion için düşük konsantrasyonu 0,2 ng/mL, yüksek konsantrasyonu 200 ng/mL olan standartlar kullanılmıştır. Bu standartlardan 11 tane düşük konsantrasyona ait, 10 tane yüksek konsantrasyona ait numune hazırlanmış ve cihaza aşağıda gösterilen düzene göre yerleştirilip okutulmuştur.

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

Grup 1 düşüklerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, grup 2 yükseklerden sonra gelen düşük numuneleri içermektedir.

GRUP 1:D2-D3-D6-D7-D8

GRUP 2:D4-D5-D9-D10-D11

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).

3.4.7. Matriks Etkisi

Çalışma CLSI EP14-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya laboratuvarına rutin tahlil için gelen

kanların artakalanlarından serum havuzu oluşturuldu. Hazırlanan serum havuzundan analiz için numune hazırlama prosedürüne göre üç adet numune hazırlandı. Hazırlanan bu numuneler azot gazı altında uçurulup çözdürücü ilave edildikten sonra viallere konmadan önce ilk tüpe 200 µL 0,2 ng/mL, ikinci tüpe 200 µL 2 ng/mL, üçüncü tüpe de 200 µL 20 ng/mL androstenedion standardı eklendi. Hazırlanan bu üç numune 200 µL viallere pipetlendi. Üç adet boş cam tüpe methanol ile hazırlanmış 0,2 ng/mL, 2 ng/mL ve 20 ng/mL'lik standartlardan 200 µL pipetlendi ve üzerlerine çözdürücü solüsyondan 200 µL ilave edildi. Hazırlanan bu karışımlardan vilallere 200 µL alınıp analiz edilir. Toplam altı numune analiz edilip pik alanlarına göre hesaplamaları yapıldı.

3.4.8. Referans Aralık Doğrulama

Çalışma CLSI EP28-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. CLSI'a 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.

Referans aralığı doğrulama amacıyla 20 sağlıklı ve gönüllü, kadın ve erkekten numune alınıp, ön işlem protokollerine uyularak analiz edilmiştir.

3.4.9. Numune Stabilitesi

Numune stabiltesini belirlemek amacıyla androstenedion için serum örneği ön işlemlerden geçirilerek çalışılmıştır. 15., 30., ve 45. günlerde çalışılmak üzere aynı örnek porsiyonlanıp dondurulmuştur. İlk günkü analiz değerine göre diğer günlerin % biası hesaplanmıştır.

3.4.10. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi

Dondurma ve çözmenin etkisini belirlemek amacıyla serum örneği çalışıldıktan sonra aynı örnek dondurulmuş, çıkarılıp çözündükten sonra tekrar çalışılmış ve bu işlem 4 defa tekrarlanmıştır. İlk bulunan sonuca göre diğer sonuçların % bias' ı hesaplanmıştır.

3.5. İstatistiksel Analiz

Metod validasyon parametrelerinin, numuneler çift çalışılıp ortalamaları alınarak MedCalc versiyon 9.2.0.1 istatistik programı, EP evaluator Release 9

versiyon ve Excel (2011) ve SPSS (21) programları kullanılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. Gruplar arası farkın anlamlılık araştırması için t testi kullanıldı. Parametrik dağılım gösteren testlerin analizinde independent simple t testi uygulanırken, non-parametrik dağılım gösteren testlerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. LC-MS/MS, RIA ve ELISA yöntemlerinin kıyaslanmasında Passing-Bablok, Deming regresyon, Bland-Altman ve ROC regresyon analizi gerçekleştirilmiştir.

4. BULGULAR

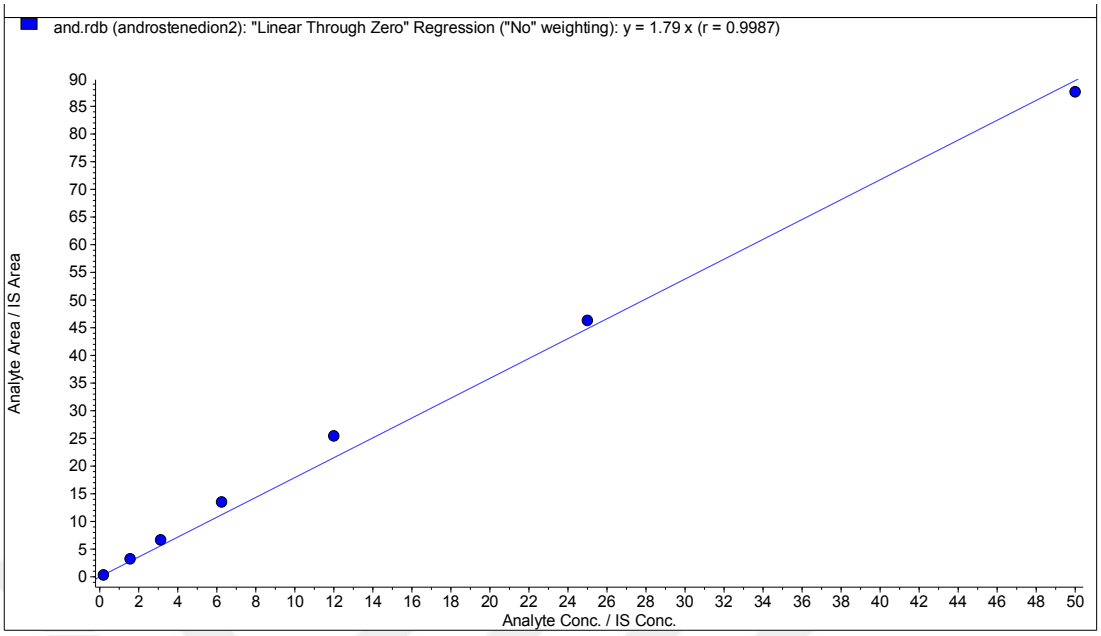
4.1. Metot Validasyonu Bulguları

4.1.1. Linearite çalışması

Androstenedion için linearite çalışmasında kullanmak üzere 50 ng/mL'lik androstenedion standardını seri dilüsyonla 25 ng/mL, 12,5 ng/mL, 6,25 ng/mL, 3,125 ng/mL, 1,56 ng/mL, 0,78 ve 0,39 ng/mL'ye kadar sulandırdık. Her bir standardı ön işlem basamaklarından geçirerek hazırlayıp cihaza verdik. Çift çalışılarak elde edilen değerlerin ortalamaları alınmış ve ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluk sonuçları elde edilmiştir. Elde edilen sonuçlar çizelge 4.1'de verilmiştir.

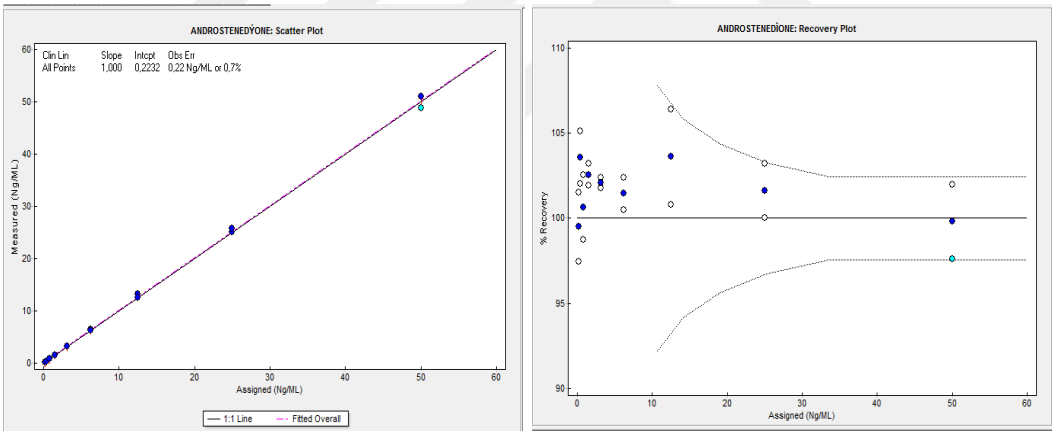
Çizelge 4.1. Androstenedion linearite verileri

Androstenedion Konsantrasyonları (ng/m)	1. Ölçülen Değer (ng/mL)	2. Ölçülen Değer (ng/mL)	1. ve 2. Ölçülen Değerlerin Ortalaması (ng/mL)	Uygunluk (%)
50	51	48,8	49,9	99,8
25	25	25,8	25,4	101,6
12,5	14	12,6	12,95	103,6
6,25	6,4	6,28	6,34	101,4
3,125	3,2	3,18	3,19	102,1
1,56	1,59	1,61	1,6	102,6
0,780	0,77	0,8	0,79	100,6
0,390	0,398	0,41	0,40	102,5
0,195	0,190	0,192	0,191	97,9



Şekil 4.1. Androstenedion linearite grafiği

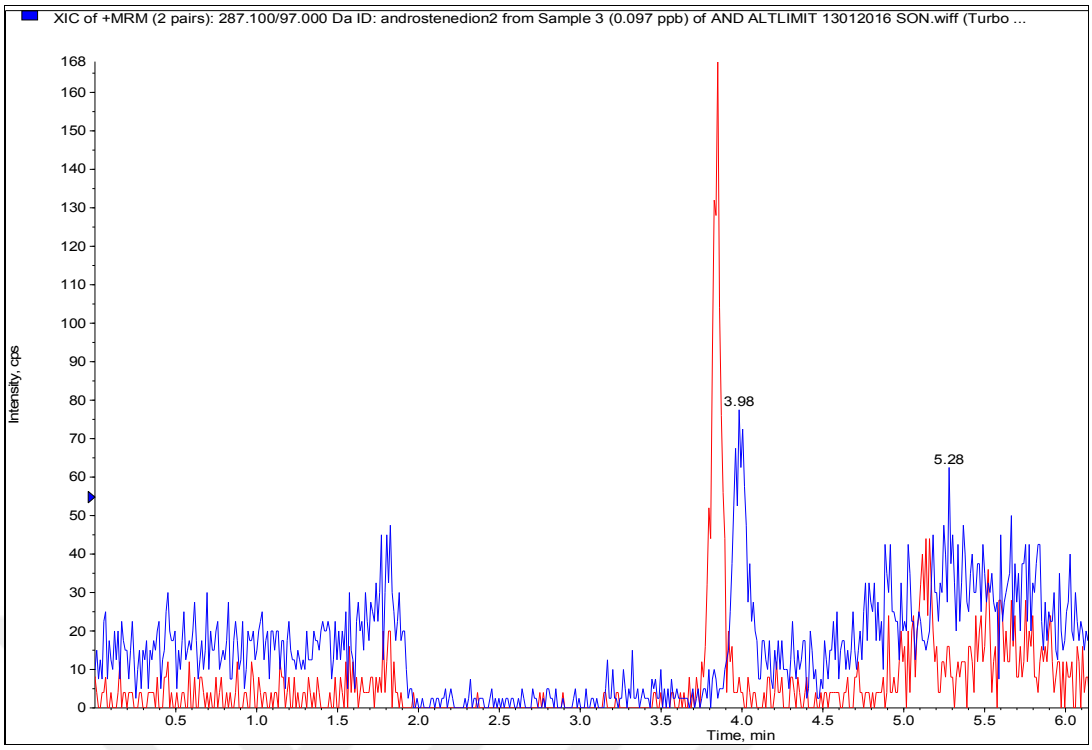
R^2= 0,9987 olarak bulunmuştur.



Şekil 4.2. Androstenedion EP evaluator linearite grafiği verileri

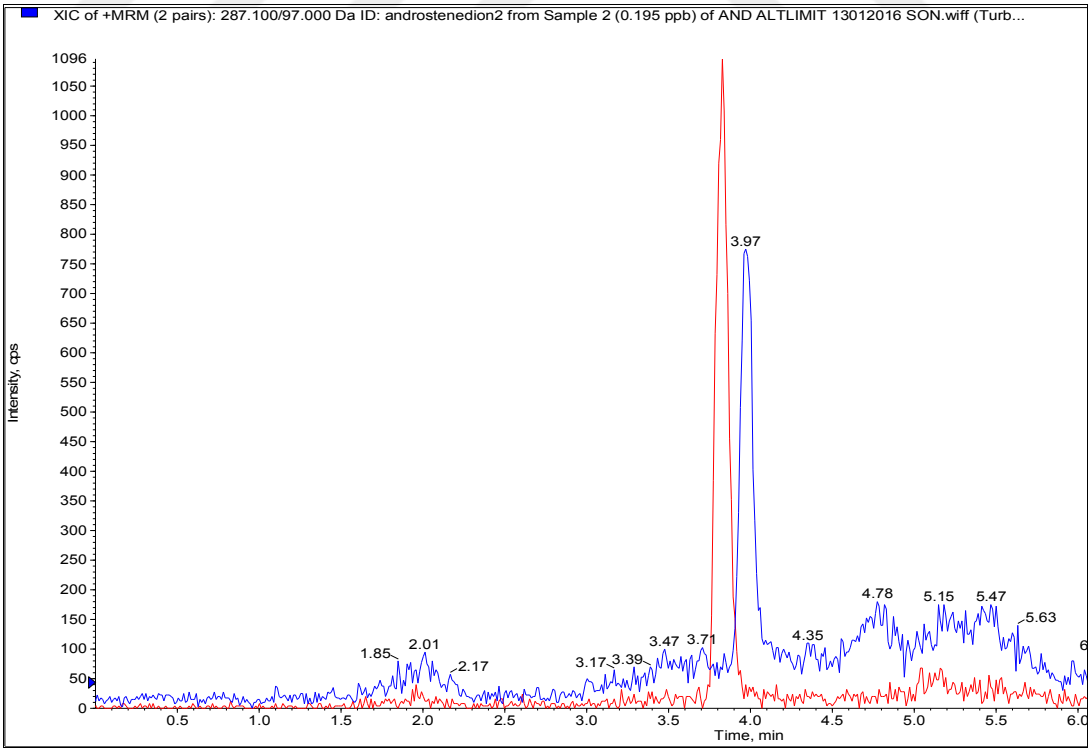
4.1.2. Analitik ölçüm limitleri

LOD'u ve LOQ'u belirlemek için androstenedion standardı 0,024 ng/mL'ye kadar BSA-PBS ile seri dilüsyon yapıldı. Elde edilen LOD VE LOQ grafikleri Şekil 4.3 ve 4.4'te verilmiştir.



Şekil 4.3. Androstenedion deteksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Androstenedion için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0,097 ng/mL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 4.4. Androstenedion kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Androstenedion için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti 0,195 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

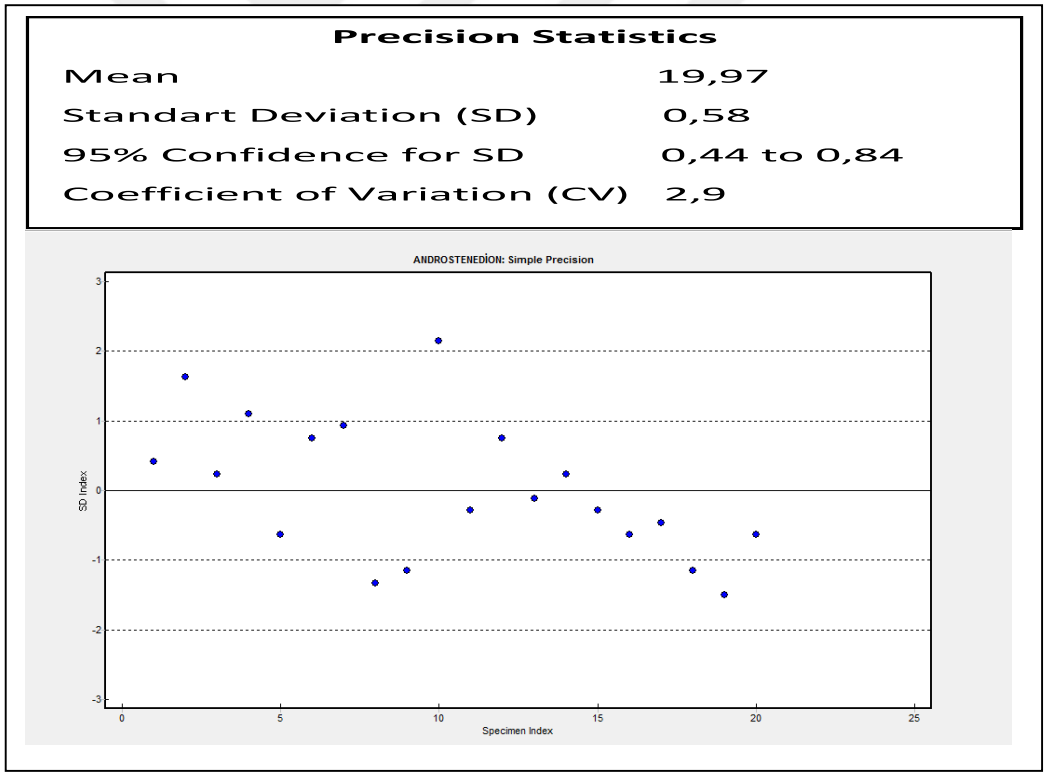
4.1.3. Tekrarlanabilirlik (Precision)

Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışması

Bu çalışma için 20 ng/mL, 2 ng/mL, 0,3 ng/mL'lik androstenedion standartları aynı çalışma içinde ardı arda 20 defa çalışılmıştır.

Çizelge 4.2. Çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları

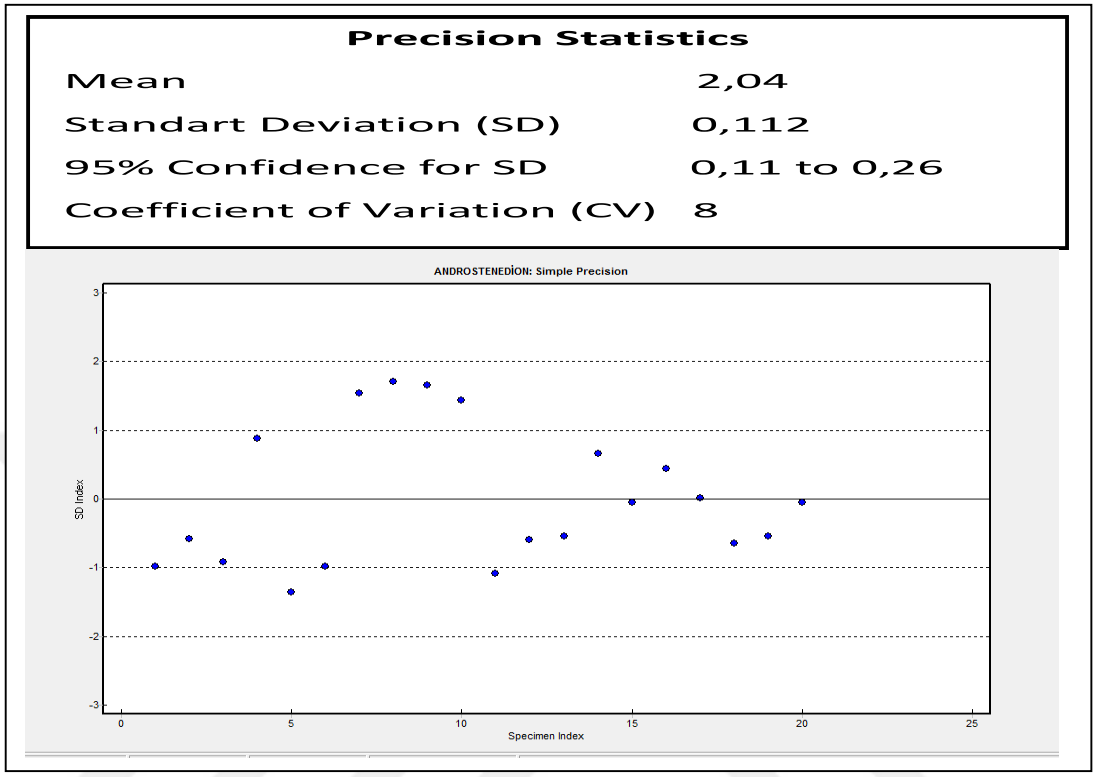
Konsantrasyon	Ortalama	SD	% CV
20 ng/mL	19,97	0,58	2,9
2 ng/mL	2,04	0,112	8
0,3 ng/mL	0,38	0,03	7,7



Şekil 4.5. 20 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı

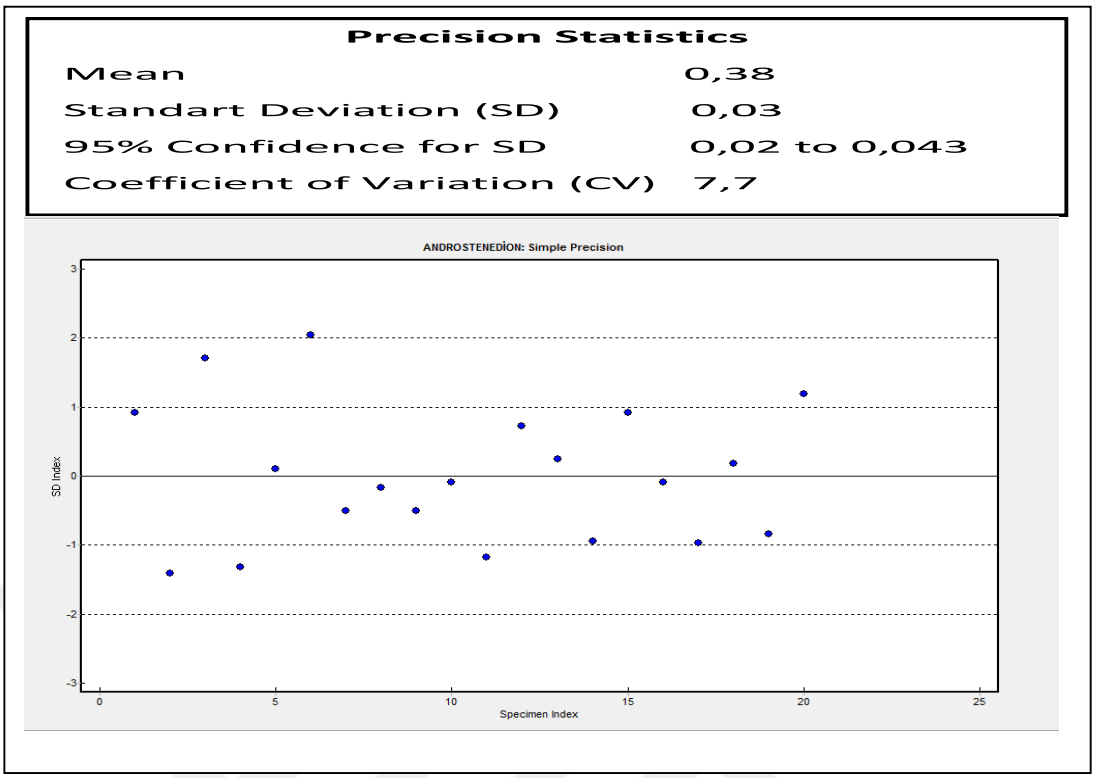
Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 20 ng/mL'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 20x0,2351=4,72'dir. Westgard kurallarına göre 20 ng/mL'lik çalışma içi

tekrarlanabilirlik SD değeri (0,58), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün dörtte birinden (4,72/4=1,18) küçük olmalıdır. 0,58<1,18 olduğu için 20 ng/mL'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeydedir.



Şekil 4.6. 2 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı

Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 2 ng/mL'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 2x0,2351=0,472'dir. Westgard kurallarına göre 2 ng/mL'lik çalışma içi tekrarlanabilirlik SD değeri (0,112), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün dörtte birinden (0,472/4=0,118) küçük olmalıdır. 0,112<0,118 olduğu için 2 ng/mL'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeydedir.



Şekil 4.7. 0,3 ng/mL androstenedion çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı

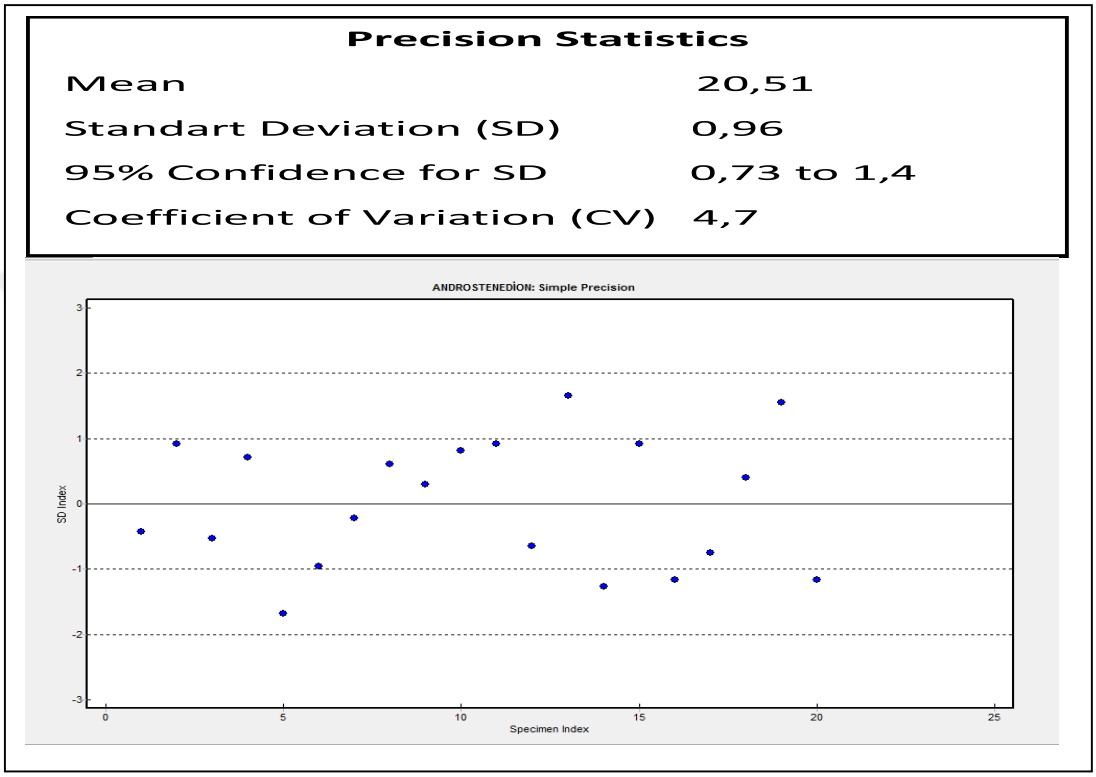
Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 0,3 ng/mL'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 0,3x0,2351=0,070'dir. Westgard kurallarına göre 0,3 ng/mL'lik çalışma içi tekrarlanabilirlik SD değeri (0,03), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün dörtte birinden (0,070/4=0,018) küçük olmalıdır. 0,03<0,018 olmadığı için 0,3 ng/mL'lik konsantrasyonda gün içi tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeyin dışındadır.

Günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması

Bu çalışma için 20 ng/mL, 2 ng/mL, 0,3 ng/mL'lik androstenedion standartları 20 gün boyunca çalışılıp ortalamaları alınarak günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir. Günlerarası tekrarlanabilirlik verileri Çizelge 4.3'de verilmiştir.

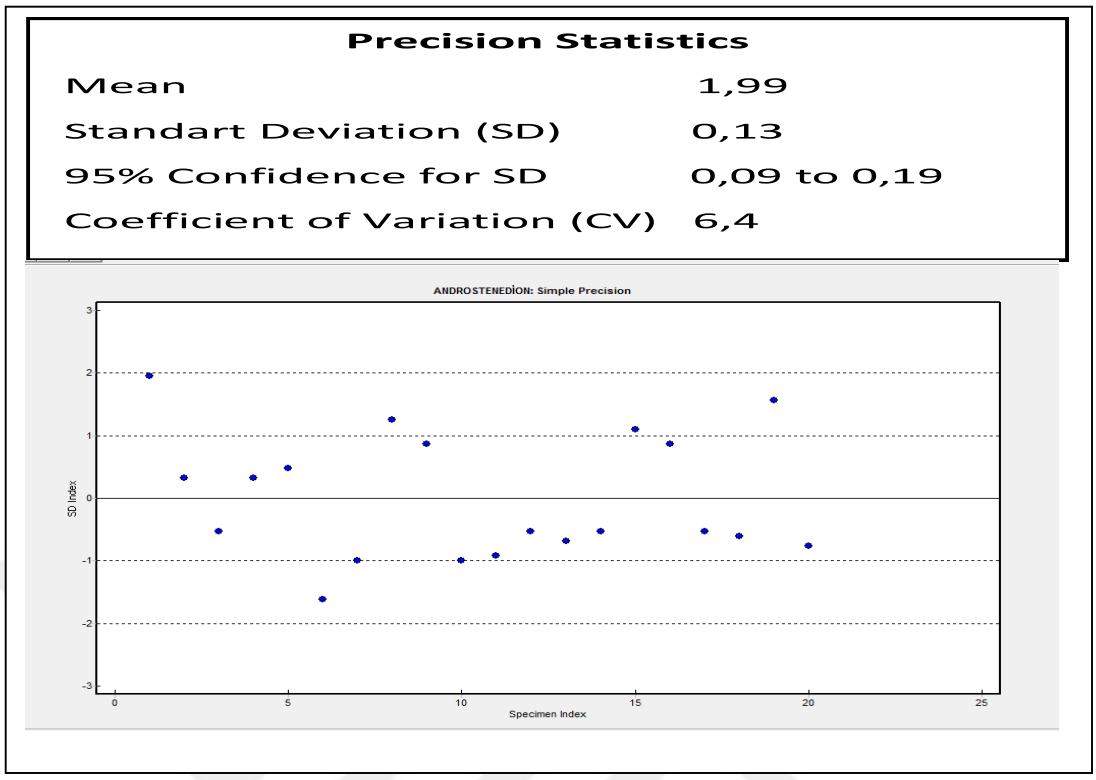
Çizelge 4.3. Günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları

Konsantrasyon	Ortalama	SD	% CV
20 ng/mL	20,51	0,96	4,7
2 ng/mL	1,99	0,13	6,4
0,3 ng/mL	0,40	0,021	11,7



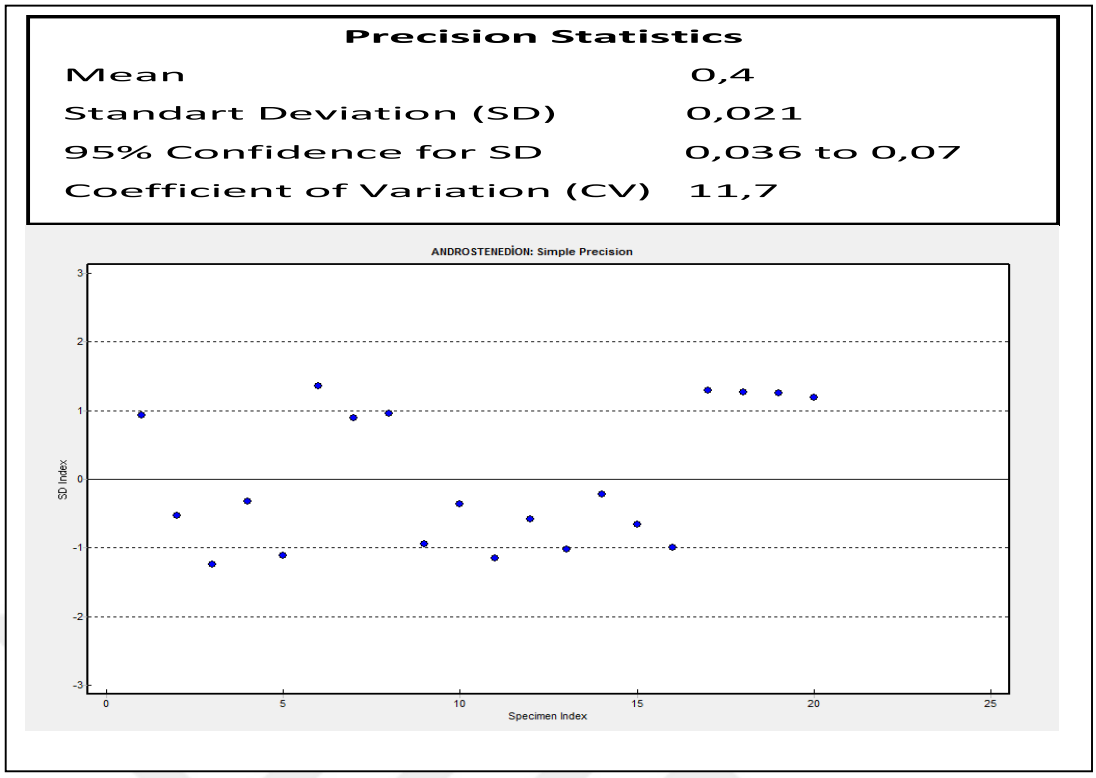
Şekil 4.8. 20 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı

Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 20 ng/mL'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 20x0,2351=4,702'dir. Westgard kurallarına göre 20 ng/mL'lik günlerarası tekrarlanabilirlik SD değeri (0,96), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün üçte birinden (4,702/3=1,56) küçük olmalıdır. 0,96<1,56 olduğu için 20 ng/mL'lik konsantrasyonda günlerarası tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeydedir.



Şekil 4.9. 2 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı.

Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 2 ng/mL'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 2x0,2351=0,4702'dir. Westgard kurallarına göre 2 ng/mL'lik günlerarası tekrarlanabilirlik SD değeri (0,13), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün üçte birinden (0,4702/3=0,156) küçük olmalıdır. 0,13<0,156 olduğu için 2 ng/mL'lik konsantrasyonda günlerarası tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeydedir.



Şekil 4.10. 0,3 ng/mL androstenedion günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları ve SD dağılımı.

Androstenedion için www.westgard.com/database adresinde belirtilen izin verilebilir hata düzeyi %23,51'dir. 0,3 ng/mL lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 0,3x0,2351=0,071'dir. Westgard kurallarına göre 0,3 ng/mL'lik günlerarası tekrarlanabilirlik SD değeri (0,021), izin verilebilir hata düzeyindeki ölçümün üçte birinden (0,071/3=0,023) küçük olmalıdır. 0,021<0,023 olduğu için 0,3 ng/mL'lik konsantrasyonda günlerarası tekrarlanabilirlik kabul edilir düzeydedir.

4.1.4. Geri elde (Recovery)

Androstenedion için steroid free serum-BSA ile hazırlanan stok, 200 ng/mL, 20 ng/mL ve 4 ng/mL'lik standartlar kullanılarak yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Çizelge 4.4'te verilmiştir.

Çizelge 4.4. Androstenedion geri elde çalışma sonuçları.

	Ölçülen değer (ng/mL)	Eklenen konsantrasyon (ng/mL)	Beklenen değer (ng/mL)	% Recovary
Serum havuzu+BSA	0,24			
Serum havuzu+4 ng/mL	0,441	0,4	0,64	69
Serum havuzu+20 ng/mL	2,21	2	2,24	98
Serum havuzu+200 ng/mL	20,2	20	20,4	99

Androstenedion için yapılan geri elde çalışmasında üç konsantrasyon için % geri elde ortalama değeri % 88,7 olarak bulunmuştur. Orantılı hatayı bulmak için bu ortalama 100'den çıkartıldı ve 11,3 olarak bulundu. Geri elde ortalamasının %70-120 arasında olması kabul edilebilir düzeyde olduğunu göstermektedir.

4.1.5. İnterferans

Androstenedion için DHEA, aldosteron ve kolesterol ile interferans çalışması yapılmıştır. Androstenedion ve DHEA ile yapılan interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.5'te gösterilmektedir.

Çizelge 4.5. Androstenedion-DHEA interferans çalışma sonuçları.

Tüpler	Düşük serum havuzu (ng/mL)	Tüpler	Yüksek serum havuzu (ng/mL)
BSA	1,31	BSA	31,9
D1	1,49	Y1	24,1
D1	1,42	Y1	30,1
D1	1,46	Y1	29,2
D2	1,63	Y2	27,9
D2	1,43	Y2	31,7
D2	1,73	Y2	30,6
D3	1,63	Y3	32
D3	1,51	Y3	34,3
D3	1,55	Y3	34,6
D4	1,48	Y4	34,8
D4	1,38	Y4	36,3
D4	1,54	Y4	34,6
D5	1,33	Y5	38,9
D5	1,37	Y5	30,5
D5	1,6	Y5	33,4

Çizelge 4.6. Androstenedion-DHEA interferans çalışması % bias sonuçları.

	BSA içeren düşük serum havuzu değeri	D5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması	BSA içeren yüksek serum havuzu değerleri	Y5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması
Sonuçlar	1,31	1,43	31,9	34,3
% Bias		9,1		7,5

Elde ettiğimiz sonuçlara göre % biaslar androstenedion için izin verilen biastan (10,47) küçük olduğundan dolayı DHEA için interferans bulunmamaktadır.

Androstenedion ve aldosteron ile yapılan interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.7'da gösterilmektedir.

Çizelge 4.7. Androstenedion-aldosteron interferans çalışma sonuçları.

Tüpler	Düşük serum havuzu (ng/mL)	Tüpler	Yüksek serum havuzu (ng/mL)
BSA	1,42	BSA	30,1
D1	1,63	Y1	30,6
D1	1,49	Y1	31,5
D1	1,24	Y1	33,5
D2	1,46	Y2	27,5
D2	1,61	Y2	31,8
D2	1,58	Y2	30,5
D3	1,91	Y3	28,8
D3	1,36	Y3	26,6
D3	1,37	Y3	25,4
D4	1,39	Y4	35,7
D4	1,47	Y4	33,2
D4	1,29	Y4	34,3
D5	1,48	Y5	34
D5	1,75	Y5	31,9
D5	1,47	Y5	32,5

Çizelge 4.8. Androstenedion-aldosteron interferans çalışması % bias sonuçları

	BSA içeren düşük serum havuzu değeri	D5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması	BSA içeren yüksek serum havuzu değerleri	Y5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması
Sonuçlar	1,42	1,56	30,1	32,8
% Bias		9,8		8,9

Elde ettiğimiz sonuçlara göre % biaslar androstenedion için izin verilen biastan (10,47) küçük olduğundan dolayı aldosteron için interferans bulunmamaktadır.

Androstenedion ve kolesterol ile yapılan interferans çalışma sonuçları Çizelge 4.9' de gösterilmektedir.

Çizelge 4.9. Androstenedion-kolesterol interferans çalışma sonuçları

Tüpler	Düşük serum havuzu (ng/mL)	Tüpler	Yüksek serum havuzu (ng/mL)
BSA	1,52	BSA	22,5
D1	1,63	Y1	25,4
D1	1,77	Y1	23,9
D1	1,52	Y1	24,5
D2	1,46	Y2	16,4
D2	2,03	Y2	18,2
D2	1,37	Y2	31,9
D3	1,39	Y3	18,9
D3	1,37	Y3	16,8
D3	1,32	Y3	17,5
D4	1,44	Y4	17,7
D4	1,22	Y4	20
D4	1,18	Y4	18,7
D5	1,63	Y5	21,3
D5	1,62	Y5	23
D5	1,74	Y5	26,4

Çizelge 4.10. Androstenedion-kolesterol interferans çalışması % bias sonuçları

	BSA içeren düşük serum havuzu değeri	D5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması	BSA içeren yüksek serum havuzu değerleri	Y5 tüplerinin sonuçlarının ortalaması
Sonuçlar	1,52	1,65	22,5	23,56
% Bias		8,5		4,7

Elde ettiğimiz sonuçlara göre % biaslar androstenedion için izin verilen biastan (10,47) küçük olduğundan dolayı kolesterol için interferans bulunmamaktadır.

Androstenedion için DHEA, aldosteron ve kolesterol ile yapılan interferans çalışmasında düşük ve yüksek düzey serum havuzundaki 5. tüplerin sonuçlarının ortalamaları alınarak % bias hesabı yapılmıştır. Düşük düzey üç adet D5 tüplerinin ortalamaları hesaplandı ve interfere içermeyen BSA içeren serum havuzunun değeri ile farkı hesaplanıp çıkan sonuç BSA içeren serum havuzu sonucuna bölünüp 100 ile çarpılarak % bias değeri elde edildi. Aynı işlem yüksek düzey üç adet Y5 sonuçları içinde yapıldı. Hesaplanan % bias değeri, izin verilen % bias değerinden küçükse interferans yoktur denilmektedir. Androstenedion için % bias 10,47 olarak verilmiştir (www.westgard.com/biodatabase). Elde ettiğimiz sonuçlara göre % biaslar 10,47 den küçük olduğundan dolayı DHEA, aldosteron ve kolesterol için interferans bulunmamaktadır. Yine en yüksek konsantrasyonlarda interferan içeren tüplerde interferansa rastlanmamışsa daha düşük konsantrasyonlarda interferan madde içeren tüpler için interferans saptanmayacağından dolayı daha düşük konsantrasyonlarda hesaplama yapılmamıştır.

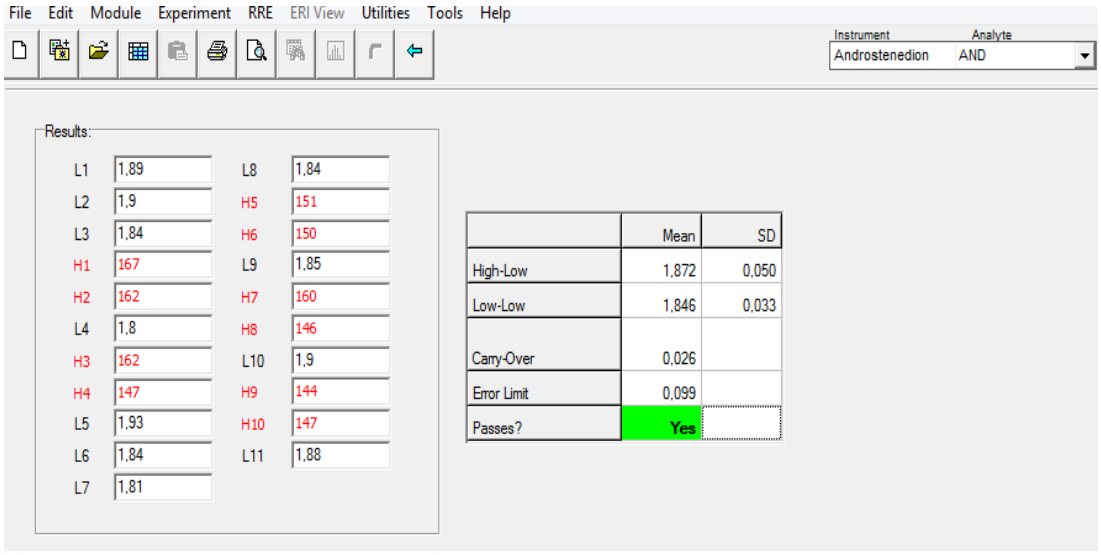
4.1.6. Taşıma (Carry-over)

Androstenedion için yapılan taşıma çalışmasının sonuçları Çizelge 4.11'de gösterilmektedir

Çizelge 4.11**. Androstenedion taşıma çalışması sonuçları**

Carryover Analysis			
High-Low Mean	1,872	Error limit	0,099
Low-Low Mean	1,846	Passes?	Yes
Carryover	0,026		

Experimental Results			
Sample	**Result**	**Low-Low Results**	**High-Low Results**
L1	1,89		
L2	1,9	*	
L3	1,84	*	
H1	167		
H2	162		
L4	1,8		*
H3	162		
H4	147		
L5	1,93		*
L6	1,84	*	
L7	1,82	*	
L8	1,84	*	
H5	151		
H6	150		
L9	1,85		*
H7	160		
H8	146		
L10	1,9		*
H9	144		
H10	147		
L11	1,88		*
MEAN		**1,846**	**1,872**
SD		**0,033**	**0,049**
Carryover	**0,026**		



Şekil 4.11. Androstenedion caryyover çalışması EP-evaluator analizi sonucu

Androstenedion için yapılan taşıma çalışması sonucu EP-evaluator analizi ile değerlendirildiğinde 0,026 olarak tespit edilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farkın total izin verilen hatadan (23,51) küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylenir.

4.1.7. Matriks etkisi

Martiks etkisi çalışması için 0,2 ng/mL, 2 ng/mL ve 20 ng/mL androstenedion standartları kulanıldı.

Çizelge 4.12. Androstenedion matriks etkisi çalışma sonuçları

	Pik alanı	**% Matriks etkisi**
Mobil faz+ 20 ng/mL std	$7{,}54\times10^{4}$	-8,1
Serum havuzu+20 ng/mL std	$6{,}93\times10^{4}$	
Mobil faz+ 2 ng/mL std	$8{,}20\times10^{3}$	9,1
Serum havuzu+ 2 ng/mL std	$8{,}95\times10^{3}$	
Mobil faz+ 0,2 ng/mL std	$1{,}24\times10^{3}$	9,6
Serum havuzu+ 0,2 ng/mL std	$1{,}36\times10^{3}$	

Androstenedion için % matriks etkisi aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

% Matriks etkisi= ($\frac{\textit{Ekstrakte edilen numunenin pik alanı}}{\textit{Ekstrakte edilmeyen numunenin pik alanı}}$-1)x100

20 ng/mL için % matriks etkisi= $(\frac{6,98x10^4}{7,54x10^4} - 1)x100$= -8,1

2 ng/mL için % matriks etkisi= $(\frac{8,95x10^3}{8,2x10^3} - 1)x100 = 9,1$

0,2 ng/mL için matriks etkisi= $(\frac{1,36x10^3}{1,24x10^3} - 1)x100 = 9,6$

4.1.8. Referans Aralık Doğrulama

Referans aralık doğrulama çalışması için 10 sağlıklı kadın ve erkekten alınan 20 adet serum numuneleri LC-MS/MS yöntemiyle analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Mayo Medical Laboratuvarı androstenedion referans aralıkları ile karşılaştırıldı.

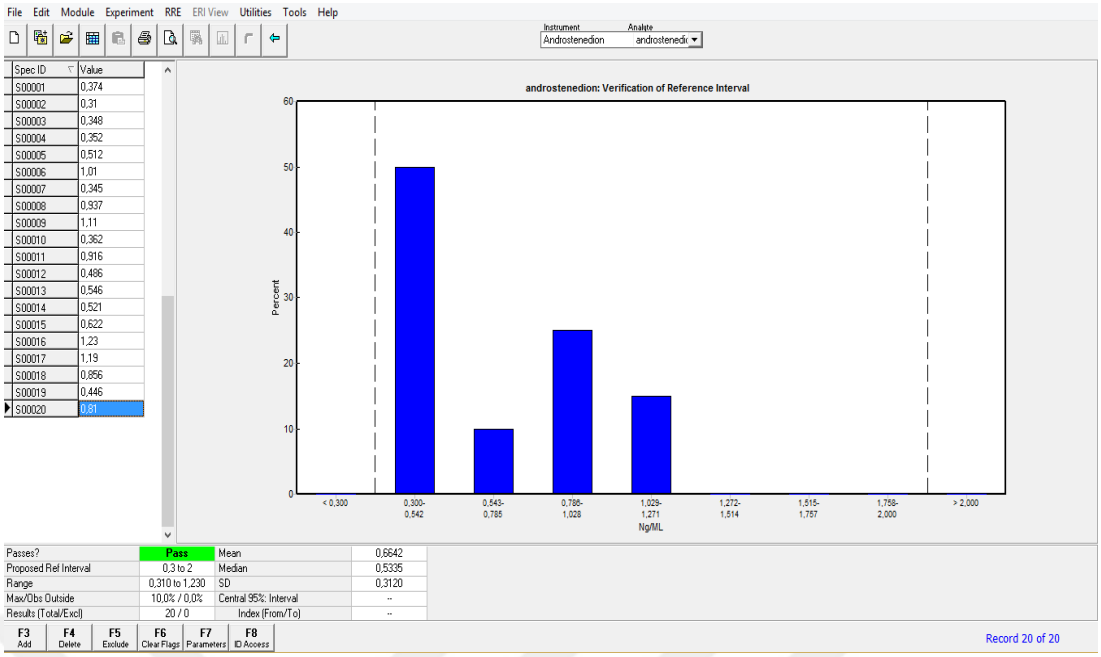
Mayo Medical Loboratuvarı androstenedion referans aralıkları;

Erkek: 0,4-1,5 ng/mL

Kadın: 0,3-2 ng/mL

Çizelge 4.13. Androstenedion referans aralık doğrulama çalışması sonuçları

KADIN (ng/mL)	ERKEK (ng/mL)
0.374	0.916
0.31	0.486
0.348	0.546
0.352	0.521
0.512	0.622
1.01	1.23
0.345	1.19
0.937	0.856
1.11	0.446
0.362	0.81



Şekil 4.12. Androstenedion referans aralık doğrulama EP-evaluator analizi sonucu.

Referans aralık doğrulama çalışmamızın sonuçları referans aralığının içinde bulunmuştur. Uyumsuzluk oranı % 0 olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen LC-MS/MS yönteminde Mayo Medical Laboratuvarı androstenedion referans aralıkları kullanılabilir.

4.1.9. Numune Stabilitesi

Androstenedion için numune stabilitesinin tespitinde yapılan çalışmanın sonuçları ve ölçümler arası hesaplanan % biaslar Çizelge 4.14'de görülmektedir.

Çizelge 4.14. Numune stabilite çalışma verileri

	1.gün ölçülen değer (ng/mL)	15. gün ölçülen değer (ng/mL)	30. gün ölçülen değer (ng/mL)	45. gün ölçülen değer (ng/mL)	15. gün % bias	30. gün % bias	45. gün % bias
Hasta serumu	2.73	2,54	2,18	1,39	-6,95	**-20,15**	**-49**

Westgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) androstenedion için % bias 10,47 olarak verilmiştir ve androstenedion için numune stabilitesinin 30. günde bozulduğu tespit edilmiştir.

4.1.10. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi

Androstenedion için dondurma-çözme etkisini belirlemek için yapılan çalışmanın sonuçları ve ölçümler arası hesaplanan % biaslar Çizelge 4.15'te görülmektedir.

Çizelge 4.15. Androstenedion dondurma-çözme etkisi çalışma verileri

	İlk okunan değer (ng/mL)	1.don-çöz analiz değeri (ng/mL)	2.don-çöz analiz değeri (ng/mL)	3.don-çöz analiz değeri (ng/mL)	4.don-çöz analiz değeri (ng/mL)
Hasta serumu	1.56 ng/mL	1.52 ng/mL	1.59 ng/mL	1.51 ng/mL	1.3 ng/mL
% Bias		-2,56	1,92	-3,2	**-16,6**

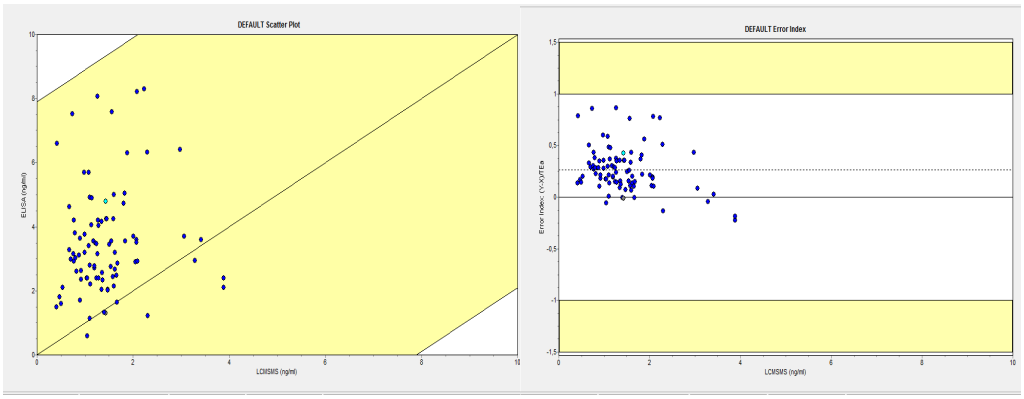
Westgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) kortizol için % bias 10,47 olarak verilmiştir. Androstenedion için yapılan dondurma çözmenin etkisinin belirlenmesi çalışmasında 4. okumada hesaplanan %bias değeri izin verilen bias değerinden (%10,47) yüksek çıktığı için 4. okumada bozulma tespit edilmiştir.

4.2. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması

LC-MS/MS, RIA ve ELISA ile yapılan androstenedion ölçümleri kıyaslanmış ve aralarındaki ilişki regresyon analizi ile belirlenmiştir. Bu yöntemlerle elde edilen sonuçlar EP Evaluator, MedCalc ve SPSS 21 programları kullanılarak hesaplamaları yapılmıştır.

4.2.1. LC-MS/MS ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması

Serum androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının EP-Evaluator programı kullanılarak yapılan kıyaslama sonuçları Şekil 4.13'te verilmiştir.



Key Statistics

Number > TEa	None	
Error Index Range	-0,23 to 0,86	
Average Error Index	0,27	
Coverage Ratio	--	

Deming Regression Statistics
Y = Slope * X + Intercept

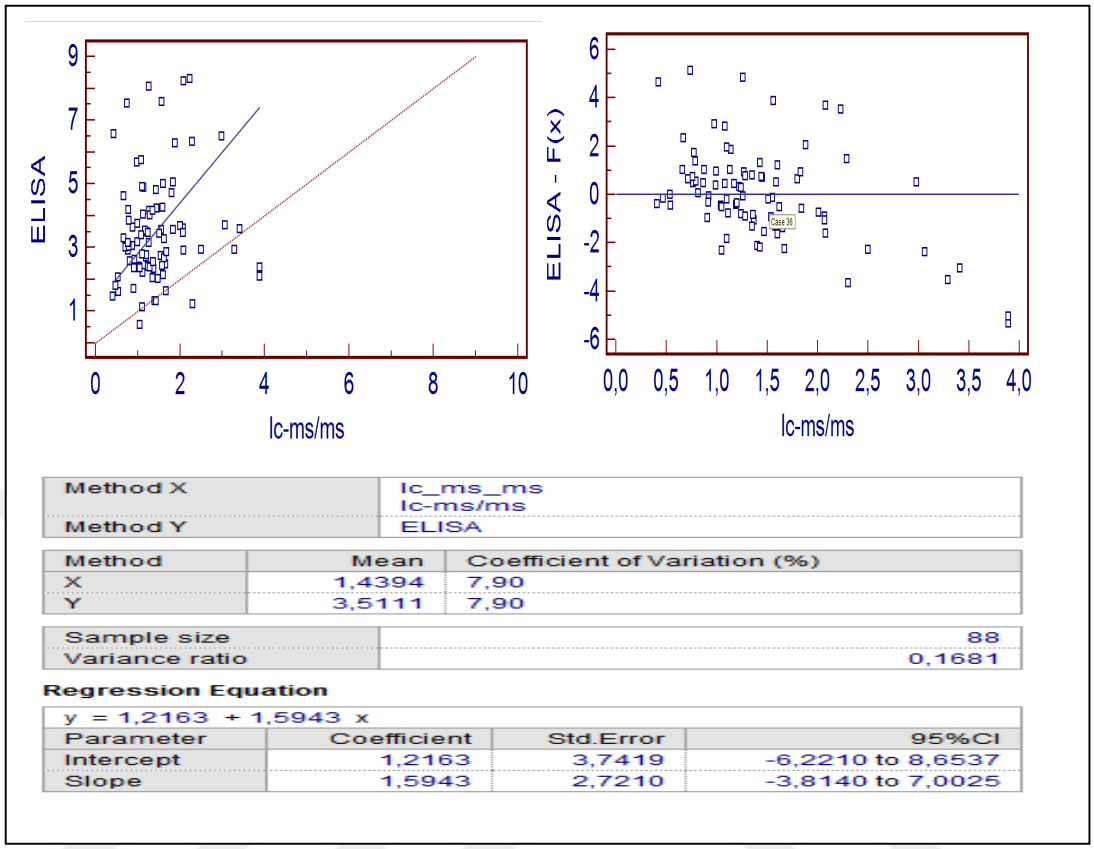
Correlation Coeff (R)	0,1033	
Slope	18,412 (14,462 to 22,363)	
Intercept	-22,8753 (-29,1889 to -16,5617)	
Std Error Estimate	13,0566	
N	87 of 90	

Other Statistics	**X (LCMSMS)**	**Y (ELISA)**
Range	0,410 to 3,890	0,590 to 8,300
Mean ± SD	1,4345 ± 0,7086	3,5368 ± 1,6486

Şekil 4.13. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması

Serum androstenedion sonuçlarının LC-MS/MS ve ELISA ile kıyaslanması sonucu elde edilen korelasyon 0,1033 olarak bulunmuştur.

Serum androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.14'te verilmiştir.



Method X	lc_ms_ms lc-ms/ms
Method Y	ELISA

Method	Mean	Coefficient of Variation (%)
X	1,4394	7,90
Y	3,5111	7,90

Sample size	88
Variance ratio	0,1681

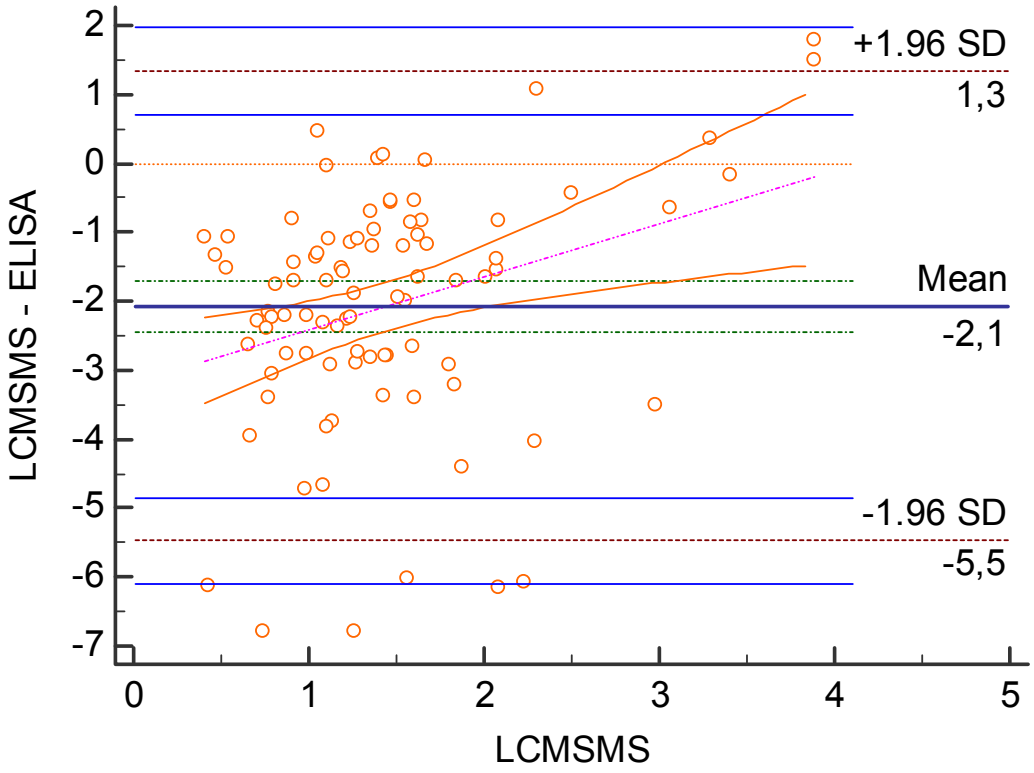
Regression Equation

y = 1,2163 + 1,5943 x

Parameter	Coefficient	Std.Error	95%CI
Intercept	1,2163	3,7419	-6,2210 to 8,6537
Slope	1,5943	2,7210	-3,8140 to 7,0025

Şekil 4.14. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri.

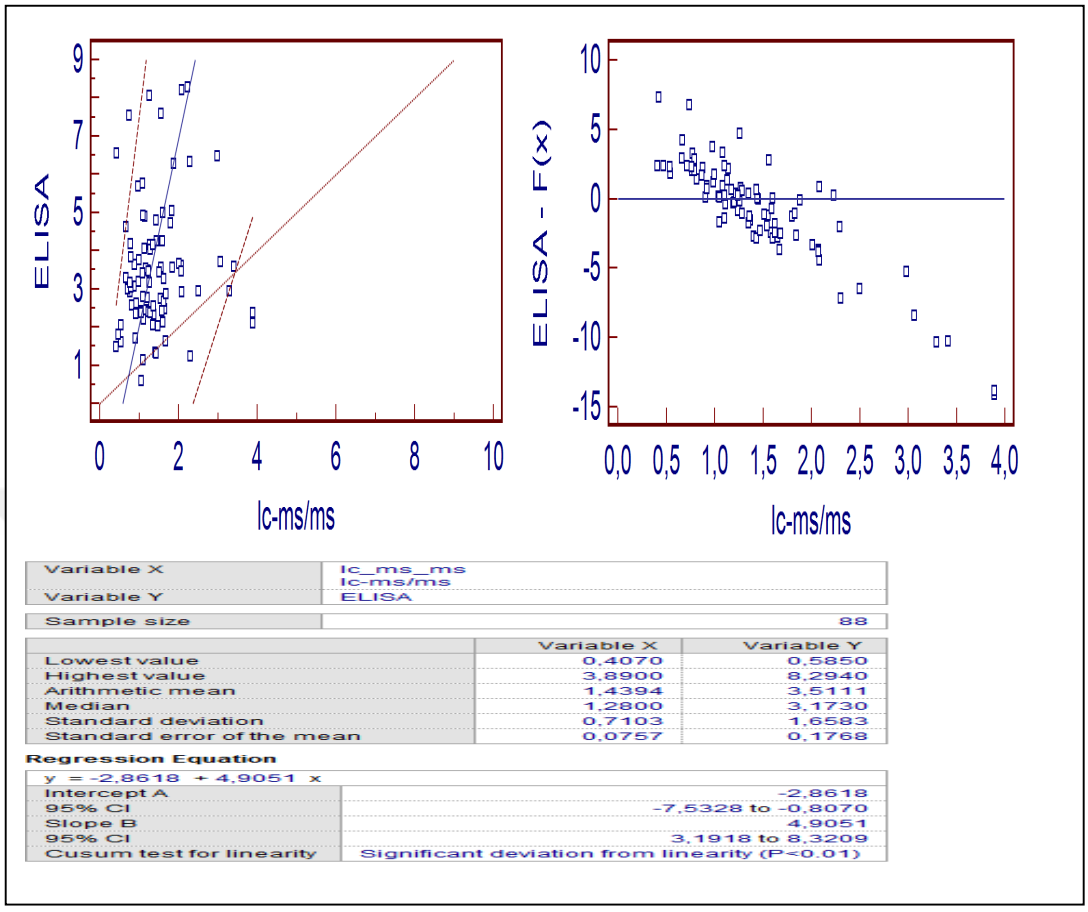
Serum androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.15'te verilmiştir.



Şekil 4.15. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman grafiği

Bland-Altman grafiği verilerine göre LC-MS/MS ölçümlerindeki değerler yükseldikçe ELISA/ LC-MS/MS oranı üç kata kadar çıkmaktadır.

Serum androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.16'da verilmiştir.



Variable X	lc_ms_ms lc-ms/ms
Variable Y	ELISA
Sample size	88

	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,4070	0,5850
Highest value	3,8900	8,2940
Arithmetic mean	1,4394	3,5111
Median	1,2800	3,1730
Standard deviation	0,7103	1,6583
Standard error of the mean	0,0757	0,1768

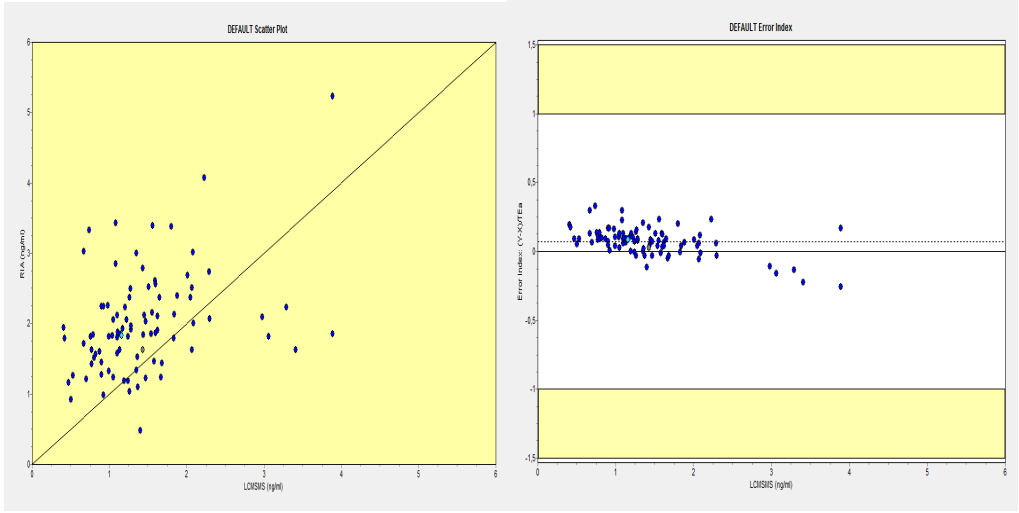
Regression Equation

y = -2,8618 + 4,9051 x	
Intercept A	-2,8618
95% CI	-7,5328 to -0,8070
Slope B	4,9051
95% CI	3,1918 to 8,3209
Cusum test for linearity	Significant deviation from linearity (P<0.01)

Şekil 4.16. Androstenedion LC-MS/MS ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve verileri.

4.2.2. LC-MS/MS ve RIA Yöntemlerinin Kıyaslanması

Serum androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının EP-Evaluator programı kullanılarak yapılan kıyaslama sonuçları Şekil 4.17'de verilmiştir.

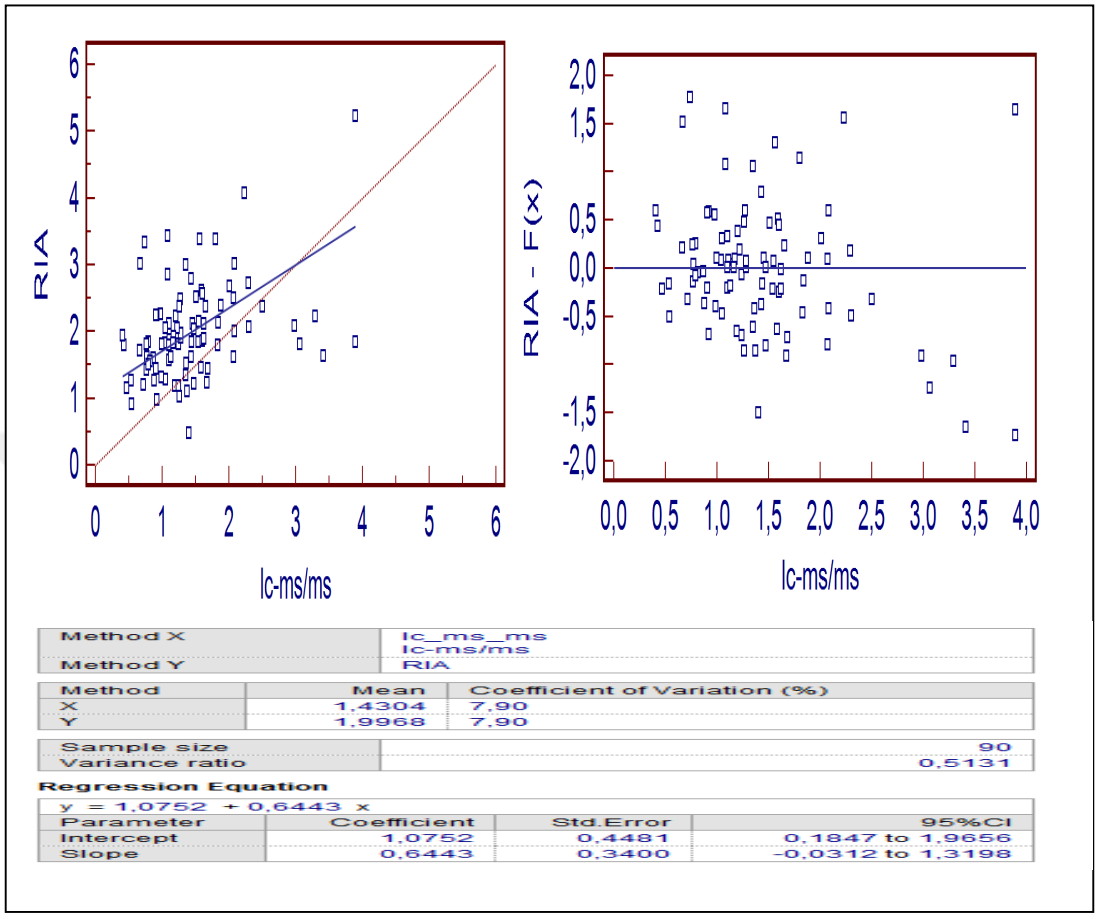


Key Statistics		
Number > TEa	None	
Error Index Range	-0,26 to 0,33	
Average Error Index	0,07	
Coverage Ratio	--	
Deming Regression Statistics		
Y = Slope * X + Intercept		
Correlation Coeff (R)	0,3712	
Slope	1,085 (0,832 to 1,338)	
Intercept	0,4541 (0,0525 to 0,8557)	
Std Error Estimate	0,8397	
N	89 of 90	
Other Statistics	**X (LCMSMS)**	**Y (RIA)**
Range	0,410 to 3,890	0,480 to 5,230
Mean ± SD	1,4254 ± 0,7034	2,0004 ± 0,7250

Şekil 4.17. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması

Serum androstenedion sonuçlarının LC-MS/MS ve RIA ile kıyaslanması sonucu elde edilen korelasyon 0,37 olarak bulunmuştur.

Serum androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Deming regresyon analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.18'de verilmiştir.



Method X	lc_ms_ms lc-ms/ms
Method Y	RIA

Method	Mean	Coefficient of Variation (%)
X	1,4304	7,90
Y	1,9968	7,90

Sample size	90
Variance ratio	0,5131

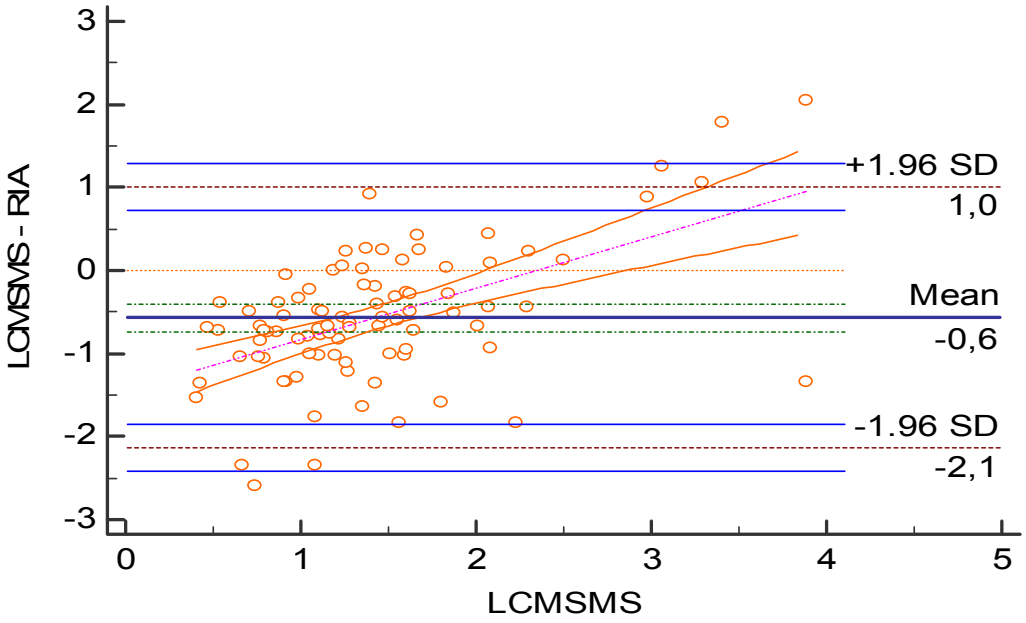
Regression Equation

y = 1,0752 + 0,6443 x

Parameter	Coefficient	Std.Error	95%CI
Intercept	1,0752	0,4481	0,1847 to 1,9656
Slope	0,6443	0,3400	-0,0312 to 1,3198

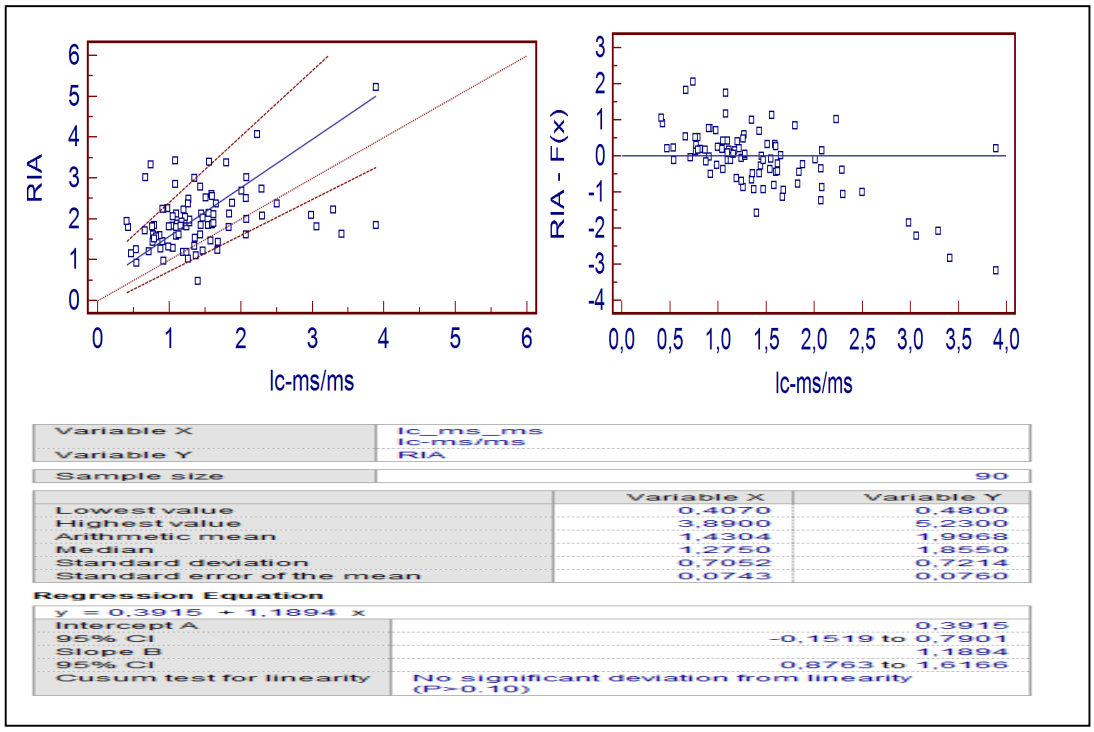
Şekil 4.18. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri.

Serum androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Bland-Altman analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.19'da verilmiştir.



Şekil 4.19. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Bland-Altman grafiği

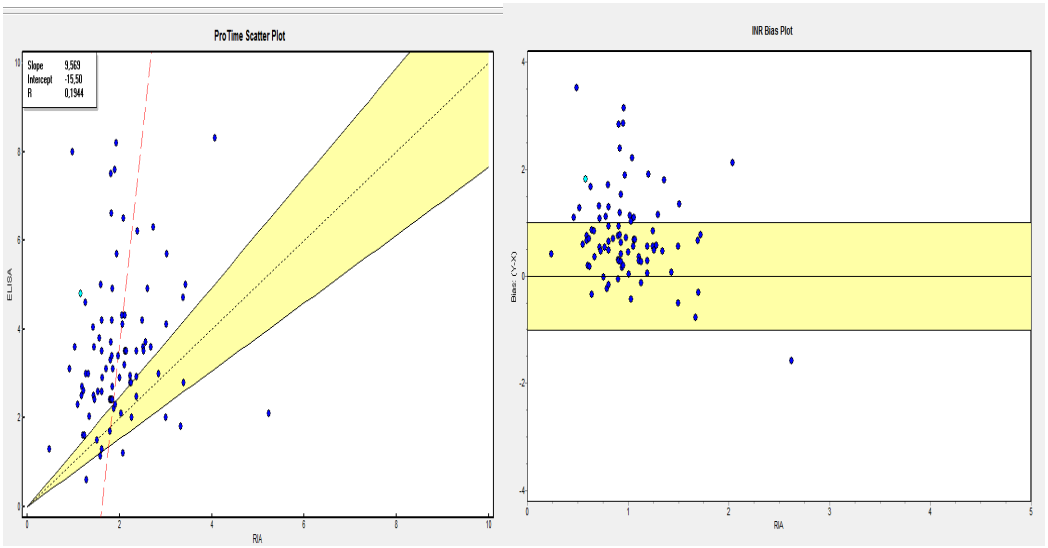
Serum androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Passing and Bablok analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.20'de verilmiştir.



Şekil 4.20. Androstenedion LC-MS/MS ve RIA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve veriler

4.2.3. RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması

Serum androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının EP-Evaluator programı kullanılarak yapılan kıyaslama sonuçları Şekil 4.21'de verilmiştir.



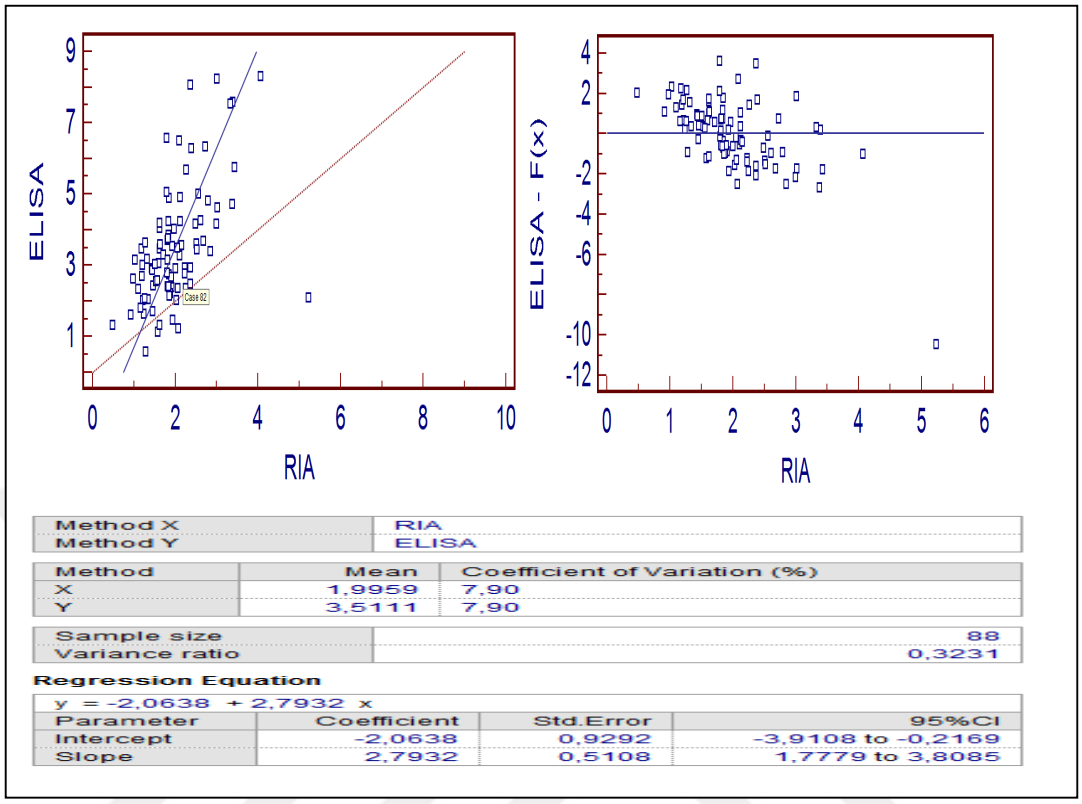
Deming Regression Statistics	ProTime	INR
Correlation Coeff (R)	0,1944	0,1940
Slope	9,569 (7,543 to 11,595)	9,565 (7,539 to 11,591)
Intercept	-15,50 (-19,78 to -11,21)	-7,747 (-9,889 to -5,604)
Std Error Estimate	6,88	3,446
N	87 of 90	87 of 90

Other Statistics	X (RIA)	Y (ELISA)
PT Range	0,5 to 5,2	0,6 to 8,3
PT Mean ± SD	1,99 ± 0,73	3,51 ± 1,66
INR Range	0,24 to 2,62	0,30 to 4,15
INR Mean ± SD	0,994 ± 0,365	1,757 ± 0,830

Şekil 4.21. Androstenedion Androstenedion RIA ve ELISA yöntemlerinin EP-Evaluator programında kıyaslaması

Serum androstenedion sonuçlarının RIA ve ELISA ile kıyaslanması sonucu elde edilen korelasyon 0,19 olarak bulunmuştur.

Serum androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.22'de verilmiştir.



Method X	RIA
Method Y	ELISA

Method	Mean	Coefficient of Variation (%)
X	1,9959	7,90
Y	3,5111	7,90

Sample size	88
Variance ratio	0,3231

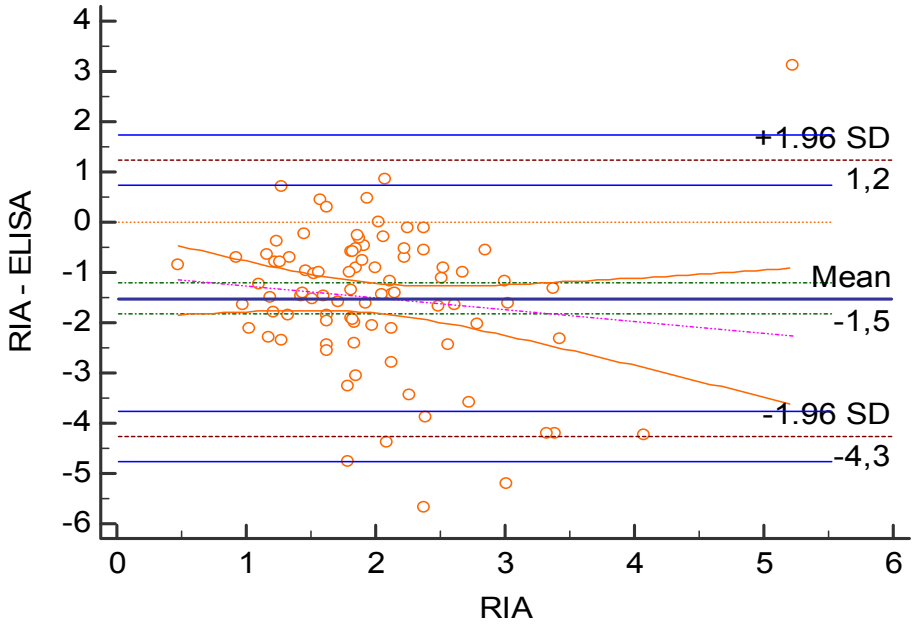
Regression Equation

y = -2,0638 + 2,7932 x

Parameter	Coefficient	Std.Error	95%CI
Intercept	-2,0638	0,9292	-3,9108 to -0,2169
Slope	2,7932	0,5108	1,7779 to 3,8085

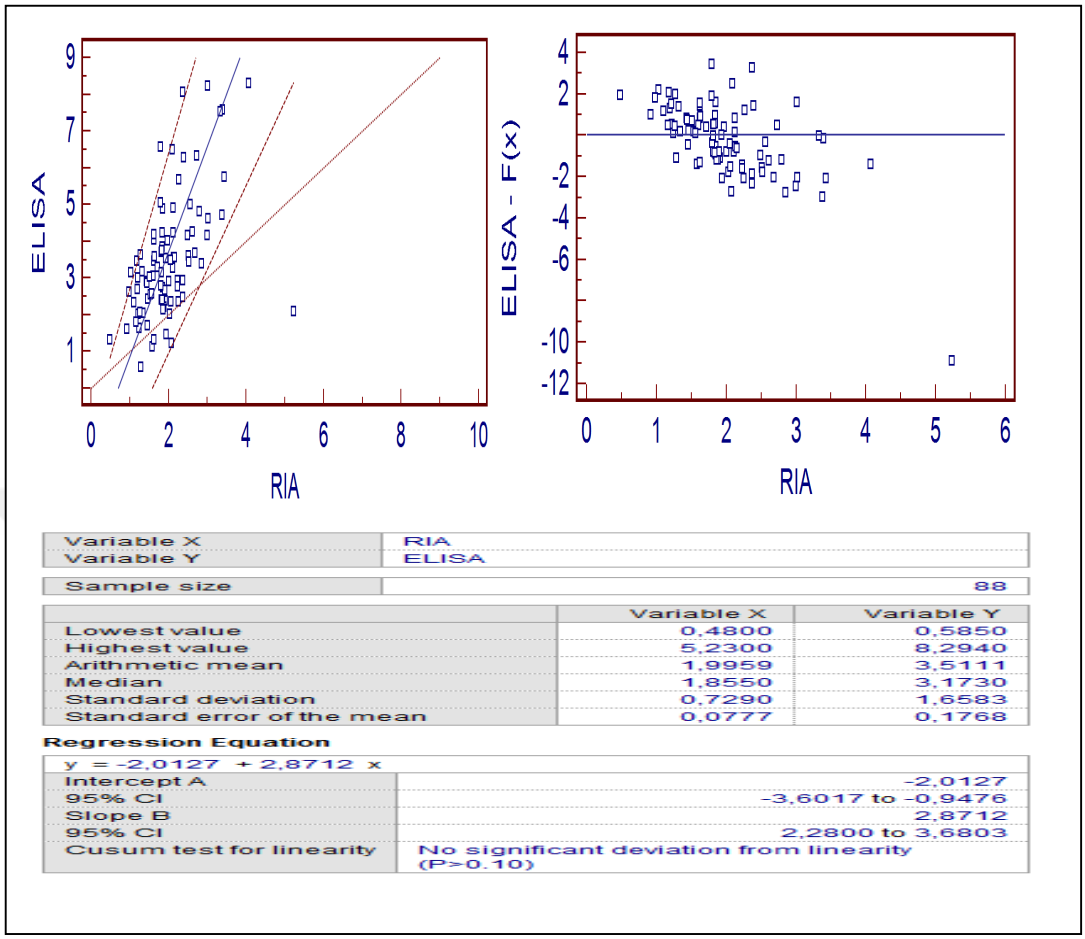
Şekil 4.22. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Deming regresyon grafiği ve verileri

Serum androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.23'te verilmiştir.



Şekil 4.23. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Bland-Altman grafiği

Serum androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok analizli yapılarak elde edilen sonuçları Şekil 4.24'de verilmiştir.



Variable X	RIA
Variable Y	ELISA
Sample size	88

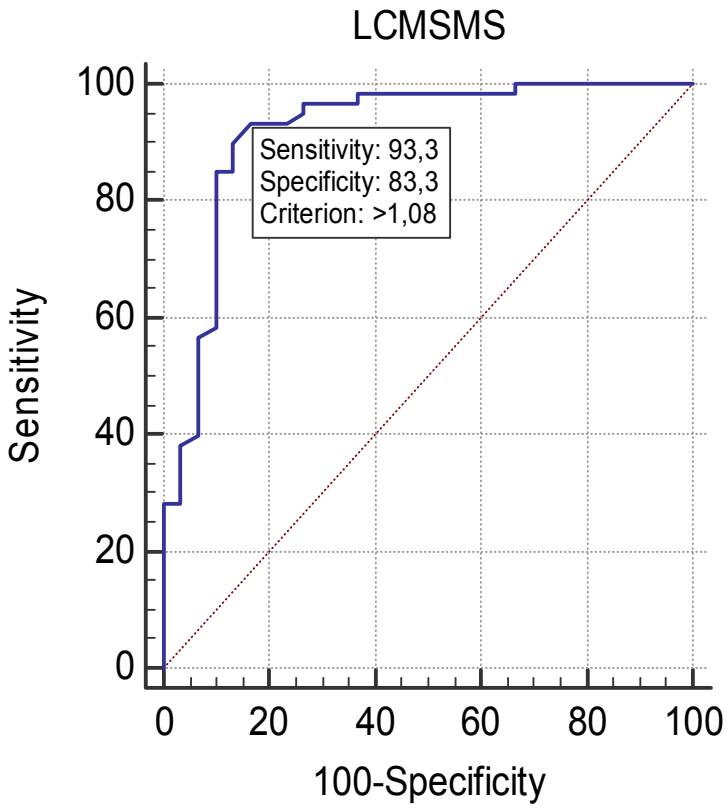
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,4800	0,5850
Highest value	5,2300	8,2940
Arithmetic mean	1,9959	3,5111
Median	1,8550	3,1730
Standard deviation	0,7290	1,6583
Standard error of the mean	0,0777	0,1768

Regression Equation

y = -2,0127 + 2,8712 x	
Intercept A	-2,0127
95% CI	-3,6017 to -0,9476
Slope B	2,8712
95% CI	2,2800 to 3,6803
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P>0.10)

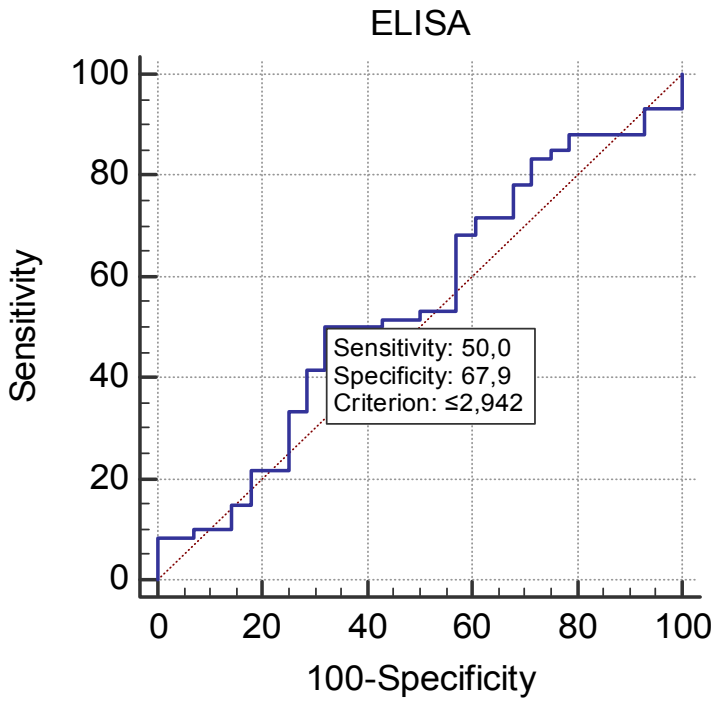
Şekil 4.24. Androstenedion RIA ve ELISA sonuçlarının Passing and Bablok grafiği ve verileri

4.2.4. LC-MS/MS, ELISA ve RIA Metodlarının ROC İstatistiği İle Kıyaslanması



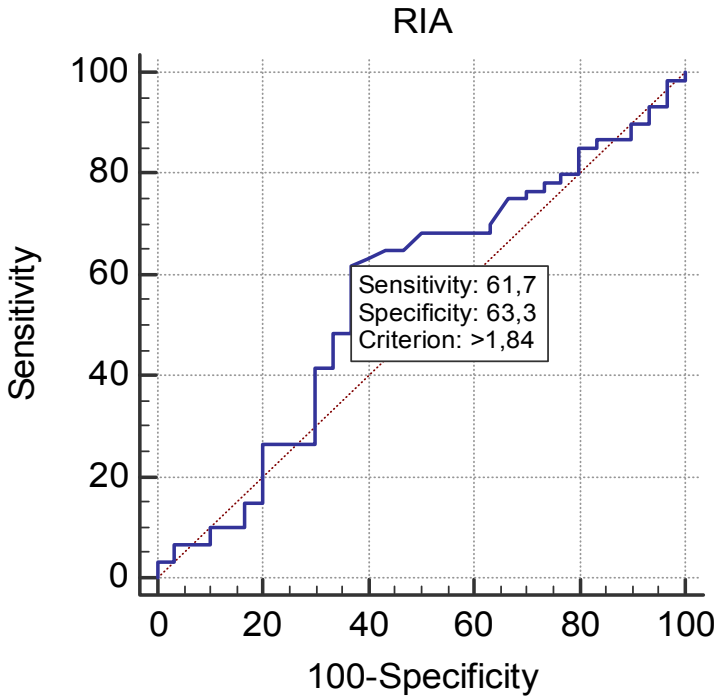
Sample size	90
Positivegroup[a]	60(66,67%)
Negativegroup[b]	30(33,33%)
Area under the ROC curve (AUC)	0,919
Standard Errora	0,0351
95% Confidence intervalb	0,842 to 0,966
z statistic	11,936
Significance level P (Area=0.5)	<0,0001

Şekil 4.25. LC-MS/MS ROC analiz sonuçları



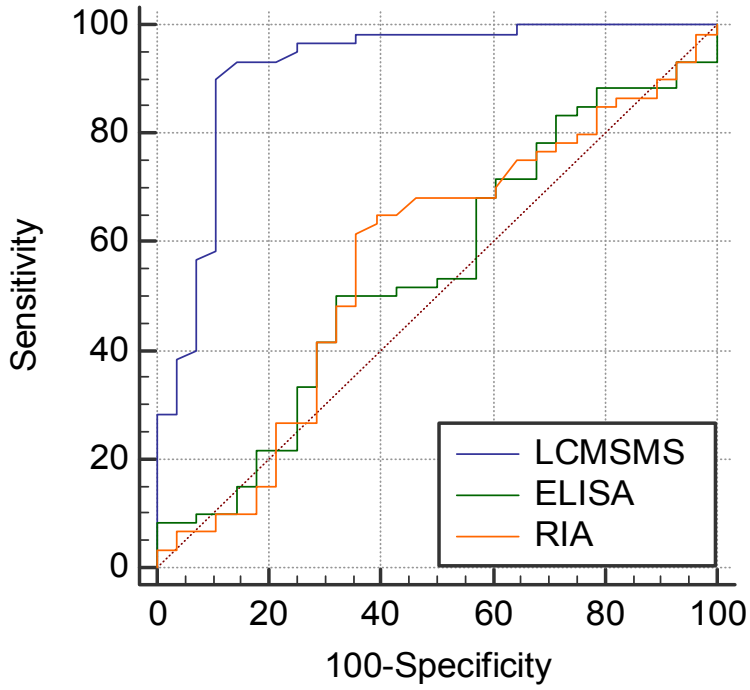
Sample size	88
Positivegroup[a]	60(68,18%)
Negativegroup[b]	28(31,82%)
Area under the ROC curve (AUC)	0,546
Standard Errora	0,0672
95% Confidence intervalb	0,436 to 0,652
z statistic	0,682
Significance level P (Area=0.5)	0,4950

Şekil 4.26. ELISA ROC analiz sonuçları



Sample size	90
Positivegroup[a]	60(66,67%)
Negativegroup[b]	30(33,33%)
Area under the ROC curve (AUC)	0,559
Standard Errora	0,0665
95% Confidence intervalb	0,450 to 0,663
z statistic	0,881
Significance level P (Area=0.5)	0,3783

Şekil 4.27. RIA ROC analiz sonuçları



Sample size			88
Positivegroup[a]			60(68,18%)
Negativegroup[b]			28(31,82%)
Variable	AUC	SE[a]	95% CI[b]
LCMSMS	0,919	0,0369	0,842 to 0,967
ELISA	0,546	0,0672	0,436 to 0,652
RIA	0,566	0,0687	0,456 to 0,671
LCMSMS ~ ELISA			
Difference between areas			0,374
Standard Error[a]			0,0872
95% Confidence Interval			0,203 to 0,544
z statistic			4,282
Significance level			**P < 0,0001**
LCMSMS ~ RIA			
Difference between areas			0,353
Standard Error[a]			0,0678
95% Confidence Interval			0,220 to 0,486
z statistic			5,209
Significance level			**P < 0,0001**

ELISA ~ RIA	
Difference between areas	0,0202
Standard Error[a]	0,118
95% Confidence Interval	-0,211 to 0,251
z statistic	0,172
Significance level	P = **0,8638**

Şekil 4.28. LC-MS/MS-ELISA-RIA ROC analiz sonuçları

4.2.5. SPSS İstatistik Sonuçları

Laboratuar sonuçları ve yapılan ultrason muayenesi ile teşhisleri kesinleştirilmiş 60 PKOS' lu hasta grubu ve herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan, ilaç kullanmayan 30 kontrol grubundan oluşan numunelerin ölçülmesiyle elde edilen sonuçlar SPSS programında istatistikleri yapılarak karşılaştırılmış ve ELISA, RIA, prolaktin ve TSH sonuçları parametrik dağılım gösterirken, LC-MS/MS, FSH, LH ve E_2 sonuçları non-parametrik dağılım göstermiştir. Ölçülen bu değerlere ait ortalama ve SD'leri Çizelge 4.16'da gösterilmiştir.

Çizelge 4.16. Hasta ve kontrol grubu ortalama ve SD'leri

	ORTALAMA ±SD		
Parametreler	**PKOS (n:60)**	**KONTROL (n:30)**	**p**
***LC-MS/MS**	1,43 ±0,69	0,89±0,32	<0,001
***ELISA**	3,51±1,72	3,46±1,54	0,669
***RIA**	2±0,76	2,02±0,64	0,536
YAŞ	22±2,83	21±7,9	0,51
FSH	6,35±1,56	8,82±8,8	0,87
LH	10,26±5,93	10,72±5,53	0,311
E2	40,5±15,9	37±59,7	0,002
PROLAKTİN	20,97±10,3	21,35±10,7	0,638
TSH	2±0,97	1,98±1,47	0,9

*: LC-MS/MS, ELISA ve RIA androstenedion sonuçlarına göre kıyaslanmıştır.

Parametrik dağılım gösteren ELISA, RIA, prolaktin ve TSH sonuçlarında independent simple t testi uygulanmıştır. Sırasıyla p değerleri 0,669, 0,536, 0,638,

0,9 olarak bulunmuştur. Pkos grubu ve kontrol grubu arasında bu ölçümler için herhangi bir farka rastlanmamıştır.

Non-parametrik dağılım gösteren LC-MS/MS, FSH, LH ve E_2 sonuçları için Mann- Whitney U testi yapılmıştır. Sırasıyla p değerleri <0,001, 0,87, 0,311, 0,002 olarak bulunmuştur.

SPSS'te yapılan korelasyon analizinde LC-MS/MS ve RIA'nın arasında androstenedion ölçümleri açısından (+) korelasyonu bulunmaktadır, p<0,001 olduğu için bu korelasyon güçlüdür ve R^2 değeri 0,363'tür.

5. TARTIŞMA

Adrenal bez yaşam için zorunlu olan ve organizmanın genel fizyolojik düzenini sağlamada iş gören önemli endokrin organdır ve bu bezde meydana gelebilecek herhangi bir sorun androjenlerin miktarını değiştirip çeşitli hastalıklara yol açabilir. Bu nedenle androjenlerin miktarını belirlemede doğru bir ölçüm yöntemi ve steroidleri hızlı, geniş bir yelpazede ölçebilecek metodlar kullanmak önemlidir (Koal ve ark 2012). Steroidlerin moleküler ağırlıklarının düşük olması ve moleküler yapılarının birbirlerine benzemesi ölçüm metodları arasında en güvenilir olanı ve en hassas ölçüm yapan yöntemi tercih etmeyi gerekli hale getirmiştir. Rutin laboratuarlarda kullanılan yöntemlerle kıyaslandığında, yapılan analizlerde interferans sorununu ortadan kaldırması, aynı anda çok sayıda steroidi az bir numune ile çalışabilme imkanı vermesi, sensitive ve spesifitesinin fazla olması sebebiyle LC-MS/MS cihazlarının önemi artmaktadır (Soldin ve ark 2005, Khajuria ve ark 2007, Van den Ounweland ve Kema 2011, Upreti ve ark 2014).

Çalışmamızda LC-MS/MS'te androstenedion için metot validasyonu CLSI kurallarına göre tamamlanmış, 60 PKOS' lu hasta grubu ve 30 kontrol grubundan oluşan numunelerin ölçülmesiyle elde edilen sonuçların ELISA ve RIA metodlarıyla kıyaslaması da yapılmıştır.

Metot validasyonu çalışmasında en yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırasıyla androstenedion için 287,1/97, izotop (d5) için ise 352,2/113,1 olarak belirlenmiştir. IS 5500 volt, sıcaklık 600 ^{0}C, total flow 0,5 ml/dk en yüksek intensitenin elde edildiği cihaz parametreleri olup metod bu parametlerle uygulanmıştır.

Metot validasyon çalışmasında androstenedion için 0,097- 50 ng/mL aralığı lineer bulunmuş, linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (R^2) değeri 0,9987 olarak hesaplanmıştır. Khajuria ve ark (2007) de androstenedion için R^2 değerini 0,999 olarak bulmuşradır. CLSI kurallarına göre R^2 değerinin >0,99 olması istenmektedir. Androstenedion için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0,097 ng/mL , kantitasyon limiti 0,195 ng/mL olarak tespit edilmiştir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 20 ng/mL, 2 ng/mL ve 0,3 ng/mL'lik konsantrasyonlar hazırlanarak çalışma içi ve günlerarası tekrarlanabilirlik çalışması

yapılmıştır. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen %CV'ler sırasıyla %4,7, %6,4 ve %11,7 olarak bulunmuştur ve bütün konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin içinde bulunmuştur. Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında 20 ng/mL ve 2 ng/mL'lik konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik %CV'leri sırasıyla %2,9 ve %8 olarak bulunmuş ve bu konsantrasyonlar için tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin içinde iken, 0,3 ng/mL'lik konsantrasyon için elde edilen %CV %7,7 tekrarlanabilirlik kabul edilebilir düzeyin üstüne bulunmuştur. Bizim için androstenedionun yüksek konsantrasyonları patoloji yaratabileceğinden dolayı alt sınırlardan ziyade metodun üst sınırları sorunsuz ölçmesi önem taşımaktadır.

Geri elde çalışmasında üç konsantrasyon için % ortalama geri elde değeri % 88,7 olarak bulunmuştur ve bu değer standartlara uygundur. Kushnir ve ark'nın (2010) yaptıkları çalışmada geri elde %79 olarak bulunmuştur.

Androstenedion için moleküler yapısı androstenediona benzer olan DHEA, aldosteron ve kolesterol ile interferans çalışması yapılmış ve elde edilen bias değerleri izin verilen bias değerlerinden (10,47) küçük olduğu için androstenedion molekülü ile DHEA, aldosteron ve kolesterol arasında interferans olmadığı kabul edilmiştir. Methline ve ark ları (2013) te yaptıkları interferans çalışmasında herhangi bir interferans etkiye rastlamamışlardır.

Taşıma çalışması sonucu EP-evaluator analizi ile değerlendirildiğinde 0,026 olarak tespit edilmiştir. Grup ortalamaları arasındaki farkın (0,026) total izin verilen hatadan (23,51) küçük olması durumunda taşıma hatası olmadığı söylenir. Bizim çalışmamızda da önemli bir taşıma etkisinin olmadığı sonucu elde edilmiştir.

Martiks etkisi çalışması için 20 ng/mL, 2 ng/mL ve 0,2 ng/mL androstenedion standartları kulanılarak gerçekleştirildi sırasıyla % matriks etkisi -8,1, 9,1 ve 9,6 olarak bulunmuştur ve herhangi bir matriks etkisine rastlanmamıştır.

Referans aralık doğrulama çalışması için 20 sağlıklı kadın ve erkekten alınan serum numuneleri LC-MS/MS yöntemiyle analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Mayo Medical Laboratuvarı androstenedion referans aralıkları ile karşılaştırıldı. Referans aralık doğrulama çalışmamızın sonuçları referans aralığının içinde bulunmuştur. Uyumsuzluk oranı % 0 olarak tespit edilmiştir. Geliştirilen LC-MS/MS yönteminde

Mayo Medical Laboratuvarında belirtilen androstenedion referans aralıkları kullanılabilir.

Nunumune stabilitesinin tespitinde yapılan çalışmada ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar 15. gün %-6,95, 30. gün %-20,15, 45.gün %-49 olarak bulunmuştur. Westgard'ın web sitesinde (www.westgard.com/biodatabase) androstenedion için % bias 10,47 olarak verilmiştir ve androstenedion için numune stabilitesinin 30. günde bozulduğu tespit edilmiştir. Kushnir ve ark ları (2010) yaptıkları numune stabilitesi çalışmasında -20 ^{0}C serum androstenedion seviyelerinin her hafta miktarının %15 düştüğünü tespit etmişlerdir.

Dondurma-çözme etkisini belirlemek için yapılan çalışmada ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar 1.don-çöz analiz için %-2,56, 2.don-çöz analiz için %1,92, 3.don-çöz analiz için %-3,2, 4.don-çöz analiz için %-16,6 olarak bulunmuştur. Androstenedion için yapılan dondurma çözmenin etkisinin belirlenmesi çalışmasında 4. okumada hesaplanan %bias değeri izin verilen bias değerinden (%10,47) yüksek çıktığı için 4. okumada bozulma tespit edilmiştir.

LC-MS/MS, ELISA ve RIA yöntem karşılaştırma çalışmasında üç yöntem ile serum androstenedion ölçümü kontrol ve hasta grubu olmak üzere iki grup ile gerçekleştirilmiş ve sonuçların regresyon analizleri yapılmıştır.

LC-MS/MS ve ELISA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 18,412, intercept -22,87 ve r^2 değeri 0,1033 olarak bulunmuştur. Bland-Altman grafiği verilerine göre LC-MS/MS okunan değerler yükseldikçe ELISA/ LC-MS/MS oranıda üç katına kadar çıkabilmektedir.

LC-MS/MS ve RIA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 1,085, intercept 0,4541 ve r^2 değeri 0,3712 olarak bulunmuştur. RIA; ELISA' ya göre sonuçları daha düşük ve LC-MS/MS değerlerine yakın okumuştur. Ancak hasta grubu tespitinde LC-MS/MS diğer metodlardan üstünlük sağlamıştır. Hsing ve ark (2007)'nın yaptıkları çalışmada da RIA ve LC-MS/MS arasında korelasyon tespit etmişlerdir fakat RIA'ya göre LC-MS/MS'in düşük miktardaki steroidleri, daha iyi okuduğu gösterilmiştir. Yine Keefe ve ark (2014) yaptıkları çalışmada RIA'nın LC-MS/MS'e göre sonuçları yüksek okuduğunu belirtmişlerdir.

RIA ve ELISA karşılaştırma çalışmasında slope değeri 9,57, intercept -15,5 ve r^2 değeri 0,19 olarak bulunmuştur. Bland-Altman grafiği verilerine göre ELISA'nın , RIA'dan daha yüksek okuduğunu tespit ettik.

ROC istatistik analiz sonuçlarına göre LC-MS/MS- ELISA ve LC-MS/MS-RIA kıyaslamasında fark varken ($p<0,0001$), ELISA-RIA arasında herhangi bir farka rastlanmadı ($p= 0,8638$).

Metot karşılaştırma çalışmasında ELISA'nın diğer metotlara göre sonuçları oldukça yüksek okuduğunu ve diğer metodlarda sonuçlar arttıkça ELISA'da bu yüksekliğin üç kata kadar çıktığını tespit ettik. Keefe ve ark'ları (2014) yaptıkları çalışmada, LC-MS/MS'e göre diğer metotların steroid ölçümlerinde sonuçları yüksek verdiğini söylemişlerdir. ELISA sonuçlarının bu kadar yüksek çıkmasında interferansın rolü olabileceğini düşünmekteyiz. Yine Janse ve ark (2011) yaptıkarı çalışmada düşük konsantrasyona sahip steroid miktarlarının ölçümünde LC-MS/MS'in RIA ya göre üstünlük sağladığını, hassaslık ve spesifiklik açısından da tercih edilmesi gerektiğini vurgulamışlardır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Serum androstenedion ölçümü, kadınlarda hirşutizm sebebiyle yapılan araştırmalar için yönlendiricidir. Hirşutizm vakalarının %60'ında serum androstenedion konsantrasyonlarının yüksek bulunduğu bildirilmiştir. Polikistik over sendromu, tanı kriterleri ve populasyonlardaki sıklıkları degisiklik göstermesine ragmen, dogurganlık yasındaki kadınlarda en sık gözlenen hormonal bozukluktur. Sendromun klinikte karsımıza çıkan en sık bulguları anovulasyon / oligomenore, hirsutizm, akne, obezite ile karşımıza çıkmaktadır. PKOS'lu kadınlarda anovulasyon ve yüksek östrojen maruziyeti nedeniyle endometriyal hiperplazi ve endometriyal kanser riski de artmıştır (Gluszak ve ark 2011, Pasquali ve ark 2013).

ELISA ve RIA yöntemleri; uygulama zorlukları, radyoaktif materyalin uzaklaştırılmasının gerekmesi, özellikle interferans sebebiyle selektivitelerinin düşük olması, aynı örnekten yapılan analizlerde farklı sonuçlar elde edilmesi, tek seferde sadece bir analitin tayin edilebilmesi LC-MS/MS'e göre dezavantaj sağlamaktadır.

CLSI kurallarına göre LC-MS/MS'te androstenedion için validasyon tamamlanmış ve RIA ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırma çalışması yapılmış LC-MS/MS'in özellikle de hasta ve kontrol grubu ile yapılan ölçümlerde ELISA ve RIA yöntemlerine göre tanı koymada daha etkili olabileceği sonucuna varılmıştır.

Yüksek sensitive ve spesifite ile daha doğru hasta sonuçları verebilmek için LC-MS/MS kullanımını önermekteyiz.

KAYNAKLAR

1. Adams JM, Otero-Corchon V, Hammond GL, Veldhuis JD, Qi N, Low MJ, 2015. Somatostatin is essential for the sexual dimorphism of GH secretion, corticosteroid-binding globulin production, and corticosterone levels in mice. Endocrinology. 156(3):1052-65.
2. Akça M, Aydoğdu SD, Doğruel N, Kural N, 2003. Adrenokortikal yetmezlik ve hipoparatiroidizm. Türk Pediatri Arşivi. 38: 247-49.
3. Akın L, 2012. Adolesanlarda hiperandrojenizim. Turkish Journal of Family Practice. 16:548-52.
4. Annesley TM, 2003. Ion suppression in mass spectrometry. Clin Chem. 49(7), 1041-4.
5. Annesley TM, 2007. Methanol-associated matrix effects in electrospray ionization tandem mass spectrometry. Clin Chem. 53(10), 1827-34.
6. Annesley TM, Clayton LT, 2008. Ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for iohexol in human serum. Clin Chem. 55(6), 1196-202.
7. Annesley T, Majzoub J, Hsing A, Wu A, Rockwood A, Mason D, 2009. Mass spectrometry in the clinical laboratory: how have we done, and where do we need to be? Clin Chem. 55(6), 1236-9.
8. Audet WE, Lepine J, Greqoire J, Plante M, Caron P, Tetu B et al, 2011. Profiling of endogenous estrogens, their precursors, and metabolites in endometrial cancer patients: association with risk and relationship to clinical characteristics. J Clin Endocrinol Metab. 96, 330-9.
9. Bal C, Serdar MA, Güngör OT, Çelik HT, Abuşoğlu S et all, 2014. Biyokimya parametrelerinin ölçüm belirsizliğinin hesaplanması. Turk J Biochem. 39(4):538-43.
10. Barth JH, Field HP, Yasmin E, Balen AH, 2010. Defining hyperandrogenism in polycystic ovary synrome: measurement of testosterone and androstenedione by liquid chromatography-tandem mass spectrometry and analysis by receiver operator characteristic plots. Eur J Endocrinol. 162, 611-5.
11. Blouin K, Richard C, Brochu G, Hould FS, Lebel S et all, 2006. Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. J Endocrinol. 191(3):637-49.
12. Botelho JC, Shacklady C, Cooper HC, Tai SS, Van Uytfanghe K, Thienpont LM, Vesper HW, 2013. Isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry candidate reference method for total testosterone in human serum. Clin Chem. 59(2):372-80.
13. Burtis CA., Ashwood ER., et al. (2012). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics: Elsevier Health Sciences.
14. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR, 2007. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. Journal of Chromatography B. 852: 22–34.
15. Cinar N, Harmanci A, Aksoy DY, Aydın K, Yildiz BO, 2012. Adrenocortical steroid response to ACTH in different phenotypes of non-obese polycystic ovary syndrome. J Ovarian Res. 2215, 5-42.

16. Colosi DM, Bowden JA, Mora-Montero D, Garrett TJ, Yost RA, 2009. Investigation of HPLC-MS using a monolithic column to separate a diverse suite of steroids. J Chromatogr Sci. 47(1), 52-6.

17. Dudzinska B, Leubner J, Ventz M, Quinkler M, 2014. Sexual well-being in adult male patients with congenital adrenal hyperplasia. Int J Endocrinol. 2014;2014:469289. doi: 10.1155/2014/469289.

18. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A, 2000. Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement. Second Edition. USA, Eurachem/Cıtac. pp. 7-113.

19. Evliyaoğlu O, 2011. Polikistik over sendromu ve hirsutizm. Türk Ped Arşivi. 46: 97-102.

20. Fanelli F, I. Belluomo, V.D. Di Lallo, G. Cuomo, R. De Iasio et al, 2011. Serum steroid profiling by isotopic dilution-liquid chromatography–mass spectrometry: comparison with current immunoassays and reference intervals in healthy adults, Steroids. 76(3): 244–53.

21. Faupel-Badger JM, Fuhrman BJ, Xu X, Falk RT, Larry K, Veenstra TM et al, 2010. Comparison of liquid chromatography-mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 19, 292-300.

22. Ferrari P, 2010. The role of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human hypertension. Biochim Biophys Acta. 1802(12):1178-87.

23. Ferreira F, Martins JM, Vale SD, Esteves R, Nunes G, Carmo ID, 2013. Rare and severe complications of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency: a case report. J Med Case Rep. 6, 7-39.

24. Ferraldeschi R, Sharifi N, Auchus RJ, Attard G, 2013. Molecular pathways: Inhibiting steroid biosynthesis in prostate cancer. Clin Cancer Res. 19(13):3353-9.

25. Frıedrıch N, Völzke H, Rosskopf D, Steveling A, Krebs A, Nauck M et al, 2008. Reference ranges for serum dehydroepiandrosterone sulfate and testosterone in adult men. J Androl. 29(6): 610-7.

26. Ford HJ, 2013. Reduced quality and accelerated follicle loss with female reproductive aging-does decline in theca dehydroepiandrosterone (DHEA) underlie the problem? Ford Journal of Biomedical Science. 20:93.

27. Gallo PN, 2016. 60 years of pomc: Adrenal and extra-adrenal functions of ACTH. J Mol Endocrinol, 56(4): 135-56.

28. Garrido A, Munoz Y, Sierralta W, Valladares L**,** 2012. Metabolism of dehydroepiandrosterone sulfate and estrone-sulfate by human platelets. Physiol Res. 61(4), 381-8.

29. Ghosh D, Jiang W, Lo J, Eqbuta C, 2011. Higher order organization of human placental aromatase. Steroids. 76, 753-8.

30. Gluszak O, Stopinska-Gluszak U, Glinicki P, Kapuscinska R, Snochowska H, Zgliczynski W, Debski R, 2012. Phenotype and metabolic disorders in polycystic ovary syndrome. ISRN Endocrinol. 569862, 7 pages. doi: 10.5402/2012/569862.

31. Guyton A, 2007. Tıbbi Fizyoloji, 11. Basım, Nobel tıp kitabevi, 755-6.

32. Günöz H, 2008. Surrenal yetersizlik. Çocuk Dergisi 8(3):145-51.

33. Hadrup N, Taxvig C, Pedersen M, Nellemann C, Hass U, Vinggaard AM, 2013. Concentration addition, independent action and generalized concentration addition models for mixture effect prediction of sex hormone synthesis in vitro. PLoS One. 22;8(8):e70490. doi: 10.1371/journal.pone.0070490.

34. Haring R, Hannemann A, John U, Radke D, Nauck M, Wallaschofski H et al, 2012. Age-specific reference ranges for serum testosterone and androstenedione concentratio in women measured by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Clin Endocrinol Metab. 97, 408-15.

35. Hsing AW, Stanczyk FZ, Belanger A, Schroeder P, Chang L, Falk RT, Fears TR, 2007. Reproducibility of serum sex steroid assays in men by RIA and mass spectrometry. Cancer Epidemion Biomarkers Prev. 16, 1004-8.

36. Ikushiro S, Kominami S, Takemori S, 1992. Adrenal P-450scc modulates activity of P-45011 beta in liposomal and mitochondrial membranes. Implication of P-450scc in zone specificity of aldosterone biosynthesis in bovine adrenal. J Biol Chem. 25;267(3):1464-9.

37. Imrich R, Vlcek M, Kerlik J, Vogeser M, Kirchhoff F, Penesova A, et al, 2014. Determinants of adrenal androgen hypofunction in premenopausal females with rheumatoid arthritis. Physiol Res. 63(3), 321-9.

38. Jamal H, Saygılı H, Akhan SE, Kartal A, Baysoy A, 2004. Asemptomatik Postmenopozal Kadınlarda Periferik Androjenlerin, Seks Hormonu Bağlayıcı Globülinin ve Vücut Kitle indeksinin Ultrasonografide Endometrium Kalınlığına Etkileri. İstanbul Tıp Dergisi. 4: 13-9.

39. Janse F, Eijkemans MJ, Goverde AJ, Lentjes EG, Hoek A, Lambalk CB et al, 2011. Assessment of androgen concentration in women: liquid chromatography-tandem mass spectrometry and extraction RIA show comparable results. Eur J Endocrinol. 165, 925-33.

40. Keefe CC, Goldman MM, Zhang K, Clarke N, Reitz RE, Welt CK, 2014. Simultaneous measurement of thirteen steroid hormones in women with polycystic ovary syndrome and control women using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. PLoS One. 9(4):e93805. doi: 10.1371/journal.pone.0093805.

41. Keelan JA, Mattes E, Tan H, Dinan A, Newnham JP, Whitehouse AJ, Jacoby P, Hickey M, 2012. Androgen concentrations in umbilical cord blood and their association with maternal, fetal and obstetric factors. PLoS One. 7(8):e42827. doi: 10.1371/journal.pone.0042827.

42. Khajuria RK, Bhardwaj V, Gupta RK, Sharma P, Somal P, Mehta P, et al, 2007. Development of a rapid normal-phase LC-positive ion APCI-MS method for simultaneous detection and quantitation of cholesterol, androst-4-ene-3,17-dione, and androsta-1,4-diene-3,17-dione. J Chromatogr Sci. 45(8), 519-23.

43. King R, Bonfiglio R, Fernandez-Metzler C, Miller-Stein C, Olah T, 2000. Mechanistic investigation of ionization suppression in electrospray ionization. J Am Soc Mass Spectrom. 11(11):942-50.

44. Koal Therese, Schmiederer D, Tuan HP, Röhring C, Rauh M, 2012. Standardized LC–MS/MS based steroid hormone profile-analysis. J Steroid Mol Biol. 129(3-5):129-38.

45. Kruszynska A, Słowinska-Srzednicka J, Jeske W, Zgliczynski W, 2014. Proinsulin, adiponectin and hsCRP in reproductive age women with polycystic ovary syndrome (PCOS)-the effect of metformin treatment. Endokrynol Pol. 65(1), 2-10. doi: 10.5603/EP.2014.0001.

46. Kulle AE, Riepe FG, Melchior D, Hiort O, Holterhus PM, 2010. Anovel ultrapressure liquid chromatography tandem mass spectrometry metod for the simultaneous determination of androstenedione, testosterone, and dihydrotestosterone in pediatric blood samples: age-and sex-specific reference data. J Clin Endocrinol Metab. 95, 2399-409.

47. Kushnir MM, Blamires T, Rockwood AL, Roberts WL, Yue B, et al, 2010. Liquid chromatograpy-tandem mass spectrometry assay for androstenedion, dehydroepiandrosterone, and testosterone with pediatric and adult reference intervals. Clin Chem. 56, 1138-47.

48. Kushnir MM, Naessen T, Kirilovas D, Chaika A, Nosenko J, Mogilevkina I et al, 2009. Steroid profiles in ovarian follicular fluid from regularly menstruating women and women after ovarian stimulation. Clin Chem. 55, 519-26.

49. Labrie F, Luu-The V, Belanger A, Lin SX, Simard J, Pelletier G, Labrie C, 2005. Is dehydroepiandrosterone a hormone? J Endocrinol. 187(2):169-96.

50. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, et al, 2004. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. Clin Chem. 50, 621-5.

51. Leder BZ, Longcope C, Catlin DH, Ahrens B, Schoenfeld DA, Finkelstein JS, 2000. Oral androstenedione administration and serum testosterone concentrations in young men. JAMA. 283, 779-82.

52. Lerchbaum E, Schwetz V, Rabe T, Giuliani A, Obermayer-Pietsch B, 2014. Hyperandrogenemia in polycystic ovary syndrome: exploration of the role of free testosterone and androstenedione in metabolic phenotype. PLoS One. 9(10):e108263. doi: 10.1371/journal.pone.0108263.

53. Lois K, Kassi E, Prokopiou M, Chrousos GP, 2014. Adrenal androgens and aging. Endotext [Internet]. South Dartmouth (MA): MDText.com, Inc.; 2000-.

54. McGregor BA, Murphy KM, Albano DL, Ceballos RM, 2016. Stress, cortisol, and B lymphocytes: a novel approach to understanding academic stress and immune function. Stress. 19(2):185-91.

55. Methline P, Hustad S, Kellman R, Almas B, Erichsen MM, Husebye ES, Lovas K, 2013. Multisteroid LC–MS/MS assay for glucocorticoids and androgens and its application in Addison's disease. Endocrine Connections. 2, 125–36.

56. Miller KK, Sesmilo G, Schiller A, Schoenfeld D, Burton S, Klibanski A, 2001. Androgen deficiency in women with hypopituitarism. J Clin Endocrinol Metab. 86, 561-7.

57. Minutti CZ, Lacey JM, Magera MJ, Hahn SH, McCann M, Schulze A et al, 2004. Steroid profiling by tandem mass spectrometry improves the positive predictive value of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia. J Clin Endocrinol Metab. 89, 3687-93.

58. Miri M, Karimi Jashni H, Alipour F, 2014. Effect of exercise intensity on weight changes and sexual hormones (androstenedione and free testosterone) in female rats with estradiol valerate-induced PCOS. J Ovarian Res. 7:37. doi: 10.1186/1757-2215-7-37.

59. Mula-Abed WA, Pambinezhuth FB, Al-Kindi MK, Al-Busaidi NB, Al-Muslahi HN, Al-Lamki MA, 2014. Congenital Adrenal Hyperplasia due to 17-alpha-hydoxylase/17,20-lyase Deficiency Presenting with Hypertension and Pseudohermaphroditism: First Case Report from Oman. Oman Med J. 29(1), 55-9.

60. Naessen T, Sjogren U, Berqquist J, Larsson M, Lind L, Kushnir MM, 2010. Endogenous steroids measured by high-specificity liquid chromatography-tandem mass spectrometry and prevalent cardiovascular disease in 70-year-old men and women. J Clin Endocrinol Metab. 95, 1889-97.

61. Newell-Fugate AE, Taibl JN, Clark SG, Alloosh M, Sturek M, Krisher RL, 2014. Effects of diet-induced obesity on metabolic parameters and reproductive function in female Ossabaw minipigs. Comp Med. 64(1), 44-9.

62. Nishii M, Nomura M, Sekine Y, Koike H, Matsui H, Shibata Y, et al, 2012. Luteinizing hormone (LH)-releasing hormone agonist reduces serum adrenal androgen levels in prostate cancer patients: implications for the effect of LH on the adrenal glands. J Androl. 33(6), 1233-8.

63. Onat T, Emerk K, Sözmen EY, 2006. İnsan Biyokimyası. 2. Baskı. Palme Yayıncılık, Ankara. 533-60.

64. 0zdemir S, Ozdemir O, Sezer S, Torun O, Celik HT, Soydas R, et al, 2014. The measurement of urinary 8-hidroxy-2'deoxyguanosine level with liquid chromatography-tandem mass spectrometry method in patients with polycystic ovary syndrome. J Turk Soc Obstet Gynecol. 11, 21-8.

65. Özbek E, 1996. Böbrek üstü bezlerinden salgılanan hormonlar. Atatürk Üniv. Diş Hek. Fak. Derg. 6(1): 115-28.

66. Panidis D, Tziomalos K, Papadakis E, Chatzis P, Kandaraki EA, Tsourdi EA, et al, 2013. The clinical significance and primary determinants of hirsutism in patients with polycystic ovary syndrome. Eur J Endocrinol. 168(6), 871-7.

67. Pasquali R, Victorin ES, Yıldız BO, Duleba AJ, Hoeger K, et al, 2011. PCOS Forum: Research in Polycystic Ovary Syndrome Today and Tomorrow. Clin Endocrinol. 74(4): 424–33.

68. Rege J, Nakamura Y, Satoh F, Morimoto R, Kennedy MR, Layman LC, et al, 2013. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry analysis of human adrenal vein 19-carbon steroids before and after ACTH stimulation. J Clin Endocrinol Metab. 98(3), 1182-8.

69. Reilly CA, Crouch DJ, 2004. Analysis of the nutritional supplement 1AD, its metabolites, and related endogenous hormones in biological matrices using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. J Anal Toxicol. 28(1), 1-10.

70. Richard SL, William DS, Michael PD, Christos C, Peter RC, Robert G et al, 2010. Total Testosterone Assays in Women with Polycystic Ovary Syndrome: Precision and Correlation with Hirsutism. J Clin Endocrinol Metab. 95(12):5305-13.

71. Rotterdam ESHRE/ASRM-Sponsored PCOS consensus workshop group 2004. Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome (PCOS). Hum Reprod. 19(1):41-7.

72. Ryan CJ, Peng W, Kheoh T, Welkowsky E, Haqq CM, Chandler DW, et al, 2014. Androgen dynamics and serum PSA in patients treated with abiraterone acetate. Prostate Cancer Prostatic Dis. 17(2), 192-8.

73. Salihoğlu B, Serdar MA, Erkal N, Erden G, Bakır F, Yıldırımkaya MM, 2011. 25-OH-Vitamin D hormon için tandem kütle spektrometrede yöntem geçerli kılma çalışması ve bu yöntemin farklı yöntemlerle karşılaştırılması. Turk J Biochem. 36, 73-9.

74. Sarafoglou K, Himes JH, Lacey JM, Netzel BC, Singh RJ, Matern D, 2011. Comparison of multiple steroid concentrations in serum and dried blood spots throughout the day of patients with congenital adrenal hyperplasia. Horm Res Paediatr. 75(1), 19-25.

75. Schreiner F, Tozakidou M, Maslak R, Holtkamp U, Peter M, Gohlke B, Woelfle J, 2009. Functional glucocorticoid receptor gene variants do not underlie the high variability of 17-hydroxyprogesterone screening values in healty newborns. Eur J Endocrinol. 160, 667-73.

76. Shiraishi S, Lee PW, Leung A, Goh VH, Swerdloff RS, Wang C, 2008. Simultaneous measurement of serum testosterone and dihydrotestosterone by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 54, 1855-63.

77. Soldin OP, Makambi KH, Soldin SJ, O'Mara DM, 2011. Steroid hormone levels associated with passive and active smoking. Steroids. 76, 653-9.

78. Soldin OP, Guo T, Weiderpass E, Tractenberg RE, Clarke LH, Soldin SJ, 2005. Steroid hormone levels in pregnancy and 1 year postpartum using isotope dilution tandem mass spectrometry. Fertil Steril, 84, 701-10.

79. Soldin SJ, Brugnara C, Wong EC, 2003. Androstenedione. In Pediatric Reference Ranges. Fourth edition. AACC Press. 32-34.

80. Spat A, Hunyady L, Szanda G, 2016. Signaling Interactions in the Adrenal Cortex. Front Endocrinol. 29;7-17.

81. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytfanghe K, Thienpont LM, 2011. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 57(3), 441-8.

82. Stolzenberg-Solomon RZ, Falk RT, Stanczyk F, Hoover RN, Appel LJ, Ard JD, et al, 2012. Sex hormone changes during weight loss and maintenance in overweight and obese postmenopausal African-American and non-African-American women. Breast Cancer Res. 14(5):R141. doi: 10.1186/bcr3346.

83. Summers AF, Pohlmeier WE, Sargent KM, Cole BD, Vinton RJ, Kurz SG, et al, 2014. Altered theca and cumulus oocyte complex gene expression, follicular arrest and reduced fertility in cows with dominant follicle follicular fluid androgen excess. PLoS One. 16;9(10):e110683. doi: 10.1371/journal.pone.0110683.

84. Szulc P, Claustrat B, Marchand F, Delmas PD 2003. Increased risk of falls and increased bone resorption in elderly men with partial androgen deficiency: the MINOS study. J Clin Endocrinol Metab. 88, 5240-7.

85. Swellam M, Khaial A, Mosa T, El-Baz H, Said M, 2013. Anti-mullerian and androgens hormones in women with polycystic ovary syndrome undergoing IVF/ICSI. Iran J Reprod Med. 11(11), 883-90.

86. Tekiş İZ, Dokuyucu R, Üstün İ, Gökçe C, Çelik M, Serarslan G, et al, 2014. Hirsutizm nedeniyle başvuran hastaların tanısal açıdan değerlendirilmesi. J Clin Exp Invest. 5 (1): 69-75.

87. 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.

88. Upreti R, Naredo G, Faqehi AM, Hughes KA, Stewart LH, Walker BR, et al, 2014. Simultaneous pharmacokinetic and pharmacodynamic analysis of 5α-reductase inhibitors and androgens by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Talanta. 131, 728-35.

89. Van den Ouweland JM, Kema IP, 2011. The role of liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 1;883-884:18-32.

90. Xing Y, Edwards MA, Ahlem C, Kennedy M, Cohen A, Gomez-Sanchez CE, Rainey WE, 2011. The effects of ACTH on steroid metabolomic profiles in human adrenal cells. J Endocrinol. 209(3), 327-35.

91. Yıldırım HA, Memişoğulları R, 2011. Polikistik over sendromunda gözlenen biyokimyasal bozukluklar. Konuralp Tıp Dergisi. 3(1):42-8.

92. Yıldız Y, Özakşit G, Yaprakeyi EG, Ünlü BS, Energin H, 2012. Polikistik over hastalarında insülin direnci , metabolik durum ve metabolik parametreler arasındaki ilişki. The Journal of Gynecology - Obstetrics and Neonatology. 9 (34):1413- 20.

93. Zhang D, Yang B, Lu X, Xiong M, Wu L, Wang J, et al, 2012. Estradiol synthesis and release in cultured female rat bone marrow stem cells. Biomed Res Int. 2013;2013:301540. doi: 10.1155/2013/301540.

94. Westgard JO, 2008. Basic Method Validation. 3rd Edition. Madison, Westgard QC. pp. 9-306

95. Woolcott CG, Shvetsov YB, Wilkens LR, White KK, Caberto C, Henderson BE et al, 2010 Plasma sex hormone concentrations and breast cancer risk in an ethnically diverse population of postmenopausal women: the multiethnic cohort study. Endocr Relat Cancer. 18, 125-34.

96. https://en.wikipedia.org/wiki/Androstanedione.

97. www.humpath.com/spip.php?article14158.

98. www.westgard.com/biodatabase.

ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Kamile YÜCEL

Doğum Yeri : Isparta

Medeni Hali : Bekar

E-posta : kamile_yucel@hotmail.com

Adresi : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya A. D., Konya

Eğitim

Lise : Konya Atatürk Sağlık Meslek Lisesi

Lisans : Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisans : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

Doktora : Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

Yabancı Dil

İngilizce

Katıldığı Kurslar&Eğitimler

Kan Bankacılığı ve Transfüzyon Tıbbı Sertifika Eğitimi

Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kursu XII

Kalite Klavuzu Temelinde Laboratuvar Hesaplamaları ve Değerlendirmeleri Kursu

Metabolizma Laboratuvarında LC-MS/MS Kullanımı Eğitimi

Klinik Laboratuvarlarda Kütle Spektrometre Kullanımı

Katıldığı Sempozyum&Kongreler

Biyokimyada Güncel Gelişmeler Sempozyumu

V. Ulusal Kan Merkezleri ve Trasfüzyon Tıbbı Kongresi

XVII. Ulusal Biyokimya Kongresi

XXIV. Ulusal Biyokimya Kongresi

2nd National Congress of the Assoiation of Medical Biyochemist in Bosna and Herzegovina

VIII Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi

IX Ulusal Kan Merkezleri ve Transfüzyon Tıbbı Kongresi

XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi

18. Ulusal Biyoteknoloji Kongresi