



T. C.

YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ERKEKLERDE ANTI-MÜLLERIAN  
HORMON'UN BİYOLOJİK VARYASYON  
VERİLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

ARŞ. GÖR. DR. RUMEYSA BETÜL KILINÇER

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşen CANIKLIOĞLU

**YOZGAT-2025**

T. C.  
YOZGAT BOZOK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

ERKEKLERDE ANTI-MÜLLERİAN HORMON'UN  
BİYOLOJİK VARYASYON VERİLERİNİN  
DEĞERLENDİRİLMESİ

UZMANLIK TEZİ

ARŞ. GÖR. DR. RUMEYSA BETÜL KILINÇER

DANIŞMAN

Dr. Öğr. Üyesi Ayşen CANIKLIOĞLU

YOZGAT-2025

## ÖNSÖZ

Tıbbi Biyokimya alanındaki eğitim hayatımın başından itibaren, beni hekimliğin farklı boyutlarını keşfederek mesleki zorluklara ve güzelliklere hazırlayan, titiz yönlendirmeleri, engin tecrübeleri ve sabrıyla her zaman örnek aldığım değerli danışmanım Sayın Dr. Öğr. Üyesi Ayşen Caniklioğlu'na, bu tez çalışmasının tüm aşamalarında bilgi ve deneyimlerini benimle paylaştığı, karşılaştığım güçlüklerde gösterdiği sabır ve anlayış için yürekten teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle yol gösteren, değerli katkıları ve destekleriyle her zaman yanımda olan Anabilim Dalı Başkanımız, kıymetli hocam Sayın Prof. Dr. Muhammet Fevzi Polat'a şükranlarımı sunarım.

Tez sürecimde çalışmamı zenginleştiren yapıcı eleştirileri ve tecrübeleriyle aklımdaki soruları aydınlatmaktan çekinmeyen kıymetli hocamız Sayın Prof. Dr. Müjgan Ercan Karadağ'a ayrıca en içten teşekkürlerimi iletirim.

Anabilim Dalımızın değerli öğretim üyelerinden Sayın Prof. Dr. Meral Ekim'e ve Sayın Prof. Dr. Ayşe Yeşim Göçmen'e bu süreçteki destek ve katkıları için teşekkür ederim.

Tez sürecinin her aşamasında bilgi paylaşımı ve moral desteğiyle yanımda olan asistan arkadaşlarım Dr. Besna Ünver, Dr. İlhami Cevizci ve Dr. Ali Özeroğlu'na; laboratuvar mesailerimizi keyifli bir çalışma ortamına dönüştüren, bu süreçte yardımlarını esirgemeyen Ahmet Hamdi Demir, Amine Erciyas, Büşra Nur Örmüş, Haşim Akbalık, Meral Eser, Neslihan Yeniçel, Rukiye Fırat ve Sena Nur Kencü'ye içten teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde emeği geçenlerin yanı sıra, dolaylı ya da doğrudan katkı sunan herkese içten şükranlarımı sunarım. Özellikle tezimin yapı taşı oluşturan, belki de çalışmamın en zorlu aşaması olan örnek toplama döneminde kan vermeyi kabul eden tüm gönüllülerime de en kalbi teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini bir an bile benden esirgemeyen, haklarını asla ödeyemeyeceğim sevgili annem Hamidiye Yılmaz ve babam Veysel Yılmaz'a, inançları ve sevgileriyle en büyük güç kaynağım oldukları için sonsuz minnettarım. Her zaman bir adım önümden giderek bana yol gösteren canım ablam Berre Nur Yılmaz'a; neşe ve motivasyonum olan canım kardeşim Bilge Naz Yılmaz'a sonsuz sevgilerimi sunarım.

Bu tez çalışması süresince, bana her zaman destek olan ve anlayış gösteren sevgili eşimin ailesine; özellikle annem Mihriban Kılınçer ve ahirete göçmüş babam Lütfi Kılınçer başta olmak üzere, ablam İlknur Göral'a, ağabeyim Muhammed Kılınçer'e, ağabeyim Ahmet Selçuk Kılınçer'e ve eşi Nursen Süren Kılınçer'e; ayrıca akademik olarak da örnek aldığım ablam Hatice Kılınçer'e içtenlikle teşekkür ederim.

Son ve en özel teşekkürümü ise varlığıyla hayatımı daha anlamlı kılan, her ihtiyaç duyduğumda yanımda olan, fedakârlığı, sabrı ve sevgisiyle zorlukları daha kolay aşmamı sağlayan sevgili eşim Muhammed Veyis Kılınçer'e tüm yüreğimle ve en içten sevgilerimle sunmak isterim.



# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ.....	ii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar LİSTESİ.....	ix
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Toplam Test Süreci.....	4
2.2. Toplam Test Sürecinde Meydana Gelebilecek Hatalar.....	6
2.3. Varyasyon Kaynakları.....	7
2.3.1. Preanalitik Varyasyon.....	8
2.3.2. Analitik Varyasyon.....	9
2.3.2.1. İmpresizyon (rastgele/random varyasyon).....	11
2.3.2.2. Bias (sistematik varyasyon).....	12
2.3.3. Biyolojik Varyasyon.....	13
2.3.3.1. Biyolojik Ritimler.....	14
2.3.3.2. Rastgele Biyolojik Varyasyon.....	14
2.4. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Çalışma Prosedürleri.....	16
2.4.1. Biyolojik Varyasyon Çalışmalarında Birey Seçimi.....	16
2.4.1.1. Dahil Etme Kriterleri:.....	16
2.4.1.2. Hariç Tutma Kriterleri:.....	16
2.4.2. Biyolojik Varyasyon Çalışmalarının Koşulları.....	17
2.4.3. Örneklerin Toplanması, İşlenmesi ve Saklanması.....	17
2.4.4. İstatistiksel Analiz.....	18

2.5. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Biyolojik Varyasyon Verilerinin Kullanımı.....	19
2.5.1. Homeostatik Ayar Noktasını Tahmin Edebilmek İçin Gerekli Olan Numune Sayısı	19
2.5.2. En Uygun Testin ve En Uygun Örnek Türünün Belirlenmesi.....	19
2.5.3. Kalite İçin Belirlenmesi Geren Analitik Performans Spesifikasyonlarının (APS) Tanımlanması.....	19
2.5.3.1. Model 1: Klinik Sonuçlara Dayalı Model.....	20
2.5.3.2. Model 2: Ölçümün Biyolojik Varyasyon Bileşenlerine Dayanan Model.....	20
2.5.3.3. Model 3: Son Teknoloji Ürününe Dayanan Model.....	21
2.5.4. Biyolojik Varyasyon Verilerine Dayalı Analitik Performans Spesifikasyonları.....	21
2.5.4.1. İmpresizyon için Analitik Performans Spesifikasyonları.....	22
2.5.4.2. Bias için Analitik Performans Spesifikasyonları.....	24
2.5.4.3. Total Kabul Edilebilir Hata için Analitik Performans Spesifikasyonları.....	25
2.5.4.4. Kabul Edilebilir Ölçüm Belirsizliği için Analitik Performans Spesifikasyonları .....	26
2.5.5. Referans Değişim Değeri (RCV).....	27
2.5.6. Bireysellik İndeksi (II).....	29
2.5.7. Personalize Referans Aralık (prRI).....	30
2.6. Antimüllerian Hormon (AMH).....	32
2.6.1. Embriyonik Gelişimde AMH'nin Rolü.....	32
2.6.2. AMH'nin Moleküler Yapısı ve Fizyolojisi.....	32
2.6.3. AMH Genetiği ve Transkripsiyonel Düzenlenmesi.....	33
2.6.4. AMH'nin Moleküler Yapısı.....	36
2.6.5. AMH'nin Reseptörleri ve Sinyal İletimi.....	37
2.6.6. AMH ve AMHR II Ekspresyon Edebilen Dokular.....	38
2.6.7. AMH'nin Klinik Kullanımı.....	39
2.6.7.1. Fertilite.....	39

2.6.7.2. Kanser.....	44
2.6.8. AMH'nin Ölçüm Yöntemleri.....	45
2.6.9. Erkeklerde AMH'nin Popülasyona Dayalı Referans Aralıkları.....	46
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	48
3.1. Çalışmanın Gücünün Değerlendirilmesi ve Çalışma Grubunun Seçimi.....	49
3.1.1. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Olma Ölçütleri.....	50
3.1.2. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmadan Dışlama Ölçütleri.....	50
3.1.3. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmadan Çıkarılma Ölçütleri:.....	51
3.2. Örneklerin Toplanması.....	51
3.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması.....	52
3.4. Örneklerin Analizi.....	52
3.5. Çalışılan Testlerin Ölçüm Prensipleri.....	52
3.5.1. Tam Kan Sayımı.....	52
3.5.2. ALT.....	53
3.5.3. GGT ( $\gamma$ -glutamiltransferaz).....	53
3.5.4. CK (Kreatin Kinaz).....	53
3.5.5. CRP (C- Reaktif Protein).....	53
3.5.6. Kreatinin.....	53
3.5.7. Total Kolesterol.....	54
3.5.8. Glukoz.....	54
3.5.9. Trigliserit.....	54
3.5.10. FSH.....	55
3.5.11. LH.....	55
3.5.12. Total Testosteron.....	55
3.5.13. AMH.....	55

3.6. İstatistiksel Analiz.....	56
3.6.1. Aykırı Değerlerin Tespiti.....	57
3.6.2. Normal Dağılımın Değerlendirilmesi.....	58
3.6.3. Kararlı Durum Koşulunun Değerlendirilmesi.....	58
3.6.4. Homojenite Koşulunun Kontrolü.....	58
3.6.5. Yaş için Alt Grup Analizinin Gerçekleştirilmesi.....	58
3.6.6. Varyans Analizinin Gerçekleştirilmesi.....	58
4. BULGULAR.....	60
4.1. Katılımcıların Demografik Bilgileri.....	60
4.2. Katılımcıların Tam Kan Sayımı, Biyokimya, Hormon Parametrelerinin Analizi ve Vücut Kütle İndekslerinin Değerlendirilmesi.....	60
4.3. Aykırı (Uç) Değerlerin İstatistiksel Yöntemlerle Belirlenerek Dışlanması.....	60
4.4. Verilerin Normal Dağılım Varsayımı, Kararlı Durum Şartı ve Homojenite Kontrolü...	62
4.5. AMH Ölçüm Sonuçları ile Biyolojik Varyasyon Verilerinin Tahmini.....	62
4.5.1. Analitik ( $CV_A$ ), Birey İçi ( $CV_I$ ), Bireyler Arası Varyasyon ( $CV_G$ ) ve Bireysellik İndeksi (II) Hesaplamaları.....	62
4.5.2. Erkeklerde AMH'nin Bireylerdeki Dağılım ve Ortalama Değer Grafikleri.....	64
4.6. Erkeklerde AMH İçin Referans Değişim Değeri (RCV) Hesaplanması.....	65
4.7. Homeostatik Ayar Noktasına Ulaşmak İçin Gereken Numune Sayısının Hesaplanması .....	66
4.8. AMH İçin Belirlenen Analitik Performans Spesifikasyonları.....	66
5. TARTIŞMA.....	68
5.1. Erkeklerde AMH'nin Analitik Varyasyon ve Biyolojik Varyasyonunun Değerlendirilmesi.....	72
5.2. Erkeklerde AMH'nin Referans Değişim Değerinin Değerlendirilmesi.....	73
5.3. Erkeklerde AMH'nin Bireysellik İndeksinin Değerlendirilmesi.....	73

6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	76
7. ÖZET.....	78
8. ABSTRACT.....	78
9. KAYNAKLAR.....	80
10. EKLER.....	93



## TABLolar LİSTESİ

Tablo I: Sürece ve kontrol edilebilirliğine göre preanalitik varyasyon kaynakları.....	8
Tablo II: AMH'nin fertilité ile ilişkili bazı klinik durumlardaki düzeyi.....	40
Tablo III: Pediatrik popülasyondan ECLIA metoduyla elde edilen referans aralıklar.....	47
Tablo IV: Yetişkin erkek bireylerde iki farklı yöntemle gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen Anti-Müllerian Hormon (AMH) referans aralıkları.....	48
Tablo V: Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin yaş ortalamaları, yaş aralıkları ve standart sapmaları.....	60
Tablo VI: Erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyon bileşenlerini tahmin edebilmek için istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve kullanılan birey /sonuç sayıları.....	61
Tablo VII: Uç değer olarak belirlenen birey analizden çıkarıldıktan sonra katılımcıların yaş ortalamaları, yaş aralıkları ve standart sapmaları.....	62
Tablo VIII: Erkeklerde yaşa göre alt gruplar ve tüm grup için Nested ANOVA'ya göre hesaplanan AMH'nin ortalama, $CV_A$ , $CV_I$ , $CV_G$ ve II değerleri.....	63
Tablo IX: Erkeklerde yaşa göre alt gruplar ve tüm grup için CV-ANOVA'ya göre hesaplanan AMH'nin ortalama, $CV_A$ , $CV_I$ ve II değerleri.....	64
Tablo X: Erkeklerde AMH için belirlenen referans değişim değerleri.....	65
Tablo XI: Erkeklerde AMH ölçümü için NHSP değerleri.....	66
Tablo XII: AMH için İmpresizyon hedefleri.....	66
Tablo XIII: AMH için Bias hedefleri.....	67
Tablo XIV: AMH için İzin Verilebilir Toplam Hata hedefleri.....	67
Tablo XV: EFLM veritabanında bulunan AMH'nin biyolojik varyasyon çalışmasından elde edilen verilerin karşılaştırılması.....	71
Tablo XVI: Hadlow'un çalışmasında verilen $CV_I$ değerine göre hesaplanan simetrik ve asimetrik (azalan ve artan) RCV değerleri.....	73

Tablo XVII: Hadlow'un çalışmasında verilen  $CV_I$  değerine göre İmpresizyon için Analitik Performans Hedefleri..... 74



## ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: Laboratuvar testinin performansındaki dokuz adım. Beyinden beyine döngü.....	5
Şekil 2: Toplam test sürecinin adımları.....	6
Şekil 3: Toplam test sürecinin üç aşamasında hataların kaynakları ve oranları.....	7
Şekil 4: Bias ve impresizyonun hedef tahtası grafiğinde ifadesi.....	10
Şekil 5: İmpresizyon ve biasın grafikte birlikte ifadesi.....	11
Şekil 6: Aynı numunenin tekrarlı çalışılması ile elde edilen normal dağılımın karakteristiği..	11
Şekil 7: Bias: Tekrarlı ölçüm sonuçları ile referans (doğru) değer arasındaki fark.....	12
Şekil 8: Biyolojik varyasyonu oluşturan bileşenler.....	13
Şekil 9: İmpresizyon için analitik performans spesifikasyonu.....	24
Şekil 10: Bias için analitik performans spesifikasyonu.....	25
Şekil 11: Toplam hata kavramı.....	26
Şekil 12: Kişiselleştirilmiş referans aralığının (prRI) pratik bir şekilde bireysel biyolojik varyasyon ( $CV_I$ ), analitik varyasyon ( $CV_A$ ) ve geçmiş ölçüm sonuçları ile nasıl hesaplandığını gösteren akış şeması.....	31
Şekil 13: AMH'nin biyolojik fonksiyonları.....	33
Şekil 14: Erkeklerde dolaşımdaki gonadotropin, testosteron (T) ve AMH seviyelerinin gelişim sürecinin şematik gösterimi.....	35
Şekil 15: AMH, Testosteron (T) ve Androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişki ve yaş ile olan bağlantı.....	35
Şekil 16: A) Görselde AMH promotör geni ve transkripsiyon faktörleri B) Sertoli hücresinde AMH'nin FSH bağımsız, FSH bağımlı ve Protein Kinaz A üzerinden etki gösteren AMH transkripsiyon faktörleri .....	36
Şekil 17: Homodimerik yapıdaki AMH ligandının işlenmesi gösterilmektedir.....	37
Şekil 18: AMH reseptörü sinyal iletimi.....	38
Şekil 19: AMH'nin DSD ayırıcı tanısındaki rolü.....	43

Şekil 20: Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra AMH konsantrasyonlarının (ng/mL) 4 haftalık takip sürecinde bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri..... 65



## SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

### **Simgeler**                      **Açıklamalar**

**CV** : Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)

**CV<sub>A</sub>** : Analitik varyasyon

**CV<sub>G</sub>** : Bireyler arası biyolojik varyasyon

**CV<sub>I</sub>** : Birey içi biyolojik varyasyon

**CV<sub>P</sub>** : Kişi içi biyolojik varyasyon

**CV<sub>T</sub>** : Total varyasyon

**mg/dL** : Miligram/desilitre

**ng/mL** : Nanogram/mililitre

**µg/L** : Mikrogram/litre

**pmol/L** : Pikomol/litre

**kDa** : KiloDalton

**kg/m<sup>2</sup>** : Kilogram/metrekare

### **Kısaltmalar**                      **Açıklamalar**

**ALT** : Alanin Aminotransferaz

**AMH** : Antimüllerian Hormon

**APS** : Analitik Performans Spesifikasyonlarının

**BA** : Bias

**BIVAC** : Biyolojik Varyasyon Verileri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi

**BMP** : Bone Morfogenetik Proteinler

<b>BV</b>	: Biyolojik Varyasyon
<b>CK</b>	: Kreatin Kinaz
<b>CRP</b>	: C-Reaktif Protein
<b>CV</b>	: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)
<b>DSD</b>	: Cinsiyet Gelişim Bozuklukları
<b>ECLIA</b>	: Elektrokemilüminesans İmmunoassay
<b>EFLM</b>	: Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
<b>ELISA</b>	: Enzim Linked İmmunosorbent Assay
<b>EuBiVAS</b>	: Avrupa Biyolojik Varyasyon Çalışması
<b>FSH</b>	: Folikül Uyarıcı Hormon
<b>GGT</b>	: Gama-Glutamil Transferaz
<b>GnRH</b>	: Gonadotropin Salgılatıcı Hormon
<b>II</b>	: Bireysellik İndeksi
<b>LH</b>	: Luteinize Edici Hormon
<b>MAU</b>	: Kabul edilebilir maksimum aralıktaki ölçüm belirsizliği
<b>NHSP</b>	: Homeostatik ayar noktasını tahmin edebilmek için alınması gereken örnek sayısı
<b>PMDS</b>	: Persistan Müllarian Kanal Sendromu
<b>PrRI</b>	: Personalize Referans Aralık
<b>RCV</b>	: Referans Değişim Değeri
<b>SD</b>	: Standard Deviation
<b>STARBIV</b>	: Biyolojik Varyasyon Veri Çalışmalarının Raporlanması için
Standartlar	
<b>TEa</b>	: İzin Verilebilir Toplam Hata

<b>TGF-<math>\beta</math></b>	: Transforming Growth Faktör-beta
<b>TTS</b>	: Toplam Test Süreci
<b>VKI</b>	: Vücut kütle indeksi
<b>WG-BV</b>	: Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu



## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Klinik laboratuvarlar, insan hastalıklarının teşhisi, izlenmesi, taranması, önlenmesi, erken teşhisi, kişiye özel tedavisi ve daha etkili takibi için gerekli bilgileri sağlar (1). Hastayı değerlendirirken, klinik karar alırken laboratuvar sonuçları oldukça büyük öneme sahiptir. Bu sebeple laboratuvar sonuçlarının doğruluğu ve güvenilirliği aynı zamanda doğru değerlendirilmesi çok önemlidir.

Günümüzde laboratuvar tıbbındaki kalite ve hata anlayışı, test sürecinin bütüncül bir şekilde ele alınmasına, laboratuvar kaynaklı hataların azaltılması için araçların araştırılmasına odaklanmaktadır (2). Bu nedenle laboratuvar uzmanı ve çalışanları hasta örneğinin kan alım aşamasından sonuç verme aşamasına kadar tüm süreçte hassasiyet göstermeli ve sonuçları etkileyebilecek varyasyon kaynaklarını çok iyi bilmelidir.

Total test süreci hekimin hasta için gerekli teste karar vermesiyle başlar. Hastadan alınan numunenin bazı ön aşamalardan geçerek laboratuvarında analiz edilmesi, raporlanması ve hekimin bu sonuçlara dayanarak klinik karar alıp uygulamaya geçmesiyle sona erer (3). Total test sürecini oluşturan tüm evrelerde gözlemlenebilecek varyasyon kaynakları preanalitik varyasyon, analitik varyasyon, biyolojik varyasyon olmak üzere üç ana başlıkta incelenir. Bir bireyden alınan seri numunelerde bakılacak analit için sonuçların aynı sayısal değerde olmadığı ve her bireyin test sonuçlarında zamanla değişim gözlemlendiği bilinmektedir. Bir analitin ölçümünde görülebilecek toplam varyasyon, preanalitik varyasyon minimuma indirilip ihmal edilebilir duruma getirildiğinde, analitik ve biyolojik varyasyon olarak iki kısımda incelenir (4).

Yapılan çalışmalarda analitler için hesaplanan toplam varyasyonun analitik varyasyondan büyük bulunması, analitik süreçten kaynaklanmayan başka bir değişkenliğin varlığına işaret ederek biyolojik varyasyonun varlığını göstermiştir. Elde edilen bulgular, analit düzeylerindeki dalgalanmaların büyük ölçüde biyolojik varyasyondan kaynaklandığını ortaya koymaktadır (5). Bu nedenle ardışık örneklerin analiz sonuçlarındaki değişikliklerin önemini değerlendirmesinde analitik varyasyon ve biyolojik varyasyon dikkate alınmalıdır (6).

Biyolojik varyasyon (BV) birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon olmak üzere iki bileşenden oluşur. Birey içi (bireysel) biyolojik varyasyon bir gruptaki bireylerin

ölçümlerinin homeostatik ayar noktası etrafında rastgele dalgalanması olarak tanımlanır. Bireyler arası biyolojik varyasyon ise gruptaki bireylerin homeostatik ayar noktalarının varyasyonudur (4).

Doğru belirlenen BV verileri önemli ve değerli uygulamalarda kullanılabilir. Bireyin seri ölçümlerindeki değişimin önemini belirlemede kullanılan referans değişim değerinin (RCV) hesaplanması, analitik kalite hedeflerin tanımlanması ve popülasyona dayalı referans aralıklarını bireysel klinik kullanım açısından değerlendirebilmek için bireysellik indeksinin (II) hesaplanması bu uygulamalara örnektir (7).

AMH ilk olarak Jost tarafından 1940'lı yıllarda keşfedildi (8). AMH sertoli hücrelerinden salgılanarak erkek iç genital yollarının gelişiminde önemli görevi olan, gelişim ve doku homeostazında rol oynayan bir hormondur ve Transforming Growth Faktör Beta (TGF- $\beta$ ) süper ailesinin bir üyesidir (9,10).

Erkeklerde AMH, intrauterin dönemde gonadal farklılaşma sonrası testislerde 8. gestasyonel haftada olgunlaşmamış sertoli hücreleri tarafından salgılanmaya başlanır ve immatür sertoli hücrelerinin biyobelirteci olarak kabul edilir (11–13).

Erkeklerde serum AMH konsantrasyonu doğumdan sonra ilk bir ay içerisinde hızlı artış gösterir yaklaşık 6. ayda zirve yapar. Çocuklukta azalmaya başlayan düzeyler, ergenlik ve erişkinlik dönemlerinde de düşmeye devam eder ve yaş ilerledikçe belirgin şekilde azalır. Puberte öncesi dönemde erkeklerde kadınlara kıyasla oldukça yüksek olan AMH, puberte ilerledikçe sertoli hücrelerinin olgunlaşmasıyla birlikte anlamlı düzeyde düşüş gösterir (14–16).

Gonadal farklılaşma gerçekleşirken erkek embriyolarda testosteron mezonefrik kanalların epididimis, vas deferens ve seminal veziküllere transformasyonunu sağlarken, AMH paramezonefrik kanalların regresyonunu tetikler. Bu sayede testosteronun etkisiyle erkek iç genital organların gelişimi sağlanır. AMH ise paramezonefrik kanalların gerilemesini sağlayarak kadın iç genital organların erkek fetusta gelişimini önler, bu aşamada görülebilecek aksaklıklarda cinsiyet gelişim bozuklukları (DSD) görülebilir. Bu nedenle DSD olarak tanımlanan hastalıklar grubunda ayırıcı tanı için AMH önemli bir hormondur (17,18).

Literatürde erkeklerde AMH ile ilgili biyolojik varyasyon çalışmasının bulunmadığı ve yine EFLM veri tabanında bu analiz için veri olmadığı dikkatimizi çekmiştir. Bu nedenle bu tez çalışmasında sağlıklı erkek bireylerde serum AMH'nin biyolojik

varyasyonunu değerlendirmeyi amaçladık. Elde ettiğimiz biyolojik varyasyon verilerinden de AMH için referans değişim değerini, bireysellik indeksini ve biyolojik varyasyona dayalı analitik kalite hedeflerini hesaplamayı, ayrıca popölasyona dayalı referans aralıklarının kullanımının uygun olup olmadığını değerlendirmeyi amaçladık.



## 2. GENEL BİLGİLER

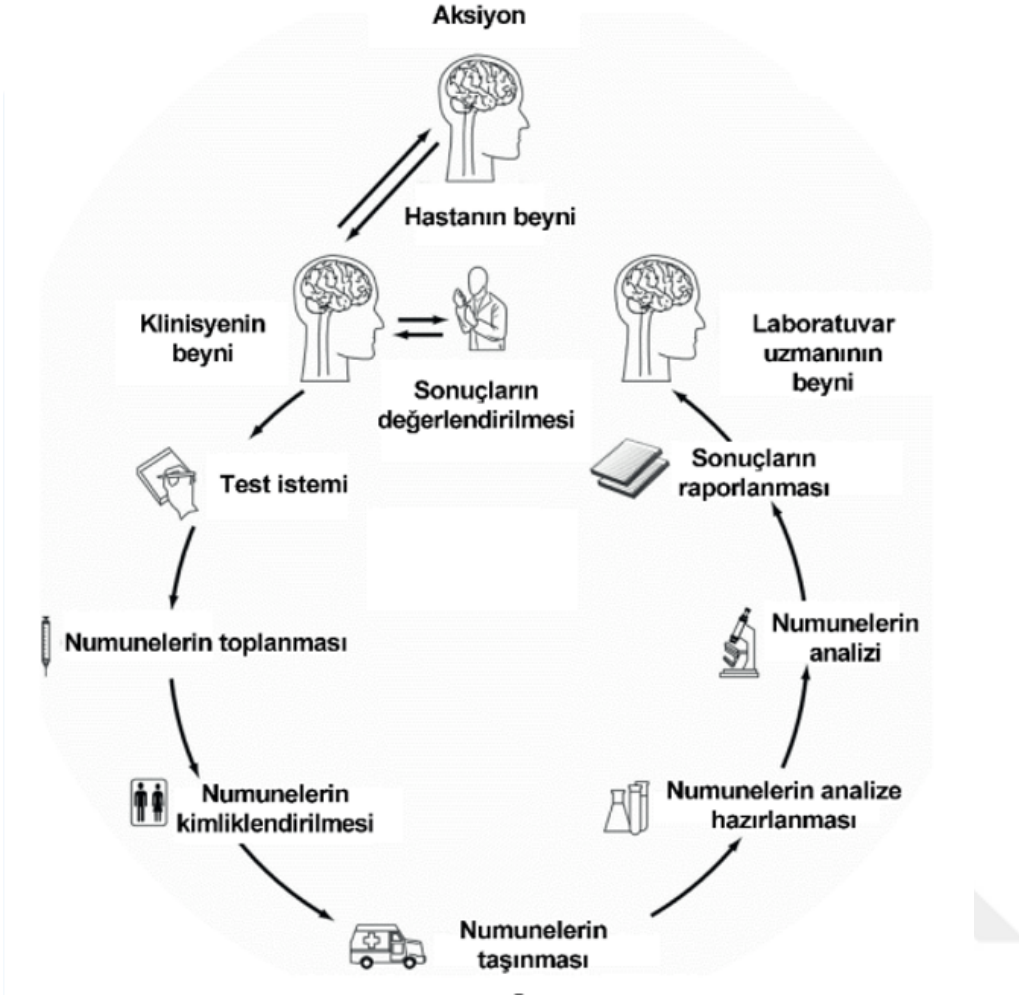
Klinik laboratuvarlar hasta yönetimi ile ilgili verilen kararlar üzerinde oldukça etkilidir. Tanı, uygulanan tedavi, hasta takibi ve hastalıktan korunma gibi durumların kararında %60- 70 laboratuvar sonuçları etkilidir (19,20).

Bu etkinlik ve önem, doğru ve güvenilir sonucun önemini de bize gösteriyor. Bu nedenle test istemine karar verme aşamasından test sonucunu değerlendirme aşamasına kadar olan tüm süreçlerde yani toplam test sürecinde hata ve değişkenlik kaynakları iyi bilinmeli ve dikkatlice kontrol edilmelidir.

### 2.1. Toplam Test Süreci

Toplam test süreci (TTS) 3 aşamaya ayrılır ve bu süreç için beyinden beyine döngü (brain to brain loop) kavramı kullanılır (21). Bu kavramda TTS klinisyenin hastaya uygun test isteminden başlar, test sonucuna uygun klinik karar almasıyla biter. Bu, döngü olarak 9 adımda anlatılmaktadır ve Şekil 1’de gösterilmektedir.

1. Test İsteminin Yapılması
2. Numunenin Alınması
3. Kimliklendirme
4. Numunenin Taşınması
5. Numunenin Hazırlanması
6. Analiz
7. Sonuçların Raporlanması
8. Sonuçların Yorumlanması
9. Klinik Eylem



Şekil 1: Laboratuvar testinin performansındaki dokuz adım. Beyinden beyine döngü (22)

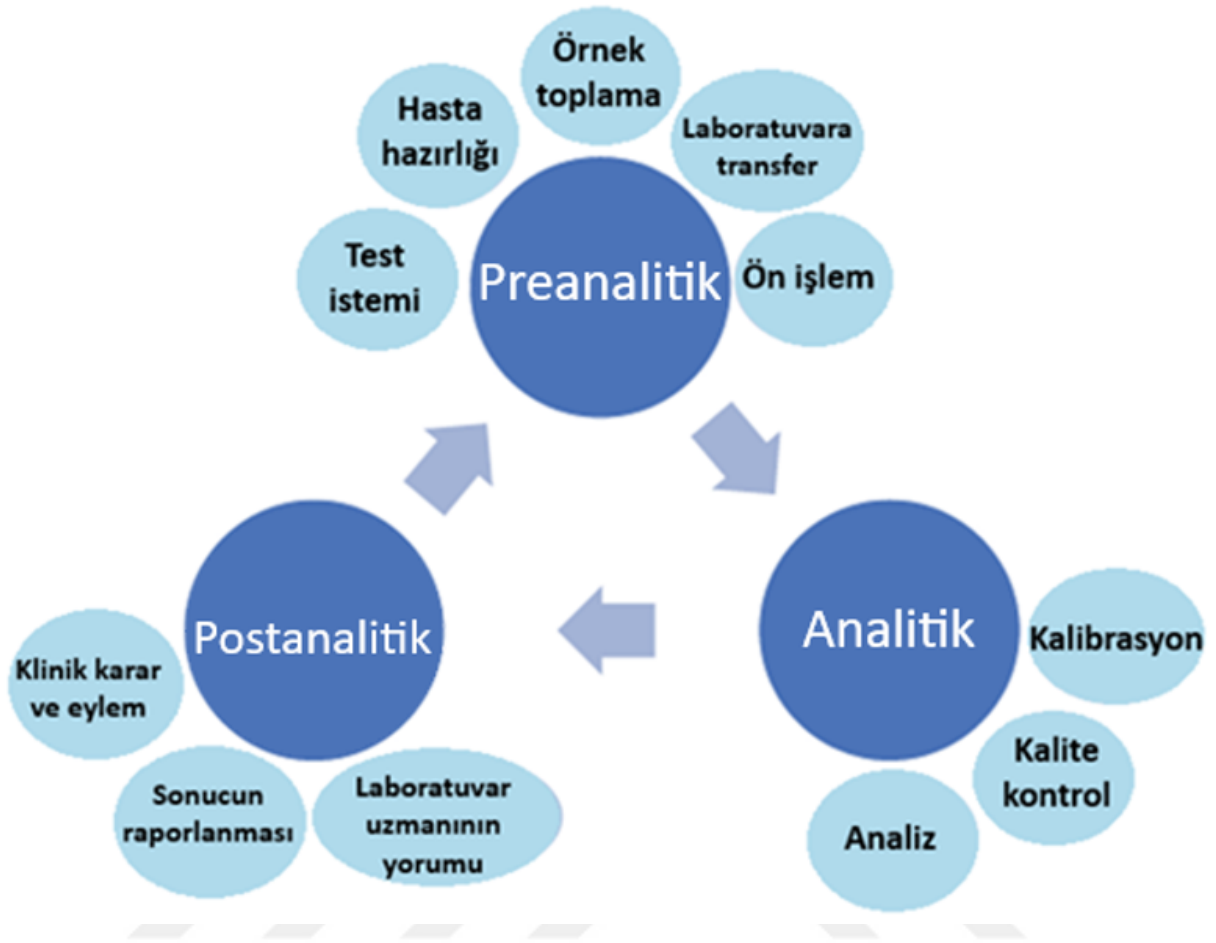
Toplam test süreci, preanalitik, analitik ve postanalitik faz olmak üzere 3 aşamada incelenir. Bu aşamalar Şekil 2’de şema olarak gösterilmiştir.

a) **Preanalitik faz:** Preanalitik faz uygun testlerin seçilmesi, biyolojik örneğin toplanması, kimliklendirilmesi, taşınması, örneklerin analize uygun duruma gelmesi için (santrifüj, alikotlama gibi) yapılan ön işlemleri içerir (20,23).

Bu evrede birden çok sağlık çalışanı görev aldığı için ve laboratuvar dışında da geçen süreçler olduğu için kontrol etmesi diğer evrelere göre daha zordur ve hata yapma riski daha yüksektir.

b) **Analitik faz:** Preanalitik evrede testin ön hazırlığı yapıldıktan sonraki süreçte numunenin laboratuvarında analiz edildiği aşamadır (24)

c) **Post analitik faz:** Post analitik aşama, analiz sonrası sonucun onaylanması ve çıkan sonucun klinisyen tarafından yorumlanması ve karar süreçlerinden oluşur (25).



Şekil 2: Toplam test sürecinin adımları (26)

Test isteminden başlayıp, klinik eylem ile biten süreç içerisinde meydana gelen herhangi bir uygunsuzluk, beyinden beyine olan döngüyü durdurarak hatalı klinik kararlara veya -iyimser bir yaklaşımla- zaman ve maliyet kaybına yol açabilir. (21) .Bu aşamaların denetimi laboratuvarların sorumluluğundadır. Yol gösterici ilkemiz “Hiç sonuç olmaması yanlış sonuç olmasından her zaman daha iyidir.” olmalıdır. Bu yaklaşım doğrultusunda, hasta yararı her koşulda en öncelikli hedef olarak benimsenmelidir (27).

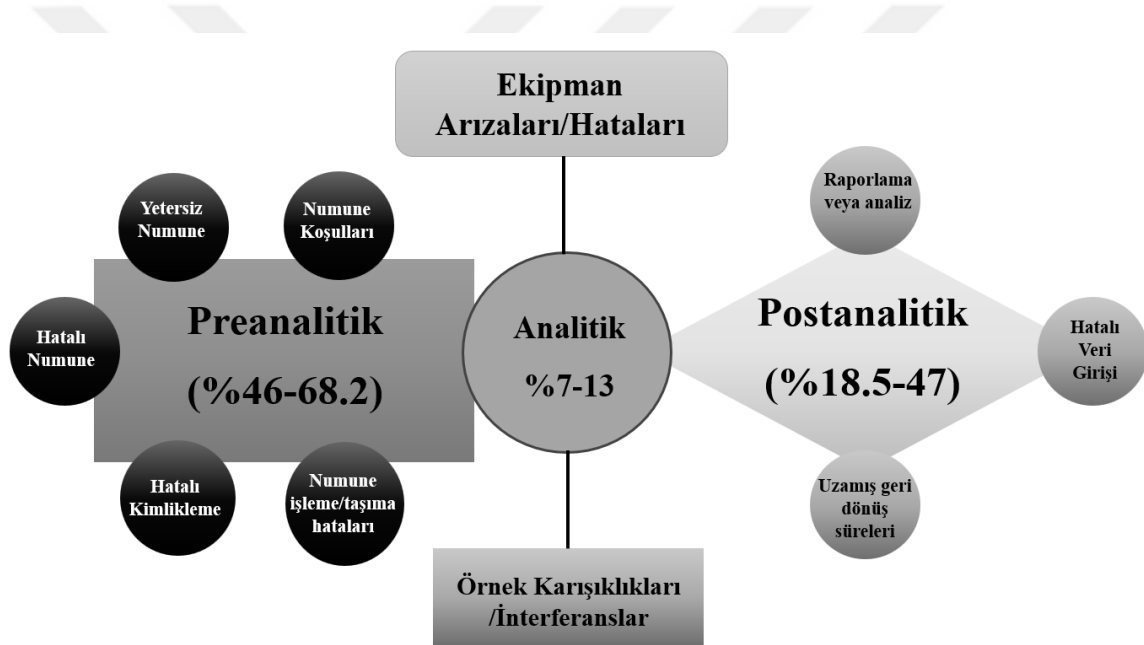
## 2.2. Toplam Test Sürecinde Meydana Gelebilecek Hatalar

Hasta güvenliğinin iyileştirilmesi her alanda bakım verenin hata yapma riskini azaltacak önlemler ile sağlanabilir. Laboratuvar için ise test sürecindeki tüm adımların ISO 15189 ve diğer kalite standartlarına uygun olarak düzenlenmesi ve uygulamaya koyulması hataları minimuma indirilebilir ve hasta için güvenilir sonuç sağlanabilir (28)

Laboratuvar tıbbında hasta güvenliğini iyileştirmek için öncelik verilmesi gereken alanlar aşağıda maddeler halinde sunulmuştur:

1. Doğru kimliklendirme
2. Laboratuvarda veri aktarımının etkinliği
3. Panik değerlerin bildirimi
4. Numune kabul edilme ve reddedilme kriterleri
5. Doğru test istemi
6. Manuel sonuç aktarımından kaçınmak (28)

Aşağıdaki Şekil 3'te toplam test sürecinde görülen hataların oranları gösterilmektedir.



Şekil 3: Toplam test sürecinin üç aşamasında hataların kaynakları ve oranları (20)

### 2.3. Varyasyon Kaynakları

Metabolizmanın dinamik yapısı nedeniyle test sonuçlarında belirli düzeyde varyasyonların görülmesi beklenen bir durumdur (5). Rastgele bir bireyin ardışık laboratuvar sonuçları karşılaştırıldığında doğal olarak bir değişim görülecektir ve bu değişimin 3 temel kaynağı vardır: preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ve biyolojik varyasyon (4).

### 2.3.1. Preanalitik Varyasyon

Preanalitik evre toplam test sürecinin en savunmasız evresidir. Bu süreç test istemi, hasta hazırlığı, örnek alma, kimliklendirme, laboratuvara transport, örneğin analiz öncesi işlemi ve saklama aşamalarından oluşur ve birçok kişi bu evrede görev aldığı için kontrol edilmesi diğer evrelere göre zordur.

Preanalitik evredeki varyasyon kaynaklarına bakacak olursak hem sürece göre hem de kontrol edilebilirlik durumuna göre incelenebilmektedir (Tablo I). Preanalitik evredeki hatalar tüm hataların yaklaşık %70'ini (Şekil 3) oluşturmaktadır (23). Toplam varyasyon kaynakları içinde preanalitik varyasyon büyük bir yer tutmaktadır. Bu nedenle bu evredeki kontrol edilebilir değişkenlerin ve hata kaynaklarının azaltılması ve yönetimi için tıbbi laboratuvarlar tarafından standardizasyon uygulamaları yapılmalıdır (29).

Kontrol edilemeyen varyasyon kaynakları kişiye özgüdürler ve değiştirilemezler. Bunun için ise uygun referans aralık belirlenip (örneğin; yaşa, cinsiyete göre vs) test sonucu değerlendirilmelidir. Preanalitik varyasyon kaynakları sürece ve kontrol edilebilirliğine göre Tablo I'de gösterilmektedir (25,27,30–32)

**Tablo I: Sürece ve kontrol edilebilirliğine göre preanalitik varyasyon kaynakları**

Faktör	Kontrol Edilebilirlik	İlgili Süreç Aşaması	Açıklama
Hasta Hazırlığı	Kontrol Edilebilir	Numune alımı öncesi	Diyet, ilaç kullanımı, uygun açlık süresi, sigara, kahve, alkol gibi maddelerin tüketim zamanlarının kontrolü gibi etmenler; hastanın önceden bilgilendirilmesi ve standart hazırlık protokollerine uyumuyla yönetilebilir.
Numune Alma Yöntemleri	Kontrol Edilebilir	Numune Alımı	Doğru kan alma tekniği, sabit numune alma saatleri, uygun örnek toplama tüplerinin seçimi ve doldurma sırasına/seviyesine uygun kan alımı; hemoliz ve pıhtılaşma risklerinin azaltılması açısından kritiktir.
Numune Taşıma ve	Kontrol Edilebilir	Numune transport ve işlenmesi	Örneklerin uygun sıcaklık, süre ve çevresel koşullarda taşınması ve saklanması; analit

Saklama			uygunluk gerektirir.
Demografik Özellikler (Yaş, Cinsiyet, Irk)	Kontrol Edilemeyen	Hastaya ait	Bireysel biyolojik farklılıklar; referans aralıklarının belirlenmesinde göz önünde bulundurulması gereken doğal varyasyonlar.
Fizyolojik Durumlar	Kontrol Edilemeyen	Hastaya ait	Gebelik, kronik hastalıklar veya hormonal değişiklikler; laboratuvar sonuçlarını yorumlarken ek varyasyon kaynağı olarak dikkate alınır.
Çevresel Faktörler	Kısmen Kontrol Edilemeyen	Çevresel Koşullar	Yaşanılan rakım, iklim, gün ışığı ve diğer çevresel etmenler; doğrudan müdahale edilmesi güç, ancak klinik yorumlamada hesaba katılması gereken unsurlar.
İnterferans faktörler	Kısmen kontrol Edilebilir	Hastaya ait (endojen) veya numune alımı, toplanması, transportu, işleme ve saklanma süreci (eksojen)	Hemoliz, lipemi, ikter gibi analizi etkileyen interferansların kontrolü hastanın hazırlanma aşamasından analiz aşamasına kadar devam etmelidir. İnterferansın etkisi testin analiz yöntemine göre farklılık gösterebilir.

### 2.3.2. Analitik Varyasyon

Analitik varyasyon, TTS'nin analitik evresinde ölçüm sonuçları arasında oluşan farklılıklardır. Analitik yöntemler varyasyon kaynakları içerirler. Bu varyasyonlar ölçüm tekniğinden, kalibratörlerden, reaktif/kalibratör/diğer malzemelerin lot farklılığından, ortam koşullarından, cihazların yetersizliğinden, teknisyenin tecrübe düzeyi gibi pek çok faktörden kaynaklanabilir. Bir testin sonuçlarının doğru ve kesin olması kalite spesifikasyonlarını oluşturan bileşenlerdendir (33).

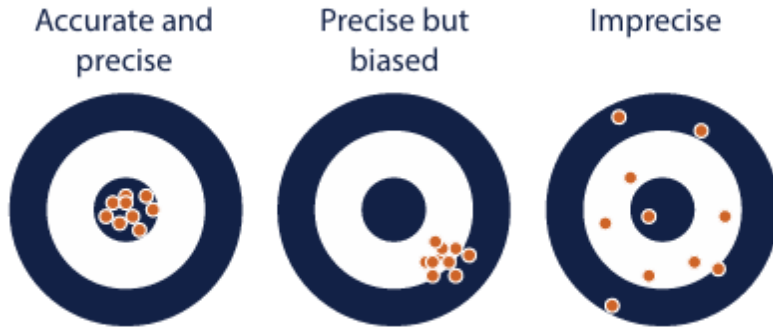
Doğruluk (Trueness), ölçümün gerçek değere yakınlığını ifade eder. Kesinlik (precision) ise ölçümlerin birbirine yakınlığı olarak tanımlanır ve aynı örneğin tekrarlı analizlerinden elde edilen verilerden tahmin edilir (34). Ayrıca presizyon günlük pratikte uygulanan iç kalite kontrol uygulamalarının sonuçlarından hesaplanabilir.

Analitik varyasyonun değerlendirildiği iç kalite kontroller, dış kalite kontrol programları laboratuvarların kantitatif (35) analitik performans göstergelerindedir (34). Kalite kontroller hasta örnekleri çalışılmadan önce testin doğruluk ve kesinliğini ölçerek varyasyon ve hata ayırımı yapılmasını sağlar (36).

Laboratuvar sorumluları, testlerinin yüksek doğruluk ve kesinliğini belirlemek için ayrıca doğruluk ve kesinliği düşük testlerde kritik hatalara sebep olabilecek metodoloji ve uygulama farklılıklarını tespit etmek amacıyla test için gerekli olan kalite kontrolünü belirlemelidir (37).

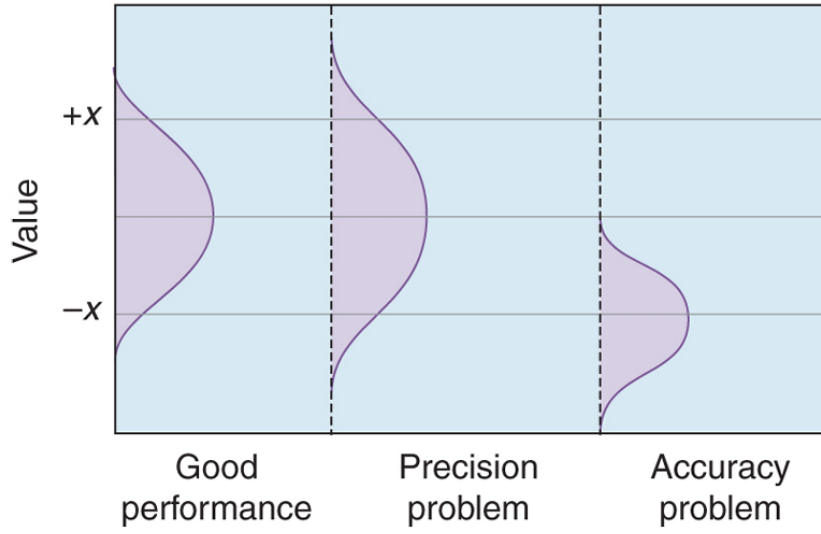
İdeal olarak analiz yöntemlerinin toplam varyasyonunun sıfır olması istenir. Fakat test yöntemi altın standart bile olsa, tüm koşullar uygun hale getirilse de bu mümkün değildir. Ancak uygun metodolojilerle ve doğru kalite kontrol uygulamalarıyla toplam varyasyon kabul edilebilir düzeye düşürülebilir (24).

Analitik varyasyonu oluşturan bileşenler impresizyon ve bias olarak ikiye ayrılır. Toplam analitik varyasyon impresizyon ve biasın toplamıdır. İmpresizyon ve bias Şekil 4 ve Şekil 5 'te grafik olarak ifade edilmiştir.



Doğru = kesin ama sapmamış

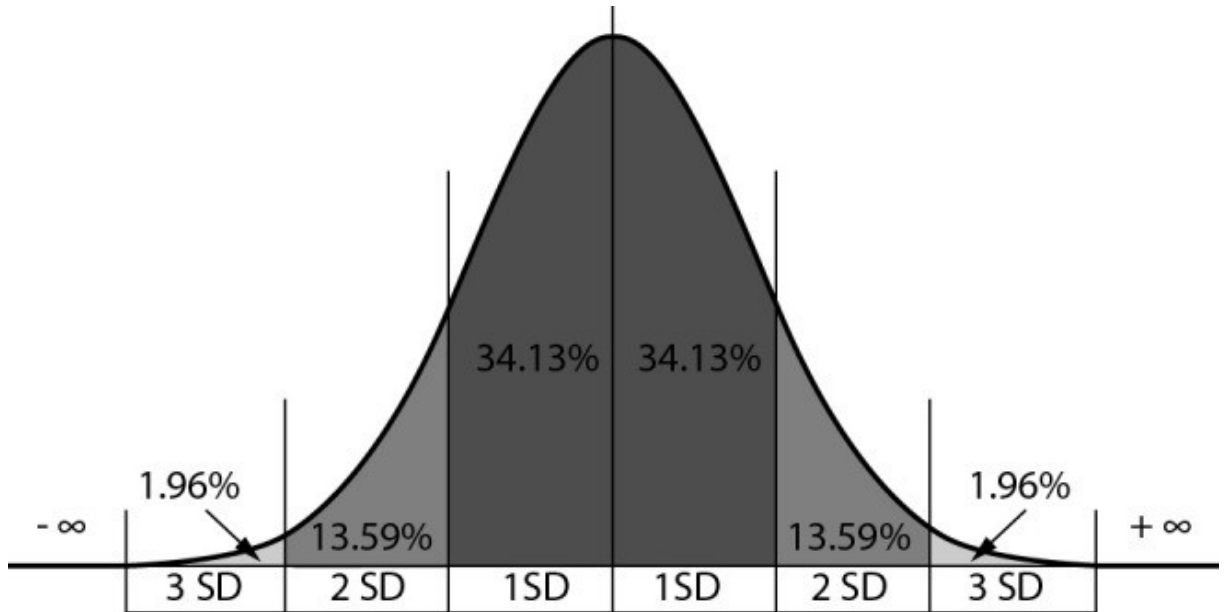
Şekil 4: Bias ve impresizyonun hedef tahtası grafiğinde ifadesi (36)



Şekil 5: İmpresizyon ve biasın grafikte birlikte ifadesi (34)

### 2.3.2.1. İmpresizyon (rastgele/random varyasyon)

İmpresizyon, bir testin aynı örnekteki tekrarlı ölçümlerinin birbirinden farklı olmasıdır. Kesinlik eksikliğini gösterir. Ölçümlerin normal dağıldığı kabul edilirse Gaussian grafiğinde dağılımın yaygınlığı/genişliği olarak ifade edilir. Bu dağılımdan standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (Coefficient of Variance, CV) ( $\%CV = SD / \text{Aritmetik ortalama} \times 100$ ) hesaplanır. Bir analitin presizyonu yani tekrarlanabilirliği iyi ise rastgele varyasyonu yani CV değeri düşük olacaktır (33).



Şekil 6: Aynı numunenin tekrarlı çalışılması ile elde edilen normal dağılımın karakteristiği (38).

Normal dağılımın karakteristikleri (Şekil 6):

Verilerin %68,3'ü ortalama  $\pm 1$  SD içinde yer alır;

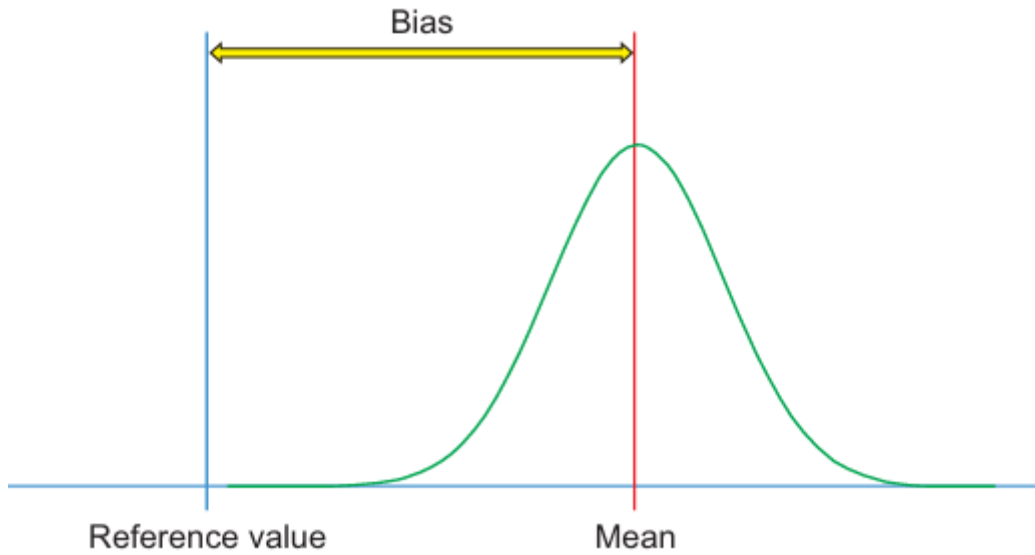
Verilerin %95,5'i ortalama  $\pm 2$  SD içinde yer alır;

Verilerin %99,7'si ortalama  $\pm 3$  SD içinde yer alır.

Normal dağılımın bu özelliği sayesinde ortalama ve SD kullanılarak değerlerin yüzde olarak hesaplanması kolaylaşır ve ayrıca laboratuvarlarda testlerin kalite kontrolünde kullanılan değerlendirme aralıkları bu temele dayanılarak oluşturulur (36).

### 2.3.2.2. Bias (sistemik varyasyon)

Bias, bir testteki tekrarlı ölçümlerin ortalamasının referans değerden farkıdır (Şekil 7). Bu fark sabittir veya öngörülebilir değişim gösterebilir. Bu terim yanlışlık olarak da ifade edilir ve doğruluğun ölçütüdür. Örneğin kalibrasyon kaynaklı hatalar sistemik hata olarak karşımıza çıkar. Bias varlığında, rastgele varyasyondan farklı olarak, ölçülen değer sürekli olarak yüksek ya da düşük olarak tahmin edilir (39). Ayrıca eksternal kalite kontrol programlarındaki ortalama değer ile laboratuvar ölçüm değeri arasındaki fark da biası gösteren uygulamalardandır.



Şekil 7: Bias: Tekrarlı ölçüm sonuçları ile referans (doğru) değer arasındaki fark (40)

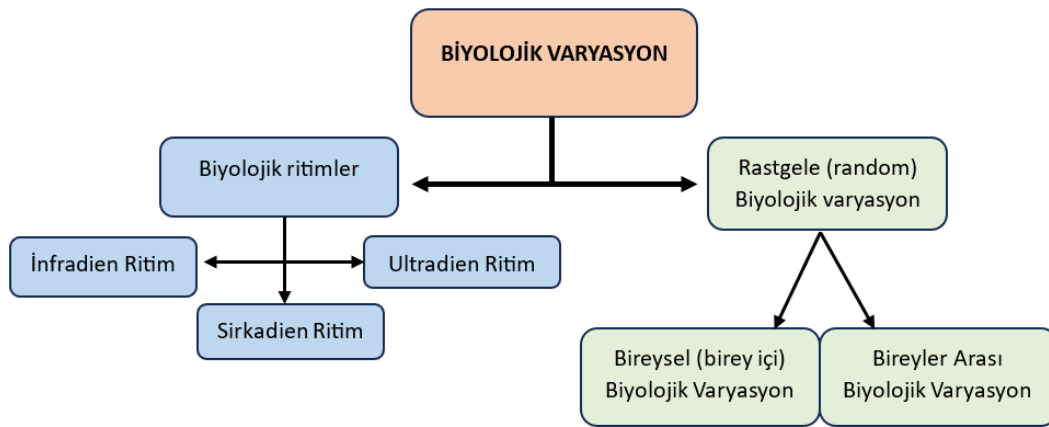
### 2.3.3. Biyolojik Varyasyon

Yaşam, biyomoleküllerde görülen değişimlerden meydana gelen sürekli dinamik bir süreçtir (41). Analit ölçümlerindeki değişim, yalnızca hasta ve sağlıklı durum arasındaki farkları ortaya koymaz, sağlıklı bireylerde de metabolik aktivitelere bağlı ölçümler arası farklılıklar gözlemlenebilmektedir. Özellikle yaşa bağlı varyasyonlar, geleneksel referans aralıklarının yaş gruplarına göre tabakalandırılmasında önemli rol oynamaktadır. Analit ölçümlerinde gözlemlenen değişkenlikleri, metabolik aktivitelere bağlı olarak ortaya çıkan, biyolojik ritimlere uygun sistematik değişiklikler ile öngörülemeyen rastgele biyolojik varyasyonlar şeklinde Şekil 8’de gösterildiği gibi iki ana kategoriye ayırabiliriz (5,6).

Biyolojik varyasyon bir kişinin farklı dönemlerdeki ölçümlerinde görülen değişime etki eden önemli bir faktördür. Sağlıklı kişilerde analitin seyri sistematik varyasyon gösteriyorsa önceden tahmin edilebilir. Rastgele biyolojik varyasyonun ise sistematik varyasyon gibi önceden tahmin edilmesi zordur ancak uygun çalışmalar ve istatistiksel yöntemler kullanılarak ölçülebilir (5).

Sistematik biyolojik varyasyonlar; büyüme ve yaşlanmaya bağlı, kadınlarda gebelik, menopoz gibi fizyolojik süreçlerde yaşam boyu süren ve günlük, aylık, mevsimlik döngülerde görülen biyolojik ritimlerle açıklanan öngörülebilir değişimlerdir (41).

Rastgele biyolojik varyasyonlar, bireylerdeki biyolojik ritimden farklı şekilde, sıralı olarak günün aynı zamanında alınan örneklerden yapılan ölçümlerde, homeostatik denge noktası etrafında rastgele dalgalanmalar olarak ifade edilmektedir; birey içi ve bireyler arası olmak üzere iki bileşenden oluşmaktadır (4).



Şekil 8: Biyolojik varyasyonu oluşturan bileşenler

### 2.3.3.1. *Biyolojik Ritimler*

Bu varyasyonlar saniyeden daha kısa zamanda ya da yıllar alan değişimler olabilir. Ritmik değişimler ultradien, sirkadien ve infradien ritim olmak üzere üç alt grupta incelenir (5).

**a) Ultradien ritim:** Bir günden (24 saatten) daha kısa döngü gösteren ritimdir. Örneğin; kalp atışı, nöronun elektriksel aktivitesi gibi fizyolojik aktivitelerin yanı sıra insülin, GnRH gibi hormonların sekresyonu ultradien biyolojik ritim gösterir.

**b) Sirkadien ritim:** 24 saatlik periyotlarda döngü gösteren ritimdir. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesinde karanlık-aydınlık döngüsü merkezi rol almakla birlikte ışık maruziyeti, beslenme gibi dış uyaranlar da düzenleyici görevdedir. Hormonlardan melatonin, growth hormon ve kortizol sirkadiyen ritim gösteren hormonlardandır. Bunun dışında lökosit, elektrolitler, eser elementler, glukoz da sirkadiyen ritim gösterir.

**c) İnfradien ritim:** 1 günden uzun periyodu olan ritimdir. İlişkili biyolojik sisteme göre günlerden mevsimlere, yıllara kadar süre uzayabilir. Örneğin; aylık döngü gösteren menstruel siklus ya da mevsimsel değişim gösteren vitamin D (5).

### 2.3.3.2. *Rastgele Biyolojik Varyasyon*

Hasta hazırlığı, numune alımı gibi preanalitik süreç ve siklik değişimlerin kontrol edildiği şartlarda toplam varyasyonun analitik varyasyondan yüksek olduğu görölmüş ve bu durum analitik varyasyon dışında ek bir varyasyonun varlığına yani biyolojik varyasyona işaret etmiştir (5). Ardışık zaman aralıklarında alınan seri örneklerdeki ölçümlerde görülen, biyolojik ritimlerle açıklanamayan, homeostatik ayar noktası etrafında görülen dalgalanmalar rastgele (random) biyolojik varyasyon olarak tanımlanır (4).

Rastgele biyolojik varyasyon, birey içi biyolojik varyasyon ve bireyler arası biyolojik varyasyon olmak üzere iki bileşenden oluşur. Ayrıca bu bileşenler kişiselleştirilmiş laboratuvar tıbbının da temel unsurlarıdır (5).

Birey içi (bireysel) biyolojik varyasyon ( $CV_1$ ), bir gruptaki bireylerin ölçümlerinin homeostatik ayar noktası etrafındaki rastgele dalgalanmaları ifade eder. Bireyler arası biyolojik varyasyon ( $CV_G$ ) ise bir gruptaki bireylerin homeostatik ayar noktaları arasındaki varyasyonunu tanımlamaktadır (4).

Kişi içi biyolojik varyasyon (within person) ( $CV_P$ ), bir bireyde gözlenen homeostatik ayar noktası etrafındaki dalgalanmalardır.  $CV_I$  ile ilk bakışta aynı gibi görünse de  $CV_I$  bir grup bireyin birey içi varyasyonudur,  $CV_P$  ise gruptan bağımsız tek bir bireye özgü olan analit değişkenliğini temsil eder (5).

Biyolojik varyasyon verilerinin klinikte ve laboratuvar tıbbında aşağıda belirtildiği gibi birçok önemli uygulama alanı vardır:

- Kalite için belirlenmesi gereken analitik performans spesifikasyonlarının (APS) tanımlanması
- Bireysellik indeksi hesaplanarak geleneksel popülasyona dayalı referans aralıkların geçerliliğinin değerlendirilmesi
- Bir bireyin ardışık örneklerindeki analizlerdeki farkın önemini değerlendirilmesi
- Personalize (kişiselleştirilmiş) referans aralıkların tahmini (42)

Tüm bu önemli uygulama alanları için kolayca ulaşılabilir ve güvenilir BV veri tabanına ve kaliteli BV verilerinin üretilmesi için standart bir yaklaşıma ihtiyaç duyulmuştur (43,44).

Bu ihtiyaçları karşılamak amacıyla EFLM 1. Stratejik konferansının ardından EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu (WG-BV) ve BV veritabanı için EFLM Görev Grubu (TG-BVD) ile düzenleme çalışmaları yapılmıştır. BV verilerini güvenilir bir şekilde güncellemek amacıyla EFLM WG-BV tarafından European Biological variation study (EuBiVAS) projesi tasarlanmış ve biyolojik varyasyon çalışmaları için birey seçimi, örnek toplama aşamasındaki kriterler belirlenmiştir (7).

TG-BVD tarafından ise BV çalışmalarının güvenilirliğini değerlendirmek amacıyla standart BV Verileri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi (BIVAC) oluşturulmuştur. Bu liste ile çalışma tasarımı, ölçüm yöntemleri ve  $CV_I$ 'nin hesaplanması için yararlanılan istatistiksel yaklaşım göz önüne alınarak mevcut BV literatürlerinin 14 kriter ile çalışmanın güvenilirlik ve metodolojik kalitesi değerlendirilmektedir ve sonucunda çalışmalar A, B, C veya D olarak sınıflandırılır. D grubu dışındaki çalışmalar meta analizlerde yer alabilmektedir (45).

Bu çalışmaların yanısıra yapılan BV çalışmalarını EFLM tarafından oluşturulan uzman grupların geliştirdiği çevrimiçi bir kaynak (www.starbiv.eu) aracılığı ile tasarım, üretim, sunum ve raporlama açısından bir standarda yaklaştırabilmek amaçlanmıştır. Bu sayede BV verilerindeki güveni ve kaliteyi etkileyen faktörlerin farkındalığında artış sağlanmaya çalışılmaktadır (42).

## **2.4. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Çalışma Prosedürleri**

### **2.4.1. Biyolojik Varyasyon Çalışmalarında Birey Seçimi**

Biyolojik varyasyon çalışmalarının güvenilirliği için ilk koşul çalışma grubunun doğru belirlenmesi ve referans bireylerin seçilmesidir. EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu (BV-WG) tarafından, biyolojik varyasyon çalışmalarının standardize edilebilmesi için, çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri belirlenmiştir.

#### **2.4.1.1. Dahil Etme Kriterleri:**

- Katılımcı, bilgilendirilmiş onam formunu okuyup imzalamalıdır.
- Katılımcı fiziksel ve ruhsal olarak kendini iyi hissetmelidir.
- Katılımcı 18 yaşından büyük olmalıdır.
- Öncelikli tercih olarak hiçbir ilaç kullanılmamalıdır; eğer ilaç veya vitamin takviyesi alınıyorsa, etkin madde, doz ve kullanım sıklığı bildirilmeli ve kaydedilmelidir.
- İdeal olarak sigara veya alkol kullanılmamalıdır; eğer tüketiyorsa, ürünün türü ve miktarı açıkça belirtilmelidir.

#### **2.4.1.2. Hariç Tutma Kriterleri:**

- Bilinen diyabetes mellitus tanısı olan veya tedavi (oral veya subkutan antidiyabetikler/insülin) gören; ayrıca açlık serum glukozu > 126 mg/dL olan bireyler
- Kronik karaciğer hastalığı öyküsü var olan; örneğin,  $\gamma$ -glutamil transferaz ( $\gamma$ GT > 150 U/L değerleri bulunan bireyler.
- Kronik böbrek hastalığı öyküsü var olan CKD-EPI formülüne göre eGFR < 60 mL/dak/1,73m<sup>2</sup> bulunan bireyler.
- Dislipidemi varlığı (Total kolesterol > 250 mg/dL (6,5 mmol/L).

- Aile öyküsünde talasemi sendromu veya diğer hemoglobinopatilerin bulunması.
- Tetkik sonuçlarında ciddi kronik hastalığı (ör. kanser, kardiyovasküler veya nörolojik hastalıklar) olan bireyler.
- Akut hastalık (ör. yükselmiş C-reaktif protein) belirtileri gösteren durumlar.
- Hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV) veya HIV taşıyıcısı olarak bilinen bireyler.
- Son 4 hafta içerisinde hastane yatış öyküsü veya ciddi hastalık nedeniyle tedavi görmüş olanlar.
- Son 3 ay içerisinde kan bağıışı yapmış kişiler.
- Gebe, emziren veya doğum sonrası ilk yılda olan kadınlar.
- Araştırmacının, çalışmaya katılımın birey üzerinde risk oluşturabilecek veya çalışma sonuçlarını olumsuz etkileyebilecek başka önemli tıbbi rahatsızlık belirlemesi (7).

#### **2.4.2. Biyolojik Varyasyon Çalışmalarının Koşulları**

Bir bireyin test sonuçlarındaki toplam varyasyonu preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ve birey içi biyolojik varyasyon oluşturur.

Biyolojik varyasyon çalışmalarında; örnek alma, toplama, taşıma, santrifüj, alikotlama işlemleri, depolama gibi numune işleyişi ve bireyin kan almadan önceki beslenme, açlık, dinlenme durumu gibi kontrol edilebilir tüm preanalitik varyasyon kaynakları sıkı kontrol altında standardize edilmelidir ve ihmal edilebilir düzeye indirilmelidir (4,7,41,46).

#### **2.4.3. Örneklerin Toplanması, İşlenmesi ve Saklanması**

Biyolojik varyasyon çalışmalarında verileri daha iyi tahmin edebilmek için preanalitik varyasyonu minimize etmek amacıyla aşağıda belirtilen bazı şartlar sağlanmalıdır (7):

- Örnekler günün aynı saatinde alınmalı (genellikle sabah erken saatte)
  - Numune alımından önce bireylerin açlık ve egzersiz durumu sorgulanmalı.
- Birey numune vermeden önceki 1 günde aşırı yemek ve alkol tüketiminden kaçınmalı, en az

10 saatlik açlığı sağlamalı ve en az 3 gün ağız egzersizden kaçınmalı. Ayrıca numune alımından kısa süre öncesinde sigara içmemeli.

- Numune alımı aynı koşullar altında yapılmalı. Analit konsantrasyonunun postürden etkilenmemesi için numune alımı öncesinde 10 -15 dk sakin bir şekilde oturmalı.

- Numune toplama işlemi aynı flebotomist tarafından yapılmalı ve aynı lot numaralı tüplere standart numune alım tekniğiyle alınmalı.

- Biyolojik varyasyon çalışması için ölçülmek istenen analit dışında, bireyin sağlıklı olma durumunu takip etmek için ilk vizitte tam kan sayımı ve her vizitte serum trigliserit, ALT, CK, CRP ve serum indeksleri analiz edilerek geleneksel referans aralıklara göre değerlendirilmeli.

- Örneklerin transport süresi ve sıcaklığı aynı olmalı.
- Numuneler santrifüj edilecekse hızları, süreleri ve sıcaklıkları aynı olmalı.
- Örneklerinin saklama koşulu için eğer analitin stabilitesi için uygunsuzsa dondurulmalı, uygun değilse numune alındığında analiz gerçekleştirilmeli.

Bu şartların yerine getirilmemesi preanalitik varyasyonu yükseltir. Bu durum biyolojik varyasyon tahminlerinin ( $CV_I$  ve  $CV_G$ ) fazla hesaplanmasına neden olur (45).

Analitik varyasyonları ( $CV_A$ ) sıfıra indirmek mümkün değildir ancak kaynakların sıkı kontrolüyle olabildiğince minimuma indirilmeli ve tahmin hesaplamaları dikkatlice yapılmalıdır (46). Analitik varyasyonun ( $CV_A$ ) kontrolü için eğer analitin stabilitesi uzunsa uygun koşullarda depolanan tüm örnekler aynı koşullar altında tek cihaz tek kalibratör seti, aynı lot reaktifler ve yardımcı malzemeler ile tek bir çalışmada çift olarak analiz edilmeye çalışılır (4,41,45). Ayrıca çalışma boyunca ölçüm konsantrasyonlarında sistematik bir değişim olmaması, analitin kararlı durumda olması, gerekir. Eğer ölçümler kararlı durum şartını karşılamıyorsa verilere gerekli dönüşümler uygulanmalıdır (45).

#### **2.4.4. İstatistiksel Analiz**

Her örneğin çift analizinden sonra elde edilen verilerde aykırı değer analizi yapılmalıdır. Aykırı değerler biyolojik varyasyon verilerini büyük ölçüde etkileyebilir. Bu nedenle aykırı değer tespit edilirse gruptan çıkarılarak analize devam edilmelidir (45).

Aykırı değerler gruptan çıkarıldıktan sonra normalite kontrolü yapılmalı ve varyans homojenitesi şartı sağlanmalıdır (45). Daha sonra çift çalışmalardan elde edilen

ortalama varyanslar ( $CV_A$ ), ortalama bireysel biyolojik varyasyon ( $CV_I$ ) ve bireyler arası biyolojik varyasyon ( $CV_G$ ) verilerini elde etmek için Nested ANOVA yöntemiyle ileri istatistiksel analiz yapılır (6). Ayrıca güncel istatistiksel yaklaşım olarak kabul gören CV-ANOVA yöntemiyle de daha sağlam  $CV_I$  elde edilir (47).

## **2.5. Klinik Biyokimya Laboratuvarında Biyolojik Varyasyon Verilerinin Kullanımı**

### **2.5.1. Homeostatik Ayar Noktasını Tahmin Edebilmek İçin Gerekli Olan Numune Sayısı**

Bir analit için homeostatik ayar noktasını güvenilir bir şekilde tahmin edebilmek için gereken örnek sayısını biyolojik varyasyon verilerinden yararlanarak belirlenebilir.

Analitik ve bireysel biyolojik varyasyon bileşenleri kullanılarak belirli bir olasılık dahilinde, homeostatik ayar noktasının belirli bir yüzde aralığında tutabilmek için gereken numune sayısının tahmini aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$n = [Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2} / D]^2$$

n: gereken örnek sayısıdır.

Z:  $p < 0.05$  için 1.96 alınır.

D: analitin tahmin edilen sonucunun homeostatik ayar noktasına olan yakınlığının yüzde olarak ifadesidir (6).

### **2.5.2. En Uygun Testin ve En Uygun Örnek Türünün Belirlenmesi**

En uygun numune türü belirlenirken bireysel biyolojik varyasyon ( $CV_I$ ) değeri düşük olan örnek türünün seçilmesi daha güvenilir sonuç elde edilmesinde yardımcı olur. En uygun test seçiminde biyolojik varyasyon verilerinin kullanımı klinik amaca yönelik değişebilir. Tanı amaçlı testte bireyselliği düşük olan testi, takip için ise referans değişim değeri (RCV) düşük olan testi tercih etmek klinik açıdan daha faydalı olacaktır (6).

### **2.5.3. Kalite İçin Belirlenmesi Geren Analitik Performans Spesifikasyonlarının (APS) Tanımlanması**

Analitik varyasyonların klinik olarak tanı, takip planı, tedavi planı veya prognostik süreç gibi klinik etkileri APS belirlenirken en önemli hedeflerdir (48). Bu amaçla test sonuçlarında klinik karara doğru etki edecek şartların oluşturulması gereklidir ve bu şartların

objektif bir şekilde değerlendirilebilmesi için analitik spesifikasyonların belirlenmesi gerekmektedir (48–50).

1999 yılında Stockholm’de Uluslararası Teorik ve Uygulamalı Kimya Birliği (International Union of Pure and Applied Chemistry), Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine) ve Dünya Sağlık Örgütü tarafından organize edilen kalite spesifikasyonlarını belirlemek amacıyla kaynaklar hiyerarşisi oluşturulmuş ancak yapılan konferanstan 15 yıl sonra uygulamadaki zorluklar nedeniyle 2014 yılında Milan’da EFLM tarafından EFLM 1. Stratejik konferans düzenlenmiş ve analitik performans spesifikasyonları belirlenmesinde bazı revizyonlar yapılarak güncel olarak 3 model üzerinde durulmuştur. Amaç, her model her metot için avantajlı olmadığından uygun model veya modellerle analitik performans hedeflerini belirlemek ve bu hedeflere uygun kalite kontroller ile klinik karar verme süreçlerindeki hataları minimuma indirmektir (44,51). Ayrıca 2023 yılında Prag’da düzenlenen 5. Avrupa’da Laboratuvar Tıbbının Geleceği Sempozyumu’nda APS belirlemek için modeller uygulaması tekrar değerlendirilmiş ve tekrar kabul görmüştür (50).

#### ***2.5.3.1. Model 1: Klinik Sonuçlara Dayalı Model***

Bu modelde test sonucunun başarısı klinik sonuçlara doğrudan etkilidir. Klinik karar için hasta yönetiminde belirgin ve merkezi rolde olduğu ve test sonucunun kesme değeri belirlenmiş ölçümler için tercih edilmelidir. Bu yaklaşımın avantajı analitik performansın hasta için kritik önem taşıyan ölçüm sonuçları üzerindeki etkisini değerlendirmesidir. Dezavantajı ise birçok test için klinik karar sınırının kesin olarak belirlenememesi ve test ölçüm yöntemlerinin elde edilen spesifikasyonlara etki etmesidir (44). Örnek olarak; Trigliseridler, LDL, HDL ve total kolesterol; CRP, glukoz, HbA1c, albümin, kardiyak troponinler, TSH, tam kan sayımında hemoglobin, trombosit, nötrofil model 1 APS belirlenirken klinik sonuca dayalı değerlendirme yapılan testlerdir (52).

#### ***2.5.3.2. Model 2: Ölçümün Biyolojik Varyasyon Bileşenlerine Dayanan Model***

Bu uygulama, analiz kaynaklı sinyallerin biyolojik sinyallere oranını minimuma düşürmeyi hedefleyen performans modelidir. Biyolojik varyasyon verilerine ulaşılabilen çoğu analiz için uygun bir modeldir fakat güvenilir ve geçerli verilere gereksinim vardır. Ayrıca analitin kararlı durumda olması, örnekleme sıklığı ve zaman aralıklarının uygunluğu, altta

yatan başka hastalıkların etkisi, ölçülebilir konsantrasyonların etkisi biyolojik varyasyona dayalı APS modeli uygulanmasında kısıtlamalar oluşturur (44).

Bu yaklaşım belirli bir hastalık ya da klinik durum için merkezi rol oynamayan, homeostatik olarak sıkı kontrol altındaki ölçümler için uygundur. Örneğin; plazma elektrolitleri, mineraller, böbrek fonksiyon belirteçleri (plazma kreatinin, üre, sistatin C), plazma urat, plazma total protein konsantrasyonları, tam kan sayımındaki bazı parametreler (eritrosit sayısı, hematokrit, ortalama eritrosit hacmi) tedavi izlemi için koagülasyon testleri (52).

### **2.5.3.3. Model 3: Son Teknoloji Ürününe Dayanan Model**

Teknik olarak en üst düzey analitik performans seviyesidir. Daha yüksek kalite gereksinimi olan laboratuvarlarda, model 1 veya model 2'ye uygun olmayan ölçüm parametreleri için kullanılmalıdır. Günümüz teknolojisine dayalı bu modelin avantajı kolay bir şekilde performans verilerinin elde edilmesidir. Dezavantajı ise teknik performans ile klinik için gerekli performans arasında doğrudan ilişki kurulamayabilir. Bu nedenle en az tercih edilen yöntemdir (44,52).

Sodyum, potasyum, klor, kalsiyum, magnezyum, inorganik fosfat, kreatinin, üre, ürik asit vb. gibi idrarda ölçülen testler bu modelin uygulamasına örnek olabilir (52).

APS uygulaması farklı prensiplere sahip bu üç modelin arasından yapılacak en uygun tercih analite bağlı olarak değişiklik gösterebilir. Ancak çoğu test için en ideal yol BV verilerine dayanan model ile APS uygulamasının yapılmasıdır (53).

### **2.5.4. Biyolojik Varyasyon Verilerine Dayalı Analitik Performans Spesifikasyonları**

İdeal olan analitik performans spesifikasyonlarını direkt klinik sonuca göre belirlemektir ancak bu yaklaşımın zorluğu sebebiyle sınırlı sayıda analit için uygulanabilmiştir. Bu nedenle APSleri üretebilmek için yaygın olarak kabul gören en iyi yöntem biyolojik varyasyon verilerine dayandırmaktır (4). Ayrıca biyolojik varyasyon verilerinin kullanım alanlarında önemli bir yer tutmaktadır. Stabil konsantrasyon veya aktiviteye sahip olan birçok ölçüm maddelerinin APS'leri BV verilerine dayandırılabilir (44).

Biyolojik varyasyon verilerine dayanarak impresizyon, bias, izin verilebilir toplam hata (TEa) ve kabul edilebilir ölçüm belirsizliği için APS'ler elde edilmektedir (47).

Ancak daha önceki bölümlerde de bahsedildiği gibi farklı kalitede ve raporlaması farklı olan birçok BV çalışmaları mevcuttur. 2014 yılında düzenlenen EFLM 1 stratejik konferansında güncellenen APS modeller uygulamasında da bu konu ele alınmıştır. BV verilerine dayanan APS uygulamasının önemli kısıtlılıklarından biri, verilerdeki kalite ve hedefe yönelik olmasıdır (47,54). Bu konferans sonrası oluşturulan TG-BVD ve WG-BV çalışma gruplarıyla geçmiş çalışmaların değerlendirilmesi ve gelecekte yapılacak BV çalışmaları standardize edilmeye çalışılmıştır (7,45). En önemli ilerlemelerden biri de EFLM biyolojik varyasyon veri tabanının (<https://biologicalvariation.eu/>) kurulmasıdır (55). Bu veri tabanında çok sayıda detaylı olarak kalite açısından değerlendirilmiş BV çalışmalarına erişilebilmekte ve bu çalışmaların meta analizlerinden global BV tahminleri elde edilerek BV verilerine dayalı APS'lerin otomatik hesaplaması yapılmaktadır.

BV'yi oluşturan bileşenler:

1) Birey içi biyolojik varyasyon ( $CV_I$ ): bir gruptaki stabil olan bir ölçümün konsantrasyon veya aktivitesinin, bireyler içindeki homeostatik ayar noktası etrafındaki değişimdir.

2) Bireyler arası biyolojik varyasyon ( $CV_G$ ): farklı bireylerdeki homeostatik ayar noktası etrafındaki değişimdir (56).

Biyolojik varyasyonun toplam ( $CV_B$ ) tahmini şu şekilde hesaplanır:

$$CV_B^2 = CV_I^2 + CV_G^2$$

Bir analitteki toplam varyasyonu oluşturan bileşenler preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ( $CV_A$ ) ve bireysel biyolojik varyasyondur ( $CV_I$ ). Bu varyasyonlar rastgele olduğu için normal dağılıma uyduğu kabul edilir. Analitik varyasyon bölümünde de anlatıldığı gibi normal dağılımın genişliği SD veya CV olarak tanımlanabilir. Test sonucuna etki eden toplam varyasyon ( $CV_T$ ) formülize edilirken daha da basitleştirebilmek için preanalitik varyasyon bileşeni ihmal edilerek aşağıdaki gibi hesaplanır:

$$CV_T^2 = CV_A^2 + CV_I^2$$

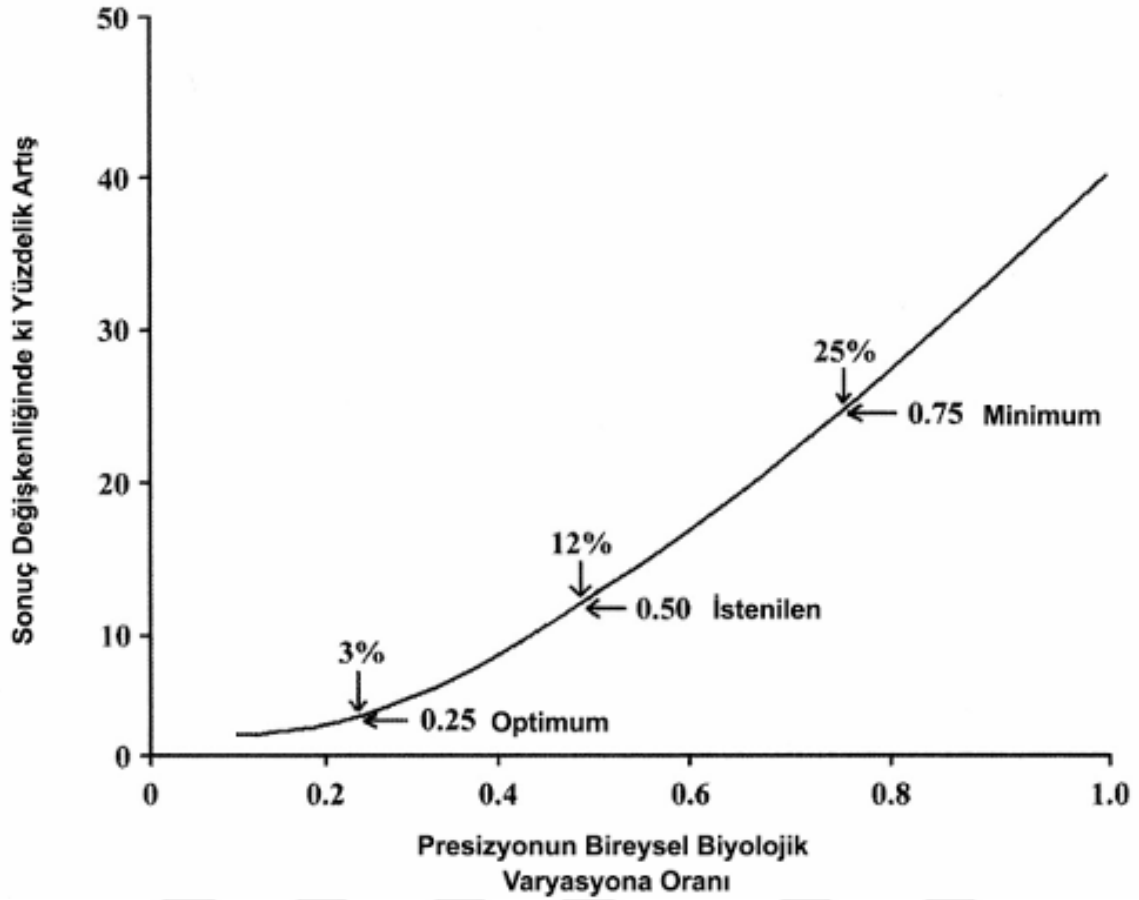
#### **2.5.4.1. İmpresizyon için Analitik Performans Spesifikasyonları**

İmpresizyon tarihsel olarak BV verilerine dayalı en eski analitik kalite yaklaşımıdır (56). Bu yaklaşımdaki amaç, analitik gürültünün biyolojik sinyalden olabildiğince düşük olmasını sağlamaktır. Bir testin tekrarlı ölçümlerinden elde edilen analitik

varyasyon katsayısının ( $CV_A$ ) düşük olması iç kalite kontrollerin sıklığını azaltır, hatalı sonuç olasılığını azaltır, bireyin seri ölçümlerinde görülen değişimi daha anlamlı kılar ve popülasyona dayalı referans aralıklarının daha dar olmasını sağlayarak klinik eyleme daha doğru etki eder. Bu nedenle toplam varyasyon formülünden yola çıkılarak aşağıdaki kabul edilebilir performans hedefleri belirlenmiştir (4,40).

- Minimum performans:  $CV_A < 0.75 CV_I$  olması halinde, test sonuçlarındaki değişkenliğe en fazla %25 değişkenlik eklenir.
- Arzu edilen performans:  $CV_A < 0.50 CV_I$  olması halinde, en fazla %12 değişkenlik eklenir.
- Optimum performans:  $CV_A < 0.25 CV_I$  olması halinde, en fazla %3 değişkenlik eklenir.

Presizyonun bireysel biyolojik varyasyona oranı ile ölçüm sonuçlarındaki değişkenlik yüzde olarak Şekil 9'da gösterilmiştir. Presizyondaki artışın test sonucuna doğrusal etki etmediği eğride görülmektedir.



Şekil 9: İmpresizyon için analitik performans spesifikasyonu (4)

#### 2.5.4.2. Bias için Analitik Performans Spesifikasyonları

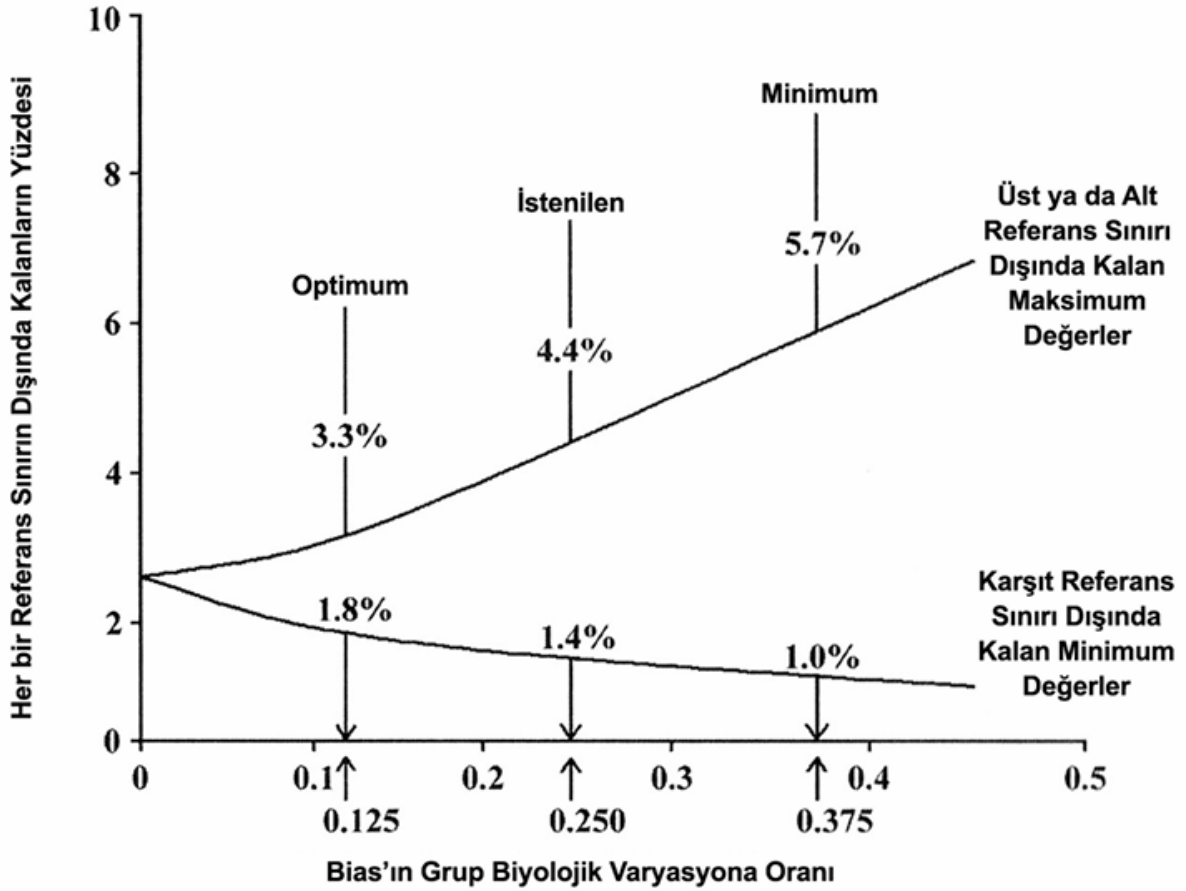
Bias, tekrarlanan ölçüm sonuçlarının sistematik olarak gerçek değerden sapmasıdır (40).

Biasın olmadığı ölçümlerde referans aralık sınırlarını Gaussian dağılım gösteren eğrinin %95'lik kısmının alt ve üst sınırları belirler ve dağılımın üst sınır ve alt sınırından %2.5'lük kısımları yani popülasyonun toplam %5'lik bölümü referans aralık dışında kalır. Bias varlığında referans aralık dışında kalanların yüzdesinde artış görülür (Şekil 10).

İmpresizyon ihmal edilebilir düzeyde olduğu takdirde, çok küçük bias varlığında referans aralıkları homojen popülasyonlarda transfer edilebilir, farklı laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar karşılaştırılabilir, laboratuvarların hali hazırda kullandığı referans aralığını test yöntem değişikliklerinde değiştirmeden kullanabilir. Bu nedenle toplam bireysel ve bireyler arası biyolojik varyasyon verilerine dayanan bias için kabul edilebilir performans hedefleri ( $B_A$ ) belirlenmiştir (4,40,57).

- Minimum performans:  $B_A < 0.375 CV_B$  olmalıdır.
- Arzu edilen performans:  $B_A < 0.250 CV_B$  olmalıdır.
- Optimum performans:  $B_A < 0.125 CV_B$  olmalıdır.

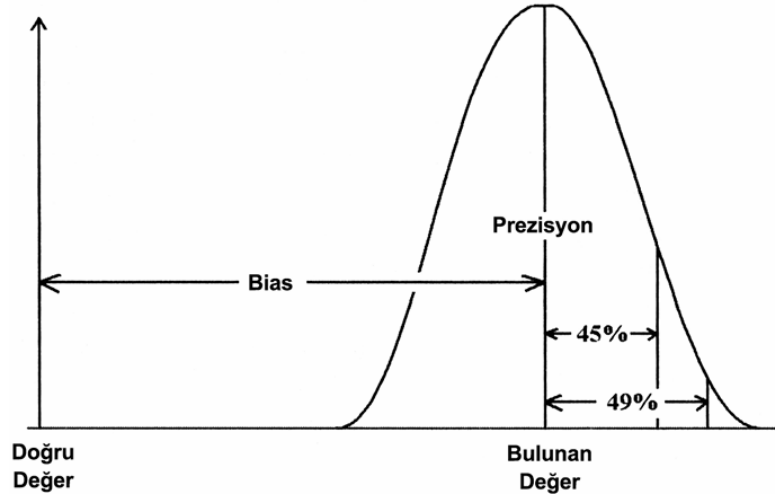
Biasın grup biyolojik varyasyona (toplam biyolojik varyasyon) oranı ile referans sınırların dışında kalan popülasyonun yüzdeleri Şekil 10'da gösterilmiştir.



Şekil 10: Bias için analitik performans spesifikasyonu (4)

#### 2.5.4.3. Total Kabul Edilebilir Hata için Analitik Performans Spesifikasyonları

Total kabul edilebilir hata, izin verilebilir impresizyon ve izin verilebilir biasın doğrusal kombinasyonu ile elde edilen performans spesifikasyonudur. Toplam hata, analitik ölçümlerin, tanımlı olasılık sınırları içerisinde (sıklıkla %95) gerçek değer çevresinde bulunabileceği aralığı belirler (Şekil 11), ölçülen değer ile gerçek değer arasındaki farkı tahmin eder (58).



Şekil 11: Toplam hata kavramı (4).

Toplam kabul edilebilir hata (TEa) aşağıda gösterilen formül ile hesaplanır:

$$TEa = B_A + 1,65 \times CV_A$$

Bu formülde 1,65, %95 güven aralığına denk gelen Z puanıdır.

İzin verilebilir impresizyon ve izin verilebilir bias tahminini hesaplama formüllerinden toplam kabul edilebilir hata formülü elde edilir ve performans hedefleri aşağıdaki gibi hesaplanır:

- Minimum performans:  $TEa < 0,375 CV_B + 1,65 \times (0,75 CV_I)$  olmalıdır.
- Arzu edilen performans:  $TEa < 0,250 CV_B + 1,65 \times (0,50 CV_I)$  olmalıdır.
- Optimum performans:  $TEa < 0,125 CV_B + 1,65 \times (0,25 CV_I)$  olmalıdır (4).

#### 2.5.4.4. Kabul Edilebilir Ölçüm Belirsizliği için Analitik Performans Spesifikasyonları

Ölçüm belirsizliği, bir ölçüme ait değerlerin dağılımını ifade eden bir kavramdır (59). Ölçüm sonucu bakış açısıyla, ölçüm sonucunun toplam belirsizliğinin bir güven aralığı içerisinde tahminidir. Test sonucu bir tahmindir ve ölçüm belirsizliğinde ölçülen değer etrafında, belirli bir olasılık dahilinde gerçek değer bulunabildiği, bir aralık sunulur (60).

Ölçüm belirsizliği, bir ölçüm prosedüründeki sistematik hatanın düzeltilmesinden (örneğin; kalibrasyon ile) sonra kalan tüm varyasyonların birleşiminden oluşur. Bu nedenle ölçüm belirsizliği, impresizyondan kaynaklanan ve bias düzeltilmesinin sonucu kaynaklanan ek belirsizlikleri içerir (56,58).

Kabul edilebilir maksimum aralıktaki ölçüm belirsizliği MAU olarak ifade edilir. Bu performans spesifikasyonunun amacı, biyolojik varyasyona kıyasla analitik gürültüyü minimuma indirmektir. Hesaplama şu şekilde yapılabilir:

$$MAU = k \times 0.5 \times CV_I$$

Burada “k” %95 güven düzeyi için 2, %99 için 3 kapsama faktörü olarak alınır. Çoğunlukla kullanılan faktör düzeyi 2’dir (47).

MAU için APS hedefleri ise şu şekildedir:

- Minimum performans:  $MAU < 2 \times 0.75 CV_I$
- Arzu edilen performans:  $MAU < 2 \times 0.5 CV_I$ .
- Optimum performans:  $MAU < 2 \times 0.25 CV_I$  (55).

#### 2.5.5. Referans Değişim Değeri (RCV)

Referans değişim değeri ardışık ölçümlerdeki farklılığın önemini belirlemek için hesaplanan bir değerdir. Bireylerin seri ölçümlerinde gözlemlenen değişimlerin anlamlı olması için ölçümler arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olması gerekir. Bu istatistiksel fark, "referans değişim değeri" olarak ifade edilir (61).

Sağlıklı bir bireyin bir ölçümünde görülebilecek varyasyonlar preanalitik varyasyonların ihmal halinde analitik ve birey içi varyasyonlardan oluşur. Total varyasyon ( $CV_T$ ) olarak ifade edilir ve şu şekilde formülize edilir:

$$CV_T = (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

Normal dağılım gösterdiği varsayılarak bu değişimin alt ve üst sınırlarını belirleyebilmek için Z skorları ile olasılıklar belirlenir ve bir ölçümde görülebilecek değişim şu şekilde belirlenir:

$$CV_T = \pm Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}$$

RCV seri ölçümlerin takibinde anlamlı farkı belirlemek için kullanılır ve aşağıdaki formülden yararlanır:

$$RCV = 2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}.$$

Seri ölçümlerdeki 2 örnek arasındaki anlamlı değişimi görmek için  $2^{1/2}$  değeri kullanılır.

Genel kullanımda Z skoru çift yönlü olarak, %95 ( $p<0,05$ ) anlamlılık için 1,96 ve %99 ( $p<0,01$ ) yüksek düzeyde anlamlılık için 2,58'dir.

$CV_A$  değeri iç kalite kontrollerden elde edilir.

$CV_I$  değeri ise en güvenilir ve en güncel olan kaynaktan alınmalıdır.

$CV_I$ , sağlıklı kişilerde ve stabil durumdaki kronik hastalıklı kişilerde sabit olduğu kabul edildiğinden impresizyon ( $CV_A$ ) arttıkça RCV artar bu da şu anlama gelir: ardışık ölçümlerde görülen küçük değişimlerin anlamlılığı düşer. Başka bir deyişle; ölçülen testin impresizyon için performansı minimum hedefi karşılamıyorsa ardışık ölçümlerdeki fark büyük olacaktır ve klinik olarak anlamlı değişikliklerin tespitini zorlaştıracaktır. Bu nedenle seri ölçümlerdeki değişimin anlamlı olma olasılığını yükseltmemiz için  $CV_A$ 'nın düşürülmesi gerekir. Performans olarak arzu edilen veya optimum hedefleri karşılayan  $CV_A$  varlığında ardışık sonuçlarda görülebilecek küçük değişikliklerin klinik olarak duyarlılığı artar. Bununla birlikte her ne kadar  $CV_A$  minimuma getirilse de ölçüme ait  $CV_I$  değeri büyükse RCV'nin yüksek olmasına sebep olacaktır (4,62).

Ölçüm sonuçlarındaki değişime en çok etki edebilecek faktörlerden biri de biastır ve mümkün olduğunca yeniden kalibrasyonla, kalite kontrollerle elimine etmek gerekir. Ayrıca ölçümler arasında yeniden kalibrasyon, reaktif lot değişikliği gibi durumların olması iki ölçüm arasında bias değişimi ( $\Delta B$ ) oluşturacaktır. Biastaki değişim belirlenebiliyorsa RCV formülü şu şekilde olacaktır:

$$RCV = \Delta B + [2^{1/2} \times Z \times (CV_A^2 + CV_I^2)^{1/2}]$$

Sağlıklı bireylerin  $CV_I$  değerleri ile hesaplanan RCV, sağlıklı popülasyon dışında birçok hastalık durumlarının takibinde de uygun olarak kullanılabilir bir araçtır. Ancak bazı hastalıklara özgü olduğu düşünülen bazı testlerde  $CV_I$ 'nin sağlıklı bireylerden farklılık gösterdiği belirlenmiş, bu nedenle ardışık sonuç takibinde yanlış pozitifliklere yol açabileceği için, sağlıklı bireylerin verilerinden elde edilen RCV'ye göre değerlendirmek uygun görülmemektedir. Ayrıca hasta ölçümleri arasındaki sıklık rastgeleliği ortadan kaldırıp ölçümler arası korelasyon oluşturabilir ve yanlış negatif sonuçlara sebep olabilir (4,63).

Bu formüller daha önce de belirtildiği gibi varyanslar normal dağılım gösterdiği durumlarda kullanılır. Normal dağılım göstermediği durumlarda veya  $CV_I$  değeri yaklaşık olarak %12'den küçük olduğu takdirde ise, doğrudan RCV hesabı hatalı sonuç vereceği için, logaritmik transformasyon ile veriler normal dağılıma yaklaştırılarak RCV'nin hesaplanması gerekir (64,65). EFLM BV Database'de de kullanılan azalış ve artış için farklı değişim değerlerinin hesaplanması asimetrik yöntem olarak bilinir. Asimetrik dağılımlarda formül şu şekilde düzenlenir (65,66):

$$RCV_{ln}(\alpha) = \% 100 \times \exp (\pm Z\alpha \times 2^{1/2} \times (CV_{lnA}^2 + CV_{lnI}^2)^{1/2})$$

RCV'lerin çeşitli testler için klinik kullanımı bildirilmiştir (67). Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü'nün (CLSI) son kılavuzları (EP33), ardışık test sonuçları arasındaki kabul edilebilir değişim sınırlarını belirlemede delta kontrolü için sistematik bir yaklaşım olarak RCV kullanımını önermektedir. Bu nedenle RCV'ler, aynı zamanda otoperifikasyon kriteri olarak da önemli bir işlev görmektedir (68,69).

#### 2.5.6. Bireysellik İndeksi (II)

Bireysellik indeksi geleneksel popülasyona dayalı referans aralıklarının yararının değerlendirilmesi için kullanılan bir parametredir. II ile gösterilir. Birey içi varyasyon bireyler arası varyasyona oranlanarak hesaplanabilir (6):

$$II = \frac{CV_I}{CV_G}$$

Sağlıklı bireylerin seri ölçümlerine bakıldığında hiçbir bireyin ölçülen değerlerinin referans aralığını kapsamadığı, çoğu ölçümün de referans aralığında sadece küçük bir aralığı kapsadığı görülür. Bu durum bireysellik ile açıklanmaktadır. Bu nedenle bireyselliği yüksek olan ölçümler için geleneksel referans aralığının kullanımının faydası sorgulanmaktadır (46).

Bir parametrenin bireysellik indeksi 0,6'dan küçük ise bireyselliği yüksektir. Geleneksel popülasyona dayalı referans aralıkları bireyin klinik olarak değerlendirebilmesi için pek faydalı değildir. Böyle bir durumda kişinin sonucu referans aralığında olsa bile homeostatik ayar noktasından uzakta olacağı için klinik değerlendirme geleneksel referans aralığa göre yapılması yanlış değerlendirme riskine sahiptir (70). Bireysellik indeksi düşük

yani yüksek bireyselliğe sahip analitlerin seri ölçüm değerlendirmesinin RCV'ye göre yapılması gerekir (47).

Bireysellik indeksi 1,4'ten büyükse bireyselliği düşüktür ve herhangi bir bireyin ölçümlerinin dağılımı geleneksel popülasyona dayalı referans aralığını kapsayacağı için kullanımı klinik olarak uygundur (46).

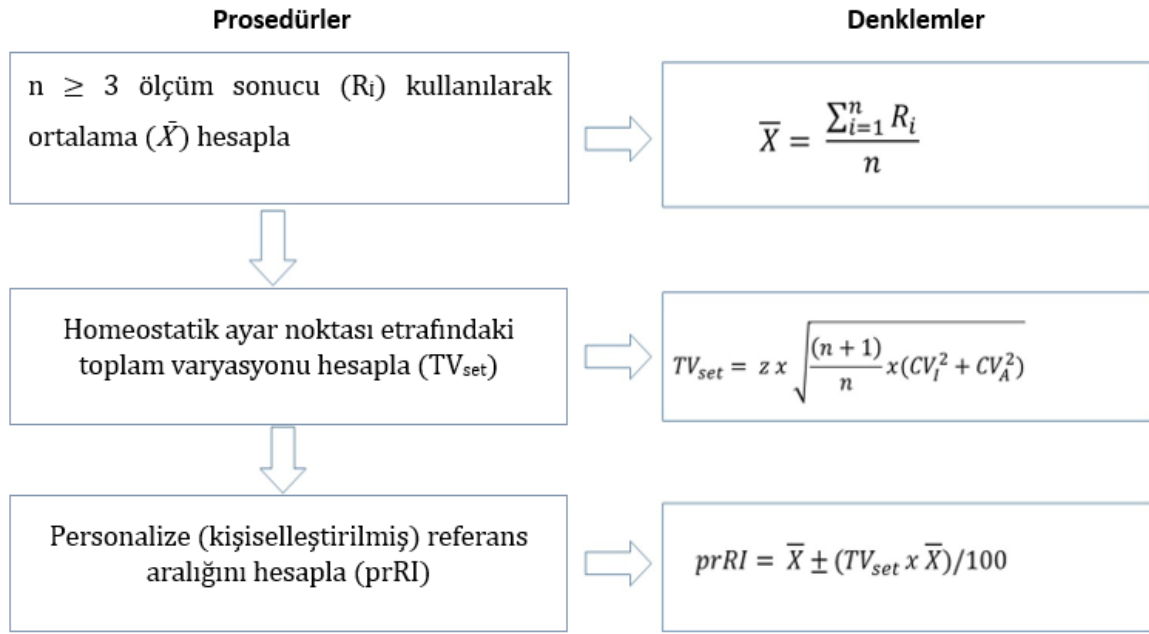
Ancak analitlerin çoğu yüksek bireysellik gösterdiği için klasik referans değerleri, klinik takip ve değerlendirmeler için pek doğru yol gösterici kabul edilmemektedir (70). Bu tür sebeplere bağlı olarak geleneksel referans aralıklarında birçok test yaşa, cinsiyete veya diğer önemli faktörlere göre tabakalara ayrılarak testlerin II oranı yükseltilmiş ve klinik karar sınırları olarak kullanılabilirliği arttırılmıştır (4).

### **2.5.7. Personalize Referans Aralık (prRI)**

Çoğu analitin bireyselliğinin yüksek olduğunu ve bu nedenle geleneksel popülasyona dayalı referans aralığının kullanılmasının klinik karara desteğini azaltacağından ve belki de bireyin prognozu için risk oluşturacağından bahsedilmiştir. Bu nedenle test sonuçları kişiselleştirilmiş referans aralığı (personalize referans aralığı-prRI) ile değerlendirilmelidir (47). Popülasyona dayalı veriler yerine bireye özgü verilere odaklanıldığı zaman hastalık yönetiminde hastaları daha merkezi konuma getirecektir (71).

PrRI'yı hesaplamak için biyolojik varyasyon verilerinden yararlanarak homeostatik ayar noktası ve analitlerin homeostatik ayar noktası etrafındaki toplam varyasyonuna dayanan yeni bir model geliştirilmiştir.

Personalize referans aralığını belirlemek için öncelikle bireyin kararlı durumdaki analit için daha önceki test sonuçlarının ortalaması alınarak elde edilen homeostatik ayar noktasının tahmin edilmesi gerekir. Sonrasında bireyin kendine ait kişi içi (within person) biyolojik varyasyon ( $CV_p$ ) tahmini veya takip edilen bu bireyin popülasyonuna yakın benzerlikte bir popülasyondan elde edilen bireysel biyolojik varyasyon ( $CV_I$ ) tahmini kullanılarak Şekil 12'de gösterildiği gibi prRI tahmin aralıkları elde edilir (72).



**Şekil 12:** Kişiselleştirilmiş referans aralığının (prRI) pratik bir şekilde bireysel biyolojik varyasyon (CV<sub>I</sub>), analitik varyasyon (CV<sub>A</sub>) ve geçmiş ölçüm sonuçları ile nasıl hesaplandığını gösteren akış şeması (n, homeostatik ayar noktasını tahmin etmek için kullanılan numune sayısıdır; TV<sub>set</sub>, homeostatik ayar noktası etrafındaki toplam varyasyonu ifade eder; CV<sub>A</sub>, analitik varyasyon; CV<sub>I</sub>, bireysel biyolojik varyasyon; z, bir sabittir ve %95 olasılık (iki taraflı değişim) için 1,96 olarak alınır) (72).

Şekil12’ de gösterilen formüllerde CV<sub>I</sub> yerine personalize (kişi içi) biyolojik varyasyon (CV<sub>P</sub>) da kullanılabilir ancak bu durumda örnek sayısı 5’ten büyük (n ≥ 5) olmalıdır (47). CV<sub>I</sub> yerine CV<sub>P</sub>’yi kullanmak yaklaşımı daha da kişiselleştirir ve prRI’nın daha spesifik olmasını sağlar (73–75).

Tanım olarak CV<sub>I</sub> ya benzese de hesaplamada kullanılan verilerin kaynağı farklıdır. CV<sub>I</sub> için bir grup bireydeki seri ölçümleri kullanırken CV<sub>P</sub> için bir bireyin ardışık ölçümlerini kullanır, böylelikle CV<sub>P</sub> bireye özgü değişimi gösterirken CV<sub>I</sub> bireye özgü değildir (5).

Modelin uygulanabilmesi için kararlı durumdaki verilerin bulunması, bireylerin sağlıklı kararlı durumda olması, analiti etkileyebilecek ilaç kullanmaması gerekmektedir. Bireyin mevcut ölçümleri arasında sonuçları etkileyebilecek bias varlığında homeostatik ayar noktasında sapma görüleceği için bu model kullanılamaz. İlaveten bireyin sonuçları ölçüm sınırına yakın testlerin verileri BV verilerini iyi temsil etmeyebilir bu durum da prRI modeli için bir sınırlılık oluşturur (72).

## 2.6. Antimüllerian Hormon (AMH)

### 2.6.1. Embriyonik Gelişimde AMH'nin Rolü

Fertilizasyondan 4 hafta sonra ürogenital sinüslerin gelişimi görülür. Ürogenital sinüsler üriner sistemin ve genital istemin öncüleridir. Çöломik epitelle kaplı mezoderm kökenli olan ürogenital sinüsler üriner ve adrenogonadal çıkıntılar yaparak ayrılır. Adrenogonadal çıkıntılar adrenal bez ve gonadların prekürsörüdür. Gonadal çıkıntı fetüsün cinsiyetine göre yumurtalık veya testise farklılaşır. Daha sonra gonadlar ekstra gonadal kökenli primordiyal germ hücreleri ile kolonize olurlar (76).

7. haftada XY kromozomlu embriyo gonadları testise farklılaşır. Gonadal hücreler testiküler kordonlar ve intersitisyel doku olmak üzere iki şekilde gelişir. Somatik sertoli hücreleri ve germ hücreleri testiküler kordonlarda gelişirken intersitisyel dokudan leydig hücreleri farklılaşır. Sertoli hücreleri AMH ve inhibin B sentezler, Leydig hücreleri ise androjenleri ve insülin like faktör (INSL3) salgılar (76).

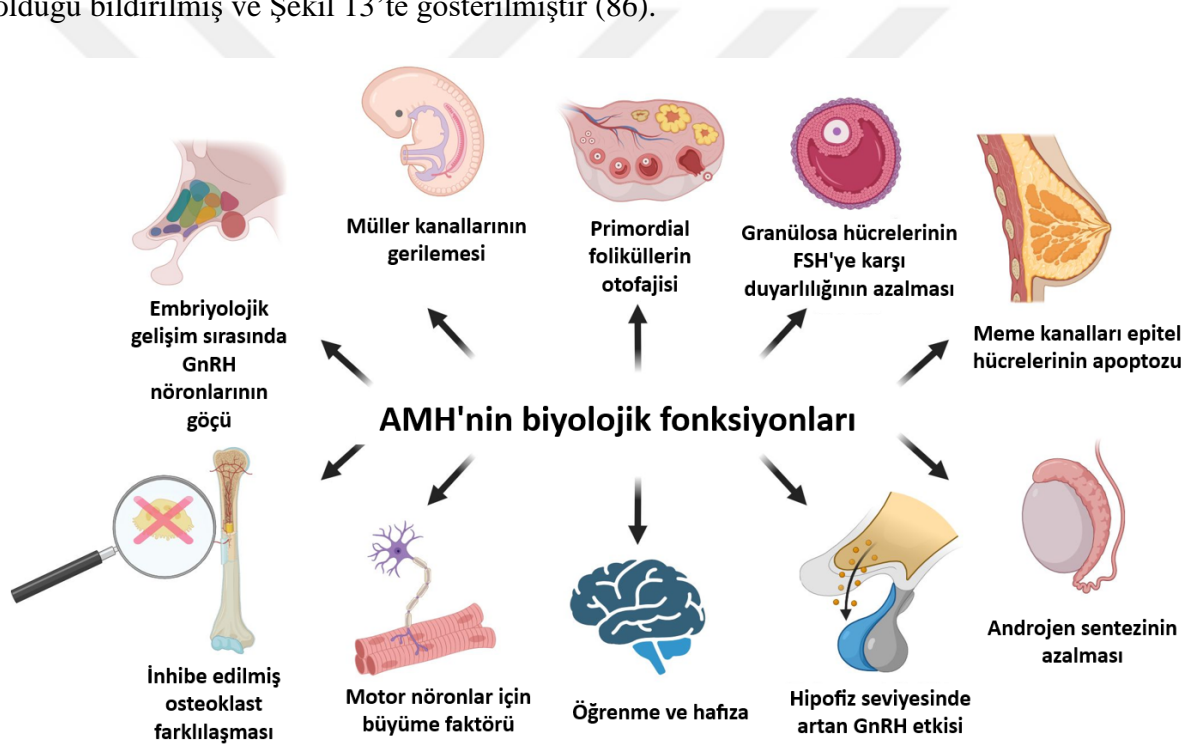
Testiküler kordonlar bazal membran ve peritübüler hücrelerle çevrelenir. Erken fetal dönemde Sertoli hücrelerinde AMH, Y kromozomu SRY kolundaki SOX geni ile tetiklenerek SF1 ve WT1 transkripsiyon faktörleriyle eksprese edilir. İlerleyen fetal dönemde FSH kontrolüyle AMH sentezi devam eder (76,77). 8. ve 9. Gebelik haftalarında müllerian kanallar AMH etkisiyle apoptozis ve epitelyal mezenşimal dönüşüm yoluyla kranialden kaudale doğru regrese olur. 10. Haftada ise regresyon tamamlanır ve müllerian kanallar AMH'ye karşı duyarsızlaşır (12,76).

### 2.6.2. AMH'nin Moleküler Yapısı ve Fizyolojisi

AMH, disülfid bağlarıyla bağlı 70 kDa'luk iki özdeş alt üniteden oluşan dimerik glikoprotein yapıda, TGF- $\beta$  süper ailesine ait bir hormondur (9,13,78).

TGF- $\beta$  süper ailesi üyeleri, disülfid bağlarıyla stabilize edilen monomerlerden oluşan dimerik glikoprotein yapısındadır. Bu aileyi inhibinler, aktivinler, bone morfogenetik proteinler (BMP'ler), büyüme ve farklılaşma faktörleri (GDF'ler) ve müllerian inhibiting substance olarak da bilinen AMH oluşturur (79). Bu ailenin üyeleri gelişim, farklılaşma, bağışıklık, hücre proliferasyonu ve apoptozisin düzenlenmesinde önemli rol alır. Ayrıca embriyonik gelişim ve yetişkinlerde doku homeostazında doku organ rejenerasyonu ve bakımının düzenlenmesinde önemli görevler üstlenir (80–82).

AMH'nin en temel fonksiyonu mezenkimal hücrelerde apoptozu tetikleyerek embriyonik gelişim sürecinde müllerian kanalın gerilemesini sağlamasıdır (76). Ayrıca erkek gonadlarında Leydig hücreleri üzerinden testosteron sentezini azaltır (83). Dişi gonadlarda ise granüloza hücrelerinden salgılanır, overlerin FSH'ye duyarlılığını dolaylı olarak azaltır (84) ve primordiyal folikül otofajisini etkiler (85). AMH'nin müllerian kanalların erkek fetüslerde regresyonu, testislerde androjen sentez inhibisyonu ve dişi gonadlardaki etkisi dışında, GnRH nöronlarının erken embriyolojik dönemdeki göçü üzerinde, laktasyon döneminden sonra meme kanal epitelinin apoptozunda, hipofizde GnRH etkisinin güçlendirilmesinde, hipokampusta hafıza ve öğrenme sürecinde, motor nöronlarda koruyucu ve büyüme faktörü olarak, kemiklerde RANKL üzerinden osteoklastların farklılaşmasının inhibisyonunda rolleri olduğu bildirilmiş ve Şekil 13'te gösterilmiştir (86).



Şekil 13: AMH'nin biyolojik fonksiyonları (86).

### 2.6.3. AMH Genetiği ve Transkripsiyonel Düzenlenmesi

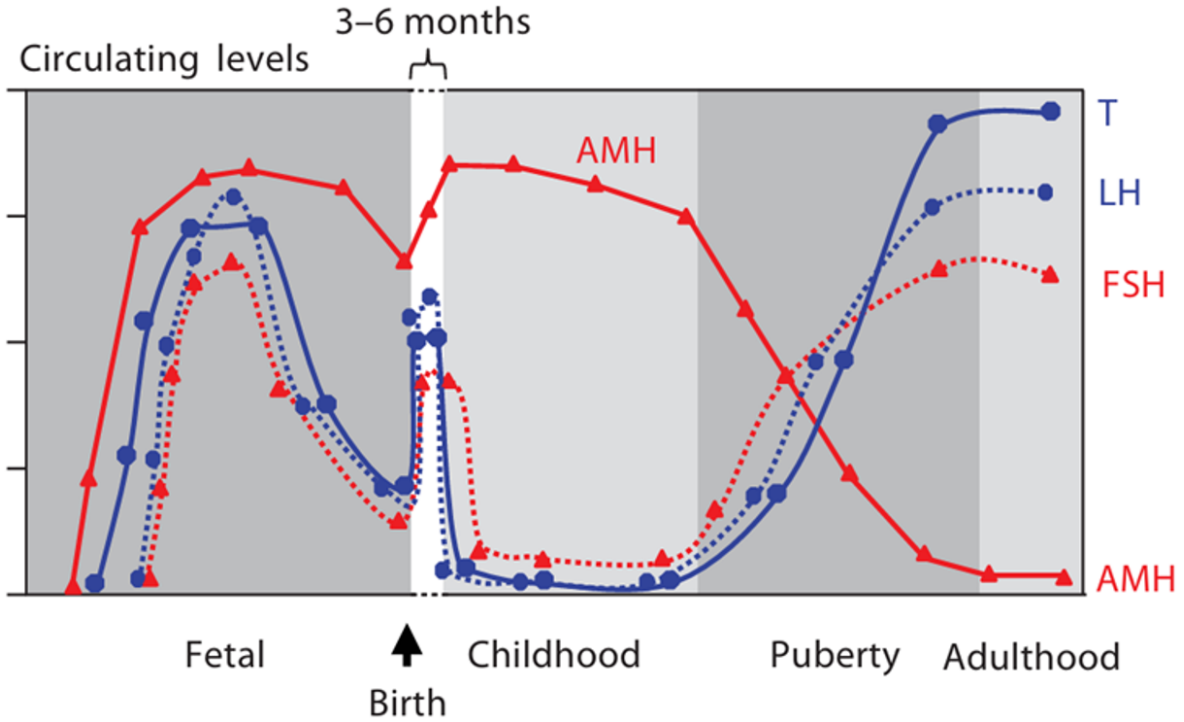
İnsan AMH geni 19. Kromozomun kısa kolunun 13.3 bölgesinde bulunur ve 2,8 kilobaz çifti uzunluğunda 5 eksondan oluşmaktadır. AMH'nin biyoaktif C-terminal bölgesi 5. eksonun 3' ucunda kodlanır (87)

AMH'nin temel olarak transkripsiyon başlangıç bölgesi (promotör bölge) ATG kodununun 10 baz çifti yukarısında bulunur. Sertoli ve granüloza hücrelerinde aktif olan

bölgedir. SF3A2 (eski adı: SAP62) ve GNRPX adlı iki gen AMH promotör bölgesinde sürekli ifade edilen genlerdir ve bu iki gen çift yönlü promotör görevindedir ve transkripsiyonun düzenlenmesinde görev alır (88). Transkripsiyonu düzenleyen faktörler promotör bölgenin ilk 420 baz çiftinde yoğunlaşmıştır (87).

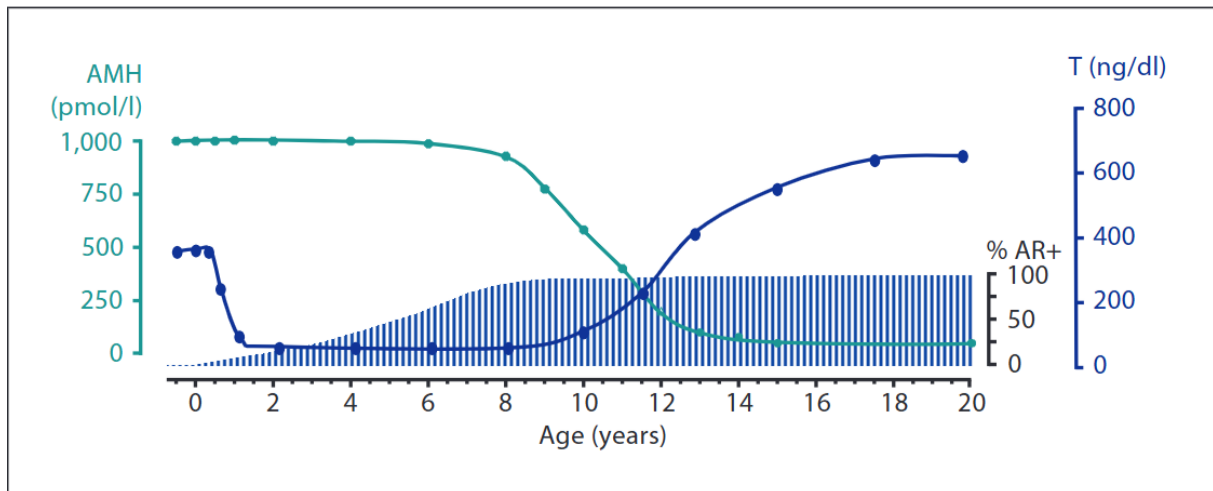
Fetal hayatın başlarında majör etkili transkripsiyon faktörleri steroidojenik faktör 1 (SF-1) (89), SOX9 (90), GATA4 (91–94), AP1 (95) ve WT1(96)'dir ve AMH geni üzerindeki promotör bölgenin proksimal kısmındaki cevap elementlerine bağlanırlar ve AMH transkripsiyonunu düzenlerler (87).

İlerleyen fetal yaşam ve doğumdan sonra AMH transkripsiyonu FSH kontrolü altına girer. FSH ile uyarılan hücrede siklik AMP (cAMP) yolu ile Protein Kinaz A aktive olur ve fosforilasyonla transkripsiyon faktörleri SOX9, SF-1, activating protein 2 (AP-2) ve nükleer faktör-kB (NF- $\kappa$ B) aktive edilir. AP-2 ve NF- $\kappa$ B için AMH geni distal promotör bölgede cevap elementleri bulunur ve transkripsiyon başlatılır (97). FSH'nin bu etkisi nedeniyle santral hipogonadotropik hipogonadizimli erkek çocuklarda AMH düşüklüğü görülür (98). Erkeklerin gelişim sürecindeki gonadotropin, testosteron (T) ve AMH seviyelerinin seyri Şekil 14'te gösterilmektedir (92).



Şekil 14: Erkeklerde dolaşımdaki gonadotropin, testosteron (T) ve AMH seviyelerinin gelişim sürecinin şematik gösterimi (92).

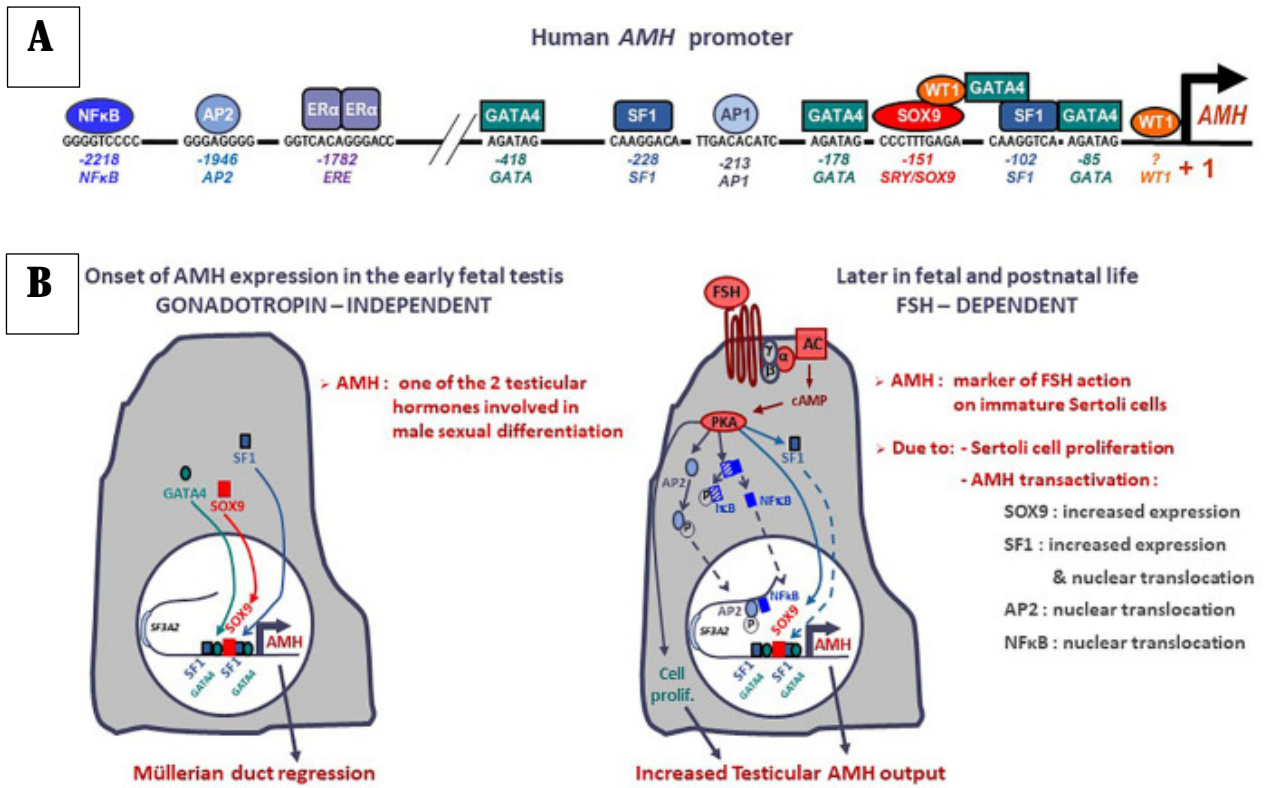
Erkeklerde androjenler FSH'yi antagonize ederek sertoli hücrelerinde AMH sentezinin düşüşüne neden olur. AMH promotöründe androjenler için direkt cevap elementleri bulunmaz. Androjenler FSH'yi baskılayarak ve androjen reseptörünün SF-1 üzerinden transkripsiyonu engellemesiyle AMH sentezini baskılar (99). Sertoli hücreleri olgunlaştıkça androjen reseptör sentezler ve buna bağlı olarak ergenlik ve yetişkinlik döneminde AMH seviyelerinde belirgin düşüşler görülür. AMH, Testosteron (T) ve Androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişki ve yaş ile olan bağlantı Şekil 15'te gösterilmektedir (92).



Şekil 15: AMH, Testosteron (T) ve Androjen reseptörü (AR) arasındaki ilişki ve yaş ile olan bağlantı (92).

Ayrıca AMH promotör bölgesinde östrojen cevap elementi bulunmaktadır, östrojenin AMH transkripsiyonunu attırdığı belirlenmiştir (100) ancak tam olarak önemi henüz anlaşılamamıştır (87).

AMH'nin transkripsiyonel düzenlenmesi görsel olarak Şekil 16'da gösterilmektedir. AMH promotör geni ve transkripsiyon faktörleri Şekil 16 A 'da; sertoli hücresinde AMH'nin FSH'den bağımsız AMH transkripsiyon düzenlenmesi, FSH bağımlı ve Protein Kinaz A üzerinden etki gösteren AMH transkripsiyon faktörleri Şekil 16 B'de görselleştirilmiştir (91,92).



Şekil 16: A) Görselde AMH promotör geni ve transkripsiyon faktörleri B) Sertoli hücresinde AMH'nin FSH bağımsız, FSH bağımlı ve Protein Kinaz A üzerinden etki gösteren AMH transkripsiyon faktörleri (91,92).

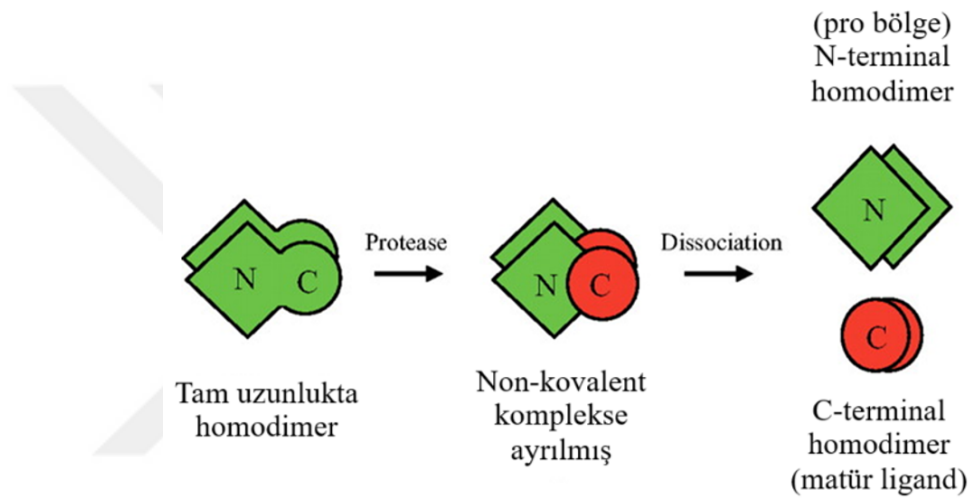
#### 2.6.4. AMH'nin Moleküler Yapısı

AMH, TGF-β süper aile üyelerinin sentezine benzer şekilde, pre-pro-hormon olarak sentezlenir. Homodimerik iki özdeş 70 kDa'lık glikoprotein yapıda subüniteden ve her subünite 560 aminoasitten oluşur (9). Dimerik öncül N-terminal pro-alan ve C-terminal olgun alandan oluşur. N-terminal prodomain, C-terminal olgun alanın katlanmasına ve

dimerizasyona aracı olur. C-terminal olgun alan ise asıl aktiviteden sorumlu olacak alandır (101).

Preprohormon yapısındaki AMH hücre içi endoproteazlarla proteolize uğrar (102). Proteoliz sonucu N-terminal pro bölge ve C-terminal olgun alan arasında non kovalent bağlı bir pro-hormon (103) yapı oluşur ve hücre dışına sekrete edilir (Şekil 17).

AMH çoğunlukla proteoliz ile biyoaktif hale gelir (102,104). Dimerik yapı korunarak, C terminal kalıntı (25 kDa) biyoaktif kısmı oluşturur, N terminal fragman (110 kDa) da aktivasyona katkıda bulunur (101).



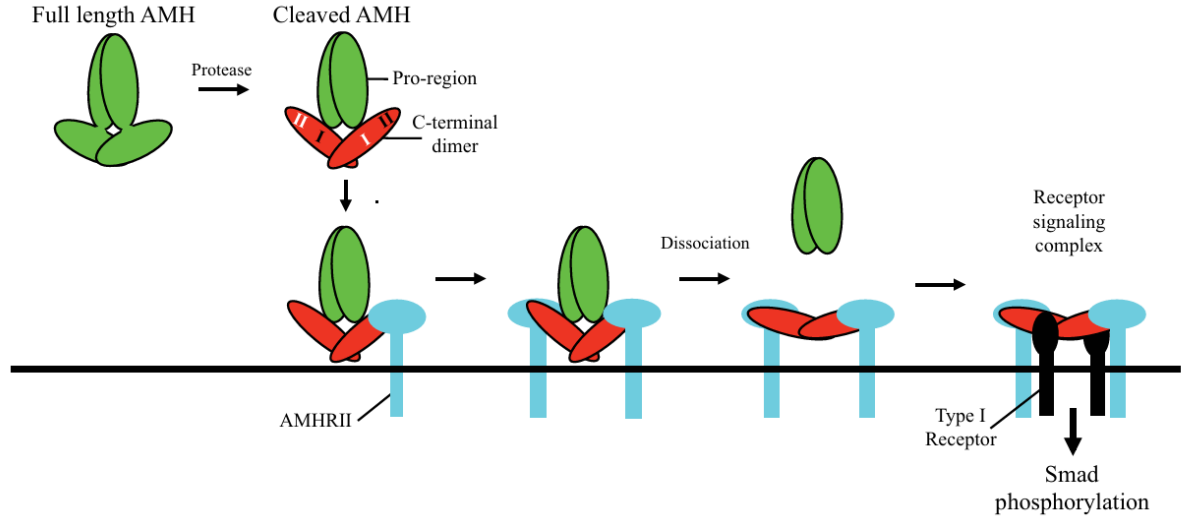
Şekil 17: Homodimerik yapıdaki AMH ligandının işlenmesi gösterilmektedir.(103)

### 2.6.5. AMH'nin Reseptörleri ve Sinyal İletimi

AMH reseptörleri TGF- $\beta$  süper ailesi reseptörleri gibi transmembran yapıdadır ve intraselüler kısmı serin treonin kinaz aktivitesi gösterir. Tip I ve tip II olmak üzere iki tip reseptörden oluşmaktadır (105). AMH, BMP'ler tarafından da kullanılan Tip I reseptörler aktivin reseptör benzeri kinaz 2 (ALK2), ALK3 ve ALK6 aracılığıyla sinyal oluşturur. AMH'ye özgü tip II reseptör ise AMHRII olarak adlandırılır (87).

AMH reseptörü sinyal iletimi Şekil 18'de gösterilmiştir. Proteoliz yoluyla aktive olan non kovalent dimerik yapıdaki AMH matür C-terminal bölgesiyle AMHRII'ye bağlanır. Bu bağlanma ile C-terminal alanda konformasyonel değişiklikler olur. AMH N-terminal Pro-bölge ligand-reseptör kompleksinden ayrılır, Tip 1 reseptörün de bağlanmasıyla reseptör sinyal kompleksi oluşur ve sinyal iletimi başlar (103).

Ligandlar reseptörlerin ekstrasellüler alanlarına bağlanır ve ligand reseptör kompleksi (AMH -AMHRII-ALK) oluşturularak sinyal iletimi başlar (Şekil 18). Önce, AMHRII reseptörün kinaz aktivitesiyle Tip I reseptörün fosforilasyonu sağlanır, sonra fosforile Tip I reseptör ile Smad ailesinden öncelikle Smad 1, 5 ve 8 proteinleri yardımcı olarak Smad 4 proteini fosforile edilir. Fosforile Smad proteinleri nükleusta gen transkripsiyonunu regüle eder (106).



Şekil 18: AMH reseptörü sinyal iletimi (103).

### 2.6.6. AMH ve AMHRII Eksprese Edebilen Dokular

AMH birden çok çeşitli dokuda eksprese edilen büyüme faktörü işlevinde bir hormondur. AMH temel olarak erkeklerde testislerin somatik hücre grubundan sertoli hücrelerinde üretilir, kadınlarda ise overlerin preantral foliküllerin granüloza hücrelerinde sentezlenir. Reprodüktif dönemdeki kadınlarda endometriyumda AMH ekspresyonu gösterilmiştir (107).

Üreme sistemi dışında da AMH ekspresyonu, yapılan çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir. Motor nöronlar (108), fetal GnRH nöronları (109), hipokampus (110) santral sinir sisteminde AMH ekspresyonu tespit edilen nöronal dokulardır. Seks kord stromal tümörler (111,112), granüloza hücreli tümörler (113) gibi malign hücrelerde de AMH ekspresyonu gösterilmiştir.

AMHRII üreten hücreler AMH sinyal iletimini gerçekleştirerek AMH uyarısına yanıt oluşturabilirler. AMHRII yaygın olarak müllerian kanallarda olmak üzere preantral foliküller, hipofiz bezi (114), hipotalamus (115) dokularında ve memede laktiferöz kanallarda

(116) eksprese edilir. Bunlar dışında leydig hücreleri (117) ve prostat dokusu (118) üreme sisteminde AMHRII ekspresyonu görülen dokulardır. Ayrıca yapılan bir çalışmada sperm hücrelerinde immunositokimya yöntemi ile kuyruk kısmında AMHRII ekspresyonu gösterilmiştir (114). Sinir sisteminde motor nöronlar (108) ve hipokampüsta (110) da AMHRII ekspresyonu gösterilmiştir.

Bu dokular dışında çeşitli kanser hücrelerinde de AMHRII ekspresyonu raporlanmıştır: endometriyum (119), over (120), prostat (118), meme (116) ve serviks kanseri (121) örnek gösterilebilir. Ayrıca küçük hücreli olmayan akciğer kanserinde (122) ve bazı solid tümörlerde de (123) AMHRII ekspresyonu doğrulanmıştır.

## **2.6.7. AMH'nin Klinik Kullanımı**

### **2.6.7.1. Fertilite**

Yetişkin erkeklerde germ gücre sayıları perinatal dönemdeki sertoli hücre sayısı ile yakından ilişkilidir (124,125). Ayrıca erkekler yaşlandıkça sertoli hücre fonksiyonu leydig hücrelerinden daha erken azalmaya başlamaktadır (126).

AMH'nin embriyonik dönemde cinsiyet gelişimindeki rolü, immatür sertoli hücrelerinin biyobelirteci kabul edilmesi ve yaşa bağlı azalma göstermesi, ayrıca subfertil erkeklerde yapılan bir çalışmada serum AMH düzeyinin kontrol grubuna göre daha düşük bulunması (127), AMH'nin erkek fertilitesinde rol oynayabileceğini düşündürmektedir (128). AMH düzeyleri erkeklerde infertiliteye yol açan bazı klinik durumlarda etiyolojii araştırırken yol gösterici olabilir (Tablo II).

**Tablo II: AMH'nin fertilité ile ilişkili bazı klinik durumlardaki düzeyi (82)**

Klinik Durum	AMH seviyesi
<b>Pubertal gecikme</b>	Ergenlikte normal prepubertal seviye
<b>Ağır konjenital hipogonadotropik hipogonadizm</b>	Ergenlik döneminde azalma
<b>Klinefelter sendromu (47, XXY)</b>	Ergenliğe kadar referans aralıktadır; ergenlikle ilişkili düşüşte gecikme, daha sonra yetişkinlerde normal altı konsantrasyonlara düşmüştür
<b>McCune-Albright sendromu</b>	Erkek çocuklarda artmış AMH seviyesi
<b>Varikosel</b>	Prepubertal ve pubertal erkek çocuklarda erken başlangıçlı varikoselde yükselmiş ve şiddetli varikoseli olan yetişkinlerde azalmıştır
<b>Non-Obstrüktif Azospermi</b>	Azalmış AMH seviyesi
<b>Erkek yaşlanması</b>	Yaşa bağlı azalma

#### **2.6.7.1.1. Non Obstrüktif Azoospermi**

Erkek infertilitesinin en ciddi formu olarak bilinen non obstrüktif azospermide bozulmuş spermatogenez sonucu semende hiç sperm bulunmamasıdır (129). İnfertilite tedavisi için mikrodiseksiyon testiküler sperm ekstraksiyonu (MD-TESE) ile sınırlı bir başarı elde edilebilmektedir (130). Bu işlemin invazif olması ve tedavideki düşük başarı oranı nedeniyle AMH ve AMH/total testosteron oranının invazif işlem olmadan MD-TESE işlem başarısını öngörebileceği non obstrüktif azospermili hastalarda yapılan bir çalışmada gösterilmiştir ancak daha geniş popülasyonlu çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır (131).

#### **2.6.7.1.2. Klinefelter Sendromu**

Klinefelter sendromu, erkeklerde hipergonadotropik hipogonadizmle seyreden non obstrüktif azospermiye sebep olan cinsiyet kromozom anomalisidir (82). Çoğunlukla 47XXY karyotipi görülür (132). Fenotip olarak uzun boy, küçük testisler, jinekoid görünüm gibi androjen eksikliğine ait semptomlarla (133) kendini gösterse de tanı daha çok erişkin dönemde infertilite sebebiyle konur (134,135). AMH düzeyleri ise çocukluk döneminde referans aralıktadır, ergenlikte muhtemelen geçici sertoli hücre kompensasyonu nedeniyle AMH seviyelerinin düşüşünde gecikme görülür. Testiküler fonksiyon bozuldukça yetişkinlikte düşük düzeylerde seyreder (136).

#### **2.6.7.1.3. Kallman Sendromu**

Kallman sendromu, hipotalamo-hipofizer bölgede GnRH nöronal göçünün başarısız olması sebebiyle GnRH eksikliği ve buna bağlı konjenital hipogonadotropik hipogonadizm görülen non obstrüktif azospermi sebeplerinden biridir. Çoğunlukla hiposmi veya anosmi ile birlikte görülür. Hipogonadotropik hipogonadizm tanısında edinsel ve konjenital ayrımını yapmak gerekir. Yapılan çalışmalar AMH düzeyinin Kallman sendromunda azalacağını göstermiştir ancak ileri çalışmalarla tanı aralıklarının netleştirilmesi gerekmektedir (137,138).

#### **2.6.7.1.4. Persistan Müllerian Kanal Sendromu**

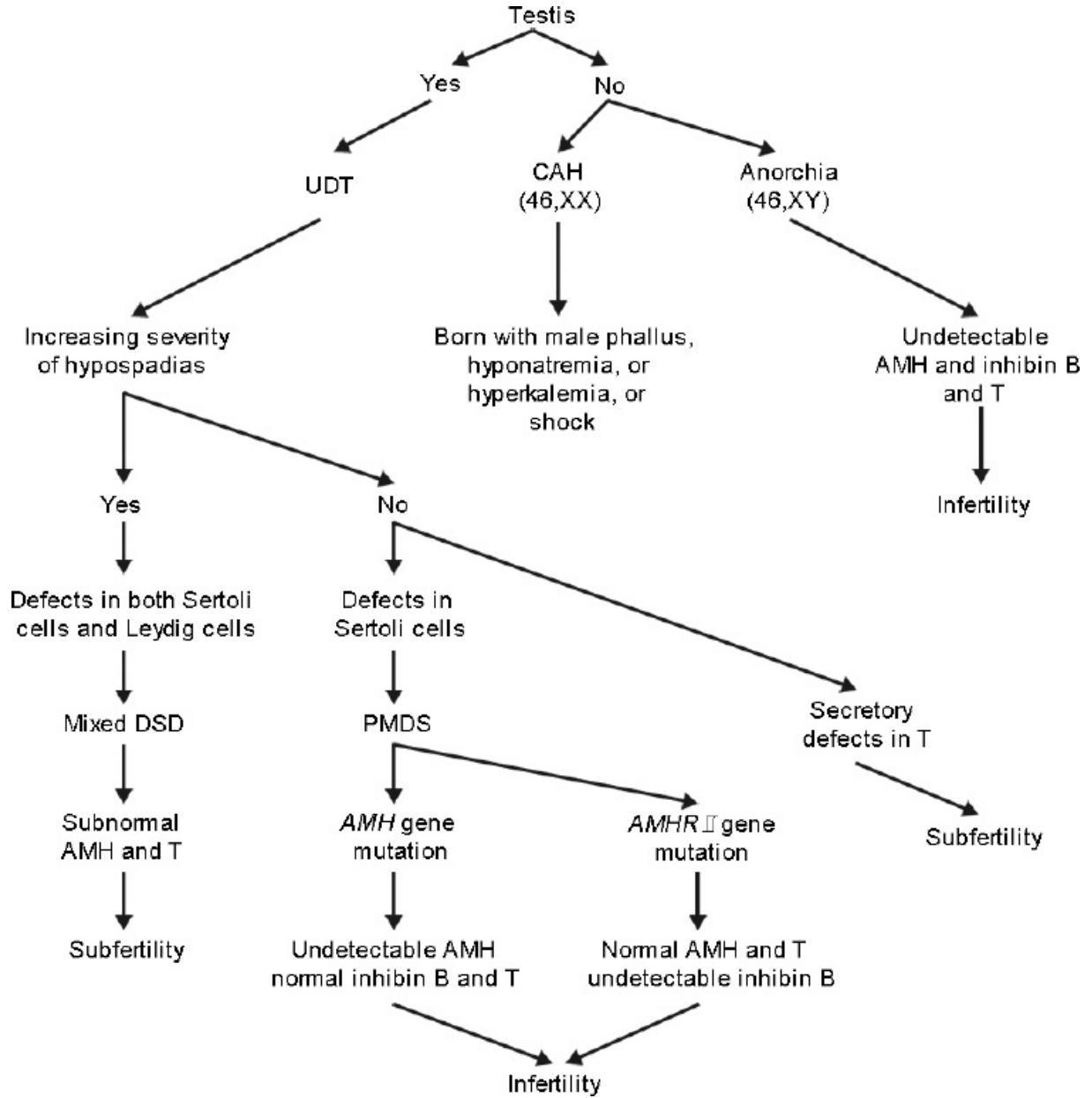
Persistan Müllerian Kanal Sendromu (PMDS), DSD içerisinde AMH yetersizliği nedeniyle gerçekleşen klinikdir. DSD'ler daha çok testosteron ile ilgili işlevlerde görülen bozukluklarda ortaya çıkarken PMDS AMH sentezinde ya da AMH'nin etkisinde görülen defekt nedeniyle oluşur. Otozomal resesif bir bozukluktur, AMH'nin etkisini göstermemesi 46 XY erkek bireylerde müllerian kanalın kalıcı olmasına neden olur ve uterus, fallop tüpleri gelişir ve kalıcıdır. Bu nedenle de çoğunlukla bilateral inmemiş testis görülür. Bu bireylerin leydig hücre işlevinde bir bozukluk olmadığından dış genital organ gelişimi normaldir. AMH veya AMHRII genlerindeki mutasyonlar PMDS'nin altta yatan nedenleridir (132).

PMDS'de AMH ölçümleri değişkenlik göstermekle birlikte AMH gen mutasyonlarında çoğunlukla saptanamaz ya da çok düşüktür. AMHRII mutasyonlarında ise normal seviyelerde görülebilir. Bu durum moleküler veya genetik testler için yol gösterici olabilir (139,140).

#### 2.6.7.1.5. *Kriptorşidizm*

Kriptorşidizm ilerleyen dönemler için ciddi infertilite riski barındırır. Bu nedenle kriptorşidizm ayırıcı tanısında ölçülebilir AMH testis varlığını gösterirken ölçülemeyen değer psödohermafrodizm veya saf gonadal disgenezi olan kızlarda anorşi veya yumurtalıkların göstergesidir. Bu nedenle cerrahi işlemlerden önce testis dokusunun varlığını belirlemek için AMH ölçümü yapılmalıdır (141,142). Bunlarla birlikte kriptorşidizimli erkek çocuklarda AMH düzeyindeki düşüş, sertoli hücre hasarının göstergesi olabilir ve AMH'taki düşüşün miktarı erişkin dönem için infertilite riski ile ilgili bilgi verebilir (143,144).

AMH düzeyleri, DSD'nin ayırıcı tanısına katkıda bulunur. Şekil 19'daki algoritmada cinsiyet gelişim bozuklukları ayırıcı tanısında AMH'nin kullanımı gösterilmektedir.



Şekil 19: AMH'nin DSD ayırıcı tanısındaki rolü. UDT: inmemiş testis; CAH: konjenital adrenal hiperplazi; DSD: cinsiyet gelişim bozuklukları; PMDS: persistan Müllerman kanal sendromu; AMH: anti-Müllerman hormon; T: testosteron; AMHR: AMH reseptörü (82).

#### 2.6.7.1.6. Erkeklerde McCune Albright sendromu

Kemiklerde fibröz displazi, ciltte kafeola lekeleri ve gonadotropinlerden bağımsız puberte prekoks ile karakterize edilmiş hastalıktır (145). McCune Albright sendromunda puberte prekoks görülürken erkeklerde beklenen AMH düşüşü gözlenmez, aksine yükselir. McCune Albright sendromunda GNAS1 mutasyonu Gs proteinindeki işlev kazancına neden olur. Bu işlev artışıyla Gs ile aktive olan faktörlerin (SF1 ve SOX9) aktivasyonu ve FSH'ye bağlı

olarak Gs proteinin alfa subunitinin aktivasyonu ile aktive olan NFκB ve AP2 faktörlerinde daha fazla aktivasyon oluşur ve AMH seviyelerinde yükseklik görülür (146).

#### **2.6.1.7.7. Varikosel**

Skrotumda pampiniform pleksus adı verilen ven ağının anormal bir düzeyde genişleyerek kıvrılması varikosel olarak tanımlanır. Erkek infertilitesinin temel tedavi edilebilir en yaygın sebebidir. İlerleyen varikosel durumlarında testiste dolaşımı bozarak oksidatif stresi artırır. Bu durum spermatogenezi olumsuz etkiler, sperm kalitesi ve sayısı azalır ayrıca sertoli hücrelerinde fonksiyon kaybına neden olur (147–149).

Yapılan bir çalışmada varikosel hastalarının da olduğu subfertil yetişkin bireylerden oluşan grup ile kontrol grubu karşılaştırılmış, AMH ve inhibin B seviyelerinde anlamlı derecede düşüklük görülmüştür (150). Bu durum varikoselin sertoli hücre fonksiyonunda kayba neden olduğunu göstermektedir. Ancak prepubertal ve pubertal dönemdeki varikosel olgularında AMH konsantrasyonlarında artış görülmüştür, bu durumun seminifer epitel fonksiyonundaki erken dönem anormalliği gösterdiği ve sertoli hücrelerinde kompensatuvar bir etki oluşturması nedeniyle olduğu düşünülmektedir (151).

Varikosel ve AMH arasındaki ilişkinin daha iyi aydınlatılabilmesi için infertil erkeklerde nedene yönelik karşılaştırmalı çalışmalar yapılmalıdır. Varikosel tedavisi sonrası değerlendirmede AMH'nin istenen düzeye gelmesi testis fonksiyonunun normale geldiğini gösterebilir, yine de spermatogenezin düzeldiğini semen analiziyle doğrulamak gerekir (152).

#### **2.6.7.2. Kanser**

AMH etkisi altında müllerian kanalların apoptozis yoluyla regrese olması, AMHRII eksprese eden başka dokularda da araştırma yapmaya yol açmıştır. Hücre kültürü çalışmalarında anlamlı derecede apoptozis artışına ve hücre döngüsünde G1 fazında duraksamaya neden olduğu anlaşılmıştır (153). Yapılan çalışmalarda AMHRII'nin birçok kanserli dokuda eksprese edildiği gösterilmiştir (86).

AMHRII'nin hem sağlıklı prostat dokusunda hem de prostat kanserlerinde ekspresyonunun gösterilmesi prostat kanseri ile AMH arasındaki ilişkinin varlığını sorgulamaya sebep olmuştur (118).

AMH, 17 alfa hidroksilaz enziminin ekspresyonunu azaltarak androjen sentezini inhibe eder (83). Distal prostat kanal gelişiminin AMH'nin postnatal yaklaşık 15. Gündeki

düşüşünden sonraki androjen artışıyla birlikte oluşu AMH'nin prostat gelişiminde etkili olabileceğini düşündürmektedir (86).

Yapılan in vitro araştırmada, androjen duyarlı prostat adenokarsinomu hücrelerinde NFκB sinyal iletim yolunun biyoaktif AMH ile tedavi edilmesi sonucu hücreyi apoptoza yönlendirdiği gösterilmiştir (118).

Ayrıca bir kohort çalışmasında radikal prostatektomi operasyonu geçirmiş prostat kanserli hastalarda, serumda düşük AMH konsantrasyonu prostat kanserinin agresifliği ile ilişkilendirilmiş ve ileri çalışmalarla desteklenerek prostatektomili hastalarda AMH'nin yeni bir biyobelirteç olabileceği sonucuna varılmıştır (154).

### **2.6.8. AMH'nin Ölçüm Yöntemleri**

AMH yaygın olarak kadınlarda over rezervini tahmin etmek için, erkeklerde ise DSD'nin ve gonadal işlevin araştırılmasında kullanılmaktadır (155,156). Bu nedenle analiz yöntemlerini geliştirme çalışmalarıyla test performansı arttırılmaya çalışılmaktadır.

2000'li yılların başlarında serum AMH konsantrasyonu ölçümü ilk olarak manuel enzim linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri ile yapılmaktaydı. Diagnostic Systems Laboratory ve Immunotech'in sandwich ELISA testleri kullanılmaktaydı. Daha sonra Beckmann Coulter tarafından Gen II ELISA testi geliştirilmiş (157) ve bu test 2010 yılında en yaygın kullanılan test haline gelmiştir (158). Ancak manuel ELISA yöntemlerinde tekrarlanabilirliğin düşük olması (159) ve kompleman interferansı (160) test güvenilirliğinde soru işaretleri oluşturmaktaydı.

2013'te Ansh laboratories tarafından manuel ultrasensitive AMH ELISA kiti kullanıma girmiştir. Biyoteknolojik ilerlemelerle birlikte AMH ölçümü için tam otomatize yöntemler geliştirilerek test performansı iyileştirilmeye ve standardize edilmeye çalışılmıştır. 2014 yılında Roche Elecsys, 2016 yılında ise Beckman Coulter Access tam otomatize elektrokemilüminesans immunoassay (ECLIA) metoduyla çalışan AMH kitleri piyasaya sürülmüştür. Bu üç testin tekrarlanabilirlikleri daha yüksektir (161) ve Elecsys ve Access kitlerinin kompleman protein interferansına olan duyarlılığı düşüktür (162).

Bu testler dışında Floresan Lateral Akış Immunoassay ile test hızını arttırmak ve kolay sonuç almak için hasta başı kantitatif sonuç almayı sağlayacak yöntem çalışmaları (163)

ve elektrokemiluminesans immunosensör teknolojileriyle sensitiviteyi arttırmak için metot geliştirme çalışmaları (164) yapılmaktadır.

Dolaşımda AMH proAMH (öncül form) ve proteolitik reaksiyondan geçtikten sonra oluşan biyoaktiviteye sahip AMH<sub>NC</sub> (N terminal prodomain ve C terminal matür bölgeden oluşan non kovalent kompleks) olarak bulunur. Günümüzde de kullanılan Elecsys ve Access kitleri dolaşımdaki total AMH'yi ölçebilmektedir (156,158,165). Bu testlerde kullanılan antikörlerin dolaşımdaki bu iki forma olan afiniteleri farklılık gösterebileceği için test sonuçlarında farklılıklar oluşturabilir veya AMH'nin aktivitesini göstermeyebilir (156,166).

AMH testleri arasında yapılan karşılaştırma çalışmalarında standardizasyondaki eksiklikler nedeniyle sonuç karşılaştırmalarında aynı numunede farklı testlerde farklı sonuçlarla karşılaşılmaktadır (161). Bu klinik yorumu güçleştiren bir durumdur. Dünya Sağlık Örgütü rekombinant proAMH içeren referans reaktif geliştirerek bu problemi çözmeye çalışmaktadır (167).

#### **2.6.9. Erkeklerde AMH'nin Popülasyona Dayalı Referans Aralıkları**

AMH erkeklerde fetal 8. haftadan itibaren sertoli hücrelerden salgılanan, testiküler fonksiyonu değerlendirmede biyobelirteç kabul edilen glikoprotein yapılı bir hormondur. Erkeklerde yaşam boyunca AMH düzeyi belirgin değişim gösterir (14,114). Bu nedenle klinik değerlendirme yapılırken bireyin yaşına uygun referans aralıklarının dikkate alınması gerekir.

Yapılan çalışmada 18-37. gestasyonel haftalar arasındaki erkek fetüslerde, AMH seviyelerinde gebelik haftası ile geniş bireysel varyasyon olduğu görülmüştür, ancak bu durumun gestasyonel yaş ile ilişkisinin önemli ölçüde olmadığı anlaşılmıştır. Doğumda umbilikal kord kanında AMH düzeyi fetal düzeye benzer bulunmuştur (168). Postnatal ilk birkaç ayda, mini puberte dönemi olarak da adlandırılan dönemde, gonadotropinlerde görülen geçici artış AMH'nin yükselmesine sebep olur ve yapılan çalışmalar bu dönemde pik yaptığını bildirmektedir (14-16,168).

İnfantil dönemde görülen zirvenin sonrasında AMH düzeyleri prepuberte dönemi süresince yavaş bir azalma gösterir (14,16,168,169). Puberte döneminde ise sertoli hücre

olgunlaşması, sertoli hücrelerinde androjen reseptör sentezinin artması ve intratestiküler androjenin AMH'yi suprese etmesi ile AMH seviyelerinde belirgin düşüş gözlenir (14,169).

Puberte sonrası erişkin dönemde ise AMH oldukça düşük seviyelerde (infantil dönemdeki seviyenin %3-4'ü) ve yaş ile birlikte hafif bir azalma eğilimi ile seyrederek (14,114,170,171).

Referans değerlerde görülen çalışmalar arası farklılığın popülasyon ve test yöntemi farklılığından kaynaklanabileceğinin göz önünde bulundurulması gerekir (16).

1 gün ve 18 yaş aralığında bulunan Elecsys AMH tam otomatize elektrokemilüminesans (ECLIA) yöntemiyle sağlıklı 484 erkek çocukta yapılan referans aralık çalışmasından elde edilen bazı veriler Tablo III'te gösterilmektedir (16).

**Tablo III: Pediatrik popülasyondan ECLIA metoduyla elde edilen referans aralıklar**

<b>Yaş Aralığı</b>	<b>Kişi sayısı</b>	<b>2.5. Persentil (ng/mL) (%90 CI)</b>	<b>Medyan (ng/mL)</b>	<b>97.5. Persentil (ng/mL) (%90 CI)</b>
<b>0-2 gün</b>	42	10.9354 (8.2446-15.2516)	36.232	84.9044 (57.3314-97.9804)
<b>3-7 gün</b>	44	22.344 (8.1102-27.9734)	77.602	166.068 (137.5766-209.4692)
<b>8-10 gün</b>	15	31.5728 (0-46.2448)	98.42	194.8394 (155.8704-274.7192)
<b>11-20 gün</b>	43	22.638 (8.3132-28.4382)	75.18	183.4644 (159.4418-229.7834)
<b>21-28 gün</b>	25	34.2972 (19.9192-50.34)	79.38	154.3318 (108.8402-179.819)
<b>29-364 gün</b>	66	32.9728 (21.721-45.2452)	77.168	157.6204 (98.931-190.2304)
<b>1-4.9 yaş</b>	60	43.498 (34.5184-59.2158)	97.038	199.5406 (152.5762-220.9126)
<b>5-7.9 yaş</b>	39	33.3662 (26.2164-42.2576)	71.61	155.1648 (121.6-181.5072)

<b>8-11.9 yaş</b>	60	13.5212 (0-14.0196)	59.682	158.4016 (146.3434-209.6)
<b>12-14.9 yaş</b>	39	1.3202 (0-2.1672)	10.031	46.452 (20.272-65.079)
<b>15-18.9 yaş</b>	51	2.3464 (1.0962-3.0842)	8.148	18.2056 (13.3546-21.4452)

Puperte sonrası yetişkin erkeklerde yapılan çalışmalarda bildirilen popülasyona dayalı referans aralık değerleri Tablo IV'te gösterilmektedir (14,114).

**Tablo IV: Yetişkin erkek bireylerde iki farklı yöntemle gerçekleştirilen çalışmalar sonucunda elde edilen Anti-Müllerian Hormon (AMH) referans aralıkları**

<b>Yetişkin Yaş Grubu</b>	<b>Akslaede et al., 2010 (Immuno tech, Beckman Coulter Ltd., Marseilles, France) Medyan (%5-95)</b>	<b>Benderradji et al., 2022 (Beckman Coulter Access ECLIA) Medyan (%2,5-97,5)</b>
20-39 yaş	42 (13 – 98) pmol/L	43.8 (18,1– 90,9) pmol/L
>39 yaş	42 (13 – 98) pmol/L	38.3(12.3– 87,6) pmol/L

Çevirme faktörü: pmol/L×0.14=ng/mL

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı'nda 11 Kasım 2024 – 17 Mart 2025 tarihleri arasında gerçekleştirildi. Erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyon verilerinin değerlendirilmesi başlıklı çalışmamız Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 05.03.2025 Tarih ve 2025-GOKAEK-255\_2025.03.05\_172 numaralı karar ile onaylandı. Tüm katılımcılar tüm çalışma süreci hakkında bilgilendirildi ve bilgilendirilmiş onam alınarak çalışmaya dahil edildi.

Çalışmamızın modeli EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu tarafından yayınlanan ve BIVAC'ı da içine alan Biyolojik Varyasyon Verileri Çalışmalarını Raporlama Standardı (STARBIV) rehberliğinde düzenlendi (42,45).

#### 3.1. Çalışmanın Gücünün Değerlendirilmesi ve Çalışma Grubunun Seçimi

Araştırmamızda çalışmanın gücü için katılan birey sayısı, her bireyden alınan numune sayısı, her numune için yapılan tekrarlı ölçüm sayısı ve  $CV_A/CV_I$  oranı değerlendirilerek  $CV_A/CV_I$  oranının 1'den düşük olması ve gücün 1.00 olması amaçlandı (172).

Çalışma grubumuza 20-39 yaş arası sağlıklı 24 erkek birey dahil edildi. Gönüllü katılımcılarımız hastane çalışanlarından oluşturuldu. Tüm katılımcıların sağlık durumları EFLM BV Çalışma Grubu'nun belirlediği kriterlere uygun olarak kontrol edildi (7). Çalışma ilerlerken gönüllülerin vazgeçmesi veya dışlama kriterleri çerçevesinde çalışma boyunca 3 kişi çalışmadan çıkarıldı ve çalışmamız 21 erkekte oluşan sağlıklı gönüllü katılımcı ile tamamlandı.

Gönüllülerimizi çalışmaya dahil edilmeden önce her bireye genel sağlık durumu ve yaşam biçimini sorgulayan sorular (Ek 1 ve Ek 2) yöneltildi ve bireylere bilgilendirilmiş onam imzalatıldı.

Her katılımcıdan genel sağlık durumunu değerlendirmek için kan alınarak ilk vizitte tam kan sayımı, ALT, GGT, CK, CRP, glukoz, kreatinin, total kolesterol, trigliserit, FSH, LH, total testosteron ve serum indeksi testleri çalışıldı. Test sonuçları uygun çıkan gönüllülerden üç hafta daha kan örnekleri toplandı. Bu örneklerde ise ALT, GGT, CK, CRP,

kreatinin, trigliserit, serum indeksi testleri çalışıldı. Dört hafta boyunca test sonuçları ve sağlık durumu iyi olan bireyler çalışmaya dahil edildi.

### **3.1.1. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmaya Dahil Olma Ölçütleri**

- a) Sağlıklı gönüllü olmak
- b) Bilgilendirilmiş onam formunu kabul edip imzalamış olmak
- c) 20-40 yaş arası erkek birey olmak
- d) Kişinin kendisini psikolojik ve/veya fiziksel olarak iyi hissetmesi
- e) İlaç kullanmamak
- f) Sigara ve alkol kullanmamak.
- g) Vücut kütle indeksi (VKİ)  $<30 \text{ kg/m}^2$  olmak.

### **3.1.2. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmadan Dışlama Ölçütleri**

- a) 20-40 yaş arası olmayan bireyler
- b) Kadın bireyler
- c) Kronik ilaç kullanımı olanlar
- d) Yakın zamanda ameliyat ya da travma geçirenler
- e) Bilinen diyabet hastası olmak ve reçeteli diyabet ilacı kullanmak veya açlık serum glukozu  $> 126 \text{ mg/dL}$
- f) Kronik karaciğer veya böbrek hastalığı öyküsü ( $\gamma$ -glutamil transferaz [ $\gamma$ GT] $> 150 \text{ U/L}$ ; tahmini glomerüler filtrasyon hızı [eGFR]  $<60 \text{ mL/dakika/1.73 m}^2$ , CKD-EPI formülü kullanılarak)
- g) Dislipidemi (total kolesterol  $> 251 \text{ mg/dL}$ )
- h) Talasemi sendromu ve diğer hemoglobinopati aile öyküsü
- i) Ciddi bir kronik hastalığı (kanser, kardiyovasküler veya nörolojik) veya akut hastalığı CRP yüksekliği) olmak
- j) Hepatit B virüsü (HBV), Hepatit C virüsü (HCV) veya HIV taşıyıcılığı öyküsü

k) Son 4 hafta içinde hastanede yatmış veya ciddi şekilde hasta olmuş olma durumu

l) Son 3 ay içinde kan bağışı yapmış olma durumu

m) Araştırmanın risk oluşturabileceği veya sonuçlarını etkileyebileceği başka önemli hastalık veya rahatsızlık.

### **3.1.3. Çalışma Grubundaki Gönüllülerin Araştırmadan Çıkarılma Ölçütleri:**

1. Katılımcılar, istedikleri zaman çalışmadan ayrılma hakkına sahiptir.
2. Araştırmacı, aşağıdaki durumlarda katılımcının çalışmaya katılımını sonlandırabilir.
3. Herhangi bir klinik olumsuz olay meydana geldiğinde
4. Laboratuvar sonuçlarında anormallik ortaya çıktığında
5. Başka bir tıbbi durum veya sağlıkla ilgili sorun gerçekleştiğinde ve çalışmaya devam etmenin katılımcının yararına olmayacağı düşünüldüğünde
6. Gönüllünün çalışmaya katılımını engelleyecek yeni gelişmiş veya sonradan fark edilmiş dışlama ölçütlerini karşılaması durumunda

### **3.2. Örneklerin Toplanması**

Katılımcılardan birer hafta arayla toplamda 4 kez venöz kan örneği alındı. Örnekler, preanalitik varyasyonu minimuma indirmek için aynı flebotomist tarafından sabah 08.00-10.00 arasında 10-12 saatlik açlık sağlanarak ve katılımcıların 30 dk istirahati sonrasında alındı. Kan örnekleri antekübital bölgeden alındı ve turnike süresinin 60 saniyeyi geçmemesine dikkat edildi.

İlk hafta kan örnekleri EDTA'lı ve pıhtı aktivatörü içeren sarı kapaklı jelli tüpe, diğer haftalardaki kan örnekleri sadece pıhtı aktivatörü içeren sarı kapaklı jelli tüpe alındı (BD vacutainer; SST<sup>TM</sup>II Advance; LOT:5007687) (VacuSEL; K<sub>3</sub>EDTA; LOT: 1784).

Katılımcılara bir gün öncesinden kan verecekleri ve en az 10 saatlik açlığı sağlamaları gerektiği hatırlatıldı. Her hafta örneklerin alınımından önce açlık süresi, son bir haftalık süreçte hastalık geçirip geçirmediği, ağır egzersiz yapıp yapmadığı, diyet değişikliği, sigara/alkol kullanma durumu, ilaç/takviye edici gıda alımını sorgulayan form dolduruldu.

### **3.3. Örneklerin Hazırlanması ve Saklanması**

Örnekler pıhtı aktivatörlü jelli tüplere alındıktan sonra 3-5 kez yavaşça alt üst edildi ve 30 dk bekletildi. Pıhtılaşma gerçekleşikten sonra 1500xg'de 10 dk santrifüj edildi. Elde edilen serumun bir kısmı ile rutin biyokimya ve hormon testleri çalışıldı. AMH analizi için yeterli miktarda serum ependorfa ayrıldı ve çalışma zamanına kadar -80 °C' de muhafaza edildi.

### **3.4. Örneklerin Analizi**

Tüm analizler Yozgat Bozok Üniversitesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda otoanalizörlerde gerçekleştirildi.

Hemogram örnekleri ilk vizitte venöz kan örneği alınırken EDTA'lı tüpe alındı ve en geç 1 saat içerisinde SYSMEX XN-1000 analizöründe çalışıldı.

Biyokimya (ALT, GGT, CK, CRP, glukoz, kreatinin, total kolesterol, trigliserit) ve hormon testleri (FSH, LH, total testosteron) venöz kan örnekleri alındıktan sonra aynı gün içinde Roche Cobas 6000 (Roche Diagnostic, Mannheim, Germany) otoanalizöründe çalışıldı.

AMH analizi aynı gün ve tek çalışma şeklinde planlandı. 21 erkekten 4 hafta boyunca alınan dondurulmuş toplam 84 örneğin önce oda sıcaklığında çözünmesi beklendi, çözünen örnekler vortekslenerek analiz öncesi hazırlığı yapıldı.

Roche Cobas 6000 e601 immünoassay analizörü, kalibrasyon ve kontrol verilerek analize hazırlandı. Analitik varyasyonu minimize etmek için aynı kullanıcıyla tek cihazda aynı gün, aynı reaktif ve sarf malzeme, aynı kalibratör aynı iç kalite kontrol kullanıldı. Analiz için ön hazırlık yapılan her bir örneğin analizi 1 saat içerisinde gerçekleştirildi. Her numune için çift analiz yapıldı.

### **3.5. Çalışılan Testlerin Ölçüm Prensipleri**

#### **3.5.1. Tam Kan Sayımı**

Tam kan sayımı parametreleri Sysmex XN 1000 analizöründe ölçüldü.

Eritrosit (RBC) sayımı, ortalama eritrosit hacmi (MCV) ölçümü ve platelet (PLT) sayımı impedans yöntemiyle yapıldı,

Lökosit (WBC) sayımı optik lazer saçılım yöntemiyle yapıldı.

Hemoglobin (Hb) konsantrasyonu ölçümü, Sodyum-lauril-sülfat yöntemi kullanılarak ve fotometrik metod ile yapıldı.

Hematokrit ise  $HCT = MCV \text{ (fL)} \times \text{Eritrosit sayısı (Milyon/}\mu\text{L)} / 10$  formülü hesaplandı.

### **3.5.2. ALT**

ALT, L-alanin ile 2-oksooglutarat arasındaki reaksiyonu katalize eder. Bu reaksiyon sonucu oluşan pirüvat, NADH tarafından laktat dehidrojenazın (LDH) katalize etmesiyle indirgenir ve ürün olarak L-laktat ve  $NAD^+$  oluşur. ALT'nin katalitik aktivitesi NADH yükseltgenmesinin hızı ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik yöntemle 700/340nm'de absorbanstaki azalmanın ölçülmesiyle ALT aktivitesi belirlenir.

### **3.5.3. GGT ( $\gamma$ -glutamilttransferaz)**

GGT, kolorimetrik enzim testi metoduyla çalışılır. GGT, L- $\gamma$ -glutamil-3-karboksi-4-nitroanilidin- $\gamma$ -glutamil grubunu glisilglisine transfer ederek ve 5-amino-2-nitrobenzoat açığa çıkartır. Numunedeki GGT aktivitesi serbest kalan 5-amino-2-nitrobenzoat miktarı ile orantılıdır. Spektrofotometrik olarak 700/415nm'deki absorbans artışı ölçülerek GGT aktivitesi belirlenir.

### **3.5.4. CK (Kreatin Kinaz)**

CK testi, enzimatik bir yöntemdir ve UV prensibiyle çalışır. CK enzimi, Kreatin Fosfat ve ADP'nin Kreatin ve ATP'ye dönüşmesini katalize eder. ATP'den ise gerçekleşen ara reaksiyonlarla NADPH üretilir. NADPH oluşumu spektrofotometrik olarak 546/340 nm'de ölçülerek CK aktivitesi belirlenir.

### **3.5.5. CRP (C- Reaktif Protein)**

CRP, Partikül yüzeyi genişletilmiş immünotürbidimetrik test metodu ile çalışılır. İnsan kaynaklı CRP, monoklonal anti-CRP antikorları ile kaplı lateks partikülleri ile aglütinasyon gösterir ve agregat oluşturur. Oluşan agregatlar 800/570nm'de türbidimetrik olarak belirlenir.

### **3.5.6. Kreatinin**

Kreatinin test prensibi kinetik kolorimetrik test Jaffe yöntemine dayanır. Alkalın solüsyonunda kreatinin pikrat ile sarı-turuncu renkte bir kompleks oluşturur. Boya

oluşumunun oranı örnek içindeki kreatinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Oluşan renk spektrofotometrik olarak 570/505nm’de ölçülerek kreatinin konsantrasyonu belirlenir.

### **3.5.7. Total Kolesterol**

Total Kolesterol testi enzimatik ve kolorimetrik yöntem prensibiyle çalışır. Kolesterol esterleri kolesterol esterazın etkisiyle bölünür ve serbest kolesterol ile yağ asitleri ortaya çıkar. Kolesterol oksidaz daha sonra kolesterolün kolest-4-en-3-on ve hidrojen peroksida ( $H_2O_2$ ) yükseltgenmesinde katalizör olarak işlev görür. Peroksidaz bulunan ortamda, oluşan hidrojen peroksit fenol ve 4-aminofenazonun oksidatif bağlanmasını etkileyerek kırmızı bir kuinon-imin boya oluşturur. Oluşan boyanın renk yoğunluğu kolesterol konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. 700/505nm’de absorbanstaki artış ölçülerek total kolesterol konsantrasyonu belirlenir.

### **3.5.8. Glukoz**

Glukoz, Hekzokinaz ile birlikte enzimatik referans yöntemi prensibiyle çalışılır.

Hekzokinaz glikozun glikoz-6-fosfata ATP ile fosforilasyonunu katalize eder. Glikoz-6-fosfat NADP bulunan ortamda Glikoz-6-fosfat dehidrojenaz ile yükseltgenir, reaksiyon sonucunda glukonat-6-fosfat ve NADPH oluşur ve başka karbonhidrat yükseltgenmez. Glikoz konsantrasyonu, NADPH’nin oluşum oranı ile doğru orantılıdır. NADPH’deki artış 700/340nm’de spektrofotometrik olarak ölçülerek glukoz konsantrasyonu belirlenir.

### **3.5.9. Trigliserit**

Trigliserit testi kolorimetrik enzim metoduyla çalışılır. Trigliseritler lipoprotein lipaz enzimi ile gliserol ve yağ asitlerine ayrılır. Ardından gliserolden gliserokinaz enziminin katalizörlüğünde gliserol-3-fosfat oluşur. Bu ürün, gliserol fosfat oksidaz enzimi tarafından dihidroksiasetonfosfat ve hidrojen peroksit ( $H_2O_2$ ) dönüştürülür. Peroksidaz enzimi katalizörlüğünde hidrojen peroksit, 4-aminofenazon ve 4-klorofenol ile etkileşir ve karakteristik kırmızı renkli bir boya (4-(p-benzokuinon-monoimino)-fenazon) meydana getirir. Bu boyanın oluşturduğu renk yoğunluğu, numunedeki trigliserit konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve spektrofotometrik yöntemle 700/505nm’ de ölçülerek trigliserit konsantrasyonu belirlenir.

### **3.5.10. FSH**

Elektrokemilüminesans immüno assay (ECLIA) metodu sandviç prensibi kullanılarak ölçüm yapılır. Biotinli antikor, rutenyum işaretli antikor ve serum FSH arasında kompleks oluşur ve bu kompleks mikropartiküllere bağlanarak katı faza sabitlenir. Elektroda voltaj uygulandıktan sonra oluşan kemilüminesans ışık emisyonu ölçülerek FSH konsantrasyonu tayin edilir.

### **3.5.11. LH**

Elektrokemilüminesans immüno assay (ECLIA) metodu sandviç prensibi kullanılarak ölçüm yapılır. LH ve biyotinlenmiş rutenyum işaretli iki monoklonal antikor sandviç oluşturur. Oluşan antikor ve LH kompleksi, streptavidin kaplı mikropartiküllerle katı faza bağlanır. Elektroda voltaj uygulandıktan sonra yayılan kemilüminesans ışık emisyonu ölçülerek LH konsantrasyonu belirlenir.

### **3.5.12. Total Testosteron**

Elektrokemilüminesans immüno assay (ECLIA) metodu yarışma prensibi kullanılarak çalışılır. Biotinlenen antikora bağlanmak için serum testosteronu ile rutenyum işaretli testosteron türevi yarışır ve kemilüminesans emisyonu ölçülerek testosteron düzeyi belirlenir.

### **3.5.13. AMH**

AMH düzeyi ölçümü ECLIA tekniği kullanılarak, sandviç prensibiyle ölçülmüştür. Toplam test süresi 18 dakikadır.

Birinci inkübasyon: 50 µL örnek, AMH'ye özgü biyotinize monoklonal antikor ve rutenyum kompleksiyle işaretlenmiş AMH'ye özgü monoklonal antikor reaksiyon vererek sandviç kompleksi oluşur.

İkinci inkübasyon: Streptavidin kaplı mikropartiküller eklenir. Sonrasında biyotin ve streptavidin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanır.

Reaksiyon karışımı mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Daha sonra bağlanmayan maddeler Procell M solüsyonuyla yıkanarak uzaklaştırılır (Procell M: 2 x 2 L sistem tamponu fosfat tamponu 300

mmol/L, tripropilamin 180 mmol/L; deterjan  $\leq$  %0,1; koruyucu, pH 6.8). Elektrot üzerine voltaj uygulanmasıyla kemilüminesans emisyonu indüklenir bu da fotoçoğaltıcı ile ölçülür.

Sonuçlar iki noktalı kalibrasyonla cihaza özgü oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif kodu veya e barkod aracılığıyla sağlanan ana eğri ile belirlenir.

#### Reaktif içeriği

M: Streptavidin kaplı mikropartiküller (saydam kapaklı), 1 şişe, 6.5 mL: Streptavidin kaplı mikropartiküller 0.72 mg/mL; koruyucu madde.

R1: Anti-AMH-Ab~biotin, 1 şişe, 8 mL: Biotinlenmiş monoklonal anti-AMH antikoru (fare) 1.0 mg/L; fosfat tamponu 50 mmol/L, pH 7.5; koruyucu madde.

R2: Anti-AMH-Ab~Ru(bpy)<sub>3</sub><sup>2+</sup>: Rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal anti-AMH antikoru (fare) 1.0 mg/L; fosfat tamponu 50 mmol/L, pH 7.5; koruyucu madde.

Reaktif lot numarası: 822778

Kalibratör lot numarası: 781911

Kalibratör REF:09013326190

İç kalite kontrol lot numaraları: Level 1 - 779628; Level 2 – 779632.

Testin saptama sınırı: 0.01 ng/mL, alt ölçüm sınırı: 0.030 ng/mL

Sağlıklı yetişkin erkeklerde AMH'nin referans aralığı: 0.77-14.5 ng/mL

### 3.6. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analiz için Microsoft Office 365 Excel 2019 ve çevrimiçi biyolojik varyasyon hesaplama aracı olan BioVar (<https://turcosa.shinyapps.io/biovar/>) programı kullanıldı.

Laboratuvar analizi sonrası veriler ile Microsoft Excel kullanılarak tablo oluşturuldu. Sonrasında TextEdit ile uygun formata dönüştürülerek BioVar çevrimiçi aracı ile istatistiksel analiz yapıldı.

BioVar biyolojik varyasyon verilerinin güncel kılavuzlara dayanarak istatistiksel analizini gerçekleştiren çevrimiçi bir araçtır (173).

BV verilerinin analizi 10 adımda gerçekleştirildi. İlk 6 aşamada BioVar çevrimiçi aracından yararlanıldı (173).

1. Aykırı değerlerin tespiti
  2. Normalite koşulunun kontrolü
  3. Kararlı durum koşulunun kontrolü
  4. Homojenite koşulunun kontrolü
  5. Yaş grupları için alt küme analizinin gerçekleştirilmesi
  6. Varyans analizinin gerçekleştirilmesi
  7. Analitik performans spesifikasyonlarının belirlenmesi
  8. Referans değişim değerlerinin hesaplanması: Simetrik RCV hesaplaması BioVar ile (173), asimetrik RCV hesaplaması ise EFLM Biyolojik Varyasyon veri tabanında bulunan hesaplama aracı ile yapıldı.
  9. II hesaplanması
  10. NHSP hesaplanması
- 7., 9. ve 10. adımlar Microsoft Excel programı ile hesaplandı.

### **3.6.1. Aykırı Değerlerin Tespiti**

Aykırı (uç) değer tespiti 3 adımda gerçekleşir.

1. Adım: Tekrarlı ölçümler arasındaki aykırı değerleri analiz etmek için Cochran testi kullanıldı.
2. Adım: Tüm gruba kıyasla bir bireyin verilerinin dağılımını incelemek ve aykırı bireyleri tespit etmek için Cochran testi kullanıldı.
3. Adım: Tüm gruba kıyasla herhangi bir bireyin ortalama değerinin büyük ya da küçükliğini belirlemek için Reed kriteri kullanıldı.

Aykırı değerler belirlenip ve çıkarıldıktan sonra geride kalan bireylerin verileriyle istatistiksel analize devam edildi.

### **3.6.2. Normal Dağılımın Değerlendirilmesi**

Uç değerler tespit edilip çıkarıldıktan sonra ilk olarak Shapiro-Wilk testi ile tüm ölçümlerden elde edilen verilerin dağılımı ve tüm bireylerin ortalama değerlerinin dağılımı olmak üzere iki aşamada normal dağılıma uyup uymadığı analiz edildi. Verilerin normal dağılıma uygunluğu için  $p>0.05$  kabul edildi (46).

### **3.6.3. Kararlı Durum Koşulunun Değerlendirilmesi**

Kararlı durum şartı RCV ve  $CV_I$ 'nin doğru tahmini için gereklidir. Analit konsantrasyonlarında zamana göre eğilimlerin olmaması olarak tanımlanır ve bu durumun dikkatlice doğrulanması gerekir (45,65). Bu doğrultuda grup ortalama değerleri doğrusal regresyon analizi ile değerlendirildi. Regresyon eğrisi %95 güven aralığında sıfırı içeriyorsa kararlı durumun varlığı kabul edildi (173).

### **3.6.4. Homojenite Koşulunun Kontrolü**

Tahminlerin tüm popülasyon için genelleştirilebilmesi için varyans homojenitesi gereklidir (45). Araştırmamızın analitik varyans ( $CV_A$ ) homojenitesi ve birey içi varyans ( $CV_I$ ) homojenitesi Cochran testi ile değerlendirildi (46).

### **3.6.5. Yaş için Alt Grup Analizinin Gerçekleştirilmesi**

Alt gruplar arasında  $CV_I$  ve  $CV_G$ 'deki anlamlı farklar verilerin yaş gruplarına göre ayrı ayrı raporlanıp raporlanamayacağını belirlemek amacıyla kontrol edilir.  $CV_I$  ve  $CV_G$ 'nin %95 güven aralıkları alt gruplar arasında örtüşüyorsa gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı değerlendirilir. Anlamlı fark yoksa tüm grubun sonuçları hem  $CV_I$  hem  $CV_G$  için rapor edilir. (174).

Çalışmamızda sadece erkek cinsiyette AMH analizi yapılmıştır ve katılımcılarımız yaş aralığına göre 2 alt gruba ayrılarak karşılaştırılmıştır.

### **3.6.6. Varyans Analizinin Gerçekleştirilmesi**

İstatistiksel analizde öncelikle aykırı değerlerin belirlenip çıkarılmasından sonra normalite, kararlı durum koşulu, homojenite varsayımı ve yaşa göre alt grupların ölçüm sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklar değerlendirildi.

Daha sonrasında tüm grup için  $CV_I$  tahminleri CV-ANOVA metoduyla,  $CV_G$  tahminleri ise standart ANOVA metoduyla elde edildi (65). Analitik varyasyon tahmini

tekrarlı ölçüm sonuçları kullanılarak CV-ANOVA yöntemiyle elde edildi. BV tahminlerinin güven aralıkları Burdick ve Graybill tarafından önerilen formüller kullanılarak hesaplandı (175).



## 4. BULGULAR

### 4.1. Katılımcıların Demografik Bilgileri

Çalışmaya 21 erkek gönüllü birey katılmıştır. Katılımcılar yaşlarına göre iki alt gruba ayrılmış olup, her bir grubun yaş ortalamaları ve yaş aralıkları Tablo V’te sunulmuştur.

Tablo V: Çalışmaya dahil edilen gönüllülerin yaş ortalamaları, yaş aralıkları ve standart sapmaları

	Birey Sayısı	Yaş Aralığı	Yaş Ortalaması	SD
<b>1. Grup</b>	9	31-38	35.8	2.1
<b>2. Grup</b>	12	22-28	23.8	2.1
<b>Tüm Grup</b>	21	22-38	28.9	6.4

SD: standart sapma

### 4.2. Katılımcıların Tam Kan Sayımı, Biyokimya, Hormon Parametrelerinin Analizi ve Vücut Kütle İndekslerinin Değerlendirilmesi

Her bireyin sağlık durumunu kontrol etmek için ilk vizitte tam kan sayımı, kreatinin, CRP, ALT, GGT, total kolesterol, trigliserit, glukoz, CK ve hormon testlerinden LH, FSH, total testosteron çalışıldı. Diğer vizitlerde kreatinin, CRP, ALT, GGT, CK ve trigliserit çalışılarak bireyin haftalık sağlık durumu ve açlığı kontrol edildi.

Ayrıca her vizitte alınan venöz kanlardan serum indeksi çalışılarak analit için interferans oluşturabilecek lipemi, hemoliz ve ikter kontrolü yapıldı.

Bireylerin VKİ’leri ve vizitlerde çalıştığımız parametrelerden elde edilen sonuçlar medyan (minimum ve maksimum) olarak tablo halinde Ek 3 ve Ek 4’te sunulmuştur.

Bireylerden elde edilen vizit ölçümlerinde tüm parametreler referans aralık içerisindeydi ve tüm katılımcıların VKİ’leri 30 kg/m<sup>2</sup>’den düşüktü.

### 4.3. Aykırı (Uç) Değerlerin İstatistiksel Yöntemlerle Belirlenerek Dışlanması

Katılımcılardan 4 hafta boyunca haftanın aynı gününde ve aynı saat aralığında venöz kan örnekleri alındı. Toplam 21 katılımcıdan 4 hafta boyunca 84 örnek toplandı. Her bir örnek çift çalışılarak 168 ölçüm sonucu elde edildi. Aykırı değerlerin belirlenmesi için uygulanan adımlarda Cochran testine göre 1. ve 2. adımlarda gruplarda aykırı değer tespit

edilmedi. 3. Adımda uygulanan Reed kriterine göre ise grup 1'deki 1 bireyin ortalama değeri grupla karşılaştırıldığında çok üstte kaldığı için aykırı olarak belirlendi ve toplamda 8 ölçüm sonucu istatistiksel analizden hariç tutuldu. Aykırı değerlerin çıkarılmasından sonra istatistiksel analize 20 bireyden elde edilen 160 AMH testi ölçüm sonucuyla devam edildi. Grup 1 için aykırı değer yüzdesi %11.11, tüm gruptaki aykırı değer yüzdesi ise % 4.76 olarak belirlendi.

AMH'ye ait istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler Tablo VI'da gösterilmiştir.

**Tablo VI: Erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyon bileşenlerini tahmin edebilmek için istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve kullanılan birey /sonuç sayıları**

Analit	Grup	Aşamalara göre aykırı değerlerin belirlenmesi			Biyolojik varyasyon verilerini tahmin etmek için kullanılan sonuçların sayısı		Aykırı değer oranı (%)
		Cochran testi		Reed kriteri	Sonuç sayısı	Birey sayısı	
		Adım 1: Tekrarlar arasındaki kontrol	Adım 2: Her bir bireyin varyansının tüm gruba göre karşılaştırılması	Adım 3: Her bir bireyin ortalamasının diğer bireylerle karşılaştırılması			
AMH	Grup 1	0	0	1 birey	64	8	11.11
	Grup 2	0	0	0	96	12	0
	Tüm Grup	0	0	1 birey	160	20	4.76

Uç değer olarak belirlenen birey istatistiksel analizden çıkarıldıktan sonra yaş ortalamaları ve yaş aralıkları Tablo VII'de gösterilmektedir.

**Tablo VII: Uç değer olarak belirlenen birey analizden çıkarıldıktan sonra katılımcıların yaş ortalamaları, yaş aralıkları ve standart sapmaları**

	<b>Birey Sayısı</b>	<b>Yaş Aralığı</b>	<b>Yaş Ortalaması</b>	<b>SD</b>
<b>1. Grup</b>	8	31-38	35.8	2.3
<b>2. Grup</b>	12	22-28	23.8	2.1
<b>Tüm Grup</b>	20	22-38	28.6	6.4

#### **4.4. Verilerin Normal Dağılım Varsayımı, Kararlı Durum Şartı ve Homojenite Kontrolü**

BV verilerini elde etmek için yapılan istatistiksel analizler, EFLM BV Çalışma Grubu'nun sunduğu STARBIV Zihin Haritası rehberliğinde gerçekleştirildi (42).

Aykırı değerlerin dışlanması ardından Shapiro-Wilk testi ile normalite varsayımı test edildi ve verilerin normal dağılıma uyduğu görüldü.

Bireylerin kararlı durumunu doğrulamak için çalışma süresi boyunca ortalama grup değerinin doğrusal regresyon analizi yapıldı ve regresyon çizgisinin eğimi %95 güven aralığında 'sıfır'ı kapsadığı için, katılımcıların kararlı durumda olduğu kabul edildi.

Analitik ve birey içi varyanslarının homojenite varsayımını sağlandığı Cochran testi ile doğrulandı.

Sonuç olarak aykırı değerlerin dışlanması sonrasında istatistiksel analize dahil edilen verilerin normal dağılım, kararlı durum ve varyans homojenliği varsayımlarını sağladığı belirlendi.

#### **4.5. AMH Ölçüm Sonuçları ile Biyolojik Varyasyon Verilerinin Tahmini**

##### **4.5.1. Analitik ( $CV_A$ ), Birey İçi ( $CV_I$ ), Bireyler Arası Varyasyon ( $CV_G$ ) ve Bireysellik İndeksi (II) Hesaplamaları**

Varyans analizi için CV-ANOVA ve standart yöntem olarak Nested ANOVA kullanıldı.

CV-ANOVA metodu her bireyin verilerini kendi ortalama değerine bölerek standartlaştırılması ile CV dönüşümüne dayanır, ardından bu sonuçlar üzerinde ANOVA yapılır, bu da analitik ve birey içi varyasyon tahminlerini CV değerleri biçiminde

sağlamaktadır ve bu nedenle CV-ANOVA'nın CV<sub>I</sub>'yi daha sağlam tahmin ettiği kabul görmüştür (45,65).

Erkeklerde AMH ölçümlerinin istatistiksel analizinden elde edilen CV<sub>I</sub> ve CV<sub>G</sub> için alt grupların %95 güven aralıklarının birbirini kapsamaması nedeniyle yaş grupları arasında anlamlı fark görülmedi. Student t-testi ile alt grupların ölçüm sonuçlarının ortalamaları arasındaki fark değerlendirildi ve anlamlı bir fark bulunmadı (p> 0.05).

AMH'ye ait Nested ANOVA yöntemi ile elde edilen ortalama değer, CV<sub>A</sub>, CV<sub>I</sub> ve CV<sub>G</sub> güven aralıkları ile birlikte Tablo VIII'de, CV-ANOVA'ya göre hesaplanan ortalama değer, CV<sub>A</sub> ve CV<sub>I</sub> güven aralıkları ile birlikte Tablo IX'da sunulmuştur.

Bireysellik indeksleri hesaplanırken tüm gruplarda CV<sub>A</sub> değeri CV<sub>I</sub> değerinden düşük olduğu için CV<sub>I</sub>/CV<sub>G</sub> formülü kullanılmıştır (53). II değerleri hesaplanırken CV<sub>I</sub> değeri CV-ANOVA'dan CV<sub>G</sub> değeri Nested ANOVA'dan alınmıştır (Tablo IX).

**Tablo VIII: Erkeklerde yaşa göre alt gruplar ve tüm grup için Nested ANOVA'ya göre hesaplanan AMH'nin ortalama, CV<sub>A</sub>, CV<sub>I</sub>, CV<sub>G</sub> ve II değerleri**

<b>Analit (Birim)</b>	<b>Grup</b>	<b>Denek Sayısı</b>	<b>Dahil Edilen Sonuç Sayısı</b>	<b>Mean (%95 Güven Aralığı)</b>	<b>CV<sub>A</sub> (%) (%95 Güven Aralığı)</b>	<b>CV<sub>I</sub> (%) (%95 Güven Aralığı)</b>	<b>CV<sub>G</sub> (%) (%95 Güven Aralığı)</b>
<b>AMH (ng/mL)</b>	<b>1.</b>	8	64	7.56 (7.34-7.78)	1.56 (1.25-2.06)	2.86 (2.10-4.17)	33.67 (22.23-68.58)
	<b>2.</b>	12	96	6.89 (6.77-7.04)	1,23 (1.03-1.54)	4.08 (3.28-5.35)	36.58 (25.87-62.18)
	<b>Tüm grup</b>	20	160	7.16 (7.07-7.24)	1.39 (1.20-1.64)	3.59 (3.00-4.42)	34.72 (26.38-50.75)

CV<sub>A</sub>: Analitik varyasyon, CV<sub>I</sub>: Birey içi biyolojik varyasyon, CV<sub>G</sub>: Bireyler arası biyolojik varyasyon

**Tablo IX: Erkeklerde yaşa göre alt gruplar ve tüm grup için CV-ANOVA'ya göre hesaplanan AMH'nin ortalama, CV<sub>A</sub>, CV<sub>I</sub> ve II değerleri**

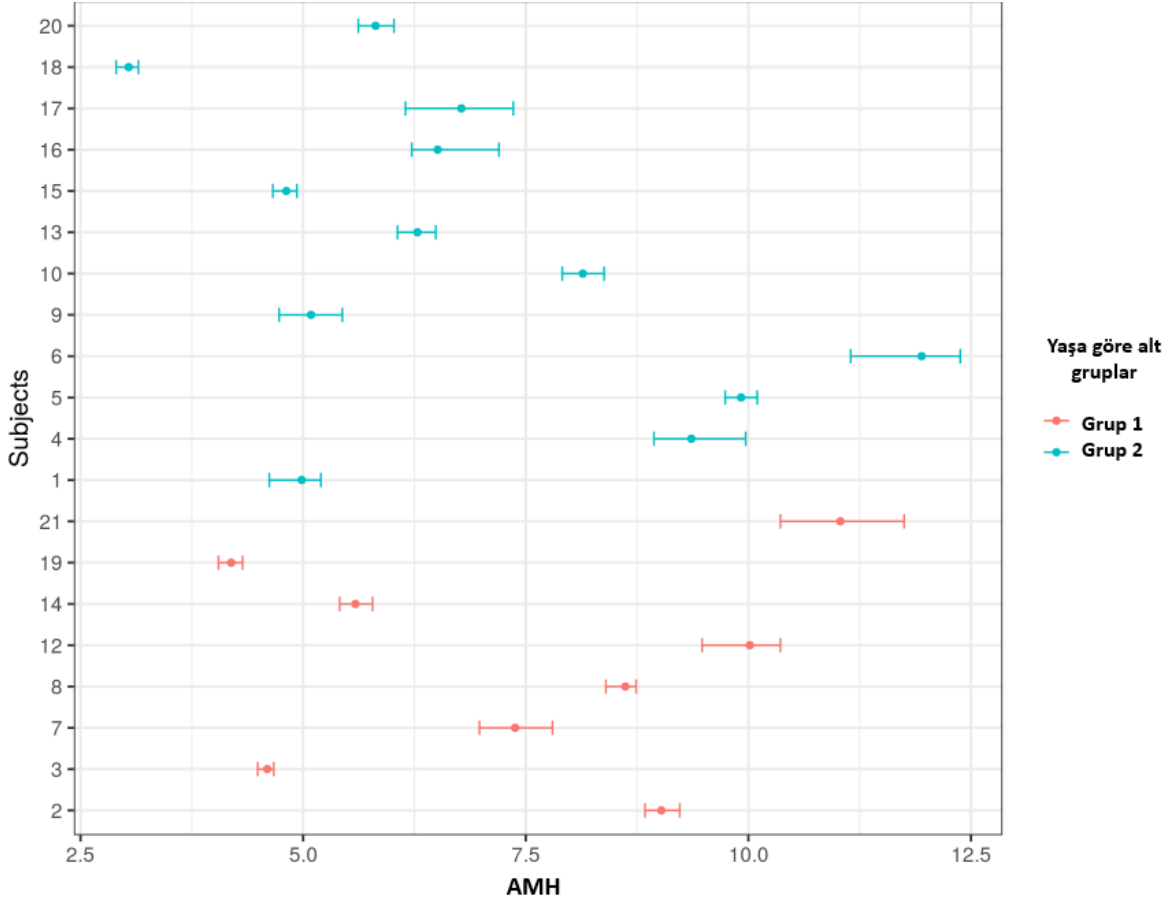
<b>Analit (Birim)</b>	<b>Grup</b>	<b>Denek Sayısı</b>	<b>Dahil Edilen Sonuç Sayısı</b>	<b>CV<sub>A</sub> (%) (%95 Güven Aralığı)</b>	<b>CV<sub>I</sub> (%) (%95 Güven Aralığı)</b>	<b>II*</b>
<b>AMH (ng/mL)</b>	<b>1.</b>	8	64	1.27 (1.02-1.68)	2.56 (1.90-3.66)	0.08
	<b>2.</b>	12	96	1.11 (0.93-1.39)	4.00 (3.22-5.24)	0.11
	<b>Tüm Grup</b>	20	160	1.18 (1.02-1.40)	3.50 (2.93-4.30)	0.10

\*II=CV<sub>I</sub>/CV<sub>G</sub> (CV<sub>I</sub> değeri CV-ANOVA'dan, CV<sub>G</sub> değeri Nested ANOVA'dan alınarak hesaplama yapılmıştır.)

CV<sub>A</sub>: Analitik varyasyon, CV<sub>I</sub>: Birey içi biyolojik varyasyon, II: Bireysellik indeksi

#### **4.5.2. Erkeklerde AMH'nin Bireylerdeki Dağılım ve Ortalama Değer Grafikleri**

AMH için bireylerdeki dağılım ve ortalama değer grafiği Şekil 20'de gösterilmektedir.



Şekil 20: Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra AMH konsantrasyonlarının (ng/mL) 4 haftalık takip sürecinde bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri

#### 4.6. Erkeklerde AMH için Referans Değişim Değeri (RCV) Hesaplanması

Erkeklerde AMH ölçümü için biyolojik varyasyon verileri ile Z puanı 1.96 alınarak elde edilen simetrik ve asimetrik Referans Değişim Değerleri (RCV) Tablo X’de gösterilmiştir. RCV hesaplaması  $CV_I$  ve  $CV_A$ , CV-ANOVA’dan elde edilen tahminlere göre yapılmıştır.

Tablo X: Erkeklerde AMH için belirlenen referans değişim değerleri

Gruplar	RCV%	lnRCV% Medyan (azalan)	lnRCV % Medyan (artan)
1.	7.92	-7.7	8.4
2.	11.52	-10.9	12.2
Tüm Grup	10.23	-9.7	10.8

RCV: Reference değişim değeri, RCV%: Simetrik RCV, lnRCV%: Asimetrik RVC, Z puanı 1,96 alınmıştır.

#### 4.7. Homeostatik Ayar Noktasına Ulaşmak için Gereken Numune Sayısının Hesaplanması

BV verilerinden hesaplanan %95 güven aralığı içerisinde %5, %10 ve %20 olasılıklarda bireyin homeostatik ayar noktasına ulaşmak için gerekli örnek sayılarının tahmini (NHSP) Tablo XI’de verilmiştir.

**Tablo XI: Erkeklerde AMH ölçümü için NHSP değerleri**

Analit	Grup	Numune Sayısı		
		%5	%10	%20
AMH	1. Grup	2	1	1
	2. Grup	3	1	1
	Tüm Grup	2	1	1

#### 4.8. AMH için Belirlenen Analitik Performans Spesifikasyonları

AMH ölçümünden elde edilen BV verileri ile hesaplanan İmpresizyon, Bias ve İzin verilebilir toplam hata (TEa) için minimum, arzu edilen ve optimum analitik performans hedefleri sırasıyla Tablo XII, Tablo XIII ve Tablo XIV’te sunulmuştur. APS hedefleri, CV-ANOVA’dan elde edilen  $CV_I$  ve standart ANOVA’dan elde edilen  $CV_G$  verileri kullanılarak hesaplanmıştır.

**Tablo XII: AMH için İmpresizyon hedefleri**

İmpresizyon		Tüm grup
Minimum	$CV_A < 0,75 CV_I$	2.62
Arzu Edilen	$CV_A < 0,50 CV_I$	1.75
Optimum	$CV_A < 0,25 CV_I$	0.87

$CV_A$ : Analitik varyasyon (impresizyon),  $CV_I$ : birey içi varyasyon

**Tablo XIII: AMH için Bias hedefleri**

<b>Bias</b>		<b>Tüm grup</b>
Minimum	$BA < 0.375 CV_B$	13.09
Arzu Edilen	$BA < 0.250 CV_B$	8.72
Optimum	$BA < 0.125 CV_B$	4.36

BA: Bias,  $CV_B: (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$

**Tablo XIV: AMH için İzin Verilebilir Toplam Hata hedefleri**

<b>TEa</b>		<b>Tüm grup</b>
Minimum	$TEa < 0.375 CV_B + 1,65 \times (0,75 CV_I)$	17.41
Arzu Edilen	$TEa < 0.250 CV_B + 1,65 \times (0,50 CV_I)$	11.61
Optimum	$TEa < 0.125 CV_B + 1,65 \times (0,25 CV_I)$	5.80

TEa: İzin verilebilir toplam hata,  $CV_B: (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$

## 5. TARTIŞMA

Laboratuvar sonuçlarının klinik kararlara olan etkisi göz ardı edilemeyecek kadar önemlidir. Doğru ve güvenilir test sonucunun hasta izleminde doğru karar verebilmek için iyi bir yol gösterici görevi bulunmaktadır. Bu sebeplerle total test sürecinde sonuca etki edebilecek tüm varyasyon kaynakları mümkün olduğunca kontrol altında olmalıdır. Test sonucuna etki eden varyasyon kaynakları preanalitik, analitik ve biyolojik varyasyonlar olarak ele alınır (33,176).

Preanalitik varyasyon kaynaklarını oluşturan örnek alma, toplama, taşıma, santrifüj, alikotlama işlemleri, depolama gibi numune işleyişi ve bireyin kan almadan önceki beslenme, açlık, dinlenme durumu gibi kontrol edilebilir faktörlerin test sonucuna etkisi standardizasyon çalışmaları ve sıkı denetim ile ihmal edilebilecek düzeye indirilmelidir (4,7,41,46). Bu sayede test sonucuna etki eden varyasyon kaynakları analitik ve biyolojik varyasyonlar olarak incelenebilir.

Analitik varyasyonlar ölçüm tekniğinden, kalibratörlerden, reaktif/kalibratör/diğer malzemelerin lot farklılığından, ortam koşullarından, cihazların yetersizliğinden, teknisyenin tecrübe düzeyi gibi pek çok faktörden kaynaklanabilir ve rastgele veya sistematik hataya sebep olur (33).

Biyolojik varyasyonlar biyolojik ritimlerden veya rastgele biyolojik varyasyonlardan kaynaklanır (5). Biyolojik ritimler test sonuçlarında önceden tahmin edilebilir sistematik değişikliklere sebep olurken rastgele biyolojik varyasyonlar test sonuçlarında önceden tahmin etmesi zor olan, istatistiksel yöntemler ile tahmin edilebilir değişikliklere neden olur. Rastgele biyolojik varyasyon, birey içi ve bireyler arası varyasyon ( $CV_I$  ve  $CV_G$ ) olmak üzere iki bileşenden oluşur.  $CV_I$  ve  $CV_G$  verileri ile RCV ve II hesaplamaları yapılır. Elde edilen RCV değeri ile ardışık örneklerin ölçümlerinde görülen değişimin klinik olarak anlamlılığı değerlendirilir (61). II ile de analitin geleneksel popülasyon temelli referans aralığına göre yorumlamanın uygun olup olmadığı değerlendirilir (176).

$II < 0.6$  ise analitin bireyselliği yüksek anlamına gelmektedir. Bu durumda ardışık örneklerin sonuçlarındaki değişimi RCV'ye göre değerlendirmek gerekir.  $II > 1.4$  ise analitin bireyselliğinin düşük olduğunu gösterir ve farklı zamanlardaki ardışık sonuçları

değerlendirirken popülasyona dayalı referans aralıklarından yararlanmanın uygun olduğunu gösterir (46,47).

Toplam test sürecinin 3 aşamasında da biyolojik varyasyon verilerinden yararlanılabilir. En uygun testin belirlenmesi, en uygun örnek türünün belirlenmesi, birçok test için analitik performans hedeflerine göre analitik aşamanın değerlendirilmesi, test sonucu elde edildikten sonra RCV ve II değerlerine göre test sonucunun yorumlanması için güncel biyolojik varyasyon verileri kullanılmaktadır (4,44). Ayrıca kişiselleştirilmiş tıbbın önemi güncel yayınlarla desteklenmekte ve gelişmektedir. BV verilerinden yararlanılarak homeostatik ayar noktasına dayanan, hasta takibi ve tanısı için geliştirilmekte olan kişiselleştirilmiş referans aralık hesaplanabilmektedir (177,42).

Biyolojik varyasyon verilerinin bahsettiğimiz önemli uygulamaları, kolay ulaşılabilir, kolay anlaşılabilir, kaliteli ve güvenilir biyolojik varyasyon verilerini elde etme ve raporlama ihtiyacını oluşturmuştur. Bu amaçla çalışma dizaynı, analiz ve raporlama aşamalarında standardizasyon için kriterler yayınlanmıştır. EFLM WG-BV tarafından çalışma tasarımı, ölçüm yöntemleri ve CV<sub>1</sub>'nin hesaplanması için yararlanılan istatistiksel yaklaşımı kapsayan kriterler belirlenmiştir (45,178) ve Avrupa biyolojik varyasyon çalışması (EuBiVAS) projesi ile de birey seçimi ve örnek toplama aşamasındaki ölçütler oluşturulmuştur (7,179).

Geçmişte yapılan BV çalışmalarından elde edilen verilerin değişkenliği, verilerin kalite ve güvenilirliği ile ilgili soru işaretleri oluşturduğu için EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu (WG-BV) tarafından Biyolojik Varyasyon Verileri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi (BIVAC) yayınlamıştır. BIVAC ile BV araştırmaları A, B, C ve D puanlarıyla 14 kriterde değerlendirilmiştir. Böylece geçmişteki BV çalışmalarının kalite ve güvenilirliği standardize edilmiş ve metaanalize dahil edilen çalışmalar belirlenmiştir. Gelecekteki çalışmaların planlanması için de yol gösterici olmuştur (45).

2025 yılında ise EFLM tarafından BIVAC'ı da kapsayan biyolojik varyasyon çalışmalarının standart bir şekilde raporlanması için çevrimiçi bir zihin haritası şeklinde bir kaynak ([www.starbiv.eu](http://www.starbiv.eu)) oluşturularak Biyolojik Varyasyon Verileri Çalışmalarını Raporlama Standardı (STARBIV) geliştirilmiştir. Böylece BV verilerindeki güveni ve kaliteyi etkileyen faktörlerin farkındalığında artış sağlanmaya çalışılmıştır (42)

Anti Müllerian hormonun kadınlarda over rezervinin bir göstergesi olarak ve pediatrik bireylerde cinsiyet gelişimi ile ilgili tanısal amaçlı klinik kullanımını mevcuttur. Yetişkin erkeklerde de infertilite alanında kullanılmaktadır. Ayrıca fertilité ve onkoloji alanında AMH'nin rolü hakkında yapılan araştırmalar devam etmektedir (86,128).

Sağlıklı erkeklerde AMH'nin popülasyona dayalı referans aralığını belirlemek için bazı çalışmalar yapılmış ve bu çalışmalarda AMH düzeylerinin erkeklerde yaşa göre değişkenlik gösterdiği belirtilmiştir (14,114).

Çalışmamızda sağlıklı yetişkin erkek bireylerde AMH'nin seri ölçümlerinde karşılaşılabilecek varyasyon kaynaklarını oluşturan analitik ( $CV_A$ ) ve biyolojik varyasyon bileşenlerinin ( $CV_I$  ve  $CV_G$ ) değerlendirilmesi ve elde ettiğimiz biyolojik varyasyon verilerinden RCV, II ve biyolojik varyasyona dayalı analitik performans hedeflerini hesaplamayı, ayrıca popülasyona dayalı referans aralıklarının kullanımının uygun olup olmadığının değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyonu üzerine yaptığımız çalışma, EFLM WG-BV tarafından yayınlanan standartlar doğrultusunda güncel kılavuzlara uygun olarak preanalitik varyasyon kaynaklarının sıkı kontrolü altında gerçekteştirilmiştir (7,179). Bununla birlikte güncel raporlama standartlarına dikkat edilerek düzenlenmiştir ve analizimiz BIVAC'ı da kapsayan ve yakın zamanda uygulamaya konulan STARBIV ile uyumlu olacak şekilde yapılmıştır (42).

Yadığımız çalışma sonucu elde ettiğimiz biyolojik varyasyon tahminleri ile yetişkin erkek bireylerde AMH düzeyleri değerlendirilirken popülasyona dayalı referans aralık kullanımının uygunluğunu değerlendirebileceğimiz ve laboratuvar tıbbı için analitik performans değerlendirmesine katkı sağlayacak güvenilir veriler elde edilmiştir.

EFLM BV veri tabanında AMH'nin biyolojik varyasyonu ile ilgili kadınlarda yapılan metaanalize giren bir adet çalışma bulunmaktadır. Bu çalışmadan elde edilen veriler  $CV_A$  %6.9 ve  $CV_I$  %19.2 olarak bildirilmiştir ve güven aralığı verilmemiştir. EFLM BV veri tabanında bulunan çalışmanın ve kendi çalışmamızın karşılaştırması Tablo XV'te gösterilmektedir. (180)

**Tablo XV: EFLM veritabanında bulunan AMH'nin biyolojik varyasyon çalışmasından elde edilen verilerin karşılaştırılması**

<b>Çalışma</b>	<b>Hadlow 2016</b>	<b>Bizim çalışmamız</b>
<b>Cinsiyet</b>	Kadın	Erkek
<b>Sağlık durumu</b>	Sağlıklı	Sağlıklı
<b>Katılımcı sayısı</b>	38 birey	20 birey
<b>Yaş</b>	22-42 yaş (reproduktif dönemdeki kadınlar)	22-38 yaş
<b>Numune matrisi</b>	Serum	Serum
<b>Analitik yöntem ve cihaz</b>	AMH Gen II ELISA, Beckman Coulter	AMH Elecsys ECLIA, Roche Cobas e601
<b>CV<sub>A</sub> (%) (%95 güven aralığı)</b>	6.9	1.18 (1.02-1.40)
<b>CV<sub>I</sub> (%) (%95 güven aralığı)</b>	19.2 (17.32- 21.47)*	3.50 (2.93-4.30)
<b>CV<sub>G</sub> (%) (%95 güven aralığı)</b>	-	34.72 (26.38-50.75)
<b>BIVAC skoru</b>	C8,10,13	

\*Hadlow 2016 çalışmasından elde edilen CV<sub>I</sub> değerinin güven aralığı EFLM BV veritabanından alınmıştır (çalışmanın orijinalinde güven aralığı verilmemiştir).

Çalışma grubumuzun yaş aralığı belirlenirken, Benderradji ve arkadaşlarının (114) yanı sıra Aksglaede ve arkadaşlarının (14) referans aralığı çalışmaları temel alındı. Özellikle Benderradji ve arkadaşlarının çalışmasında 20-39 yaş aralığındaki bireyler için serum AMH düzeylerinin 2.53- 12.73 ng/mL (18,1-90,9 pmol/L), 39 yaş ve üzeri bireyler için ise 1.72-

12.26 ng/mL (12,3-87,6 pmol/L) olarak rapor edilmesi (114), çalışmamızın yaş aralığı sınırlarının belirlenmesinde yol gösterici olmuştur.

Çalışmamızı 22-38 yaş arası, gönüllü ve sağlıklı 21 erkek birey üzerinde gerçekleştirdik. Her katılımcıdan birer hafta arayla 4 kez alınan serum örnekleri uygun koşullar altında depolandı ve tek seferde Roche Cobas 6000 e601 otoanalizöründe ECLIA yöntemiyle her örnek için iki tekrarlı ölçüm yapılarak analiz edildi.

Bireyleri tüm grup olarak ve yaşa göre iki gruba ayırarak istatistiksel analizimizi gerçekleştirdik. Grup 1, 31-38 yaş aralığında 9 erkek bireyden oluşmaktadır. Grup 2 ise 22-28 yaş aralığında 12 bireyden oluşmaktadır.

İstatistiksel analiz sırasında grup 1'den bir bireyin tüm sonuçları aykırı değer olarak belirlendi ve çalışma haricinde tutuldu. Böylece grup 1'den 8 kişi, grup 2'den 12 kişi ve tüm grup 20 kişi olarak analize devam edildi. Toplamda 160 sonuç istatistiksel analize dahil edildi.

Ölçümlerimizden elde edilen verilerimizin varyasyon analizi EFLM WG-BV'nin kriterlerine uygun olarak standart yöntem olan Nested ANOVA ve  $CV_I$ 'yi daha sağlam tahmin eden CV-ANOVA yöntemiyle yapılmış ve ayrı ayrı tablolarda sunulmuştur (42,45).

### **5.1. Erkeklerde AMH'nin Analitik Varyasyon ve Biyolojik Varyasyonunun Değerlendirilmesi**

Çalışmamız sonucunda erkeklerde AMH'nin  $CV_I$  ve  $CV_G$  değerleri, %95 güven aralıkları ile değerlendirildiğinde yaşa bağlı gruplar arasında birbiriyle örtüşmektedir. Bu nedenle, referans aralıkların kullanımında gruplardaki yaş dağılımına göre tabakalandırma yapılmasının gerekli olmadığı görüldü. Yapılan analiz verilerine göre gruplar arasında fark bulunmamıştır. Bu nedenle buradan sonraki hesaplamalar tüm grup üzerinden yapıp tartışılmıştır.

Çalışmamızın sonucunda Nested ANOVA'ya göre elde edilen biyolojik varyasyon verileri %95 güven aralıkları ile Tablo VIII'de gösterilmiştir ve tüm grup için  $\%CV_A$  1.39 (1.20-1.64),  $\%CV_I$  3.59 (3.00-4.42),  $\%CV_G$  34.72 (26.38-50.75) olarak bulunmuştur.

Çalışmamızın sonucunda CV-ANOVA'ya göre elde edilen biyolojik varyasyon verileri %95 güven aralıkları ile Tablo IX'da gösterilmiştir ve şu şekildedir: Tüm grup için  $\%CV_A$  1.18 (1.02-1.40),  $\%CV_I$  3.50 (2.93-4.30)'dir.

Ayrıca sağlıklı erkeklerde AMH'nin yüksek bireysellik gösterdiği, II değerinin tüm grup için  $<0,6$  olduğu bulundu.

Hadlow'un reproduktif çağıdaki kadınlarda yapılan siklus içi ve sikluslar arası anti Müllerien hormonunun birey içi varyasyonunu değerlendirdiği çalışmada  $CV_A$  ve  $CV_I$  değerleri bizim çalışmamıza göre daha yüksek bulunmuştur (180). Kadınlarda  $CV_I$ 'nin erkeklere göre daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum reproduktif dönemdeki kadınların siklusa bağlı hormonal değişimlerinden kaynaklanabilir.  $CV_A$  değeri ise bizim çalışmamızda daha düşük bulunmuştur. Bu durum kullanılan yöntem ve cihaz farklılığından kaynaklanmış olabilir.

## 5.2. Erkeklerde AMH'nin Referans Değişim Değerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızdan elde ettiğimiz RCV değerlerini, simetrik RCV formülü ile ve  $CV_I$  değerleri tüm grupta %12'den düşük olduğu için lnRCV formülünü kullanarak asimetric RCV olarak hesapladık.  $CV_I$  ve  $CV_A$  değerleri CV-ANOVA'ya göre hesaplanmıştır. Tüm grup için simetrik RCV değeri 10.23, asimetric RCV değeri ise azalan ve artan olarak -9.7 ve 10.8 olarak hesaplanmıştır ve Tablo X'da belirtilmiştir.

Hadlow'un kadınlarda yaptığı çalışmada RCV değerinin hesaplanmadığı görülmektedir (180). EFLM veri tabanından hesapladığımız asimetric RCV ve Microsoft Excel programı ile hesapladığımız simetrik RCV değerleri ise Tablo XVI'da sunulmuştur.

**Tablo XVI: Hadlow'un çalışmasında verilen  $CV_I$  değerine göre hesaplanan simetrik ve asimetric (azalan ve artan) RCV değerleri**

Çalışma grubu	RCV%	lnRCV% medyan (azalan)	lnRCV% medyan (artan)
Hadlow kadınlar	56,55	-42.9	75.2

Z puanı 1.96 alınmıştır.

Buna göre, çalışmamızdan elde edilen RCV değerlerinin kadınlarda yapılan çalışmadaki verilerden hesapladığımız RCV değerlerine göre oldukça düşük olduğu görülmektedir.

## 5.3. Erkeklerde AMH'nin Bireysellik İndeksinin Değerlendirilmesi

Bireysellik indeksi (II) hesaplanırken tüm grupta  $CV_A$   $CV_I$ 'dan küçük olduğu için  $CV_I/CV_G$  formülünden yararlanıldı.  $CV_I$  değeri CV-ANOVA'dan,  $CV_G$  değeri ise Nested ANOVA'dan elde edilerek II hesaplandı.

Tüm grup için elde edilen II değeri 0.1'dir ve Tablo IX'da gösterilmektedir.

Bu sonuçlara dayanarak erkeklerde AMH için tüm grupta elde edilen BV verileri kullanılarak hesaplanan bireysellik indeksi 0.6'dan düşük olduğu için, geleneksel popülasyona dayalı referans aralıklarının kullanılabilirliğinin kısıtlı olduğunu ve ardışık ölçümlerin takibindeki değişimin önemini belirlemek için RCV'nin kullanılması gerektiğini düşündürmüştür.

Hadlow'un kadınlarda yaptığı çalışmada ise  $CV_G$  değeri bulunmadığı için II değeri hesaplanamamaktadır (180). Bu nedenle karşılaştırma yapılamamıştır.

#### 5.4. Erkeklerde AMH'nin Analitik Performans Hedeflerinin Değerlendirilmesi

Hadlow'un kadınlarda yaptığı çalışmada  $CV_G$  değeri bulunmamaktadır ve analitik performans hedeflerinden bahsedilmemektedir (180). Bu nedenle sadece impresizyon için analitik performans hedefleri elde edilebilirdi. Kendimiz impresizyon için hesaplama yaptığımızda elde ettiğimiz hedefler Tablo XVII'de sunulmuştur.

**Tablo XVII: Hadlow'un çalışmasında verilen  $CV_I$  değerine göre İmpresizyon için Analitik Performans Hedefleri**

İmpresizyon		
Minimum	$CV_A < 0,75 CV_I$	14.4
Arzu Edilen	$CV_A < 0,50 CV_I$	9.6
Optimum	$CV_A < 0,25 CV_I$	4.8

$CV_A$ : analitik varyasyon (impresizyon),  $CV_I$ : birey içi biyolojik varyasyon

Çalışmamızdan elde ettiğimiz analitik performans hedefleri ise Tablo XII, Tablo XIII ve Tablo XIV'te sunulmaktadır. Tüm grup için impresizyon hedefleri minimum 2.62, arzu edilen 1.75 ve optimum 0.87'dir. Bias hedefleri minimum 13.09, arzu edilen 8.72 ve optimum 4.36'dır. TEa hedefleri minimum 17.41, arzu edilen 11.61 ve optimum 5.80'dir.

Bu sonuçlara göre erkeklerde yaptığımız çalışmamızdan elde edilen verilerle hesapladığımız impresizyon hedeflerinin, kadınlarda yapılan çalışmadaki  $CV_I$  değerinden hesapladığımız impresizyon hedeflerine kıyasla çok daha düşük olduğu anlaşılmaktadır.

Literatüre bakıldığında erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyon verilerinin elde edildiği bir çalışma bulunmamaktadır. Çalışmamız AMH'nin erkeklerdeki biyolojik varyasyon verilerinin değerlendirilmesi adına yapılan ilk çalışma olduğu için literatüre önemli katkıda bulunmaktadır.



## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda Yozgat Bozok Üniversitesi Tıp Fakültesi Araştırma ve Uygulama Hastanesi erkek çalışanlarından venöz serum örnekleriyle AMH parametresinin BV çalışmasını gerçekleştirdik.

EFLM BV veri bankası ve güncel veri tabanları incelendiğinde erkeklerde AMH için BV çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız erkeklerde AMH için BV verilerini literatüre kazandıran ilk çalışma olma özelliğini taşımaktadır.

Grup 1, 31-38 yaş aralığında 9 erkek bireyden; Grup 2 ise 22-28 yaş aralığında 12 bireyden; toplamda 21 bireyden oluşan çalışma grubumuzdaki her bireyden birer hafta arayla toplamda 4 kez venöz kan alınarak serum örnekleri toplandı. Analiz sonrası aykırı değerlerin tespit edilip çıkarılmasından sonra 20 sağlıklı erkek bireyin AMH sonuçları ile istatistiksel analizler gerçekleştirildi.

Çalışmamız EFLM tarafından kurulmuş olan BV-WG tarafından yayınlanan kritik kontrol değerlendirme listesini (BIVAC) de kapsayan Biyolojik Varyasyon Verileri Çalışmalarını Raporlama Standardı (STARBIV) rehberliğinde dizayn edildi (42). AMH analizi sonrası verilerimizin öncelikle dağılımının normaliteye uygunluğu, ardından aykırı değer analizi ve aykırı değerlerin dışlanması, kararlı durum şartını kontrolü ve homojenite kontrolü yapıldı. İstatistiksel analizimizde kılavuzların önerileri doğrultusunda standart ANOVA ile birlikte daha sağlam  $CV_I$  tahmini elde edebilmek için CV-ANOVA ile biyolojik varyasyon verileri elde edildi. Çalışmamız sonucunda elde ettiğimiz biyolojik varyasyon verileriyle her analit için APS hedeflerini, II ve RCV değerlerini ve homeostatik ayar noktasına ulaşmak için gerekli numune sayısını hesapladık.

Çalışmamız sonucunda erkeklerde AMH'nin  $CV_I$  ve  $CV_G$  değerleri, %95 güven aralıkları ile değerlendirildiğinde yaşa bağlı gruplar arasında birbiriyle örtüşmektedir. Bu nedenle, referans aralıkların kullanımında gruptaki yaş dağılımına göre tabakalandırma yapılmasının gerekli olmadığı görüldü. Ayrıca yüksek bireysellik gösterdiği, II değerinin tüm grup için  $<0,6$  olduğu bulundu. Bu sebeple erkeklerde AMH'nin ardışık ölçümlerindeki değişimin önemini belirlemek için RCV'nin kullanılması gerektiği sonucuna vardık. Erkek bireylerde AMH sonuçlarının doğru değerlendirilebilmesi için kaliteli biyolojik varyasyon verilerinin literatürde yer almasının önemi ortaya çıkmaktadır.

Bu çalışmanın kısıtlılığı, çalışma grubumuzun 22-38 yaş aralığında olmasıdır. Gelecekte yapılacak olan çalışmalarla, diğer yaş gruplarındaki biyolojik varyasyonun incelenmesi, geniş bir popülasyon için veri elde edilmesini sağlayacaktır.

Sonuç olarak erkeklerde AMH'nin biyolojik varyasyonunu ilk kez inceleyen bu çalışma ile, güncel standartlara uygun olarak biyolojik varyasyon verileri, referans değişim değeri, bireysellik indeksi ve analitik performans hedefleri elde edilerek literatüre önemli bir katkı sağlanacağı düşünülmektedir. Erkeklerde AMH'nin belirgin bireysellik göstermesi nedeniyle bireylerin geleneksel topluma dayalı referans aralık yerine RCV kullanılarak takip edilmesi gerektiği anlaşılmıştır.



## 7. ÖZET

**Amaç:** Bu çalışmada, sağlıklı erkek bireylerde serum Anti-Müllerian Hormon (AMH) düzeylerinin analiz edilerek birey içi ( $CV_I$ ) ve bireyler arası ( $CV_G$ ) biyolojik varyasyon verilerinin belirlenmesi ve bu verilerle bireysellik indeksi (II), referans değişim değerleri (RCV) ve analitik performans spesifikasyonları (APS) hesaplanması amaçlandı.

**Gereç ve Yöntem:** Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (EFLM) Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu'nun (BV-WG) belirlediği Biyolojik Varyasyon Verileri Çalışmalarını Raporlama Standardı (STARBIV) rehberine uygun olarak planlandı. 22-38 yaş aralığındaki 21 sağlıklı erkek bireyden dört ardışık hafta boyunca haftada bir kez, sabah 08.00-10.00 saatleri arasında venöz kan örnekleri alındı. Preanalitik varyasyon kaynakları minimize edildi ve serumlar  $-80^{\circ}C$ 'de saklandı. Analizler, Roche Cobas e601 cihazında, aynı lot numaralı reaktif ve sarf malzemeleri kullanılarak, elektrokemilüminesans immünölçüm (ECLIA) yöntemiyle, rastgele sırayla ve çift tekrarlı olarak gerçekleştirildi.

**Bulgular:** Erkeklerde AMH için %95 güven aralığı ile birlikte  $CV_I$  %3.50 (2.93–4.30) ve  $CV_G$  %34.72 (26.38–50.75) olarak bulundu. Bireysellik indeksi 0,1 olarak hesaplandı. Simetrik ve asimetrik RCV değerleri sırasıyla  $\pm\%10.23$  ve  $+10.8/-9.7$  olarak saptandı. Arzu edilen APS değerleri impresizyon için  $<\%1.75$ , bias için  $<\%8.72$  ve izin verilebilir toplam hata için  $<\%11.61$  olarak belirlendi.

**Sonuç:** Erkeklerde AMH'nin düşük  $CV_I$  değeri, analitin homeostatik olarak sıkı kontrol altında olduğunu göstermektedir. Düşük II ( $II < 0.6$ ), AMH'nin yüksek bireyselliğe sahip olduğuna işaret etmekte olup, klinik takipte popülasyona dayalı referans aralıkları yerine RCV kullanımının daha uygun olacağını düşündürmektedir. Bildiğimiz kadarıyla, bu araştırma erkeklerde AMH biyolojik varyasyon verilerine ilişkin literatürdeki ilk kapsamlı çalışmadır.

**Anahtar Kelimeler:** Anti-Müllerian Hormon; Biyolojik Varyasyon; Analitik Performans Spesifikasyonları; Bireysellik İndeksi; Referans Değişim Değeri.

## 8. ABSTRACT

**Objective:** This study aimed to determine within-subject ( $CV_I$ ) and between-subject ( $CV_G$ ) biological variation data for serum Anti-Müllerian Hormone (AMH) in healthy male subjects. These data were subsequently utilized to calculate individuality index (II), reference change values (RCV), and analytical performance specifications (APS).

**Materials and Methods:** This study planned in accordance with the Standard for Reporting Biological Variation Data Studies (STARBIIV) guideline determined by the Biological Variation Working Group (BV-WG) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Venous blood specimens were collected from 21 healthy male subjects aged 22–38 years once weekly for four consecutive weeks between 08:00-10:00 hours. Preanalytical sources of variation were minimized, and sera were stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ . To ensure analytical precision, analyses were performed on a Roche Cobas e601 analyzer using electrochemiluminescence immunoassay with reagents from a single lot, processed randomly in duplicate.

**Results:** For AMH in males,  $CV_I$  was 3.50% (95% CI: 2.93–4.30) and  $CV_G$  was 34.72% (95% CI: 26.38–50.75). The individuality index was 0.1. Symmetric and asymmetric RCVs were  $\pm 10.23\%$  and  $+10.8\%/-9.7\%$ , respectively. Desirable analytical performance specifications were imprecision  $<1.75\%$ , bias  $<8.72\%$ , and total allowable error  $<11.61\%$ .

**Conclusion:** The low  $CV_I$  for AMH in males indicates stringent homeostatic regulation. The low II ( $II < 0.6$ ) signifies high individuality, suggesting RCV utilization is more appropriate than population-based reference intervals for clinical monitoring. To the best of our knowledge, this represents the first comprehensive study reporting AMH biological variation data in males within the existing literature.

**Keywords:** Anti-Müllerian Hormone; Biological Variation; Analytical Performance Specifications; Index of Individuality; Reference Change Value.

## 9. KAYNAKLAR

1. Plebani M. Clinical laboratories: production industry or medical services? CCLM. 2015;53(7):995–1004.
2. Plebani M. Performance specifications for the extra-analytical phases of laboratory testing: why and how. Clin Biochem. 2017;50(10–11):550–4.
3. Plebani M, Laposata M, Lundberg GD. The brain-to-brain loop concept for laboratory testing 40 years after its introduction. Am J Clin Pathol. 2011;136(6):829–33.
4. Fraser CG. Biological variation: from principles to practice. Washington, DC: AACC Press; 2001.
5. Coskun A, Zarepour A, Zarrabi A. Physiological rhythms and biological variation of biomolecules: the road to personalized laboratory medicine. IJMS. 2023;24(7):6275.
6. Fraser CG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. Crit Rev Clin Lab Sci. 1989;27(5):409–37.
7. Carobene A, Strollo M, Jonker N, Barla G, Bartlett WA, Sandberg S, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. CCLM. 2016;54(10):1599–608.
8. Jost A. The age factor in the castration of male rabbit fetuses. Proc Soc Exp Biol Med. 1947;66(2):302.
9. Cate RL, Mattaliano RJ, Hession C, Tizard R, Farber NM, Cheung A, et al. Isolation of the bovine and human genes for Müllerian inhibiting substance and expression of the human gene in animal cells. Cell. 1986;45(5):685–98.
10. Josso N. In vitro synthesis of Mullerian-inhibiting hormone by seminiferous tubules isolated from the calf fetal testis. Endocrinology. 1973;93(4):829–34.
11. Josso N, Lamarre I, Picard JY, Berta P, Davies N, Morichon N, et al. Anti-Müllerian hormone in early human development. Early Hum Dev. 1993;33(2):91–9.
12. Taguchi O, Cunha GR, Lawrence WD, Robboy SJ. Timing and irreversibility of Müllerian duct inhibition in the embryonic reproductive tract of the human male. Dev Biol. 1984;106(2):394–8.
13. Tran D, Josso N, MEUSY-DESSOLLE N. Anti-Müllerian hormone is a functional marker of foetal Sertoli cells. Nature. 1977;269(5627):411–2.
14. Aksglaede L, Sørensen K, Boas M, Mouritsen A, Hagen CP, Jensen RB, et al. Changes in anti-Müllerian hormone (AMH) throughout the life span: a population-based study of 1027 healthy males from birth (cord blood) to the age of 69 years. J Clin Endocrinol Metab. 2010;95(12):5357–64.

15. Bergadá I, Milani C, Bedecarrás P, Andreone L, Ropelato MG, Gottlieb S, et al. Time course of the serum gonadotropin surge, inhibins, and anti-Müllerian hormone in normal newborn males during the first month of life. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(10):4092–8.
16. Yates AP, Jopling HM, Burgoyne NJ, Hayden K, Chaloner CM, Tetlow L. Paediatric reference intervals for plasma anti-Müllerian hormone: comparison of data from the Roche Elecsys assay and the Beckman Coulter access assay using the same cohort of samples. *Ann Clin Biochem.* 2019;56(5):536–47.
17. Behringer RR, Finegold MJ, Gates RL. Müllerian-inhibiting substance function during mammalian sexual development. *Cell.* 1994;79(3):415–25.
18. Grinspon RP, Bergadá I, Rey RA. Male hypogonadism and disorders of sex development. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020;11:211.
19. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. Errors in laboratory medicine. *Clin Chem.* 2002;48(5):691–8.
20. Plebani M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? *CCLM.* 2006;44(6):750–9.
21. Lundberg GD. Acting on significant laboratory results. *Jama.* 1981;245(17):1762–3.
22. Çolak Samsun E, Demirci G. Laboratuvar sonuçlarına etki eden önemli faktörler. In: Yücel D, editor. *Tıbbi biyokimya toplam test süreci rehberi.* Ankara: Türkiye Cumhuriyeti Sağlık Bakanlığı Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü; 2024. p. 2–31.
23. Plebani M, Sciacovelli L, Aita A. Quality indicators for the total testing process. *Clin Lab Med.* 2017;37(1):187–205.
24. Sepulveda JL. Tıbbi laboratuvarında değişkenlik, hatalar ve kalite. In: Dasgupta A, Sepulveda JL, editors. *Tıbbi Laboratuvarında Doğru Sonuç-Hataların Tespiti ve Düzeltilmesi için Rehber.* Ankara: Palme Yayıncılık; 2015. p. 1–8.
25. Konukoğlu D. Klinik laboratuvarında yapılan çalışmalar. In: Görmüş U, editor. *Laboratuvar Dünyası.* 2nd ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitapevi Yayınları; 2018. p. 33–84.
26. Shajani-Yi Z, Nichols JH. Preanalytical variation. In: Clarke W, Marzinke MA, editors. *Contemporary practice in clinical chemistry.* 4th ed. Chennai: Elsevier; 2020. p. 1–15.
27. Simundic AM, Dukic L, Biljak VR. Preanalytical variation and pre-examination processes. In: Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham CAD, Wittwer CT, editors. *Tietz textbook of laboratory medicine.* 7th ed. St. Louis: Elsevier; 2022. p. 80–128.
28. Plebani M. The detection and prevention of errors in laboratory medicine. *Ann Clin Biochem.* 2010;47(2):101–10.
29. Schneider F, Maurer C, Friedberg RC. International Organization for Standardization (ISO) 15189. *Ann Lab Med.* 2017;37(5):365–70.

30. Ellervik C, Vaught J. Preanalytical variables affecting the integrity of human biospecimens in biobanking. *Clin Chem*. 2015;61(7):914–34.
31. Lima-Oliveira G, Volanski W, Lippi G, Picheth G, Guidi GC. Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis. *Scand J Clin Lab Invest*. 2017;77(3):153–63.
32. Narayanan S. The preanalytic phase. *Am J Clin Pathol*. 2000;113(3):429–52.
33. Coskun A. Are your laboratory data reproducible? the critical role of imprecision from replicate measurements to clinical decision-making. *Ann Lab Med*. 2025;45(3):259–71.
34. Rogers MW, Letsos CB, Henderson MPA, Willis MS, McCudden CR. Method evaluation and quality control. In: Bishop ML, Fody EP, Schoeff LE, editors. *Clinical chemistry: principles, techniques, and correlations*. 8th ed. Burlington: Jones & Bartlett Learning; 2020. p. 206–311.
35. Menditto A, Patriarca M, Magnusson B. Understanding the meaning of accuracy, trueness and precision. *Accred Qual Assur*. 2007;12(1):45–7.
36. Coşkun A. Süreç kontrolü- kantitatif testler için kalite kontrol. In: Yücel D, editor. *Laboratuvar Kalite Yönetim Sistemi El Kitabı*. Türk Biyokimya Derneği; 2019. p. 79–93.
37. Westgard JO, Darcy T. The truth about quality: medical usefulness and analytical reliability of laboratory tests. *Clin Chim Acta*. 2004;346(1):3–11.
38. Coskun A, Oosterhuis WP. Statistical distributions commonly used in measurement uncertainty in laboratory medicine. *Biochem Med*. 2020;30(1):5–17.
39. Linnet K, Moons KGM, Boyd JC, Rifai N, Chiu RWK, Young I, et al. Statistical methodologies in laboratory medicine analytical and clinical evaluation of laboratory tests. In: *Tietz textbook of laboratory medicine*. St. Louis: Elsevier; 2022. p. 10–59.
40. Coskun A. Bias in laboratory medicine: the dark side of the moon. *Ann Lab Med*. 2024;44(1):6–20.
41. Ricos C, Perich C, Minchinela J, Alvarez V, Simon M, Biosca C, et al. Application of biological variation - a review. *Biochem Med*. 2009;19(3):250–9.
42. Bartlett WA, Sandberg S, Carobene A, Fernandez-Calle P, Diaz-Garzon J, Coskun A, et al. A standard to report biological variation data studies – based on an expert opinion. *CCLM*. 2025;63(1):52–9.
43. Carobene A. Reliability of biological variation data available in an online database: need for improvement. *CCLM*. 2015;53(6):871–7.
44. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: consensus statement from the 1st strategic conference of the European Federation of clinical chemistry and laboratory medicine. *CCLM*. 2015;53(6):833–5.

45. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Díaz-Garzón J, Jonker N, et al. The biological variation data critical appraisal checklist: a standard for evaluating studies on biological variation. *Clin Chem*. 2018;64(3):501–14.
46. Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: an update. *Crit Rev Clin Lab Sci*. 2016;53(5):313–25.
47. Sandberg S, Carobene A, Bartlett B, Coskun A, Fernandez-Calle P, Jonker N, et al. Biological variation: recent development and future challenges. *CCLM*. 2023;61(5):741–50.
48. Horvath AR, Bossuyt PMM, Sandberg S, John AS, Monaghan PJ, Verhagen-Kamerbeek WDJ, et al. Setting analytical performance specifications based on outcome studies – is it possible? *CCLM*. 2015;53(6):841–8.
49. Fraser CG. The 1999 Stockholm consensus conference on quality specifications in laboratory medicine. *CCLM*. 2015;53(6):837–40.
50. Sandberg S, Zima T, Panteghini M. Analytical performance specifications – moving from models to practical recommendations. *CCLM*. 2024;62(8):1451–4.
51. Panteghini M, Sandberg S. Defining analytical performance specifications 15 years after the Stockholm conference. *CCLM*. 2015;53(6):829–32.
52. Ceriotti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, Nordin G, Sandberg S, Streichert T, et al. Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM strategic conference. *CCLM*. 2017;55(2):189–94.
53. Sandberg S, Røraas T, Aarsand AK. Biological variation and analytical performance specifications. In: Rifai N, Chiu RWK, Young I, Burnham CAD, Wittwer CT, editors. *Tietz textbook of laboratory medicine*. 7th ed. St. Louis: Elsevier; 2022. p. 335–56.
54. Perich C, Minchinela J, Ricós C, Fernández-Calle P, Alvarez V, Doménech MV, et al. Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *CCLM*. 2015;53(2):299–305.
55. Aarsand AK, Webster C, Fernandez-Calle P, Jonker N, Diaz-Garzon J, Coskun A, et al. The EFLM biological variation database. [cited 2025 Apr 12]. Available from: <https://biologicalvariation.eu/>
56. Sandberg S, Coskun A, Carobene A, Fernandez-Calle P, Diaz-Garzon J, Bartlett WA, et al. Analytical performance specifications based on biological variation data – considerations, strengths and limitations. *CCLM*. 2024;62(8):1483–9.
57. Gowans EMS, Petersen PH, Blaabjerg O, Hørder M. Analytical goals for the acceptance of common reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest*. 1988;48(8):757–64.
58. Oosterhuis WP. Analytical performance specifications in clinical chemistry: the holy grail? *J Lab Precis Med*. 2017;2:78–78.

59. JCGM J. 100: 2008 (GUM 1995 with minor corrections) evaluation of measurement data-Guide to the expression of uncertainty in measurement. Paris: Joint Committee for Guides in Metrology; 2008.
60. Kallner A. Is the combination of trueness and precision in one expression meaningful? on the use of total error and uncertainty in clinical chemistry. CCLM. 2016;54(8):1291–7.
61. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a “reference change” for comparing two consecutive measurements. Clin Chem. 1983;29(1):25–30.
62. Ricós C, Cava F, García-Lario JV, Hernández A, Iglesias N, Jiménez CV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. Scand J Clin Lab Invest. 2004;64(3):175–84.
63. Ricós C, Iglesias N, García-Lario JV, Simón M, Cava F, Hernández A, et al. Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. Ann Clin Biochem. 2007;44(4):343–52.
64. Boyd JC, Harris EK, Zinder O. Utility of reference change values for the monitoring of inpatient laboratory data. In: Optimal use of the clinical laboratory: 5th international meeting on clinical laboratory organization and management. Haifa; 1985. p. 26–9.
65. Røraas T, Støve B, Petersen PH, Sandberg S. Biological variation: the effect of different distributions on estimated within-person variation and reference change values. Clin Chem. 2016;62(5):725–36.
66. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. Clin Chem. 2006;52(8):1602–3.
67. Plebani M, Lippi G. Biological variation and reference change values: an essential piece of the puzzle of laboratory testing. CCLM. 2012;50(2):189–90.
68. Randell EW, Yenice S, Khine Wamono AA, Orth M. Autoverification of test results in the core clinical laboratory. Clin Biochem. 2019;73:11–25.
69. Randell EW, Yenice S. Delta checks in the clinical laboratory. Crit Rev Clin Lab Sci. 2019;56(2):75–97.
70. Fraser CG. Making better use of differences in serial laboratory results. Ann Clin Biochem. 2012;49(1):1–3.
71. Coskun A. Diagnosis based on population data versus personalized data: the evolving paradigm in laboratory medicine. Diagnostics. 2024;14(19):2135.
72. Coşkun A, Sandberg S, Unsal I, Cavusoglu C, Serteser M, Kilercik M, et al. Personalized reference intervals in laboratory medicine: a new model based on within-subject biological variation. Clin Chem. 2021;67(2):374–84.
73. Carobene A, Banfi G, Locatelli M, Vidali M. Personalized reference intervals: from the statistical significance to the clinical usefulness. Clin Chim Acta. 2022;524:203–4.

74. Coskun A, Sandberg S, Unsal I, Cavusoglu C, Serteser M, Kilercik M, et al. Personalized reference intervals: using estimates of within-subject or within-person biological variation requires different statistical approaches. *Clin Chim Acta*. 2022;524:201–2.
75. Coşkun A, Sandberg S, Unsal I, Cavusoglu C, Serteser M, Kilercik M, et al. Personalized and population-based reference intervals for 48 common clinical chemistry and hematology measurands: a comparative study. *Clin Chem*. 2023;69(9):1009–30.
76. Rey RA, Grinspon RP. Normal male sexual differentiation and aetiology of disorders of sex development. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2011;25(2):221–38.
77. Rey R, Lukas-Croisier C, Lasala C, Bedecarrás P. AMH/MIS: what we know already about the gene, the protein and its regulation. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;211(1):21–31.
78. Picard JY, Tran D, Josso N. Biosynthesis of labelled anti-Müllerian hormone by fetal testes: evidence for the glycoprotein nature of the hormone and for its disulfide-bonded structure. *Mol Cell Endocrinol*. 1978;12(1):17–30.
79. Hinck AP. Structural studies of the TGF- $\beta$ s and their receptors – insights into evolution of the TGF- $\beta$  superfamily. *FEBS Letters*. 2012;586(14):1860–70.
80. Hirschhorn T, Di Clemente N, Amsalem AR, Pepinsky RB, Picard JY, Smorodinsky NI, et al. Constitutive negative regulation in the processing of the anti-Müllerian hormone receptor II. *J Cell Sci*. 2015;128(7):1352–64.
81. Wakefield LM, Hill CS. Beyond TGF $\beta$ : roles of other TGF $\beta$  superfamily members in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(5):328–41.
82. Xu HY, Zhang HX, Xiao Z, Qiao J, Li R. Regulation of anti-Müllerian hormone (AMH) in males and the associations of serum AMH with the disorders of male fertility. *Asian J Androl*. 2019;21(2):109.
83. Laurich VM, Trbovich AM, O’Neill FH, Houk CP, Sluss PM, Payne AH, et al. Müllerian inhibiting substance blocks the protein kinase a-induced expression of cytochrome p450 17 $\alpha$ -hydroxylase/C<sub>17-20</sub> lyase mRNA in a mouse Leydig cell line independent of cAMP responsive element binding protein phosphorylation. *Endocrinology*. 2002;143(9):3351–60.
84. Pellatt L, Rice S, Dilaver N, Heshri A, Galea R, Brincat M, et al. Anti-Müllerian hormone reduces follicle sensitivity to follicle-stimulating hormone in human granulosa cells. *Fertil Steril*. 2011;96(5):1246–51.
85. Sonigo C, Beau I, Grynberg M, Binart N. AMH prevents primordial ovarian follicle loss and fertility alteration in cyclophosphamide-treated mice. *FASEB J*. 2019;33(1):1278–87.
86. Gowkielewicz M, Lipka A, Zdanowski W, Waśniewski T, Majewska M, Carlberg C. Anti-Müllerian hormone: biology and role in endocrinology and cancers. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2024;15:1468364.
87. Josso N, Picard JY. Genetics of anti-Müllerian hormone and its signaling pathway. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2022;36(1):101634.

88. Dresser DW, Jamin SP, Atkins CJ, Guerrier D. An expressed GNRP-like gene shares a bi-directional promoter with SF3A2 (SAP62) immediately upstream of AMH. *Gene*. 2001;277(1–2):163–73.
89. Giulli G, Shen WH, Ingraham HA. The nuclear receptor SF-1 mediates sexually dimorphic expression of Müllerian inhibiting substance, in vivo. *Development*. 1997;124(9):1799–807.
90. Arango NA, Lovell-Badge R, Behringer RR. Targeted mutagenesis of the endogenous mouse *Mis* gene promoter: in vivo definition of genetic pathways of vertebrate sexual development. *Cell*. 1999;99(4):409–19.
91. Edelsztein NY, Valeri C, Lovaisa MM, Schteingart HF, Rey RA. AMH regulation by steroids in the mammalian testis: underlying mechanisms and clinical implications. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022;13:906381.
92. Grinspon RP, Rey RA. Anti-Müllerian hormone and Sertoli cell function in paediatric male hypogonadism. *Horm Res Paediatr*. 2010;73(2):81–92.
93. Tremblay JJ, Robert NM, Viger RS. Modulation of endogenous *gata-4* activity reveals its dual contribution to Müllerian inhibiting substance gene transcription in Sertoli cells. *Mol Endocrinol*. 2001;15(9):1636–50.
94. Tremblay JJ, Viger RS. Transcription factor GATA-4 enhances Müllerian inhibiting substance gene transcription through a direct interaction with the nuclear receptor SF-1. *Mol Endocrinol*. 1999;13(8):1388–401.
95. Lasala C, Schteingart HF, Arouche N, Bedecarrás P, Grinspon RP, Picard JY, et al. SOX9 and SF1 are involved in cyclic AMP-mediated upregulation of anti-Müllerian gene expression in the testicular prepubertal Sertoli cell line SMAT1. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2011;301(3):E539–47.
96. Hossain A, Saunders GF. Role of wilms tumor 1 (WT1) in the transcriptional regulation of the Mullerian-inhibiting substance promoter1. *Biology of Reproduction*. 2003;69(6):1808–14.
97. Lukas-Croisier C, Lasala C, Nicaud J, Bedecarrás P, Kumar TR, Dutertre M, et al. Follicle-stimulating hormone increases testicular anti-Müllerian hormone (AMH) production through Sertoli cell proliferation and a nonclassical cyclic adenosine 5'-monophosphate-mediated activation of the AMH gene. *Mol Endocrinol*. 2003;17(4):550–61.
98. Grinspon RP, Castro S, Brunello FG, Sansó G, Ropelato MG, Rey RA. Diagnosis of male central hypogonadism during childhood. *Journal of the Endocrine Society*. 2021;5(11):bvab145.
99. Edelsztein NY, Racine C, Di Clemente N, Schteingart HF, Rey RA. Androgens downregulate anti-Müllerian hormone promoter activity in the Sertoli cell through the androgen receptor and intact steroidogenic factor 1 sites. *Biol Reprod*. 2018;99(6):1303–12.
100. Valeri C, Lovaisa MM, Racine C, Edelsztein NY, Riggio M, Giulianelli S, et al. Molecular mechanisms underlying AMH elevation in hyperoestrogenic states in males. *Sci Rep*. 2020;10(1):15062.

101. Wilson CA, di Clemente N, Ehrenfels C, Pepinsky RB, Josso N, Vigier B, et al. Mullerian inhibiting substance requires its n-terminal domain for maintenance of biological activity, a novel finding within the transforming growth factor-beta superfamily. *Mol Endocrinol.* 1993;7(2):247–57.
102. Nachtigal MW, Ingraham HA. Bioactivation of Müllerian inhibiting substance during gonadal development by a kex2/subtilisin-like endoprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(15):7711–6.
103. Di Clemente N, Jamin SP, Lugovskoy A, Carmillo P, Ehrenfels C, Picard JY, et al. Processing of anti-Müllerian hormone regulates receptor activation by a mechanism distinct from TGF- $\beta$ . *Mol Endocrinol.* 2010;24(11):2193–206.
104. Pepinsky RB, Sinclair LK, Chow EP, Mattaliano RJ, Manganaro TF, Donahoe PK, et al. Proteolytic processing of mullerian inhibiting substance produces a transforming growth factor-beta-like fragment. *J Biol Chem.* 1988;263(35):18961–4.
105. di Clemente N, Wilson C, Boussin L, Carmillo P, Tizard R, Picard JY, et al. Cloning, expression, and alternative splicing of the receptor for anti- Müllerian hormone. *Mol Endocrinol.* 1994;8(8):1006–20.
106. Hill CS. Transcriptional control by the SMADs. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2016;8(10):a022079.
107. Wang J, Dicken C, Lustbader JW, Tortoriello DV. Evidence for a Müllerian-inhibiting substance autocrine/paracrine system in adult human endometrium. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1195–203.
108. Wang PY, Koishi K, McGeachie AB, Kimber M, MacLaughlin DT, Donahoe PK, et al. Mullerian inhibiting substance acts as a motor neuron survival factor *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(45):16421–5.
109. Malone SA, Papadakis GE, Messina A, Mimouni NEH, Trova S, Imbernon M, et al. Defective AMH signaling disrupts GnRH neuron development and function and contributes to hypogonadotropic hypogonadism. *eLife.* 2019;8:e47198.
110. Wang K, Xu F, Campbell SP, Hart KD, Durham T, Maylie J, et al. Rapid actions of anti-Müllerian hormone in regulating synaptic transmission and long-term synaptic plasticity in the hippocampus. *The FASEB Journal.* 2020;34(1):706–19.
111. Gustafson ML, Lee MM, Scully RE, Moncure AC, Hidakawa T, Goodman A, et al. Müllerian inhibiting substance as a marker for ovarian sex-cord tumor. *N Engl J Med.* 1992;326(7):466–71.
112. Matias-Guiu X, Pons C, Prat J. Müllerian inhibiting substance, alpha-inhibin, and CD99 expression in sex cord-stromal tumors and endometrioid ovarian carcinomas resembling sex cord-stromal tumors. *Hum Pathol.* 1998;29(8):840–5.
113. Geerts I, Vergote I, Neven P, Billen J. The role of inhibins B and antimullerian hormone for diagnosis and follow-up of granulosa cell tumors. *Int J Gynecol Cancer.* 2009;19(5):847–55.
114. Benderradji H, Barbotin AL, Leroy-Billiard M, Prasivoravong J, Marcelli F, Decanter C, et al. Defining reference ranges for serum anti-Müllerian hormone on a large cohort of

normozoospermic adult men highlights new potential physiological functions of amh on fsh secretion and sperm motility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2022;107(7):1878–87.

115. Cimino I, Casoni F, Liu X, Messina A, Parkash J, Jamin SP, et al. Novel role for anti-Müllerian hormone in the regulation of GnRH neuron excitability and hormone secretion. *Nat Commun.* 2016;7(1):10055.
116. Segev DL, Ha TU, Tran TT, Kenneally M, Harkin P, Jung M, et al. Müllerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NF $\kappa$ B-mediated pathway. *J Biol Chem.* 2000;275(37):28371–9.
117. Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferré A, Huhtaniemi I, et al. Receptors for anti-Müllerian hormone on leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(2):594–9.
118. Segev DL, Hoshiya Y, Hoshiya M, Tran TT, Carey JL, Stephen AE, et al. Mullerian-inhibiting substance regulates NF- $\kappa$ B signaling in the prostate in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(1):239–44.
119. Renaud EJ, MacLaughlin DT, Oliva E, Rueda BR, Donahoe PK. Endometrial cancer is a receptor-mediated target for Mullerian inhibiting substance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(1):111–6.
120. Ha TU, Segev DL, Barbie D, Masiakos PT, Tran TT, Dombkowski D, et al. Müllerian inhibiting substance inhibits ovarian cell growth through an Rb- independent mechanism. *J Biol Chem.* 2000;275(47):37101–9.
121. Barbie TU, Barbie DA, MacLaughlin DT, Maheswaran S, Donahoe PK. Mullerian inhibiting substance inhibits cervical cancer cell growth via a pathway involving p130 and p107. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100(26):15601–6.
122. Beck TN, Korobeynikov VA, Kudinov AE, Georgopoulos R, Solanki NR, Andrews-Hoke M, et al. Anti-Müllerian hormone signaling regulates epithelial plasticity and chemoresistance in lung cancer. *Cell Rep.* 2016;16(3):657–71.
123. Barret JM, Nicolas A, Jarry A, Dubreuil O, Meseure D, Passat T, et al. The expression of anti-Müllerian hormone type II receptor (AMHRII) in non-gynecological solid tumors offers potential for broad therapeutic intervention in cancer. *Biology.* 2021;10(4):305.
124. Griswold MD. The central role of Sertoli cells in spermatogenesis. *Semin Cell Dev Biol.* 1998;9(4):411–6.
125. Orth JM, Gunsalus GL, Lamperti AA. Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology.* 1988;122(3):787–94.
126. Haji M, Tanaka S, Nishi Y, Yanase T, Takayanagi R, Hasegawa Y, et al. Sertoli cell function declines earlier than leydig cell function in aging Japanese men. *Maturitas.* 1994;18(2):143–53.

127. Goulis DCh, Mintzioti G, Koliakos N, Hatzichristou D, Papadimas I, Hatzimouratidis K, et al. Inhibin B and anti-Müllerian hormone in spermatic vein of subfertile men with varicocele. *Reprod Sci*. 2011;18(6):551–5.
128. Xu H, Zhang M, Zhang H, Alpadi K, Wang L, Li R, et al. Clinical applications of serum anti-Müllerian hormone measurements in both males and females: an update. *The Innovation*. 2021;2(1):100091.
129. Cocuzza M, Alvarenga C, Pagani R. The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics*. 2013;68:15–26.
130. Utlu A, Ozkaya F, Aksakalli T, Cinislioglu AE, Demirdogen SO, Altay MS, et al. Comparison of unilateral and bilateral microdissection testicular sperm extraction (MD-TESE) in patients with non-obstructive azoospermia: a prospective study. *Int Urol Nephrol*. 2023;55(9):2177–82.
131. Alfano M, Ventimiglia E, Locatelli I, Capogrosso P, Cazzaniga W, Pederzoli F, et al. Anti-Müllerian hormone-to-testosterone ratio is predictive of positive sperm retrieval in men with idiopathic non-obstructive azoospermia. *Sci Rep*. 2017;7(1):17638.
132. Josso N, Rey RA. What does AMH tell us in pediatric disorders of sex development? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2020;11:619.
133. Groth KA, Skakkebaek A, Høst C, Gravholt CH, Bojesen A. Klinefelter syndrome—a clinical update. *J Clin Endocrinol Metab*. 2013;98(1):20–30.
134. Bojesen A, Juul S, Gravholt CH. Prenatal and postnatal prevalence of Klinefelter syndrome: a national registry study. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(2):622–6.
135. Pacenza N, Pasqualini T, Gottlieb S, Knoblovits P, Costanzo PR, Stewart Usher J, et al. Clinical presentation of Klinefelter’s syndrome: differences according to age. *International Journal of Endocrinology*. 2012;2012:1–6.
136. Aksglaede L, Christiansen P, Sørensen K, Boas M, Linneberg A, Main KM, et al. Serum concentrations of anti-Müllerian hormone (AMH) in 95 patients with Klinefelter syndrome with or without cryptorchidism. *Acta Paediatrica*. 2011;100(6):839–45.
137. Boehm U, Bouloux PM, Dattani MT, De Roux N, Dodé C, Dunkel L, et al. European consensus statement on congenital hypogonadotropic hypogonadism—pathogenesis, diagnosis and treatment. *Nature Reviews Endocrinology*. 2015;11(9):547–64.
138. Thakker S, Persily J, Najari BB. Kallman syndrome and central non-obstructive azoospermia. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*. 2020;34(6):101475.
139. Abduljabbar M, Taheini K, Picard JY, Cate RL, Josso N. Mutations of the AMH type II receptor in two extended families with persistent Müllerian duct syndrome: lack of phenotype/genotype correlation. *Horm Res Paediatr*. 2012;77(5):291–7.
140. Josso N, Belville C, Di Clemente N, Picard JY. AMH and AMH receptor defects in persistent müllerian duct syndrome. *Hum Reprod Update*. 2005;11(4):351–6.

141. Kolon TF, Herndon CDA, Baker LA, Baskin LS, Baxter CG, Cheng EY, et al. Evaluation and treatment of cryptorchidism: AUA guideline. *Journal of Urology*. 2014;192(2):337–45.
142. Lee MM, Donahoe PK, Silverman BL, Hasegawa T, Hasegawa Y, Gustafson M, et al. Measurements of serum Müllerian inhibiting substance in the evaluation of children with nonpalpable gonads. *N Engl J Med*. 1997;336(21):1480–6.
143. Demircan M, Akinci A, Mutus M. The effects of orchiopexy on serum anti-Müllerian hormone levels in unilateral cryptorchid infants. *Ped Surgery Int*. 2006;22(3):271–3.
144. Matuszczak E, Hermanowicz A, Debek W, Oksiuta M, Dzienis-Koronkiewicz E, Zelazowska-Rutkowska B. Serum AMH concentration as a marker evaluating gonadal function in boys operated on for unilateral cryptorchidism between 1st and 4th year of life. *Endocrine*. 2012;41(2):334–7.
145. Collins MT, Singer FR, Eugster E. McCune-Albright syndrome and the extraskelatal manifestations of fibrous dysplasia. *Orphanet J Rare Dis*. 2012;7(Suppl 1):S4.
146. Rey RA, Venara M, Coutant R, Trabut JB, Rouleau S, Lahlou N, et al. Unexpected mosaicism of R201H-GNAS1 mutant-bearing cells in the testes underlie macro-orchidism without sexual precocity in McCune–Albright syndrome. *Human Molecular Genetics*. 2006 Dec 15;15(24):3538–43.
147. Jensen CFS, Østergren P, Dupree JM, Ohi DA, Sønksen J, Fode M. Varicocele and male infertility. *Nat Rev Urol*. 2017;14(9):523–33.
148. Li H, Dubocq F, Jiang Y, Tiguert R, Gheiler EL, Dhabuwala CB. Effect of surgically induced varicocele on testicular blood flow and Sertoli cell function. *Urology*. 1999;53(6):1258–62.
149. Vaz ADC, Paccola CC, Mendes TB, Cabral REL, Simas JN, Vendramini V, et al. Sertoli cell alterations in peripubertal varicocele rats: evidence of primary damage on spermatogenesis. *J Histochem Cytochem*. 2020;68(3):185–98.
150. Goulis DG, Iliadou PK, Tsametiis C, Gerou S, Tarlatzis BC, Bontis IN, et al. Serum anti-Müllerian hormone levels differentiate control from subfertile men but not men with different causes of subfertility. *Gynecological Endocrinology*. 2008;24(3):158–60.
151. Trigo RV, Bergadá I, Rey R, Ballerini MG, Bedecarrás P, Bergadá C, et al. Altered serum profile of inhibin B, Pro-alphaC and anti-Müllerian hormone in prepubertal and pubertal boys with varicocele. *Clin Endocrinol*. 2004;60(6):758–64.
152. Matuszczak E, Hermanowicz A, Komarowska M, Debek W. Serum AMH in physiology and pathology of male gonads. *Int J Endocrinol*. 2013;2013(1):1–6.
153. Namkung J, Song JY, Jo HH, Kim MR, Lew YO, Donahoe PK, et al. Müllerian inhibiting substance induces apoptosis of human endometrial stromal cells in endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012;97(9):3224–30.
154. Kontogiannis S, Markantes G, Stamou M, Tsagkarakis M, Mamali I, Giannitsas K, et al. Anti-Müllerian hormone: a novel biomarker for aggressive prostate cancer? emerging evidence from a prospective study of radical prostatectomies. *Hormones*. 2024;23(2):297–304.

155. Leader B, Baker VL. Maximizing the clinical utility of antimüllerian hormone testing in women's health. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*. 2014;26(4):226–36.
156. Punchoo R, Bhoora S. Variation in the measurement of anti-Müllerian hormone – what are the laboratory issues? *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:719029.
157. Kumar A, Kalra B, Patel A, McDavid L, Roudebush WE. Development of a second generation anti-Müllerian hormone (AMH) ELISA. *Journal of Immunological Methods*. 2010;362(1–2):51–9.
158. Li HWR, Robertson DM, Burns C, Ledger WL. Challenges in measuring AMH in the clinical setting. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2021;12:691432.
159. Rustamov O, Smith A, Roberts SA, Yates AP, Fitzgerald C, Krishnan M, et al. Anti-Mullerian hormone: poor assay reproducibility in a large cohort of subjects suggests sample instability. *Hum Reprod*. 2012;27(10):3085–91.
160. Han X, McShane M, Sahertian R, White C, Ledger W. Pre-mixing serum samples with assay buffer is a prerequisite for reproducible anti-Mullerian hormone measurement using the Beckman Coulter Gen II assay. *Hum Reprod*. 2014;29(5):1042–8.
161. Li HWR, Wong BPC, Ip WK, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. Comparative evaluation of three new commercial immunoassays for anti-Müllerian hormone measurement. *Hum Reprod*. 2016;31(12):2796–802.
162. Turner K, Larson B, Willrich MA, Bornhorst J. Assessment of complement interference in anti-Müllerian hormone (AMH) immunoassays. *Am J Clin Pathol*. 2018;150(suppl\_1):S158–9.
163. Goux HJ, Vu BV, Wasden K, Alpadi K, Kumar A, Kalra B, et al. Development of a quantitative fluorescence lateral flow immunoassay (LFIA) prototype for point-of-need detection of anti-Müllerian hormone. *Practical Laboratory Medicine*. 2023;35:e00314.
164. Li J, Hu S, Zheng L, Xu L, Wu Y, Deng B. Electrochemiluminescence immunosensor using a lanthanum-based metal-organic framework as signal probe and Cu<sub>2</sub>MoS<sub>4</sub> as a co-reaction promoter for the sensitive detection of anti-Müllerian hormone. *Talanta*. 2025;285:127406.
165. Gassner D, Jung R. First fully automated immunoassay for anti-Müllerian hormone. *CCLM*. 2014;52(8):1143–52.
166. Pankhurst MW, McLennan IS. Human blood contains both the uncleaved precursor of anti-Müllerian hormone and a complex of the NH<sub>2</sub>- and COOH-terminal peptides. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2013;305(10):E1241–7.
167. Ferguson J, Hockley J, Rigsby P, Burns C. Establishment of a WHO reference reagent for anti-Mullerian hormone. *Reprod Biol Endocrinol*. 2020;18(1):86.
168. Guibourdenche J, Lucidarme N, Chevenne D, Rigal O, Nicolas M, Luton D, et al. Anti-Müllerian hormone levels in serum from human foetuses and children: pattern and clinical interest. *Mol Cell Endocrinol*. 2003;211(1–2):55–63.
169. Wang J, Jiang L, Zhang X, Gong S, Chen M, Hu X, et al. Age-specific reference intervals for anti-Müllerian hormone in Chinese boys: a population-based study. *Clin Chim Acta*. 2020;506:154–9.

170. Ramezani Tehrani F, Mansournia MA, Solaymani-Dodaran M, Minoos S, Azizi F. Serum variations of anti-müllerian hormone and total testosterone with aging in healthy adult Iranian men: a population-based study. *Lobaccaro JMA, editor. PLoS ONE*. 2017;12(7):e0179634.
171. Woloszynek RR, Brito LP, Batista MC, Valassi HPL, Mendonca BB, Brito VN. Validation of an immunoassay for anti-Müllerian hormone measurements and reference intervals in healthy Brazilian subjects. *Ann Clin Biochem*. 2015;52(1):67–75.
172. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem*. 2012;58(9):1306–13.
173. Korkmaz S, Zarasız G, Göksülük D, Senes M, Sönmez C, Yucel D. BioVar: an online biological variation analysis tool. *Turk Biyokim Derg*. 2020;45(5):479–89.
174. Carobene A, Marino I, Coşkun A, Serteser M, Unsal I, Guerra E, et al. The EuBIVAS project: within- and between-subject biological variation data for serum creatinine using enzymatic and alkaline picrate methods and implications for monitoring. *Clin Chem*. 2017;63(9):1527–36.
175. Burdick RK, Graybill FA. Confidence intervals on variance components. Boca Raton: CRC Press; 1992.
176. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *CCLM*. 2004;42(7):758–64.
177. Coskun A, Ertaylan G, Pusparum M, Van Hoof R, Kaya ZZ, Khosravi A, et al. Advancing personalized medicine: integrating statistical algorithms with omics and nano-omics for enhanced diagnostic accuracy and treatment efficacy. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*. 2024;1870(7):167339.
178. Bartlett WA, Braga F, Carobene A, Coşkun A, Prusa R, Fernandez-Calle P, et al. A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *CCLM*. 2015;53(6):879–85.
179. Carobene A, Aarsand AK, Bartlett WA, Coskun A, Diaz-Garzon J, Fernandez-Calle P, et al. The European biological variation study (EuBIVAS): a summary report. *CCLM*. 2022;60(4):505–17.
180. Hadlow N, Brown SJ, Habib A, Wardrop R, Joseph J, Gillett M, et al. Quantifying the intraindividual variation of antimüllerian hormone in the ovarian cycle. *Fertil Steril*. 2016;106(5):1230–7.

## 10.EKLER

### Ek 1: Çalışmaya Katılım Formu

#### Demografik Veriler

Doğum Tarihi: \_\_\_\_\_ Cinsiyet: [ ] Kadın [ ] Erkek Irk: \_\_\_\_\_

Boy: \_\_\_\_\_ Kilo: \_\_\_\_\_ Vücut Kütle İndeksi (VKİ): \_\_\_\_\_

#### Yaşam Tarzı

1. Son olarak ne zaman yemek yediniz? \_\_\_\_\_

2. Özel bir diyet uyguluyor musunuz? - [ ] Evet - [ ] Hayır

- Eğer "Evet" ise, uyguladığınız diyetin türünü belirtiniz. \_\_\_\_\_

3. Alkol tüketiyor musunuz? - [ ] Evet - [ ] Hayır

- Eğer "Evet" ise: Ne sıklıkla alkol tüketiyorsunuz?

- [ ] Günlük - [ ] Haftada birkaç kez - [ ] Haftada bir - [ ] Ayda birkaç kez - [ ] Daha seyrek

- Ortalama olarak, bir oturumda ne kadar alkol tüketiyorsunuz? (Lütfen birim belirtiniz) \_\_\_\_

4. Sigara kullanıyor musunuz? - [ ] Evet - [ ] Hayır - [ ] Geçmişte kullandım, bıraktım

- Eğer "Evet" ise:

- Günde kaç adet sigara içiyorsunuz? \_\_\_\_\_

- Sigara kullanım süreniz ne kadar? (Lütfen yıl olarak belirtiniz) \_\_\_\_\_

5. Ne sıklıkla egzersiz yapıyorsunuz?

- [ ] Günlük - [ ] Haftada birkaç kez - [ ] Haftada bir - [ ] Ayda birkaç kez - [ ] Daha seyrek

Aktivitenin derecesi? (Hafif) 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 (Ağır)

- Her bir egzersiz seansınızın süresi ortalama ne kadar? (Lütfen dakika olarak belirtiniz) \_\_\_\_

- Hangi tür egzersizleri yapıyorsunuz? (Lütfen belirtiniz) \_\_\_\_\_

#### Tıbbi Durum

1. En son ne zaman hasta oldunuz? (Lütfen tarih belirtiniz) \_\_\_\_\_

2. Son bir yıl içinde hastaneye yattınız mı? - [ ] Evet - [ ] Hayır

- Eğer "Evet" ise, yatış sebebinizi belirtiniz. \_\_\_\_\_

3. Herhangi bir alerjiniz var mı? - [ ] Evet - [ ] Hayır  
- Eğer "Evet" ise, alerjinizin türünü ve etkilerini belirtiniz. \_\_\_\_\_
4. Kan basıncınızı biliyor musunuz? (Lütfen belirtiniz) \_\_\_\_\_
5. Düzenli olarak doktor kontrolü altında mısınız? - [ ] Evet - [ ] Hayır  
- Eğer "Evet" ise sebebinizi belirtiniz. \_\_\_\_\_
6. Düzenli olarak ilaç kullanıyor musunuz? - [ ] Evet - [ ] Hayır  
- Eğer "Evet" ise, kullandığınız ilacı, dozu ve kullanım amacını belirtiniz. \_\_\_\_\_
7. Vitamin takviyeleri veya bitkisel ilaçlar kullanıyor musunuz? - [ ] Evet - [ ] Hayır  
- Eğer "Evet" ise, hangi takviyeleri veya bitkisel ilaçları kullandığınızı belirtiniz. \_\_\_\_\_
8. Tehlikeli kimyasallara maruz kalma durumunuz oldu mu? - [ ] Evet - [ ] Hayır  
- Eğer "Evet" ise, hangi kimyasallara maruz kaldığınızı belirtiniz. \_\_\_\_\_

#### Aile Geçmişi

Ailenizde aşağıda belirtilen hastalıklardan herhangi birisi var mı? Varsa evet işaretleyiniz/yoksa hayır işaretleyiniz ve boşluğa hangi aile üyesinde görüldüğünü ve biliyorsanız hastalığın türü/tanı ismini belirtiniz.

1. Kanser - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
2. Kardiyovasküler Hastalık - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
3. Böbrek Hastalığı - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
4. Diyabet - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
5. Karaciğer Hastalığı- [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
6. Tiroid Hastalığı - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
7. Talasemi Sendromu ve diğer Hemoglobinopatiler - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
8. Nörolojik Hastalık - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_
9. Ruhsal Hastalık - [ ] Evet - [ ] Hayır \_\_\_\_\_

**Ek 2: 2–4. Haftalarda Numune Alımında Kullanılan Kısa Takip Formu**

Tarih (gün/ay/yıl): \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_ - \_\_\_\_\_

Numune Alma Saati: \_\_\_\_\_

1. Aç mısınız?  EVET  HAYIR

En son saat kaçta yemek yediniz? \_\_\_\_\_

2. Son 48 içerisinde alkollü içecek tükettiniz mi?  EVET  HAYIR

Evet ise türünü ve miktarını belirtiniz.

\_\_\_\_\_

3. Sigara içiyor musunuz?  EVET  HAYIR

Eğer evet ise, en son ne zaman içtiniz? \_\_\_\_\_

4. Özel bir diyet uyguluyor musunuz?  EVET  HAYIR

Eğer evet ise, ne tür bir diyet?

\_\_\_\_\_

5. Son bir hafta içinde hasta oldunuz mu?  EVET  HAYIR

Eğer evet ise, hastalığı ve zamanı açıklayın:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

6. Herhangi bir ilaç veya vitamin/mineral takviyesi alıyor musunuz?  EVET  HAYIR

Eğer evet ise, ne için? (Her bir ilaç için adı, dozu ve sıklığını açıklayın): \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

7. Geçen hafta herhangi bir fiziksel aktivite yaptınız mı?  EVET  HAYIR

Eğer evet ise, aktivitenin türünü belirtin ve açıklayın:

\_\_\_\_\_

### Ek 3: Bireylerin VKİ'leri ve ziyaret ölçümleri

Birey no* (Yaş)	1 (28)	2 (35)	3 (35)	4 (24)	5 (22)	6 (23)	7 (36)	8 (36)	9 (28)	10 (24)
<b>VKI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	29,8	19,4	28,1	27,8	22,7	26,5	26,8	27,8	25,1	27,4
<b>WBC (10<sup>3</sup>/µL)</b>	8,69	5,25	7,29	7,04	7,66	5,54	7,88	8,6	4,71	5,73
<b>RBC (10<sup>6</sup>/µL)</b>	5,52	5,15	5,53	5,49	5,17	5,71	5,76	5,11	4,7	5,39
<b>HB (g/dL)</b>	15,8	16,1	15,6	17,1	15	16	16,5	15,2	14,7	15
<b>HTC (%)</b>	46,1	47,4	45,6	48,3	46,9	47,2	47	43,9	41,7	44,6
<b>MCV (fL)</b>	83,5	92	82,5	88	90,7	82,7	81,6	85,9	88,7	82,7
<b>PLT (10<sup>3</sup>/µL)</b>	235	148	179	263	261	246	212	280	199	230
<b>Glukoz (mg/dL)</b>	84,1	78,2	80,6	89,1	85,7	92,6	92,7	85,6	77,1	87,1
<b>Kolesterol (mg/dL)</b>	166,5	137	164,2	168	183	206,2	233,7	156,2	158,1	97,8
<b>FSH (mIU/mL)</b>	2,53	4,1	3,96	2,02	2,51	2,16	3,42	2,04	2,8	3,18
<b>LH (mIU/mL)</b>	2,36	6,73	6,21	4,22	4,29	4,27	2,62	4,83	3,86	3
<b>Testosteron (ng/mL)</b>	3,2	6,74	4,14	5,71	4,96	4,32	2,15	3,32	4,44	3,36
<b>Kreatinin (mg/dL)</b>	1,06 (1,02 – 1,16)	0,89 (0,83 – 0,93)	0,94 (0,89 – 0,97)	0,87 (0,83 – 0,95)	0,93 (0,91 – 0,98)	0,92 (0,87 – 0,95)	1,02 (0,97 – 1,05)	0,92 (0,9 – 0,98)	0,86 (0,8 – 0,88)	0,97 (0,91 – 0,99)
<b>Trigliserit (mg/dL)</b>	154,15 (128,7 – 167,7)	104,2 (86,4 – 112,6)	128,85 (98,1 – 160,2)	103,4 (87,9 – 115,2)	132,2 (118 – 146,7)	121,65 (109,5 – 131,6)	114,95 (100 – 147,7)	139,95 (107,1 – 196,9)	103,95 (75,8 – 121,1)	27,35 (23,3 – 32,2)
<b>GGT (U/L)</b>	22,5 (17 – 26)	21 (20 – 21)	17 (15 – 19)	21 (20 – 25)	19,5 (15 – 33)	12 (11 – 12)	15 (13 – 16)	21 (19 – 23)	22,5 (21 – 23)	10,5 (10 – 13)
<b>ALT (U/L)</b>	20,25 (17,2 – 24,9)	9,75 (8,5 – 10,9)	21,7 (19,2 – 25,6)	29,55 (28,4 – 37,6)	17,95 (16,1 – 28,3)	16,25 (15,3 – 17,3)	22,9 (20,3 – 27,7)	20,05 (18,4 – 23,7)	22,45 (20,5 – 30,2)	13,4 (11,4 – 15,7)
<b>CK (U/L)</b>	129,5 (100 – 167)	68 (62 – 72)	70 (66 – 91)	105,5 (98 – 247)	148,5 (136 – 175,1)	131,5 (114 – 216)	78 (61 – 91)	67,5 (65 – 79)	189 (177 – 204)	100 (94 – 111)
<b>CRP (mg/L)</b>	1,12 (0,86 – 1,77)	1,3 (0,98 – 4,63)	2,16 (1,91 – 2,72)	2,1 (0,94 – 3,63)	0,74 (0,6 – 0,77)	1,15 (0,78 – 1,64)	0,6 (0,6 – 0,71)	1,44 (1,08 – 4,42)	0,83 (0,81 – 1,01)	0,6 (0,6 – 0,6)
<b>L</b>	10 (9 – 21)	7,5 (6 – 9)	9 (8 – 13)	8,5 (7 – 11)	10 (7 – 12)	7 (6 – 9)	10,5 (10 – 12)	10,5 (10 – 12)	7 (6 – 8)	8 (7 – 9)
<b>H</b>	13,5 (7 – 17)	9 (6 – 9)	10,5 (10 – 12)	14,5 (8 – 15)	12 (6 – 13)	7,5 (5 – 12)	13 (11 – 15)	10,5 (9 – 18)	12 (7 – 13)	12,5 (9 – 18)
<b>I</b>	1 (1 – 2)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1,5 (1 – 2)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1,5 (1 – 2)	1 (1 – 1)

Referans aralıklar: Glukoz 74-109 mg/dL, Kreatinin 0,7-1,2 mg/dL, T. Kolesterol (Total Kolesterol) 3-200 mg/dL, Trigliserit 0-200 mg/dL, GGT 10-17 U/L, ALT 0-41 U/L, CK 39-308 U/L, CRP 0,15-5 mg/L, FSH 1,5-12,4 mIU/mL, LH 1,7-8,6 mIU/mL, T. Testosteron (Total Testosteron) 2,49-8,36 ng/mL, WBC 4,6-10,2 10<sup>3</sup>/µL, RBC 4,04-6,13 10<sup>6</sup>/µL, HB 12-18,1 g/dL, HTC 36-53,7 %, MCV 86,6-102 fL, PLT 142-424 10<sup>3</sup>/µL

Kreatinin, Trigliserit, GGT, ALT, CK, CRP ve serum indeks (Lipemi (L), Hemoliz (H) ve İtker (I)) ölçümleri 4 haftalık ölçümlerdir ve medyan (minimum ve maksimum) olarak gösterilmektedir.

\*1-10. bireylerin sonuçları

#### Ek 4: Bireylerin VKİ'leri ve vizit ölçümleri

Birey no* (Yaş)	11 (36)	12 (38)	13 (23)	14 (37)	15 (23)	16 (22)	17 (23)	18 (22)	19 (38)	20 (23)	21 (31)
<b>VKI (kg/m<sup>2</sup>)</b>	22,2	27,6	23,5	25,6	21,2	27,8	21,9	25,9	24,4	22	25,7
<b>WBC (10<sup>3</sup>/μL)</b>	4,7	6,22	5,94	4,57	6,85	4,66	6,62	5,76	6,58	4,69	6,8
<b>RBC (10<sup>6</sup>/μL)</b>	5,07	5,68	5,46	5,53	6,25	5,49	5,92	4,73	5,54	5,87	5,24
<b>HB (g/dL)</b>	14,1	16,3	14,7	15,9	16,5	17	16,9	14,3	16,2	16,9	15,6
<b>HTC (%)</b>	42	47,8	47,2	46,2	51	49,7	51,3	44,1	47,9	51,3	46
<b>MCV (fL)</b>	82,8	84,2	86,4	83,5	81,7	90,5	86,7	93,2	86,5	87,4	87,8
<b>PLT (10<sup>3</sup>/μL)</b>	161	245	215	265	245	189	270	294	310	185	224
<b>Glukoz (mg/dL)</b>	81,3	88,9	86,3	83	80,6	82,3	75	89,2	94,9	84,7	84,2
<b>Kolesterol (mg/dL)</b>	141,7	151,2	120,6	179	132,5	143,5	156	169,6	197,5	183,7	174,6
<b>FSH (mIU/mL)</b>	1,48	1,84	3,61	3,09	2,37	3,39	3,45	1,75	2,69	2,87	3,34
<b>LH (mIU/mL)</b>	4,95	2,1	5,34	2,99	5,04	4,23	7,17	6,4	3,7	4,65	4,06
<b>Testosteron (ng/mL)</b>	6,12	3,13	4,41	5,47	6,53	5,18	5,2	8,68	4,38	6,64	3,83
<b>Kreatinin (mg/dL)</b>	0,71 (0,64 – 0,73)	0,91 (0,89 – 0,99)	0,81 (0,75 – 0,87)	1,01 (0,88 – 1,05)	0,85 (0,82 – 0,93)	0,77 (0,75 – 0,88)	1,03 (0,99 – 1,17)	0,98 (0,96 – 0,99)	0,92 (0,81 – 0,94)	0,94 (0,85 – 1,02)	0,87 (0,84 – 0,94)
<b>Trigliserit (mg/dL)</b>	74,45 (50,5 – 123,2)	177,7 (129,7 – 205,5)	61,15 (50,6 – 74,4)	85,35 (74,7 – 93,2)	98 (84,1 – 103,9)	97,6 (63,7 – 125,6)	165,4 (127,3 – 190,3)	61,4 (49,9 – 68,4)	177,55 (120,1 – 197,3)	51,75 (39,7 – 73,3)	100,3 (80,7 – 112,7)
<b>GGT (U/L)</b>	7 (5 – 8)	17 (16 – 18)	15 (13 – 17)	9,5 (9 – 11)	14 (13 – 16)	25 (20 – 37)	15,5 (14 – 16)	14,5 (14 – 16)	14,5 (14 – 15)	16 (15 – 16)	17,5 (17 – 18)
<b>ALT (U/L)</b>	18,85 (18,6 – 22,9)	20,5 (19,1 – 26,3)	10,6 (8,6 – 14,3)	14,85 (11,5 – 15,7)	13,1 (12,2 – 15,4)	15,25 (11,8 – 20)	12,15 (11,2 – 14,6)	27,55 (26,1 – 29,4)	21,85 (18,8 – 25,8)	12,65 (12 – 14,5)	32,8 (28,3 – 38)
<b>CK (U/L)</b>	81,5 (77 – 93)	139 (135 – 165)	114,5 (94 – 133)	181,5 (169 – 188)	118 (110 – 142)	81 (64 – 162)	64 (50 – 78)	161 (140 – 257)	52 (51 – 61)	114,5 (96 – 130)	143,5 (133 – 155)
<b>CRP (mg/L)</b>	2,5 (1,65 – 4,87)	0,6 (0,6 – 0,97)	0,63 (0,6 – 0,95)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,6 (0,6 – 1,04)	0,6 (0,6 – 0,6)	0,6 (0,6 – 0,6)	1,02 (0,78 – 1,15)	0,6 (0,6 – 0,6)	1,93 (1,69 – 2,36)
<b>L</b>	7 (5 – 17)	10,5 (8 – 16)	8 (4 – 10)	8 (5 – 10)	9 (8 – 11)	9 (7 – 11)	10 (9 – 13)	8 (6 – 9)	11 (9 – 13)	8 (7 – 11)	8,5 (8 – 10)
<b>H</b>	12 (7 – 20)	14,5 (12 – 21)	14 (10 – 27)	12 (10 – 13)	11,5 (6 – 16)	17 (13 – 24)	10,5 (8 – 11)	8 (6 – 11)	11,5 (8 – 16)	11 (10 – 11)	10 (6 – 16)
<b>I</b>	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	2 (2 – 3)	1 (1 – 1)	1,5 (1 – 2)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)	1 (1 – 1)

Referans aralıklar: Glukoz 74-109 mg/dL, Kreatinin 0,7-1,2 mg/dL, T. Kolesterol (Total Kolesterol) 3-200 mg/dL, Trigliserit 0-200 mg/dL, GGT 10-17 U/L, ALT 0-41 U/L, CK 39-308 U/L, CRP 0,15-5 mg/L, FSH 1,5-12,4 mIU/mL, LH 1,7-8,6 mIU/mL, T. Testosteron (Total Testosteron) 2,49-8,36 ng/mL, WBC 4,6-10,2 10<sup>3</sup>/μL, RBC 4,04-6,13 10<sup>6</sup>/μL, HB 12-18,1 g/dL, HTC 36-53,7 %, MCV 86,6-102 fL, PLT 142-424 10<sup>3</sup>/μL

Kreatinin, Trigliserit, GGT, ALT, CK, CRP ve serum indeks (Lipemi (L), Hemoliz (H) ve İkter (I)) ölçümleri 4 haftalık ölçümlerdir ve medyan (minimum ve maksimum) olarak gösterilmektedir.

\*11-21. bireylerin sonuçları