

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERKORTİZOLEMİNİN DIŞLANMASI
GEREKEN HASTALARDA İMMUNOASSAY
VE TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİ
YÖNTEMLERİ İLE ÖLÇÜLEN TÜKÜRÜK
KORTİZOLÜNÜN TANISAL DEĞERİ VE
DİÜRNAL RİTMİ ORTAYA KOYMADAKİ
BAŞARISININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

Hüsniye Şahin

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

İZMİR-2021

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2014970078

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HİPERKORTİZOLEMİNİN DIŞLANMASI
GEREKEN HASTALARDA İMMUNOASSAY
VE TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİ
YÖNTEMLERİ İLE ÖLÇÜLEN TÜKÜRÜK
KORTİZOLÜNÜN TANISAL DEĞERİ VE
DİÜRNAL RİTMİ ORTAYA KOYMADAKİ
BAŞARISININ DEĞERLENDİRİLMESİ**

**MOLEKÜLER TIP
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

HÜSNIYE ŞAHİN

Danışman Öğretim Üyesi: Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2018.KB.SAG.083 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSL.MSc-2014970078

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı,
Yüksek Lisans programı öğrencisi Hüsniye Şahin ‘**Hiperkortizoleminin Dışlanması
Gereken Hastalarda İmmunoassay ve Tandem Kütle Spektrometri Yöntemleri ile
Ölçülen Tükürük Kortizolünün Tanısal Değeri ve Diüurnal Ritmi Ortaya
Koymadaki Başarısının Değerlendirilmesi**’ konulu Yüksek Lisans tezini 25.01.2021
tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

Dr. Öğr. Üyesi Gamze TUNA

BAŞKAN

Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL

ÜYE

Prof. Dr. Gül Güner AKDOĞAN

ÜYE

Prof. Dr. Abdullah Serkan YENER

YEDEK ÜYE

Dr. Öğr. Üyesi Melek PEHLİVAN

YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER	i
TABLO DİZİNİ	v
ŞEKİL DİZİNİ	vii
KISALTMALAR	ix
TEŞEKKÜR	xi
ÖZET	1
ABSTRACT	4
1.GİRİŞ VE AMAÇ	7
2.GENEL BİLGİLER	10
2.1. Adrenal Bez Anatomisi ve Fizyolojisi	10
2.2.Steroid Biyokimyası	11
2.2.1. Glukokortikoidler	11
2.2.1.1. Glukokortikoid Salınımı	11
2.2.1.2. Glukokortikoid Salınımının Düzenlenmesi	12
2.2.1.2.1. Hipotalamik- Hipofiz-Adrenal Eksen	13
2.2.1.2.2. Stres Tepkisi ve İmmün-Endokrin Eksen	15
2.2.1.2.3. Sirkadiyen Ritim	15
2.2.1.2.4. Feedback inhibisyon	16
2.2.2. Kortizol Bağlayıcı Globulin (CGB) ve Kortikosteroid Hormon Metabolizması	17
2.2.3. Kortizolün Etkileri	18
2.2.4. Kortizol ile İlişkili Hastalıklar	19
2.2.4.1. Glukokortikoid Yetmezlik Hastalıkları	19
2.2.4.1.1. Primer Adrenokortikal Yetmezlik (Addison hastalığı)	20
2.2.4.1.2. Sekonder Adrenokortikal Yetmezlik	20
2.2.4.1.3. Konjenital Adrenal Hiperplazi	20
2.2.4.2. Glukokortikoid Fazlalığı Hastalıkları	20
2.2.4.2.1. Cushing Sendromu	20
2.2.4.2.1.1. ACTH Bağımlı Nedenler	22
2.2.4.2.1.1.1. Cushing Hastalığı	22
2.2.4.2.1.1.2. Ektopik ACTH Sendromu	22
2.2.4.2.1.1.3. Ektopik CRH Sendromu	22
2.2.4.2.1.1.4. Makronodüler Adrenal Hiperplazi (MAH)	22

2.2.4.2.1.2. ACTH Bağımsız Nedenler	23
2.2.4.2.1.2.1. Adrenal Adenom ve Karsinom	23
2.2.4.2.1.2.2. Primer Pigmentli Nodüler Adrenal Hiperplazi ve Carney Sendromu	23
2.2.4.2.1.2.3. McCune-Albright Sendromu	23
2.2.4.2.1.2.4. Makronodüler Hiperplazi (AIMAH)/Aberrant Reseptörü İfadesi	23
2.2.4.2.1.2.5. İyatrojenik Cushing Sendromu	24
2.2.4.2.1.3. Diğer Nedenler	24
2.2.4.2.2. Subklinik Cushing Sendromu (SCS)	25
2.2.5. HHA Aks Testleri	25
2.2.6. Kortizol Ölçüm Metotları	27
2.2.7. Metot Validasyonu	28
2.2.7.1. Doğrusallık (Linearite) ve Ölçüm Aralığı	29
2.2.7.2. Doğruluk	30
2.2.7.3. Analitik Ölçüm Limitleri	30
2.2.7.3.1. LOB	30
2.2.7.3.2. LOD	30
2.2.7.3.3. LOQ	31
2.2.7.4. Kesinlik (Precision, Tekrarlanabilirlik)	31
2.2.7.5. Geri Kazanım	31
2.2.7.6. Referans Aralık Doğrulama	31
2.2.7.7. Taşıma (Carryover)	31
2.2.7.8. Numune Stabilitate Çalışması	32
2.2.7.9. Matriks Etkisi	32
2.2.7.10. Metot Karşılaştırma Çalışması	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	33
3.1. Araştırmanın Tipi	33
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı	33
3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi	33
3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali	34
3.5. Araştırmanın Değişkenleri	34
3.6. Veri Toplama Araçları	35
3.6.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler	35
3.6.2. Tükürük Kortizolü Düzeylerinin LC-MS/MS ile Ölçümü	36
3.6.2.1. LC-MS/MS Ölçüm Prensibi	36

3.6.2.2. LC-MS/MS Koşulları	38
3.6.2.2.1. LC-MS/MS Koşulları Optimizasyon Çalışmaları	38
3.6.2.3. Metot Validasyonu Çalışmaları	40
3.6.2.3.1. Doğruluk (Accuracy)	40
3.6.2.3.2. Doğrusallık (Linearity) ve Ölçüm Aralığı Çalışmaları	41
3.6.2.3.3. Analitik Ölçüm Limitleri	41
3.6.2.3.3.1. LOB	41
3.6.2.3.3.2. LOD ve LOQ	41
3.6.2.3.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik	41
3.6.2.3.5. Geri Kazanım Çalışması	41
3.6.2.3.6. Referans Aralık Doğrulama Çalışması	42
3.6.2.3.7. Taşıma (Carryover) Çalışması	42
3.6.2.3.8. Numune Stabilitate Çalışması	42
3.6.2.3.9. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi	42
3.6.2.3.10. Matris Etkisi Çalışması	43
3.6.2.3.11. Seçicilik (Selectivity)	43
3.6.2.3.12. Metot Karşılaştırma Çalışmaları	43
3.6.2.3.12.1. Tükürük Kortizol Düzeylerinin ELISA Yöntemi ile Çalışılması	44
3.7. Araştırma Planı ve Takvimi	46
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi	46
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	47
3.10. Etik Kurul Onayı	47
4.BULGULAR	48
4.1. LC-MS/MS ile Tükürük Kortizol Düzeyi Ölçüm Yöntemi Optimizasyonu	48
4.2. Metot Validasyonu Çalışmaları Bulguları	51
4.3. ELISA Bulguları	59
4.4. Metot Karşılaştırma Çalışmaları	60
4.5. Çalışma Grubunu Tanımlayıcı Bulgular	70
4.6. Biyokimyasal Analizler	71
4.7. LC-MS/MS ve ELISA Yöntemleri ile Tükürük Kortizol Ölçümleri	72
4.8. Diüurnal Ritim Bulguları	76
4.9. Korelasyon Analizleri	79
5. TARTIŞMA	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	89

7. KAYNAKLAR

91

8. EKLER

100



TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Glukokortikoid fazlalığı ve eksikliği hastalıkları	19
Tablo 2. Endokrin Derneği tarafından tanımlanan CS'nin klinik özellikleri (% prevalans yayınlardaki hasta popülasyonuna göre belirtilmiştir)	21
Tablo 3. Cushing Sendromu'nun sınıflandırılması	21
Tablo 4. Sağlıklı gönüllülerde kütle spektrometrisi ve immünoanaliz gece yarısı tükürük kortizolü (LNSC) referans değerleri	28
Tablo 5. Analitik hata tipleri ve bu hataların belirlenmesi için yapılacak deneyler	29
Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar	35
Tablo 7. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler	36
Tablo 8. HPLC çalışma koşulları	39
Tablo 9. Elisa kiti içinde bulunan malzemeler ve hazırlanma şekilleri	45
Tablo 10. Kortizol için belirlenen bileşik ve kaynak bağımlı parametreler	49
Tablo 11. D4-Kortizol için belirlenen bileşik ve kaynak bağımlı parametreler	50
Tablo 12. Kortizol standartları doğruluk verileri	51
Tablo 13. NIST CRM kontrol sonuçları	51
Tablo 14. 0,1 µg/L, 5 µg/L, 100 µg/L konsantrasyonlarındaki kortizol standartlarına ait gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları	54
Tablo 15. 0,1 µg/L, 5 µg/L, 100 µg/L konsantrasyonları günlerarası tekrarlanabilirlik sonuçları	54
Tablo 16. Referans aralık doğrulama sonuçları	56
Tablo 17. Tükürük kortizol numune stabilite çalışması sonuçları ve hesaplanan % biaslar	57
Tablo 18. Tükürük Kortizol dondurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar	57
Tablo 19. CS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülen tükürük kortizolünün eşik değer, sensitivite ve spesifite tablosu	69
Tablo 20. SCS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülen tükürük kortizolünün eşik değer, sensitivite ve spesifite tablosu	70
Tablo 21. CS, SCS ve NFA gruplarının yaş ve VKİ verileri	71
Tablo 22. CS, SCS ve NFA gruplarının cinsiyet ve sigara kullanım verileri	71
Tablo 23. Biyokimyasal parametre sonuçlarının istatistiksel analizi	72

Tablo 24. Hastaların LC-MS\MS ve ELISA ile 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde toplanan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi bulguları	74
Tablo 25. CS, SCS ve NFA gruplarında LC-MS\MS ve ELISA ile günün üç farklı saatinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri	78
Tablo 26. Tüm gruplara ait korelasyon sonuçları	79



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. Adrenal bez katmanlarının şekilsel gösterimi	11
Şekil 2. Adrenal steroidogeneizde yer alan biyokimyasal yollar	12
Şekil 3. HHA ekseninin aktivasyonu	14
Şekil 4. Normal kişilerde kortizol sirkadyen ritimleri	16
Şekil 5. HHA eksenini geri besleme	16
Şekil 6. Kortizol metabolizmasının başlıca yolları	18
Şekil 7. Tükürük örnekleri toplama protokolü	34
Şekil 8. LC-MS/MS tekniğinin şeması	38
Şekil 9. Kortizol fragmentasyon spektrumu	48
Şekil 10. D4-Kortizol fragmentasyon spektrumu	49
Şekil 11. Kortizol ve internal standart (D4-kortizol) pikleri	50
Şekil 12. Kortizol kalibrasyon grafiği	52
Şekil 13. Kortizol linearite grafiği	52
Şekil 14. Kortizol tespit limiti (Sinyal/Gürültü: S/N) grafiği	53
Şekil 15. Kortizol kantitasyon limiti (Sinyal/ Gürültü: S/N) grafiği	53
Şekil 16. Estriol- metanol-su karışımı pikleri	59
Şekil 17. Tükürük kortizolü ELISA kalibrasyon grafiği	60
Şekil 18. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 08.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği	62
Şekil 19. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 16.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği	62
Şekil 20. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 24.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği	63
Şekil 21. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 08.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi	64
Şekil 22. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 16.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi	65
Şekil 23. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 08.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi	66

Şekil 24. LC-MS/MS ve ELISA 08, 16 ve 24. saatte ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin yöntemler arası korelasyon analizleri	67
Şekil 25. CS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemlerindeki 8-16-24. saatler de alınan tükürük kortizolü ölçümleri için ROC eğrisi	68
Şekil 26. SCS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemlerimindeki 8-16-24. saatler de alınan tükürük kortizolü ölçümleri için ROC eğrisi	69
Şekil 27. Hasta örneğinde tükürük kortizolün total iyon kromatogramı	73
Şekil 28. CS, SCS ve NFA gruplarında LC-MS\MS ile ölçülen tükürük kortizol düzeylerinin box-plot grafikleri	75
Şekil 29. CS, SCS ve NFA gruplarında ELISA ile ölçülen tükürük kortizol düzeylerinin box-plot grafikleri	76
Şekil 30. LC-MS\MS ile ölçülen tükürük kortizolü diüurnal ritim grafiği	78
Şekil 31. ELISA ile ölçülen tükürük kortizolü diüurnal ritim grafiği	79

KISALTMALAR

ACTH:	Adrenokortikotropik hormon
APCI:	Atmosferik basınçta kimyasal iyonlaşma
AUC:	Eğrinin altındaki alan
CBG:	Kortizol bağlayıcı globulin
CLSI:	Klinik laboratuvar standart enstitüsü
CRH:	Kortikotropin salgılayan hormon
CS:	Cushing Sendromu
CV:	Varyasyon katsayısı
DHEA:	Dehidroepiandrosteron
DHEAS:	Dehidroepiandrosteron sülfat
ECLIA:	Electrochemiluminescence immunoassay
EIA:	Enzim immunoassay
EMA:	Avrupa İlaç Ajansı
ELISA:	Enzime bağlı immünosorbent testi
ESI:	Elektrosprey iyonizasyonu
HDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
HHa:	Hipotalamus-hipofiz-adrenal eksen
HPLC:	Yüksek basınçlı sıvı kromatografi
IS:	İnternal standart
LC-MS/MS:	Sıvı kromatografi - tandem kütle spektrometresi
LDL:	Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOB:	Boş sınırı
LOD:	Tespit limiti
LOQ:	Kantitasyon limiti
MF:	Matris faktörü
MRM:	Çoklu reaksiyon izleme
MSH:	Melanin uyarıcı hormon
M/Z:	Kütle/yük
NFA:	Fonksiyonel olmayan adenom
PKA:	Protein kinaz A
POMC:	Proopiomelanokortin
RIA:	Radioimmunoassay

ROC: Alıcı işletim karakteristik eğrileri

RT: Alıkonma zamanı

SCS: Subklinik Cushing Sendromu

SS: Standart sapma

STAR: Siteroidojenik akut düzenleyici protein

SPE: Katı Faz Ekstraksiyon Kartuşu

TEA: Toplam izin verilen hata

THE: Tetrahidrokortizon

THF: Tetrahidrokortizol

TSH: Tiroid uyarıcı hormon

VKİ: Vücut kitle indeksi

1mg DST: 1 miligram deksametazon supresyon testi

TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca değerli bilgilerini ve deneyimlerini benimle paylaşan, desteğine ihtiyaç duyduğum her zaman yanımda olan ve gülen yüzünü eksik etmeyen, çalışmalarımda kendisini örnek aldığım Anabilim Dalı Başkanımız **Sayın Prof. Dr. Gül Hüray İŞLEKEL'e** ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp AD. değerli **öğretim üyelerine,**

Tez çalışmamın gerçekleşmesinde çok emeği geçen, kendisine ne zaman danışsam bana kıymetli zamanını ayırıp sabırla ve büyük bir ilgiyle elinden gelenin fazlasını sunan, her sorun yaşadığımda yanına çekinmeden gidebildiğim, titiz çalışmaları ile bana farklı bakış açıları kazandıran değerli danışman hocam **Sayın Dr. Öğretim Üyesi Gamze TUNA'ya,**

Klinik anlamda yardımlarını esirgemeyen aynı zamanda hasta örneklerinin toplanması ve tüm bilgilerin sağlanması konusunda yanımda olan değerli hocalarım; **Sayın Prof. Dr. Abdullah Serkan YENER, Uzm. Dr. Süleyman Cem ADIYAMAN ve Uzm. Dr. Başak ÖZGEN SAYDAM'a,**

Moleküler Tıp yüksek lisans eğitimim sırasında desteklerini benden esirgemeyen Sağlık Bilimleri Enstitüsü müdürümüz **Sayın Prof. Dr. Hülya ELLİDOKUZ'a,** müdür yardımcımız **Sayın Prof. Dr. Mehmet ERDURAN'a** ve **enstitü çalışanlarına,**

Deneyisel çalışmaları yürüttüğüm süre boyunca destek olan başta Tıbbi Biyokimya AD. Başkanı Sayın **Prof. Dr. Sezer UYSAL** olmak üzere Anabilim Dalı'nın **tüm değerli üyelerine,** Tez çalışmam boyunca hastaların toplanması ve deney aşamalarında desteklerini esirgemeyen ve birlikte çalışmaktan mutluluk duyduğum sevgili çalışma arkadaşlarım **Nazlı Ecem DAL ve Yağmur YAVAŞ'a,**

Bu araştırmaya destek sağlayan **Dokuz Eylül Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi'ne,** Yüksek lisansa başladığım andan itibaren dostluğunu, bilgilerini esirgemeyen, yanlarında çok mutlu olduğum sevgili arkadaşlarım **Burcu AÇIKGÖZ ve Güler GÜL'e**

Tez yazım sürecinde bilgilerini paylaşan, bana her zaman destek olan **Ramazan Uğur BORA'ya,**

Yüksek Lisansa başlamam konusunda beni yüreklendiren ve yanımda olan **Berrin SİBER, Aynur ŞAHİN ve Fatoş AKSU'ya,**

Eğitim hayatım boyunca desteklerini esirgemeyen, yanımda olan hayattaki en büyük şansım **Canım Aileme,** tatlı yeğenim **Çınar'a** ve biricik oğlum **BATU'ya** sonsuz teşekkür ederim.

Hüsniye ŞAHİN

HİPERKORTİZOLEMİNİN DIŞLANMASI GEREKEN HASTALARDA İMMUNOASSAY VE TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMLERİ İLE ÖLÇÜLEN TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN TANISAL DEĞERİ VE DİÜRNAL RİTMİ ORTAYA KOYMADAKİ BAŞARISININ DEĞERLENDİRİLMESİ

**Hüsniye Şahin, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,
Moleküler Tıp Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir**

ÖZET

Giriş ve Amaç: Adrenal adenomlar, adrenal bezin en sık görülen iyi huylu tümörleri olup, görüntülemelerde sıklıkla rastlantısal olarak tespit edilen kitle lezyonlarıdır. Adrenal lezyonların yaklaşık %75-80'ini fonksiyon göstermeyen adrenal adenomlar ve diğer az görülen kitleler, %20-25'ini ise feokromositoma, androjen üreten tümör, primer hiperaldosteronizm, Cushing Sendromu (CS) veya Subklinik Cushing Sendrom (SCS)'una neden olan fonksiyonel adrenal kitleler oluşturur. CS ve SCS tanısında üzerinde görüş birliği sağlanmış olan tarama testi 1 mg deksametazon supresyon testidir (1mg DST). Ancak, aynı bireyde dahi, değişik zamanlarda 1 mg deksametazon sonrası kortizol düzeyleri belirgin değişkenlik ve tutarsızlıklar gösterebilmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, CS tanısında girişimsel olmayıp hastada stres oluşturmayan ve hastaneye yatmayı gerektirmeden ev ortamında bile toplanabilen aynı zamanda yüksek sensitiviteye sahip bir test olan gece yarısı tükürük kortizolünün tarama ve tanı amaçlı kullanılması önerilmektedir.

Bununla birlikte literatürde özellikle adrenal kökenli CS ve/veya SCS tanısında hem gece yarısı hem de gün içi belirli saatlerde alınan örneklerde ölçülen tükürük kortizolünün tanısal değeri üzerine yapılan çok az çalışma bulunmaktadır. Halen adrenal kökenli CS ve SCS tanısında tükürük kortizolünün tarama testi olarak kullanılıp kullanılamayacağı sorusunun cevabı tam olarak anlaşılamamıştır. Tükürük kortizolü ölçümünde kullanılan farklı biyokimyasal metotların varlığı ve sonuçların önemli ölçüde bu teknikler ile değişiklik göstermesi, örnek toplama yöntemleri, testin eşik değeri, duyarlılık ve özgüllüğü konusunda farklı görüşler mevcuttur. Ayrıca yapılan bu çalışmaların çoğu referans yöntem olan tandem kütle spektrometri yerine çapraz reaksiyona neden olabilen metotlarla gerçekleştirilmiştir.

Bu çalışmada sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) ile tükürük kortizolü ölçümü için yöntem geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin tanısal performansının enzim

immünoassay (ELISA) testi ile karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca hiperkortizoleminin dışlanması gereken hastalarda hem gün içi hem de gece yarısı tükürük kortizolü testinin tanısal değeri ve diüurnal ritmi ortaya koymadaki başarısının değerlendirilmesi çalışmanın diğer amacıdır.

Yöntemler: Şubat 2018 ve Mart 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Endokrinoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne gelen CS (n=20), SCS (n=52) hastaları ve fonksiyonel olmayan adenomu (NFA) (n=49) olan kişilerden alınan venöz kan örneklerinde 1 mg deksametazon öncesi ve sonrası serum kortizolü, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), adrenokortikotropik hormon (ACTH), total kolesterol, LDL, HDL, trigliserit ve HbA1c düzeyleri ölçüldü. Kişilerden ayrıca tükürük kortizolü ölçümü için günde üç kez 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde tükürük örnekleri alındı. Tükürük kortizolünün LC-MS/MS ile ölçüm yönteminin geliştirilmesi ve metot validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra örneklerde LC-MS/MS ve ELISA yöntemleri ile kortizol ölçümü gerçekleştirildi. Elde edilen bulgular SPSS 22.0 ve MedCalc 19.6 programları ile değerlendirildi.

Bulgular: Metot validasyonu çalışmaları kapsamında elde edilen kalibrasyon grafiğinin (0.01-10 µg/L) R² değeri 0,9997, linearite grafiğinin (0.5-200 µg/L) R² değeri 0,9999 olarak bulundu. 0.1, 5 ve 100 µg/L standartlar ile çalışma sonucu hesaplanan % doğruluk değerleri %98.8-106.7 aralığında, gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik % CV sonuçları % 2.3-14.9 aralığında hesaplandı. LOD değeri 0.01 µg/L, LOQ değeri 0.1 µg/L olarak bulundu. Matriks etkisi çalışmasında kullanılan altı farklı tükürük örneğinin IS-normalize matriks faktörlerinin % CV değerleri % 1.75-14.19 aralığında hesaplandı. Metot karşılaştırma sonuçları kapsamında çizilen Bland-Altman grafikleri ve Passing-Bablok regresyon analizlerine göre her iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu bulundu. Yapılan ROC analizlerine göre her iki yöntemle günün üç farklı saatinde ölçülen kortizol düzeylerinden özellikle gece yarısı 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeylerinin tanı koydurucu etkinliğinin hem CS hem de SCS hastalarında yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip olduğu belirlendi. Bununla birlikte LC-MS/MS ile saat 16.00'da ölçülen kortizolün tanısal performansı SCS hastalarında ELISA ölçümüne göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

LC-MS/MS ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre; sabah 08.00'de alınan örneklerde ölçülen kortizol sonuçlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Öğleden sonra 16.00'da alınan tükürük örneklerinde hem LC-MS/MS hem de ELISA ile ölçülen tükürük kortizolü düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, SCS ve NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Gece 24.00'da alınan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına

göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca SCS gruplarında da ölçülen kortizol düzeyi NFA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu.

Ölçülen kortizol düzeylerinin diüurnal ritmi ortaya koymadaki durumu değerlendirildiğinde; literatür ile uyumlu olarak CS hastalarında ritmin bozulduğu ve yüksek seyrettiği, SCS hastalarında öğlen ve akşam saatlerine ılımlı yüksek olduğu kontrol grubu olarak çalışılan NFA grubunda ise en yüksek seviyeye sabah en düşük seviyeye ise gece yarısı geldiği bulundu. Böylece tüm gruplar için ölçülen tükürük kortizolünün diurnal ritmi grup özelliklerine uyumlu olarak yansıttığı görüldü. Çalışmamız gruplarının rutin parametrelerinin ölçüm sonuçları ve tükürük kortizolü bulguları ile korelasyonları değerlendirildiğinde; 1mg DST sonuçlarının ELISA 08.00 tükürük kortizolü düzeyi hariç hem LC-MS/MS hem de ELISA ile ölçülen tüm saatler ile orta düzeyde korelasyona sahip olduğu görüldü.

Sonuç: Gerçekleştirilen çalışma sonucunda LC-MS/MS yönteminin tükürük kortizolü ölçümü için oldukça hassas ve güvenilir olduğu, elde edilen bulguların ELISA yöntemi sonuçları ile de uyumlu olduğu gözlemlendi. Ayrıca LC-MS/MS yöntemi ile hastalarda ölçülen tükürük kortizolünün diüurnal ritmi yansıttığı gözlenmiş olup, elde edilen bulguların hiperkortizoleminin ayırıcı tanısına, klinik seyrine ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesine ışık tutacağı düşüncesindeyiz.

Anahtar Sözcükler: Tükürük kortizol, LC-MS/MS, ELISA, Cushing sendromu, Subklinik Cushing Sendromu, Diüurnal ritim

**EVALUATION OF THE SUCCESS OF SALIVARY CORTISOL IN
DETERMINING DIAGNOSTIC VALUE AND DIURNAL RHYTHM AS
MEASURED BY IMMUNOASSAY AND TANDEM MASS SPECTROMETRY
METHODS IN PATIENTS WHO NEEDS TO BE EXCLUDED FROM
HYPERCORTISOLEMIA**

**Hüsniye Şahin, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences,
Department of Molecular Medicine,
35340, Inciraltı, Izmir**

ABSTRACT

Introduction and aim: Adrenal adenomas are the most common benign tumors of the adrenal gland are often incidentally detected in imaging mass lesions. Nonfunctional adrenal adenomas and other rarely seen masses constitute approximately 75-80% of adrenal lesions, whereas functional adrenal masses that cause 20-25% of patients with pheochromocytoma, androgen-producing tumor, primary hyperaldosteronism, Cushing's Syndrome (CS) or Subclinical Cushing Syndrome (SCS) are detected. The agreed screening test for CS and SCS diagnosis is the 1 mg dexamethasone suppression test (1 mg DST). However, even in the same person, cortisol levels may shows significant variability and inconsistencies after 1 mg dexamethasone at different times. In recent studies, it is recommends to use midnight salivary cortisol for screening and diagnostic purposes in CS diagnosis. Salivary cortisol is a test with high sensitivity and for the patient does not cause stress because is noninvasive and the samples can collect at home without requiring hospitalization. However, there are very few studies in the literature especially in the diagnosis of adrenal CS and / or SCS, on the diagnostic value of salivary cortisol measured in samples taken both at midnight and at certain hours of the day. The answer to the question of whether salivary cortisol can be used as a screening test in the diagnosis of adrenal-derived CS and SCS is still not fully understood. There are different opinions about the different biochemical methods used in salivary cortisol measurement and the fact that the results differ significantly with these techniques, sample collection methods, threshold value of the test, sensitivity and specificity. In addition, most of these studies were carried out with methods that can cause cross-reactivity instead of tandem mass spectrometry, which is the reference method.

In this study, it was aimed to develop a method for measuring salivary cortisol by liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) and to compare the diagnostic

performance of the developed method with the enzyme immunoassay (ELISA) test. In addition, evaluation of the diagnostic value of the salivary cortisol test during the day and at midnight and its success in revealing the diurnal rhythm in patients whose hypercortisolemia should be excluded is another aim of the study.

Methods: Patients with CS (n = 20), SCS (n = 52) and non-functional adenoma (NFA) (n = 49) who attended the Dokuz Eylül University (DEU) Faculty of Medicine Endocrinology Outpatient Clinic between February 2018 and March 2019. Serum cortisol before and after 1 mg of dexamethasone, dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), ACTH, total cholesterol, LDL, HDL, triglyceride, HbA1c levels were measured in the venous blood samples taken from the patients. Saliva samples were taken three times a day at 08.00, 16.00 and 24.00 hours for salivary cortisol measurement. After the development of salivary cortisol measurement method with LC-MS/MS and method validation studies were completed, cortisol measurement was performed in the samples by LC-MS/MS and ELISA methods. The findings obtained were evaluated with SPSS 22.0 and Medcalc19.6.

Results: The R² value of the calibration graph (0.01-10 µg / L) obtained within the scope of method validation studies was found to be 0.9997, and the R² value of the linearity graph (0.5-200 µg/L) was found to be 0.9999. Accuracy % values calculated as a result of working with 0.1, 5 and 100 µg/L standards were in the range of 98.8-106.7%, intra-day and inter-day repeatability CV % results were calculated between 2.3-14.9%. LOD value was found as 0.01 µg/L and LOQ value as 0.1 µg/L. The CV % values of the IS-normalized matrix factors of six different saliva samples used in the matrix effect study were calculated between 1.75% and 14.19%. According to method comparison results, both methods were found to be compatible with each other. According to the ROC analysis, it was determined that cortisol levels measured at three different hours of the day by both methods, especially the cortisol levels in samples taken at midnight at 24.00 hours, had high sensitivity and specificity in both CS and SCS patients. However, the diagnostic performance of cortisol, which was measured at 16.00 hours by LC-MS/MS, was found to be significantly higher in SCS patients compared to the ELISA measurement.

According to the measurement results made with LC-MS/MS; There was no statistically significant difference between the groups in the cortisol results measured in the samples taken at 08:00 in the morning. Salivary cortisol level measured by both LC-MS/MS and ELISA in saliva samples taken at 16:00 in the afternoon was found to be significantly higher in the CS group compared to the SCS and NFA groups, but no significant difference was found between the SCS and NFA groups. The cortisol level measured in saliva samples taken at midnight

was found to be significantly higher in the CS group compared to the SCS and NFA groups. In addition, cortisol level measured in SCS groups was found to be significantly higher than the NFA group.

When the situation of measured cortisol levels in revealing the diurnal rhythm is evaluated; Consistent with the literature, it was found that the rhythm was disturbed in CS patients and was moderately high in SCS patients at noon and evening hours, and the highest level in the NFA group, which was studied as the control group, reached the lowest level in the morning and at midnight. Thus, it was observed that salivary cortisol measured for all groups reflected the diurnal rhythm in accordance with the group characteristics. The correlations of the routine parameters of our study groups with the measurement results and salivary cortisol findings were evaluated. It was observed that the 1mg DST results were moderately correlated with all hours measured by both LC-MS/MS and ELISA except ELISA 08.00 salivary cortisol level.

Conclusion: As a result of the study carried out, it was observed that the LC-MS/MS method was very sensitive and reliable for salivary cortisol measurement, and the findings were consistent with the results of the ELISA method. In addition, it has been observed that salivary cortisol measured in patients with the LC-MS/MS method reflects the diurnal rhythm, and we believe that the findings obtained will shed light on the differential diagnosis, clinical course and evaluation of response to treatment of hypercortisolemia.

Key Words: Salivary cortisol, LC-MS/MS, ELISA, Cushing Syndrome, Subclinical Cushing Syndrome, Diurnal rhythm.

1. GİRİŞ VE AMAC

Genel adıyla "stres" hormonu olarak bilinen kortizol, hipotalamus-hipofizer-adrenal (HHA) aksın bir ürünüdür. Ortamdaki değişikliklere yanıt olarak beyin, HHA aksı başlatır. Hipotalamustadaki paraventriküler nükleusun özelleşmiş hücreleri, stres durumlarında kortikotropin salıverici hormon (CRH) salgısından sorumludur. Bu hormon, ön hipofizden adreno-kortikotropik hormon (ACTH) salgılanmasına neden olmaktadır. Salgılanan ACTH ise, adrenal korteksteki zona fasikülatadan kortizol ve katekolaminlerin salınımını sağlamaktadır. Hipotalamus, hipofiz ve adrenal bez arasındaki bu etkileşime “HHA aks” adı verilmektedir. Kortizol, gerek hipotalamik CRH üzerine, gerekse de pitüiter ACTH üzerine negatif geri besleme etkisi ile adrenal korteksten sekresyonu kontrol eder [1]. Stres oluşturan durumlarda organizmanın hayatta kalabilmesi için kortizol önemli role sahiptir [2]. Bu hormon, stres anında adrenal bezlerden birkaç dakika içinde salgılanır ve stresin başlangıcından yaklaşık 15 dakika sonra konsantrasyonu maksimum seviyeye ulaşır. Stresiz koşullar altında kortizol salınımı, sirkadyen ritim veya “kortizol uyanış tepkisi” vasıtasıyla vücut içerisinde düzenlenir [3]. Kortizol sekresyonu, en yüksek değerine sabah erken saatlerde, en düşük düzeyine ise gece yarısı (23:00-02:00 arası) ulaşır [4]. Kortizolün en önemli glukokortikoid hormonu olduğu, fizyolojik düzeylerinin yaşamsal öneme sahip olduğu ve 10-20 mg/gün miktarında üretildiği bilinmektedir. İmmun sistem, kardiyovasküler sistem, kemik yıkım/yeniden yapılanma süreçleri, büyüme/gelişme süreçleri, karbonhidrat, protein, yağ metabolizması, su/elektrolit kan basıncı homeostazı gibi birçok sistemde esansiyeldir [5]. Adrenal lezyonlar, genellikle, adrenal gland ilişkili herhangi bir yakınma ve bulgusu olmayan bireylerde, adrenal dışı organların görüntülenmesi sırasında saptanırlar. Prevelans, radyolojik seriler dikkate alındığında orta yaşlı popülasyonda %2-4, ileri yaş grubunda ise %10’dur. Adrenal adenomu olan hastalarda klinik ve/veya laboratuvar olarak, adrenal gland kökenli hormonların fazlalığı ile karakterize sendromlar ekarte edilmelidir [6],[7]. Endojen hiperkortizolemi, farmakolojik glukokortikoid maruziyeti olmayan insanlarda klinik ve/veya laboratuvar belirteçler ile saptanan durumun genel tanımıdır. Adrenal adenomu olan insanlarda endojen hiperkortizolemi, adrenal kökenli Cushing Sendromu (CS) ve Subklinik Cushing Sendromu (SCS) olmak üzere iki ana başlık altında gruplandırılır. CS, nadir bir hastalık olup, genel popülasyonda yıllık insidansının milyonda 0.2-5, prevelansının milyonda 39-79 arasında olduğu bildirilmiştir. CS görülme yaşı ortalama 41.4 olup, kadınlarda erkeklere oranla görülme sıklığı 3 kat fazladır [8],[9]. CS, viseral obezite, pletore, özellikle boyun bölgesinde cilt altı yağ depolarının artışı (hump/hörgüç), ciltte yaygın

parlak renkli çatlaklar, spontan ekimoz, kas atrofileri, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik sorunlara yatkınlık, osteoporoz, psikolojik sorunlar, hipogonadizm gibi çoklu problemlere neden olan bir sendromdur. Ancak CS'nin bazı klinik bulgularını taşıyan ve biyokimyasal olarak hiperkortizolemi bulgularını taklit eden durumlar da mevcuttur. Örneğin stres, alkolizm, psikiyatrik bozukluklar, böbrek yetmezliği, morbid obezite, primer glukokortikoid reseptör direnci, artmış sıvı alımı (psikojenik polidipsi veya diabetes insipidus), kontrolsüz diabetes mellitus olgularında da hiperkortizolemi prevalansının yüksek olduğu raporlanmıştır [10]. Nispeten daha sık görülen ve CS'ye benzer klinik özellikler gösteren bu hastalıkların hiperkortizolemi durumu bazı biyokimyasal laboratuvar verileri ile dışlanmalıdır. Ancak ılımlı glukokortikoid fazlalığı durumunda sıklıkla kullanılan kortizol sekresyon parametrelerinin güvenilirliği endojen hiperkortizolemi durumuna göre düşüktür [11].

SCS ise, adrenal adenomu olan bir hastada CS ilişkili belirti ve bulgular belirgin olarak mevcut değil iken, yapılan HHA aks ilişkili laboratuvar testlerinde hiperkortizolemi saptanması durumudur [12]. SCS adrenal adenomu olan hastalarda en sık rastlanılan hormonal problemdir [13],[14]. Adrenal kitle ile tetkik edilen hastalar içinde sıklığının %5-48 arasında olduğu gösterilmiştir [11],[15]. HHA aks testleri, adrenal lezyonun normalden fazla kortizol üretme kapasitesinin olup olmadığını ölçmek için yapılan testlerdir. 1mg DST, plazma ACTH düzeyi, idrar serbest kortizolü başta gelen testlerdir. Ayrıca gece serum kortizolü, gece tükürük kortizolü, serum DHEA testleri de bu grup içindedir. SCS'nin taranması için uygulanan HHA aks testleri, belirgin CS tarama testlerinden farklı değildir. Bu testler, klinik belirtileri aşık, hiperkortizolemik durumun ağır olduğu CS'de oldukça yüksek özgüllükte iken, SCS'de mevcut olduğu düşünülen hafif/ılımlı kortizol fazlalığını değerlendirmede yeterli kesinlikle değildir [6],[16],[13],[14],[15].

Çalışmanın başlıca amaçları:

- Sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) ile tükürük kortizolü ölçümü için yöntem geliştirilmesi,
- Tükürük kortizolü ölçümünde ELISA ve LC-MS/MS metotlarının karşılaştırılması,
- Şüpheli hiperkortizolemi tanısı alan hastalardan belirli saatlerle alınan tükürük örneklerinde tükürük kortizolü düzeylerinin her iki yöntem ile ölçümü ve elde edilen bulguların olguların klinik ve laboratuvar verileri ile karşılaştırılması,
- Tükürük kortizolü sonuçlarının her iki yöntemle de tanı koydurucu performansının ve eşik değerlerinin belirlenmesi,

- Gün içerisinde belirli saatlerde alınan tükürük kortizol sonuçlarının günlük ritmi göstermedeki etkinliğinin incelenmesidir.

Bu amaçlar doğrultusunda araştırmanın hedefleri;

- LC-MS/MS yöntemi ile tükürük kortizolü ölçümünün optimizasyonu ve tüm analitik yöntem geçerlilik çalışmalarının gerçekleştirilmesi
- Hiperkortizolemi şüphesi olan olguların klinik ve HHA aks testleri sonucuna göre CS, SCS ve NFA şeklinde gruplandırılması,
- CS, SCS ve NFA gruplarından günde üç kez (08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde) alınan tükürük  rne lerinde kortizol düzeylerinin hem LC-MS/MS hem de ELISA yöntemleri ile  l  lmesi,
- ELISA ve LC-MS/MS ile tükürük kortizolü ölçümü yapılan tüm  rne lere ait ölçüm sonuçlarının Bland-Altman grafikleriyle ve Passing-Bablok regresyon analiziyle uyumlarının karşılaştırılması ve tanısai performanslarının ROC (receiver operating characteristic curves) analizi ile belirlenmesi,
- Olguların demografik, klinik ve laboratuvar verileri ile elde edilen bulguların korelasyonlarının değerlendirilmesidir.
- Böylece hiperkortizolemi için ciddi ayırıcı tanı problemleri oluşturan koşullarda adrenal CS ve SCS tanılarının konulmasında tükürük kortizolünün belirleyici rolünün ve di rnel ritmi ortaya koymadaki başarısının açığa çıkarılması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Adrenal Bez Anatomisi ve Fizyolojisi

Adrenal bezler endokrin sistemin önemli bir parçasıdır. Sürrenal bezler ya da böbrek üstü bezleri olarak da bilinen adrenal bezler, yaklaşık 5 cm x 2 cm'lik üçgen biçimli organlardır, her böbreğin üst kısmında bulunur ve her biri 4 ila 5 gram ağırlığındadır (Şekil 1). Bağışıklık sisteminin düzenlenmesinde, vücut metabolizmasında, tuz ve su dengesinde önemli rol oynayan hormonları salgılar ve stres dönemlerinde vücuda yardım eder [17]. Adrenal bezler önemli damar ve organlara yakın konumlanmışlardır. Sağ adrenal bez sağ hemidiafram, karaciğer ve inferior vena kavaya yakinken, sol adrenal bez aort, dalak ve pankreas kuyruğuna yakındır.

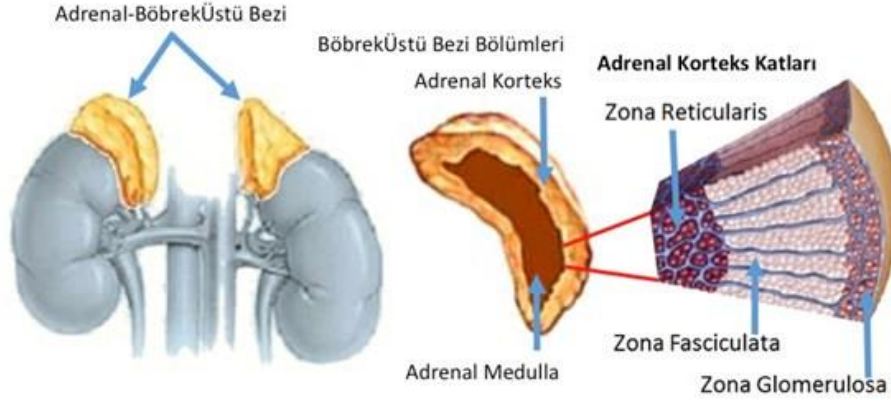
Adrenal bez dış katman (korteks) ve iç katman (medulla) olmak üzere iki ayrı dokudan oluşur. Adrenal korteks sarı bir renk tonuna sahipken, adrenal medulla daha çok kırmızımsı kahverengi renktedir. Bağ dokusundan oluşan kalın bir kapsül tüm adrenal bezini çevreler [17]. Adrenal korteks histolojik ve fonksiyonel açıdan üçe ayrılır (Şekil 1):

Zona glomerulosa (dış tabaka): En önemlisi aldosteron olan minerakokortikoidlerin sentezinden sorumludur. Bu hormon, elektrolit dengesinde ve kan basıncının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar [18].

Zona fasciculata (orta katman): Zona fasciculata, baskın hormonun kortizol olduğu glukokortikoidleri üretir. Bu hormon, glukoneogenez yoluyla kan şekerinin düzenlenmesinde rol oynar. Kortizol ayrıca bağışıklık sistemini modüle eder ve yağ, protein ve karbonhidrat metabolizmasını modüle eder. Kortizolün salgılanması, hipofiz bezinden salınan ACTH tarafından düzenlenir [18].

Zona reticularis (iç bölge): Zona reticularis androjenler üretir ve sekonder cinsel özelliklerin gelişiminde rol oynar. Zona reticularis'te üretilen birincil androjen, vücutta en bol bulunan hormon olan DHEA'dır. Progesteron, östrojen, kortizol ve testosteron gibi adrenal bez tarafından üretilen diğer birçok hormonun sentezi için bir öncü görevi görür.

Adrenal medulla katekolaminleri sentezler. Katekolaminler, dopamin öncülünden yapılıp ve tirozin ile birleştirilerek norepinefrin elde edilir. Norepinefrin oluşturulduktan sonra, sadece adrenal medullada bulunan feniletanolamin N-metiltransferaz (PNMT) ile metillenir [19].



Şekil 1. Adrenal bez katmanlarının şekilsel gösterimi [20]

2.2.Steroid Biyokimyası

Adrenal kortekste üretilen majör hormonlar, minerolokortikoidler, glukokortikoidler ve adrenal androjenlerdir.

2.2.1 Glukokortikoidler:

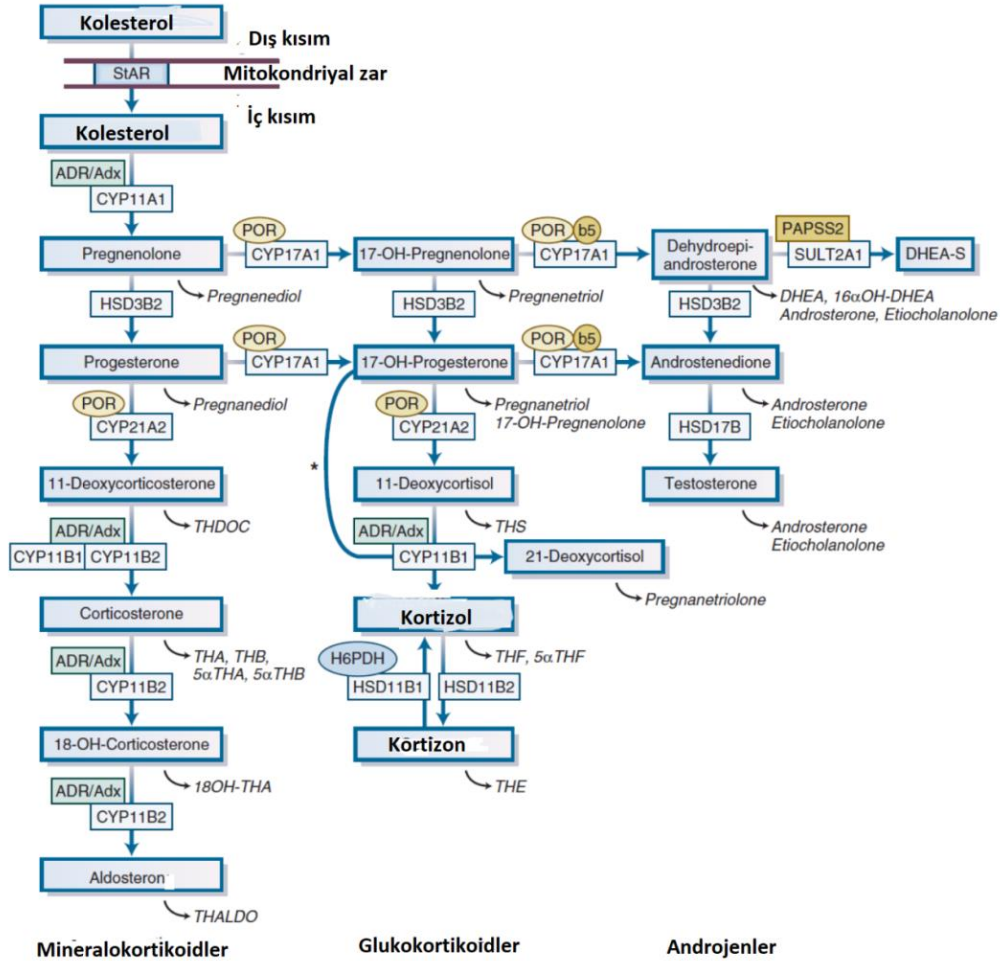
Glukokortikoidler, çevresel veya biyolojik strese tepki olarak adrenal korteks tarafından üretilen steroid hormonlardır. Yetişkinlerde, enerji metabolizması, kalp debisi, iltihaplanma ve bağışıklık dahil çeşitli biyolojik süreçleri düzenler [21].

2.2.1.1. Glukokortikoid Salınımı

İnsanlardaki tüm steroid hormonlar kolesterolden köken almaktadır. Plazma lipoproteinleri ana adrenal kolesterol kaynağıdır. Düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL), adrenal beze verilen kolesterolün yaklaşık % 80'ini oluşturur. Adrenal doku üzerinde spesifik hücre yüzeyi LDL reseptörleri vardır. Uyarım gerçekleştiğinde akut yanıt için adrenal içindeki küçük serbest kolesterol havuzu mevcuttur. Akut stimülasyon, depolanmış kolesteril esterlerin serbest kolesterol için hidrolize olmasına, plazma lipoproteinlerinden alımın artmasına ve bez içindeki kolesterol sentezinin artmasına neden olur (Şekil 2) [22].

Kolesterol, steroid kolesterol esteraz enziminin etkisiyle steroidojenik yola girer ve steroid akut düzenleyici (STAR) proteini ile steroidojenik hücrelerin dış mitokondriyal zarından iç mitokondri zarına aktarılır. Bu aktarımı, kolesterolün, steroid sentezinin ilk basamağı olan ve adrenaller üzerinde adrenokortikotropik hormonun (ACTH) ana etkisi olan pregnenolona dönüşümü izlemektedir. Kolesterol daha sonra iç mitokondriyal membranda, CYP11A1 (P450_{scc}) yoluyla pregnenolona dönüştürülür [23]. CYP11A1, steroid hormon üretiminin hız

sınırlayıcı basamağını katalize eder ve adrenal korteksin üç katmanında da eksprese edilir. Pregnenolon, CYP17A1 geni tarafından katalize edilerek 17- α -hidroksipregnenolona dönüşüm gerçekleştirilir. 17- α -hidroksipregnenolon da 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz enzimi ile 17 α -hidroksiprogesterona dönüşür. Reaksiyon CYP21A2 enzimi ile devam eder ve 11-deoksikortizol sentezi gerçekleşir. 11-deoksikortizol oluşumu gerçekleştikten sonra mitokondride CYP11B1 enzimi ile kortizol sentezi tamamlanır [24].



Şekil 2. Adrenal steroidogenezde yer alan biyokimyasal yollar [24]

2.2.1.2. Glukokortikoid Salınımının Düzenlenmesi

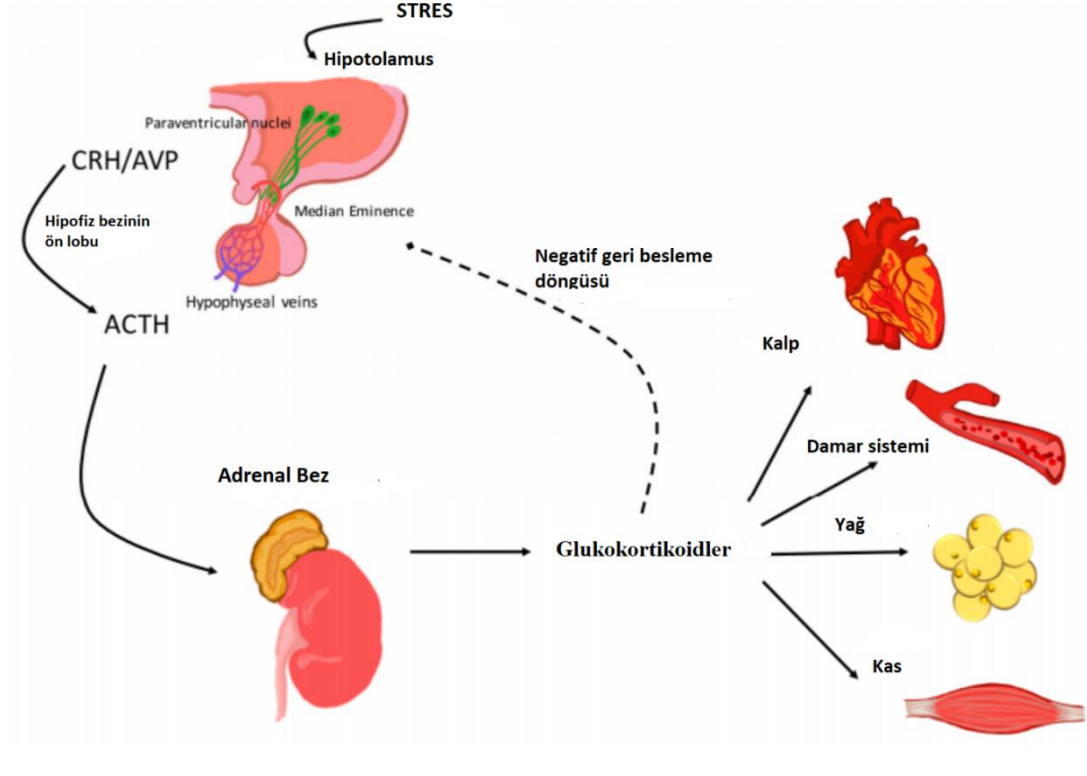
Kortizol salınması HHA sistemi ile düzenlenmektedir. HHA ekseninin aktivasyonu ve glukokortikoid salgılanması, hipotalamus ve hipofiz bezi seviyesindeki bir negatif geri besleme döngüsü ile sıkı şekilde düzenlenir.

2.2.1.2.1. Hipotalamik-Hipofiz-Adrenal Eksen

1936 yılında biyokimyacı Dr. Hans Selye strese maruz kalan hayvanlarda üç fazlı bir “genel alarm reaksiyonu” gözlemlemiştir [25].

- (i) Lenfatik dokuların boyutunun azalması, 6-48 saatte lipoliz ve gastrointestinal kanama “alarm reaksiyonu”,
- (ii) Adrenal hipertrofi, tiroid 48 saat sonra atrofi ve gonadal atrofi “direnc aşaması”,
- (iii) Strese maruziyete devam etmesi durumunda başlangıç durumuna dönme eğilimi “tükenme aşaması” şeklinde tanımlamalarda bulunmuştur.

Daha sonra genişletilmiş klinik gözlemleri “genel adaptasyon sendromu” olarak yeniden tanımlanmıştır. Adrenal steroidlerin görevlerini, “glukokortikoid” ve “mineralokortikoid” terimlerinin keşfini, modern nörosteroid anlayışı hakkındaki bilgilere rağmen HHA ekseninin rolünü anlamada başarısız olmuştur [26]. 1986'da National Institutes of Health (NIH)'de CRH hipersekresyonunun melankolik depresyona neden olduğunu, endokrinoloji ve psikiyatriyi daha da bağladığını ve daha sonra CRH yanıtlarının melankolikleri atipik depresyondan ayırdığı gösterilmiştir [27]. Böylece, HHA eksenin, adrenal fonksiyonun düzenlemesinin ötesinde ve tüm stres formlarında merkezi rol oynadığı açıklanmıştır [28]. Çevresel, fiziksel veya fizyolojik streslere maruz kalmak, merkezi sinir sistemi ile endokrin, immün ve kardiyovasküler sistemler dahil olmak üzere tüm sistemlerde stres tepkisinin aktivasyonuna yol açar. HHA eksen, homeostazın korunmasına veya restore edilmesine yardımcı olan adrenal hormonların düzenlenmesinde merkezi bir rol oynar. HHA eksen, *zona fasciculata* ve *zona reticularis*'ten glukokortikoidler ve adrenal androjenlerin üretilmesinde rol oynar (Şekil 3) [29]. HHA ekseninin aktivasyonu, hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinde (PVN) lokalize olan hipofizyotropik nöronların, CRH ve arginin vasopresinini (AVP) sentezlemesi ve salgılaması için uyarıldığında başlar [30].



Şekil 3. HHA ekseninin aktivasyonu [29]

Pro-opiomelanokortin ve ACTH

ACTH, adrenal glukokortikoid biyosentezi ve sekresyonunu uyaran başlıca hormondur. Anterior hipofiz tarafından sentezlenen 39 amino asit içeren bir peptiddir ve 241 amino asitlik bir öncül olan pro-opiomelanocortin'den (POMC) sentezlenir [22]. Hipotalamus-hipofiz ekseninde ACTH'nin rolü, adrenal bezlerden kortizol salınımının uyarılmasıdır. Sentezi ve salgılanması esas olarak her ikisi de hipotalamusun paraventriküler çekirdeğinin paravoküler nöronları tarafından üretilen ve birbirleriyle sinerjide hareket eden CRH ve AVP tarafından düzenlenir [22]. ACTH sekresyonu nabız ve negatif geri besleme kontrolü altındadır ve sirkadiyen bir ritim paterni gösterir. Vücutta salgılanan çeşitli hormonların ve faktörlerin etkisi altındadır. Yeme ve stres yanıtı gibi fizyolojik aktiviteler de ACTH salınımını etkileyebilir. HHA sisteminin yaşlanma ve cinsiyet farklılıklarına göre değiştiği bilinmektedir [27]. ACTH seviyeleri kortizole paralel olarak, sirkadiyen ritimle değişir, 06.00-09.00 saatleri arasında zirveye ulaşır, gün boyunca 23.00-02.00 arasında düşer ve yaklaşık 02.00-03.00'de tekrar yükselmeye başlar [27].

CRH ve Arginin Vazopressin

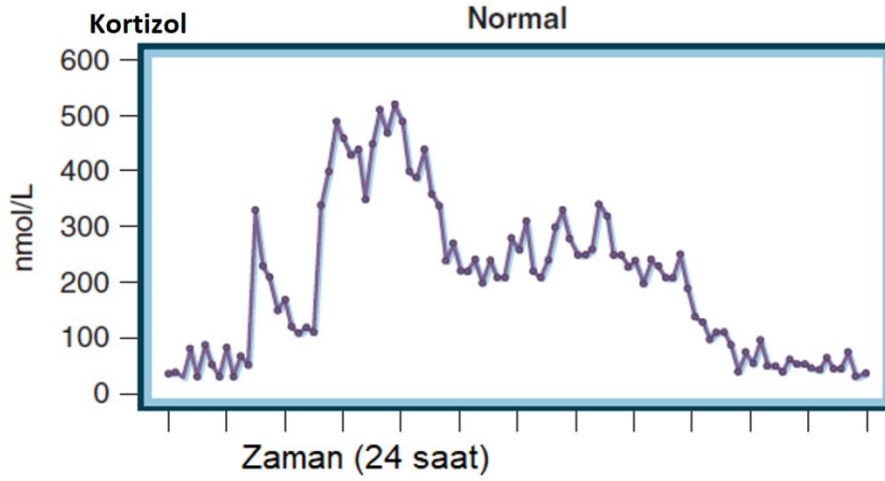
CRH, hipotalamusta PVN'nin hipofizyotropik nöronları tarafından üretilen ve salgılanan 41-amino asit içeren peptit hormonudur [29]. CRH, hipofiz portal kanı içine salgılanır, anterior spesifik tip I CRH reseptörleri ön hipofiz kortikotroflarına bağlanarak adenilat siklaz aktivasyonu sayesinde POMC transkripsiyonu uyarılır [31]. POMC salgılanması, özellikle CRH ve AVP olmak üzere çok sayıda faktör tarafından sıkı bir şekilde kontrol edilir. CRH, ACTH salgılanması için temel uyarıcıdır, ancak AVP, CRH aracılı sekresyonu güçlendirebilir. Bu durumda, AVP, proteini etkinleştirmek için V1b reseptörüne bağlanarak protein kinaz C'yi aktive eder. ACTH'nin CRH'ye tepki gün boyunca farklılık gösterir, ancak endojen olarak etkilenir. Dolaşımdaki CRH seviyelerine hipotalamik CRH'nin katkısının olup olmadığı belirsizdir. CRH diğer dokulardan da sentezlenir. Dolaşımdaki CRH büyük olasılıkla testis, gastrointestinal sistem, adrenal medulla ve özellikle plasentadan salgılanmaktadır [32]. Dolaşımdaki, CRH, CRH bağlayıcı proteine (CRH-BP) bağlıdır, CRH-BP seviyeleri hamilelik sırasında artar, böylece kortizol salgısı belirgin bir şekilde yükselmez [33].

2.2.1.2.2. Stres Tepkisi ve İmmün-Endokrin Eksen

Çevresel veya psikolojik sebeplere bağlı akut stres, CRH salınımına, bu da ön hipofizden ACTH ve adrenal korteksten de glukokortikoid salınımına sebep olur [31]. Akut ve kronik stresin, HHA eksenini üzerindeki etkisi incelendiğinde, CRH'nin merkezi sempatik ve serotonerjik sistemlerin aktivasyonunda önemli bir rol oynayan stres nörotransmitter olduğu kanıtlanmıştır [32]. Majör depresyonun başlangıcını tetikleyen kronik stres, genellikle artmış CRH sekresyonu ve kortizol tarafından azaltılmış geri besleme (feedback) inhibisyonunun hassasiyetinin azaltılması ile ilişkilidir. Kronik stres durumlarında artmış plazma kortizol konsantrasyonları hipotalamustan AVP salınımını artırır [33].

2.2.1.2.3. Sirkadiyen Ritim

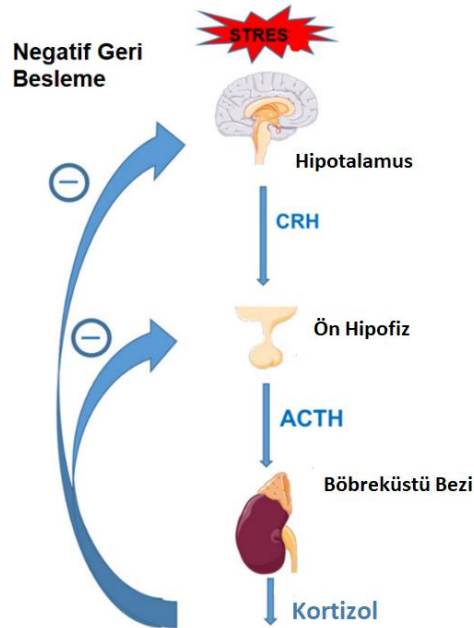
HHA eksenini uyanıklığın korunmasında ve uykunun düzenlenmesinde önemli rol oynar. CRH reseptörü, glukokortikoid reseptörü veya mineralokortikoid reseptöründe işlev bozukluğu uykuyu bozabilir [34]. ACTH ve kortizol, sirkadiyen ritim ile pulsatil bir modda salınır, sabah uyanınca en yüksek seviyelerde olup gün boyu düşme eğilimindedir, akşam ise nadir seviyelere iner (Şekil 4). ACTH seviyeleri sabah 05.00-09.00 arasında artarken, akşam 6.00 ve gece yarısına doğru düşüş eğilimindedir [24]. Kortizol sekresyonu, uyku başlangıcında düşük, 02.00-04.00 saatleri arasında artmaya başlayarak, 1 saat içinde zirveye ulaşan ve daha sonra gün içinde düşerek devam eden bir sirkadiyen ritim izler [3].



Şekil 4. Normal kişilerde kortizol sirkadyen ritimleri [24]

2.2.1.2.4. Feedback inhibisyon

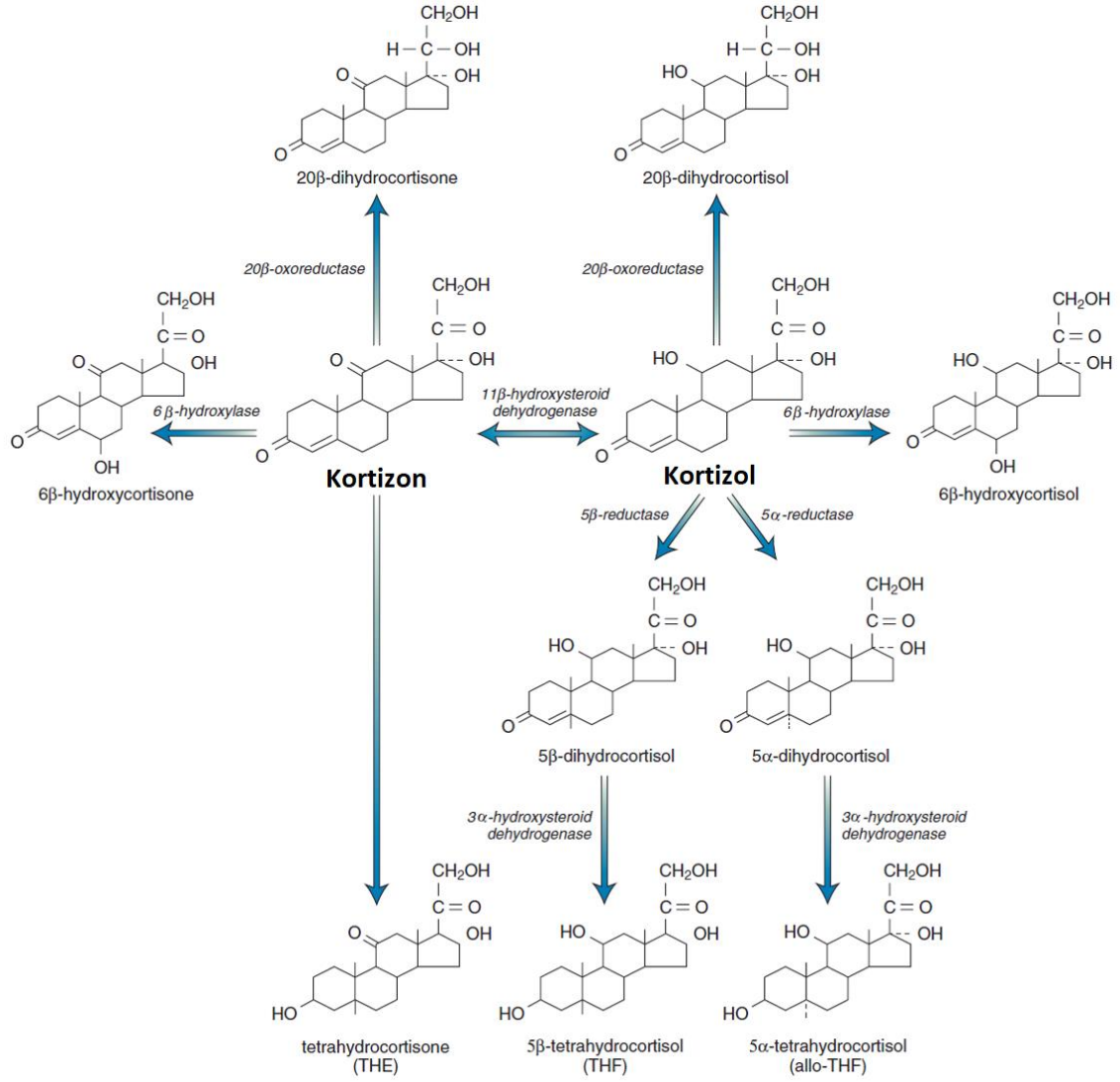
HHa ekseni, böbreküstü bezinden kortizol üretimini ve salınmasını uyaran merkezi bir stres tepki sistemidir. Kortizol, vasküler direnci desteklemek amacıyla glikozun kullanılabilirliğini artırır ve damar içi hacmi korur [35]. Vücut ne zaman bir stresle karşılaşır (ör. cerrahi, travma), hipotalamus aktive olur ve anterior üzerinde etkili olan CRH'ı serbest bırakır, CRH'de ön hipofizden ACTH salınımını uyarır. Daha sonra ACTH salınarak kortizol salınımını etkinleştirir. Dolaşımda artan kortizol seviyelerine göre hipotalamus ve hipofizden ACTH ve CRH salınımını baskılamak için HHA ekseninin negatif geri besleme mekanizması vardır (Şekil 5) [24].



Şekil 5. HHA ekseni geri besleme [35]

2.2.2. Kortizol Bağlayıcı Globulin (CGB) ve Kortikosteroid Hormon Metabolizması

Kortizol büyük ölçüde dolaşım sistemi boyunca kandaki taşıyıcı proteinler (kortizol bağlayıcı globülinler- CBG, α -1 glikoprotein ve albümin) aracılığıyla taşınır [36]. Sadece %5'lik küçük bir kısmı serbest halde bulunur, yağda çözünür ve böylece çift tabakalı hücre membran sisteminden geçebilir [37]. Bu bağlanmamış kortizol biyolojik açıdan aktif fraksiyondur ve kan-beyin bariyerinden ve hücre membranından geçebilme yeteneğine sahip olup, nöronal fonksiyonları ve hücrelerde gen ekspresyonunun değişimini doğrudan etkileyebilmektedir [38]. 11b-hidroksisteroid dehidrojenaz (11p-HSD), hormonal olarak aktif kortizolün aktif olmayan kortizona dönüşümünü katalize eder. 11 β -HSD'nin iki izoformu vardır. 11b-HSD tip 1 (11 β -HSD1), aktif olmayan kortizonu karaciğer, yağ dokusu, gonadal doku ve merkezi sinir sistemi gibi hedeflerde aktif kortizole dönüştürür [39]. Serbest kortizol, distal nefron, tükürük bezleri, deri, kolon gibi aldosteron seçici hedef dokularda yüksek oranda eksprese edilen 11b ile hidroksisteroid dehidrojenaz (11bHSD) tip 2 kortizona dönüştürülür. Salgılanan kortizol'ün yaklaşık % 50'si idrarda tetrahidrokortizol (THF), 5alfa-tetrahidrokortizol (allo THF) ve tetrahidrokortizon (THE), % 25 'i kortol/kortolon olarak, %10'u C19 steroidleri olarak, %10 kortolik/kortolonik asitler olarak, kalan metabolitler serbest halde konjüge olarak bulunur (kortizol, kortizon ve 6 β - ve 20 α / 20 β - metabolitler) (Şekil 6) [24].



Şekil 6. Kortizol metabolizmasının başlıca yolları [24]

2.2.3. Kortizolün Etkileri

- Karbonhidrat, protein ve lipid metabolizması üzerine etkileri;

Glukokortikoidler, glikojen, protein ve lipid metabolizmaları üzerindeki etkileri sayesinde kan şekeri konsantrasyonlarını artırır. Glikojen sentezini artırarak karaciğerde glikojen birikimini uyarır [40].

- Deri, kas ve bağ dokusu üzerine etkileri;

Kas dokusunda insülin direncini indüklemeye ek olarak, glukokortikoidler, cilt ve bağ dokuda ve ayrıca kasta katabolik değişikliklere neden olur. Deride ve bağ dokuda , glukokortikoidler epidermal hücre bölünmesini engeller ve DNA sentezini azaltmak ve üretimini azaltır [24].

- Kemik ve kalsiyum metabolizması üzerine etkileri;

Osteoblastları baskılayarak yeni kemik oluşumunu azaltır. Böylece kemik yıkımını arttırarak kemik kütlesinin azalmasını bu sebeple de kırılabilirliği arttırır [41].

- Tuz ve su Homeostazı ve kan Basıncı kontrolü;

Glukokortikoidler, böbrek ve damar sistemindeki mekanizmalara etki ederek kan basıncını arttırır [42].

- Antienflamatuvar eylemler ve bağışıklık sistemi üzerine etkileri;

İntravasküler kompartmandan, lenfositleri dalak, lenf düğümleri ve kemik iliğine dağıtarak kandaki lenfosit sayısını akut olarak azaltır. İmmünoglobülinin sentezini engeller ve lenfosit apoptozunun uyarılması sağlar [24].

- Endokrin etkileri;

Glukokortikoidler tiroid eksenini baskılayarak tiroid uyarıcı hormon (TSH) salgılanması üzerine doğrudan etkilidir [24].

2.2.4. Kortizol ile İlişkili Hastalıklar

Adrenokortikal hastalıklar nispeten nadir olup, tedavi edilmezse yüksek morbidite ve mortalite oranına sahip hastalıklardır. Hastalıklar hormon seviyelerinin aşırı olması veya eksikliğine göre sınıflandırılabilir. Tablo 1. 'de gösterilmiştir [24].

Tablo 1: Glukokortikoid fazlalığı ve eksikliği hastalıkları [24]

Glukokortikoid yetmezlik hastalıkları	Glukokortikoid fazlalığı hastalıkları
Primer adrenokortikal yetmezlik (Addison hastalığı)	Cushing Sendromu
Sekonder adrenokortikal yetmezlik	Pseudo Cushing Sendromu
Konjenital adrenal hiperplazi	

2.2.4.1. Glukokortikoid Yetmezlik Hastalıkları

Adrenal yetmezlik, glukokortikoidlerin ve/veya mineralokortikoidlerin ve adrenal androjenlerin azalmış üretimi veya etkisi ile karakterize ciddi bir patolojik durumdur. Hayatı tehdit eden bu durum, sırasıyla adrenal korteksi, ön hipofiz bezini veya hipotalamusu etkileyen hastalıklardan kaynaklanır. [43].

2.2.4.1.1. Primer Adrenokortikal Yetmezlik (Addison hastalığı)

Primer Adrenal Yetmezlik, adrenal korteksten glukokortikoid (öncelikle kortizol), mineralokortikoid (öncelikle aldosteron) hormonlarının sentezinin ve salınımının birincil yetersizliğini temsil eder. Karakteristik klinik belirtileri; ortostatik hipotansiyon, ajitasyon, konfüzyon, dolaşım bozukluğu, karın ağrısı ve ateştir [24].

2.2.4.1.2. Sekonder Adrenokortikal Yetmezlik

Sekonder adrenal yetmezlik, primer adrenal yetmezlikten daha sık görülür. Sekonder adrenal yetmezlik, ön hipofizi etkileyen ve ACTH sekresyonuna müdahale edilmiş herhangi bir hastalık sürecinden kaynaklanabilir. [43]. Sekonder adrenal yetmezliğin klinik özellikleri, primer adrenal yetmezlik ile benzerdir.

2.2.4.1.3. Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi vakalarının % 90 ila % 95'ine 21-hidroksilaz eksikliği neden olur. Hastalığa, steroid 21-hidroksilaz enzimini kodlayan cyp21 genindeki mutasyonlar neden olur [44].

2.2.4.2. Glukokortikoid Fazlalığı Hastalıkları

2.2.4.2.1. Cushing Sendromu (CS)

Cushing sendromu (CS), yüksek seviyelerde serbest plazma endojen kaynaklı (kortizol) ya da ekzojen (örneğin prednizolon, deksametazon) kaynaklı glukokortikoidlere uzun süre maruz kalmayla ilişkili semptom ve bulguları içerir [24]. CS, nadir bir hastalık olup, genel popülasyonda yıllık insidansının milyonda 0.2-5, prevelansının milyonda 39-79 arasında olduğu bildirilmiştir. CS görülme yaşı ortalama 41.4 olup, kadınlarda erkeklere oranla görülme sıklığı 3 kat fazladır [8], [9]. CS, viseral obezite, pletore, özellikle boyun bölgesinde cilt altı yağ depolarının artışı (hump/hörgüç), ciltte yaygın parlak renkli çatlaklar, spontan ekimoz, kas atrofileri, diyabet, hipertansiyon gibi metabolik sorunlara yatkınlık, osteoporoz, psikolojik sorunlar, hipogonadizm gibi çoklu problemlere neden olan bir sendromdur [45] (Tablo 2). CS, ACTH-bağımlı, ACTH-bağımsız ve diğer nedenler olarak sınıflandırılabilir (Tablo 3).

Tablo 2. Endokrin Derneği tarafından tanımlanan CS'nin klinik özellikleri (% prevalans yayınlardaki hasta popülasyonuna göre belirtilmiştir) [45]

Cushing Sendromu'nu en iyi ayırt eden işaretler	Genel popülasyonda yaygın görülen CS özellikleri (Endojen hiperkortizolemi için daha az ayırıcı)
Kolay morarma (% 80), Facial plethora (%90), Proksimal miyopati veya kas güçsüzlüğü (% 60), Kırmızımsı mor çizgiler (>1 cm) (% 45), Büyüme hızında azalma ile kilo alımı (çocuklar) (% 90)	Depresyon (% 59), Yorgunluk (% 77), Kilo alımı ve obezite (% 97), Sırt ağrısı (% 60), Azalmış libido (% 50), Bozulmuş kısa süreli hafıza (% 60), Uykusuzluk (% 85), Sinirlilik (% 60), Menstrüel anormallikler (% 90), Bufalo hörgücü (%57), Yüz veya supraklaviküler dolgunluk (% 80), Hirsutizm (% 48), Kadınlarda kellik (% 38), Periferik ödem (% 20), İnce cilt (% 70)

Tablo 3. CS'nin sınıflandırılması [24]

ACTH BAĞIMLI CS	ACTH BAĞIMSIZ CS	DİĞER NEDENLER
Cushing hastalığı	Adrenal adenom ve karsinom	Gebelik
Ektopik ACTH sendromu	Primer pigmentli nodüler adrenal hiperplazi ve Carney sendromu	Obezite
Ektopik CRH sendromu	McCune-Albright sendromu	Alkol
Makronodüler adrenal hiperplazi	Aberrant reseptörü ifadesi	Depresyon
İyatrojenik (1-24 ACTH ile tedavi)	İyatrojenik (örneğin, prednisolonun farmakolojik dozları, deksametazon)	

2.2.4.2.1.1. ACTH Bağımlı Nedenler

2.2.4.2.1.1.1. Cushing Hastalığı

İyatrojenik nedenler hariç tutulduğunda, Cushing hastalığı, CS vakaların yaklaşık % 70'ini oluşturur ve hipofiz kortikotrop tümörlerinin neden olduğu nadir bir bozukluğu ifade eder [46]. Hipofiz tümörü ACTH'ın aşırı üretilmesine sebep olur bu da HHA eksen geri besleme düzenlemesinin azalmasına böylece böbreküstü bezlerinden salgılanan aşırı miktarda kortizol salınmasına neden olur [24].

2.2.4.2.1.1.2. Ektopik ACTH Sendromu

Cushing sendromu vakaların % 15'ini kapsayan hipofiz ile ilişkili olmayan ACTH salgılatan tümörler kaynaklıdır [24]. Ektopik ACTH sendromu, yüksek derecede malign tümörler veya tipik CS semptomları ve bulgularını gösteren daha az agresif nöroendokrin tümörler ile ilişkili olabilir [47]. Dolaşımdaki ACTH konsantrasyonları ve kortizol sekresyonu oranları çok yüksek olabilir. Hastalar yaygın olarak pigmentlidir, genelde kilo kaybı, miyopati ve glikoz intoleransı belirgin semptom ve işaretlerdir. Bu özelliklere eşlik eden hipokalemik alkaloz ve periferik ile ödem klinisyeni tanı konusunda uyarmalıdır [24].

2.2.4.2.1.1.3. Ektopik CRH Sendromu

ACTH üretiminden ziyade izole CRH üretiminin neden olduğu CS oldukça nadirdir [48]. Bu konu ile ilgili bildirilmiş bazı tümörlerin (genellikle bronşiyal karsinoid, medüller tiroid veya prostat karsinomu) sadece CRH salgılattığı yada ACTH ile birlikte salgılattığına dair birkaç vaka bulunmaktadır [24].

2.2.4.2.1.1.4. Makronodüler Adrenal Hiperplazi (MAH)

Cushing hastalığı olan hastaların % 10 ile % 40'ında çapı birkaç cm'yi bulabilen bir ve ya daha fazal nodül ile ilişkili bilateral adrenokortikal hiperplazi durumudur. Uzun süreli devam eden adrenal ACTH stimülasyonundan kaynaklanan otonom adrenal adenom oluşumunun MAH'ın sonucu olduğu düşünülmektedir [24].

2.2.4.2.1.2. ACTH Bağımsız Nedenler

2.2.4.2.1.2.1. Adrenal Adenom ve Karsinom

Primer adrenal tümörler ACTH bağımsız CS nedenidir. Adrenal tümörler CS'li olguların %10-15'inden sorumlu olup, bunların çoğunluğunu iyi huylu adrenokortikal adenomlar oluşturmaktadır. Karsinomlar ise CS'li olguların % 5'inden sorumludur [24]. Adrenal CS'nin tanısı; belirgin klinik bulgular, ACTH bağımsız hiperkortizolemi ve radyolojik olarak saptanan adrenal lezyon(lar)a dayanır. Belirgin belirti ve bulgular nedeni ile genellikle tanısız zorluk olmaz [16].

2.2.4.2.1.2.2. Primer Pigmentli Nodüler Adrenal Hiperplazi ve Carney Sendromu

Bilateral, küçük, pigmentli adrenal nodüller ile ilişkili olarak yaklaşık 100 ACTH bağımsız Cushing sendromu vakası bildirilmiştir. Patolojik olarak, bu nodüller genellikle 2 ila 4 mm çapındadır (ancak daha büyük olabilirler). Carney kompleks adında bir ailevi otozomal dominant varyant olup sivilceli cilt pigmentasyonu, periferik sinir tümörleri, meme lezyonları, testis tümörleri ve GH salgılayan hipofiz tümörleri dahil olmak üzere diğer çeşitli tümörleri (özellikle atriyal miksomlar), mezenkimal tümörleri içerir [49]. Protein kinaz A (PKA) düzenleyici alt birim tip 1A'yı (PRKAR1A) kodlayan genin mutasyonları, anormal PKA sinyallerine yol açar ve bazı durumlarda fenotipi açıklar [50].

2.2.4.2.1.2.3. McCune-Albright Sendromu

McCune-Albright sendromu, başlangıçta polioestotik lifli displazi, erken ergenlik ve cafe-au-lait lekelerinin üçlüsü tarafından tanınan nadir bir genetik bozukluktur [51]. Fibröz displazi ve deri pigmentasyonu hipofiz, tiroid, adrenal ve gonadal hiperfonksiyon ile ilişkili olabilir. Adenil siklaz ile bağlı G proteinin α alt biriminin somatik mutasyonudur. Mutasyon, adrenal düzeyde sabit ACTH'ı taklit eden G proteinin aktivasyonun oluşumuna neden olur. ACTH seviyeleri baskılanır ve adrenal adenomlar oluşabilir [24].

2.2.4.2.1.2.4. Makronodüler Hiperplazi (AIMAH)/Aberrant Reseptörü İfadesi

MAH, ACTH'ye bağlı Cushing sendromu hastalarında yaygın olarak görülmesine rağmen, gerçekte ACTH'den bağımsız makronodüler hiperplazi (AIMAH) de açıkça kabul edilir. Nodüller pigmentsizdir ve çapı 5 mm'den fazla olup bazen, böbrek üstü bezi kitlesel olarak genişler [24]. AIMAH, baskılanmış ACTH seviyeleri varlığında adrenal bezlerin büyük bilateral nodüler büyümesi ve hiperkortizolizmin karakteristik özelliği olan CS nadir görülen

bir nedenidir [52]. Çoğu vaka adrenal kortekste anormal reseptör (Aberrant reseptör) ekspresyonu temelinde açıklanmaktadır. Farklı akış aşağı sinyal yollarındaki değişiklikler nedeniyle veya anormal şekilde eksprese edilmiş G-protein bağlı reseptörler yoluyla cAMP/PKA yolunun aktivasyonu, hem kortizol sekresyonu hem de adrenal büyüme ile ilgilidir. Germline Armadillo repeat 5 (ARMC5) mutasyonları sık görülen bir genetik kusurdur. Teşhis yaklaşımı hem görüntüleme hem de hormonal karakterizasyondan oluşur [53].

2.2.4.2.1.2.5. İyatrojenik Cushing Sendromu

İyatrojenik Cushing sendromu, hiperkortizolizmin en yaygın şeklidir. Glukokortikoidler, sıklıkla ciddi dozlarda hiperkortizolizmin gelişmesine yol açabilecek yüksek dozlarda çeşitli hastalıkların tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır [54]. CS'nin özelliklerinin geliştirilmesi, klinik pratikte kullanılan kortikosteroidlerin doz, süre ve potansiyeline bağlıdır. ACTH nadiren reçete edilir, ancak uzun süreli uygulama da cushingoid özelliklerine neden olacaktır. Göz içi basıncı, katarakt, benign intrakranial hipertansiyon, femur başı aseptik nekrozu, osteoporoz, ve pankreatit, iyatrojeniklerde olduğundan daha sık görülürken, endojen Cushing sendromunda diğer özellikler, hipertansiyon, hirsutizm ve oligomenore / amenore, daha az yaygındır [24].

2.2.4.2.1.3. Diğer Nedenler

CS'nin bazı klinik bulgularını taşıyan ve biyokimyasal olarak hiperkortizolemi bulgularını taklit eden durumlar da mevcuttur. Örneğin stres, alkolizm, psikiyatrik bozukluklar, böbrek yetmezliği, morbid obezite, primer glukokortikoid reseptör direnci, artmış sıvı alımı (psikojenik polidipsi veya diabetes insipidus), kontrolsüz diabetes mellitus olgularında da hiperkortizolemi prevalansının yüksek olduğu raporlanmıştır [10]. Nispeten daha sık görülen ve CS'ye benzer klinik özellikler gösteren bu hastalıkların hiperkortizolemi durumu bazı biyokimyasal laboratuvar verileri ile dışlanmalıdır. Ancak ılımlı glukokortikoid fazlalığı durumunda sıklıkla kullanılan kortizol sekresyon parametrelerinin güvenilirliği endojen hiperkortizolemi durumuna göre düşüktür [11]. Catargi ve arkadaşlarının çalışmasında, HHA aks durumunu araştırmak için tip 2 diabetes mellituslu 200 hastaya klinik ve laboratuvar tetkikleri yapılmış ve 11 hastada endojen hiperkortizolemi saptanmıştır [55]. Buna ek olarak, 150 komplike olmayan obezite hastası üzerinde yapılan bir çalışmada hastaların %9.3'ünün farklı etyolojilere sahip CS ile ilişkili spesifik hiperkortizolemi semptomlarına sahip olduğu gösterilmiştir [56]. 1020 hipertansif hastada yapılan prospektif bir çalışma sonucunda ise 21

hastaya aşikar veya preklinik CS tanısı konmuştur [57]. Bu veriler, hiperkortizoleminin dışlanması veya konfirmasyonu için kullanılabilen güvenilirliği yüksek tarama testlerine ihtiyaç duyulduğunu göstermektedir.

2.2.4.2.2. Subklinik Cushing Sendromu (SCS)

Subklinik Cushing Sendromu adrenal adenomu olan bir hastada CS ilişkili belirti ve bulgular belirgin olarak mevcut değil iken, yapılan HHA aks ilişkili laboratuvar testlerinde hiperkortizolemi saptanması durumudur [12]. SCS adrenal adenomu olan hastalarda en sık rastlanılan hormonal problemdir [13],[14]. Tesadüfen bulunan adrenal kitlesi (adrenal insidentalomalar) olan hastaların % 5-30'unda bulunduğu ve bunun da yetişkin popülasyonun % 4-7'sinde olduğu düşünülmektedir [11]. SCS'yi tanımlamak için iki kriter karşılanmalıdır, bunlardan birincisi, hasta net bir Cushing fenotipi (örneğin yüz dolgunluğu ve merkezi obezite) sunmamalı ve ikincisi ise hasta tesadüfen saptanan bir adrenal kitle taşımamalıdır [58]. CS 100 yılı aşkın bir süre önce tanınmış olsa da, SCS özellikle son 30 yıl içinde tanınır ve tartışılır hale gelmiştir. SCS' nin tanı ve tedavisi son zamanlarda artan bir ilgi konusu haline gelmiştir ve şu anda tartışılmaktadır.

2.2.5. HHA Aks Testleri

HHA aks testleri, adrenal lezyonun normalden fazla kortizol üretme kapasitesinin olup olmadığını ölçmek için yapılan testlerdir. 1 mg deksametazon supresyon testi (DST), plazma ACTH düzeyi, idrar serbest kortizolü başta gelen testlerdir. Ayrıca gece serum kortizolü, gece tükürük kortizolü, serum dehidroepiandrostenadion testleri de bu grup içindedir. SCS'nin taranması için uygulanan HHA aks testleri, belirgin CS tarama testlerinden farklı değildir. Bu testler, klinik belirtileri aşikar, hiperkortizolemik durumun ağır olduğu CS'de oldukça yüksek özgüllükte iken, SCS'de mevcut olduğu düşünülen hafif/ılımlı kortizol fazlalığını değerlendirmede yeterli kesinlikte değildir. Buna göre 1 mg DST sonrası kortizol değerinin 3 µg/dL'nin üstünde olması, ACTH düzeyinin 10 pg/mL'den düşük olması, idrar serbest kortizolünün yüksek olması kriterlerinden iki tanesinin SCS tanısı için yeterli olduğu görüşü mevcuttur. Ayrıca 1 mg DST sonrası kortizol değerinin 5 µg/dL üzerinde olması da tek başına SCS tanısı için yeterli olarak görülmektedir [6],[16],[13],[14],[15]. Ancak üzerinde görüş birliği sağlanan tanısal kriterler henüz net değildir. Test sonuçlarından elde edilen ara değerlerin yanlış pozitiflik mi yoksa SCS ilişkili mi olduğunu değerlendirmek klinik bulguları yetersiz bu grup hastalarda oldukça zordur. Günümüz literatürü dikkate alındığında, SCS'yi tanımlamada önerilen kriterler aşağıda özetlenmiştir.

1 mg DST: Gece 11.00 – 12.00 arasında verilen 1 mg deksametazonun ardından sabah 08.00–09.00 arasında ölçülen kortizolün 3 µg/dL veya 5 µg/dL üzerinde saptanması SCS'nin kriterlerinden biridir. Sınır değerin hangisi olacağına dair netleşmiş bir görüş yoktur. Eşik değeri 3 µg/dL kabul edildiğinde duyarlılık %50-60, özgüllük %50-80 arasında, 5 µg/dL kabul edildiğinde ise duyarlılık %20-60, özgüllük %85-100 arasında değişmektedir. Endojen hiperkortizolemiyi büyük oranda dışlayan 1.8 µg/dL eşik değeri alındığında ise duyarlılık %75-100, özgüllük %23-72 arasında değişmektedir [6],[7],[13],[14]. Duyarlılığı bu derece yüksek iken pozitif prediktif değeri düşüktür. Bu nedenle eşik değeri aşan her kortizol değeri gerçek bir endojen hiperkortizolemik durumu yansıtmaz. NIH-A.B.D. ve Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği eşik değeri 5 µg/dL olarak kabul ederken [59], Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Derneği ve Akdeniz Endokrinologlar Birliği eşik değeri 3 µg/dL olarak kabul etmektedir [15]. Ancak 1 mg deksametazon sonrası ölçülen serum kortizolü sonuçlarında saptanan ara değerlerin (1,8-3 veya 1,8-5 µg/dL) nasıl yorumlanacağı, gerçek bir hiperkortizolemik durum olup olmadığı henüz netleşmemiştir.

İki gün 2 mg DST: İki gün boyunca (4x0.5 mg) dozu ile deksametazon verilmesi ve üçüncü gün sabah kortizol düzeyi için kan örnekleme esasına dayanır. Özellikle endojen kortizol düzeyi başka sorunlara bağlı olarak yükselen (alkolizm, morbid obezite vb.) hastalarda kullanılması önerilmiştir. Ancak SCS için tanısal işleyişi kolaylaştırmadığı görülmüştür [6],[14],[15].

ACTH düzeyi: Adrenal kökenli hiperkortizolemilerde ACTH düzeyinin baskılanması beklenir ancak bu durum hiperkortizoleminin seviyesi ile ilişkilidir. Bu nedenle, SCS'li hastalarda her zaman aşık ACTH supresyonu olmayabilir. ACTH düzeyinin <10 pg/mL olması adrenal hiperkortizolemiyi destekler ama baskılanmamış değerlerin tek başına tanıyı reddetme gücü sınırlıdır. Ayrıca ACTH örnekleme sonrasında örneklerin hızlı bir şekilde transportu ve soğuk zincir gerekliliği teknik problemlere de neden olmaktadır [6],[14],[15].

İdrar serbest kortizolü: İdrar kortizolü proteinlere bağlı olmayan serbest kortizol fraksiyonunun önemli bir göstergesidir [16]. Farklı KBG seviyelerinde hiperkortizoleminin saptanmasında avantaja sahiptir. Ancak farklı koşullarda birçok ilaçla etkileşimi nedeniyle ile yanlış pozitif ve negatif sonuçlar gözlenebilmektedir [55]. Sonuçların fazla sıvı alımı, tamamlanmayan toplama ve böbrek yetmezliğinden etkilendiği belirtilmiştir. Bu durumun SCS'nin tanı ve takibinde tutarsızlık yarattığı bildirilmiştir. Ayrıca, idrar serbest kortizolündeki artışlar CS'nin görece ileri evrelerinde görüldüğü için SCS'li kişilerde saptanabilecek normal değerler tanısal zorluklara neden olabilmektedir.

Gece yarısı tükürük/serum kortizolü: Gece saatlerinde alınan örneklerde ölçülen serum kortizolünün veya tükürük kortizolünün yüksek saptanması endojenik hiperkortizolemi durumlarında görülebilir ve HHA aksdaki sirkadiyen ritmin kaybolduğunu gösterir. Ancak, bu testlerin de tanısal gücü SCS’de henüz netlik kazanmamıştır. Serum kortizolünde diüurnal ritmin kaybolmasını göstermek için yapılan gece yarısı serum kortizol düzeyinin ölçülmesi, SCS ve CS tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (yaklaşık %97). Ancak poliklinik koşullarında bu testin yapılması uygun olmayacağı için hastaların hastaneye yatırılması önerilmektedir [60]. Son dönemde, tükürükte kortizol ölçümünün serum kadar eşit tanısal öneme sahip olması, ayrıca girişimsel olmayıp kişide stres oluşturmada alınabiliyor olması nedeniyle potansiyel tanı testi olarak değerlendirilmesi söz konusudur [2],[3]. Plazma serbest kortizolü tükürük bezi asiner hücrelerine pasif difüzyon ile taşınır. Bu nedenle plazma serbest kortizolü ve tükürük kortizolü arasında çok güçlü bir ilişki vardır. Tükürükteki kortizol çok kararludur [10] ve örnekler oda sıcaklığında yedi gün [61], ayrıca buzdolabında da yedi gün boyunca saklanabilir [4].

2.2.6. Kortizol Ölçüm Metotları

Kortizol ölçüm yöntemleri; immünoanalizler (ör. radioimmunoassay (RIA), enzime bağlı immünosorban analizi (ELISA), kemilüminesans veya otomatik kemilüminesans (ECLIA) ve kütle spektrometrik ölçümler şeklinde ikiye ayrılabilir. Rutin laboratuvarlarda kortizol seviyelerinin belirlenmesinde immünoassay yöntemi sıklıkla tercih edilmektedir. Ancak bu yöntemde, sentetik glukortikoidler ve bazı antikorlarla çapraz reaksiyon durumu gözlenebilir [45]. Endokrin Derneği Klinik Uygulamalar Kılavuzu steroid hormonlarının özellikle düşük konsantrasyonlarında analizi için referans yöntem olarak LC-MS/MS yöntemini önermektedir [62]. LC-MS/MS, radyoaktif materyallerin kullanılmadığı ve düşük seviye kortizol düzeylerini dahi yüksek duyarlılık, özgüllük ve güvenilirlikle tespit edebilen bir yöntemdir. Sağlıklı bireylerde tükürük kortizol referans değerlerini farklı yöntemler kullanarak belirleyen çalışmalar mevcuttur (Tablo 4) [63].

Tablo 4. Sağlıklı gönüllülerde kütle spektrometrisi ve immünoanaliz ile belirlenen gece yarısı tükürük kortizolü (LNSC) referans değerleri [63]

METOT	ÖLÇÜM	nmol/L	N	YIL
RIA	Coat-a count	<2.9	73	1998
RIA	SmithKline Bioscience	<13.6	34	2002
RIA	Byk-Sangtec Diagnostica	10.4	27	2003
RIA	CIS Biointernational	5.5	54	2004
RIA	Cis Biointernational	0.3–4.3	20	2005
RIA	Esoterix	1.4–4.7	26	2007
EIA	Salimetrics	<4.3	20	2011
EIA	BUSCAR	<3.2	30	2015
ELISA	IBL International	0.83–8.3	725	2016
EIA	Salimetrics	<2.3*	54	2019
ECLIA	Elecsys 2010, Roche	0.2–8.9	100	2006
ECLIA	Elecsys 2010, Roche	1.9–9.0	42	2015
ECLIA	Cobas 601, Roche	<8.3	122	2017
ECLIA	Elecsys 2010, Roche	0.11–3.42	57	2018
ECLIA	Access, Beckman Coulter	<15.3	117	2019
Mass spectrometry	LC-MS	<2.8	102	2012
Mass spectrometry	LC-MS	<2.8	60	2013
Mass spectrometry	LC-MS	0.25–2.5	91	2015
Mass spectrometry	LC-MS	<3.1	52	2018
Mass spectrometry	LC-MS	<1.5*	54	2019

*Hastanın normal yatmadan önce (20:25– 24:00 saat). RIA; radioimmunoassay, EIA; enzim immüno analizi, ELISA; enzime bağlı immüno sorban analizi, ECLIA; elektrokemilüminesans immünoanaliz, LC-MS; sıvı kromatografi-kütle spektrometresi.

2.2.7. Metot Validasyonu

ISO 9000’e göre validasyon; objektif kanıtlara dayanarak, belirli bir kullanım veya uygulama için şartların yerine getirildiğinin teyidi olarak tanımlanmaktadır [64]. Dünya Sağlık Örgütü’ne göre validasyon ise; süreç, sistem, ekipman veya yöntemin beklendiği gibi çalıştığını kanıtlama eylemi olarak tanımlar. Buna göre “klinik laboratuvarlar için belirli bir standardın geliştirilmesi ve uygulanması; laboratuvarların tüm kalite yönetimi sistemine değer katar ve ayrıca hasta güvenliğini artırır.” şeklinde belirtilmektedir [65]. Doğrusallık, ölçüm aralığı, doğruluk, tekrarlanabilirlik, geri kazanım, ölçüm sınırı, analitik ölçüm limitleri, numune stabilite çalışmaları ve matriks etkisi bir yöntemin analitik performansını belirleyen temel karakteristiklerdir. Bu karakteristiklerin değerlendirilmesi veya yöntemin analitik performansının belirlenmesi için deneysel çalışmaların yapılması gerekir [66].

Analitik bir prosedürün performansını etkileyen hatalar, özellikle klinik laboratuvarlarda, tanı, izleme ve tedavi sürecinde yanlışlığa yol açmayacak düzeyde olması aynı zamanda tıbben kabul edilen hata (EA) düzeyini aşmaması gerekir [67]. Analitik bir prosedürün performansını

etkileyen hatalar rasgele (Random Error) veya sistematik hatalar (Systematic error, SE) olabilir. Rasgele hatayı oluşturan bileşenler; deney içi, deneyler-arası, günler-arası değişkenlerdir ve rasgele hata ile ilişkili tüm değişkenler sistemin tekrarlanabilirliğini ve kesinliğini etkiler. Sistematik hata ise analiz sonuçlarının sürekli düşük yada yüksek seyretmesini ifade eder. Örnek konsantrasyonu ile bağlantılı olmadan sabit olarak ölçüm sonucunu etkiliyorsa sabit sistematik hata, ölçüm sonucunu orantısal etkiliyorsa oransal sistematik hata olarak adlandırılır [66]. Yöntem geliştirme çalışmaları kapsamında yönteme etki eden hata miktarlarının saptanması elde edilen sonuçların kabul edilebilir hata açısından değerlendirilmesi yöntemin performansı hakkında bilgi verir. Analitik hata tipleri ve bu hataların belirlenmesi için yapılacak deneyler Tablo 5.' da gösterilmiştir.

Tablo 5. Analitik hata tipleri ve bu hataların belirlenmesi için yapılacak deneyler

Analitik hata türleri	Değerlendirme deneyi	
	Ön Deneyler	Son Deneyler
Rasgele hata	Çalışma-içi tekrarlanabilirlik	Çalışmalar-arası tekrarlanabilirlik
Sabit hata	Etkileşim	Yöntemlerin karşılaştırılması
Oransal hata	Geri kazanım	

2.2.7.1. Doğrusallık (Linearite) ve Ölçüm Aralığı:

Doğrusallık (Linearite): Bilinen analit konsantrasyonlarına karşılık elde edilen sonuçların doğrusal değişimini ifade eder. Doğrusallığın sonlandığı nokta “sapma noktası” olarak tanımlanır. Bir yöntemin doğrusallık sınırı, ölçülen örneklerin %95-99’unu ölçebilecek aralıkta olmalıdır [66]. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) EP6-A protokolüne göre doğrusallık deneyi farklı konsantrasyonlarda hazırlanan standartların (beş veya daha fazla) her düzeyde minimum iki tekrarlı çalışılıp sonuçların ortalamalarının ($\bar{x}$) alınması ile değerlendirilir. Çalışılan her standarda karşılık elde edilen verilerin % uygunluğu hesaplanır. Uygunluk yüzdesi %95- 100 sınırlarında ise linearite doğrulanır [68].

Ölçüm Aralığı: Kalibrasyon eğrisinde ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Ölçüm aralığı metotun

uygulama aralığını belirler ve bu aralık yöntemin, örnekte herhangi bir dilüsyon yapmadan ölçebildiği konsantrasyon aralığıdır.

Ölçüm aralığı doğrusallık parametresi ile ilişkilidir. Linearite sınırları kalibrasyon eğrisi çizilerek saptanır. Analitik cihazların çoğunun linear aralığının sınırlı olduğu bilinmektedir. Bu nedenle, yöntem doğrulama sırasında kalibrasyon eğrisinin doğrusallığı değerlendirilmeli ve kalibrasyon eğrisinin çalışma aralığı belirlenmelidir. Sonuçlar grafiksel olarak verilir. Grafikten elde edilen regresyon formülü ve korelasyon katsayısı değerlendirilir. Korelasyon katsayısı (R) bu amaç için yaygın olarak kullanılır ve $R^2 \geq 0.995$ olan eğriler genellikle doğrusal olarak kabul edilir [69].

2.2.7.2. Doğruluk

Ölçülen analitin, gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. ISO 3534-1'e göre beklenen test sonuçları ile kabul edilen referans değeri arasındaki fark bias olarak tanımlanır. Sistemik hata ve rastgele hataların toplamı, toplam hatayı oluşturur. CLSI 62-A kılavuzuna göre [70]; gerçek değer çeşitli şekillerde elde edilebilir. Bu konudaki birinci yaklaşım, referans bir yöntemin sonuçlarıyla örnek sonuçlarının karşılaştırılmasıdır. İkinci yaklaşım ise, konsantrasyonu bilinen bir numuneyi (örneğin sertifikalı bir referans materyali) analiz ederek, ölçülen değer ile gerçek değeri karşılaştırarak değerlendirilebilir.

2.2.7.3. Analitik Ölçüm Limitleri

CLSI EP17-A2 kılavuzuna göre analitik ölçüm limitleri, ölçüm aralığının alt uç bölgesindeki ölçüm doğruluğunu karakterize etmek için kullanılabilen bir dizi performans özelliğini gösterir. Bu performans özellikleri boş sınırı (Limit of Blank-LOB), Tespit Limiti (Limit of Detection-LOD), Ölçüm Limiti (Limit of Quantification-LOQ)'dir [71].

2.2.7.3.1. LOB

İçinde örnek bulunmayan (blank) numune için ölçülebilen en yüksek sonuçtur. LOB, ISO 11843-1'e göre "net durum değişkeninin kritik değeri" olarak da tanımlanır [72].

2.2.7.3.2. LOD

ISO 11843-1'e göre; "alt algılama limiti", "minimum saptanabilir değer" ve "algılama limiti" olarak da adlandırılır [72]. Örnekte ölçülebilen fakat kesin olarak miktarı belirlenemeyen en düşük miktardır. Analizi yapılan maddenin en düşük konsantrasyonunu saptama ve sıfırdan ayırabilme olarak da tanımlanır [66]. Kromatografik yöntemlerde alt deteksiyon limitlerinin

belirlenmesinde sinyal/gürültü oranları esas alınır. Buna göre sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri LOD olarak seçilir [79].

2.2.7.3.3. LOQ

Kabul edilebilir doğrulukla kantitatif olarak ölçülen en düşük analit miktarıdır. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri LOQ olarak seçilir [73].

2.2.7.4. Kesinlik (Precision, Tekrarlanabilirlik)

CLSI-EP05-A2 protokolüne göre, belirli koşullar altında aynı veya benzer numunelerden elde edilen bağımsız test/ölçüm sonuçlarının birbirine olan yakınlığıdır [74]. Ölçümün kesinliği genellikle belirtilen ölçüm koşulları altında standart sapma (SD), varyans veya varyasyon katsayısı (%CV) gibi kesin olmayan ölçümlerle sayısal olarak ifade edilir [75]. Elde edilen sonuçların dağılımı ne kadar dar bir aralıkta ise yöntem o kadar kesindir. Çalışma koşullarını etkileyen zaman, kalibrasyon, operatör ve ekipman olmak üzere dört unsur vardır. Çalışma koşullarında "çalışma arası", "gün içi", "gün arası", "cihaz içi" ve "laboratuvar içi" olarak adlandırılan ve genellikle kesinlik tahminlerini etkileyen unsurlarda değişim yapıldığında süreç değerlendirilmelidir [66].

2.2.7.5. Geri Kazanım

CLSI EP15-A2 kılavuzuna göre geri kazanım; bir yöntemin, konsantrasyonu bilinen ve belli miktarda eklenen referans materyali doğru olarak ölçme yeteneğidir [76]. Örnek havuzunda analizi yapılacak maddenin düzeyi ölçülür ve bilinen miktarda analit örneğe eklenerek analiz tekrarlanır. Elde edilen çalışma sonrasında % R geri kazanım formülü ile hesaplama yapılır [66].

2.2.7.6. Referans Aralık Doğrulama

CLSI EP 28-A3C 2' ye [77] göre geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralığı baz alınarak yeni yöntemle karşılaştırmak amacıyla 20 sağlıklı birey numunesi analiz edilir. Önemli olan bir laboratuvarın referans aralığının kendi popülasyonu ve metodolojisine uygulanabilirliğini makul bir şekilde doğrulayabilmesidir [77].

2.2.7.7. Taşıma (Carryover)

Ölçüm sistemi tarafından bir örnek reaksiyonundan, sonraki reaksiyonlara taşınan analit miktarına bağlı etkilenmiş sonuçlar olarak tanımlanır [78]. Food and Drug Administration

(FDA)'nin son yayınladığı kılavuza göre; taşımayı değerlendirmek için yüksek konsantrasyonlu bir numuneden hemen sonra bir veya daha fazla boş numunenin enjekte edilmesi gerektiği belirtilir [79].

2.2.7.8. Numune Stabilite Çalışması

Laboratuvar çalışmalarında örnekleme ortamı üzerinde analit stabilitesinin belirlenmesi ön deney olmalıdır. Numunelerin tekrar analiz edilmesi gerektiğinde örnek bütünlüğünün korunmuş olması çok önemlidir. Stabilite çalışmasında çalışılan örneklerin % 95'inin sonuçlarının çalışılan ilk örnek sonucuna göre en fazla % 25 farklı olması beklenir [80].

2.2.7.9. Matriks Etkisi

LC-MS tarafından test edilecek olan biyolojik numunenin matriks bileşenleri genellikle tuzları, lipitleri, proteinleri, peptidleri ve organik küçük molekülleri içerir. Herhangi bir matriks bileşeninin, kütle spektrometrik yöntemde analitin iyonizasyon verimliliğini etkileyebileceği veya bunu arttırabileceği bilinmektedir. Bu moleküller endojen olarak bulunurken, son zamanlarda ekzojen bileşiklerin de sorumlu olabileceği gösterilmiştir. Bunlar arasında plastik toplama tüplerinden polimerler, antikoagülanlar ve plazma/serum ayırıcı tüplerde kullanılan jeller yer alır [81]. İnterfere eden matriks bileşenlerinin çoğu numune hazırlama ve kromatografik ayırma sırasında ayrılabilir. Genel olarak, matriks etkisini yöntem için gereken toplam izin verilen hata (TEa) sınırları bağlamında değerlendirilmelidir [67].

2.2.7.10. Metot Karşılaştırma Çalışması

Laboratuvarların amacı; tıbbi karar almaya yardımcı olmak ve optimal sağlık hizmetlerini teşvik etmek için yararlı bilgiler sağlamaktır. Örnekler, test edilen yöntem ile kesinliği-doğruluğu kanıtlanmış bir yöntem ile çalışılır ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılır [66]. İki metot arasında eşdeğer sonuçlar elde etmek, ortak standartlara ve izlenilebilirliğe bağlıdır. Birbirine yakın sonuçlar bulmak için testler ve kitler yüksek dereceden referanslarla izlenebilir olmalıdır. İzlenilebilir olması için bazı karşılaştırmalar gerekmektedir, bu karşılaştırmaların aynı veya hatta benzer protokollere dayandırılması gerekmez. ISO 17511 ve ISO 181532' de belirlendiği gibi, sertifikalı bir referans materyali, bir referans ölçüm prosedürü veya bir referans laboratuvar da olabilir. Yöntemin doğruluğunu değerlendirmek için en az 40 numune çalışılması önerilmektedir. Numuneler popülasyondaki tüm analitik ölçüm aralığını kapsamalıdır [73].

3. GEREK VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi

Araştırmanın türü kesitseldir.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Araştırma Şubat 2018 ve Eylül 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Bilim Dalı, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı tarafından gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Çalışmaya Şubat 2018 ve Mart 2019 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi (DEÜ) Tıp Fakültesi Endokrinoloji Anabilim Dalı Polikliniği'ne gelen ve hiperkortizolemi durumunun ekarte edilmesi gereken klinik bulgulara sahip kişiler (n=121) dahil edildi. Etik Kurul onayını takiben kişiler çalışma hakkında bilgilendirildi ve kabul ettiklerine dair onam formu alındı (EK-2). Kişilerin demografik verileri (yaş, cinsiyet, kilo, boy, vücut kitle indeksi (VKİ), sigara kullanımı) kayıt edildi. Çalışmaya dahil edilen kişilerden alınan venöz kan örneklerinde, rutin kontrol için DEÜ Merkez Laboratuvarı'nda 1 mg deksametazon öncesi ve sonrası serum kortizolü, 1mg DST, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEAS), ACTH, total kolesterol, LDL, HDL, trigliserit, HbA1c düzeyleri ölçüldü. Alınan kan örneklerinde rutin ölçümler dışında herhangi başka bir ölçüm yapılmadı. Kişilerden rutin kan testlerine ilave olarak tükürük kortizolü ölçümü için günde üç kez 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde tükürük örnekleri alındı. Tükürük kortizolünün LC-MS/MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülmesi DEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışma grubunun örnekleme tamamlandığında, rutin laboratuvar testleri sonuçlarına göre katılımcılar aşikar hiperkortizolemi (Cushing Sendromu-CS) (n=20), subklinik hiperkortizolemi (Subklinik Cushing Sendromu-SCS) (n=52) ve fonksiyonel olmayan adenom (NFA) (n=49) olarak üç gruba ayrıldı. Ölçüm sonuçlarına göre hiperkortizolemisi olmayan NFA grubu kişiler çalışmanın kontrol grubunu oluşturdu. Literatürdeki benzer yayınlar baz alınarak yapılan G Power güç analizi sonucunda sağlıklı bireyler ve CS'li bireyler arasında kortizol düzeyi farkını %80 güç ile belirleyebilmek için minimum toplam 32 bireylik (16 CS ve 16 sağlıklı) örneklemin yeterli olduğu tespit edilmiştir.

- Dahil Etme ve Dışlama Kriterleri

Çalışmaya hiperkortizolemi durumunun ekarte edilmesi gereken klinik bulgulara sahip 18 yaş üstü kişiler dahil edildi. Bu klinik bulgular; rastlantısal adrenal kitle saptanması veya viseral obezite, proksimal kas güçsüzlüğü, yeni ortaya çıkan strialar, kontrolsüz hipertansiyon ve diyabet, boyun bölgesindeki yağ yastıkçıklarında hipertrofidir. Aktif malignite, aktif

enflamatuar veya enfeksiyöz süreç, HHA ile etkileşen ilaç kullanımı olan hastalar ise çalışmadan dışlandı. Ayrıca kan veya yutulan bileşikler tarafından tükürük kontaminasyonu riskini en aza indirmek için, tükürük örnekleme esnasında ağız ülseri, diğer oral lezyonu olan hastalar çalışmaya dahil edilmedi.

3.4. Araştırmanın Çalışma Materyali

Tükürük kortizolü ölçümü için hastalardan 1 mL’lik tükürük örneği Salivette®-Sarstedt tükürük toplama kabına toplandı. Tükürük toplama işlemi tüplerin kullanım talimatına uygun şekilde gerçekleştirildi (72) (Şekil 7)(EK-3). Hastalara, örnek alınımından üç saat öncesine kadar yemekten kaçınılması aynı zamanda dişlerini fırçalamaması gerektiği aktarıldı. Alınan tükürük örnekleri porsiyonlanarak -80 °C’de analiz zamanına kadar saklandı. Rutin biyokimya analizleri için ise 5 mL düz kan örneği alındı.



Şekil 7. Tükürük örnekleri toplama protokolü [82]

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Araştırmadaki bağımlı değişkenler; Tükürük kortizol seviyeleri

Araştırmadaki bağımsız değişkenler; Hasta ve kontrol grubunu oluşturacak kişilerin cinsiyeti, yaşı, CS, SCS veya hiperkortizolemi durumu, sigara kullanımı, VKİ.

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Kullanılan Cihaz, Kimyasal Maddeler ve Malzemeler

Tez çalışmasında kullanılan cihazlar Tablo 6.'de, çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 7.'de ise kimyasal malzemeler gösterilmiştir.

Tablo 6. Çalışmada kullanılan cihazlar

Cihaz Adı	Marka/Model	Kullanım Amacı
- HPLC sistemi Shimadzu - Pompa sistemi - Oto-örnekleyici - Degasser ünitesi - Kolon fırın	- Shimadzu LC-20AD - LC-20AD - SIL-20AC HT - DGU-20A3 - CTO-10AS	Tükürük kortizolu ölçümü
Tandem kütle spektrometre (MS/MS)	AB Sciex 4000QTRAP	Tükürük kortizolu ölçümü
Mikroplate okuyucu	Bioteck Snergy HT	ELISA plate okuma
Hassas terazi	Precisa, XB220A	Kimyasal tartımı
Derin dondurucu -80 °C	Thermo Scientific, Forma 705	Örneklerin saklanması
Derin dondurucu -20 °C	Uğur	Sarf malzemelerin saklanması
Buzdolabı +4 °C	Uğur	Sarf malzemelerin saklanması
Plate çalkalayıcı inkübatör Labnet	VorTemp 56	Plate inkübasyonu
Ultrasonik yıkama cihazı	Transsonic 660	Ultrasonik temizleme
Numune karıştırıcı	Vibramax 100	Numunelerin karıştırılması
Soğutmalı Santrifüj	NF800R	Örneklerin çöktürülmesi
Manyetik Karıştırıcı	WiseMix vm-10	Solüsyonların karıştırılması
100 µL otomatik pipet	Eppendorf	Analiz öncesi, sonrası hazırlıklar
200 µL otomatik pipet	Eppendorf	Analiz öncesi, sonrası hazırlıklar
1000 µL otomatik pipet	Eppendorf	Analiz öncesi, sonrası hazırlıklar
Multi pipet	Eppendorf	ELISA plate pipetleme
SpeedVac Vakum Konsantratörü	Thermo, Savant ISS110	Örneklerin konsantre edilmesi
Mikrosantrifüj	Eppendorf mini spin	Örneklerin çöktürülmesi, karıştırılması
Vakum Manifoldu	Waters U.S.A	SPE işlemi gerçekleştirilmesi

Tablo 7. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve malzemeler

Kimyasal/Malzeme adı	Markası-Katalog Numarası-Üretici Firma	Kullanım Amacı
Filtreli tüp, 3 kDa	Pall, Nanosep	Kütle spektrometrik analiz
Asetonitril LC grade	Merck, 1.00030.2500	Kütle spektrometrik analiz
Metanol LC grade	Sigma, 384885	Kütle spektrometrik analiz
Etil Asetat	Erba Pharm/ 341503	Kütle spektrometrik analiz
2 Propanol	Emsure/1.09634.2500	Kütle spektrometrik analiz
Kortizol Standardı	Sigma C106	Kütle spektrometrik analiz
D4. Kortizol Standardı	Cerillant C113	Kütle spektrometrik analiz
Estriol	Sigma e 1253	Numune ekstraksiyonu
Katı Faz Ekstarksiyon Kartuşu (SPE)	Strata- X 33µm	Numune ekstraksiyonu
Analitik kolon	Restek Ultra II® Aromax kolon (100×3.2 mm, 3 µm)	Kütle spektrometrik analiz
Guard kolon	Column E ODS-3, 3 µ, 1.5 x 10 mm	Kütle spektrometrik analiz
Salivette tükürük toplama tüpü	Sarsted/ 51.1534.500	Tükürük numunesi toplama
15 ml ve 50 mL falkon tüpler	Isolab, Corning	Genel kullanım
5 mL ve 10 mL serolojik pipetler	Jet Biofil, Sarstedt	Genel kullanım
Cortisol Saliva ELISA kiti	Biovendor , RCD005R	ELISA ölçümleri
100 - 200 - 1000 µL pipet ucu	Lp Italiana Spa/ L151143	Genel kullanım
Mikrosantrifüj Tüpü 2.0 mL, 1.5 mL	Eppendorf	Genel kullanım

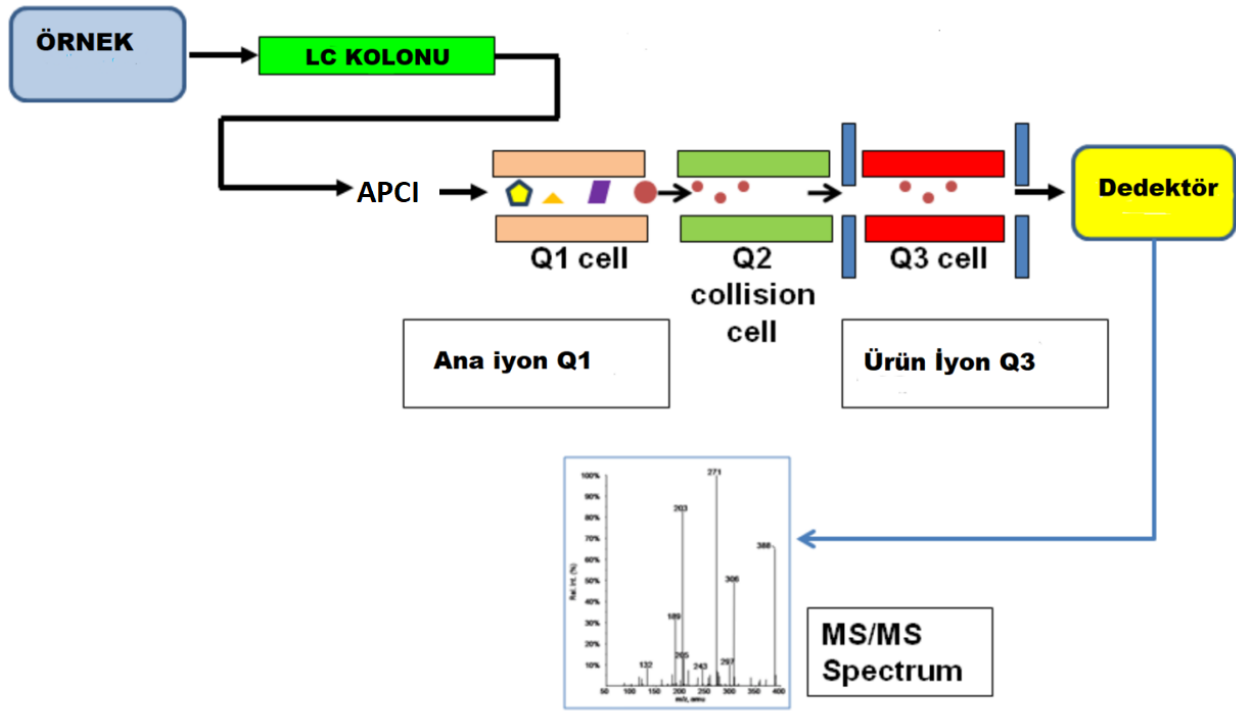
3.6.2. Tükürük Kortizolü Düzeylerinin LC-MS/MS ile Ölçümü

3.6.2.1. LC-MS/MS Ölçüm Prensipleri

Tükürük kortizol düzeylerinin kantitatif ölçümü LC-MS/MS (Shimadzu, Kyoto, Japan-4000 QTRAP, AB SCIEX, ABD) ile gerçekleştirildi. Veri analizi için Analyst Software Version 1.5 kullanıldı. LC-MS/MS sisteminde ilk adım, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine yakın bileşenlerden oluşan biyolojik karışımların sabit faz ile hareketli faz arasındaki ayrılmasını sağlayan sıvı kromatografisi (LC) dir. Karışımdaki bileşikler kolon içerisinde farklı hızlarda hareket ederek kromatografik olarak alıkonma zamanlarına (RT) göre birbirlerinden ayrılırlar. Alıkonma zamanı her bir bileşik için farklıdır. Kütle spektrometresi

(MS), iyonize edilen analitlerin elektromanyetik bir alan içerisinde sıvı fazdan gaz fazına geçirilerek analitlere özgü bir kütle-yük oranını (m/z) ölçen analitik bir tekniktir (Şekil 8). Bu yöntem sisteme giren bileşiklerin tanımlanmasında kullanılmaktadır [83]. İyonizasyon mekanizmaları belirgin şekilde değişse de, tüm kütle spektrometreleri moleküllere iyon yükler. İyonizasyon işleminin verimliliği bir molekül üzerine yerleştirilen yük tipi, iyonizasyon yöntemine bağlı olarak değişir [83]. Çalışmamızda “atmospheric pressure chemical ionization (APCI)” iyonizasyon türü kullanıldı. APCI, küçük, ısıya dayanıklı moleküllerin analizi için önemli bir tekniktir [83]. Kütle analizöründeki elektriksel alan istenilen analitin m/z değerine göre geçişine izin veren bir filtre görevi görür. İki kütle analizörünün ard arda geldiği sisteme sıralı kütle spektrometresi (Tandem MS) adı verilir [83].

Triple quadrupole ion trap, tandem MS özelliğindeki hibrid bir kütle analizörüdür. Ardışık üç quadropolden oluşan triple quadropol kütle analizörlerinde (QQQ) ana iyonların filtrelenmesinin gerçekleştirildiği Q1, seçilen ana iyonun Q2 kısmına iletilerek collision gaz adı verilen yüksek saflıkta özel bir gaz ile (inert N_2 gazı) parçalandığı Q2 kısmı ve oluşan ürün iyonların Q3’e geldiklerinde belirlenen m/z değerlerine göre ayrıldıkları kısımlardan oluşur. Daha sonra dedektör yardımıyla kalitatif ya da kantitatif olarak değerlendirme yapılır [83]. Bu yöntemde ayrıca kantitasyonun güvenilirliğini arttırmak amacıyla çalışmanın başında her bir örneğe belirli konsantrasyondaki stabil izotoplarla işaretlenmiş internal standart (IS) eklenmesiyle MS öncesi (ekstraksiyon, HPLC enjeksiyonu vb.) ve MS koşullarında (iyonizasyon vb.) oluşabilecek değişiklikler normalize edilmiş olur. Internal standartlar ^{13}C , ^{15}N veya 2H (döteryum) ile işaretlenebilir. Stabil izotop işaretli IS’lerin kimyasal özelliği, kromatografik ayrımlanma özellikleri, iyonizasyon etkinliği ve fragment iyon dağılımı hedef analit ile aynıdır. IS’ın hedef analitten tek farkı ^{12}C yerine ^{13}C ’ün, ^{14}N yerine ^{15}N ’in ve 1H atomu yerine 2H atomunun geçmesi nedeniyle daha yüksek moleküler kütleye sahip olmasıdır.



Şekil 8. LC-MS/MS tekniğinin şeması [84]

3.6.2.2. LC-MS/MS Koşulları

3.6.2.2.1. LC-MS/MS Koşulları Optimizasyon Çalışmaları

Tükürük örneklerinde LC-MS/MS kortizol ölçümlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla öncelikli olarak kortizol standardı ve IS (D4-Kortizol) kullanılarak yöntem optimizasyonu çalışmaları tamamlandı.

Kullanılan standartlar:

- **Kortizol (1 mg/mL metanolde-Sigma C106):** Ana stoktan metanol ile 1/10 dilüsyon yapılarak 100 µg/mL (ppm) konsantrasyonunda ara stok çözeltisi hazırlandı.
- **D4-Kortizol (100 µg/mL metanolde-Cerillant C113):** Optimizasyon çalışmaları için ana stoktan çalışmalar için gereken dilüsyonlar yapıldı.

Tandem Kütle Spektrometre Koşulları

Optimizasyon çalışmaları kapsamında kortizol ve D4-kortizol için bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametreler, izlenecek ana iyon/ürün iyon ikilileri belirlendi. Kütle spektrometresinde analite özgü parametreler, standartların infüzyon pompasından iyon kaynağına gönderilmesi ile optimize edildi ve MS/MS yöntemi oluşturuldu.

Kullanılan tandem kütle spektrometresinin (4000 QTRAP) özellikleri:

-İyonizasyon kaynağı: Turbo V

-İyonizasyon türü: APCI

-İyonizasyon modu: Çoklu reaksiyon izleme (MRM)-pozitif iyon modu

-Software: Analyst 1.5

İnfüzyon için her bir standart ve IS için hazırlanan 100 µg/mL'lik çözeltiler metanol ile 1/20 oranında seyreltilerek son konsantrasyon 5 µg/mL olarak hazırlandı. Her biri ayrı ayrı şırıngaya çekilen 5 µg/mL konsantrasyonundaki çözeltiler, infüzyon pompası akış hızı (10 µL/dk) ve HPLC şakış hızı (500 µL/dk) da hesaba katılarak son konsantrasyonları 100 µg/L olacak şekilde infüzyon pompasına verildi. Mobil faz olarak 10 mmol/L formik asit içeren asetonitril kullanıldı.

HPLC koşulları:

Tükürük örneğinden kortizol ekstraksiyonu ve LC-MS/MS'de ölçümü yapılacak bileşiklerin (kortizol ve IS) alıkonma zamanlarının belirlenmesi ve pik şekillerinin hangi mobil faz ve akış programında uygun şekilde elde edilebileceğini analiz etmek için farklı metot deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Bu çalışmalar için; 100 µg/mL konsantrasyonunda stok çözeltileri olan standart ve IS örnekleri metanol:su (1:1) ile 1/250 oranında dilüe edildi. 400 µg/L olarak hazırlanan her bir çözeltiden 25'er µL çekilerek son konsantrasyon 100 µg/L olacak şekilde 100 µL hazırlanarak HPLC vialine aktarıldı ve analizi gerçekleştirildi. Yapılan optimizasyon çalışmaları sonucunda elde edilen çalışma koşulları Tablo 8.'de verilmiştir.

Tablo 8. HPLC çalışma koşulları

Cihaz:	Shimadzu LC-20AD	Kolon fırın sıcaklığı:	45 °C
Analitik kolon:	Restek Ultra II® Aromax kolon (100×3.2 mm, 3 µm)	Program:	İzokratik
Guard kolon:	Cartridge Guard Column E ODS-3 3 µ, 1.5 x 10 mm	Minimum-maksimum basınç:	0-400 bar
Mobil fazlar:	Mobil Faz A: %95 metanol Mobil Faz B: 10 mmol/L formikasit içeren asetonitril	Toplam analiz süresi:	6.1 dk
Akış hızı:	0.5 mL/dk	Enjeksiyon hacmi:	30 µL
Alıkonma zamanı (RT):	*Kortizol: 1.85 dk *D4-kortizol: 1.84 dk		

Kortizol ekstraksiyon prosedürü [85]:

- Tükürük kortizolü ölçümü örnek ekstraksiyonu için 2 mL mikrosantrifüj tüpü içerisine 200 µL tükürük (ya da standartlar), 100 µL IS (10 µg/L D4-kortizol) ve 800 µL distile su eklendi. Karışım karıştırıcıda 15 dakika boyunca inkübasyona bırakıldı. Ardından 2500 rpm’de iki dakika santrifüj edildi.
- Vakum konsantratörüne katı-faz ekstraksiyon kartuşları (SPE kartuşları) yerleştirildi. Kartuşlar düşük vakum altında 500 µL metanol ve daha sonra 500 µL distile su pipetlenerek yıkandı.
- Dengelenmiş SPE kartuşu üzerine 1100 µL örnek karışımı eklendi. Düşük vakum altında örnek karışımı kartuştan geçirildi.
- Sonrasında kartuş üzerine 1 mL distile su ve ardından 1 mL %30 metanol- distile su karışımı pipetlenerek yıkama yapıldı. En yüksek seviye vakum altında kartuş 15 dk boyunca kurutuldu.
- 2x500 µL % 15 izopropanol içeren etil asetat solüsyonu ile analitin kartuştan elüsyonu sağlandı. Örnekler speedvac’de vakum altında kurutuldu. Kurutulan örneklerin analizi 100 µL 10 mg/L estriol içeren metanol-su (1:3) içerisinde çözündürülüp HPLC viallerine aktarıldıktan sonra gerçekleştirildi.
- 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5 ve 10 µg/L konsantrasyonlarında kortizol standartları kullanılarak çizilen standart grafikten yararlanılarak tükürük örneklerindeki kortizol düzeylerinin µg/L cinsinden kantitatif ölçümü gerçekleştirildi.

3.6.2.3. METOT VALİDASYONU ÇALIŞMALARI

3.6.2.3.1. Doğruluk

Doğruluk çalışması CLSI EP15A2 [76] kılavuzuna göre gerçekleştirildi. Doğruluk çalışmaları kapsamında 0.1, 5 ve 100 µg/L konsantrasyonunda hazırlanan kortizol standartları 10’ar kez çalışıldı. Ayrıca konsantrasyonu bilinen standart referans materyali (National Institute of Standard and Technology NIST-CRM 971 female and male) örnekleri de birer kez çalışıldı. Tükürük örneği için ticari olarak satılan sertifikalı referans materyal bulunamadığından NIST-CRM 971 serum örnekleri ile çalışıldı. Elde edilen verilerle % Doğruluk hesabı (gerçek değer/ölçülen değer x100) yapıldı.

3.6.2.3.2. Doğrusallık (Linearite) ve Ölçüm Aralığı Çalışmaları

Doğrusallık Çalışması: Doğrusallık çalışması CLSI EP6-A [68] protokolüne uygun şekilde gerçekleştirildi. Bu protokol doğrultusunda; 1 mg/mL ana stok kortizol standardından 1000 µg/L konsantrasyonda ara stok hazırlanıp 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde 1:1 methanol-su kullanılarak seri dilüsyonlar yapıldı elde edilen standartlar üç tekrarlı olarak çalışıldı.

Ölçüm Aralığı Çalışması: Kalibrasyon grafiği 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/L'lik standartlar kullanılarak her biri üç gün ve günde üç tekrarlı olacak şekilde çalışılarak çizildi. 1 mg/mL ana stok olan kortizol standardından 1000 µg/L konsantrasyonda ara stok hazırlanıp 0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/L'lik konsantrasyonlar elde edilecek şekilde 1:1 methanol- su kullanılarak seri dilüsyonlar yapıldı ve elde edilen standartlar kullanıldı.

3.6.2.3.3. Analitik Ölçüm Limitleri

CLSI EP17-A2 kılavuzunda belirtilen protokole göre çalışıldı [71].

3.6.2.3.3.1. LOB

LOB belirleme çalışmaları için kullanılmak üzere 200 µL su (blank) örneği ekstrakte edildi. Ekstrakte edilen örnek toplamda 20 defa okutularak kortizol değerleri hesaplandı.

3.6.2.3.3.2. LOD ve LOQ

LOD ve LOQ belirlenmesi için seri dilüsyonlu standart örnekleri (0.01, 0.1, 0.5, 1 µg/L) kullanıldı. LOD ve LOQ belirlenmesi için sinyal/gürültü oranı (S/N) esas alındı. S/N>3 olduğu konsantrasyon LOD, S/N>10 olduğu konsantrasyon ise LOQ olarak belirlendi.

3.6.2.3.4. Gün İçi ve Günler Arası Tekrarlanabilirlik

CLSI EP05-A2 [74] protokolüne uyularak gerçekleştirilen tekrarlanabilirlik çalışmasında kortizol için 0.1, 5, 100 µg/mL'lik standartlarla gün içi çalışma kapsamında her standart için 15 ölçüm, günler arası çalışma için her standart üç gün boyunca her gün üç tekrar olacak şekilde ölçüm gerçekleştirildi. Kesinlik, varyasyon katsayısı (% CV) olarak ifade edildi.

3.6.2.3.5. Geri Kazanım Çalışması

Geri kazanım çalışmaları CLSI 62-A [70] ve C 50-A [83] kılavuzları referans alınarak SPE öncesi ve sonrası için değerlendirilecek şekilde gerçekleştirildi. Hastalara ait normal düzeyde bulunan beş adet tükürük örneğinden oluşturulan tükürük havuzu çalışmalar için kullanıldı.

Örnek havuzunda kortizol düzeyi ölçüldü ve tükürük havuzuna düşük, orta ve yüksek konsantrasyonlarda (0.5, 5, 50 µg/L) standartlar eklenerek analiz tekrarlandı. Beklenen ve ölçülen değerler arasındaki orandan geri kazanım yüzdeleri (% R) hesaplandı. Ölçümler üçer kez tekrarlanarak ortalama değerleri belirlendi.

3.6.2.3.6. Referans Aralık Doğrulama Çalışması

EP28-A3c [86] kılavuzu referans alındı. Bu kılavuza göre en az 20 kontrol ile referans aralığının doğrulanması önerilmektedir. Buna göre örneklerin % 95'inin bu aralık içinde olması kabul kriteridir. Referans aralığı doğrulama amacıyla hiperkortizolemisi olmayan NFA grubu örneklerinin analizi gerçekleştirilerek sonuçlar değerlendirildi.

3.6.2.3.7. Taşıma (Carryover) Çalışması

FDA'nın [79] son yayınladığı kılavuz taşımayı değerlendirmek için yüksek konsantrasyonlu bir numuneden hemen sonra bir veya daha fazla boş numunenin enjekte edilmesi gerektiğini belirtir. Yüksek konsantrasyon olarak 100 µg/mL standart okutuldu, düşük konsantrasyon olarak ise blank (mobil faz) okutuldu bu işlem ard arda 10 kez tekrarlandı.

3.6.2.3.8. Numune Stabilite Çalışması

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

3.6.2.3.9. Dondurma ve Çözmenin Etkisinin Belirlenmesi

Dondurma ve çözme işleminin kortizol üzerindeki etkisini belirlemek amacıyla düşük ve yüksek konsantrasyonlarda seçilen tükürük numuneleri 4 kez dondurulup çözüldü. Çözdürülen numuneler ön işlemlerden geçirilerek analiz edildi ve ölçüm sonuçları incelendi.

3.6.2.3.10. Matriks Etkisi Çalışması

Matriks etkisi, SPE öncesi ve sonrası için değerlendirilecek şekilde European Medicines Agency (EMA) kılavuzuna [87] uygun olarak gerçekleştirildi. Bu kapsamda altı farklı bireyden alınan tükürük örnekleri ve blank örnek (neat solution) kullanıldı. SPE öncesi matriks etkisini değerlendirmek amacıyla ekstraksiyon öncesi tüm örnekler düşük, orta ve yüksek düzeyi temsil eden üç farklı konsantrasyonda (0.5, 5 ve 50 µg/L) kortizol standardı eklendi. SPE sonrası matriks etkisini değerlendirmek için ise aynı konsantrasyonlarda standart materyal, ekstraksiyon sonrası elde edilen örnekler doğrudan eklendi. SPE öncesi ve sonrası matriks etkisini değerlendirmek amacıyla standart eklenmiş örnek sonuçları endojen kortizol düzeyleri ile düzeltildi. Matriks faktör (MF), analit ve internal standart için ayrı ayrı olacak şekilde, standart eklenmiş tükürük örneklerindeki peak alanlarının standart eklenmiş blank örnekteki peak alanlarıyla karşılaştırılmasıyla hesaplandı. Son olarak, analitlerin matriks faktörü, IS matriks faktörüne bölünerek IS-normalize matriks faktörler hesaplandı ve sonuçlar IS-normalize matriks faktör olarak ifade edildi. Ayrıca, standart eklenmiş altı farklı tükürük örneğinin IS-normalize matriks faktörlerinin %CV değerleri hesaplandı ve %15'in altındaki %CV değerleri kabul edilebilir olarak değerlendirildi.

3.6.2.3.11. Seçicilik (Selectivity)

Seçicilik, analitin kompleks bir bileşim içinde doğru olarak belirlenebilmesidir. LC-MS/MS yöntemlerinde seçiciliğin belirlenmesi için alıkonma zamanı ve analite ait farklı ana iyon/ürün iyon çiftleri kullanılır [88]. Bu parametreler farklı kişilerden elde edilen örneklerde doğrulanır.

3.6.2.3.12. Metot Karşılaştırma Çalışmaları

Metot karşılaştırma çalışmaları için CLSI EP09 [89] kılavuzu referans alınmıştır. Bu kılavuza göre en az 40 örnek ile çalışılması gerekmektedir. Çalışma kapsamında CS, SCS ve NFA hastalarından alınan üç farklı saatteki tükürük kortizolü örneklerinin tümü (n=121) LC-MS/MS cihazında ölçüldü. Bu örnekler içerisinde 57'si (CS n=12, SCS n=28, NFA n=17) yöntem çalışması kapsamında ELISA yöntemi ile eş zamanlı olarak çalışıldı. Elde edilen verilere Passing-Bablok regresyon analizi ve Spearman korelasyon analizleri uygulanarak iki yöntem karşılaştırıldı. İki yöntemin ölçümünden elde edilen değerler MedCalc analiz programı kullanılarak değerlendirildi. Metotlar arasındaki uyum Bland-Altman grafikleriyle gösterildi. Testin hasta ve sağlıklı kişileri ayırma gücünün belirlenmesi, testlerin etkinliklerinin

kıyaslanması, duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek eşik değerinin belirlenmesi için ROC eğrisinden yararlanıldı.

3.6.2.3.12.1. Tükürük Kortizol Düzeylerinin ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) Yöntemi ile Çalışılması

Tükürük örneklerinde kortizol düzeyinin ölçümü ELISA (BioVendor, Çek Cumhuriyeti, Katalog No: RDRCD005R) kiti ile gerçekleştirildi. ELISA kiti içinde bulunan malzemeler ve hazırlanma şekilleri Tablo 9.'da gösterilmiştir.

Test prensibi: Bu ölçüm yöntemi, kantitatif bir yarışmalı enzim immunoassay tekniğidir. Bu teknikte kuyucuklar kortizole karşı geliştirilmiş poliklonal antikorlarla kaplanmıştır. Ölçülecek numune ve enzim etiketli antijen aynı anda kuyucuğa pipetlenir. Böylece birbirileri ile kuyucuktaki antikora bağlanmak için yarışmaya girerler [90]. Yıkamadan sonra enzime spesifik substrat eklenir ve elde edilen rengin absorbansı reaksiyon durdurulduktan sonra okunur. Oluşan renk ile konsantrasyon ters orantılıdır. Analiz edilen antijen konsantrasyonu düşük ise yüksek absorbans elde edilirken, daha büyük konsantrasyonlarda düşük absorbans elde edilir [91]. Reaksiyon, ortama asit ilavesi ile sonlandırılır ve oluşan rengin yoğunluğu 450 nm'de ölçülür. Örneklerdeki kortizol konsantrasyonu çizilen standart grafikten yararlanılarak ng/mL ya da µg/dL olarak hesaplanır.

Kontrol Örnekleri: Her bir çalışmada 2 farklı seviye kontrol örneği çalışıldı.

Aynı zamanda her iki seviye kontrol örnekleri kullanılarak gün içi ve günler arası %CV değerleri hesaplandı. Gün içi % CV değeri yüksek seviye kontrol örneğinin aynı gün içerisinde 10 kez çalışılması ile elde edilen sonuçlar üzerinden hesaplandı. Günler arası % CV değeri her iki kontrol örneğinin 3 farklı günde birer kez çalışılması ile elde edilen sonuçlar üzerinden hesaplandı. Üreticinin önerdiği uygulama basamakları aşağıda verilmiştir [92];

Tablo 9. ELISA kiti içinde bulunan malzemeler ve hazırlanma şekilleri [92]

Malzeme	Hazırlama
Rabbit Anti Cortisol Antibody Coated Microwell Plate	Kullanıma hazır 96' lık well şeklinde (12x8)
Cortisol -Horseradish Peroxidase (HRP) Conjugate Concentrate	1:50 dilüe edilir
Standartlar (0,1,3,10,30,100 ng/mL)	Kullanıma hazır
Kontroller	Kullanıma hazır
Wash Buffer	1:10 dilüe edilir
Assay Buffer	Kullanıma hazır
TMB substrat solüsyonu	Kullanıma hazır
Stopping Solüsyon	Kullanıma hazır

Uygulama Basamakları

Çalışmadan önce tüm standartlar, kontroller ve numuneler oda sıcaklığına getirildi.

1. HRP kortizol (assay buffer ile 1:50 dilüe edildi) ve wash buffer (distile su ile 1:10 dilüe edildi) çalışma solüsyonlarını hazırlandı.
2. Standartlar (0,1,3,10,30,100 ng/mL standartlar kullanıma hazır) , kontrol örnekleri ve serum örnekleri 96'lık ELISA mikropak kuyucuklarına 50'şer µL olarak pipetlendi.
3. Bu işlemin ardından her bir kuyucuğun içine 100 µL konjugat çalışma solüsyonu konuldu.
4. Oda sıcaklığında Plate karıştırıcıda (VorTemp 56) 200 rpm' de 45 dakika inkübasyona bırakıldı.
5. Her bir kuyucuk 3 kez 300 µL wash buffer (1:10 distile su ile dilüe edilmiş) ile yıkandı, plate in üst kısmını kurutmak için abzorbant kağıt yerleştirildi.
6. Her bir kuyucuğa 150 µL TMB substrat eklendi.
7. Oda sıcaklığındaki plate karıştırıcı'da 15-20 dakika bekletildi. (standart A koyu mavi renge ulaşana kadar)
8. Herbir kuyucuğa 50 µL stop solüsyonu eklenerek reaksiyon sonlandırıldı.
9. Mikropak okuyucu (Biotek Snergy HT) kullanılarak 450 nm'de ölçüm yapıldı. Tüm örneklerle ait absorbanslar elde edildi.

10. Tükürük kortizol konsantrasyonları hazırlanan logaritmik skalada standart grafiğin denkleminde yararlanılarak hesaplandı. Tüm standartlar çift çalışıldı. Tüm sonuçlar ng/mL ya da µg/dL olarak hesaplandı.

3.7. Araştırma Planı ve Takvimi

Ocak-Haziran 2017	Tez önerisi hazırlanması
	Tez önerisi sunumu ve kabulü
Eylül-Mart 2018	Etik kurul onayı
	Proje önerisinin hazırlanması
Şubat 2018-Mart 2019	Örnek toplama süreci
Kasım 2018-Ocak 2019	Projenin kabul edilmesi
	Malzeme alımları
Ocak-Mart 2019	LC-MS/MS ön çalışması
	LC-MS/MS validasyon çalışmaları
Mart-Eylül 2019	LC-MS/MS ile örneklerin analiz edilmesi
	ELISA ile örneklerin analiz Edilmesi
Ocak-Aralık 2020	İstatistiksel analizler
	Tez yazım aşaması

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

İstatistiksel analizler SPSS 22.0 (SPSS Inc., ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Tüm ölçümlerden elde edilen değerler medyan ve en düşük-en yüksek değer (min-max) olarak sunuldu. Her çalışma grubundan gelen verilerin normalliği Shapiro-Wilk normallik testi ile test edildi. Sınırlı örneklem büyüklüğüne ve sürekli değişkenlerin normal olmamasına

dayanarak, bağımsız gruplara ait veri setleri Kruskal-Wallis testi ve ardından Dunn'ın çoklu karşılaştırma testi, bağımlı gruplar Friedman testi ile değerlendirildi. Kategorik verileri incelemek için Ki-Kare testi kullanıldı. $p < 0.05$ anlamlı kabul edildi. Normal dağılım göstermeyen değişkenler arasındaki korelasyonları analiz etmek için Spearman korelasyon katsayıları kullanıldı. Korelasyonun gücü (r), 0,00-0,24 arasında ise zayıf; 0,25-0,49 arasında ise orta; 0,50-0,74 arasında ise güçlü ve 0,75-1,00 arasında ise çok güçlü olarak değerlendirildi. Yöntemler arası mutlak uyumu araştırmak için Bland Altman grafikleri, yöntemlerin ilişkisel uyumunu göstermek için de Passing Bablok analiz çözümleri yapıldı. Testin ayırt etme gücünün belirlenmesinde, testlerin etkinliklerinin karşılaştırılmasında, uygun pozitiflik eşiğinin belirlenmesinde, ROC analizinden yararlanıldı. Çalışmamızda ROC analizinde referans yöntem olarak 1 mg DST testi seçildi.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

LC-MS/MS ile tükürük kortizolü ölçümü için kullanılan SPE ekstraksiyon yöntemi yerine laboratuvarında rutin iş akışında daha rahat uygulanabilecek olan sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürü de yöntem optimizasyonu çalışmaları kapsamında denenmiştir. Ancak uygulanan prosedür kapsamında gerçekleşen analiz sonrasında elde edilen piklerin kalitesinin kantitasyon yapılamayacak düzeyde kötüleştiği gözlemlendi. Bu nedenle sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduna göre daha fazla zaman ve maliyet gerektiren SPE bazlı ekstraksiyon metodu kullanıldı.

Ayrıca bütçe sebebiyle interferans ölçümü için gereken malzemeler tedarik edilemediğinden validasyon çalışmaları kapsamında interferans çalışması yapılamamıştır.

Tükürük toplama sırasında özellikle gece yarısı tükürük toplama saatlerinde, tükürük toplama işleminin hastanın kendi kontrolünde olması sebebiyle saatlere tam uyulduğu düşünülerek çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Gece yarısı tükürük kortizolü ölçümü için bu durum sınırlılık oluşturmaktadır.

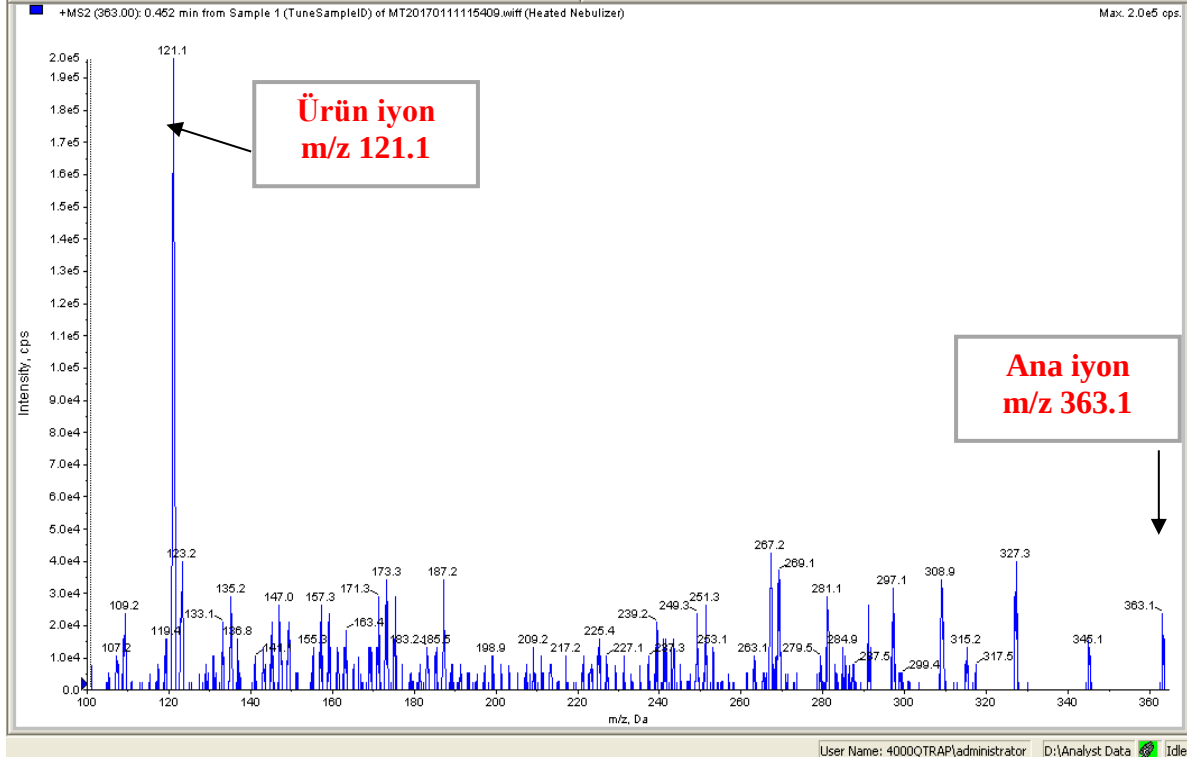
3.10. Etik Kurul Onayı

Çalışmamız için Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 29.03.2018 tarih ve 2018/08-34 karar numarası ile etik kurul onayı alındı (EK-1).

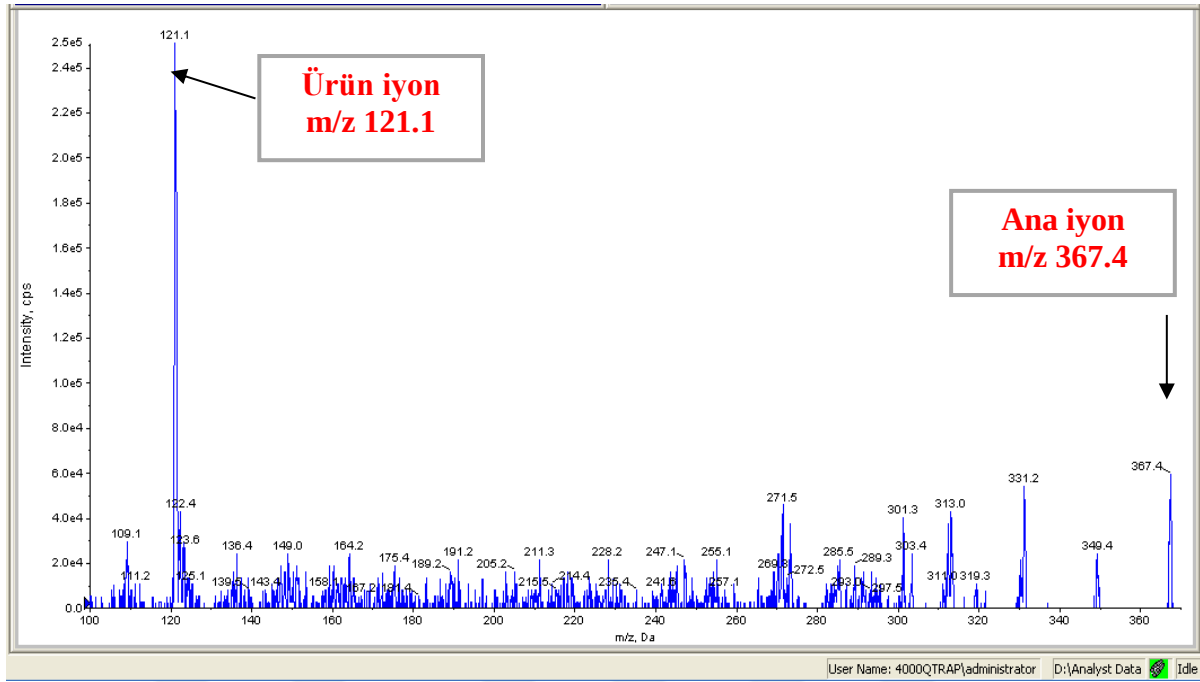
4. BULGULAR

4.1. LC-MS/MS ile Tükürük Kortizol Düzeyi Ölçüm Yöntemi Optimizasyonu

Tükürük örneklerinde kortizol ölçümlerinin gerçekleştirilebilmesi amacıyla öncelikli olarak yöntem optimizasyonu çalışmaları tamamlandı. Optimizasyon çalışmaları kapsamında kortizol ve D4 -kortizol için bileşik ve iyonizasyon kaynağı bağımlı parametreler, izlenecek ana iyon/ürün iyon çiftleri belirlendi (Şekil 9,10).



Şekil 9. Kortizol fragmentasyon spektrumu



Şekil 10. D4-Kortizol fragmentasyon spektrumu

LC-MS/MS’de kortizol kantitasyon yönteminin oluşturulması için bileşik-bağımlı parametreler ve kaynak-bağımlı parametreler aşağıda belirtilen koşullarda optimize edildi (Tablo 10, 11).

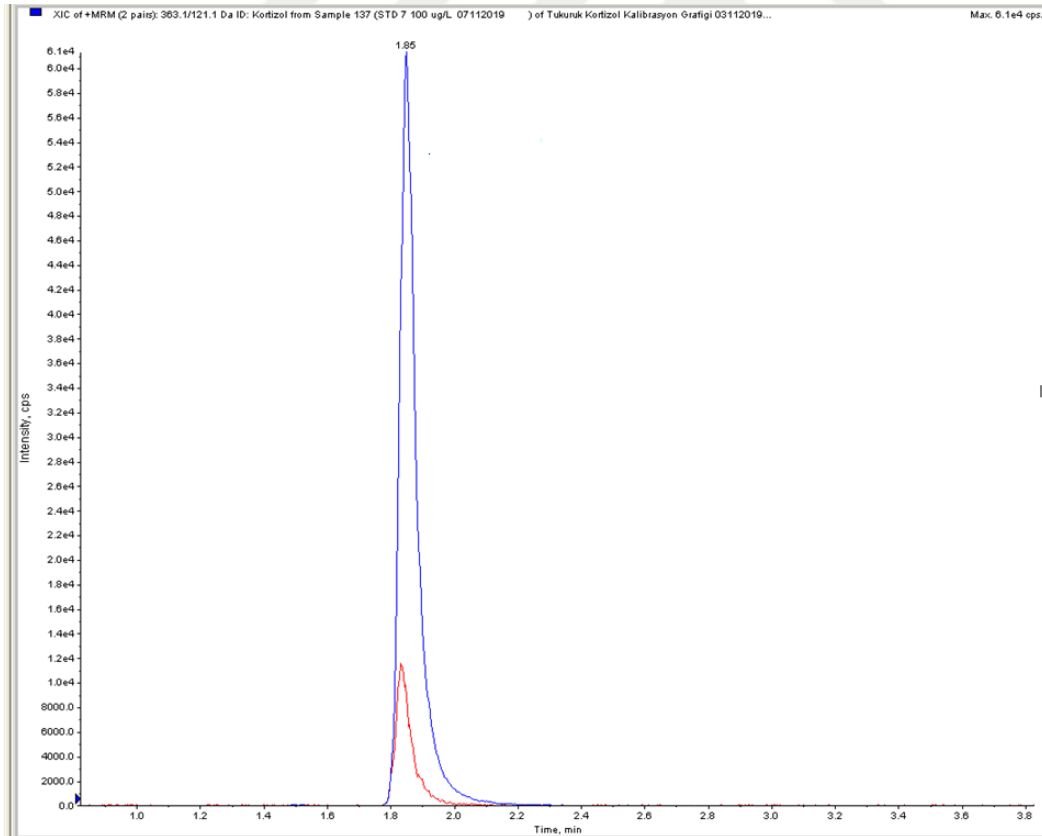
Tablo 10. Kortizol için belirlenen bileşik ve kaynak bağımlı parametreler

Kortizol m/z: 363.1/121.1			
Bileşik - bağımlı parametreler		Kaynak - bağımlı parametreler	
DP	55	Source temp.	300 °C
EP	13	Nebulizer current	3
CE	31	Curtain gas	10
CXP	2	Ion source gas	35
Dwell time	100 ms /transition		

Tablo 11. D4-Kortizol için belirlenen bileşik ve kaynak bağımlı parametreler

D4-Kortizol m/z: 367.4/121.1			
Bileşik - bağımlı parametreler		Kaynak - bağımlı parametreler	
DP	67	Source temp.	300 °C
EP	11	Nebulizer current	3
CE	30	Curtain gas	10
CXP	6	Ion source gas	35
Dwell time	100 ms/transition		

Yöntem optimizasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra standart-IS (kortizol, D4-kortizol) karışımının LC-MS/MS analizlerinden elde edilen total iyon kromatogramlarında kortizol için belirlenen alıkonma zamanları Şekil 11.'de görülmektedir.



Şekil 11. Kortizol ve internal standart (D4-kortizol) pikleri

4.2. METOT VALİDASYONU ÇALIŞMALARI BULGULARI

4.2.1. Doğruluk Çalışması

Kortizol için yapılan doğruluk çalışması bulguları Tablo 12.'de gösterilmiştir.

Tablo 12. Kortizol standartları doğruluk verileri

Kortizol (µg/L)	Ölçülen Konsantrasyon (n=10)	% Doğruluk
0,1	0,10	98,8
5	5,11	102,2
100	106,73	106,7

Yapılan ölçümler sonrası % doğruluk, ölçülen değer, beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak hesaplandı. ISO15189 kılavuzuna göre doğruluk (recovery) sonuçlarının % 100 ± 15 olması beklenmektedir [93].

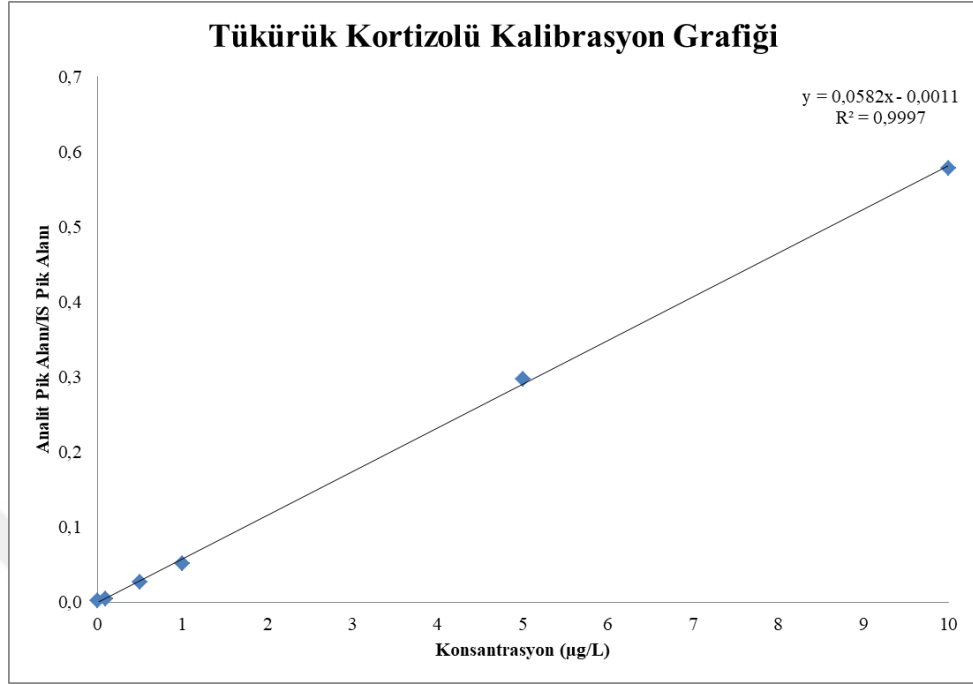
Ayrıca konsantrasyonu bilinen serum standart referans materyali (NIST-CRM 971 female and male) örnekleri de birer kez çalışıldı. Çalışılan örneklerin sonuçlarında 'CRM Erkek' örneği beklenen değerler içinde bulundu ancak 'CRM Kadın' beklenen değerlere yakın bulunmasına rağmen aralık dışındaydı. Bu durumun ekstraksiyon ve ölçüm yönteminin tükürük materyaline göre optimize edilmiş olması kaynaklı olabileceği düşünüldü (Tablo 13).

Tablo 13. NIST CRM kontrol sonuçları

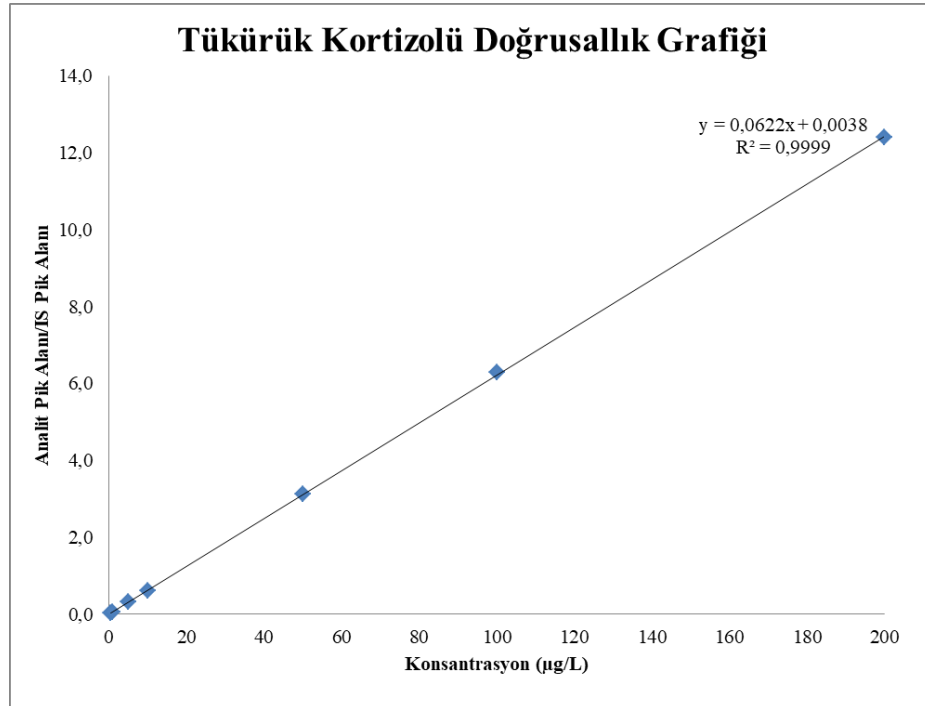
LC-MS/MS ile ölçülen değer (nmol/L)	NIST CRM 971- Female Referans Aralığı (nmol/L)	LC-MS/MS ile ölçülen değer (nmol/L)	NIST CRM 971- Male Referans Aralığı (nmol/L)
267,55	250.1 ±5.8	297,34	296.8±4.1

4.2.2. Linearite (Doğrusallık) ve Ölçüm Aralığı Çalışmaları:

0.01, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/L' lik standart konsantrasyonlarında hazırlanan kalibrasyon grafiğinin regresyon denklemi ve korelasyon katsayısı (R^2) Şekil 12.'de, 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 200 µg/L'lik konsantrasyonlar kullanılarak çizilen doğrusallık grafiğinin regresyon denklemi ve R^2 değeri Şekil 13.'de gösterilmiştir.



Şekil 12. Kortizol kalibrasyon grafiği (Kortizol için $r^2 = 0,9997$, $y = 0,0582x - 0,0011$ olarak bulundu.)



Şekil 13. Kortizol linearite grafiği (Kortizol için $r^2 = 0,9999$, $y = 0,0622x + 0,0038$ olarak bulundu.)

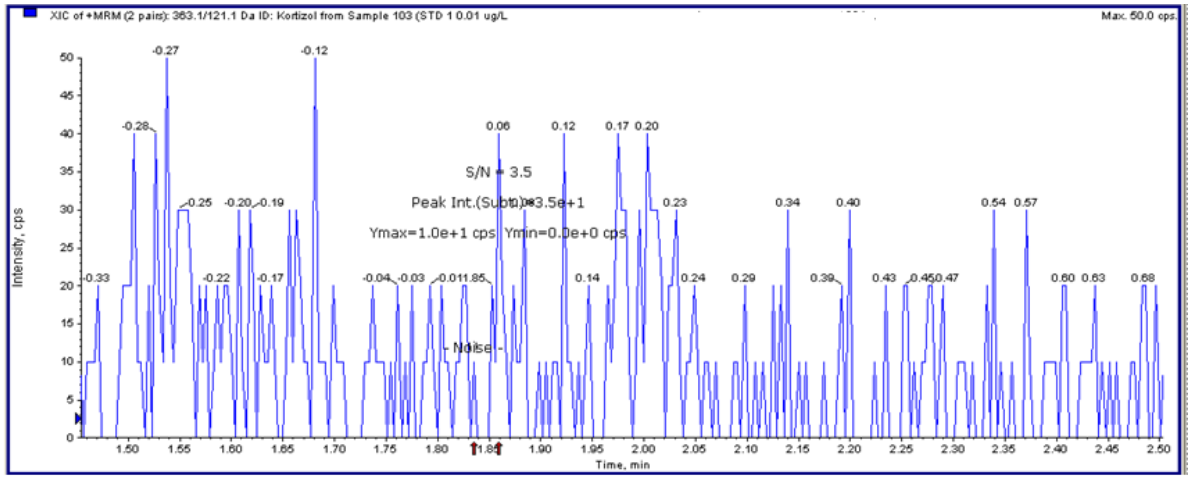
4.2.3. Analitik Ölçüm Limitleri

4.2.3.1. LOB

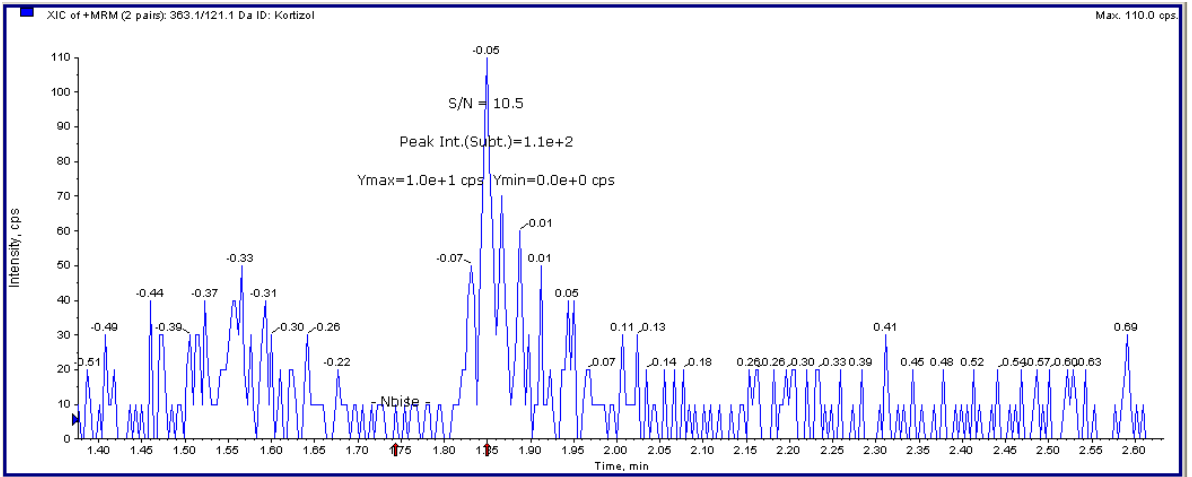
Kortizol için LC-MS/MS’de blank ile yapılan analiz sonuçlarına göre tespit edilen kör okuma limiti 0.005 µg/L (0.0005 µg/dL) olarak belirlendi.

4.2.3.2. LOD ve LOQ

Kortizol için LC-MS/MS’de sinyal gürültü oranına göre belirlenen LOD 0.01 µg/L (0.001 µg/dL) olarak belirlendi. Tespit limiti Şekil 14.’de gösterilmiştir. Kortizol için LC-MS/MS’de sinyal gürültü oranına göre belirlenen LOQ 0.1 µg/L (0.01 µg/dL) olarak belirlendi. Kortizol için LC-MS/MS’de sinyal gürültü oranına göre belirlenen kantitasyon limiti Şekil 15.’de gösterilmektedir.



Şekil 14. Kortizol tespit limiti (Sinyal/ Gürültü: S/N) grafiği



Şekil 15. Kortizol kantitasyon limiti (Sinyal/ Gürültü: S/N) grafiği

4.2.4. Tekrarlanabilirlik çalışmaları

4.2.4.1. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması

0,1, 5, 100 µg/L konsantrasyonlarındaki kortizol standartları aynı çalışma içinde ard arda 15'er kez çalışıldı. Elde edilen verilerden standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (% CV) değerleri hesaplandı. CLSI 62-A Kılavuzuna göre % CV değerinin <15 olması kabul olma kriteridir [70] Buna göre yapılan çalışmalar kabul sınırları içinde bulundu (Tablo 14).

Tablo 14. 0, 1 µg/L, 5 µg/L, 100 µg/L konsantrasyonlarındaki kortizol standartlarına ait gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Konsantrasyon (µg/L)	Ortalama	Standart Sapma(SD)	%CV
0, 1	0,11	0,01	13,76
5	5,08	0,42	8,27
100	107,55	7,26	6,75

4.2.4.2. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları

Kortizol için düşük, orta ve yüksek seviye 0,1, 5, 100 µg/L'lik konsantrasyonlar üç gün boyunca günde üç kez olacak şekilde çalışıldı ve standart sapma (SD), varyasyon katsayısı (% CV) değerleri hesaplandı. CLSI 62-A Kılavuzuna göre % CV değerinin < 15 olması kabul olma kriteridir. 0, 1 µg/L, 5 µg/L, 100 µg/L konsantrasyonları için gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları Tablo 15.' de gösterilmiştir.

$$\%CV = \frac{SD}{ortalama} \times 100 \quad SD = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n-1}}$$

Tablo 15. 0, 1 µg/L, 5 µg/L, 100 µg/L konsantrasyonları günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Konsantrasyon µg/L	Ortalama	SD	% CV
0, 1	0,08	0,01	14,90
5	5	0,12	2,32
100	105,87	2,52	2,38

4.2.5. Geri Kazanım Çalışmaları

Kortizol değeri önceden belirlenen tükürük havuzu örneklerine 0.5, 5, 50 µg/L konsantrasyonlarındaki standartlardan SPE öncesi ve SPE sonrası ekleme yapılarak beklenen ve ölçülen değerler arasındaki orandan geri kazanım yüzdeleri hesaplandı. ISO 15189 kılavuzuna göre geri elde sonuçlarının % 100 ± 15 olması beklenmektedir [93]. Buna göre yapılan geri kazanım çalışmaları sonucunda SPE öncesi geri kazanım yüzdeleri eklenen 0.5, 5, 50 µg/L konsantrasyonlarındaki standartlar için sırasıyla % 89.7, 100.9, 115.1, SPE sonrası için geri kazanım yüzdeleri ise sırasıyla %84, 134.4, 117.9 olarak bulundu.

4.2.6. Referans Aralık Doğrulama Çalışmaları

CLSI'ya göre geçerliliği kabul edilen yöntemin referans aralığı baz alınarak yeni yöntemle karşılaştırmak amacıyla 20 sağlıklı birey numunesi analiz edilir. Referans aralık doğrulama çalışmaları kapsamına fonksiyonel olmayan adenom bulgusu haricinde ölçülen diğer laboratuvar verileri açısından her hangi bir referans aralık dışında bulunan sonucu olmayan NFA grubu kişilere ait tükürük kortizolü ölçüm sonuçları dahil edildi (n=20). Çalışma sonuçları “Mayo Medical Laboratuvarı” LC-MS/MS ile ölçülen tükürük kortizolü referans aralıkları ile karşılaştırıldı ([SALCT - Clinical: Cortisol, Saliva \(mayocliniclabs.com\)](https://www.mayocliniclabs.com)) Erişim tarihi 2020) (Tablo 16). Buna göre çalışılan tüm sonuçlar referans aralığının içinde bulundu. Uyumsuzluk oranı %0 olarak tespit edildi.

Mayo Medical Laboratuvarı Referans Aralıkları [94];

Sabah 07:00- 09:00 arası : 0.1- 0.75 µg/dL

Öğlen 15:00- 17:00 arası : < 0.401 µg/dL

Akşam 23:00- sonrası: < 0.1 µg/dL

Tablo 16. Referans aralık doğrulama sonuçları

Sabah 08.00 µg/dL	Öğleden sonra 16.00 µg/dL	Gece yarısı 24.00 µg/dL
0,05	0,01	0,05
0,14	0,03	0,01
0,13	0,08	0,02
0,08	0,05	0,01
0,32	0,05	0,01
0,28	0,08	0,01
0,09	0,04	0,02
0,01	0,07	0,04
0,26	0,05	0,01
0,21	0,05	0,02
0,19	0,05	0,04
0,08	0,06	0,02
0,02	0,07	0,01
0,19	0,24	0,01
0,31	0,06	0,01
0,07	0,03	0,01
0,29	0,06	0,04
0,19	0,03	0,05
0,05	0,02	0,01
0,09	0,02	0,01

4.2.7. Numune stabilite çalışması

Düşük ve yüksek seviyede iki farklı numunenin ilk gün ölçümü ardından 15., 30. ve 45. günlerde de ölçümü gerçekleştirildi. Sonuçların % Bias hesaplaması yapıldı. % Bias bir analitin ölçülen düzeyinin gerçek değere olan yakınlığını ifade eder. Hata (bias) ise iki değer arasındaki farkı göstermektedir [95].

$$\% \text{ Bias} = \frac{\text{Ölçülen değer} - \text{Hedef Değer}}{\text{Hedef Değer}} \times 100$$

Tablo 17. Tükürük kortizol numune stabilite çalışması sonuçları ve hesaplanan % biaslar

Örnek	İlk Çalışma (0. gün) (µg/dL)	15.gün (µg/dL)	30.gün (µg/dL)	45.gün (µg/dL)
1.Örnek Sonuçları (µg/dL)	0.344	0.326	0.315	0.313
1.Örnek % Bias		%5.23	%8.43	%9.01
2.Örnek Sonuçları (µg/dL)	0.751	0.736	0.730	0.740
2.Örnek % Bias		%1.99	%2.79	%1.46

Yapılan numune stabilite çalışmalarında tükürük örneklerinin stabil bir şekilde 45 gün boyunca birbirine yakın sonuçlar verdiği görüldü.Yapılan tekrar sonuçları ve % bias sonuçları Tablo 17.'de gösterilmiştir.

4.2.8. Dondurma ve çözmenin etkisinin belirlenmesi

Tükürük kortizol çalışmasının dondurma çözme sonuçları ve % bias sonuçları Tablo 18.'de verilmiştir. Yapılan dondurma çözme sonuçlarına göre tükürük örneğinin dondurma çözme işleminden çok az etkilendiği bu sebeple çok stabil bir örnek türü olduğu görüldü.

Tablo 18. Tükürük Kortizol dondurma çözme etkisi çalışma sonuçları ve ölçümler arası % biaslar.

Örnek	İlk Okuma	1. Dondurma-Çözme (µg/dL)	2. Dondurma-Çözme (µg/dL)	3. Dondurma -Çözme (µg/dL)
Düşük Örnek Sonuçları (µg/dL)	0.04	0.03	0.03	0.03
Düşük Örnek Bias(%)		%1	%1	%1
Yüksek Örnek Sonuçları (µg/dL)	0.22	0.20	0.20	0.20
Yüksek Örnek Bias(%)		%0.09	%0.09	%0.09

4.2.9. Matriks etkisi çalışması

Matriks etkisi ekstraksiyon öncesi ve sonrası ayrı ayrı olacak şekilde (pre ve post SPE), altı farklı tükürük örneğine ve blank örneğe düşük, orta ve yüksek düzeyleri temsil eden üç farklı konsantrasyonda (0.5, 5 ve 50 µg/L) kortizol standardı eklenerek değerlendirildi. Ekstraksiyon öncesi (pre-SPE) IS-normalize matriks faktörler düşük, orta ve yüksek düzey konsantrasyonda standart eklenmiş örnekler için sırasıyla 0.87, 1.05 ve 1.15 olarak hesaplandı. Ekstraksiyon sonrası (post-SPE) IS-normalize matriks faktörler ise düşük, orta ve yüksek düzey konsantrasyonda standart eklenmiş örnekler için sırasıyla 1.15, 1.09 ve 1.15 olarak hesaplandı. Bu sonuçlar göz önüne alındığında, pre ve post-SPE örneklerinde herhangi bir matriks etkisi gözlenmedi. Ayrıca, matriks etkisi çalışmasında kullanılmış olan altı farklı tükürük örneğinin IS-normalize matriks faktörlerinin %CV değerleri, düşük, orta ve yüksek düzeyde standart eklenmiş örnekler için sırasıyla %14.19, %5.95 ve %1.75 olarak hesaplandı ve üç düzey için de %CV değerlerinin kabul edilebilir değer olan %15'in altında olduğu tespit edildi.

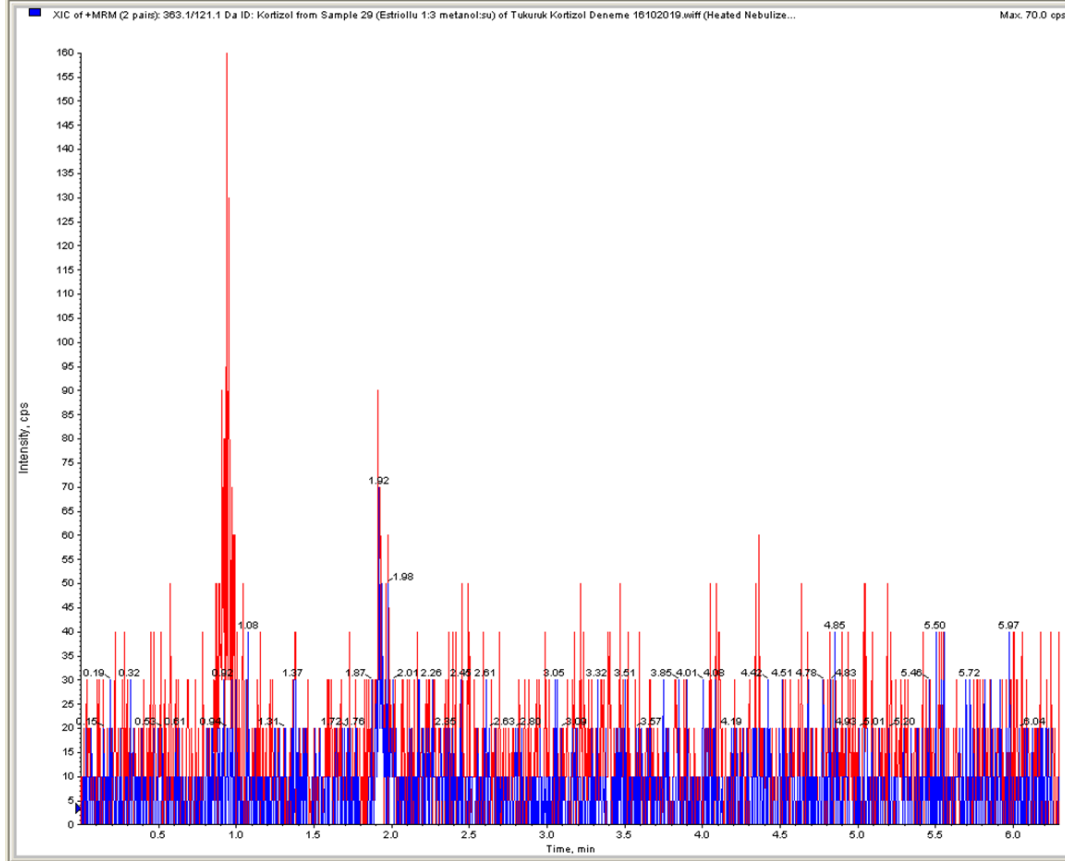
4.2.10. Taşıma (Carryover) çalışması

Taşıma çalışması kapsamında yüksek konsantrasyon olarak 100 µg/L standart okutuldu, düşük konsantrasyon olarak ise blank (mobil faz) okutuldu. Yapılan işlem kapsamında ilk olarak yüksek konsantrasyon hemen ardından düşük konsantrasyon (mobil faz) olacak şekilde çalışma yapıldı ve bu işlem ard arda 10 kez tekrarlandı. Çalışma sonrasında elde edilen mobil faz sonuçlarının yüksek değerlerinin ve düşük değerlerinin ortalama değerleri ayrı ayrı hesaplandı. Ardından yüksek mobil faz değerlerinin ortalamasından, düşük mobil faz değerlerinin ortalama değerleri çıkartılarak taşıma değeri bulundu. Çalışmadaki yüksek değer ortalaması 0,03 olarak, düşük değer ortalaması ise 0,02 bulundu sonuç olarak taşıma değerimiz 0,01 olarak hesaplandı. Buna göre yüksek örnek sonrası çalışılan numunelerde taşıma olmadığı görüldü.

4.2.11. Seçicilik (Selectivity)

Çalışmamızda seçtiğimiz analitin belirlenmesi için deneme çalışması yapıldı. Bu da örnek elüsyon işleminde kullanılan estriol içeren solüsyonun kortizol yerine bağlanıp bağlanmadığının incelenmesiydi. Literatürde çözücünün içerisine estriol eklenmesinin, kortizol ile estriolün ekstraksiyon ve analiz esnasında kullanılan cam malzemelerin silanol gruplarına bağlanmak için yarıştıklarını bu yüzden estriolün kortizol yerine cama bağlandığını gösteren çalışmalar mevcuttur [88]. Bu nedenle SPE ile ekstraksiyonun elüsyon aşamasına

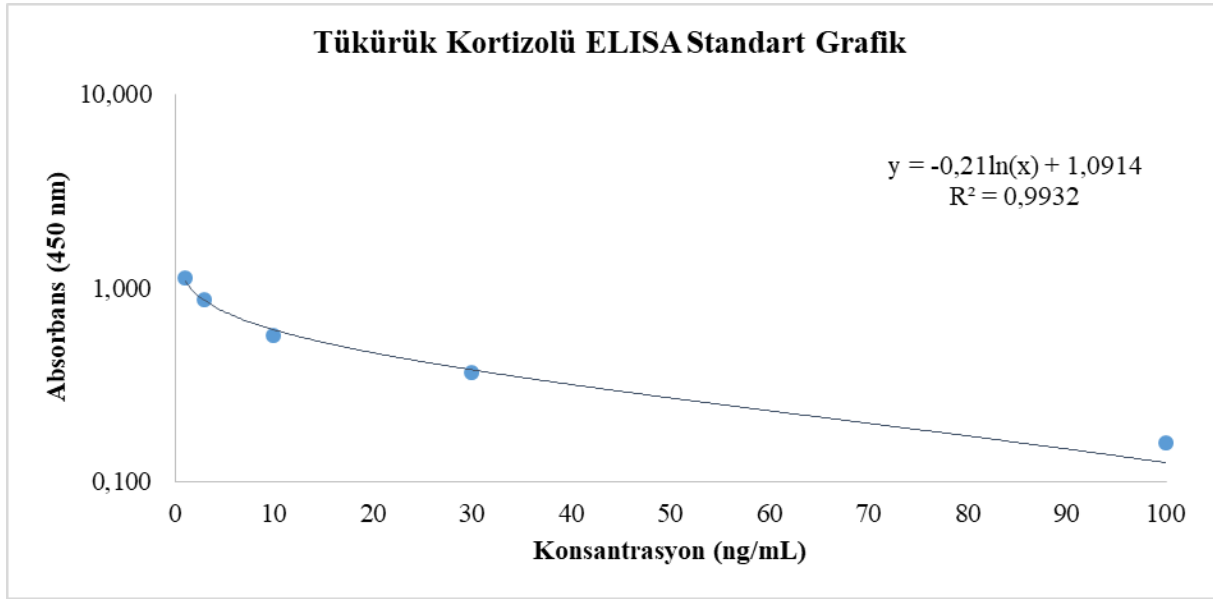
eklendi. Bu şekilde verimliliğin daha iyi olduğu gözlenmiştir. Bununla birlikte estriolün tek başına okutulması sonucunda kortizol için seçilen m/z değerinde herhangi bir pik vermemesi de yöntemin seçici olduğunu gösterdi (Şekil 16) Kortizolün m/z değeri 363.2/121.1 [89] iken estriol için m/z değeri 287/171 [90] olduğu için kortizol için seçilen m/z değerinde sadece kortizol piki gözlemlendi.



Şekil 16. Estriol- methanol-su karışımı pikleri

4.3. ELISA Bulguları

CS, SCS ve NFA grubunu oluşturan kişilerden (CS n=12, SCS n=28, NFA n=17) üç farklı saatte alınan tükürük örneklerinden kit üreticisinin talimatlarına uygun şekilde çalışıldı. İşlem basamaklarına uyularak mikropate'e reaktif, numune, standartlar ve kontroller pipetlendi ve 450 nm'de okutularak kalibrasyon eğrisi çizildi. Ardından tüm gruplara ait sonuçlar kullanılan üç ayrı kit için $y = -0.21\ln(x) + 1.0914$, $y = -0.2\ln(x) + 1.033$ ve $y = -0.22\ln(x) + 1.1556$ formülleri kullanılarak hasta ve kontrol sonuçları hesaplandı (Şekil 17). Kontrol sonuçlarının üreticinin verdiği referans aralık içinde olduğu görüldü. Standart grafiklerin R^2 değerleri 0.99'dan büyük bulundu. Yüksek seviye kontrol örnekleri ile çalışılan gün içi %CV değeri %7,6 olarak, günler arası yüksek ve düşük seviye kontrollerle yapılan tekrarlanabilirlik sonuçları ise sırasıyla % 7,8 ve % 8,9 olarak bulundu.



Şekil 17. Tükürük kortizolü ELISA kalibrasyon grafiği

4.4. Metot Karşılaştırma Çalışmaları

Metot karşılaştırma çalışmaları kapsamında CS, SCS ve NFA grubu hastalarda hem LC-MS/MS hem de ELISA yöntemleri ile üç farklı saatte alınan tükürük örnekleri çalışıldı. LC-MS/MS ile çalışılan hasta sayısı toplam 121 (CS grubu n=20, SCS n=52, NFA n=49) iken ELISA ile bu kişiler arasından seçilen toplam 57 örnek (CS grubu n=12, SCS n=28, NFA n=17) çalışıldı. Bu nedenle her iki yöntem ile karşılaştırılan toplam örnek sayısı 57'dir.

Metotlar arasındaki mutlak uyum oranı Bland-Altman grafikleriyle, ilişkisel uyum ise MedCalc (v19.6) istatistik programı kullanılarak Passing-Bablok regresyon analizi ile gösterildi. Bland Altman grafiği ortalamalar (gerçek değer) ve farklar (hata) arasındaki olası korelasyonun değerlendirilmesine olanak sağlar. Ayrıca Bland-Altman grafiği yanlılığın (farkların sistematik olarak sıfırdan farklı olup olmadığının) ve rastgele hatanın (farkların ne kadar yaygın olduğunun) değerlendirilmesini de sağlar [99], [100]. Bland-Altman grafiğinin (farklar grafiği) Y ekseninde iki ölçüm arasındaki fark, X ekseninde ise iki ölçümün ortalaması yer almaktadır (Şekil 18,19,20).

İki metot arasındaki ilişkisel uyumu incelemek için ayrıca Passing-Bablok regresyon analizi yapılmıştır. Passing-Bablok regresyon yöntemi parametrik olmayan Tip II regresyon yöntemidir. Regresyon grafiklerine ait denklemler ve veriler Şekil 21, 22, 23.' de yer almaktadır. Regresyon analizi için hesaplanan "Cusum testi" ile linear modelin geçerliliği ve Passing-Bablok regresyon analizinin bu yöntemlere uygulanabilirliği test edildi. Buna göre her üç saat için incelenen yöntemlerle ölçülen kortizol düzeyleri açısından anlamlı fark

olmadığı (08.00 saat tükürük kortizol LC-MS/MS ve ELISA $p=0.52$, 16.00 saat tükürük kortizol LC-MS/MS ve ELISA $p=0.74$, 24.00 saat tükürük kortizol LC-MS/MS ve ELISA $p=0.93$) gözlemlendi. Bu iki yöntem uyum karşılaştırması için Passing-Bablok regresyon analizinin yapılabilir olduğu ve yöntemler arasında doğrusal bir ilişki olduğu gösterildi. Analiz sonucunda elde edilen “intercept A (kesişim A)” iki metot arasındaki sistematik farklılığın bir ölçüsüdür. Intercept A için %95 güven aralığı (%95 CI) $A=0$ hipotezini test etmek için kullanılır. Bu hipotez eğer A için %95 güven aralığında sıfır değerini içeriyorsa kabul edilir. Hipotez reddedilirse, A'nın sıfırdan önemli ölçüde farklı olduğu ve her iki yöntemin de en azından sabit bir miktarda farklı olduğu sonucuna varılır [101].

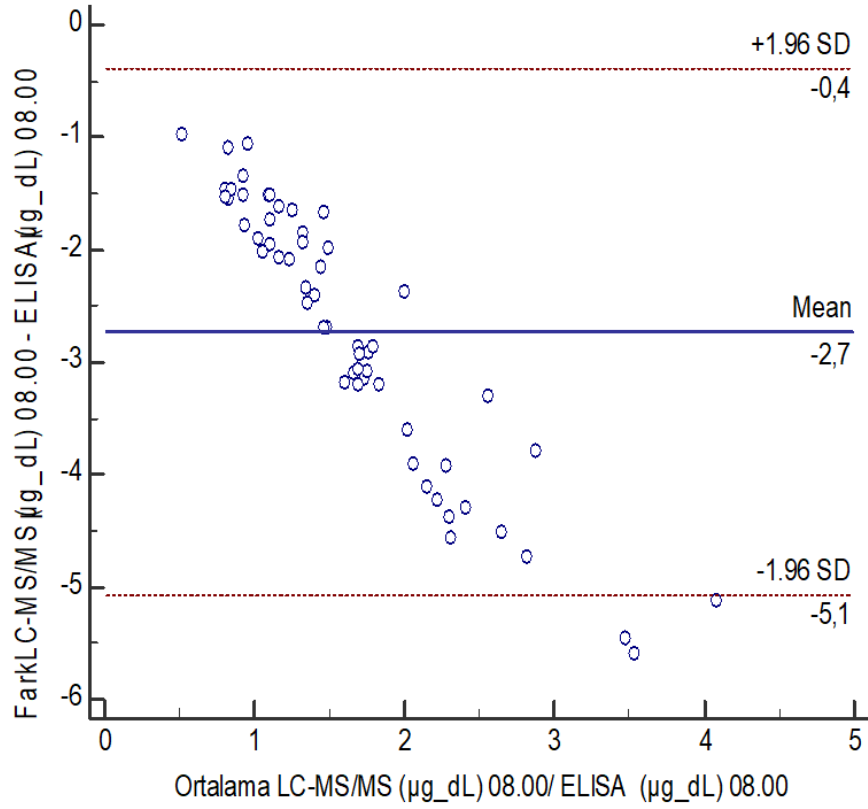
Residüel standart sapma (RSD), iki yöntem arasındaki rastgele farklılıkların bir ölçüsüdür. Rastgele farklılıkların % 95'inin -1.96 RSD ile +1.96 RSD aralığında olması beklenmektedir. Bu aralık büyükse, iki yöntem uyuşmayabilir [101].

Bu bilgiler doğrultusunda yapılan incelemede;

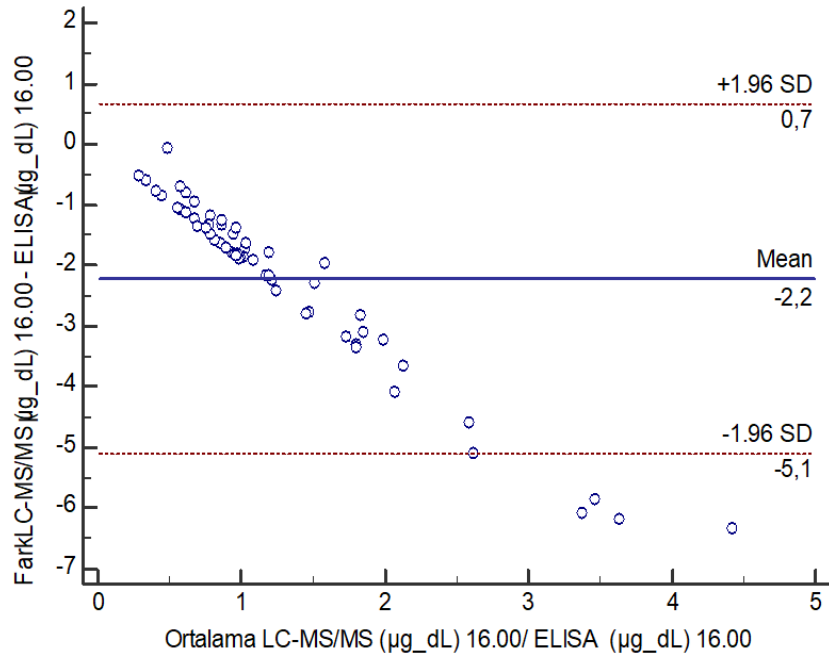
Sabah 08.00'de alınan örneklerde ölçülen kortizol düzeyleri açısından iki yöntem arasında sistematik farklılık olmadığı görüldü (Intercept A: 0,19, %95 CI: -4,7 - 1,08). Arıca RSD değeri incelendiğinde iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu bulundu (RSD değeri: 0.2536, ± 1.96 RSD Interval: -0,4970 - 0, 4970) (Şekil 21).

Öğleden sonra 16.00'da alınan örneklerde ölçülen kortizol düzeyleri açısından iki yöntem arasında sistematik farklılık olmadığı görüldü (Intercept A: 0,30, %95 CI: -0,72-0,64). Arıca RSD değeri incelendiğinde iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu bulundu (RSD değeri: 0.1790, ± 1.96 RSD Interval: -0,3509 - 0, 3509) (Şekil 22).

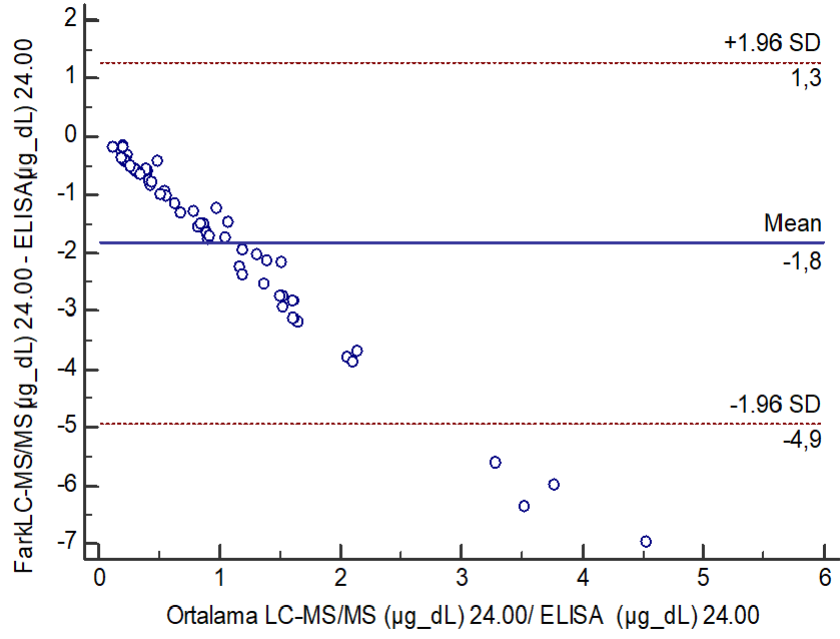
Gece yarısı 24.00'de alınan örneklerde ölçülen kortizol düzeyleri açısından iki yöntem arasında sistematik farklılık olmadığı görüldü (Intercept A: -0,05, %95 CI: -0,70-0,30). Arıca RSD değeri incelendiğinde iki yöntemin birbiri ile uyumlu olduğu bulundu (RSD değeri: 0,1452, ± 1.96 RSD Interval: -0,2845 - 0, 2845) (Şekil 23).



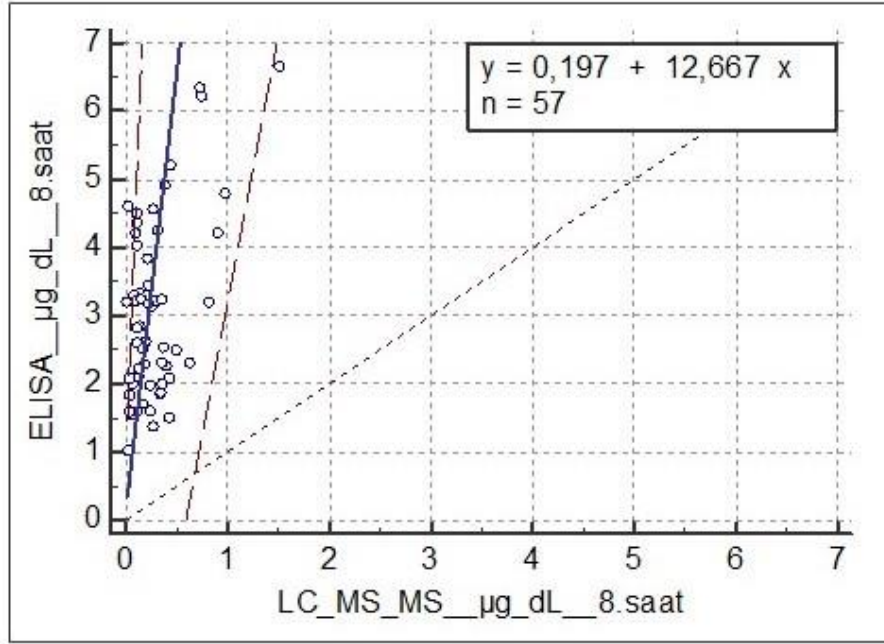
Şekil 18. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 08.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği



Şekil 19. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 16.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği

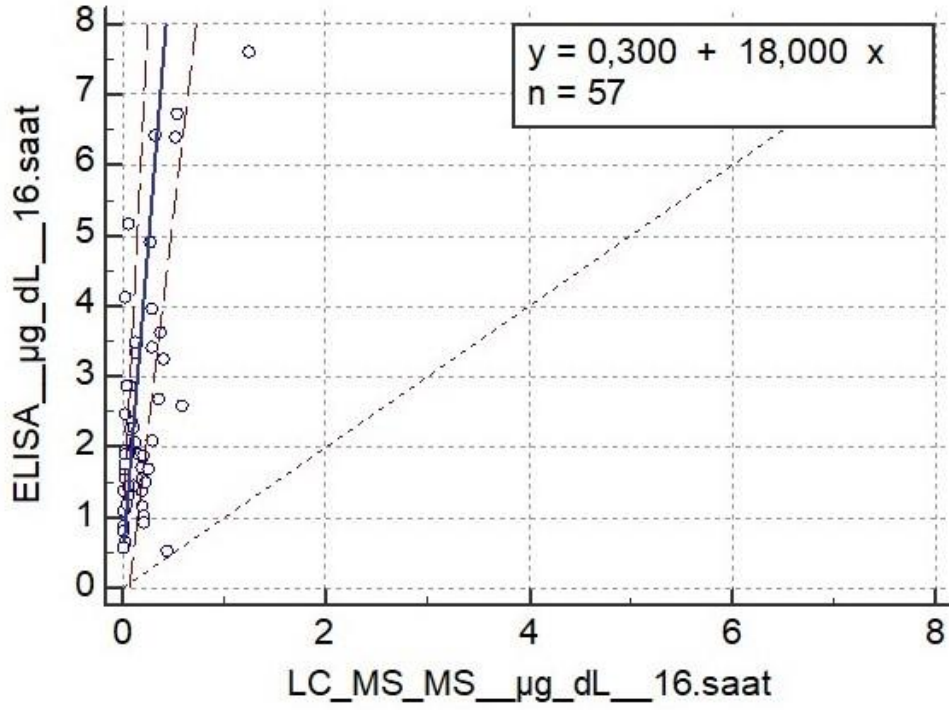


Şekil 20. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 24.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Bland-Altman grafiği



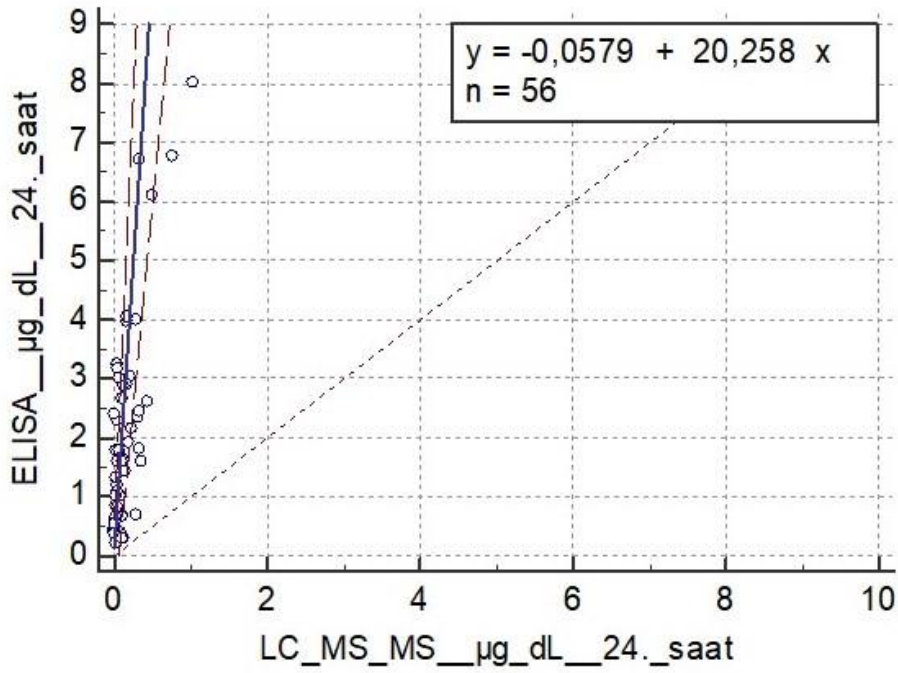
Variable X	LC_MS_MS_μg_dL_8.saat	
Variable Y	ELISA_μg_dL_8.saat	
Sample size	57	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,01000	1,0100
Highest value	1,5200	6,6500
Arithmetic mean	0,2932	3,0240
Median	0,2200	2,8100
Standard deviation	0,2795	1,3133
Standard error of the mean	0,03702	0,1740
Regression Equation		
$y = 0,196667 + 12,666667 x$		
Systematic differences		
Intercept A		0,1967
95% CI		-4,6900 to 1,0779
Proportional differences		
Slope B		12,6667
95% CI		7,8929 to 36,5000
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)		0,2536
± 1.96 RSD Interval		-0,4970 to 0,4970
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,52)	

Şekil 21. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 08.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi



Variable X	LC_MS_MS_μg_dL_16.saat	
Variable Y	ELISA_μg_dL_16.saat	
Sample size	57	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,02000	0,5300
Highest value	1,2500	7,5900
Arithmetic mean	0,1791	2,4051
Median	0,1100	1,8900
Standard deviation	0,2071	1,5920
Standard error of the mean	0,02743	0,2109
Regression Equation		
y = 0,300000 + 18,000000 x		
Systematic differences		
Intercept A	0,3000	
95% CI	-0,7200 to 0,6371	
Proportional differences		
Slope B	18,0000	
95% CI	12,1429 to 30,6000	
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)	0,1790	
± 1.96 RSD Interval	-0,3509 to 0,3509	
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,74)	

Şekil 22. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 16.00'da alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi



Variable X	LC_MS_MS_μg_dL_24_saat	
Variable Y	ELISA_μg_dL_24_saat	
Sample size	56	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,01000	0,2200
Highest value	1,0400	8,0200
Arithmetic mean	0,1475	1,9705
Median	0,08000	1,6000
Standard deviation	0,1903	1,7309
Standard error of the mean	0,02542	0,2313
Regression Equation		
$y = -0,0579167 + 20,258333 x$		
Systematic differences		
Intercept A		-0,05792
95% CI		-0,7029 to 0,3006
Proportional differences		
Slope B		20,2583
95% CI		13,4444 to 29,8571
Random differences		
Residual Standard Deviation (RSD)		0,1452
± 1.96 RSD Interval		-0,2845 to 0,2845
Linear model validity		
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0,93)	

Şekil 23. LC_MS/MS ve ELISA yöntemlerine ait saat 24.00'de alınan tükürük örnekleri kortizol ölçümlerinin ortalamaya karşı fark değerlerinin Passing Bablok grafiği ve regresyon analizi

Ayrıca tüm gruplarda üç farklı saatte ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin yöntemler arası korelasyon analizleri gerçekleştirildi. 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeylerinin her iki yöntem ile ölçümü arasında pozitif yönde anlamlı korelasyonlar saptandı (08.00 saat LC-MS/MS ve ELISA arası $r=0,278$, $p=0,037$, 16.00 saat LC-MS/MS ve ELISA arası $r=0,467$, $p=0,000$, 24.00 saat LC-MS/MS ve ELISA arası $r=0,590$, $p=0,000$) (Şekil 24)

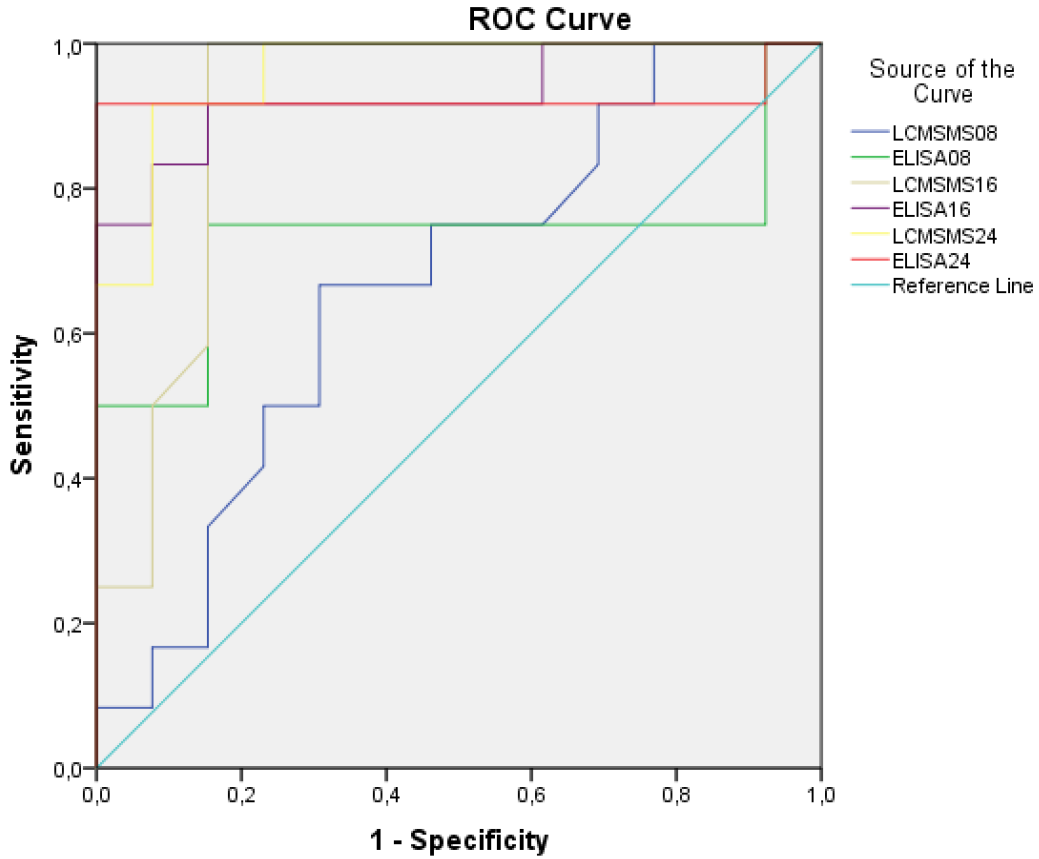
Korelasyonlar				
		TKELISA08	TKELISA16	TKELISA24
Spearman's rho	TKLCMSMS08	0,278	0,219	0,268
		0,037	0,102	0,046
		57	57	56
	TKLCMSMS16	0,072	0,467	0,470
		0,593	0,000	0,000
		57	57	56
	TKLCMSMS24	0,101	,456	0,590
		0,455	0,000	0,000
		57	57	56

Şekil 24. LC_MS/MS ve ELISA 08,16 ve 24. saatte ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin yöntemler arası korelasyon analizleri

LC-MS\MS ile ELISA yöntemlerinin tanısal değerlendirmesi, özgüllük ve duyarlılık hesaplanmasında, testlerin etkinliklerinin karşılaştırılmasında, uygun pozitiflik eşiğinin belirlenmesinde, laboratuvar sonuçlarının kalitesinin izlenmesinde ROC analizinden yararlanıldı. ROC eğrisi, farklı eşik değerleri için dikey eksen üzerinde doğru pozitiflik (duyarlılık) ve yatay eksen üzerinde yanlış pozitiflik (1-özgüllük) oranlarının yer aldığı bir eğridir. ROC eğrisi üzerindeki her nokta, farklı eşik değerlerine karşılık gelen duyarlılık ve 1-özgüllük değerlerini ortaya koyar. Genelde düşük yanlış pozitiflik oranlarını veren eşik değerleri, düşük doğru pozitiflik oranına da sahiptir. Doğru pozitiflik oranı arttıkça, yanlış pozitiflik oranı da artar. Bu eğri; testin sağlıklı ve hasta bireyleri ayırt etme gücünün belirlenmesine, farklı testlerin etkinliklerinin kıyaslanmasına, duyarlılık ve özgüllüğü yüksek en uygun eşik değerinin belirlenmesine olanak sağlar [102].

Yapılan analiz sonucuna göre AUC (area under curve) değerleri CS grubu için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleriyle 16. ve 24. saatlerde ölçülen tükürük kortizolünün 8. saate göre ayırıcı

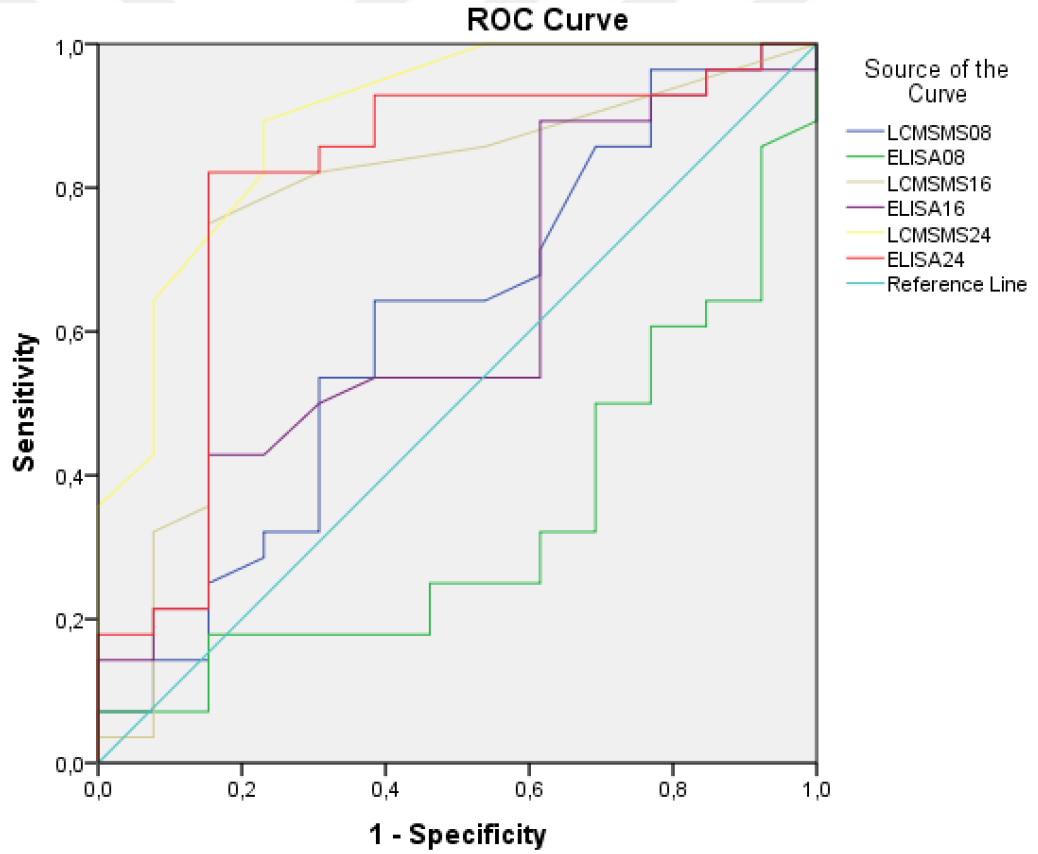
tanıda daha iyi performans gösterdiği belirlendi (Şekil 25). LC-MS\MS yönteminde 24. saat tükürük kortizol için eşik değeri olarak 0,055 olarak seçilmiştir. Sensitivitenin (duyarlılık) 0,92 olduğu nokta seçilmiş 1- spesifite ise 0,077' dir. Buna göre özgüllük: $1 - 0,077 = 0,923$ bulunmuştur. Diğer saatler için aynı şekilde seçim ve hesaplama yapılarak Tablo 19.'da gösterilmiştir.



Şekil 25. CS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemlerindeki 8-16-24. saatler de alınan tükürük kortizolü ölçümleri için ROC eğrisi

Tablo 19. CS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülen tükürük kortizolünün eşik değeri, sensitivite ve spesifite tablosu

Tükürük Kortizol Ölçüm	Eşik Değer (µg/dL)	Sensitivite	Spesifite	AUC(Area)	p değeri
LC-MS\MS 08	0.095	0.92	0.31	0.667	0.157
LC-MS\MS 16	0.07	0.92	0.85	0.907	0.001
LC-MS\MS 24	0.055	0.92	0.92	0.962	0.000
ELISA 08	3.30	0.75	0.84	0.731	0.050
ELISA 16	2.10	0.92	0.85	0.907	0.000
ELISA 24	2.34	0.92	0.92	0.923	0.000



Şekil 26. SCS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemlerimlerdeki 8-16-24. saatler de alınan tükürük kortizolü ölçümleri için ROC eğrisi

Tablo 20. SCS için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülen tükürük kortizolünün eşik değer, sensitivite ve spesifite tablosu

Tükürük Kortizol Ölçüm	Eşik Değer (µg/dL)	Sensitivite	Spesifite	AUC(Area)	p değeri
LC-MS\MS 08	0.045	0.96	0.24	0.604	0.287
LC-MS\MS 16	0.05	0.75	0.93	0.772	0.006
LC-MS\MS 24	0.02	0.90	0.77	0.896	0.000
ELISA 08	2.23	0.60	0.27	0.331	0.085
ELISA 16	1.15	0.89	0.38	0.617	0.234
ELISA 24	0.92	0.82	0.85	0.802	0.002

Yapılan analiz sonucuna göre AUC değerleri SCS grubu için LC-MS\MS ve ELISA yöntemleriyle 24. saatlerde ölçülen tükürük kortizolünün 8. ve 16. saatlere göre ayırıcı tanıda daha iyi performans gösterdiği belirlendi (Tablo 20) (Şekil 26). Ayrıca LC-MS\MS ile 16. saatte ölçülen tükürük kortizolünün ELISA yöntemine göre ayırıcı tanıda daha iyi performans gösterdiği belirlendi. LC-MS\MS yönteminde 24. saat tükürük kortizol için eşik değer olarak 0.02 olarak seçilmiştir. Sensitivitenin 0.90 olduğu nokta seçilmiş 1- spesifite ise $1 - 0,231 = 0,77$ bulunmuştur. Diğer saatler için aynı şekilde seçim ve hesaplama yapılarak değerler yukarıdaki tabloda verilmiştir.

4.5. Çalışma Grubunu Tanımlayıcı Bulgular

4.5.1. Demografik Veriler

Çalışmamıza 20'si CS'li, 52'si SCS'li ve 49'u NFA'lı toplam 121 hasta katılmıştır. Yapılan değerlendirmede cinsiyet, sigara kullanımı ve VKİ açısından CS, SCS ve NFA grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunmadı (Tablo 21). CS-NFA ve SCS-NFA gruplarının yaşları arasında anlamlı fark olmazken CS ve SCS grupları arasında anlamlı fark bulundu (Tablo 22).

Tablo 21. CS, SCS ve NFA gruplarının yaş ve VKİ verileri

Demografik Veriler	CS (n=20)	SCS (n=52)	NFA (n=49)	$p^{Kruskal-Wallis}$	p^1
	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)		
Yaş (yıl)	47,5 (26- 72)	59,0 (27- 75)	58,0 (20- 71)	0,006	0.076 [#] - 0.004 [°] - 0.610 [∞]
VKİ (kg/m2)	30,8 (25,1- 54)	29,9 (21,3- 43,2)	28,4 (21,5- 46,8)	0,641	

p^1 : Dunn çoklu karşılaştırma testi, [#]CS ve NFA gruplarının karşılaştırılması, [°]CS ve SCS gruplarının karşılaştırılması, [∞]SCS ve NFA gruplarının karşılaştırılması

Tablo 22. CS, SCS ve NFA gruplarının cinsiyet ve sigara kullanım verileri

Demografik Veriler	CS (n=20)	SCS (n=52)	NFA (n=49)	$p^{Chi-Square}$
Cinsiyet	K:15	K:42	K:35	0.543
	E:5	E:10	E:14	
Sigara Kullanımı	e: 4	e:20	e:13	0.501
	h: 9	h:26	h:27	

$p^{Chi-Square}$ testi : Ki kare testi. K: kadın sayısını, E: erkek sayısını, e: Evet, h: Hayır. $p < 0.05$ anlamlı olarak değerlendirildi.

4.6. Biyokimyasal Analizler

4.6.1. Rutin Parametreler

Hastalara ait rutin biyokimyasal parametrelere ait bulgular Tablo 23.'de yer almaktadır. Buna göre serum kortizol, trigliserit, total kolesterol parametreleri için CS, SCS ve NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. ACTH ve DHEAS düzeyleri açısından CS-NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, CS grubu hastalarda bu parametreler SCS grubuna göre anlamlı yüksek, NFA grubu hastalarda ise SCS grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 1 mg DST ve HbA1c düzeyleri açısından CS-SCS grupları arası anlamlı fark bulunmazken, CS ve SCS grubu hastalarda bu parametreler NFA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu. LDL ve HDL bulguları açısından SCS-NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmazken, LDL düzeyi CS grubunda NFA ve SCS gruplarına göre anlamlı yüksek, HDL düzeyi ise anlamlı düşük bulundu.

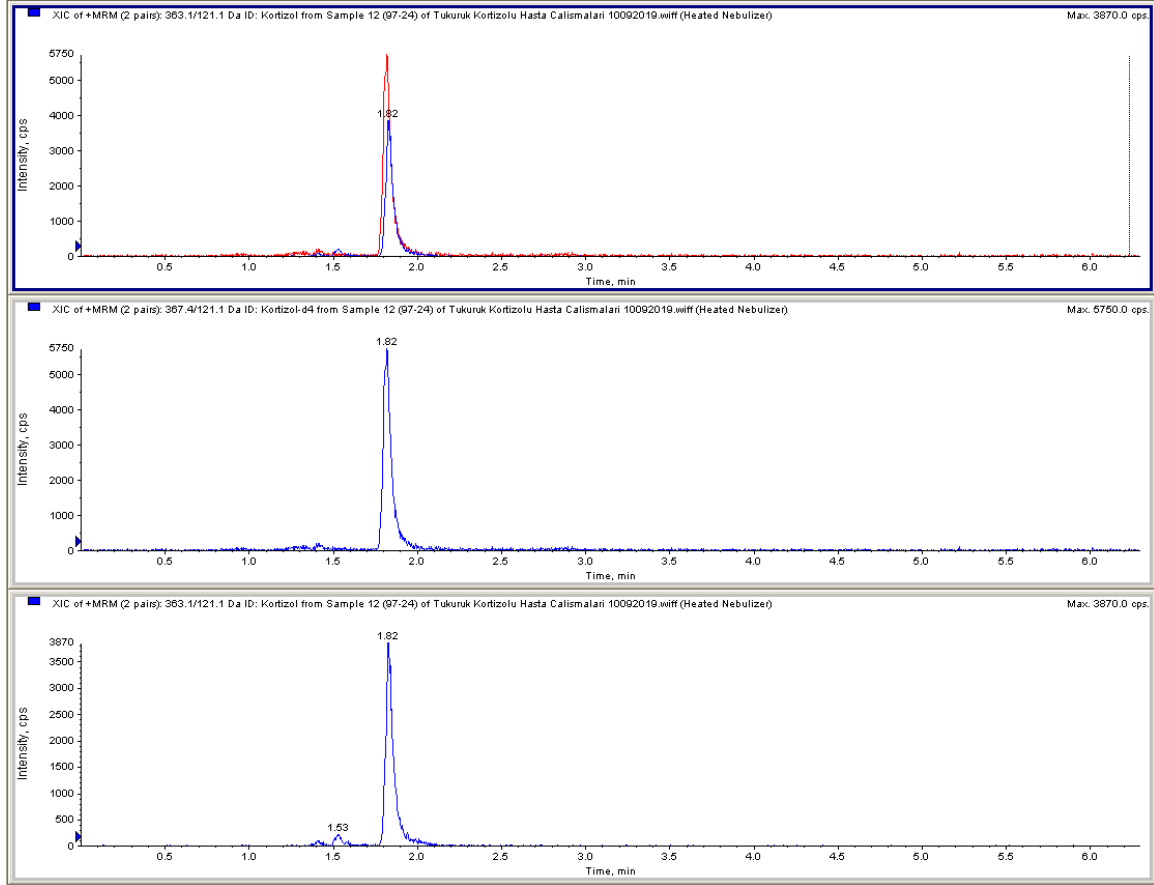
Tablo 23. Biyokimyasal parametre sonuçlarının istatistiksel analizi

Biyokimyasal Parametreler	CS (n=20)	SCS (n=52)	NFA (n=49)	$p^{Kruskal-Wallis}$	p^1
	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)	Medyan (Min-Max)		
Serum Kortizol ($\mu\text{g/dL}$)	19,25 (6,17-31)	15,1 (6,42-32)	14,95 (5,87-25,44)	0.063	
ACTH (pg/mL)	45,1 (5-202)	11,85 (4-34,1)	16,6 (4-81,4)	0.000	0.709 [#] - 0.000 [◇] - 0.000 [∞]
DHEAS ($\mu\text{g/dL}$)	93,1 (4-498,5)	42,08 (5,29-323)	65,27 (9,74-235,6)	0.001	0,850 [#] - 0.008 [◇] - 0.008 [∞]
DST 1mg Kortizol ($\mu\text{g/dL}$)	12,15 (0,57-31,13)	3,33 (1,65- 20,01)	1,09 (0,4-17,8)	0.000	0.000 [#] - 0.074 [◇] - 0.000 [∞]
Total Kolesterol (mg/dL)	253 (144-394)	211,5 (121-372)	228 (136-302)	0.063	
LDL (mg/dL)	157 (63,2-210)	73,5 (40- 184)	78 (41-217)	0.000	0.001 [#] - 0.000 [◇] - 1.00 [∞]
HDL (mg/dL)	48 (30,6-77)	90,4 (27-257)	101,2 (35-204)	0.000	0.001 [#] - 0.000 [◇] - 1.00 [∞]
Trigliserit (mg/dL)	181 (67-1413)	129 (50- 407)	122 (49-242)	0.085	
HbA1c (%)	6,95 (5,5-10,7)	6,2 (4,2-10,7)	5,8 (4,9-15,6)	0.003	0.007 [#] - 0.775 [◇] - 0.023 [∞]

P^1 : Dunn çoklu karşılaştırma testi, [#]CS ve NFA gruplarının karşılaştırılması, [◇]CS ve SCS gruplarının karşılaştırılması, [∞]SCS ve NFA gruplarının karşılaştırılması

4.7. LC-MS\MS ve ELISA Yöntemleri ile Tükürük Kortizol Ölçümleri

CS, SCS ve NFA grubunda tükürük kortizolü düzeylerinin LC-MS/MS yöntemiyle ölçülmesine ilişkin bir hasta örneği Şekil 27.'de sunulmuştur.



Şekil 27. Hasta örneğinde tükürük kortizolün total iyon kromatogramı

CS, SCS ve NFA hastalarında 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde toplanan tükürük örneklerinde LC-MS/MS ve ELISA yöntemleri ile ölçülen kortizol düzeylerine ait bulgular Tablo 24.'de yer almaktadır.

Tablo 24. Hastaların LC-MS\MS ve ELISA ile 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde toplanan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi bulguları

Tükürük Kortizol Ölçümleri	CS (n=20)	SCS (n=52)	NFA (n=49)	$p^{kruskal-Wallis}$	p^1
	Medyan (Min- Max)	Medyan (Min- Max)	Medyan (Min- Max)		
TK08- LC-MS\MS (µg/dL)	0,230 (0,03- 0,98)	0,19 (0,01- 1,52)	0,130 (0,01-0,82)	0.107	
TK16- LC- MS\MS (µg/dL)	0,17 (0,02- 1,25)	0,05 (0,01- 0,45)	0,04 (0,01- 0,60)	0.001	0.001[#] - 0.032[°] - 0.312[∞]
TK24- LC-MS\MS (µg/dL)	0,13 (0,04- 1,04)	0,05 (0,00- 0,43)	0,02 (0,00- 0,28)	0.000	0.000[#] - 0.008[°] - 0.004[∞]
TK08- ELISA (µg/dL)	4,35 (1,85- 6,34)	2,40 (1,01- 6,65)	3,19 (1,37- 4,60)	0.017	0.261- 0.013[°] - 0.816 [∞]
TK16- ELISA (µg/dL)	4,42 (1,15- 7,59)	1,87 (0,53- 4,12)	1,70 (0,56- 3,25)	0.000	0.000[#] - 0.001[°] - 0.705[∞]
TK24- ELISA (µg/dL)	3,57 (0,32- 8,02)	1,61 (0,29- 3,99)	0,59 (0,22- 2,39)	0.000	0.000[#] - 0.008[°] - 0.018[∞]

p^1 : Dunn çoklu karşılaştırma testi, [#]CS ve NFA gruplarının karşılaştırılması, [°]CS ve SCS gruplarının karşılaştırılması, [∞]SCS ve NFA gruplarının karşılaştırılması. TK08- LC-MS\MS: 8. Saat LC-MS\MS tükürük kortizol çalışması. TK16- LC-MS\MS: 16. Saat LC-MS\MS tükürük kortizol çalışması. TK24 - LC-MS\MS: 24. Saat LC-MS\MS tükürük kortizol çalışması. TK08- ELISA: 8. Saat ELISA tükürük kortizol çalışması. TK16- ELISA: 16. Saat ELISA tükürük kortizol çalışması. TK24- ELISA: 24. Saat ELISA tükürük kortizol çalışması.

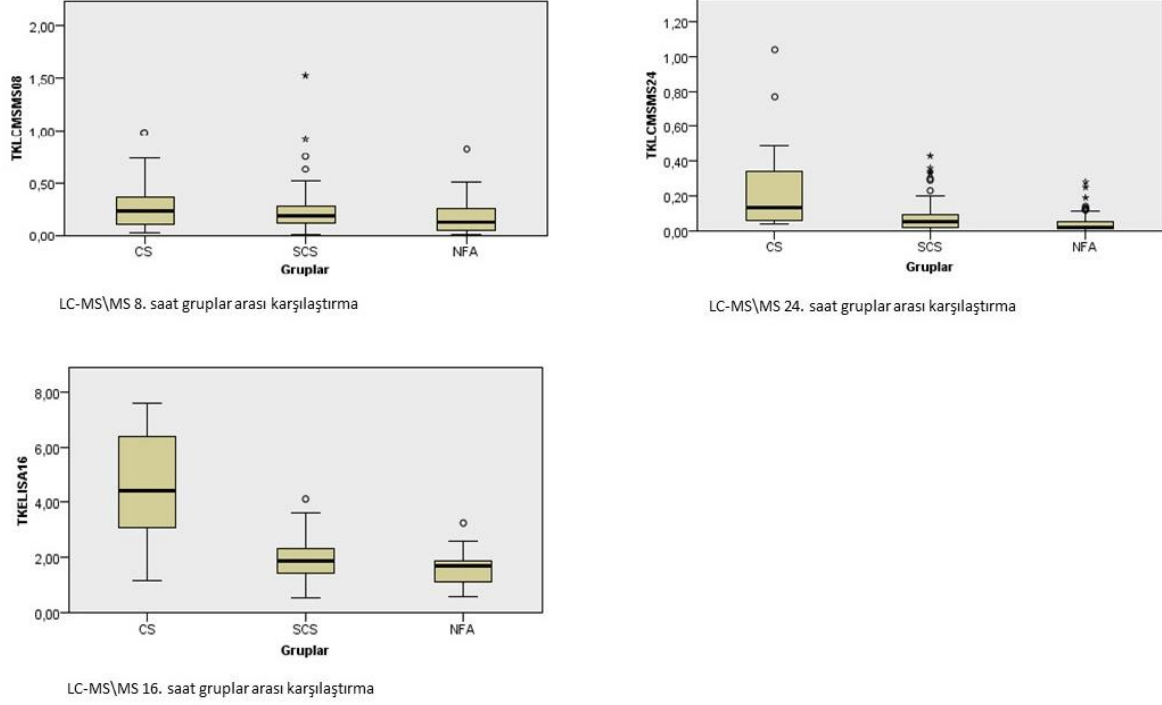
LC-MS/MS ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre;

Sabah 08.00'de alınan örneklerde ölçülen kortizol sonuçlarında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmadı. Öğleden sonra 16.00'da alınan tükürük örneklerinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, SCS ve NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Gece 24.00'da alınan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca SCS gruplarında da ölçülen kortizol düzeyi NFA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 24., Şekil 28).

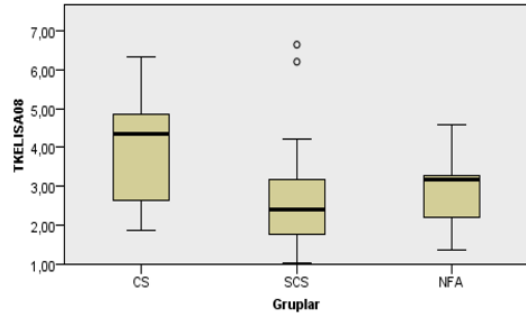
ELISA ile yapılan ölçüm sonuçlarına göre;

Sabah 08.00'de alınan örneklerde ölçülen kortizol sonuçları CS grubunda SCS grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, CS-NFA grupları arasında ve SCS-NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Öğleden sonra 16.00'da alınan tükürük örneklerinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, SCS ve NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı. Gece 24.00'da alınan

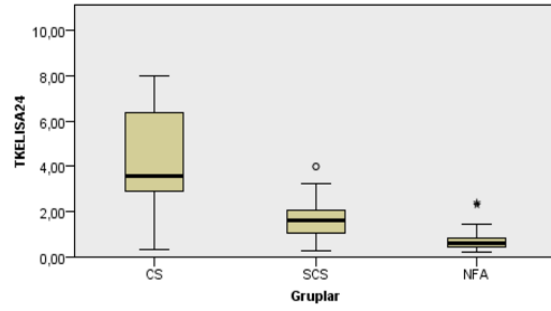
tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi CS grubunda SCS ve NFA gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca SCS gruplarında da ölçülen kortizol düzeyi NFA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu (Tablo 25., Şekil 29).



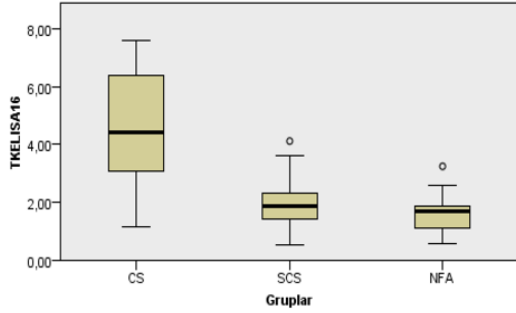
Şekil 28. CS, SCS ve NFA gruplarında LC-MS\MS ile ölçülen tükürük kortizol düzeylerinin box-plot grafikleri



ELISA 8. saat grupları arası karşılaştırma



ELISA 24. saat grupları arası karşılaştırma



ELISA 16. saat grupları arası karşılaştırma

Şekil 29. CS, SCS ve NFA gruplarında ELISA ile ölçülen tükürük kortizol düzeylerinin box-plot grafikleri

4.8. Diüurnal Ritim Bulguları

4.7.1. LC-MS/MS ve ELISA Sonuçlarının 08.00, 16.00 ve 24.00 Saatleri Alınan Kortizol Düzeyleri Açısından Değerlendirilmesi

Stressiz koşullar altında ve sağlıklı kişilerde kortizol salınımı, en yüksek değerine sabah erken saatlerde, en düşük düzeyine ise gece yarısı (23:00- 02:00 arası) ulaştığı bilinmektedir [4]. Buna göre bütün gruplar kendi içinde 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde alınan tükürük örneklerinde hem LC-MS/MS hem de ELISA yöntemleri ile ölçülen kortizol düzeyleri kıyaslandı. Günün üç farklı saatinde alınan tükürük örnekleriyle ölçülen kortizol düzeylerinin hem LC-MS/MS hem de ELISA yöntemleri ölçümü sonucunda elde edilen veriler Tablo 25.'de, bulguların grafiksel gösterimi ise Şekil 30 ve 31'de bulunmaktadır.

CS grubu hastalarda hem LC-MS/MS hem de ELISA ile günün üç farklı saatinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Bu durum CS grubu hastalarda diurnal ritmin bozulduğunu ve gece yarısı alınan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyinin gün içine göre azalmadığını göstermektedir (Şekil 30 ve 31). Ayrıca her iki

yöntemin de CS grubu hastaların gün içi kortizol düzeylerinin birbiri ile uyumlu sonuçlar verdiği gözlemlendi.

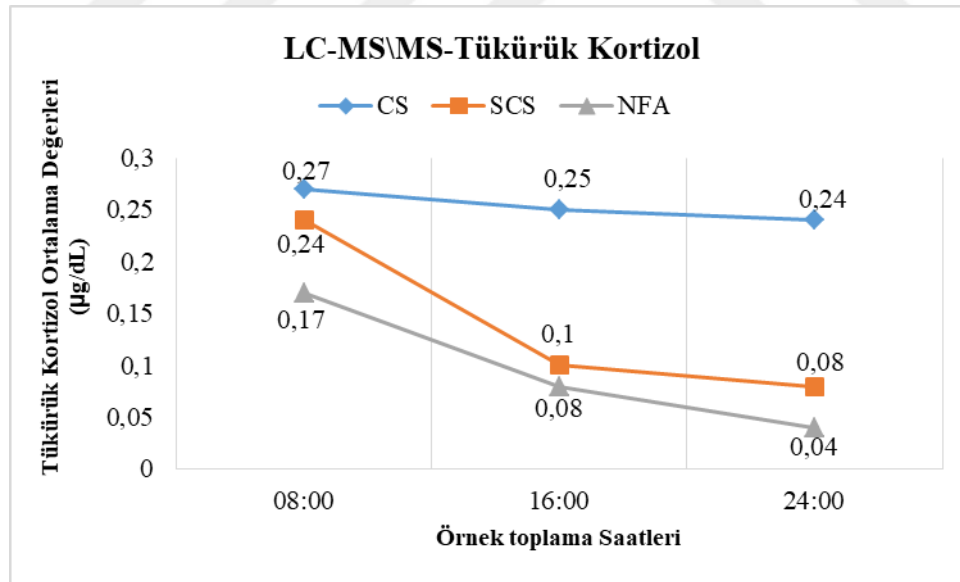
SCS grubu hastalarda sabah 08.00'de alınan örneklerdeki LC-MS/MS ile ölçülen kortizol düzeyleri 16.00 ve 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. 16.00 ve 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki LC-MS/MS ile ölçülen kortizol düzeyleri arasında ise anlamlı fark bulunmadı. Sabah 08.00'de alınan örneklerdeki ELISA ile ölçülen kortizol düzeyleri 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Saat 16.00'da alınan örneklerdeki ELISA ile ölçülen kortizol düzeyleri ile 08.00 ve 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeyleri arasında anlamlı fark bulunmadı (Şekil 30 ve 31).

NFA grubunda LC-MS/MS ile günün üç farklı saatinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri açısından üç grup arasında da anlamlı fark bulundu. NFA grubunda sabah 08.00'de alınan örneklerdeki LC-MS/MS ile ölçülen kortizol düzeyleri 16.00 ve 24.00 saatlerinde alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Ayrıca NFA grubunda 16.00'de alınan örneklerdeki LC-MS/MS ile ölçülen kortizol düzeyleri 24.00'de alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Bu durum NFA grubunda diurnal ritmin bozulmadığının LC-MS/MS ile ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri ile gösterildiğini ortaya koymaktadır (Tablo 24., Şekil 30). Ayrıca NFA grubunda sabah 08.00'de alınan örneklerdeki ELISA ile ölçülen kortizol düzeyleri 24.00'de alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulunurken, saat 16.00'da alınan örneklerle ölçülen kortizol düzeyleri açısından anlamlı fark göstermedi. NFA grubunda 16.00'de alınan örneklerdeki ELISA ile ölçülen kortizol düzeyleri 24.00'de alınan örneklerdeki kortizol düzeylerine göre anlamlı olarak yüksek bulundu. Buna göre LC-MS/MS ile ölçülen gün içi kortizol düzeylerinin NFA grubunda diurnal ritmi daha net yansıttığı gözlemlendi (Şekil 30 ve 31).

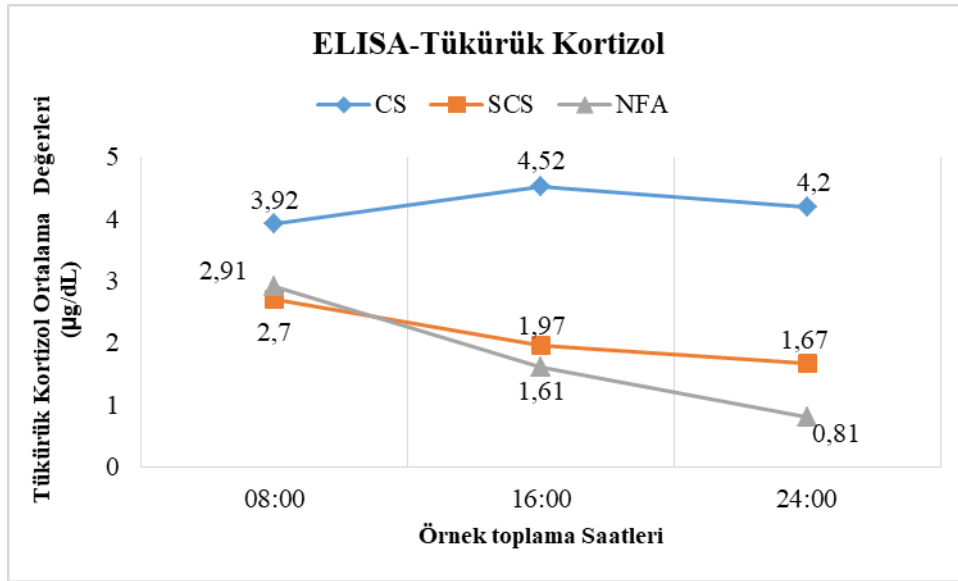
Tablo 25: CS, SCS ve NFA gruplarında LC-MS\MS ve ELISA ile günün üç farklı saatinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri

	TK08- LC-MS\MS (µg/dL)	TK16- LC-MS\MS (µg/dL)	TK24- LC-MS\MS (µg/dL)	TK08- ELISA (µg/dL)	TK16- ELISA (µg/dL)	TK24- ELISA (µg/dL)	p ^{Friedman Anova}	p ¹
CS Grubu Medyan (Min- Max)	0,230 (0,03- 0,98)	0,17 (0,02- 1,25)	0,13 (0,04- 1,04)	4,35 (1,85- 6,34)	4,42 (1,15- 7,59)	3,57 (0,32- 8,02)	0.105*, 0.264**	
SCS Grubu Medyan (Min- Max)	0,19 (0,01- 1,52)	0,05 (0,01- 0,45)	0,05 (0,00- 0,43)	2,40 (1,01- 6,65)	1,87 (0,53- 4,12)	1,61 (0,29- 3,99)	0.000*, 0.002**	0.133 ^{&} , 0.000 [∞] , 0.000 [□] , 0.247 [×] , 0.002 [°] , 0.247 ⁺
NFA Grubu Medyan (Min- Max)	0,130 (0,01-0,82)	0,04 (0,01- 0,60)	0,02 (0,00- 0,28)	3,19 (1,37- 4,60)	1,70 (0,56- 3,25)	0,59 (0,22- 2,39)	0.000*, 0.000**	0.009 ^{&} , 0.000 [∞] , 0.003 [□] , 0.024 [×] , 0.000 [°] , 0.102 ⁺

*LC-MS\MS ile ölçülen kortizol düzeyleri, ** ELISA ile ölçülen kortizol düzeyleri, [&]16.00 ve 24.00 saatleri LC-MS/MS kortizol ölçümleri karşılaştırması, [∞]24.00 ve 08.00 saatleri LC-MS/MS kortizol ölçümleri karşılaştırması, [□]16.00 ve 08.00 saatleri LC-MS/MS kortizol ölçümleri karşılaştırması, [×]16.00 ve 24.00 saatleri ELISA kortizol ölçümleri karşılaştırması, [°]24.00 ve 08.00 saatleri ELISA kortizol ölçümleri karşılaştırması, ⁺16.00 ve 08.00 saatleri ELISA kortizol ölçümleri karşılaştırması.



Şekil 30. LC-MS\MS ile ölçülen tükürük kortizolü diüurnal ritim grafiği



Şekil 31. ELISA ile ölçülen tükürük kortizolü diüurnal ritim grafiği

4.9. Korelasyon Analizleri

LC-MS/MS ve ELISA yöntemleriyle ölçülen tükürük kortizol düzeylerine ait tüm gruplar (CS, SCS ve NFA) arasında yapılan karşılaştırma bulguları ile hastaların rutin laboratuvar verileri, klinik bulguları ve demografik parametreleri arasındaki ilişkilere ait korelasyon analizleri Tablo 26.'da gösterilmiştir.

Tablo 26 . Tüm gruplara ait korelasyon sonuçları

			Correlations										
Spearman's rho	TKLCMSMS08	Correlation Coefficient	SerumKortizol	ACTH	DHEAS	DST1mgKortizol	Totalkolesterol	LDL	HDL	Trigliserit	HbA1c	Yaş	BMI
			Sig. (2-tailed)										
	TKELISA08	Correlation Coefficient	,339	,499	,295	,072	,022	,258	,000	,113	,355	,014	
		Sig. (2-tailed)	,010	,000	,036	,603	,877	,062	,035	,999	,446	,007	,927
	TKLCMSMS16	Correlation Coefficient	-,025	,019	-,055	,314	-,067	,050	-,113	-,104	,055	-,134	-,16
		Sig. (2-tailed)	,783	,836	,565	,001	,483	,603	,232	,275	,580	,144	,134
	TKELISA16	Correlation Coefficient	,302	,288	,103	,544	,138	,128	-,130	,307	,223	-,440	,008
		Sig. (2-tailed)	,022	,030	,472	,000	,321	,362	,347	,024	,128	,001	,960
	TKLCMSMS24	Correlation Coefficient	,035	,027	-,048	,485	-,065	,041	-,142	-,053	,058	-,016	-,19
		Sig. (2-tailed)	,709	,772	,614	,000	,499	,670	,139	,581	,561	,866	,072
	TKELISA24	Correlation Coefficient	,280	,210	,004	,732	-,054	,079	-,161	,096	,262	-,203	-,17
		Sig. (2-tailed)	,036	,120	,981	,000	,699	,577	,250	,492	,076	,134	,278
	SerumKortizol	Correlation Coefficient	1,000	,390	,232	,147	,074	,183	-,180	,307	,107	-,061	-,10
		Sig. (2-tailed)		,000	,013	,118	,434	,054	,056	,001	,281	,511	,335
	ACTH	Correlation Coefficient	,390	1,000	,436	-,176	-,021	,194	-,344	,179	,043	-,133	-,09
		Sig. (2-tailed)	,000		,000	,059	,823	,040	,000	,058	,662	,147	,411
	DHEAS	Correlation Coefficient	,232	,436	1,000	-,190	-,071	,268	-,429	,160	,061	-,191	,058
		Sig. (2-tailed)	,013	,000		,049	,467	,006	,000	,101	,545	,043	,593
	DST1mgKortizol	Correlation Coefficient	,147	-,176	-,190	1,000	-,002	,101	-,136	,140	,279	-,050	-,02
		Sig. (2-tailed)	,118	,059	,049		,986	,298	,161	,149	,005	,593	,850
	Totalkolesterol	Correlation Coefficient	,074	-,021	-,071	-,002	1,000	,416	,268	,372	,007	-,163	-,01
		Sig. (2-tailed)	,434	,823	,467	,986		,000	,004	,000	,942	,085	,911
	LDL	Correlation Coefficient	,183	,194	,268	,101	,416	1,000	-,622	,050	-,021	-,217	,057
		Sig. (2-tailed)	,054	,040	,006	,298	,000		,000	,602	,837	,021	,603
	HDL	Correlation Coefficient	-,180	-,344	-,429	-,136	,268	-,622	1,000	-,108	-,128	,096	-,05
		Sig. (2-tailed)	,056	,000	,000	,161	,004	,000		,255	,204	,310	,626
	Trigliserit	Correlation Coefficient	,307	,179	,160	,140	,372	,050	-,108	1,000	,410	-,030	,119
		Sig. (2-tailed)	,001	,058	,101	,149	,000	,602	,255		,000	,755	,271
	HbA1c	Correlation Coefficient	,107	,043	,061	,279	,007	-,021	-,128	,410	1,000	,163	,203
		Sig. (2-tailed)	,281	,662	,545	,005	,942	,837	,204	,000		,098	,072
	Yaş	Correlation Coefficient	-,061	-,133	-,191	-,050	-,163	-,217	,096	-,030	,163	1,000	-,21
		Sig. (2-tailed)	,511	,147	,043	,593	,085	,021	,310	,755	,098		,050
	BMI	Correlation Coefficient	-,102	-,087	,058	-,021	-,012	,057	-,053	,119	,203	-,206	1,00
		Sig. (2-tailed)	,335	,411	,593	,850	,911	,603	,626	,271	,072	,050	

p<0.05 ise istatistiksel olarak anlamlı

LC-MS/MS 08:00 saat tükürük kortizolü düzeyi; 1mg DST ile zayıf düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

ELISA 08:00 tükürük kortizolü düzeyi; serum kortizol, DHEAS, ACTH ile orta düzeyde pozitif yönlü korelasyon, HDL ve yaş bulgularında ise orta düzeyde negatif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

LC-MS/MS 16:00 saat tükürük kortizolü düzeyi; 1mg DST ile orta düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

ELISA 16:00 tükürük kortizolü düzeyi; 1mg DST ile güçlü düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

LC-MS/MS 24:00 saat tükürük kortizolü düzeyi; 1mg DST ile orta düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

ELISA 24:00 tükürük kortizolü düzeyi; 1mg DST ile güçlü düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

Serum kortizol düzeyleri; ACTH ve trigliserid ile orta düzeyde pozitif yönlü anlamlı, DHEAS ile zayıf düzeyde pozitif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

ACTH düzeyleri; DHEAS ve serum kortizol ile orta düzeyde pozitif yönlü anlamlı, HDL bulgularında ise orta düzeyde negatif yönlü anlamlı korelasyon bulunmuştur.

DHEAS düzeyleri; Serum kortizol ile LDL zayıf düzeyde pozitif yönlü anlamlı, ACTH pozitif yönde orta düzeyde, HDL negatif yönde orta düzeyde anlamlı, 1mgDST ve kolesterol negatif yönde güçlü düzeyde anlamlı bulunmuştur.

1mgDST düzeyleri; DHEAS düzeyleri negatif yönde zayıf düzeye anlamlı, HbA1c pozitif yönde zayıf olarak anlamlı bulunmuştur.

LDL düzeyleri; DHEAS ve kolesterol ile negatif yönde güçlü düzeyde, ACTH ile zayıf düzeyde pozitif yönlü anlamlı ve HDL ile negatif yönde güçlü düzeyde anlamlı bulunmuştur.

HDL düzeyleri; ACTH, DHEAS ve kolesterol negatif yönde orta düzeyde, LDL ise negatif yönde güçlü düzeyde anlamlı bulunmuştur.

Trigliserid düzeyleri; Serum kortizol ve kolesterol ile negatif yönde güçlü düzeyde, LDL ise negatif yönde güçlü düzeyde anlamlı bulunmuştur.

HbA1C düzeyleri; 1mg DST ile orta düzeyde pozitif yönlü anlamlı, trigliserid ile negatif yönde orta düzeyde anlamlı bulunmuştur.

Yaş; DHEAS seviyeleri ile negatif yönde zayıf düzeyde anlamlı bulunmuştur.

5. TARTIŞMA

Adrenal lezyonlar, genellikle, adrenal gland ilişkili herhangi bir yakınma ve bulgusu olmayan bireylerde, adrenal dışı organların görüntülenmesi sırasında saptanırlar. Prevelans, radyolojik seriler dikkate alındığında orta yaşlı popülasyonda %2-4, ileri yaş grubunda ise %10'dur. Adrenal lezyonların yaklaşık %90'ını iyi huylu adrenal kitleler oluşturur. İyi huylu lezyonların yaklaşık %75-80'ini fonksiyon göstermeyen adrenal adenomlar ve diğer az görülen kitleler (myelolipom, kist vb. gibi) oluşturur iken, %20-25 hastada feokromositoma, androjen üreten tümör, primer hiperaldosteronizm, CS veya SCS gibi fonksiyonel adrenal kitleler saptanır [6],[7]. Dokuz Eylül Üniversitesi Adrenal Hastalıklar Grubu verilerinde ise, adrenal lezyon nedeni ile başvuran hastalarda adenom görülme oranı %85.6'dır. Adrenal adenomu olan insanların %67.4'ünde fonksiyon göstermeyen adrenal adenom mevcuttur [103]. Adrenal adenomu olan hastalarda klinik ve/veya laboratuvar olarak, adrenal gland kökenli hormonların fazlalığı ile karakterize sendromlar ekarte edilmelidir. Bu sendromlar, feokromositoma, primer hiperaldosteronizm, androjen üreten tümör, CS ve SCS'dir. Adrenal lezyonu olan hastalarda endojen hiperkortizolemiyi dışlamak için kullanılan testlerin sonucu her zaman gerçek klinik durumu yansıtmamaktadır. Bu nedenle tanıda kortizol seviyelerinin doğru ve kolay ölçülebilir olması anahtar rol oynamaktadır. Yakın zamanda tanıda kullanılan testlerin duyarlılığı ve eşik değerleri yeniden sorgulanmaya başlanmış ve yeni tanı yöntemleri geliştirme çalışmaları hız kazanmıştır. Son yıllarda yapılan çalışmalarda, gece yarısı tükürük kortizolü CS tanısında yüksek sensitiviteye sahip olduğu için bu testin tarama ve tanı amaçlı kullanılması önerilmektedir.

Rutin laboratuvarında farklı biyolojik materyallerin kortizol seviyelerinin belirlenmesinde immünoassay yöntemi yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak elde edilen ölçümlerin steroid hormonlar, glukokortikoidler ve antikorlarla çapraz reaksiyon vermesi bu yöntemin dezavantajıdır. Bu nedenle Endokrin Derneği Klinik Uygulamalar Kılavuzu [62] kortizol dahil steroid hormonlarının özellikle düşük konsantrasyonlarında analizi için referans yöntem olarak LC-MS/MS yöntemini önermektedir. LC-MS/MS, radyoaktif materyallerin kullanılmadığı ve düşük seviye kortizol düzeylerini dahi yüksek duyarlılık, özgüllük ve güvenilirlikle tespit edebilen bir yöntemdir. Adrenal kökenli CS, ACTH bağımlı CS ve SCS'li hastalarda tükürük kortizol düzeyini inceleyen çalışmalar [104],[105] çoğunlukla immünoassay yöntemleri ile gerçekleştirilmiş olup sadece gece yarısı tükürük kortizolü düzeyleri ölçülmüştür [104]. Kullanılan analitik metotlar ve hiperkortizoleminin tanısında kullanılan eşik değerler ölçümlerin doğruluk ve güvenilirliğini etkilemektedir [104]. Çalışmamız

kapsamında LC-MS/MS ile tükürük kortizolü ölçümü için yüksek sensitivite ve spesifiteye sahip bir yöntem geliştirildi, ölçümle ilgili analitik yöntem geçerlilik çalışmaları yapılarak ELISA yöntemi ile geliştirilen yöntemin karşılaştırılması çalışmaları da gerçekleştirildi. Geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ile ELISA yöntemi kullanılarak CS, SCS ve NFA grubu hastalarda günün üç farklı saatinde alınan tükürük örneklerinde kortizol ölçümü gerçekleştirildi. Gerçekleştirilen ölçümler sonucunda hem her iki yöntemin birbirleriyle uyumu, hem de hastalarda ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin bu hastalardaki tanısal değeri, diurnal ritmi ortaya koymadaki başarısı ve hastaların klinik bulgularıyla ilişkileri değerlendirildi. Çalışmamız her üç grubu birlikte farklı iki yöntemle inceleyen ve ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin hastalardaki diurnal ritmi, tanısal değeri ve klinik korelasyonları açısından bu derece kapsamlı değerlendiren ilk çalışmadır.

Metot validasyonu:

Çalışmamızda CLSI kurallarına göre LC-MS/MS yöntemi ile doğru kortizol ölçümü için metot validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiş olup ve aynı zamanda ELISA yöntemiyle metot karşılaştırma çalışmaları yapıldı. Buna göre yapılan validasyon çalışmasında kortizol ölçümü 0.5-200 µg/L aralığında lineer bulundu. Linearite çalışmasında elde ettiğimiz korelasyon katsayısı R^2 değeri 0,9999 olarak bulundu. Mészáros ve arkadaşlarının yaptıkları validasyon çalışmasında 0.05-100 µg/L aralığını lineer, korelasyon katsayısını ise $R^2 > 1.0$ olarak bulmuşlardır [106]. Antonelli ve arkadaşlarının yaptıkları validasyon çalışmasında ise 0.18-20 µg/L aralığı lineer bulunmuştur [107]. Yaptıkları çalışmada korelasyon katsayısını R^2 kortizol için > 0.998 olarak bulmuşlardır.

Gerçekleştirdiğimiz kesinlik çalışmasında kortizol için gün içi ve günler arası %CV değerleri 2.32-14.9 aralığında bulunmuştur. Mezzullo ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada %CV değerlerini sırasıyla 5.5-3.9-2.7 ve 9.5-10.5-12.5 olarak bulmuşlardır [108]. Paula ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada tek konsantrasyon ve sadece gün içi tekrarlanabilirlik çalışılmış ve %CV 5.5 olarak bulunmuştur [109]. Antonelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada iki seviye için çalışmışlar ve %CV değerleri gün içi tekrarlanabilirlik 7.5-6, günlerarası değerler ise 8.4-6 olarak bulmuşlardır [107]. Geri elde çalışmamızda tükürük kortizol için SPE öncesi geri kazanım yüzdeleri eklenen 0.5, 5, 50 µg/L konsantrasyonlarındaki standartlar için % 89.7-115.1, SPE sonrası için geri kazanım yüzdeleri ise %84-134.4 aralığında bulunmuştur. Marco ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada geri kazanım değerleri % 68.2, 77.6, 78.6 olarak bizim çalışmamıza göre düşük bulunmuştur. Antonelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada geri kazanım sonuçları % 90-111 olarak

bulunmuştur [107]. Sinyal gürültü oranı baz alınarak belirlenmiş olan limitler, çalışmamızda kortizol için LOD 0.01 µg/L (0.001 µg/dL) , LOQ ise 0.1 µg/L (0.01 µg/dL) olarak belirlendi. Antonelli ve arkadaşları sinyal gürültü değerlerini esas aldıkları çalışmada LOD değerini 0.2 nmol/L (0.007 µg/dL), LOQ değerini ise 0.51 nmol/L (0.18 µg/dL) olarak bulmuştur [110]. Referans doğrulama çalışması kapsamında 20 kontrol grubu ile Mayo Clinic'in referans değerler karşılaştırılmış olup % 100 uyum bulunmuştur. Antonelli ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sabah için referans değeri olarak 3.0- 21.0 nmol/L (0.10- 0.76 µg/dL) olarak, gece yarısı tükürük kortizolü içinse 0.5-2.5 nmol/L (0.018- 0.09 µg/dL) olarak verilmiştir [107]. Literatür taraması yapıldığında validasyon parametreleri kapsamında taşıma çalışmasının, dondurma çözme çalışmalarının yaygın olarak yapılmadığı görüldü. Bu bağlamda çalışmamız diğer çalışmalara nazaran validasyon sürecini tüm yönleri ile ele alan bir çalışma kapsamındadır. Ayrıca saklama koşulları açısından değerlendirildiğinde yaptığımız 3 kez dondurma çözme işleminde %biasların düşük konsantrasyonda örnek için biasın %1, yüksek konsantrasyondaki diğer örnek için biasın %0.09 çıkması tükürük numunesinin son derece stabil bir örnek türü olduğunu göstermiştir.

Tükürük kortizol tanısal performansı ve diüurnal ritim değerlendirilmesi:

Gece saatlerinde alınan serum kortizolünün ve tükürük kortizolünün yüksek saptanması endojenik hiperkortizolemi durumlarında görülebilir ve HHA aksdaki sirkadiyen ritmin kaybolduğunu gösterir. Gece yarısı tükürük kortizol düzeylerinin ölçülmesi CS tanısında duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir yöntemdir (yaklaşık %97). Ancak, bu testlerin tanısal gücü SCS'de henüz netlik kazanmamıştır. Literatürde CS hastalarında gece yarısı tükürük kortizolü kullanılarak yapılan birçok çalışma mevcuttur. Castro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, gece yarısı tükürük kortizol numunesi ve gece boyunca 1 mg deksametazon sonrası serum kortizol testlerinin CS teşhisi için hassas belirteçler olduğunu göstermektedir. Ek olarak, iki testin kombinasyonu, obez ve CS hastaları arasında ayırım yapmada olanak sağlayacağını ve ayakta hasta taraması için faydalı olabileceğini bildirmişlerdir [60]. Carlos ve arkadaşlarının yaşları 1-16 arasında olan CS'li 11 hasta ile yaptıkları çalışmada 09:00 ve 23:00 saatlerinde 1mg deksametazon sonrası tükürük kortizol düzeylerini RIA yöntemi ile incelenmiştir. Çalışmada 1mg deksametazon sonrasında 23:00'de ölçülen tükürük kortizol düzeylerinin % 100 sensitivite ve spesifite ile çocuklarda CS'yi tespit ettiği bir çalışma mevcuttur. Bu çalışmada tükürük kortizolünün girişimsel bir yöntem olmaması aynı zamanda yüksek spesifiteye sahip olması avantaj olarak gösterilmiştir [111]. Castro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 33 CS'li hasta ile 18 obez kişinin katıldığı çalışmada 09:00, 17:00 ve 23:00' da alınan örneklerin 1 mg deksametazon sonrası gece 23:00 de çalışılan tükürük kortizolün

%90 'ın üzerinde spesifite ve sensitiviteyle CS tanısı koydurduğunu bildirmiştir [60]. Adrenal kökenli CS, SCS ve ACTH bağımlı CS'li kişilerde tükürük kortizolü ile yapılan çalışmalar [104],[105] çoğunlukla immunoassay yöntemleri ile çalışılmış olup sadece gece yarısı tükürük kortizolü seviyeleri analiz edilmiştir [104]. Literatürde, SCS, adrenal CS ve NFA olgularında gün içerisinde belirli zaman aralıklarında ölçülen tükürük kortizolü düzeylerini LC-MS/MS ve ELISA yöntemleriyle birlikte inceleyen bir çalışma bulunmamaktadır. Bu kortizol düzeylerinin SCS, adrenal CS ve NFA tanıları için önemli olup olmadığı ve özellikle standart laboratuvar yöntemi olan immunoassay ile SCS veya CS grubu olarak kategorize edilen hastaların örneklerinin LC-MS/MS ile ölçüldüğünde farklı bir şekilde sınıflandırılıp sınıflandırılmayacağı bilinmemektedir. Son dönemde, tükürükte kortizol ölçümünün serum kadar eşit tanısal öneme sahip olması, ayrıca girişimsel olmayıp kişide stres oluşturmaktan alınabiliyor olması nedeniyle potansiyel tanı testi olarak değerlendirilmesi söz konusudur [2],[3].

Sağlıklı kişilerde günlük kortizol dalgalanmalarını tükürük ve serum örneklerinde inceleyen bir çalışmada sirkadiyen varyasyonun her iki örnek türünde de örtüştüğünü ve gün içinde dört kez (saatler; 08:00, 12:00, 16:00 ve 20:00) alınan örneklerde en yüksek düzeyin sabah 08:00'de gözlemlendiğini belirtmişlerdir. CS veya SCS'de günün belirli saatlerinde ölçülen tükürük kortizolünün diüurnal ritmi yansıtip yansıtmadığını inceleyen sadece bir çalışma bulunmuştur. Filippo ve arkadaşlarının insidental adrenal adenomlu hastalarda yaptığı bu çalışmada gün içinde 6 kez (saatler; 07:00, 09:00, 12:30, 14:30, 18:30 ve gece yarısı tükürük kortizolünü değerlendirmek için 22.30) alınan tükürük ve serum örneklerinde diurnal ritmin değerlendirilmesi için kortizol ölçümleri yapılmıştır. Buna göre sabah saatlerinde alınan serum ve tükürük örneklerinde kortizol düzeyinin kontrol grubuna göre yüksek bulunduğu belirtilmiştir [112]. Çalışmada araştırmanın retrospektif-gözlemsel olmasının çalışmanın sınırlılığı olduğu ve otonom kortizol sekresyonu üzerine farklı çalışmaların yapılması gerekliliği vurgulanmıştır. Çalışmamızda LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin sirkadiyen ritim sonuçları karşılaştırıldı, aynı zamanda 08:00, 16:00 ve 24:00 saatlerinin de kendi arasında grupları birbirinden ayırmadaki başarısı değerlendirildi. CS grubu hastalarda hem LC-MS\MS hem de ELISA ile günün üç farklı saatinde ölçülen tükürük kortizolü düzeyleri açısından anlamlı fark bulunmadı. Literatürde gece yarısı tükürük kortizolün CS tanısında hassas olduğuna dair çok fazla çalışma vardır. Gece yarısı tükürük kortizol düzeyleri bu hastalarda ayırıcı şekilde yüksek bulunur nitekim bizim çalışmamızda da literatür ile uyumlu olarak yüksek bulundu. Çalışmamızda kontrol grubumuz NFA'lı kişilerde kortizol düzeyleri en yüksek sabah 08:00, azalma eğiliminde 16:00' da ve en düşük de gece 24:00 bandında

görülmüş olup diurnal ritmi yansıttığı görülmüştür. SCS grubu hastalarda sabah 08:00'deki çalışma sonuçlarının en yüksek düzeyde, 16:00'da ve 24:00' te ise düşme eğrisi sergilediği ancak sağlıklı gruba göre olması gerekenden yüksek olduğu görüldü. Bu durumda, SCS hastalarındaki diurnal ritmin CS grubu hastalara kıyasla nispeten daha ılımlı bir dengesizlik gösterdiği anlaşıldı. 08:00'de ELISA ile çalışılan NFA ve SCS grubunda birbirine yakın sonuçlar alındı. Bu sebeple LC-MS/MS ile ölçülen gün içi kortizol düzeylerinin diurnal ritmi daha net yansıttığı gözlemlendi. Çalışmamız sonucunda SCS hastalarında 16:00 ve 24:00'de alınan tükürük kortizolü düzeylerinin ayırıcı tanıdaki etkinliğinin değerlendirilmesi gerektiği düşüncesindeyiz.

Tükürük kortizol testinin CS ve SCS hastalarında tanı koydurucu etkinliğinin ve eşik değer belirlenmesi çalışmaları kapsamında ROC analizinden yararlanıldı. Buna göre CS testi için LC-MS/MS' de sekizinci saatte eşik değer 0.095 µg/dL olarak seçildiğinde sensitivite %92, spesifite ise %31 olarak bulundu. ELISA'da sekizinci saatteki eşik değer 3.30 µg/dL seçildiğinde sensitivite %75, spesifite ise %84 olarak bulundu. Sekizinci saatteki ROC analizi p değerleri her iki yöntem için (p=0,157 ve 0,05) anlamlı bulunmadı. ELISA ile bulunan nispeten yüksek sensitivite ve spesifite değerlerinin de bu nedenle anlamlı olmadığı düşünüldü. Yaptığımız çalışma sonucunda LC-MS/MS ile sekizinci saatteki sensitivite yüksek olmasına rağmen spesifitesi düşük bulunmuştur. Literatürdeki sekizinci saat sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. LC-MS/MS 'de 16. ve 24. saatteki sırasıyla eşik değerleri 0.07 µg/dL ve 0.055 µg/dL olarak seçilmiş, bu değerlere göre sensitivite, spesifite değerleri sırasıyla %92-%85 ve %92- %92 olarak bulundu. ELISA 'da 16. ve 24. saatteki sırasıyla eşik değerleri 2.10 µg/dL ve 2.34 µg/dL olarak seçilmiş, bu değerlere göre sensitivite, spesifite değerleri sırasıyla %92-%85 ve %92- %92 olarak bulundu. Literatürde farklı yöntemler kullanılarak CS grubu hastalarla yapılmış çalışmalar da mevcuttur. Yako ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, sabah 08:00 saatinde alınan tükürük kortizol düzeyleri için 1mg DST öncesi ve 1 mg DST sonrası tükürük kortizol düzeyleri ile çalışmış olup eşik değer belirlemişlerdir. Çalışma grubunda SCS (n=16), NFA (n= 12), birincil aldosteronizm (PA) (n= 8), feokromositoma (Pheo) (n=6) hastalarında 1mg DST sonrası kortizol düzeyi ECLIA yöntemi ile ölçülmüş ve eşik değer belirlenmiştir. DST öncesi eşik değeri 0.11 µg/L olarak belirlediklerinde sensitivite %100 iken spesifite %50 olarak bulunmuş, 1mg DST sonrası eşik değeri 0.12 µg/L olarak belirlediklerinde ise sensitivite % 93.8, spesifite ise % 58.3 olarak bulunmuştur. SCS ve NFA ayırımında yaptıkları çalışmanın çok spesifik olmadığını da ayrıca yazmışlardır [113]. Beko ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ECLIA ve RIA yöntemleri

kullanılarak, 127 CS'li, obez veya insidental adrenal adenomlu hastalarda gece yarısı tükürük kortizolü düzeyleri ölçülmüştür. ROC analizine göre ECLIA yöntemi için eşik değeri 0.35 µg/dL olarak alındığında duyarlılık %100, özgüllük %88, RIA yöntemi için ise 0.29 µg/dL olarak alındığında duyarlılık %100, özgüllük %71 bildirmişlerdir. Yapılan çalışmada gece yarısı tükürük kortizolü ölçümünün aşikar hiperkortizolemi tanısı için uygun bir biyobelirteç olduğu ancak eşik değerinin yüksek oranda Metota bağlı olarak değiştiğini belirtmişlerdir [104]. Son zamanlarda yayınlanan, 21 CS'li, 27 asemptomatik CS'li, 185 subklinik hiperkortizolemi ve 52' si sağlıklı kişiler olmak üzere yapılan bir diğer çalışmada ise gece yarısı tükürük kortizolü düzeyleri ECLIA ve LC-MS/MS yöntemleri ile çalışılmıştır. ECLIA yöntemi için eşik değeri 0.26 µg/dL olarak kullanıldığında duyarlılık %97, özgüllük %92, LC-MS/MS yöntemi için ise eşik değeri 0.18 µg/dL olarak belirlendiğinde duyarlılık %95, özgüllük %94 olarak bulunmuştur [106]. Bir diğer çalışmada ise 9 adrenal CS, 43 CS ve 18 obez hastada gece yarısı tükürük kortizolü ve idrar serbest kortizolü düzeyleri ölçülmüştür. Elde edilen bulgular doğrultusunda gece yarısı tükürük kortizolü testinin idrar serbest kortizolüne kıyasla tanısallık performansının yüksek olduğu ve CS tanısı için primer belirteç olarak kullanılmasının gerekliliği vurgulanmıştır [109]. Raff ve arkadaşlarının aynı örneklerde RIA ve enzim immunoassay (EIA) yöntemlerini karşılaştırma yaptıkları çalışmada, EIA'da tükürük kortizol sonuçlarının RIA'dan daha yüksek olduğu, ancak RIA ile bulunan değerlerin beklenen değere daha yakın olduğu bildirilmiştir [114]. Friedman ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise ELISA yöntemi kullanılarak 24 CS'li hastada gece yarısı tükürük kortizol seviyeleri ölçülmüş ve ELISA yöntemi için özgüllük % 95, duyarlılık % 45 olarak bulunmuştur [115]. Sonuç olarak çalışmamızda bulduğumuz 16. ve 24. saatteki eşik değerlere bağlı sensitivite ve spesifite sonuçlarının literatür ile karşılaştırıldığında geliştirdiğimiz LC-MS/MS yönteminin oldukça hassas ölçüm yaptığı ve CS hastalığı tanısı için uygun olduğu görülmüştür.

Çalışmamızda SCS hastalarında ölçülen tükürük kortizolü için eşik değeri LC-MS/MS'de sekizinci saatteki 0.045µg/dL olarak seçildiğinde sensitivite %96, spesifite ise %24 olarak bulundu. ELISA'da sekizinci saatteki eşik değer 2.23 µg/dL seçildiğinde sensitivite %60, spesifite ise %27 olarak bulundu. Sekizinci saatteki AUC değerleri aynı şekilde her iki yöntem için (0.604 ve 0.331) düşük bulundu. Yaptığımız çalışmada sekizinci saatteki sensitivite yüksek olmasına rağmen spesifitesi düşük bulunmuştur. Literatürdeki sekizinci saat sonuçlarıyla uyumlu bulunmuştur. LC-MS/MS 'de 16. ve 24. saatteki sırasıyla eşik değerleri 0.05 µg/dL ve 0.02 µg/dL olarak seçildi, bu değerlere göre sensitivite, spesifite değerleri

sırasıyla (%75-%93 ve %90- %77) olarak bulundu. Literatürde farklı yöntemler kullanılarak SCS grubu hastalarla yapılmış çalışmalar da mevcuttur. ELISA'da 16. ve 24. saatteki sırasıyla eşik değerleri 1.15 µg/dL ve 0.92 µg/dL olarak seçilmiş, bu değerlere göre sensitivite, spesifite değerleri sırasıyla (%89-%38 ve %82- %85) olarak bulundu. ELISA'da 16. saat sonuçlarının yeterince hassas olmadığı görüldü (p=0.234). SCS olguları ile yapılan çalışmalarda gece yarısı tükürük kortizolü düzeylerinin diğer HHA aks testleri ile birlikte değerlendirildiğinde tanısal güvenirlikte artışın söz konusu olduğu bildirilmiştir [116]. Palmieri ve arkadaşları, SCS'in biyokimyasal tanısı için ölçtükleri gece yarısı tükürük kortizolü sonuçlarının duyarlılık ve özgüllüğünün 1 mg deksametazon testi bulguları ile beraber değerlendirildiğinde sırasıyla %88.9 ve %85.2 olarak bulunduğunu belirtmişlerdir[117]. Ancak LC-MS/MS ile gerçekleştirdikleri kortizol ölçümünün tanısal doğruluğunu karşılaştırmak için aynı hastalarda başka bir yöntemle ölçüm yapamadıklarını ve bu durumun çalışmanın sınırlılığı olduğunu belirtmişlerdir. SCS'li hastalarda gece yarısı tükürük kortizolünün tanısal değerini inceleyen [118] ve immunassay yöntemi ile yapılan çalışmada ise gece yarısı tükürük kortizol düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. Ancak immunassay yöntemi için en iyi performansın gözlendiği eşik değerinde (0.18 µg/dL) duyarlılığın %82, özgüllüğün %60 olduğu belirtilmiştir. Masserini ve arkadaşları immüno florometrik yöntem ile ölçülen gece yarısı tükürük kortizolünün SCS tanısında duyarlılık ve özgüllüğünün sırasıyla %27.7 ve %87.7 bulunduğunu belirtmişlerdir [116]. Gece yarısı tükürük kortizolünün tanısal gücü ve klinik karar verme eşiklerini yayınlayan bu ve benzer araştırma çalışmalarında oldukça farklı sonuçlar elde edilmiştir ve halen bir görüş birliği mevcut değildir. Çalışmamızda bulduğumuz 16. ve 24. saatteki eşik değerlere bağlı sensitivite ve spesifite sonuçlarının literatür ile karşılaştırıldığında LC-MS/MS ile geliştirdiğimiz yöntem çalışmasının oldukça hassas ölçüm yaptığı görülmüştür. Bu bağlamda bu eşik değerlerin kullanılabileceği düşünülmektedir. Bununla birlikte SCS tanısında kabul görmüş ve sıklıkla kullanılan 1mg DST sonrası ölçülen serum kortizol değerleri için seçilen eşik değerler farklı otoritelere göre farklılık göstermektedir. National Institute of Health-A.B.D. ve Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği eşik değeri 5 µg/dL olarak kabul ederken [59], Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları Derneği ve Akdeniz Endokrinologlar Birliği eşik değeri 3 µg/dL olarak kabul etmektedir [15]. Endojen hiperkortizolemi 1.8 µg/dL eşik değeri ile büyük oranda dışladığı bilinmektedir [6],[7],[13],[14]. Ancak 1 mg deksametazon sonrası ölçülen serum kortizolü sonuçlarında saptanan ara değerlerin (1,8-3 veya 1,8-5 µg/dL) nasıl yorumlanacağı, gerçek bir hiperkortizolemik durum olup olmadığı henüz netleşmemiştir. Bu durumda Türkiye

Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği deksametazon süpresyon test(ler)’i dışında HHA aks ile ilgili diğer göstergeler de (idrar serbest kortizolü, ACTH düzeyi, DHEAS düzeyi ve gece serum kortizol düzeyi) adrenal gland kaynaklı otonom glukokortikoid salgısının varlığı göstermede değişik duyarlılık ve özgüllük oranları ile kullanılabileceğini bildirmiştir. Bazal ACTH ve DHEAS düzeylerinin, örnek çalışılması ile ilgili teknik sorunlar, özellikle DHEAS için geçerli olan yaşlanma ile doğal baskılanma süreci nedeni ile kullanımı sınırlanmaktadır. Nitekim bizim çalışmamızda bu söylemi doğrular nitelikte tüm gruplar arasında yaptığımız korelasyon çalışmasında DHEAS seviyelerinin yaş ile negatif yönde zayıf düzeyde anlamlı bulunmuştur. Ancak SCS, ACTH bağımsız bir ılımlı hiperkortizolemi durumunu yansıttığı için, baskılı ACTH düzeyleri (< 10 pg/ml) veya yaş ile uyumsuzluk gösterecek kadar baskılı DHEAS düzeyleri SCS tanısının doğrulanmasında önem taşımaktadır [119]. Bir diğer HHA testi olan idrar serbest kortizolü ise ancak farklı koşullarda birçok ilaçla etkileşimi nedeniyle ile yanlış pozitif ve negatif sonuçlar gözlenebilmektedir [55]. Sonuçların fazla sıvı alımı, tamamlanmayan toplama ve böbrek yetmezliğinden etkilendiği belirtilmiştir. Çalışmamız gruplarının rutin parametrelerinin ölçüm sonuçları ve tükürük kortizolü bulguları ile korelasyonları değerlendirildiğinde; 1mg DST sonuçlarının ELISA 08.00 tükürük kortizolü düzeyi hariç hem LC-MS/MS hem de ELISA ile ölçülen tüm saatler ile orta güçlü düzeyde korelasyona sahip olduğu görüldü. Bu anlamda sonuçların 1 mg DST ile uyumlu ve korele olduğu düşünülmektedir. 1 mg deksametazon sonrası ölçülen kortizol düzeyleri CS ve SCS grubu hastalarda NFA grubuna göre anlamlı yüksek bulundu ($p=0.000$, 0.000). Ancak CS ve SCS grupları arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.074$). Serum kortizol düzeyleri açısından ise üç grup arasında anlamlı fark bulunmadı ($p=0.063$). ACTH ve DHEAS düzeyleri açısından CS-NFA grupları arasında anlamlı fark bulunmadı (sırasıyla $p=0.709$, 0.850). Bununla birlikte öğleden sonra 16.00’da alınan tükürük örneklerinde LC-MS/MS ile ölçülen tükürük kortizolü düzeyi CS grubunda NFA ve SCS gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.001$, 0.032). Gece 24.00’da alınan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol düzeyi CS grubunda NFA ve SCS gruplarına göre anlamlı olarak yüksek bulundu (sırasıyla $p=0.000$, 0.008). Ayrıca SCS gruplarında da ölçülen kortizol düzeyi NFA grubuna göre anlamlı olarak yüksek bulundu ($p=0.0004$).

Bizim çalışmamızda üç saat için de hem SCS’ li hem de NFA’ lı grup ile çalışılmış ve 16. ve 24. saatte yüksek sensitivite ve yüksek spesifite ile eşik değer belirlenmiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda kullanımı yaygın olan HHA aks testlerinde yaşanabilecek dezavantajların olması nedeniyle hastada stres oluşturmayan, ev ortamında bile alınabilen, hassas ve stabil bir test olması gibi birçok avantaja sahip tükürük kortizol ölçümünün yaygınlaştırılması gerektiği

düşüncesindeyiz. Bu sebeple özellikle SCS tanısında özellikle ara değerlerin 1mg DST için 1,8-3 veya 1,8-5 µg/dL bulunduğu hastalardan saat 16:00' da ve 24:00' de alınan tükürük kortizol sonuçların klinisyene tanı koymada yardımcı olacağı ve tedaviye yön vermede yardımcı olacağı düşüncesindeyiz.

4. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızdan elde ettiğimiz bulgular ışığında sonuçlarımız aşağıdaki gibi özetlenebilir; CLSI kılavuzu baz alınarak LC-MS/MS ile tükürük kortizolü ölçümü için yeni bir yöntem geliştirildi ve tüm analitik yöntem geçerlilik çalışmaları yapıldı. Metot karşılaştırma çalışmaları kapsamında ELISA yöntemi ile karşılaştırma yapılarak iki yöntemin uyumu değerlendirildi. Çalışmamızda iki yöntemin birbirine korele ve uyumlu olduğu bulundu.

Bununla birlikte LC-MS/MS ile kortizol ölçüm yöntemimiz gruplar arası ayrımı özellikle 16. ve 24. saatlerde alınan tükürük örneklerinde tanısal algoritmaya katkıda bulunması ve diüurnal ritmi ortaya koyması açısından ELISA yöntemine göre daha hassas, doğru ve güvenilir olduğu gösterilmiştir.

Çalışmamızda kontrol grubumuz NFA'lı kişilerde kortizol düzeyleri en yüksek sabah 08:00, azalma eğiliminde 16:00' da ve en düşük de gece 24:00 bandında görülmüş olup diurnal ritmi yansıttığı görülmüştür.

LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinin sirkadyen ritim sonuçlarının karşılaştırılması aynı zamanda da 08:00-16:00 ve 24:00 saatlerinin de kendi arasında grupları birbirinden ayırmadaki başarısı değerlendirildi. CS hastalarında her üç saatte de kortizol düzeyleri yüksek bulunarak literatür ile uyumlu sonuçlar bulundu.

LC-MS/MS 'de 16. ve 24. saatteki sırasıyla eşik değerleri 0.07 µg/dL ve 0.055 µg/dL olarak seçilmiş, bu değerlere göre yüksek sensitivite ve spesifite bulundu. Çalışmamızda bulduğumuz 16. ve 24. saatteki eşik değerlere bağlı sensitivite ve spesifite sonuçlarının literatür ile karşılaştırıldığında geliştirdiğimiz yöntem çalışmasının oldukça hassas ölçüm yaptığı görülmüştür.

CS ve SCS tanısında tanı koydurucu etkiye sahip tarama testi üzerinde görüş birliğine varılmış 1mg DST sonuçlarının ELISA 08.00 tükürük kortizolü düzeyi hariç hem LC-MS/MS hem de ELISA 'daki tüm saatler ile orta düzeyde korelasyona sahip olduğu görüldü.

Çalışmamız her üç grubu birlikte farklı iki yöntemle inceleyen ve ölçülen tükürük kortizolü düzeylerinin hastalardaki diurnal ritmi, tanısal değeri ve klinik korelasyonları açısından oldukça kapsamlı şekilde değerlendirilmiş olup, özellikle SCS tanısında 16. saat ve 24. saat

lerde ölçülen tükürük kortizolünün belirlenen eşik değerleri ile birlikte ayırıcı tanıda klinisyenlere ve hastalara fayda sağlayacağı düşüncesindeyiz.

Sonuç olarak, elde edilen bulguların hiperkortizoleminin ayırıcı tanısına, klinik seyrine ve tedaviye yanıtın değerlendirilmesine ışık tutacağı düşüncesindeyiz. Çalışmamızın ayrıca uluslararası gelişmiş merkezler yanı sıra ülkemizde de sayılı klinik laboratuvarlarda kullanılmaya başlanan tandem kütle spektrometrik yöntemin yaygınlaşmasına ve standardizasyonuna yönelik girişimlere katkıda bulunacağı, dolayısıyla tükürük kortizölü ölçümünde yaşanan sorunlar nedeniyle olası hatalı sonuçların önlenmesi konusunda ve ölçüm maliyetini düşürme yönünde yarar sağlayacağı görüşündeyiz.



5. KAYNAKLAR

- [1] H. Raff ve T. Carroll, “Cushing’s syndrome: from physiological principles to diagnosis and clinical care”, *J. Physiol.*, c. 593, sayı 3, ss. 493–506, 2015.
- [2] R. H. Williams, P. R. Larsen, H. M. Kronenberg, S. Melmed, ve K. S. Polonsky, “Williams textbook of endocrinology 10th edition”, *Pennsylvania: Saunders*, ss. 393–400, 2003.
- [3] M. Debono vd., “Modified-release hydrocortisone to provide circadian cortisol profiles”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 94, sayı 5, ss. 1548–1554, 2009.
- [4] Q. Zhang, J. Dou, W. Gu, G. Yang, ve J. Lu, “Reassessing the reliability of the salivary cortisol assay for the diagnosis of Cushing syndrome”, *J. Int. Med. Res.*, c. 41, sayı 5, ss. 1387–1394, 2013.
- [5] Y. E., A. Y., A. J., ve E. O. <http://orcid.org/0000-0003-4257-7492> A. O.-A. Sarfo-Kantanka O. AO - Yorke Yacoba; ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-7179-2461> AO - Sarfo-Kantanka, Osei; ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-4451-5749>, “Screening for Cushing Syndrome at the Primary Care Level: What Every General Practitioner Must Know”, *Int. J. Endocrinol.*, c. 2017, s. 1547358, 2017.
- [6] A. G. Ioachimescu, E. M. Remer, ve A. H. Hamrahian, “Adrenal incidentalomas: a disease of modern technology offering opportunities for improved patient care”, *Endocrinol. Metab. Clin.*, c. 44, sayı 2, ss. 335–354, 2015.
- [7] S. Kannan, E. M. Remer, ve A. H. Hamrahian, “Evaluation of patients with adrenal incidentalomas”, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, c. 20, sayı 3, ss. 161–169, 2013.
- [8] J. Lindholm vd., “Incidence and late prognosis of Cushing’s syndrome: a population-based study”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 86, sayı 1, ss. 117–123, 2001.
- [9] C. Steffensen, A. M. Bak, K. Z. Rubeck, ve J. O. L. Jørgensen, “Epidemiology of Cushing’s syndrome”, *Neuroendocrinology*, c. 92, sayı Suppl. 1, ss. 1–5, 2010.
- [10] F. Guaraldi ve R. Salvatori, “Cushing syndrome: maybe not so uncommon of an endocrine disease”, *J. Am. Board Fam. Med.*, c. 25, sayı 2, ss. 199–208, 2012.
- [11] I. Chiodini, “Diagnosis and treatment of subclinical hypercortisolism”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 96, sayı 5, ss. 1223–1236, 2011.
- [12] W. F. Young Jr, “The incidentally discovered adrenal mass”, *N. Engl. J. Med.*, c. 356, sayı 6, ss. 601–610, 2007.
- [13] M. De Leo, A. Cozzolino, A. Colao, ve R. Pivonello, “Subclinical Cushing’s

- syndrome”, *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 26, sayı 4, ss. 497–505, 2012.
- [14] L. F. Starker, J. W. Kunstman, ve T. Carling, “Subclinical Cushing syndrome: a review”, *Surg. Clin.*, c. 94, sayı 3, ss. 657–668, 2014.
- [15] M. Terzolo vd., “AME position statement on adrenal incidentaloma”, *Eur. J. Endocrinol.*, c. 164, sayı 6, ss. 851–870, 2011.
- [16] L. K. Nieman vd., “The diagnosis of Cushing’s syndrome: an endocrine society clinical practice guideline”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 93, sayı 5, ss. 1526–1540, 2008.
- [17] R. Megha ve S. W. Leslie, *Anatomy, Abdomen, Adrenal Glands (Suprarenal Glands)*. 2018.
- [18] A. Crawford ve H. Harris, “Adrenal cortex disorders: hormones out of kilter”, *Nursing* 2019, c. 42, sayı 10, ss. 32–38, 2012.
- [19] G. Mastorakos ve A. Antoniou-Tsigkos, “Adrenocorticotrophic Hormone (ACTH): Physiology and Its Involvement in Pathophysiology”, içinde *Encyclopedia of Endocrine Diseases*, 2017.
- [20] S. erişim: 20.10.2020, “No Title”.
- [21] J. T. Busada ve J. A. Cidlowski, “Mechanisms of glucocorticoid action during development”, içinde *Current topics in developmental biology*, c. 125, Elsevier, 2017, ss. 147–170.
- [22] A. Antoniou-Tsigkos, E. Zapanti, L. Ghizzoni, ve G. Mastorakos, “Adrenal androgens”, *Endotext, KR Feingold al., Eds.(MDText. com, South Dartmouth, MA, 2000)*, 2000.
- [23] B. J. Clark, “ACTH action on StAR biology”, *Front. Neurosci.*, c. 10, s. 547, 2016.
- [24] H. Kronenberg, *Williams textbook of endocrinology*. Elsevier Health Sciences, 2007.
- [25] H. Selye, “A syndrome produced by diverse nocuous agents [13]”, *Nature*. 1936.
- [26] W. L. Miller, “The hypothalamic-pituitary-adrenal axis: a brief history”, *Horm. Res. Paediatr.*, c. 89, sayı 4, ss. 212–223, 2018.
- [27] C. T. Lim ve B. Khoo, *Normal Physiology of ACTH and GH Release in the Hypothalamus and Anterior Pituitary in Man*. 2000.
- [28] P. W. Gold ve G. P. Chrousos, “Organization of the stress system and its dysregulation in melancholic and atypical depression: High vs low CRH/NE states”, *Mol. Psychiatry*, 2002.
- [29] N. G. Burford, N. A. Webster, ve D. Cruz-Topete, “Hypothalamic-pituitary-adrenal axis modulation of glucocorticoids in the cardiovascular system”, *International Journal of Molecular Sciences*. 2017.

- [30] M. Dutt ve I. Jialal, “Physiology, Adrenal Gland”, içinde *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2019.
- [31] B. E. Leonard, “HPA and immune axes in stress: involvement of the serotonergic system”, *Neuroimmunomodulation*, c. 13, sayı 5–6, ss. 268–276, 2006.
- [32] B. E. Leonard, “HPA and immune axes in stress: Involvement of the serotonergic system”, *NeuroImmunoModulation*. 2007.
- [33] T. G. Dinan, E. Lavelle, L. V. Scott, J. Newell-Price, S. Medbak, ve A. B. Grossman, “Desmopressin normalizes the blunted adrenocorticotropin response to corticotropin-releasing hormone in melancholic depression: Evidence of enhanced vasopressinergic responsivity”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 1999.
- [34] T. M. Buckley ve A. F. Schatzberg, “On the interactions of the hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis and sleep: normal HPA axis activity and circadian rhythm, exemplary sleep disorders”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 90, sayı 5, ss. 3106–3114, 2005.
- [35] S. A. Bowden, A. M. Connolly, K. Kinnett, ve P. S. Zeitler, “Management of adrenal insufficiency risk after long-term systemic glucocorticoid therapy in Duchenne muscular dystrophy: clinical practice recommendations”, *J. Neuromuscul. Dis.*, c. 6, sayı 1, ss. 31–41, 2019.
- [36] W. S. Gozansky, J. S. Lynn, M. L. Laudenslager, ve W. M. Kohrt, “Salivary cortisol determined by enzyme immunoassay is preferable to serum total cortisol for assessment of dynamic hypothalamic–pituitary–adrenal axis activity”, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, c. 63, sayı 3, ss. 336–341, 2005.
- [37] D. Hellhammer, “Salivary cortisol and behavior: an overview”, *Neuropsychobiology*, c. 22, ss. 150–169, 1989.
- [38] T. F. Oberlander, J. Weinberg, M. Papsdorf, R. Grunau, S. Misri, ve A. M. Devlin, “Prenatal exposure to maternal depression, neonatal methylation of human glucocorticoid receptor gene (NR3C1) and infant cortisol stress responses”, *Epigenetics*, c. 3, sayı 2, ss. 97–106, 2008.
- [39] I.-K. Jeong, “The role of cortisol in the pathogenesis of the metabolic syndrome”, *Diabetes Metab. J.*, c. 36, sayı 3, ss. 207–210, 2012.
- [40] W. Stalmans ve M. Laloux, “Glucocorticoids and hepatic glycogen metabolism.”, *Monogr. Endocrinol.*, c. 12, ss. 517–533, 1979.
- [41] E. Canalis, “Clinical review 83: Mechanisms of glucocorticoid action in bone: implications to glucocorticoid-induced osteoporosis”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c.

- 81, sayı 10, ss. 3441–3447, 1996.
- [42] R. FRASER, D. L. DAVIES, ve J. M. C. CONNELL, “Hormones and hypertension”, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., c. 31, sayı 6, ss. 701–746, 1989.
- [43] N. C. Nicolaides, G. P. Chrousos, ve E. Charmandari, “Adrenal insufficiency”, içinde *Endotext [Internet]*, MDText. com, Inc., 2017.
- [44] P. C. White ve P. W. Speiser, “Congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency”, *Endocr. Rev.*, c. 21, sayı 3, ss. 245–291, 2000.
- [45] F. Ceccato ve M. Boscaro, “Cushing’s syndrome: screening and diagnosis”, *High Blood Press. Cardiovasc. Prev.*, c. 23, sayı 3, ss. 209–215, 2016.
- [46] H. Nishioka ve S. Yamada, “Cushing’s Disease”, *J. Clin. Med.*, c. 8, sayı 11, s. 1951, 2019.
- [47] A. M. Isidori vd., “The ectopic adrenocorticotropin syndrome: clinical features, diagnosis, management, and long-term follow-up”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 91, sayı 2, ss. 371–377, 2006.
- [48] S. Shahani, R. J. Nudelman, R. Nalini, H.-S. Kim, ve S. L. Samson, “Ectopic corticotropin-releasing hormone (CRH) syndrome from metastatic small cell carcinoma: a case report and review of the literature”, *Diagn. Pathol.*, c. 5, sayı 1, s. 56, 2010.
- [49] L. S. Kirschner vd., “Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I- α regulatory subunit in patients with the Carney complex”, *Nat. Genet.*, c. 26, sayı 1, s. 89, 2000.
- [50] L. Groussin vd., “Molecular analysis of the cyclic AMP-dependent protein kinase A (PKA) regulatory subunit 1A (PRKAR1A) gene in patients with Carney complex and primary pigmented nodular adrenocortical disease (PPNAD) reveals novel mutations and clues for pathophysiology: ”, *Am. J. Hum. Genet.*, c. 71, sayı 6, ss. 1433–1442, 2002.
- [51] L. Holbrook ve R. Brady, “McCune Albright Syndrome”, içinde *StatPearls [Internet]*, StatPearls Publishing, 2019.
- [52] M.-H. Hsieh, C.-C. Chang, M.-C. Lin, ve T.-C. Chang, “Adrenocorticotropin-Independnt Bilateral Adrenal Macronodular Hyperplasia (AIMAH) A Case Report”, *J Intern Med Taiwan*, c. 17, ss. 291–297, 2006.
- [53] D. A. Vassiliadi ve S. Tsagarakis, “Diagnosis and management of primary bilateral macronodular adrenal hyperplasia”, *Endocr. Relat. Cancer*, c. 26, sayı 10, ss. R567–R581, 2019.

- [54] P. Igaz, K. > Rácz, M. Tóth, E. Gláz, ve Z. Tulassay, “Treatment of iatrogenic cushing’s syndrome: Questions of glucocorticoid withdrawal”, *Orv. Hetil.*, c. 148, sayı 5, ss. 195–202, 2007.
- [55] B. Catargi vd., “Occult Cushing’s syndrome in type-2 diabetes”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 88, sayı 12, ss. 5808–5813, 2003.
- [56] M. de Castro ve A. C. Moreira, “Screening and diagnosis of Cushing’s syndrome”, *Arq. Bras. Endocrinol. Metabol.*, c. 51, sayı 8, ss. 1191–1198, 2007.
- [57] M. Omura, J. Saito, K. Yamaguchi, Y. Kakuta, ve T. Nishikawa, “Prospective study on the prevalence of secondary hypertension among hypertensive patients visiting a general outpatient clinic in Japan”, *Hypertens. Res.*, c. 27, sayı 3, ss. 193–202, 2004.
- [58] M. Terzolo vd., “Subclinical Cushing’s syndrome in adrenal incidentalomas”, *Endocrinol. Metab. Clin.*, c. 34, sayı 2, ss. 423–439, 2005.
- [59] M. Zeiger vd., “American Association of Clinical Endocrinologists and American Association of Endocrine Surgeons Medical Guidelines for the Management of Adrenal Incidentalomas”, *Endocr. Pract.*, c. 15 Suppl 1, ss. 1–20, Tem. 2009.
- [60] M. Castro, P. C. L. Elias, A. R. P. Quidute, F. P. B. Halah, ve A. C. Moreira, “Out-patient screening for Cushing’s syndrome: the sensitivity of the combination of circadian rhythm and overnight dexamethasone suppression salivary cortisol tests”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 84, sayı 3, ss. 878–882, 1999.
- [61] A. D. Clements ve C. R. Parker, “The relationship between salivary cortisol concentrations in frozen versus mailed samples”, *Psychoneuroendocrinology*, c. 23, sayı 6, ss. 613–616, 1998.
- [62] D. J. Handelsman ve L. Wartofsky, “Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism”. Oxford University Press, 2013.
- [63] G. Casals ve F. A. Hanzu, “Cortisol Measurements in Cushing’s Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry?”, *Ann. Lab. Med.*, c. 40, sayı 4, ss. 285–296, 2020.
- [64] British Standards Institution, “BS EN ISO 9000:2000 Quality management systems - Fundamentals and vocabulary”, 2000.
- [65] International Organization for standardization, “ISO 15189:2012 - Medical laboratories-Requirements for quality and competence”, *Int. Organ. Stand. ISO*, 2012.
- [66] P. T. Semra Gezer, Gül Güner, “Klinik laboratuvarlarda yöntem seçimi değerlendirilmesi ve laboratuvara uygulanması kurs kitabı”, 2000.

- [67] K. L. Lynch, “CLSI C62-A: A new standard for clinical mass spectrometry”, *Clinical Chemistry*. 2016.
- [68] CLSI Document, “CLSI EP06-A Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline”, *Wayne PAL Clinical and Laboratory Standards institute*. 2003.
- [69] J. Van Loco, M. Elskens, C. Croux, ve H. Beernaert, “Linearity of calibration curves: Use and misuse of the correlation coefficient”, *Accredit. Qual. Assur.*, 2002.
- [70] W. Clarke vd., “Liquid chromatography-mass spectrometry methods; approved guideline”, *C62-A*, c. 34, sayı 16, ss. 1–62, 2014.
- [71] J. F. Pierson-Perry vd., “Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guidance-Second Edition. EP17-A2”, 2012.
- [72] B. S. ISO, “Capability of Detection-Part 1: Terms and definitions”, 1997.
- [73] I. O. for Standardization, “In vitro diagnostic medical devices—measurement of quantities in biological samples—metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials”, *EN ISO*, c. 2003, 2003.
- [74] D. W. Tholen, A. Kallner, J. W. Kennedy, J. S. Krouwer, ve K. Meier, *EP5-A2 Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline — Second Edition*. 2004.
- [75] BIPM, *JCGM 200:2012 International vocabulary of metrology – Basic and general concepts and associated terms (VIM) - 2008 version with minor corrections*. 2012.
- [76] R. Carey vd., “User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline—Second Edition. CLSI document EP15-A2”, *CLSI Doc. EP15-A2*, 2006.
- [77] M. et al. Gary L. Horowitz, MD, Sousan Altaie, PhD, James C. Boyd, “EP28-A3c: Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline—Third Edition”, içinde *Clinical and Laboratory Standards Institute*, 2010.
- [78] CLSI Document, “CLSI EP10-A3-AMD Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline- Third Edition”, *Wayne PAL Clinical and Laboratory Standards institute*. 2014.
- [79] F. and D. A. FDA, *Bioanalytical Method Validation Guidance*. 2018.
- [80] E. R. Kennedy, T. J. Fischbach, R. Song, P. M. Eller, ve S. A. Shulman, “Summary of the NIOSH guidelines for air sampling and analytical method development and evaluation”, içinde *Analyst*, 1996.
- [81] C. Wang vd., “Validation of a testosterone and dihydrotestosterone liquid

- chromatography tandem mass spectrometry assay: interference and comparison with established methods”, *Steroids*, c. 73, sayı 13, ss. 1345–1352, 2008.
- [82] (https://www.sarstedt.com/fileadmin/user_upload/99_Broschueren/Englisch/156_Salivette_GB_0813.pdf), “No Title”.
- [83] Donald H. Chace vd., “Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Proposed Guideline”, 2007.
- [84] H. Spickova, “Development of a novel method for the analysis of acyl carnitine profile using liquid chromatography mass spectrometry”. UiT Norges arktiske universitet, 2019.
- [85] J. A. Ray, M. M. Kushnir, A. L. Rockwood, ve A. W. Meikle, “Analysis of cortisol, cortisone and dexamethasone in human serum using liquid chromatography tandem mass spectrometry and assessment of cortisol: Cortisone ratios in patients with impaired kidney function”, *Clin. Chim. Acta*, 2011.
- [86] P. A. Wayne, “CLSI Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory-Approved Guideline”, *CLSI Doc. EP28-A3C. Third Ed. Available online http://shop.clsi.org/site/Sample_pdf/EP28A3C_sample.pdf (accessed 19 Oct. 2010)*, 2008.
- [87] C. for M. P. for H. Use, “Guideline on bioanalytical method validation. European Medicines Agency EMA”, CHMP/EWP/192217/2009, 1–22.(cited 2011 August 01).
- [88] J. W. Honour, “Development and validation of a quantitative assay based on tandem mass spectrometry”, *Ann. Clin. Biochem.*, c. 48, sayı 2, ss. 97–111, 2011.
- [89] J. Budd vd., “Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Third Edition (EP05-A3)”, *CLSI Doc. EP09-A3*, 2014.
- [90] A. Voller, A. Bartlett, ve D. E. Bidwell, “Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques.”, *J. Clin. Pathol.*, c. 31, sayı 6, ss. 507–520, 1978.
- [91] A. Baid, “ELISA-A mini review”, *Res. Rev. J. Pharm. Anal*, c. 5, ss. 1–8, 2016.
- [92] <https://www.biovendor.com/cortisol-saliva-human-elisa>, “No Title”.
- [93] G. Antonelli, L. Sciacovelli, A. Aita, A. Padoan, ve M. Plebani, “Validation model of a laboratory-developed method for the ISO15189 accreditation: The example of salivary cortisol determination”, *Clin. Chim. Acta*, 2018.
- [94] <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Clinical+and+Interpretive/84225> Son erişim 19.12.2020, “No Title”.
- [95] J. O. Westgard ve S. A. Westgard, “Total analytic error”, *From concept to Appl.*, 2013.

- [96] R. L. Taylor, D. Machacek, ve R. J. Singh, “Validation of a high-throughput liquid chromatography - Tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone”, *Clin. Chem.*, 2002.
- [97] H. Raff ve J. M. Phillips, “Bedtime salivary cortisol and cortisone by LC-MS/MS in healthy adult subjects: evaluation of sampling time”, *J. Endocr. Soc.*, c. 3, sayı 8, ss. 1631–1640, 2019.
- [98] T. Guo, J. Gu, O. P. Soldin, R. J. Singh, ve S. J. Soldin, “Rapid measurement of estrogens and their metabolites in human serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry without derivatization”, *Clin. Biochem.*, 2008.
- [99] S. Mantha, M. F. Roizen, L. A. Fleisher, R. Thisted, ve J. Foss, “Comparing methods of clinical measurement: reporting standards for Bland and Altman analysis”, *Anesth. Analg.*, c. 90, sayı 3, ss. 593–602, 2000.
- [100] B.-A. plot S. E. 20. 12. 202. (medcalc.org, “No Title”.
- [101] https://www.medcalc.org/manual/passing-bablok_regression.php Son Erişim: 20.12.2020, “No Title”.
- [102] X. Liu, “Classification accuracy and cut point selection”, *Stat. Med.*, c. 31, sayı 23, ss. 2676–2686, 2012.
- [103] A. Comlekci vd., “Adrenal incidentaloma, clinical, metabolic, follow-up aspects: single centre experience”, *Endocrine*, c. 37, sayı 1, ss. 40–46, 2010.
- [104] G. Beko vd., “Cutoff values of midnight salivary cortisol for the diagnosis of overt hypercortisolism are highly influenced by methods”, *Clin. Chim. Acta*, c. 411, sayı 5–6, ss. 364–367, 2010.
- [105] M. Vogeser vd., “Multicenter performance evaluation of a second generation cortisol assay”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, c. 55, sayı 6, ss. 826–835, 2017.
- [106] K. Mészáros vd., “Diagnostic performance of a newly developed salivary cortisol and cortisone measurement using an LC–MS/MS method with simple and rapid sample preparation”, *J. Endocrinol. Invest.*, sayı 0123456789, ss. 1–9, 2017.
- [107] G. Antonelli, F. Ceccato, C. Artusi, M. Marinova, ve M. Plebani, “Salivary cortisol and cortisone by LC–MS/MS: validation, reference intervals and diagnostic accuracy in Cushing’s syndrome”, *Clin. Chim. acta*, c. 451, ss. 247–251, 2015.
- [108] M. Mezzullo vd., “Validation of an LC–MS/MS salivary assay for glucocorticoid status assessment: evaluation of the diurnal fluctuation of cortisol and cortisone and of their association within and between serum and saliva”, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, c. 163, ss. 103–112, 2016.

- [109] P. C. L. Elias, E. Z. Martinez, B. F. C. Barone, L. M. Mermejo, M. Castro, ve A. C. Moreira, “Late-night salivary cortisol has a better performance than urinary free cortisol in the diagnosis of Cushing’s syndrome”, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, c. 99, sayı 6, ss. 2045–2051, 2014.
- [110] G. Antonelli, A. Padoan, A. Aita, L. Sciacovelli, ve M. Plebani, “Verification of examination procedures in clinical laboratory for imprecision, trueness and diagnostic accuracy according to ISO 15189:2012: A pragmatic approach”, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 2017.
- [111] C. E. Martinelli, S. L. Sader, E. B. Oliveira, J. C. Daneluzzi, ve A. C. Moreira, “Salivary cortisol for screening of Cushing’s syndrome in children”, *Clin. Endocrinol. (Oxf)*., c. 51, sayı 1, ss. 67–71, 1999.
- [112] F. Ceccato vd., “Daily salivary cortisol and cortisone rhythm in patients with adrenal incidentaloma”, *Endocrine*, c. 59, Eyl. 2017.
- [113] Y. Tateishi, R. Kouyama, M. Mihara, M. Doi, T. Yoshimoto, ve Y. Hirata, “Evaluation of salivary cortisol measurements for the diagnosis of subclinical Cushing’s syndrome”, *Endocr. J.*, c. 59, sayı 4, ss. 283–289, 2012.
- [114] H. Raff, P. Homar, ve E. Burns, “Comparison of two methods for measuring salivary cortisol [7]”, *Clin. Chem.*, c. 48, ss. 207–208, Şub. 2002.
- [115] T. C. Friedman, E. Zuckerbraun, M. L. Lee, M. S. Kabil, ve H. Shahinian, “Dynamic pituitary MRI has high sensitivity and specificity for the diagnosis of mild Cushing’s syndrome and should be part of the initial workup”, *Horm. Metab. Res.*, c. 39, sayı 06, ss. 451–456, 2007.
- [116] B. Masserini vd., “The limited role of midnight salivary cortisol levels in the diagnosis of subclinical hypercortisolism in patients with adrenal incidentaloma”, *Eur. J. Endocrinol.*, c. 160, sayı 1, ss. 87–92, 2009.
- [117] S. Palmieri vd., “The role of salivary cortisol measured by liquid chromatography–tandem mass spectrometry in the diagnosis of subclinical hypercortisolism”, *Eur. J. Endocrinol.*, c. 168, sayı 3, ss. 289–296, 2013.
- [118] I. Kuzu, S. S. Zuhur, N. Demir, G. Aktas, F. Y. Ozturk, ve Y. Altuntas, “The diagnostic value of late-night salivary cortisol for diagnosis of subclinical Cushing’s syndrome”, *Endokrynol. Pol.*, c. 67, sayı 5, ss. 487–492, 2016.
- [119] T. ENDOKRİNOLOJİ ve 2018 METABOLİZMA DERNEĞİ, “ADRENAL VE GONADAL HASTALIKLAR KILAVUZU”.

8. EKLER

Ek 1: Etik Kurul Belgesi

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2018/08-34	Tarih:29.03.2018				
	Yard.Doç.Dr.Gamze TUNA'nın sorumlusu olduğu "Hiperkortizoleminin Dışlanması Gereken Hastalarda İmmunoassay ve Tandem Kütle Spektrometri Yöntemleri ile Ölçülen Tükürük Kortizolünün Tanısal Değeri ve Diüurnal Ritmi Ortaya Koymadaki Başarısının Değerlendirilmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.					
ETİK KURUL BİLGİLERİ						
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy Klinik Uygulamaları Kılavuzu					
ETİK KURUL ÜYELERİ						
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Gül ERGÖR (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr. Mehmet Refik MAS	Geriatri	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sülen SARIOĞLU	Patoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayhan ABACI	Pediyatrik Endokrinoloji ve Metabolizma Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.M.Aylin ARICI	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Murat BEKTAŞ	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	DEU Hemşirelik Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Hemşireliği	Erkek	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Yasemin SOYSAL	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	Sağlık Bilimleri Enstitüsü Moleküler Tıp Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D.	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Karar Formu

Ek 2: Araştırma Amaçlı Çalışma için Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Sayın gönüllü,

“Hiperkortizoleminin Dışlanması Gereken Hastalarda İmmunoassay ve Tandem Kütle Spektrometri Yöntemleri ile Ölçülen Tükürük Kortizolünün Tanısal Değeri ve Diürenal Ritmi Ortaya Koymadaki Başarısının Değerlendirilmesi” başlıklı araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini ve olası yararlarını anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız.

Çalışmamızın amacı, Adrenal Cushing Sendromu ve Subklinik Cushing Sendromu tanılarının konulmasında tükürük kortizolünün, özellikle ciddi ayırıcı tanı problemleri oluşturan koşullarda, belirleyici rolünün açığa çıkarılması ve gün içerisinde belirli saatlerde alınan tükürük örneklerinde ölçülen kortizol sonuçlarının günlük ritmi göstermedeki etkinliğinin incelenmesidir. Katılımınız durumunda sizden sadece bir günde 08.00, 16.00 ve 24.00 saatlerinde tükürük örnekleri alınacaktır. Tükürük örnekleri toplama işlemi hastaneye gelmeyi gerektirmeyen, ev ortamında tükürük toplama aparatı ile yapabileceğiniz acısız ve diş fırçalamak kadar basit bir işlemdir. Bu çalışma ile sizden alınan tükürük numunelerinde “stres hormonu” olarak bilinen kortizol ölçümü gerçekleştirilecektir.

Çalışmaya katılmakla parasal bir yük altına girmeyeceksiniz ve bu çalışma bağlı bulunduğunuz sosyal güvenlik kurumuna da ek bir mali yükümlülük getirmeyecektir. Tüm çalışma masrafları, araştırma bütçesinden karşılanacaktır. Çalışmaya katılmayı kabul etmeniz durumunda size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu çalışmada sizin için beklenen bir rahatsızlık ya da risk söz konusu değildir. Çalışma doktorunuz, araştırmada yer alan diğer araştırmacılar kişisel bilgilerinizi araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak, kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Çalışmanın sonunda size ait sonuçlar hakkında bilgi istemeye hakkınız olduğu gibi böyle bir bilgiyi öğrenmeyi reddetme hakkınız da vardır. Bu bilgiyi sizin dışınızda biriyle paylaşmamız da ancak sizin izninizle olacaktır.

Bu çalışmaya katılmayı reddetme hakkına sahiptir. Reddettiğiniz takdirde de hastalık takibiniz olağan şekilde devam edecektir. Eğer çalışmaya katılmaya karar verirseniz imzalamanız için size bu “Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu” verilecektir. Çalışmadan herhangi bir zamanda, mazeret belirtmeksizin ayrılmakta özgürsünüz.

(Katılımcının/Hastanın Beyanı)

Yukarıda, gönüllüye araştırmadan önce verilmesi gereken bilgileri okudum. Kendi başıma belirli bir düşünme süresinden sonra, tıbbi amaç ile gerçekleştirilecek olan bu araştırmaya “katılımcı” olarak katılma kararı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. Aynı şekilde araştırmacı da beni çalışma dışı bırakabilir.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmadım. Eğer katılmayı reddedersem, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye bir zarar getirmeyeceğini biliyorum. Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Katılımcı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Görüşme tanığı

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Katılımcı ile görüşen hekim

Adı, soyadı:

Adres:

Tel. :

Tarih:

İmza:

Bu çalışma için alınan tükürük örneklerinin daha sonra farklı bir bilimsel araştırma amacıyla kullanılmasına:

() izin veriyorum

() izin vermiyorum



Ek 3: Tükürük toplama tüpü kısa kullanım kılavuzu



DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

Tıp Fakültesi Endokrinoloji AD.



Salivette Tükürük Toplama Tüpü Kullanımı



1. Tüpün kapağı açılır



2. Tüpün içindeki pamuk çıkartılır



3. Pamuk ağızda 2 dakika boyunca hafifçe çiğnenir



4. Pamuk geri yerleştirilir



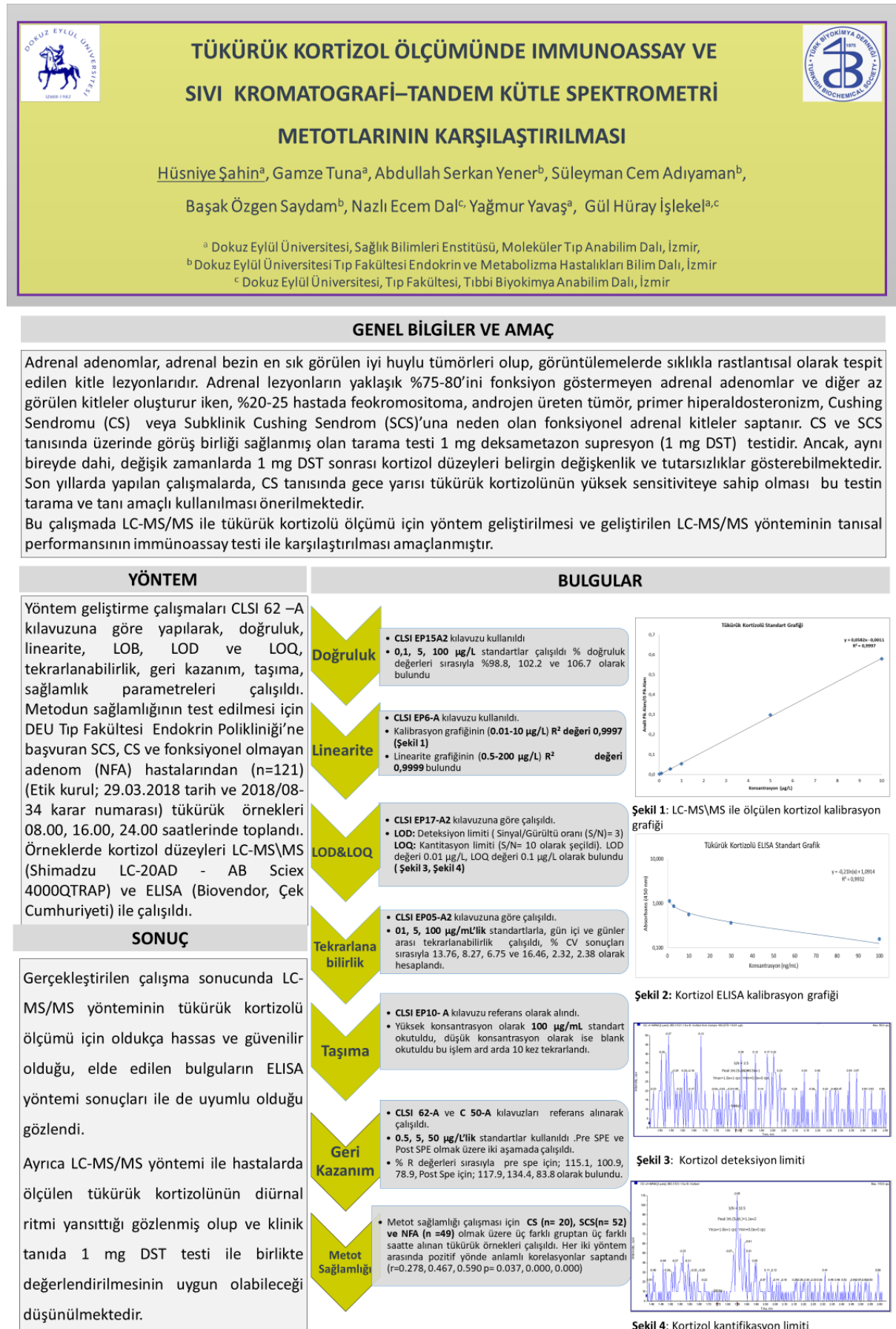
5. Tüpün kapağı kapatılır.

İşlem bitince tüpün üzerine saat yazılır.

LÜTFEN DİKKAT: Tükürük , sabah dişler fırçalanmadan ve aç karnına , gün içinde ise yemek yedikten ya da birşeyler içtikten 3 saat sonra alınmalıdır. (Su içilebilir)

Size 3 adet numune toplama tüpü verilecektir, **sabah 08:00 - öğlen 16:00** ve **gece 24:00** olmak üzere 3 kez tükürük numunesi toplanması gerekmektedir.

Ek 4: Poster sunumu



EK 5: ÖZGEÇMİŞ**1. GENEL BİLGİLER**

Düzenleme Tarihi:	20.12.2020		
Adı Soyadı:	Hüsniye Şahin		
Yazışma Adresi:			
Doğum Tarihi ve Yeri:			
Yabancı Dil	İngilizce		
ALES Puanı			
Askerlik Durumu	-		
Medeni Durum			
Tel:		GSM:	
E-Posta:		Faks:	-

2. EĞİTİM

Öğrenim Dönemi	Derece	Üniversite/Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı
2004- 2008		Muğla Üniversitesi/Fen-Edebiyat Fakültesi	Biyoloji
2014-2021		Dokuz Eylül Üniversitesi	Moleküler Tıp

3. MESLEKİ DENEYİM

Görev Dönemi	Unvan	Kurum	Bölüm
2011-Halen	Uygulama Uzmanı	Roche	Satış sonrası destek
2009-2011	Uygulama Uzmanı	El-med medikal	Aplikasyon

4.BİLDİRİLER**Uluslararası bilimsel toplantılarda sunulan ve bildiri kitaplarında basılan bildiriler**

31. Ulusal Türk Biyokimya Kongresi Poster sunumu (18-20 Aralık 2020 Sanal Kongre)

5. Dinleyici Olarak Katıldığı Bilimsel Toplantılar

Tarih	Kurs/Kongre
Ekim 2014	DNA Hasarı, onarımı ve proteomiks kursu
18-20 aralık 2020	31. Ulusal Biyokimya Kongresi