



T.C.

GİRESUN ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**BİYOYARARLI VE SERBEST TESTOSTERON İÇİN
HESAPLAMALARDA KULLANILAN ALGORİTMALAR İLE
DENGİ DİYALİZİ/KEMİLÜMINESANS İMMÜNÖLÇÜM
YÖNTEMİ ARASINDAKİ FARKLARIN METABOLİK
SENDROM PROFİLLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ**

Arş. Gör. Dr. Engin IŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman

Dr. Öğr. Üyesi Ömer EMECEN

Prof. Dr. Murat USTA

Giresun-2024

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

BİYOYARARLI VE SERBEST TESTOSTERON İÇİN
HESAPLAMALARDA KULLANILAN ALGORİTMALAR İLE
DENGİ DİYALİZİ/KEMİLÜMİNESANS İMMÜNÖLÇÜM
YÖNTEMİ ARASINDAKİ FARKLARIN METABOLİK
SENDROM PROFİLLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ

Arş. Gör. Dr. Engin IŞIK

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman
Dr. Öğr. Üyesi Ömer EMECEN

Prof. Dr. Murat USTA

Giresun-2024

TEZ BİLDİRİMİ

Tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu tezin yazılmasında bilimsel etik kurallarına uyulduğunu, başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunulduğunu, tezin herhangi bir kısmının bu üniversite veya başka bir üniversitedeki başka bir tez çalışması olarak sunulmadığını beyan ederim.

09.09.2024

Arş. Gör. Dr. Engin IŞIK
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA A.D.

T.C.
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Arş.Gör.Dr. Engin IŞIK tarafından Dr.Öğr. Üyesi Ömer EMECEN ve Prof.Dr. Murat USTA danışmanlığında hazırlanan “BİYOYARARLI VE SERBEST TESTOSTERON İÇİN HESAPLAMALARDA KULLANILAN ALGORİTMALAR İLE DENGİ DİYALİZİ/KEMİLÜMİNESANS İMMÜNÖLÇÜM YÖNTEMİ ARASINDAKİ FARKLARIN METABOLİK SENDROM PROFİLLERİ İLE DEĞERLENDİRİLMESİ” başlıklı bu çalışma jürimiz tarafından 09.09.2024 tarihinde yapılan sınav ile Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof.Dr. MURAT USTA
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Üye: Prof.Dr. SEMBOL YILDIRMAK
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

Üye: Dr.Öğr. Üyesi ÖMER EMECEN
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

ONAY

Giresun Üniversitesi BAP Koordinasyon Birimi tarafından SAĞ-BAP-C-301123-61 numaralı proje olarak desteklenen bu tez, Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanlığınca belirlenen ve yukarıda adları yazılan jüri üyeleri tarafından uygun görülmüştür.

09.09.2024

Prof.Dr. MURAT USTA
GİRESUN ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA A.D.

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitim sürecimin tamamında engin bilgi ve tecrübeleri ile yoluma ışık tutan, bu süreçte yardımını ve desteğini tam özverilikle hiç esirgemeyen Sayın hocam Prof. Dr. Murat USTA'ya,

Meslek hayatımda değerli bilgi ve tecrübelerinden her daim yararlanacağım, akademik ve uzmanlık eğitim sürecime yön veren Sayın hocam Prof. Dr. Sembol YILDIRMAK'a,

Asistanlık sürecimde enerjisi ve mesleki bilgi ve deneyimi ile beni sürekli motive eden, tez sürecinde bilgi ve eleştirileri ile destek olan Sayın hocam Dr. Öğretim Üyesi Ömer EMECEN'e,

Tez sürecinde yardımlarını ve güleryüzlerini esirgemeyen Sayın Prof. Dr. Oğuz DİKBAŞ'a, Sayın Dr. Öğretim Üyesi Mustafa YAKARIŞIK'a ve Sayın Uzman Dr. Ali TÜREDİ'ye,

Beraber çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarıma ve Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı ailesine,

Hayatım boyunca desteklerini hissettiğim, bugünlere gelmemde büyük emekleri olan başta annem Nurten IŞIK'a ve babam Zekeriya IŞIK'a,

Her daim beraber yol aldığım, desteğini hissettiğim, bu süreçte de yanımda olan biricik eşim Tuğçe IŞIK'a,

Ve varlığından güç aldığım sevgili oğlum Ege IŞIK'a

teşekkürlerimi sunarım...

Dr. Engin IŞIK

Eylül 2024

ÖZGEÇMİŞ

2011-2017 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi'nde tıp eğitimini aldı. 2017 yılında Giresun Prof.Dr. A. İlhan Özdemir Eğitim ve Araştırma Hastanesi Acil Tıp Kliniği'nde pratisyen hekim olarak göreve başladı. 2018 yılında Giresun Tirebolu 3 No'lu Aile Sağlığı Merkezi'nde Aile Hekimi olarak görev yaptı. 2018-2019 yılında Ondokuz Mayıs Üniversitesi Tıp Fakültesi Göğüs Hastalıkları A.D.'de asistan hekim olarak görev yaptı. 2020 yılında tekrar girdiği Tıpta Uzmanlık Sınavı'nda Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.'de asistan hekim olarak görev yapmaya hak kazandı ve halen ihtisasına devam etmektedir. Yabancı dili İngilizcedir.

Dr. Engin IŞIK

Giresun Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Araştırma Görevlisi Doktor

ÖZET

Amaç: Bu çalışmada 20-49 yaş arası erkek gönüllülerde serbest testosteron (sT) ve biyoyararlı testosteron (bioT) hesaplamalarında kullanılan algoritmaların sonuçları ile sT analizlerinde denge diyaliz yöntemi sonuçlarının metabolik sendrom profilleri ile değerlendirilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Dahil etme ve dışlama kriterlerine uygun 188 erkek gönüllü için değerlendirmeler yapıldı. sT ve bioT hesaplamalarında Vermeulen ve ark. ($sT_{\text{Vermeulen}}$, $bioT_{\text{Vermeulen}}$), Sodergard ve ark. ($sT_{\text{Sodergard}}$, $bioT_{\text{Sodergard}}$), Emadi-Konjin ve ark. ($sT_{\text{Emadi-Konjin}}$, $bioT_{\text{Emadi-Konjin}}$), Morris ve ark. ($bioT_{\text{Morris}}$), Ly ve ark. (sT_{Ly}) ile Wheeler (sT_{Wheeler})'in bildirdiği algoritmalar kullanıldı. Denge diyalizi sonrası elektrokemilüminesans immünölçüm (ECLIA) metodu ile serum serbest testosteron ($DDsT_{\text{ECLIA}}$) düzeylerinin belirlenmesinde saf politetrafloroetilen malzemeden yapılan 96-kuyucuklu bloklar, *regenerated-cellulose* membranlar (10kDa) ve HEPES tamponu kullanıldı.

Bulgular: Bu çalışmada yaştan karıştırıcı etkisinden arındırılmış gruplar için metabolik sendromu olan grupta metabolik sendromu olmayan gruba kıyasla $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ ve $bioT_{\text{Emadi-Konjin}}$ hariç diğer beş algoritmalar için hesaplanan sT (nmol/L) ve bioT (nmol/L) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamı düşük iken ($p<0,05$), yine beş algoritmalar için hesaplanan sT (%) ve bioT (%) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamı yüksekti ($p<0,05$). Metabolik sendromu olmayan gruba kıyasla metabolik sendromu olan grupta $DDsT_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklı değil iken ($p=0,225$), $DDsT_{\text{ECLIA}}$ (%) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti ($p=0,038$). Metabolik sendromu olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $sT_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), sT_{Wheeler} (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında, metabolik sendromu olan grupta minimal düşüşler olmakla beraber, pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı ($r>0,910$ ve $p<0,0001$). Ek olarak, metabolik sendromu olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ile $DDsT_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon saptanırken ($r=0,630$, $p<0,0001$), metabolik sendromu olan grupta pozitif yönde zayıf derecede korelasyon ($r=0,393$, $p<0,0001$) saptandı. Metabolik sendromu olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (%) ile $DDsT_{\text{ECLIA}}$ (%) arasında belirlenen korelasyon katsayılarında ($r=0,630$, $p<0,0001$)

metabolik sendromu olan grupta belli derecede düşmesine rağmen ($r=0,564$, $p<0,0001$) her iki grupta bu değişkenler arasında pozitif yönde orta derecede korelasyonlar saptandı.

Sonuç: Bu sonuçlar sT ve bioT için nmol/L düzeyleri ile beraber % değerlendirmelerinin de önemini vurgulamaktadır. Ancak, klinik takipte sT analizlerinde kullanılan immünölçüm yöntemlerinin izlenebilirlikleri için farklı referans materyaller kullanılması sT (%) düzeylerini belirlemede tutarsızlıklara yol açabileceğini belirtmek önemlidir. Bunun ışığında, bu çalışmada önerilen, bazal total testosteron ve denge diyalizi sonrası serbest testosteron analizlerinde aynı kemilüminesans immünölçüm yönteminin kullanıldığı prosedürü tanımlıyoruz. Bu prosedür umut verici bir çözüm sunmaktadır, ancak gelecekte potansiyelini ve sınırlamalarını ayrıntılı olarak anlamak için daha fazla çalışmaya ihtiyaç olduğu açıktır.

Anahtar Kelimeler: biyoyararlı testosteron, serbest testosteron, denge diyaliz, kemilüminesans immünölçüm, metabolik sendrom

ABSTRACT

Objective: This study aimed to evaluate the algorithms used to calculate free testosterone (fT) and bioavailable testosterone (bioT) and the equilibrium dialysis method in fT analyses with metabolic syndrome profiles in male volunteers aged 20-49.

Materials and Methods: Evaluations were performed for 188 male volunteers who met the inclusion and exclusion criteria. The algorithms reported by Vermeulen et al. (fT_{Vermeulen}, bioT_{Vermeulen}), Sodergard et al. (fT_{Sodergard}, bioT_{Sodergard}), Emadi-Konjin et al. (fT_{Emadi-Konjin}, bioT_{Emadi-Konjin}), Morris et al. (bioT_{Morris}), Ly et al. (fT_{Ly}), and Wheeler (fT_{Wheeler}) were used in the calculations of fT and bioT. In determining of serum free testosterone (EDfT_{ECLIA}) levels by electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method after equilibrium dialysis, 96-well blocks made of pure polytetrafluoroethylene material, regenerated-cellulose membranes (10kDa), and HEPES buffer were used.

Results: In this study, for the age-adjusted groups, the mean values of fT (nmol/L) and bioT (nmol/L) calculated for the other five algorithms except fT_{Emadi-Konjin} and bioT_{Emadi-Konjin} were statistically significantly lower in the group with metabolic syndrome compared to the group without metabolic syndrome ($p < 0.05$), while the mean values of fT (%) and bioT (%) calculated for the five algorithms were statistically significantly higher ($p < 0.05$). While the mean values of EDfT_{ECLIA} (nmol/L) were not statistically significantly different in the group with metabolic syndrome compared to the group without metabolic syndrome ($p = 0.225$), the mean values of EDfT_{ECLIA} (%) were statistically significantly higher ($p = 0.038$). In the group without metabolic syndrome, robust positive correlations were found between fT_{Vermeulen} (nmol/L) and separately fT_{Sodergard} (nmol/L), fT_{Wheeler} (nmol/L) and fT_{Ly} (nmol/L), although there were minimal decreases in the group with metabolic syndrome ($r > 0.910$ and $p < 0.0001$). In addition, in the group without metabolic syndrome, a moderate positive correlation was found between fT_{Vermeulen} (nmol/L) and EDfT_{ECLIA} (nmol/L) ($r = 0.630$, $p < 0.0001$), while in the group with metabolic syndrome, a weak positive correlation ($r = 0.393$, $p < 0.0001$) was found. In the group without metabolic syndrome, although the correlation coefficients determined between fT_{Vermeulen} (%) and EDfT_{ECLIA} (%)

($r=0.630$, $p<0.0001$) decreased to a certain extent in the group with metabolic syndrome ($r=0.564$, $p<0.0001$), moderate positive correlations were found between these variables in both groups.

Conclusion: These results emphasize the importance of % evaluations along with nmol/L levels for fT and bioT. However, it is important to note that immunoassay methods used in fT analyses in clinical follow-up may lead to inconsistencies in determining fT (%) levels due to the use of different reference materials for their traceability. In light of this, we introduce the procedure proposed in this study, using the same chemiluminescence immunoassay method to analyse basal total testosterone and post-equilibrium free testosterone. This procedure offers a promising solution, but it's clear that further studies are needed to understand its potential and limitations in the future exhaustively.

Keywords: bioavailable testosterone, free testosterone, equilibrium dialysis, chemiluminescence immunoassay, metabolic syndrome

İÇİNDEKİLER

sayfa

TEZ BİLDİRİMİ.....	i
TEZ KABUL VE ONAY BELGESİ.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZGEÇMİŞ.....	iv
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
İÇİNDEKİLER.....	ix
SİMGELER.....	xv
KISALTMALAR.....	xvi
TABLolar.....	xxi
ŞEKİLLER.....	xxiv
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. Androjenler.....	5
2.2. Testosteron.....	5
2.2.1. Testosteron Yapımının LH İle Düzenlenmesi.....	7
2.2.2. Ön Hipofiz FSH ve LH Salgısının Testosteron Tarafından Baskılanması – Testosteron Salgısının Negatif Feedback İle Kontrolü.....	7
2.2.3. Testosteron Sentezi.....	9

2.3.3.1. Testiküler Steroidogenez.....	9
2.2.4. Testosteronun İşlevleri ve Süreç.....	10
2.2.4.1. Fetal Gelişim Sürecinde Testosteronun İşlevleri.....	12
2.2.4.1.1. Testosteronun Testislerin İnmesindeki Etkisi.....	12
2.2.4.2. Testosteronun Erişkinde Primer ve Sekonder Seks Özelliklerinin Gelişimine Etkisi.....	12
2.2.4.2.1. Testosteronun Vücut Kılıplarının Dağılımına Etkileri.....	13
2.2.4.2.2. Alopesi	13
2.2.4.2.3. Libido	13
2.2.4.2.4. Ses.....	13
2.2.4.2.5. Testosteronun Kas Kütlesine Etkisi.....	14
2.2.4.2.6. Testosteronun İskelet Sistemine Etkisi	14
2.2.4.3. Testosteronun Epidermal Etkileri.....	15
2.2.4.4. Testosteronun Metabolizma Üzerine Etkisi.....	15
2.2.4.5. Testosteronun Eritrositler Üzerine Etkisi.....	15
2.2.4.6. Testosteronun Elektrolit ve Su Dengesi Üzerine Etkisi.....	16
2.2.5. Testosteron Etkisinin Temel İntraselüler Mekanizması.....	16
2.2.6. Testosteronun Yıkımı ve Atılımı.....	17
2.3. Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG).....	17
2.4. Albümin.....	18
2.5. Testosteron, SHBG ve Albümin İlişkisi.....	21

2.6. Serbest Testosteron.....	22
2.6.1. Fizyoloji.....	22
2.6.2. Düşük Serbest Testosteron İçin Eşik Değerler.....	22
2.7. Serbest ve Total Testosteronun Klinik Önemi.....	22
2.8. Biyoyararlı Testosteron (bioT).....	23
2.9. Serbest Androjen İndeksi (FAI).....	24
2.10. Hesaplanan Serbest Testosteron.....	25
2.11. Hormon Ölçüm Yöntemleri.....	25
2.11.1. Analiz Öncesi Hususlar.....	28
2.11.2. Analizin Zorlukları ve İmmünolojik Testlerin Avantajları ve Sınırlamaları.....	29
2.11.3. Kütle Spektrometrisinin Katkısı.....	30
2.11.3.1. Kütle Spektrometrisinin Daha Yararlı Olduğu Klinik Senaryolar.....	33
2.11.3.1.1. Hassasiyet: Düşük konsantrasyonlarda steroid ölçümü.....	33
2.11.4. Testosteron Testi.....	34
2.11.4.1. Elecsys Testosterone II İmmünölçümü.....	36
2.11.4.1.1. Test Prensipleri.....	36
2.11.5. Serbest Testosteronun Ölçümü.....	37
2.11.5.1. Serbest Testosteron Hesaplamasında Kullanılan Algoritmalar.....	38
2.11.5.1.1. Vermeulen ve ark. ve Sodergard ve ark.'nin serbest testosteron (sT) hesaplaması için denklemi ile Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ve Emadi-Konjin ve ark.'ın bioT hesaplaması için denklemi.....	39
2.11.5.1.2. Morris ve ark.'ye göre bioT için hesaplama denklemi.....	40
2.11.5.1.3. Ly ve ark.'ye göre serbest testosteron için hesaplama denklemi.....	40

2.11.5.1.4. Wheeler'e göre serbest testosteron için hesaplama denklemleri.....	41
2.11.5.2. Serbest Testosteron Direkt Ölçüm.....	41
2.11.5.2.1. Equilibrium Diyaliz (Denge Diyaliz).....	42
2.12. Metabolik Sendrom.....	47
2.12.1. Metabolik Sendromun Tanımı ve Tarihçesi.....	47
2.12.2. İnsülin Direnci.....	47
2.12.3. Santral Obezite.....	48
2.12.4. Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri.....	49
2.12.4.1. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) Yetişkin Tedavi Paneli (ATP) III Kriterleri.....	49
2.12.4.2. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) Tanı Kriterleri.....	50
2.12.4.3. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Tanı Kriterleri.....	52
2.12.4.4. Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE) Tanı Kriterleri.....	52
2.12.5. Metabolik Sendrom ve Testosteron İlişkisi.....	53
3. MATERYAL ve METOT.....	59
3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Gönüllüler.....	59
3.2. Total Testosteron ve SHBG Analizleri.....	60
3.3. Serbest Testosteron ve bioT Hesaplamalarında Kullanılan Algoritmalar.....	62
3.4. Denge Diyaliz Metodu.....	65
3.4.1. Denge Diyaliz Ekipmanları.....	65
3.4.1.1. 96-Kuyucuklu Denge Diyaliz Bloğu.....	65
3.4.1.2. Denge Diyaliz Membranı.....	66

3.4.1.3. Diyaliz Tamponu.....	66
3.4.2. Denge Diyalizi Çalışma Prosedürü.....	69
3.4.3. Denge Diyalizi Metot Validasyonu.....	70
3.4.3.1. Denge Diyalizi Doğrulama Deneyi.....	70
3.4.3.2. Olası 2-bromoestradiol İnterferansı İçin Önerilen Prosedürler.....	70
3.4.3.3. Denge Diyalizi İçin Standart Koşulların Belirlenmesi.....	71
3.4.3.4. Presizyon Çalışmaları.....	72
3.4.3.5. Metot Karşılaştırma Çalışmaları.....	72
3.5. İstatistiksel Analizler.....	72
4. SONUÇLAR.....	74
4.1. Denge Diyalizi Metodu İçin Yapılan Validasyon Çalışmaları Sonuçları.....	74
4.1.1. Denge Diyalizi İçin Standart Koşulların Belirlenmesi Sonuçları.....	74
4.1.2. Presizyon Çalışma Sonuçları.....	79
4.1.3. Metot Karşılaştırma Çalışma Sonuçları.....	81
4.2. Denge Diyalizi Metodu İçin Esas Alınan Aplikasyon Bilgileri.....	88
4.3. Denge Diyaliz Uygulamaları ve Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Elde Edilen Serbest Testosteron ve bioT Verilerinin MetS Profilleri İle Değerlendirme Sonuçları.....	89
5. TARTIŞMA.....	108
6. SONUÇ.....	125
7. KAYNAKÇA.....	127
8. EKLER.....	144
EK-A: Hasta Veri Toplama Formu.....	144

EK-B: Etik Kurul Onayı.....	145
EK-C: Bilgilendirilmiş Olur Formu.....	146
EK-D: Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kurum İzni.....	147
EK-E: Giresun İl Sağlık Müdürlüğü Kurum İzni.....	148



SİMGELER

N : Kişi Sayısı

r : Pearson Korelasyon Katsayısı

rho : Spearman Korelasyon Katsayısı

p : Olasılık

% : Yüzdelik



KISALTMALAR

T	: Testosteron
TT	: Total testosteron
sT	: Serbest testosteron
bioT	: Biyoyararlı testosteron
DHT	: Dihidrotestosteron
E2	: Estradiol
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DHEA-S	: Dehidroepiandrosteron-sülfat
SHBG	: Seks Hormon Bağlayan Globulin
GnRH	: Gonadotropin salgılatıcı hormon
FSH	: Folikül stimulan hormon
LH	: Lüteinize edici hormon
HCG	: insan koryonik gonadotropini
HPT	: Hipotalamik - pitüiter – testiküler
INR	: Uluslararası normalleştirilmiş oran
CLIA	: Kemilüminessans immünassay
ECLIA	: Elektrokemilüminessans immünassay
FIA	: Floresans immünassay
EIA	: Enzim immünassay
RIA	: Radyoimmünassay

LC-MS	: Sıvı kromatografisi-Kütle Spektrometrisi
UF	: Ultrafiltrasyon
LC-MS	: Likid kromatografi - Kütle spektrometri
IDGC-MS	: İzotop dilüsyon / Gaz kromatografisi – Kütle spektrometri
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
LDL-K	: Düşük Yoğunluklu Lipoprotein - Kolesterol
HDL-K	: Yüksek Yoğunluklu Lipoprotein Kolesterol
LPL	: Lipoprotein Lipaz
INR	: Uluslararası Normleştirilmiş Oran
PCOS	: Polikistik Over Sendromu
cP	: Kapiller Membran Basıncı
cHP	: Kapiller Hidrostatik Basıncı
cOP	: Kapiller Onkotik Basıncı
iOP	: İnterstisyel Onkotik Basıncı
iHP:	: İnterstisyel Hidrostatik Basıncı
KB	: Kan Basıncı
KVH	: Kardiyovasküler Hastalık
Tip2-DM	: Tip2 diabetes Mellitus
TRT	: Testosteron Replasman Terapisi
ADT	: Androjen Deprivasyon Terapisi

APG	: Açlık Plazma Glukozu
SAAG	: Serum asit albümin gradiyenti
FAI	: Serbest Androjen İndeksi
SAAG	: Serum – Asit Albümin Gradiyenti
WHO, DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
CDC	: Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
CLSI	: Klinik Laboratuvar Standartları Enstitüsü
WSLH	: Wisconsin State Laboratory of Hygiene
NCEP ATPIII	: Ulusal Kolesterol Eğitim Programı Üçüncü Yetişkin Tedavi Paneli
IDF	: Uluslararası Diyabet Federasyonu
AACE	: Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği
IOTF	: Uluslararası Obezite Görev Gücü
EMAS	: Avrupa Erkek Yaşlanma Çalışması
EGIR	: Avrupa İnsülin Direnci Çalışma Grubu
BAP	: Bilimsel Araştırma Projesi
ANOVA	: Varyans Analizi
ANCOVA	: Kovaryans analizi
LoD	: Saptama Limiti
LoQ	: Limit of Quantitation
CVI	: Birey içi Biyolojik Varyasyon Katsayısı
CVG	: Bireyler arası Biyolojik Varyasyon Katsayısı

II	: Bireysellik İndeksi
RCV	: Referans Değişim Değeri
BMI, VKİ	: Vücut Kitle Endeksi
MetS	: Metabolik Sendrom
SS	: Standart Sapma
CV	: Değişkenlik Katsayısı
AUC	: Eğri Altında Kalan Alan
TAH	: Total Analitik Hata
NIST	: Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü
SRM	: Standart Referans Materyal
NIBSC	: Ulusal Biyolojik Standartlar ve Kontrol Enstitüsü
IFCC	: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
EMAS	: Avrupa Erkek Yaşlanma Çalışması
Ve ark.	: Ve arkadaşları
sT_{Vermeulen}	: Vermeulen ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron
sT_{Sodergard}	: Sodergard ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron
sT_{Emadi-Konjin}	: Emadi-Konjin ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron
sT_{Wheeler}	: Wheeler ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron

sT_{Ly} : Ly ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron

sT_{Morris} : Morris ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron

bioT_{Vermeulen} : Vermeulen ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış biyoyararlı testosteron

bioT_{Sodergard} : Sodergard ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış biyoyararlı testosteron

bioT_{Emadi-Konjin}: Emadi-Konjin ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış serbest testosteron

bioT_{Morris} : Morris ve ark.'ın yayımladığı denklemle hesaplanmış biyoyararlı testosteron

sT_{CLIA} : MAGLUMI serbest testosteron kiti ile direkt ölçülen serbest testosteron sonuçları

DDsT_{ECLIA} : Denge diyalizi sonrası Elecsys Testosterone II (ECLIA) kiti ile elde edilen serbest testosteron sonuçları

TABLÖLAR

Tablo 1: Ticari Olarak Elde Edilebilen Denge Diyaliz Aparatları.....	44
Tablo 2a: Ölçüm Teknikleri Özeti (Total testosteron, bioT, FAI).....	45
Tablo 2b: Ölçüm Teknikleri Özeti (Serbest Testosteron).....	46
Tablo 3: Metabolik sendromun NCEP ATP III klinik tanımlanması.....	49
Tablo 4: IDF Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri.....	51
Tablo 5: IDF'ye göre bel çevresi için etnik spesifik değerler	51
Tablo 6: Metabolik Sendrom için DSÖ Klinik Kriterleri	52
Tablo 7: İnsülin Direnci Sendromu Tanısı için AACE Klinik Kriterleri.....	53
Tablo 8: Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ve Emadi-Konjin ve ark.'nin bildirdikleri algoritmalara göre serbest testosteron (sT) ve bioT denklemleri	62
Tablo 9: Vermeulen ve ark. ile Sodergard ve ark.'nin bildirdikleri yaklaşımın dışında Emadi-Konjin ve ark., Morris ve ark., Ly ve ark. ve Wheeler'ın bildirdiği 4 farklı algoritma.....	63
Tablo 10: Önerilen algoritmalar için bioT ve serbest testosteron (sT) hesaplamaları.....	64
Tablo 11: Farklı moleküller için tasarlanan denge diyalizi çalışmalarında kullanılan tamponlar.....	68
Tablo 12: Prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar sonrası yapılan denge diyalizi analizleri ile elde edilen serbest testosteron düzeyleri.....	75
Tablo 13: Oda sıcaklığında hazırlanan pH 7,4 ve pH 7,6'lık HEPES tamponları ile 4 farklı serum numunesi için 37 °C'de ve %5 CO ₂ 'li inkübatörde 5 saatlik inkübasyon ile denge diyalizi uygulamaları sonuçları.....	78
Tablo 14: İki farklı seviye total testosteron düzeylerine sahip serum numuneleri için yapılan presizyon çalışma sonuçları.....	80

Tablo 15: sT_{CLIA} sonuçları ile prosedür 1,2 ve 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları karşılaştırma verileri.....	82
Tablo 16: $sT_{Vermeulen}$ sonuçları ile prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçlarının karşılaştırma verileri.....	83
Tablo 17: Denge diyalizi metodu için esas alınan aplikasyon bilgileri.....	89
Tablo 18: Çalışmada değerlendirilen 188 erkek gönüllü için NCEP ATPIII ve IDF'e göre MetS kriterlerini karşılayan komponentler ve frekansları.....	90
Tablo 19: IDF'ye göre MetS'si olmayan/olan gruplarda demografik ve laboratuvar verilerinin karşılaştırması.....	91
Tablo 20: MetS'si olmayan/olan gruplarda total testosteron, SHBG, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT verilerinin karşılaştırması.....	94
Tablo 21: MetS'si olmayan/olan gruplarda kovaryant yaş için kontrol edilen kovaryans analizlerle (ANCOVA) total testosteron, SHBG, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT verilerinin belirlenen düzeltilmiş ortalama $\pm$ standart hata değerleri ve karşılaştırma sonuçları.....	95
Tablo 22: Tüm gönüllüler için total testosteron, SHBG, albümin, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron verilerinin korelasyon analizleri.....	98
Tablo 23: MetS'si olmayan grupta total testosteron, SHBG, albümin, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron verilerinin korelasyon analizleri.....	99
Tablo 24: MetS'si olan grupta total testosteron, SHBG, albümin, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron verilerinin korelasyon analizleri.....	100
Tablo 25: Tüm gönüllüler için total testosteron, SHBG, albümin ve bioT verilerinin korelasyon analizleri.....	101
Tablo 26: MetS'si olmayan grupta total testosteron, SHBG, albümin ve bioT verilerinin korelasyon analizleri.....	102

Tablo 27: MetS'si olan grupta total testosteron, SHBG, albümin ve bioT verilerinin korelasyon analizleri.....	103
--	-----



ŞEKİLLER

Şekil 1: Testosteronun moleküler yapısı.....	5
Şekil 2: Testosteronun sentezi ve salgılanması.....	6
Şekil 3: Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde feedback mekanizmaları....	8
Şekil 4: Steroidogenez.....	10
Şekil 5: İmmünölçümler.....	31
Şekil 6: Almanya Biyoanaliz için Referans Enstitüsü'nün Avrupa Dış Kalite Kontrol Programı'na uygun olarak, CLIA, MS ve RIA metoduyla testosteron ve E2 ölçümü yapan laboratuvarların sayısı.....	33
Şekil 7: Denge diyaliz metodunun şematik gösterimi.....	43
Şekil 8: Konveks sonlu kuyucukların enine kesiti.....	65
Şekil 9: 96-kuyucuklu diyaliz ve çerçeve blokları genel görüntüsü.....	66
Şekil 10: Prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar sonrası yapılan denge diyalizi analizleri ile elde edilen serbest testosteron düzeyleri.....	76
Şekil 11: Prosedür 1 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait scatter diagram	84
Şekil 12: Prosedür 1 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....	84

Şekil 13: Prosedür 2 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait scatter diagram	85
Şekil 14: Prosedür 2 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....	85
Şekil 15: Prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait scatter diagram.....	86
Şekil 16: Prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....	86
Şekil 17: $sT_{Vermeulen}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait scatter diagram.....	87
Şekil 18: $sT_{Vermeulen}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği..	87
Şekil 19: MetS'si olmayan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) sonuçları ve $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait heat map scatter diagram.....	104
Şekil 20: MetS'si olmayan grupta $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) sonuçları ve $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....	104
Şekil 21: MetS'si olan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) sonuçları ve $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait heat map scatter diagram.....	105
Şekil 22: MetS'si olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) sonuçları ve $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....	105

Şekil 23: MetS'si olmayan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (%) (Ln-transformed) sonuçları ve $sT_{Vermeulen}$ (%) sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait heat map scatter diyagram.....106

Şekil 24: MetS'si olmayan grupta $sT_{Vermeulen}$ (%) sonuçları ve $DDsT_{ECLIA}$ (%) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....106

Şekil 25: MetS'si olan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (%) (Ln-transformed) sonuçları ve $sT_{Vermeulen}$ (%) sonuçları için yapılan linear regresyon analizine ait heat map scatter diyagram.107

Şekil 26: MetS'si olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (%) sonuçları ve $DDsT_{ECLIA}$ (%) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği.....107

1. GİRİŞ

Sağlıklı yetişkin erkeklerde, dolaşımdaki testosteronun %44'ü spesifik olarak seks hormonu bağlayıcı globuline (SHBG), %50'si spesifik olmayan bir şekilde albümine ve %3,5'i kortizol bağlayıcı globuline bağlanmakta olup sadece %1-3'ü serbesttir (1–3). Testosteronun SHBG'ye bağlanması molekülü inaktif halde tutar ve testosteronun hücrelere girmesi engellenerek serbest hormon miktarı kontrol edilir (4). Ancak serbest hormon hipotezinin aksine (5), üreme dokularında bulunan bazı endositik reseptörlerin biyolojik olarak aktif ve SHBG'ye bağlı androjenlerin SHBG'nin bir kofaktör olarak kullanılarak hücresel alımında görev yapabileceği de gösterilmiştir (6). Albumine bağlı testosteron formunda daha zayıf bir bağlanma olduğundan, testosteron belli durumlarda albüminden ayrılabilir ve biyolojik olarak aktif testosteron seviyesini artırabilir (7). Non-SHBG testosteron olarak da ifade edilebilen biyoyararlı testosteron (bioT) (serbest testosteron (sT) + albümine bağlı testosteron) ile serbest testosteronun korelasyonlarının çoğu vakada kabul edilebilir düzeylerde olduğu ve birbirlerinin yerine kullanılabileceği de rapor edilmiştir (8).

BioT amonyumsülfat çöktürme tekniği ile ex vivo olarak ölçülebilir (9). Serbest testosteron ölçümünde referans yöntem, denge diyalizi sonrası kütle spektrometrisi (MS) tabanlı tekniklerle ölçümdür (10). Denge diyaliz uygulamaları ile elde edilen ultrafiltratlarda serbest testosteron analizleri için literatürde MS ve radyoimmünoassay (RIA) gibi yöntemlerin kullanılabileceği bildirilmiştir (8,10–12). Ancak hem amonyumsülfat çöktürme hem de denge diyaliz metotlarının otomatize edilememesi, analiz sürelerinin uzun olması ve maliyetli olması nedenleri ile bu metotlar serbest testosteron analizleri için çoğu laboratuvarında rutin olarak kullanılmaz. Serbest testosteron ve bioT konsantrasyonları, ayrıca yayınlanmış birkaç algoritmadan biri kullanılarak da hesaplanabilir. Serbest testosteron ve bioT'yi hesaplamak için en yaygın olarak kullanılan iki denklem, Vermeulen ve ark. (8) ve Sodergard ve ark. (13)'nın bildirdikleridir. Bu algoritmalar, total testosteron, SHBG ve albümin konsantrasyonları ve testosteronun SHBG ve albümine bağlanma sabitleri bilindiğinde, serbest testosteron ve bioT'nin hesaplanabileceğini varsayar. Bu hesaplamalar, testosteronun SHBG (k_t) ve albümine (k_{at}) bağlanması için ilişki sabitinin uygun bir tahminine bağlıdır. Bu denklemlerde albumine bağlanma ilişki

sabiti (k_{at}) ve SHBG bağlanma ilişki sabitleri (k_t) için Vermeulen ve ark. (6), Sodergard ve ark. (13) ve Emadi-Konjin ve ark. (14)'nin bildirdikleri algoritmaların nasıl kullanılacağı Tablo 8'de belirtilmiştir. Ancak SHBG bağlanma ilişki sabitleri (k_t) için bu 3 çalışma grubu dışında 16×10^8 L/mol (15) ve 19×10^8 L/mol (16) olarak bildirilenler de mevcuttur. Bu Vermeulen ve ark. ile Sodergard ve ark.'nın bildirdikleri yaklaşımın dışında daha pragmatik bir yaklaşım, serbest testosteron veya bioT ölçümüne dayalı bir algoritma oluşturmak ve bu algoritmayı, total testosteron ve SHBG konsantrasyonları temelinde sonraki numunelerde serbest testosteron veya bioT'yi tahmin etmek için kullanmak olmuştur. Serbest testosteron veya bioT konsantrasyonlarını tahmin etmek için son zamanlarda çok sayıda numunede altın standart teknikle ölçülen konsantrasyonlara dayalı Emadi-Konjin ve ark. (14), Morris ve ark. (17) ile Ly ve ark. (18)'nin bildirdiği 3 yeni algoritma önerildi. BioT hesaplamasında Emadi-Konjin ve ark. (14), Morris ve ark. (17)'nin bildirdiği denklemler ile serbest testosteron hesaplamasında Ly ve ark. (18)'nin bildirdiği denklem Tablo 9'da belirtilmiştir.

Bir yanda Vermeulen ve Sodergard algoritmaları, diğer yanda Emadi-Konjin, Ly ve Morris hesaplamaları temelde farklı yaklaşımlardan geliştirilmiştir. Vermeulen ve Sodergard denklemleri, bioT ve serbest testosteronu hesaplamak için total testosteron, SHBG ve testosteronun albümin ve SHBG'ye bağlanması için ilişki sabitlerinin değerlerinin kullanıldığı kütle etkisi yasasına dayanmaktadır. Bu algoritmalar için ilişki sabitleri deneysel olarak elde edilmiş ve altın standart bir teknikle (8,12,19) hesaplamaların sonuçları karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Van Uytfanghe ve ark.'nin (12) sonuçlarında belirtildiği gibi, ilişki sabitleri ile bu sabitler kullanılarak elde edilen sonuçlar arasındaki tutarlılık, bu algoritmaların güvenilirliğine katkıda bulunur.

Emadi-Konjin ve ark. (14) ve Morris ve ark. (17) önce bioT'yi amonyum-sülfat presipitasyonu ile ölçtüler ve bu sonuçları total testosteron ve SHBG konsantrasyonunu kullanarak diğer numunelerdeki bioT konsantrasyonlarını tahmin etmek için bir algoritma oluşturmak için kullandılar. Sonuçları ile optimal korelasyon elde etmek için Emadi-Konjin ve ark. (14), albümin ve SHBG'ye testosteron bağlanması için bağlanma sabitlerini değiştirerek Vermeulen ve Sodergard tarafından kullanılan denklemleri değiştirdiler. Morris ve ark. (17), ölçümlerine dayalı olarak bir

regresyon denklemi oluşturmuştur. Ly ve ark. (18) ilk olarak yaklaşık 4000 numunede serbest testosteronu tahmin etmek için bir ultrafiltrasyon metodu kullanmıştır. Daha sonra bu örneklerde serbest testosteronu tahmin etmek için 2 regresyon modeli oluşturdular; total testosteron konsantrasyonları 5 nmol/L için bir denklem ve bu konsantrasyonun üzerindeki konsantrasyonlar için başka bir denklem. Vermeulen ve Sodergard yöntemlerinin aksine, Morris, Ly ve Emadi-Konjin algoritmaları yalnızca ölçümlerinin doğruluğuna dayanır. Regresyon temelli serbest testosteron hesaplamasında başka bir yöntem Wheeler MJ'nin bildirdiğidir (20).

SHBG, primer yapısı iki disülfid bağı ile 373 amino asit kalıntısından oluşan 90 kDa'lık bir glikoproteindir. Bu alt birimlerden her birinde tek bir steroid bağlama bölgesi vardır. Glikozilasyon serum yarı ömrünü uzatır. Temel işlevi, serbest hormonların dolaşımdaki konsantrasyonlarını ve bunların hedef dokulara taşınmasını düzenleyen, seks steroidleri için bir taşıma proteini olarak kabul edilmiştir (21). SHBG konsantrasyonları diyet, vücut kitle indeksi (VKİ), insülin konsantrasyonları ve yaş gibi değişkenlerle ilişkili olduğundan, testosteronun biyoaktif kısımlarının (serbest testosteron ve bioT) doğru değerlendirilmesinde dikkate alınmalıdır (22–24). 40-70 yaş arası 1552 erkek birey ile yapılan bir çalışmada testosteron ve estradiol (E2) düzeyleri kontrol edildikten sonra SHBG düzeyleri ile lifli gıda alımı ve yaş arasında pozitif korelasyon, ancak SHBG düzeyleri ile VKİ ve protein alımı arasında negatif korelasyon bildirilmiştir (24). 40-70 yaş arası erkek bireylerle yapılan başka bir çalışmada total testosteron ve bioT'nin ilerleyen yaş ile beraber yılda sırasıyla %0,2 ve %0,7 azaldığı; SHBG'nin ise ilerleyen yaş ile beraber yılda %1,1 arttığı rapor edilmiştir (23). Testosteronun biyoaktif kısmı (bioT) için önemli olan albuminin yaş ile birlikte azalması (SHBG'den daha az önemli olsa da) ve serbest testosteronun plazma testosteronunun düzenlendiği hipotalamik-hipofiz-gonadal aksta negatif-feed back için görev yaptığı dikkate alındığında, albuminin SHBG ile birlikte (kodeterminant) plazma testosteron düzeylerinin yaşa bağlı azalmaya katkıda bulunabileceğine dair görüşler de bulunmaktadır (22). Yapılan çalışmalar SHBG düzeylerinin metabolik sendrom ile ilişkili insulin direnci ile ilişkisini ortaya koymuş olup (25–27); gözlemsel çalışmalar, düşük SHBG konsantrasyonunu, erkek ve kadınlarda seks hormonu düzeylerinden bağımsız olarak artan tip2 diabetes mellitus (tip2-DM) insidansı ile ilişkilendirmiştir (28).

Serbest testosteron ve bioT hesaplamalarında kullanılan algoritmaların sonuçları ile serbest testosteron ölçümünde altın standart denge diyaliz yöntemini içeren sonuçların karşılaştırıldığı çalışmalarda, hesaplanan değerlerle gerçek değerler arasında farklılıklar olabileceği bildirilmiştir (1). Ancak bu çalışmalar göreceli olarak yaşlı erkek (40-70 yaş) popülasyonunda yapılmış olup, çalışmaya dahil edilen gönüllülerin metabolik profilleri karşılaştırmalarda dikkate alınmamıştır. Serum SHBG, albumin ve testosteron düzeylerinin yaş ve metabolik sendrom (MetS) ilişkili insülin direnci ile ilişkileri dikkate alındığında bu çalışmada, NCEP ATPIII ve IDF'e göre metabolik sendromu olan ve olmayan 20-49 yaş arası erkek gönüllülerde serbest testosteron ve bioT hesaplamalarında kullanılan algoritmaların sonuçları ile serbest testosteron ölçümünde kullanılan denge diyalizi sonrası elektrokemilüminesans immünölçüm (ECLIA) yönteminin sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, yaşın karıştırıcı etkisini (*confounding effect*) sınırlamak için diğer çalışmalardan göreceli olarak daha genç (20-49 yaş) seçilen erkek popülasyonda MetS'nin, serbest testosteronun algoritmalarla hesaplama ve direkt ölçüm sonuçları arasındaki uyumsuzluklarda olası rolünün ortaya konması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Androjenler

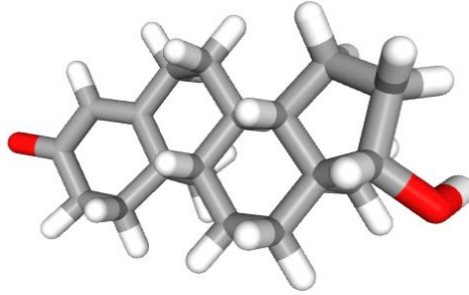
“Androjen” terimi, maskülinizan etkileri olan steroidleri tanımlamak için kullanılır. Androjenler, hem testislerde hem de adrenal bezlerde kolesterolde veya doğrudan asetil CoA’dan sentezlenirler. Steroid yapıda bileşiklerdir (29).

Testislerde türetilen testosteron ve dihidrotestosteron (DHT); adrenal bezde üretilen dehidroepiandrosteron (DHEA), DHEA-sülfat (DHEA-S) ve androstenedion başlıca androjenlere örnektir (30,31).

Bu adrenal androjenler, testosteron ile karşılaştırıldığında zayıf olmalarına rağmen, periferik dokularda testosteron ve DHT gibi daha aktif steroid metabolitlerine dönüştürülebilirler (31).

2.2. Testosteron

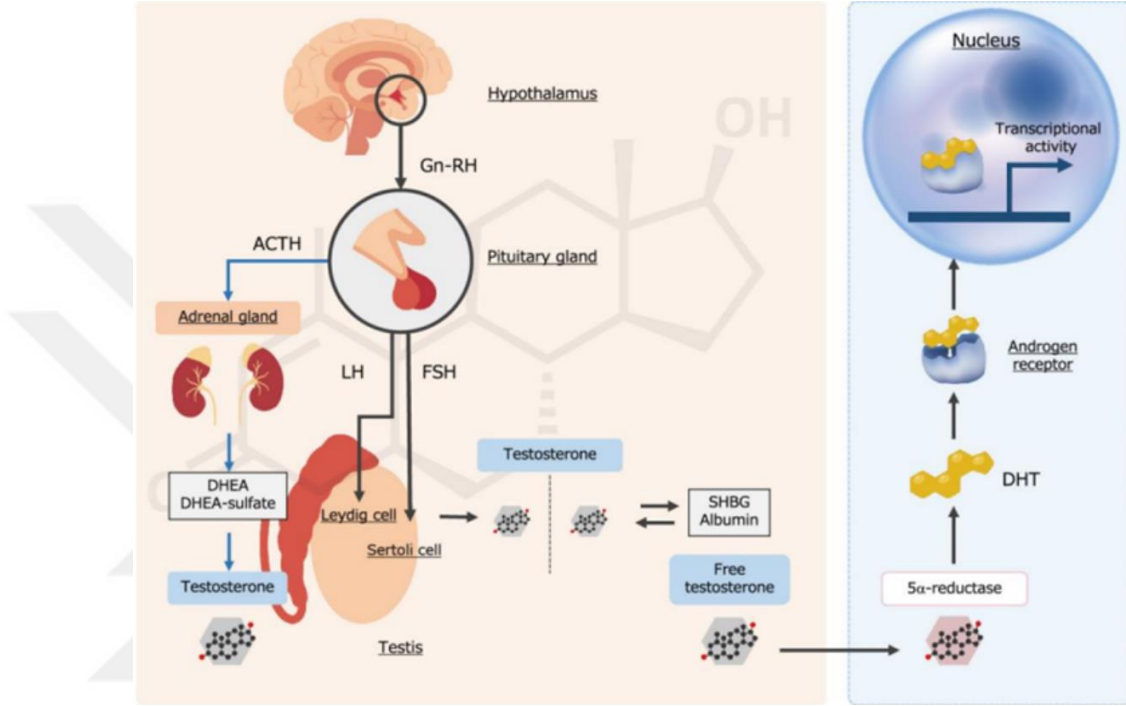
Testosteron, 17-beta hidroksi ve 3-okso gruplarına sahip bir androstanoiddir (32). Moleküler yapısı Şekil 1’deki gibidir.



Şekil 1: Testosteronun moleküler yapısı (32)

İlk olarak, hipotalamusta sentezlenip salgılanan gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ön hipofiz bezini uyarır. Bu uyarı ile ön hipofizden Luteinize edici hormon (LH) ve Folikül stimulan hormon (FSH) sentezlenir ve salınır. LH, testisteki Leydig hücrelerini uyarır ve testosteron üretimini teşvik eder (Şekil 2) (30).

Sağlıklı erkeklerde testisler, dolaşımdaki androjenlerin ana kaynağıdır. Testisler, testosteronun yanı sıra, androstenedion, 5 α -dihidrotestosteron (DHT) ve östradiol gibi diğer seks steroidlerini de az miktarda salgılar (31).



Şekil 2: Testosteronun sentezi ve salgılanması. Gn-RH: gonadotropin salgılatıcı hormon, LH: lüteinize edici hormon, FSH: folikül uyarıcı hormon, DHEA: dehidroepiandrosteron, DHT: dihidrotestosteron, SHBG: seks hormonu bağlayıcı globulin (30).

FSH ve testosteron, seminifer tübüllerdeki Sertoli hücrelerine etki ederek spermatogenik fonksiyonun korunmasını teşvik eder (30).

Erkeklerde doğal olarak bulunan ve biyolojik olarak en güçlü androjen olan DHT'nin, esas olarak 5 α -redüktaz izozimlerinin etkisiyle prostat ve deri gibi periferik dokularda testosterondan dönüştürüldüğüne inanılmaktadır (31).

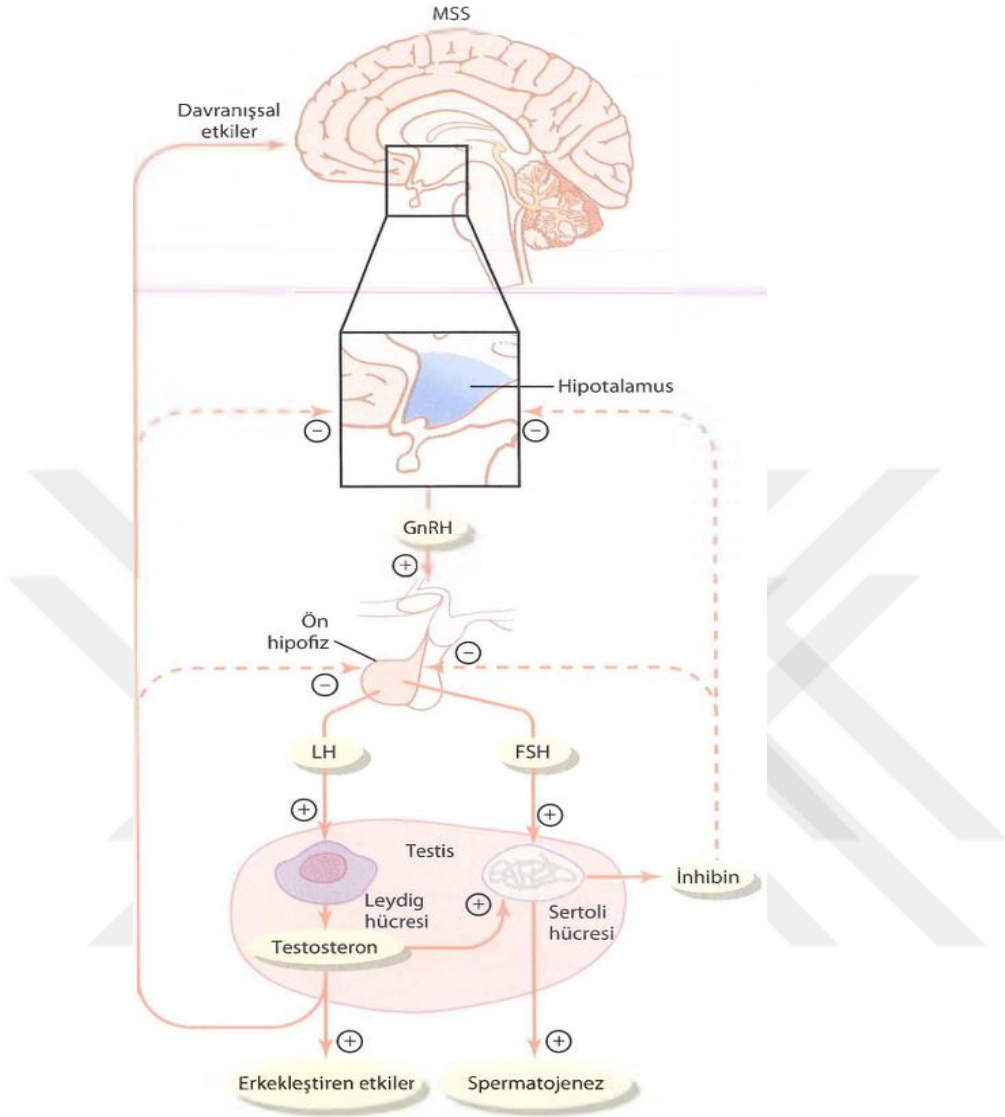
2.2.1. Testosteron Yapımının LH İle Düzenlenmesi

Testislerin interstisyel Leydig hücrelerinden testosteron salgılanması, yalnızca hipofiz bezinden salgılanan LH'nin uyarısı ile gerçekleşir. Bunun da ötesinde salgılanan testosteron miktarı, uyarıcı LH miktarıyla yaklaşık doğru orantılıdır. Testislerde olgun Leydig hücreleri normalde doğumdan sonra birkaç hafta kadar bulunur; daha sonra 10 yaşından sonrasına kadar bulunmaz. Ancak, herhangi bir yaştaki çocuğa saflaştırılmış LH enjekte edildiğinde veya puberte döneminde LH salgısının arttığı durumda, testislerdeki fibroblastlara benzeyen interstisyel hücreler, işlevsel Leydig hücrelerine dönüşürler (29).

2.2.2. Ön Hipofiz FSH ve LH Salgısının Testosteron Tarafından Baskılanması – Testosteron Salgısının Negatif-FeedBack İle Kontrolü

LH ve FSH'nin plazma konsantrasyonları hipotalamustan gelen gonadotropin salgılatıcı hormon tarafından düzenlenir. Testis, androjenler, östrojenler ve inhibin B'yi içeren negatif geri bildirim mekanizmaları ile hipotalamik-hipofiz eksenini üzerinde etki gösterir (31).

LH uyarısı ile testislerden salgılanan testosteron hormonu karşıt olarak ön hipofizden LH salgısını baskılar (Şekil 3). Bu baskılamanın büyük kısmı olasılıkla, testosteronun doğrudan hipotalamusa etkisi sonucu, GnRH salgısının azaltılmasına bağlıdır. Bu da, daha sonra ön hipofizden LH ve FSH salgısını azaltır. LH'nin azalması da, testislerden testosteron salgılanmasında azalmaya neden olur (29).



Şekil 3: Erkeklerde hipotalamus-hipofiz-testis ekseninde feedback mekanizmaları (33). Uyarıcı etkiler (+), baskılayıcı etkiler (-) ile gösterilmiştir. FSH, folikül uyarıcı hormon; GnRH, gonadotropin- serbestletici hormon; LH, luteinizan hormon; MSS, merkezi sinir sistemi.

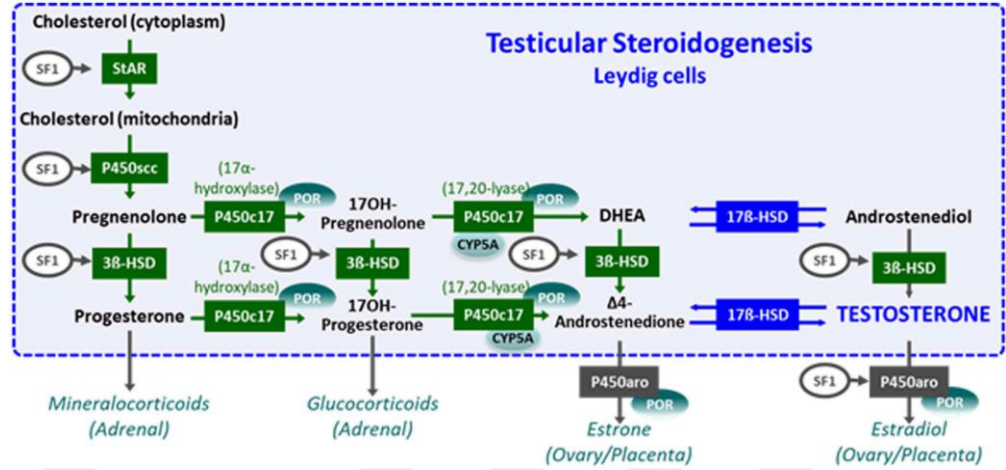
Böylece, testosteron salgısının çok fazla olması halinde, otomatik olarak negatif feedback etkisiyle hipotalamus ve ön hipofizin salgısı azaltılarak testosteron sekresyonu baskılanır ve hormon düzeyi normal hale getirilir. Buna zıt olarak, testosteronun çok az olması halinde hipotalamustan yüksek düzeyde GnRH salgılanır. Ön hipofizden LH ve FSH salgısı artar ve sonuçta testiküler testosteron sekresyonu artar (29).

2.2.3. Testosteron Sentezi

Androjenlerin ana kaynakları gonadlar ve adrenal bezlerdir (34).

2.2.3.1. Testiküler Steroidogenez

Kolesterol, steroid sentezi için ilk substrattır. Gonadal ve adrenal steroidogenezin ilk adımı, kolesterolün steroidojenik akut düzenleyici proteinin (StAR) kontrolü altında sitoplazmadan iç mitokondriyal transferidir. Daha sonra, sitokrom P450 kolesterol yan zincir bölünme enzimi (P450_{scc}), kolesterolden pregnenolon sentezini katalize eder. Sitokrom P450_{c17} ailesinden olan 17 α -hidroksilaz iki reaksiyonda rol alır. Birincisi, pregnenolonu 17 α -hidroksipregnenolona katalize eder. Diğeri ise progesteronu 17 α -hidroksiprogesterona (17-OHP) katalizlemesidir. Bir diğeri sitokrom P450_{c17} ailesinden olan 17,20-liyaz ise, 17 α -hidroksipregnenolondan DHEA oluşumunda ve 17-OHP'den Δ 4-androstenedion oluşumunda görev alır. P450 oksidoredüktaz (POR), P450_{c17}, 21-hidroksilaz ve aromatazin katalitik aktivitesi için gereklidir. HSD tip 2, Δ 5-steroidlerin Δ 4-steroidlere (pregnenolonun progesterona, 17 α -hidroksipregnenolonun 17-OHP'ye, DHEA'nın androstenediona ve androstenediolün testosterona) dönüşümünü katalize eder. 17 β -HSD tip 3 enzimi testislerde Δ 4-androstenedionu testosterona dönüştürür (34).



Şekil 4: Steroidogenez. Testiküler Leydig hücrelerinde meydana gelen steroidojenik yol şematik olarak kutuda gösterilmiştir. Adrenaller, plasenta ve overlerde gerçekleşen steroidojenik adımlar kutunun dışındadır (34).

2.2.4. Testosteronun İşlevleri ve Süreç

Testosteron, hedef dokuda 5 α -redüktazın etkisi ile yüksek derecede aktif DHT'ye dönüştürülerek etki eder. DHEA'nın da benzer şekilde testosteron ve DHT'ye dönüştüğüne ve onlar gibi davrandığına inanılıyor. Testosteron ve DHT reseptörü olan androjen reseptörü (AR), testosteron veya DHT'ye bağlandığında hedef genler için transkripsiyon faktörü olarak görev yapan ve biyolojik aktiviteler sergileyen nükleer bir reseptördür. Androjen reseptörleri beyin, kan damarları ve periferik sinirlerin yanı sıra üreme organlarında da yaygın olarak dağılmıştır (30).

Testosteron genel olarak, vücuttaki belirgin erkek özelliklerinin oluşumundan sorumludur (29). Fetal yaşam sürecinde, testisler plasenta da oluşan koryonik gonadotropinlerle uyarılarak, orta düzeyde testosteron salgırlar (29). İnsan fetal testisi tarafından testosteron üretimi yaklaşık 8. gebelik haftasında başlar ve 11 ila 14. gebelik haftaları arasında zirve yapar (31). Yaşamın ilk yılında, erkeklerde plazma testosteron konsantrasyonları genellikle zamanla azalır (31). 46 sağlıklı erkek bebek üzerinde yapılan bir çalışmada, ortalama plazma testosteron konsantrasyonları 1-3 aylıkken 7,2 nmol/L, 3-5 aylıkken 3,3 nmol/L ve 5-7 aylıkken 0,8 nmol/L olarak bulunmuş ve 7-12 aylıkken prepubertal seviyelere (0,2 nmol/L) ulaşmıştır (31). Testiküler testosteron salgısı; adrenal ve testiküler androjenlerin üretiminin belirgin

şekilde arttığı ve sesin derinleşmesi, pubarş ve kas kütlesinde artış gibi androjen bağımlı değişikliklerin olduğu puberteye kadar çocukluk döneminde çok düşük kalır (31). Daha sonra, puberte döneminde ön hipofiz gonadotropik hormonlarının uyarısıyla testosteron yapımı hızla artar (29). Sağlıklı yetişkin erkeklerde, plazma testosteronu yaşamın üçüncü ila dördüncü dekadı boyunca en yüksek seviyelerde kalır (31). Hem kesitsel hem de uzunlamasına çalışmalar, total testosteron, serbest testosteron ve biyoyararlı testosteronun beşinci dekaddan itibaren yaşla birlikte kademeli olarak azaldığını göstermiştir (29,31). 80 yaşında en üst düzeyin %20-50'sine iner (29).

Artan SHBG konsantrasyonlarının bir sonucu olarak, artan yaşla beraber serbest ve biyoyararlı testosterondaki düşüş genellikle total testosterondan daha belirgindir. Massachusetts erkek yaşlanma çalışmasında, 40 yaşından sonra total testosteronda yaşa bağlı ortalama azalma yılda %0,8-1,6 iken, serbest testosteron yaşla birlikte yılda %1,7-2,8 oranında azalmaktadır. Testosteronun bu ölçümlerinde yaşa bağlı düşüş hem sağlıklı erkeklerde hem de kronik hastalığı olan erkeklerde görülür, ancak sağlıklı erkeklerdeki konsantrasyonlar kronik hastalığı olan hastalara göre %10-15 daha yüksek olma eğilimindedir. Artan yaşla birlikte testosteron konsantrasyonlarındaki düşüşün nedeni tam olarak anlaşılamamıştır; ancak, primer testiküler değişiklikler, Leydig hücre fonksiyonunun değişen nöroendokrin düzenlemesi ve plazma SHBG bağlama kapasitesindeki artış dahil olmak üzere çoklu mekanizmalar söylenmiştir. Plazma testosteron konsantrasyonlarındaki yaşa bağlı düşüşün yaşlanmayla ilişkili fizyolojik bir olgu mu yoksa testosteron takviyesiyle düzeltilebilecek yaygın bir klinik durum olarak mı değerlendirilmesi gerektiği tartışmalıdır (31).

Yetişkin erkeklerde serum total, biyoyararlı ve serbest testosteron normalde 06.00-08.00 saatleri arasında pik konsantrasyonları ve 18.00-20.00 saatleri arasında dip konsantrasyonları ile diurnal değişimler gösterir. Bu ölçümlerde pik ve dip seviyeleri arasındaki farklar genellikle %40 seviyesindedir. Serum SHBG konsantrasyonları da, 16.00 saatlerinde pik ve 04.00 saatlerinde dip konsantrasyonları ile diurnal bir değişim gösterir. Bu diurnal varyasyonlar nedeniyle, erkeklerde testosteron durumunun araştırılmasında kan örneklerinin testosteron

konsantrasyonlarının maksimum olduğu sabahın erken saatlerinde alınması önerilir (31).

2.2.4.1. Fetal Gelişim Sürecinde Testosteronun İşlevleri

Testesteron, erkek fetus testislerinde, embriyonik hayatın yaklaşık yedinci haftasında yükselmeye başlar. Erkek ve kadın seks kromozomu arasındaki en önemli işlevsel farklılık, gelişmekte olan genital plaktan erkek kromozomunun testosteron salgılanmasını; kadın kromozomunun ise östrojen salgılanmasını sağlamasıdır. Gebe hayvanlara, yüksek dozda erkek seks hormonları enjekte edildiğinde, fetus dişi bile olsa, erkek seksüel organlarının geliştiğı görülür. Aynı şekilde, erkek fetusta erken evrede testislerin çıkarılması, dişi seks organlarının gelişmesine neden olur. Bu nedenle, ilk önceleri genital plaktan, daha sonra fetal testislerden salgılanan testosteron hormonu erkek vücut özelliklerinin gelişmesinden sorumludur (29).

2.2.4.1.1. Testosteronun Testislerin İnmesindeki Etkisi

Testisler, genellikle gebeliğin son 2-3 ayında yeterli düzeyde testosteron salgılanmasıyla skrotuma inerler. Testislerin inmesini sağlayan faktörün testosteron olması, testosteronun fetal yaşam sırasında, erkek seksüel gelişme için önemli bir hormon olduğunu göstermektedir (29).

2.2.4.2. Testosteronun Erişkinde Primer ve Sekonder Seks Özelliklerinin Gelişimine Etkisi

Puberte, hipotalamik-hipofizer ekseninde bir "uyanma" olduğunda ortaya çıkar (35). Hipotalamus GnRH salgısını artırır ve bu da LH ve FSH salınımını uyarır (35). Bu, testiküler testosteron üretiminde önemli bir artışa ve puberte ilişkili sekonder cinsiyet özelliklerinin indüklenmesine yol açar (35). Puberte sonrasında testosteron salgısının yeniden başlamasıyla penis, skrotum ve testislerde 20 yaşından önce yaklaşık 8 kat kadar büyüme görülür (29). Sekonder cinsiyet özelliklerinden bazıları; büyüme atağı, libido artışı, erektile fonksiyon artışı, akne, vücut kıllarında artış, kas

kütlesinde artış, sesin derinleşmesidir (35). Bu olay puberteden itibaren başlar ve olgunluk döneminin sonuna kadar sürer (29). Sekonder seks özellikleri, seksüel organlara ek olarak erkek ile kadın ayrımında yardımcıdır (29).

2.2.4.2.1. Testosteronun Vücut Kıllarının Dağılımına Etkileri

Testosteron vücut kılların büyümesine neden olur. Bu kıllar pubis çevresinde, yukarı doğru linea alba boyunca (bazen göbeğe ve daha yukarıya doğru), yüzde, genellikle göğüste ve daha az ölçüde de vücudun sırt gibi diğer bölgelerinde bulunur. Aynı şekilde, vücudun farklı bölümlerinde de kılların belirginleşmesini sağlar (29).

2.2.4.2.2. Alopesi

Testosteron başın tepe kısmında saçların büyümesini yavaşlatır. Alopesi iki faktöre bağlı ortaya çıkar. Birincisi, alopesinin gelişimi için genetik bir zemin olmalıdır. İkincisi, bu genetik zemin üzerine yüksek miktarda androjen hormonunun eklenmesi gerekir. Uygun genetik altyapısı olan bir kadında uzun süreli bir androjenik bir maruziyet varsa, erkekte olduğu gibi kellik başlar (29).

2.2.4.2.3. Libido

Testosteronun libido, cinsel ilgi ve uyarılma üzerine etkisi vardır (35). Hipogonadal erkeklerde testosteron replasman terapisi başlandığında genellikle libidoda belirgin bir iyileşme görülür (36,37).

2.2.4.2.4. Ses

Testosteron, tesislerden salgılandığı ya da vücuda enjekte edildiğinde, larinks mukozasının hipertrofiye olmasına ve larinksin genişlemesine neden olur. Bu durum, önce görece olarak akortsuz “çatlak” bir ses oluşumuna yol açar. Fakat, ses giderek değişir ve tipik bir bas erkek sesi karakterini alır (29).

2.2.4.2.5. Testosteronun Kas Kütlesine Etkisi

Testosteron kas kütlesinin gelişimi ve korunmasında önemli bir hormondur (38). Erkeğe özgü en önemli özelliklerden biri puberte sonrasında kas gelişiminin artışıdır (29). Kas kütlesindeki bu artış kadınlara oranla hemen hemen %50 daha fazladır (29). Bir dizi çalışma, testosteronun hipogonadal erkeklerde yağsız vücut kütlesini (kas) geri kazandırırken aynı zamanda yağ kütlesinde azalmaya neden olduğunu göstermiştir (39). Testosteron veya sentetik androjenleri sporcular vücudun kas yapısına büyük etkisi nedeniyle kas gelişimini arttırmak için doping olarak kullanabilmektedir (29). Zayıf hipogonadal erkeklerin testosteron ile tedavisi, kas gen ekspresyonunda değişikliklere, kas kütlesinde artışa, güç, kuvvet ve dayanıklılıkta iyileşmelere ve fiziksel fonksiyonda iyileşmeye neden olabilir (35).

2.2.4.2.6. Testosteronun İskelet Sistemine Etkisi

Testosteronun kemikler üzerinde aromataz aracılığıyla estradiole dönüşerek osteoklastik aktiviteyi ve dolayısıyla kemik erimesini engelleme ve 5α -redüktaz aracılığıyla DHT'ye dönüşerek osteoblastik aktiviteyi uyarma/kemik oluşumunu artırma olmak üzere iki önemli etkisi vardır (40,41). Testosteron hem kemik matriksin total miktarını artırır hem de kalsiyumun depolanmasını sağlar (29). Kemik matriksindeki artışın testosteronun proteinler üzerinde genel anabolik etkisi sonucunda olduğu; kalsiyum birikiminin ise kemik matrisinin artmasına bağlı sekonder bir etki olduğu düşünülmektedir (29).

Testosteron pelvisin dar ve uzun olmasını sağlaması üzerine spesifik bir etkisi vardır (29). Kadındaki geniş, oval pelvis yapısı yerine huniye benzer şekil almasında rol oynar ve pelvisin yük taşımaya karşı direncini artırır (29).

Hipogonadal erkekler osteopeni veya osteoporoz gelişimi ve dolayısıyla müteakip kırıklar açısından risk altındadır (42). Testosteron kemiklerin büyüklüğünü ve dayanıklılığını artıracak etkisi nedeniyle, yaşlı erkeklerde osteoporoz tedavisinde kullanılabilmektedir (29). Tüm osteoporotik kalça kırıklarının yaklaşık üçte biri erkeklerde görülür ve 50 yaşın üzerindeki erkeklerde herhangi bir osteoporotik kırık riski yüzde 25 kadar yüksektir (43,44).

Büyüme dönemindeki çocuklarda testosteronun anormal düzeyde aşırı salgılanması, kemiklerin belirgin şekilde hızla büyümesine, uzun kemiklerde epifizlerin erken kapanmasına ve vücudun tümüyle hızla gelişmesine neden olur (29).

2.2.4.3. Testosteronun Epidermal Etkileri

Testosteron tüm vücutta derinin kalınlaşmasını ve subkutan dokunun güçlenmesini sağlar. Testosteron yağ bezlerinin bir kısmında veya tümünde salgıyı artırır. Yüzdeki yağ bezlerinin fazla salgı yapması, özellikle çok önemlidir. Çünkü, bu bezlerin aşırı salgıları akneye neden olur. Deri, yıllar sonra salgılanan testostereona adapte olur ve akneler regrese olur (29).

2.2.4.4. Testosteronun Metabolizma Üzerine Etkisi

Yüksek dozda testosteron enjeksiyonu, bazal metabolizma hızını %15 kadar artırabilir. Hatta, adölesan ve erken erişkin dönemlerinde testislerden salgılanan normal testosteron miktarı bile bazal metabolizmayı, testislerin aktif olmadığı döneme göre %5-10 oranında hızlandırabilir. Metabolizma üzerine bu artırıcı etki muhtemelen testosteronun protein anabolizması üzerine etkisinin dolaylı sonucudur. Protein miktarının, özellikle enzimlerin artışı tüm hücrelerde aktiviteyi artırmaktadır (29).

2.2.4.5. Testosteronun Eritrositler Üzerine Etkisi

Testosteron kemik iliğinde hematopoezin uyarıcısıdır ve sonuç olarak hematokriti artırır (45). Kastre edilmiş bir erişkin normal dozda testosteron enjekte edilecek olursa, mm^3 'teki eritrosit sayısı %15-20 artış gösterir. Erkeklerde eritrosit sayısının, kadınlardaki ortalamaya göre mm^3 'te yaklaşık 700000 daha fazla olduğu bilinmektedir (29). Bu farklılık, testosteronun eritrosit yapımı üzerine doğrudan etkisinden çok, belki de metabolik hızda artışa da bağlı olabilir (29).

Bhatia ve ark.'nın tip2 DM'li 70 erkek hasta (yaş aralığı; 24-78) üzerinde yaptığı bir çalışmada, hipogonadal erkeklerde istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha

düşük hematokrit bulunmuştur (46). Hastaların %23'ünde (70 hastanın 16'sı) anemi gözlenmiştir ve anemik 15 hastanın 14'ünde hesaplanan serbest testosteron düşük bulunmuştur (46).

2.2.4.6. Testosteronun Elektrolit ve Su Dengesi Üzerine Etkisi

Birçok steroid hormon böbreğin distal tübüllerinde sodyum geri emilimini artırabilir. Testosteron da aynı etkiye sahip bir hormondur. Ancak, adrenal mineralokortikoidlerle karşılaştırıldığında, etkinin çok küçük olduğu anlaşılır. Bununla beraber, puberte sonrası erkekte kan ve hücre dışı sıvı hacmi, ağırlıklarına oranla %5-10 oranında daha fazla bulunur (29).

2.2.5. Testosteron Etkisinin Temel İntraselüler Mekanizması

Testosteronun temel etkisi, hedef hücrelerde protein yapım hızını artırmaktadır. Bu etki, testosterondan en çok etkilenen bir organ olan prostat bezinde, sayısız incelemelerle araştırılmıştır. Bu bezde, testosteron, salgılandıktan birkaç dakika sonra hücre içine girer. Hücre içinde 5 α -redüktaz enziminin etkisi altında dehidrotestosterona dönüşür ve stoplazmik reseptör proteinine bağlanır. Reseptör-hormon kompleksi daha sonra çekirdeğe girer ve çekirdekteki bir proteinle bağlanarak DNA-RNA transkripsiyon işlemini uyarır. 30 dakika içinde, RNA polimeraz aktifleşir ve prostat hücrelerinde RNA konsantrasyonu artmaya başlar. Bu olayı, hücresel protein artışı izler. Birkaç gün sonra, bezdeki DNA miktarının artışı sonucunda, aynı anda prostat hücrelerinin sayısında artış gözlenir. Testosteron genelde vücudun her yerinde protein yapımını büyük oranda artırmaktadır. Ancak, bu artış daha özgül olarak sekonder seks özelliklerinin gelişmesinden sorumlu olan hedef organ ve dokularda görülmektedir. Testosteronla ilgili son çalışmalar, hormonun diğer steroid hormonlar gibi, yeni protein sentezini gerektirmeyen non-genomik etkileri olduğunu göstermektedir. Ancak, non-genomik etkilerin fizyolojik önemi belirlenmemiştir (29).

2.2.6. Testosteronun Yıkımı ve Atılımı

Testislerden salgılandıktan sonra, testosteronun yaklaşık %97'si, zayıf bağlarla plazma albümini ya da daha sıkı bir şekilde SHBG'ye bağlanır. Bağlı hormonun dolaşım sisteminde kalış süresi 30 dk - 1 sa, bazen de daha uzun olabilir. Bu süre sonunda testosteron ya dokularda fikse olur ya da inaktif ürünlere dönüşerek vücuttan atılır. Dokulara fikse olan testosteronun çoğunluğu hücre içinde DHT'ye dönüşür. Bu olayın gerçekleştiği hedef organlar ise erişkinlerde özellikle prostat bezi, erkek fetusta dış genital organlardır. Dokularda fikse olmayan testosteron, karaciğerde başlıca androsteron ve DHEA'ya dönüşür. Aynı anda, her iki yapı özellikle glukuronidlerle ya da sülfatlarla birleşerek bağlı hale getirilir. Bunlar da, safra içinde sindirim kanalından ya da idrarla böbrekten atılırlar (29).

2.3. Seks Hormon Bağlayıcı Globulin (SHBG)

SHBG, 17. kromozomun kısa kolundaki tek bir gen tarafından kodlanan 90-100 kilodalton (kDa) moleküler ağırlığa sahip homodimerik bir glikoproteindir (47). Değişken glikozilasyon, moleküler ağırlıktaki varyasyonu açıklar ve östrojenler tarafından artırıldığı bilinmektedir, ancak önemi bilinmemektedir (47). Dolaşımdaki SHBG öncelikle hepatositler tarafından üretilir (47,48). Ancak, gen aynı zamanda beyin, uterus, prostat, meme, over ve testisin yanı sıra bazı over ve prostat kanserlerinde de eksprese edilir (47). SHBG, çok sayıda memelinin dolaşımında bulunur, ancak yetişkin rat ile farelerin, kobayların ve domuzların plazmasında yok gibi görünmektedir (47). SHBG, kan plazmasında testosteron ve diğer steroidleri taşır, metabolik klerens oranlarını azaltır ve hedef dokulara erişimlerini düzenler (47,48). SHBG hedef dokulardan steroidleri tutabilirken, ligand bağlı SHBG'nin membran reseptörlerine bağlandığına ve cAMP üretimini uyardığına ve/veya biyolojik bir etki başlatmak için membran proteini megaline bağlanarak hücrelere girdiğine dair bazı kanıtlar vardır (47). SHBG düşük bağlanma kapasitesine sahiptir ancak steroidler için son derece yüksek bağlanma afinitesine sahip olup dihidrotestosteron, testosteron, androstenediol ve E2 için en yüksek afiniteleri gösterir (48). İnsan SHBG'si DHT, testosteron ve E2'nin yanı sıra levonorgestrel ve fluoksimesteron gibi ilaçları da bağlar (47).

Birkaç vakada plazma SHBG'de tam bir eksiklikle sonuçlanan homozigot yanlış anlamlı mutasyon bildirilmiştir. Etkilenen yetişkin bir erkeğin düşük libido, spontan sabah ereksiyonlarında azalma, yorgunluk, kas güçsüzlüğü, tıraş sıklığında azalma, küçük testisler ve düşük kemik kütlesi şikayeti olduğu bildirilmiştir. Ancak, semen analizinin normal olduğu bildirilmiştir. Etkilenen kız kardeşinde menarş gecikmesi, meme gelişimi yetersizliği ve düzensiz menstrüel periyotlarının olduğu bildirilmiştir (47).

SHBG, testosteronu yüksek afinite ile bağlar (~1 nmol/L) ve yetişkin erkek serumundaki SHBG bağlanma bölgelerinin çoğu testosteron tarafından işgal edilir. Öyle ki, SHBG seviyesi, yetişkin erkeklerde total testosteron seviyesinin önemli bir belirleyicisidir. Düşük SHBG seviyesine sahip ögonadal yetişkin erkeklerin total testosteron seviyeleri düşükken, yüksek SHBG seviyesine sahip erkeklerin testosteron seviyeleri daha yüksektir. Sırasıyla, obezite (negatif yönde) ve hipertiroidizm (pozitif yönde) bu etkilere örnektir (47).

Serum SHBG konsantrasyonlarının ölçümü için piyasada bulunan birçok immünoassay yöntemi rutin olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu SHBG testleri arasında yöntemle bağlı belirgin sapma farklılıkları ortaya çıkabilir. Bu nedenle, yalnızca serum SHBG konsantrasyonları için değil, aynı zamanda ölçülen SHBG konsantrasyonlarına dayalı olarak hesaplanan serbest testosteron ve biyoyararlı testosteron için de yöntemle ilişkili referans aralıklarının kullanılması son derece önemlidir (31).

2.4. Albümin

İnsan albümini, 66,5 kDa moleküler ağırlığa sahip küresel bir proteindir. Tekrarlanan üç homolog alan halinde organize olan ve A ve B olmak üzere iki ayrı alt alandan oluşan 585 aminoasitten oluşur (49).

Albümin, plazmada en fazla bulunan proteindir. Sağlıklı insanlarda plazmanın toplam protein içeriğinin yarısını (3,5 g/dL ila 5 g/dL) temsil eder. Albümin, hepatositler tarafından sentezlenir ve günde yaklaşık 10 g ila 15 g civarında hızla kan dolaşımına verilir (50).

Kötü beslenme durumu, enflamasyon, hepatotoksinlere maruz kalma ve yüksek kolloid ozmotik basınca maruz kalma, albümin sentezini inhibe eder. Karaciğerin biyosentetik kapasitesi ya da başka bir deyişle hastanın karaciğer fonksiyonları serum albümin değerleri ile ölçülebilir. Albümin genellikle karaciğer biyosentezini daha iyi değerlendirmek için protrombin zamanı ve/veya uluslararası normalleştirilmiş oran (INR) ile birleştirilir. Bununla birlikte, serum albümin değerleri kronik karaciğer hastalığı durumlarında normal ve normal karaciğer fonksiyonu durumlarında anormal olabilir. Hipoalbüminemi, asitli karaciğer yetmezliği vakalarının yanı sıra böbrek veya konjestif kalp yetmezliğinde de görülebilir. Bu nedenle, değerlendirme ve tanısız çalışma sırasında hastanın tüm klinik bağlamı göz önünde bulundurulmalıdır (49).

Yetersiz beslenen bazı hastalarda hipoalbüminemi görülür. Açlığın etkileri hızlı bir başlangıç gösterebilir ve açlığın başlamasından sonraki 24 ila 48 saat içinde albüminde üçte bir oranında azalma olabilir. Ancak, yeterli beslenme ile 15 ila 30 dakika içinde karaciğer albümin sentezleme yeteneğini geri kazanır. Yetersiz beslenme cerrahi sonrası dönemde olumsuz olaylarla ilişkilendirildiğinden, beslenme optimizasyonu ve cerrahiye hazırlık için klinik bir ölçüt olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. Albümin, bir hastanın beslenme durumunu değerlendirmek için kullanılan birçok laboratuvar ölçümünden biridir. Diğerleri; pre-albümin, transferrin ve retinol bağlayıcı proteindir. Ancak, bu laboratuvar ölçümlerinin hiçbirisi tek başına yeterli değildir ve hastanın fizik muayenesi ile birleştirilmeleri gerekir. Hipoalbüminemi, anazarka ve malabsorpsiyonu olan hastaların tanı ve takibinde de faydalıdır (49).

Albümin karaciğerde çok az depolanır ve çoğu hızla kan dolaşımına verilir. Albümin dolaşıma girdiğinde, yaklaşık %30 ila %40'ı kan dolaşımında kalır ve geri kalanı interstisyel alana girer. Dolaşımdan ayrılan proteinin çoğunluğu daha sonra lenfatik sistem yoluyla dolaşıma geri döner. Albüminin dolaşımdaki yarı ömrü 16 saattir. Albüminin ozmotik etkisinin çoğunluğu büyük moleküler ağırlığına bağlanırken, geri kalanının negatif yükünden kaynaklandığı düşünülmektedir. Negatif yük özelliği albüminin pozitif yüklü molekülleri ve nihayetinde suyu intravasküler kompartmana çekmesini sağlar. Albümin onkotik basıncı etkileyerek, denkleme temsil edilen kapiller membran basıncı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (49):

$$CP = (cHP - iHP) - r \times (iOP - cOP)$$

CP: kapiler membran basıncı, cHP: kapiler hidrostatik basınç, iHP: interstisyel hidrostatik basınç, r: yansıma katsayısı, cOP: kapiler onkotik basınç, iOP: interstisyel onkotik basınçtır (49).

İnsanlarda serum albümini, plazma onkotik basıncının önemli bir modülatörüdür. Endojen ve eksojen ligandların taşıyıcısı olarak işlev görür. Serum albümini tarafından taşınan ligandlar arasında endojen olarak bilirubin, iyonlar, yağ asitleri, v.s. ve eksojen olarak ilaçlar bulunur. Albümin tarafından taşınan ilaçlar; metadon, propranolol, tiyopental, furosemid, warfarin, metotreksat, alfentanil ve diğerlerini içerir. Şiddetli karaciğer hastalığı hipoalbuminemiye neden olabilir, bu da ilaçlar için daha az bağlanma bölgesine yol açar. Bu da daha fazla miktarda bağlanmamış ilaçla sonuçlanır ve bu da ilaç duyarlılığının artmasına neden olabilir. Bu hassasiyet, hastaların serum albümin konsantrasyonları 2,5 g/dL'den düşük olduğunda ortaya çıkar (49).

Klinik tıpta, serum albümini standart serum laboratuvar testleri ile ölçülebilir ve bu ölçüm bireysel bir hastanın nutrisyonel durumu için bir belirteç olarak savunulmuştur (50).

Albümin aynı zamanda, özellikle travmada (ör. hipovolemik şok) veya büyük hacimli parasentez durumunda sıvı resüsitasyonuna ihtiyaç duyan hastalara uygulanan bir kolloid sıvıdır. Hastaların karaciğer fonksiyonları veya tüm vücut homeostazı için hayati önem taşıyan proteinleri ve faktörleri biyosentezleme becerileri hakkında, serum albümin düzeyi klinisyenlere yardımcı olabilir (51–53).

Albümin kan dolaşımında, interstisyel alanda ve diğer sıvılarda bulunabilir. Asit veya idrar gibi diğer sıvılarda yüksek konsantrasyonlarda bulunduğunda, genellikle altta yatan patolojinin bir göstergesidir (49).

Albümin seviyeleri, enflamatuvar bozuklukları ve diğer durumları olan hastalarda düşebilir. Bunun nedenleri; karaciğer tarafından albümin mRNA üretiminin azalmasına bağlı sentezin azalması, albümin katabolizmasının artması ve vasküler permeabilitenin artması olabilir (54).

Albümin, asiti olan hastaların tanısai çalışmasında ek bir faydaya sahiptir. Bir hastada konjestif kalp yetmezliği, karaciğer yetmezliği ve malignite dahil olmak üzere çok çeşitli nedenlerle asit olabilir. Bir klinisyen asit sıvısını boşaltmak için tanısai bir paracentez yapabilir ve bu sıvıdaki albümini serum albümin düzeyleriyle karşılaştırarak serum asit-albümin gradyanını (SAAG) hesaplayabilir (49):

$$SAAG = \text{Serum albümin} - \text{Asit albümin (49)}$$

SAAG'nin 1,1 veya daha yüksek olması konjestif kalp yetmezliği, hepatik siroz ve alkolik hepatit gibi portal hipertansif etiyolojiye bağlı asit olduğunu gösterir. SAAG'nin 1,1'den düşük olması peritoneal karsinomatozis, *M. tuberculosis*, nefrotik sendrom, pankreatit ve serozit gibi portal hipertansif olmayan bir etiyolojiye bağlı asiti gösterir (49).

2.5. Testosteron, SHBG ve Albümin İlişkisi

Sağlıklı yetişkin erkeklerde dolaşımdaki testosteronun, %44'ü spesifik olarak SHBG'ye, %50'si nonspesifik bir şekilde albümine, %3,5'i kortizol bağlayıcı globuline bağlıdır; %1-3'ü bağlanmamış ve serbesttir (1–3,55). Total testosteron hem bağlı formun hem de serbest formun bir kombinasyonudur (1). Biyoyararlı testosteron, testosteronun SHBG'ye bağlı olmayan formudur (30,31). Albümine bağlı testosteronun dokulara girmek için yeterince hızlı ayrışıp ayrışamayacağı tartışmalıdır (1). Ancak, albümine bağlı testosteronun biyolojik aktivitesini sergilemek için nispeten kolay bir şekilde ayrıldığına inanılmaktadır (30). Dolayısıyla, albümine bağlı testosteronun potansiyel biyoaktiviteye sahip olduğu varsayılmıştır (31). Testosteronun SHBG'ye bağlanması metabolik klerens hızını azaltır ve bağlı hormonun hücre içine difüzyonunu engeller (1). Ayrıca SHBG'ye bağlı testosteronun kapillerden geçişi sırasında hiç ayrışmadığı varsayılmıştır (31). Ancak, SHBG, testosteronun hücre alımı için gerekli bir kofaktör olabilir (1). Bununla birlikte, SHBG'ye bağlı olmayan testosteron ile serbest testosteron konsantrasyonları son derece iyi korelasyon gösterir ve çoğu durumda birbirinin yerine kullanılabilir (1).

Dolaşımdaki testosteronun hangi bileşenlerinin hedef dokular üzerinde biyoaktivite uygulayabildiğine ilişkin tartışmalar devam etmektedir. Geleneksel görüş,

bağlanmamış (serbest) testosteronun yalnızca nispeten küçük bir kısmının hücrelere girerek androjen reseptörüne bağlanabileceği ve hücrel bir yanıt oluşturabileceği yönündedir. Bugüne kadar, biyoyararlı testosteronun serbest testosterondan daha üstün bir androjenite belirteci olup olmadığı açık değildir (31).

2.6. Serbest Testosteron

2.6.1. Fizyoloji

Daha önce de bahsedildiği üzere, testosteron (T) plazmada ya serbest bir molekül (serbest testosteron / %2) olarak ya da albümin (gevşek bağlı / %50), SHBG (sıkı bağlı / %44) veya kortikosteroid bağlayıcı globulin (gevşek bağlı / %4) gibi proteinlere değişen afinitelerle kompleks oluşturmuş olarak dolaşır. Serbest testosterona ek olarak, biyolojik olarak aktif testosteron yaygın olarak rapor edilir [(Total T-SHBG'ye bağlı T)*100]. Total testosteronda olduğu gibi, serbest testosteron da günlük değişimlerden etkilenir; yaş ve VKİ ile ters ilişkilidir (55).

2.6.2. Düşük Serbest Testosteron İçin Eşik Değerler

İki önemli çalışma, düşük testosteron için 2,5. persentili belirlemek üzere toplum temelli değerlendirmeler yapmıştır. 3690 yaşlı erkekten (ortalama yaş 77) oluşan toplum temelli bir örnekleme, hesaplanan serbest testosteron seviyeleri 24,2 pg/mL (83,9 pmol/L) iken, kendilerini mükemmel veya çok iyi sağlıklı olarak tanımlayan ayrı bir kohort grubunda 29,9 pg/mL (103,7 pmol/L) olarak raporlanmıştır. Framingham Kalp Çalışması'ndan 19-40 yaş arası obez olmayan sağlıklı erkeklerle yapılan ikinci bir çalışmada hesaplanan serbest testosteron seviyeleri 70 pg/mL (242,7 pmol/L) olarak bildirilmiştir (55).

2.7. Serbest ve Total Testosteronun Klinik Önemi

Total testosteronun serbest testosterona kıyasla klinik önemi tartışmalıdır; birçok kişi serbest testosteronun yaşlanma, akut/kronik hastalıklar, hormonal

değişiklikler, obezite ve normal diurnal ritimlerle ortaya çıkan SHBG varyasyonları nedeniyle hipogonadizm için daha uygun bir ölçüm olduğunu öne sürmektedir (55).

Yaşlı erkeklerde total testosteron veya serbest testosteronun klinik değişkenlerle ilişkisini karşılaştıran sınırlı veriler, hesaplanan bioT ile kas gücü, kemik mineral yoğunluğu ve yağ kütlesi arasında total testostere kıyasla daha güçlü bir ilişki olduğunu göstermiştir. Diğer çalışmalar da serbest testosteron ile depresyon ve hipogonadal semptomlar dahil olmak üzere diğer komorbid durumlar arasında artmış ilişkiler olduğunu göstermiştir. Hem serbest testosteron hem de total testosteron, VKİ, erektil disfonksiyon ve libido azalması ile eşit derecede ilişkilidir (55).

Bununla birlikte, bu çalışmaların çoğu düşük serbest testosteron [50-65 pg/mL (173,4-225,4 pmol/L)] tanımındaki heterojenlik nedeniyle engellenmektedir; düşük serbest testosteron eşliğindeki artışlar total testostere kıyasla daha yüksek sensitivite ve daha düşük spesifite ile sonuçlanmaktadır. Bu durum, tek başına total testostere kıyasla serbest testosteron ile bildirilen daha güçlü ilişkileri açıklayabilir. Serbest testosteron ayrıca genç erkeklerde yaşlı erkeklere kıyasla daha iyi bir göstergedir; bu da SHBG'deki yaşa bağlı artışın serbest testosteronun spesifitesini daha da azaltabileceğini düşündürmektedir (55).

AR genindeki bulgulara benzer şekilde, SHBG polimorfizmleri de SHBG'nin kendisinin yanı sıra sistemik serbest testosteron ve E2'nin ekspresyonunu ve variabilitesini doğrudan etkilemektedir (55).

2.8. Biyoyararlı Testosteron (bioT)

Biyoyaralı testosteron, dolaşımdaki testosteronun SHBG'ye bağlı olmayan kısmıdır (31). Uygulamada, bioT genellikle serbest testosteron ve albümine bağlı testosteronun toplam konsantrasyonuna eşdeğer kabul edilir (30,31). BioT ölçülebilir ya da hesaplanabilir (31). Tipik olarak, SHBG ve SHBG'ye bağlı steroidlerin amonyum sülfat kullanılarak presipitasyonu ve ardından süpernatanttaki total testosteronun direkt ölçülmesiyle test edilir (31).

BioT ölçümü için alternatif bir yöntem; amonyum sülfat presipitasyonundan önce serumun ³H-testosteron ile ön inkübasyonunu içerir; süpernatantta kalan radyo-

etiketli izleyicinin yüzdesi daha sonra, bioT'yi elde etmek için total testosteron konsantrasyonu ile çarpılır (31).

BioT ölçümünün ana dezavantajlarından biri, yeterli SHBG presipitasyonuna, sıcaklığa ve kullanılan amonyum sülfat çözeltisinin konsantrasyonuna bağlı olmasıdır. Ayrıca, bioT analizleri kolayca otomatikleştirilemez ve bu nedenle çok az klinik laboratuvar rutin olarak bioT ölçümü yapmaktadır (31).

BioT hesaplaması için çeşitli denklemler (Vermeulen, Sodergard, Emadi-Konjin, Morris) önerilmiştir (1,31). Daha önce de bahsedildiği gibi, bioT'nin androjenitenin biyokimyasal bir belirteci olarak serbest testosterondan daha iyi olup olmadığı konusunda fikir birliği yoktur (31).

2.9. Serbest Androjen İndeksi (FAI)

Serbest testosteron indeksi olarak da bilinen FAI, ilk olarak Carter ve ark. (1983) tarafından hirsutizm ile başvuran kadınların araştırılması için tanımlanmıştır (31).

Şu formülle hesaplanır: $100 \times \text{total testosteron (nmol/L)} / \text{SHBG (nmol/L)}$ (31,56).

Matematiksel olarak hesaplanması kolay olsa da FAI, dolaşımdaki serbest testosteron konsantrasyonunu çok az gösteren boyutsuz bir parametredir (31). Ho ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, doğrusal regresyon analizi, FAI'nın hesaplanan serbest testosteronla zayıf korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur (56).

FAI, klinik uygulamada kadınlarda serbest testosteron durumunu tahmin etmek için sıklıkla kullanılır ancak, erkeklerde kullanılmamalıdır (31). Çünkü, FAI formülünün doğasında bulunan bazı varsayımlar erkekler için geçerli değildir (31). Erkeklerde sıklıkla bulunan düşük SHBG konsantrasyonları nedeniyle FAI, hesaplanan serbest testosteronu aşırı tahmin etme eğilimindedir ve erkeklerde serbest testosteron tahmininde yanıltıcı olabilir (31,56). Özetle; FAI, SHBG konsantrasyonunun bir fonksiyonu olarak değişkenlik göstermesi nedeniyle güvenilir bir serbest testosteron parametresi değildir (57).

2.10. Hesaplanan Serbest Testosteron

Literatürde, serum serbest testosteron hesaplaması için yayınlanmış en az altı farklı denklem bulunmaktadır ve iki ana kategoride gruplandırılabilir (31).

İlk olarak, bir ligandın (testosteron) iki proteine (SHBG ve albümin) bağlandığı varsayımıyla kütle etkisi yasasına dayanan denklemler. İkinci olarak, serbest testosteronun ampirik ölçümlerinden elde edilen denklemler. Kütle etkisi yasasına dayananlar Vermeulen ve ark. ile Sodergard ve ark.'nin denklemleri; serbest testosteronun ampirik ölçümünden elde edilenler Ly ve ark. ile Wheeler'in denklemleridir (1,56). Bu denklemlerin tümü total testosteron ve SHBG direkt ölçümünü içerir. Ayrıca, kütle etkisi yasasına dayanan iki denklem albümin konsantrasyonunu da gerektirir (31).

Yayınlanan denklemler arasında Vermeulen versiyonu literatürde en yaygın kullanılanı gibi görünmektedir ve orijinal çalışmada bu denklem kullanılarak hesaplanan serbest testosteron değerlerinin denge diyalizi ile ölçülen serbest testosteron ile iyi korelasyon gösterdiği gösterilmiştir (31). Çoğunlukla Vermeulen ve Sodergard yöntemleri ile elde edilen hesaplanmış serbest testosteron ve biyoyararlı testosteron konsantrasyonları endokrinoloji literatüründe yaygın olarak kullanılmaktadır (1).

Aynı total testosteron, SHBG ve albümin konsantrasyonları göz önüne alındığında, çeşitli denklemlerin birbirinden yaklaşık iki kata kadar farklı serbest testosteron değerlerine yol açabileceğine dikkat etmek önemlidir. Bu nedenle, farklı denklemler kullanılmışsa, farklı laboratuvarlar tarafından hesaplanan serbest testosteron değerleri karşılaştırılabilir olmayabilir (31).

Bugüne kadar, yukarıdaki denklemlerden hangisinin serum serbest testosteron konsantrasyonlarına en yakın değerleri verdiği bilinmemektedir (31).

2.11. Hormon Ölçüm Yöntemleri

Steroid hormon konsantrasyonlarını doğru ölçme performansı yöntemine göre değişir. Çok çeşitli klinik durumlarda, steroid hormonlarının yüksek özgüllük,

hassasiyet, doğruluk ve kesinlik ile doğru standardizasyona sahip teknikler kullanılarak ölçülmesi gerekir. Sonuçların güvenilir olmasını sağlamak, uygun karar verme için çok önemlidir ve yanlış tanı, uygunsuz tedavi ve gereksiz monitörizasyonu önler (58).

İlk steroid hormon ölçüm teknikleri kimyasal yöntemlere ve biyolojik deneylere dayanıyordu. Bu yöntemler sınırlı bir analitik hassasiyete (mg veya mcg/L konsantrasyonları) sahipti ve çoğunlukla idrardaki konjuge steroidlerin analizi ile sınırlıydı. RIA'nın ortaya çıkışı, steroid hormonlarının serum ve plazmada daha yüksek bir hassasiyet (ng veya pg/L) ve özgüllükle ölçülmesini mümkün kılmıştır. İlk RIA 1959 yılında geliştirilmiş ve başlangıçta peptid hormonlar (insülin) için tasarlanmıştır. Kullanımları daha sonra steroidler gibi daha küçük moleküllere genişletilmiş ve ilk olarak Abraham ve ark. tarafından estradiol RIA ile ölçülmüştür. Hormonların ölçümü için RIA testlerinin ortaya çıkması ve yerleştirilmesi, modern endokrinolojinin gelişiminde önemli bir rol oynamıştır (58).

Küçük moleküller için ilk immünölçümleri geliştiren araştırmacılar, bu tekniklerin zorluklarının ve sınırlamalarının farkındaydı. Steroid hormonların küçük boyutu ve düşük immünojenitesi, ek optimize edilmiş ön analitik adımların geliştirilmesini gerekli kılmış ve bu da bir steroid hormon için ilk immünölçümün geliştirilmesini geciktirmiştir. Steroid hormonlar kolesterolden orijin alan ve enzimatik dönüşümlerle sınırlı miktarlarda salınan lipid molekülleridir, bu nedenle yapı olarak çok benzerdirler. Bu ek ön analitik adımlar organik çözücülerle ekstraksiyon ve kromatografiyi içeriyordu. Bu adımlar serum, plazma ve idrar gibi biyolojik sıvılarda bulunan farklı steroid hormonları ayırmıştır. Bu şekilde, 70'li yıllarda iyi bir hassasiyet ve özgüllüğe sahip ilk serum steroid testleri geliştirilmiştir. Ancak, numunelerin manuel olarak işlenmesinin zaman alıcı olması nedeniyle bunların kullanımı özel laboratuvarlarla sınırlıydı. Önceki saflaştırma adımlarına sahip RIA'ların avantajları arasında, potansiyel olarak etkileşime giren metabolitlerin ortadan kaldırılması ve steroidleri (testosteron veya E2) serbest bırakan organik çözücülerle ekstraksiyon sırasında SHBG gibi taşıma proteinlerinin denatürasyonu yer alır. RIA'larda numune hacmi optimum hassasiyete göre ayarlanabilir. Ayrıca, kromatografi kullanılarak moleküler ağırlık ve polariteye göre ayrıldıktan sonra aynı numunede farklı steroidler ölçülebilir (58).

Önceki numune saflaştırma adımlarına sahip RIA'lar endokrinolojideki ilerlemelere önemli ölçüde katkıda bulunmuştur. Klinik tanı alanında, RIA'lar doğru tanı ve tedavi için çok önemli olmuştur. Bununla birlikte, bu testler radyasyon tesisleri gerektirdiğinden, zaman aldığından ve pek pratik olmadığından (yaklaşık 40 örnekte tek bir steroid hormonunu ölçmek iki gün sürer) bazı sınırlamalara sahiptir (58).

70'lerin sonunda, hedefe yönelik antikorların ve çift antikor tekniklerinin geliştirilmesi, daha önce bir numune saflaştırma adımı içermeyen doğrudan RIA'ların ortaya çıkmasını sağladı. 80'li ve 90'lı yıllarda radyoaktif RIA etiketlerinin yerini kemilüminesan, floresan veya enzimatik etiketler almıştır. Laboratuvar testlerine olan talepteki önemli artışla aynı zamana denk gelen bu yeni etiketler, daha fazla sayıda numunenin test edilmesini sağlayan daha basit ve otomatikleştirilebilir reaktif kitlerinin dahil edilmesini kolaylaştırdı (58).

Günümüzde, direkt kemilüminesans immünoassay (CLIA)'ler (önceden numune ekstraksiyonu olmadan) seks hormonlarının ölçümü için en sık kullanılan yöntemlerdir. Analitik sınırlamaları hızla tanımlanmış olmasına rağmen, 2000 yılına kadar popüler hale gelmemişlerdir. Bunun nedeni, mevcut yöntemlerin analitik performansına ilişkin kanıtların artması ve kütle spektrometresi tabanlı yöntemlerin kullanılabilirliğinin artmasıdır. Taieb ve ark. tarafından yayınlanan çalışma, değerlendirilen 10 testosteron immünölçümünün hiçbirinin çocuklarda ve kadınlarda sıklıkla bulunan değerler aralığında uygun bir analitik performansa sahip olmadığını ortaya koyduğu için bu alanda bir dönüm noktası olmuştur. Bu bulgu, çeşitli klinik senaryolarda tekniklerin klinik kullanışlılığına meydan okumuştur. Testosteron tayini ile ilgili bu bulgular sonraki çalışmalarda tekrarlanmış ve östradiol gibi diğer analitlere de genişletilmiştir. Lee ve ark. ile Stanczyk tarafından yapılan ve MS'i referans alan çalışmalar, immünölçümlerin menopoza sonrası kadınlarda serum E2 konsantrasyonlarını kesin ve doğru bir şekilde ölçemediğini göstermiştir (58).

Testosteron da dahil olmak üzere steroid seks hormonlarını gerekli doğruluk, tekrarlanabilirlik ve hassasiyetle ölçmenin zorlukları ışığında, 2007 yılında Endokrin Derneği, dolaşımdaki testosteron seviyelerini ölçmek için referans yöntem olarak MS tabanlı tekniklerin kullanılmasını tavsiye etmiştir. Birkaç yıl sonra Endokrin Derneği, Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezleri (CDC) ile birlikte testosteron analizlerini

standartlaştırmak için bir konsensüs bildirisi yayınladı. Ardından CDC, testosteron ölçümlerinin standardizasyonunu amaçlayan bir program olan Hormon Standardizasyon Programı (HoSt)'nı başlattı. Amaç, testosteron analizlerinin tekrarlanabilirliğini, biasını, total analitik hatasını ve karşılaştırılabilirliğini geliştirmektir. Son olarak 2013 yılı, testosteron ölçümü için Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (NIST) tarafından hazırlanan izlenebilir ve değiştirilebilir bir referans malzeme olan Standart Referans Materyal (SRM) 971'e kalibre edilmiş bir LC-MS/MS testinin geliştirilmesine ve validasyonuna tanıklık etmiştir. CDC standardizasyon programı çerçevesindeki gözetim, MS bazlı tekniklerin immünolojik testlerden daha üstün olduğunu tutarlı bir şekilde göstermektedir, ancak immünölçümlerde bazı iyileştirmeler yapılmıştır (58).

2.11.1. Analiz Öncesi Hususlar

Analitlerin ölçümü için analitik öncesi koşullar çok önemlidir. Bu nedenle preanalitik koşulların çok iyi kontrol edilmesi gerekmektedir (58).

Testosteron salgılanması sirkadiyen bir ritimle olur; değerler 8 a.m.'de zirveye ulaşır ve 8 p.m.'de düşer. %36'luk varyasyonlar rapor edilmiştir; bu nedenle testosteron testinde sabahın erken saatlerinde kan alınmalıdır. Testosteronun çoğunluğu SHBG'ye (yüksek afiniteli, düşük kapasiteli bağlanma) ve albümine (düşük afiniteli, yüksek kapasiteli) bağlı olarak dolaşırken, küçük bir kısmı bağlanmamış (serbest) olarak dolaşarak hedef dokulara ulaşır. Serbest testosteron, hedef hücrelerde sitozolik reseptörüne bağlanan, hücre çekirdeğine giren ve DNA'ya özgü AR elemanlarına bağlanan DHT'ye dönüşür. Bu amaçla serbest fraksiyon, DHT'nin etkisi ile daha doğrudan ilişkilidir ve klinik uygulama için daha uygundur (58).

Ancak serbest testosteronun doğru ölçümü klinik laboratuvarlar için bir zorluktur. Ticari olarak satılan immünölçümler olmasına rağmen bunların önemli limitasyonları olduğu bilinmekte ve klinikte kullanımı önerilmemektedir. Serbest testosteronu ölçmek için altın standart yöntemler arasında ultrafiltrasyon veya denge diyalizi sonrası yapılan ölçümler bulunur. Bu tekniklerin kullanılması, RIA veya MS ölçümü öncesinde serbest testosteronun bağlı testosterondan ayrılmasını sağlar.

Ancak, bu yöntemler teknik açıdan karmaşıktır ve çoğu klinik laboratuvarında mevcut değildir. Alternatif olarak, total testosteron, SHBG ve albümini dikkate alan denklemler kullanılarak serbest testosteronun belirlenmesi önerilir (58).

2.11.2. Analizin Zorlukları ve İmmünolojik Testlerin Avantajları ve Sınırlamaları

Optimum preanalitik koşullar sağlandığında, test sonuçlarının klinik değeri, uygun bir ölçüm yönteminin kullanılmasına büyük ölçüde bağlıdır. Serumdaki steroid hormonlarının klinik veya araştırma amaçlı ölçümü zordur. Birincisi, yapısal olarak benzer çok sayıda endojen ve eksojen metabolit (kolesterol türevi moleküller) vardır. İkincisi, klinik olarak ilgilenilen konsantrasyon aralığı çok geniştir. Son olarak, serbest ve dolaşımdaki proteine bağlı formların varlığı ölçümü zorlaştırır. İmmünölçümler bu karıştırıcı faktörlerin bazılarına karşı hassas olmasına rağmen en yaygın kullanılan yöntemlerdir. Çok sayıda bilimsel topluluk, önemli ölçüde daha doğru ve hassas oldukları için immünölçümler yerine MS tabanlı yöntemlerin kullanılması gerektiğini savunmaktadır (58).

Otomatik immünölçümlerin bir avantajı, sadeliği ve nispeten düşük bir maliyetle çok sayıda numuneyi hızlı bir şekilde ölçme kapasitesidir. Sınırlamalarından bazıları, kullanılan antikorların spesifik olmamasıdır; bu da analite benzer moleküllerle çapraz reaktivite nedeniyle konsantrasyonların olduğundan fazla ölçülmesine neden olabilir. Ayrıca, kalibratör ve serum numunelerinin farklı matrislere sahip olması ayrı bir analitik zorluğa sebep olmaktadır. Son olarak, otomatik immünölçümler testosteron veya E2'yi SHBG'den ayırmada daha fazla zorluk gösterebilir ve genel olarak düşük konsantrasyonlarda steroid hormonlarının tespit edilmesini engelleyen sınırlı bir duyarlılığa sahiptir (58).

Testosteron için CDC'ye göre referans metot olan LC-MS/MS'e göre immünölçümlerin doğruluğunun değerlendirilmesinde, 0,435 ng/mL'lik bir konsantrasyon için önemli sapmalar olduğunu ortaya konulmuştur (Üreticilere göre ortalama bias: Abbott Architect %30, Beckman Coulter %83-89, Siemens %8,5-22,7, Roche Cobas %48, Tosoh Bioscience %37). Kadınlar için referans aralığında olan bu

aynı konsantrasyon için farklı immünölçümler için bildirilen sonuçlar 0,344 ila 0,878 ng/mL arasında değişmektedir. Presizyon, daha yüksek testosteron değerleri (1,6 ve 5,34 ng/mL) için çoğu durumda %20'den az bias ile beraber iyileşmiştir. E2 ile ilgili olarak, erkek serum örneklerinde ticari popüler immünölçümler (Siemens Centaur, Siemens IMMULITE, Abbott ARCHITECT, Roche Cobas), 25. persentil (0,062 ng/mL) için %11-74 ve ortalama değer (0,082 ng/mL) için %12-53 pozitif bias göstermiştir (58).

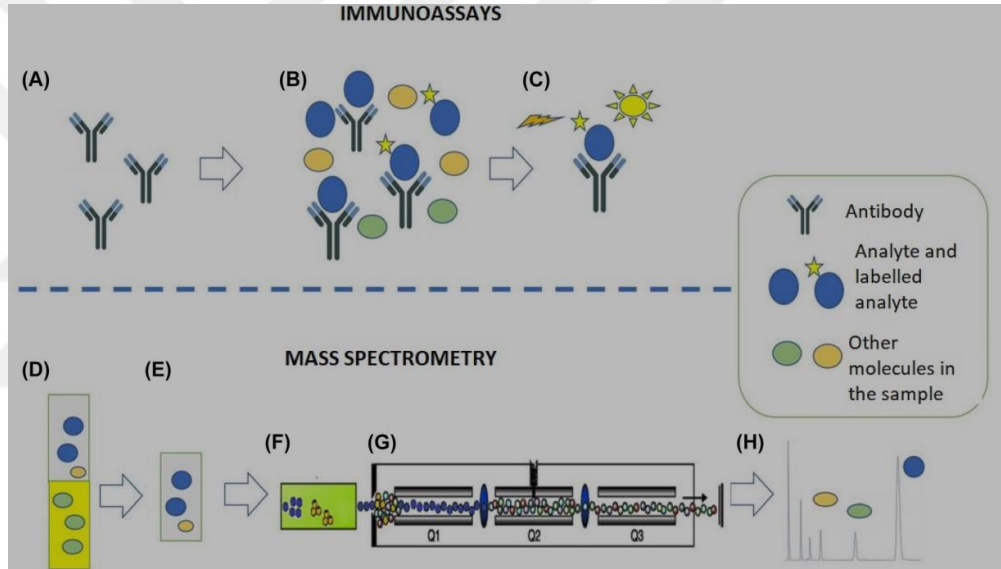
DHEA-S, testosteron immünölçümlerinde potansiyel bir interferan faktör olarak tanımlanmış ve aşırı tahmine neden olduğu öne sürülmüştür. Testosteronun fazla tahmin edilmesi, nispeten düşük konsantrasyonlar test edildiğinde kritik önem taşır. Kadınlar, çocuklar ve testosteron konsantrasyonunun cerrahi/kimyasal kastrasyon kriteri olarak kullanıldığı prostat kanseri takibindeki erkekler için durum böyledir. Ayrıca 11-ketotestosteron veya 11-hidroksitestosteron gibi diğer endojen metabolitlerle de çapraz reaksiyonlar vardır. Testosteron test antikorları ayrıca nandrolon, danazol veya noretisteron gibi sentetik steroidlerle çapraz reaksiyon gösterebilir. E2 immünölçümleri söz konusu olduğunda, moleküler benzerlikleri nedeniyle eksemestan gibi aromataz inhibitörleriyle çapraz reaksiyonlar özel bir öneme sahiptir (Androstenedion immünölçümleri de eksemestan ile çapraz reaktivite nedeniyle yanlış yüksek konsantrasyonlar verebilir). Aromataz inhibitörlerinin etkinliği E2 seviyelerine göre değerlendirildiğinden, bu çapraz reaktivitenin önemli bir klinik etkisi vardır. Fulvestrant gibi östrojen reseptör antagonistleri ile çapraz reaktivite de tanımlanmıştır. Steroid hormonların analizinde spesifik bir interferansın oluşumu ve derecesi, bu immünölçümde kullanılan antikorlara bağlıdır ve üreticiler arasında önemli farklılıklar vardır (58).

2.11.3. Kütle Spektrometrisinin Katkısı

Bu steroid analitlerin saptanması, benzer yapıya sahip veya ölçüm prosedürüne müdahale eden diğer analitlerden (monoklonal antikorlar, biyolojik ilaçlar vb. içeren yeni tedaviler) kaynaklanan girişimlerden arındırılmış yöntemlere dayanmalıdır. Test yöntemleri ayrıca belirli fizyolojik (pediatrik veya kadın numunelerinde) veya

patolojik ortamlarda olduğu gibi düşük konsantrasyonları ölçebilmek için yeterli hassasiyete sahip olmalıdır (58).

Bu doğrultuda, MS çeşitli klinik senaryolarda immünölçümlerin sınırlamalarının üstesinden gelmeyi mümkün kılmaktadır. İki teknik (immünölçüm ve MS) farklı temellere sahiptir. Birden fazla immünölçüm ve MS metodu olmasına rağmen, genel anlamda immünölçüm antijen-antikor reaksiyonlarına dayanırken, MS doğrudan analitlerin yapısal özelliklerine (kütle ve kütle spektrumu) dayanmaktadır (Şekil 5) (58).



Şekil 5: İmmünölçümler. (A-C) Yarışmalı CLIA örneği. (A) Bu yöntemle, spesifik bir antikor ilgili analiti tanır. (B) Antikor, numune (ilgili analit ve diğer molekülleri içeren) ve işaretli analit ile inkübe edilir. Analit ve işaretli analit, antikor bağlanma bölgeleri için yarışmaya girer. (C) Bağlı işaretli analit tarafından üretilen kemilüminisans sinyali kaydedilir. Bu örnekte, kaydedilen sinyal başlangıçta numunede bulunan analit miktarı ile ters orantılı olacaktır. (D-H) MS. Sıvı kromatografi tandem-MS (LC-MS/MS) örneği. (D) ve (E) Organik bir çözücü kullanılarak bir serum örneğinin ekstraksiyonu. Bu adım potansiyel interferansları ortadan kaldırır. (F) Numune bileşenlerinin sıvı kromatografisi ile separasyonu. (G) Analite özgü iyonların seçimi. (H) Sonuçların gösterimi. Kromatografik pik alanı, numunede başlangıçta bulunan analit miktarı ile doğru orantılıdır (58).

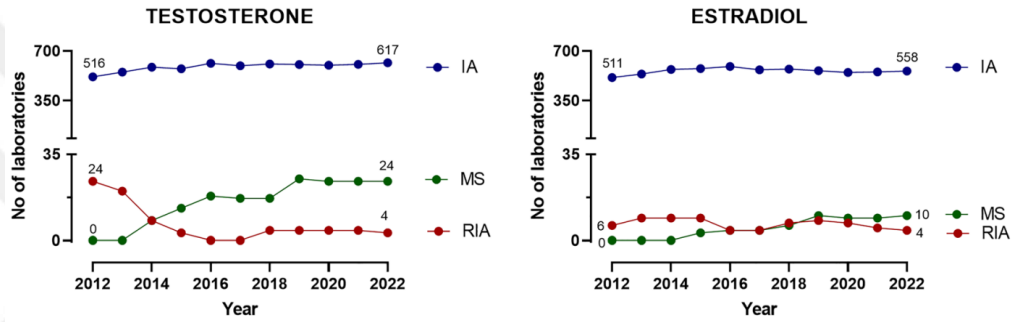
Yüksek *impact*'lı dergiler, araştırmacıların uygun performansa sahip hormon test yöntemlerini kullanmalarını giderek daha fazla talep etmektedir; bu da hormon testlerinde analitik performansın önemini yansıtmaktadır. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, steroid hormonlarının primer son nokta olduğu araştırma çalışmalarının yayınlanması için MS kullanımının gerekli olacağını bir baş yazı ile duyurmuştur (58).

Yaygın CLIA'larının MS tabanlı testlere karşı avantaj ve limitasyonları vardır (58):

- İmmünölçümlerin avantajları; iyi tekrarlanabilirlik, numune ön hazırlama olmaması, hızlı, yüksek sayıda numune çalışılabilmesidir.
- İmmünölçümlerin limitasyonları; çapraz reaktivite, matriks etkisi, heterofil antikorların interferansı, bazı analitler için ticari immünoassaylerin bulunmaması, üreticiler arasında farklılık (standardizasyon yetersizliği), sıklıkla eş zamanlı tek parametre ölçülebilmesi.
- MS tabanlı testlerin avantajları; yüksek spesifite (çapraz reaktivite yokluğu), ticari olarak temin edilebilen bir immünoassay olmadan moleküllerin analizi, birçok metabolitin eş zamanlı belirlenmesi (endekslerin veya profillerin karakterizasyonu).
- MS tabanlı testlerin limitasyonları; sıklıkla numune hazırlığı gerekir, daha uzun analitik süreç, yüksek kompleksite, daha az numune çalışılması, yüksek ekipman maliyeti.

İmmünölçümler hızlı ve tekrarlanabilir, bu da yüksek iş yüklerinin uygun şekilde ele alınmasını sağlar. Buna karşılık, MS yüksek analitik özgüllüğe sahiptir (endojen veya eksojen metabolitlerle, yani ilaçlarla çapraz reaksiyonların olmaması), daha düşük matris etkisine sahiptir ve heterofil antikorların girişiminden etkilenmez. MS'nin diğer avantajları arasında çok yönlülüğü (neredeyse tüm analitleri ölçer) veya aynı örnekten birkaç biyobelirteç profilini veya panelini aynı anda ölçme kapasitesi yer alır. Yüksek özgüllüğü laboratuvarlar arası değişkenliği en aza indirir, bu da klinik

karar için referans aralıklarının veya eşik noktalarının oluşturulmasını kolaylaştırır. Bununla birlikte, MS önemli ölçüde masraf gerektiren nispeten pahalı ekipmanların kullanılmasını gerektirir. Bu teknik ayrıca numune ön hazırlığı gerektirir ve yüksek iş gücü vardır (yüksek eğitilmiş personel gereklidir) ve daha uzun bir geri dönüş süresine sahiptir. Bu dezavantajlar klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımını sınırlamaktadır. Avrupa dış kalite kontrol programları, klinik laboratuvarlarda MS kullanımının giderek arttığını ortaya koymaktadır (Şekil 6) (58).



Şekil 6: Almanya Biyoanaliz için Referans Enstitüsü'nün Avrupa Dış Kalite Kontrol Programı'na uygun olarak, CLIA, MS ve RIA metoduyla testosteron ve E2 ölçümü yapan laboratuvarların sayısı (58).

2.11.3.1. Kütle Spektrometrisinin Daha Yararlı Olduğu Klinik Senaryolar

Steroid hormon analizleri farklı konsantrasyonlar için hassas, spesifik, doğru ve kesin olmalıdır. MS özellikle çeşitli klinik ortamlarda kullanışlıdır (58).

2.11.3.1.1. Hassasiyet: Düşük konsantrasyonlarda steroid ölçümü

Düşük konsantrasyonlarda E2 ölçümü, aromataz inhibitörleri ile tedavi edilen meme kanserli hastaların gözetimi gibi özel durumlarda (endojen östradiol konsantrasyonlarının baskılanması gerektiğinde) önemlidir. Testler, menopozdaki kadınlar için 10-15 pg/mL olan tedavi öncesi konsantrasyonlardan <1 pg/mL olan baskılanmış konsantrasyonları ayırt etmelidir. Benzer şekilde, endometriozis veya

leiomyom gibi diğer hastalıkları olan ve blokaj ve replasman (düşük doz östrojen ile birlikte tıbbi kastrasyonu indüklemek için GnRH agonisti) tedavileri alan kadınlar, dolaşımdaki östrojenlerin beklenen düşük konsantrasyonları için yeterli hassasiyete sahip spesifik bir ölçüm tekniğinin olmaması nedeniyle uygun şekilde izlenemez (58).

Yaşlı erkek ve yaşlı kadınlar 5-30 pg/mL arasında değişen düşük E2 konsantrasyonlarına sahiptir. Bazı durumlarda, düşük konsantrasyonları ölçme yeteneği, androjen deprivasyon tedavisi alan prostat kanserli erkekler gibi hastalar için yararlı olabilir. Bu ortamda östrojen tayini, kemiklerde ve kalpte tedaviye verilen yanıtın değerlendirilmesine ve metabolik durumun değerlendirilmesine yardımcı olabilir (58).

Çocuklarda puberte gelişimini izlemek için steroid hormonları düşük seviyelerde yüksek doğrulukla ölçmek gerekir. Bu durum, ergenlik öncesi çocuklar ve santral, periferik veya mix puberte prekoksli hastalar için özellikle önemlidir. Çocukluk döneminde normal konsantrasyon aralıklarının tanımlanması da önemlidir. Yaşamın bu evresinde, nadiren de olsa, bazı gonadal tümörler insan koryonik gonadotropini (HCG) salgılar ve genellikle yöntemin saptama sınırının altında kalan seks hormon üretimine neden olur (58).

2.11.4. Testosteron Testi

Polikistik over sendromu (PCOS) ve diğer androjen fazlalığı formları olan hastaların çoğu, çoğu immünölçümün sensitivite ve/veya spesifite eksikliği nedeniyle yeterince değerlendirilememektedir. Bazı çalışmalar, PCOS'un klinik tablosu ile serbest testosteronun, total testosterondan daha iyi korelasyon gösterdiğini ortaya koymuştur. Bununla birlikte, altın standart yöntemi ultrafiltrasyon veya denge diyalizine dayanan serbest testosteron ölçümü, yaygın klinik laboratuvarlarda mevcut değildir. Serbest testosteron tahmini için kullanılan formüller, total testosteronun kesin ve doğru bir yöntemle ölçülmesini gerektirir. Bu durumda, hesaplama formüllerinin performansı ultrafiltrasyon veya denge diyalizine dayalı ölçümlerinkine benzerdir. 2009 yılından bu yana *Androgen Excess & PCOS Society*, total testosteron testi için altın standart olarak LC-MS/MS kullanılmasını önermektedir. Bu dernek ayrıca bu

hastalarda biyokimyasal hiperandrojenizmi tahmin etmek için tercih edilen yöntem olarak SHBG ve albümin kullanarak serbest testosteron hesaplanmasını önermektedir (58).

Başka bir yayında total testosteron için ID/GC-MS referans yöntem olarak belirtilmektedir (31).

Yüksek hassasiyetli yöntemlerin gerekli olduğu diğer durumlar arasında, endojen testosteronu baskılamak için kimyasal kastrasyona tabi tutulan prostat kanserli hastaların takibi, erken veya gecikmiş pubertenin değerlendirilmesi yer alır (58).

Sonuçlar laboratuvarlar arasında karşılaştırılabilir olmalıdır. Tekrarlanabilir veriler, testleri farklı laboratuvarlarda farklı yöntemler kullanılarak gerçekleştirilen hastaların analizi ve kontrolü için gereklidir. Uygun şekilde standardize edilmiş tekniklerin yaygın kullanımı, belirli bir merkezde takip edilen hastaların testler arası doğruluk ve laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (*reproducibility*) eksikliği nedeniyle başka merkezlere sevk edilmesini önleyecektir (58).

Steroid hormon tayininde, özellikle yüksek sensitivite ve spesifite gerektiğinde MS'nin metodolojik olarak üstün olduğu gösterilmiştir. Tüm ölçüm teknikleri standardize edilmediği sürece, hizmet verilen popülasyon için Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI)'nin laboratuvarlar arası tekrarlanabilirlik (*reproducibility*), sensitivite ve doğruluk kriterlerini karşılayan valide yöntemlerin kullanılması önerilir. Buna ek olarak, her laboratuvar kendi referans aralıklarını tanımlamalıdır. İmmünölçümler, referans aralıktaki konsantrasyonlara sahip erkeklerde total testosteron ve premenopozal kadınlarda E2 ölçümü için bir şekilde yararlı olsa da, son on yılda yapılan çalışmalar, özellikle steroid hormonlarının uygun şekilde belirlenmesi için MS tabanlı tekniklerin kullanılmasını sürekli olarak önermektedir (58).

Öte yandan, çok az laboratuvar MS tabanlı teknikleri gerçekleştirecek uzmanlığa sahiptir. Rutin klinik tanı laboratuvarlarında total testosteron, genellikle piyasada bulunan otomatik immünölçümler kullanılarak ölçülür. Sağlıklı erkekler için referans aralıkta bulunan serum total testosteron konsantrasyonlarında immünölçüm yöntemlerinin performansı genel olarak tatmin edici olsa da, hipogonadal erkeklerde

bulunan daha düşük konsantrasyonlarda bu testlerin doğruluğu sorunlu olabilir. Tüm immünölçümler için doğruluk ve kesinlik açısından yöntemle ilgili farklılıklar vardır ve testosteron için şu anda mevcut olan immünölçümler için de bu durum geçerlidir. LC-MS/MS, tanı laboratuvarlarında giderek daha yaygın olarak kullanılmakta ve birçok kişi tarafından serum total testosteron ölçümünde güvenilir ve doğru bir yöntem olarak kabul edilmektedir. Ancak, LC-MS yöntemlerinin doğruluğu; numune ekstraksiyon prosedürü ve kalibrasyonun güvenilirliğine bağlıdır (31).

2.11.4.1. Elecsys Testosterone II İmmünölçümü

Elecsys Testosterone II testinde, özellikle testosterona karşı yönlendirilmiş yüksek afiniteli bir monoklonal antikorla (koyun) yarışmalı test prensibi kullanılır. 2-bromoestradiol ile bağlayıcı proteinlerinden ayrılan endojen testosteron, biotinlenmiş testosterona özgü monoklonal antikordaki bağlanma yerleri için rutenyum kompleksi [Tris(2,2'-bipiridil) rutenyum(II)-kompleksi ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$)] ile işaretlenmiş ilave testosteron türeviyle yarışır (59).

2.11.4.1.1. Test Prensibi

Yarışmalı test prensibidir (59).

1. inkübasyon: 20 μL numune, rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş testosteron türevi, testosterona özgü biotinlenmiş monoklonal antikor ile inkübe edilir. İşaretlenmiş antikorun bağlanma yerleri konsantrasyona bağımlı olarak numune analiti ile dolu hale gelir (59).

2. enkübasyon: Oluşan antijen-antikor kompleksi, streptavidin kaplı mikropartiküller sayesinde, biotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla katı faza bağlanmış hale gelir (59).

Reaksiyon karışımı ölçüm hücresi içine aspire edilir ve burada, manyetik mikropartiküller sayesinde elektrodun yüzeyine manyetik olarak tutunurlar (59).

Bundan sonra bağlanmamış maddeler *ProCell M* ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması elektrokemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir *fotomultiplier* ile ölçülür (59).

Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyonla cihaza özgü bir şekilde oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi ile belirlenir (59).

2.11.5. Serbest Testosteronun Ölçümü

Serbest testosteron ya doğrudan testlerle ya da yayınlanmış birkaç farklı hesaplama yoluyla dolaylı olarak ölçülür. Şu anda, serbest testosteron ölçümü için altın standart yöntem, serbest testosteronun düşük moleküler ağırlıklı yarı geçirgen bir membrandan diferansiyel geçişini sağlayan denge diyalizi sonrası MS tabanlı teknikler ile ölçümüdür (55,60). Ancak, denge diyaliz metodu pahalıdır, zaman alıcıdır ve rutin klinik kullanım açısından pratik değildir (60).

Denge diyaliz metoduna ek olarak analiz öncesi ultrafiltrasyon yöntemini de altın standart metot olarak kabul eden yayınlar mevcuttur. Her iki yöntem de testosteronun sadece bağlanmamış fraksiyonun (serbest testosteron) geçişine izin veren yarı geçirgen bir membran kullanılarak ayrılmasını içerir (31).

Literatürde bioT, FAI ve serbest testosteron için çok sayıda tahmin denklemi tanımlanmıştır ve sonuçlar direkt testlerle yüksek korelasyon olduğunu göstermektedir. Çeşitli çalışmalar, hesaplanan serbest testosteronun prediktif doğruluğunu değerlendirmiş, 1072 erkek üzerinde yapılan bir çalışmada hesaplanan değerler, testle belirlenen bioT ile karşılaştırılmıştır. Sonuçlar, total testosteron kullanılarak yüksek prediktivite sağlandığını ($r^2=0,68$) ve total testosteronun biyokimyasal hipogonadizmi belirlemek için test edilen diğer yöntemlerden daha iyi olduğunu göstermiştir (AUC; TT=0,93, FAI=0,72, Wheeler hesaplaması=0,91, Vermeulen hesaplaması=0,88). Daha düşük total testosteron seviyelerinde [216-346 ng/dL (7,5-12 nmol/L)], serbest testosteronun tek başına total testosteronundan daha üstün olduğu bulunmuştur. Bu bulgular, hesaplanan serbest testosteron veya bioT'nin tanıyı doğrulamaya yardımcı olabileceği; sınırda düşük total testosteron vakaları dışında total testosteronun hipogonadizmin daha iyi bir göstergesi olabileceğini

düşündürmektedir. ASA, EAA, EAU, ISA ve ISSAM'ın güncel kılavuzları, sınırdaki düşük total testosteron vakalarında serbest testosteronun doğrulayıcı bir belirteç olarak kullanılmasına yönelik bu stratejiyi benimsemiştir (55).

Serbest testosteron hesaplamalarının prediktif doğruluğunu değerlendiren bir çalışmada, Sartorius ve ark., hesaplanan serbest testosteronun ampirik yöntemlerinin (Ly, Sartorius) en uyumlu olduğu; diğer denklemlerin (Vermeulen, Wheeler, Sodergard) gerçek değerden fazla tahmin edilmesine neden olduğu sonucuna varmıştır (55).

Ho ve ark.'nin yaptığı bir çalışmada, Vermeulen denklemiyle hesaplanan serbest testosteron ($sT_{Vermeulen}$) değerleri genel olarak Wheeler denklemiyle hesaplanan serbest testosteron ($sT_{Wheeler}$) ve Sodergard denklemiyle hesaplanan serbest testosteron ($sT_{Sodergard}$) değerlerinden daha düşük; ancak Ly denklemiyle hesaplanan serbest testosteron (sT_{Ly}) değerinden daha yüksek bulunmuştur. Ayrıca, $sT_{Sodergard}$; $sT_{Vermeulen}$ ve sT_{Ly} 'a karşı pozitif, $sT_{Wheeler}$ 'a karşı negatif biasa sahip bulunmuş. Yine, $sT_{Wheeler}$ 'in $sT_{Sodergard}$, $sT_{Vermeulen}$ ve sT_{Ly} 'a karşı pozitif biasa sahip olduğu bulunmuştur. sT_{Ly} ise, diğer üç denklem kullanılarak elde edilen sonuçlardan önemli ölçüde daha düşük bulunmuştur (56).

2.11.5.1. Serbest Testosteron Hesaplamasında Kullanılan Algoritmalar

Serbest testosteron ve bioT konsantrasyonları, yayınlanmış çeşitli algoritmalar kullanılarak da hesaplanabilir. Serbest testosteron ve bioT'yi hesaplamak için en yaygın kullanılan iki denklem Vermeulen ve ark. ve Sodergard ve ark. tarafından açıklananlardır. Bu algoritmalar, total testosteron, SHBG ve albümin konsantrasyonları ile testosteronun SHBG (k_t) ve albümine (k_{at}) bağlanma sabitleri bilindiğinde serbest testosteron ve bioT'nin hesaplanabileceğini varsayar. Bu hesaplamalar, testosteronun SHBG ve albümine bağlanması için birleşme sabitinin uygun bir şekilde tahmin edilmesine bağlıdır. Bununla birlikte, çeşitli yöntemlerle ölçülen k_t için $5,97 \times 10^8$, 10^9 , 16×10^8 ve 19×10^8 gibi değerler bildirilmiştir. Çoğu yayında serbest testosteron veya bioT'nin hesaplanması için belirli bir yöntemin seçilmesine ilişkin herhangi bir argüman sunulmamaktadır; ancak yukarıda

açıklandığı gibi, belirli bir sabitler kümesinin seçilmesi, hesaplanan serbest ve biyoyararlı testosteron konsantrasyonlarının sonuçlarını açıkça etkileyecek ve dolayısıyla analizlerin sonuçlarını etkileyebilecektir (1).

2.11.5.1.1. Vermeulen ve ark. ve Sodergard ve ark.'nin serbest testosteron (sT) hesaplaması için denklemi ile Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ve Emadi-Konjin ve ark.'nin bioT hesaplaması için denklemi (1,56)

$$\text{bioT} = k_{at} \times \text{albümin} \times sT / (1 + k_{at} \times sT) + sT$$

$$sT = \{-1 - k_t \times \text{SHBG} - k_{at} \times \text{albümin} + (k_{at} + k_t) \times \text{TT} + \sqrt{[1 + k_t \times \text{SHBG} + k_{at} \times \text{albümin} - (k_{at} + k_t) \times \text{TT}]^2 + 4 \times [k_{at} + k_t + k_{at} \times k_t \times (\text{SHBG} + \text{albümin} - \text{TT})] \times \text{TT}}\} / \{2 \times [k_{at} + k_t + k_{at} \times k_t \times (\text{SHBG} + \text{albümin} - \text{TT})]\}$$

Tüm denklemlerdeki albümin, SHBG, sT, bioT ve TT (total testosteron) için birimler mol/L'dir.

$$(56) sT_{\text{Vermeulen}} = \{\text{TT} - \text{albümin} \times 0,5217 - 1 - \text{SHBG} + \sqrt{[(\text{albümin} \times 0,5217 + 1 + \text{SHBG} - \text{TT})^2 + 4 \times (\text{albümin} \times 0,5217 + 1) \times \text{TT}]} / [2 \times (\text{albümin} \times 0,5217 + 1)]$$

Denklemdaki SHBG, sT, ve total testosteron (TT) için birimler nmol/L; albümin için g/L'dir.

Testosteronun SHBG ve albümine bağlanması için afinite sabitleri, Sodergard ve ark. tarafından önerilen $5,97 \times 10^8$ L/mol (SHBG) ve $4,06 \times 10^4$ L/mol (albümin); Vermeulen ve ark. tarafından önerilen 10^9 L/mol (SHBG) ve $3,6 \times 10^4$ L/mol (albümin); Emadi-Konjin ve ark. tarafından önerilen $1,4 \times 10^9$ L/mol (SHBG) ve $1,3 \times 10^4$ L/mol (albümin)'dür (1).

2.11.5.1.2. Morris ve ark.'ye göre bioT için hesaplama denklemi (1)

$$\text{bioT (nmol/L)} = e^{[-0,266 + 0,955 \times \ln(\text{TT}) - 0,228 \times \ln(\text{SHBG})]}$$

Denklemdaki SHBG ve TT için birimler nmol/L'dir.

2.11.5.1.3. Ly ve ark.'ye göre sT için hesaplama denklemi (1,56)

$$\text{sT (pmol/L)} = -52,65 + 24,4 \times \text{TT} - 0,704 \times \text{SHBG} - 0,0782 \times \text{TT} \times \text{SHBG} - 0,584 \times \text{TT}^2$$

Denklemdaki SHBG ve TT için birimler pmol/L'dir.

Bir çalışmada bioT farklı denklemlerle hesaplandığında, testosteronun SHBG'ye bağlanması için farklı ilişki sabitlerinden beklendiği gibi, ortalama bioT_{Sodergard} en yüksek bulunmuş, bunu bioT_{Vermeulen}, bioT_{Morris} ve bioT_{Emadi-Konjin} izlemiştir (1). Ayrıca, total testosteron ve bioT_{Morris} konsantrasyonları arasında güçlü korelasyon bulunmuş; değişen SHBG konsantrasyonlarının bioT_{Morris} konsantrasyonu üzerindeki etkisinin sınırlı olduğu gösterilmiştir (1). Serbest testosteron için en yüksek değer sT_{Sodergard}'da iken, bunu sT_{Vermeulen} ve sT_{Ly}'nin izlediği bulunmuştur (1).

Vermeulen ve Sodergard denklemleri, total testosteron, SHBG ve testosteronun albümin ve SHBG'ye bağlanması için birleşme sabitlerinin bioT ve serbest testosteronu hesaplamak için kullanıldığı kütle etkisi yasasına dayanmaktadır (1).

Emadi-Konjin ve ark. ile Morris ve ark. ilk olarak amonyum-sülfat presipitasyonu ile bioT'yi ölçmüş ve bu sonuçları total testosteron ve SHBG konsantrasyonlarını kullanarak, diğer numunelerdeki bioT konsantrasyonlarını tahmin etmek için bir algoritma oluşturmak için kullanmışlardır (1).

Ly ve ark. ilk olarak 4000 örnekte serbest testosteronu tahmin etmek için bir ultrafiltrasyon testi kullanmışlardır. Daha sonra bu numunelerde serbest testosteronu tahmin etmek için 2 regresyon modeli oluşturdular: <5 nmol/L total testosteron konsantrasyonları için bir denklem ve >5 nmol/L için bir denklem (1).

2.11.5.1.4. Wheeler'e göre serbest testosteron için hesaplama denklemi (20)

Wheeler denklemi, 100 normal erkek ve 18 normal kadından alınan serum örneklerinde jel filtrasyon yöntemiyle ölçülen serbest testosteron konsantrasyonlarının regresyon analizinden türetilmiştir (56). Denkleme göre testosteron ve SHBG'deki değişiklikler dikkate alınmış, ancak albümin konsantrasyonu hesaba katılmamıştır:

$$sT \text{ (nmol/L)} = [2,28 - 1,38 \times \log(\text{SHBG}) / 10] \times TT \times 10$$

Denklemdaki SHBG ve TT için birimler nmol/L'dir.

Ho ve ark., hesaplanan serbest testosteronun Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (IFCC)'na göre referans aralıklarını tanımlamış, Vermeulen denklemine göre alt (2,5p) ve üst (97,5p) referans sınırları sırasıyla 0,245 nmol/L ve 0,785 nmol/L bulunmuş. Serbest testosteron denklemleri arasında Wheeler'inki en yüksek referans aralığını verirken, en düşük referans aralığını Ly denklemi vermiş: Wheeler 0,314 (2,5p) – 0,845 (97,5p) nmol/L; Sodergard ve ark. 0,278 (2,5p) – 0,821 (97,5p) nmol/L; Ly 0,174 (2,5p) – 0,589 (97,5p) nmol/L (56).

Vermeulen denklemi kullanılarak hesaplanan biyoyararlı testosteron ($\text{bioT}_{\text{Vermeulen}}$) için referans aralığı ise 2,5p için 6,1 nmol/L ve 97,5p için 19,2 nmol/L olarak bulunmuş (56).

2.11.5.2. Serbest Testosteron Direkt Ölçüm

Serbest testosteronun direkt analog testleri ticari olarak mevcuttur ancak, tanı amacıyla önerilmemektedir (3,31). Serbest testosteron konsantrasyonları direkt RIA ile ölçülebilir, ancak doğruluk eksikliği nedeniyle eleştirilmektedir (1). Ancak, daha yeni yayınlarda Vermeulen formülasyonu ile direkt ölçüm (immünlüminometrik) karşılaştırılmış; sensitivite ve spesifite analizinde, tüm hastalar dikkate alındığında direkt yöntemin duyarlılığının %75,0, özgüllüğünün ise %93,4 olduğu görülmüştür (60). Metodolojik açıdan direkt analog testler, testosteron olan bir izleyici (analog) kullanır ve testteki antikora bağlanır, ancak serum bağlayıcı proteinlere bağlanmaz (31). Teorik olarak, analog dikkatle seçilir ve test uygun şekilde optimize edilirse,

antikora yarışmalı bir şekilde bağlanan analog miktarı numunedeki serbest testosteron konsantrasyonuyla ters orantılıdır (31). Ancak, direkt testlerle elde edilen sonuçlardan ziyade denge diyalizi ile belirlenen serbest testosteron konsantrasyonları total testosteron ile daha iyi korelasyon gösterme eğilimindedir (31). LC-MS/MS'de serbest testosteron ölçümünde ise diğer direkt testlerden farklı olarak analiz öncesi denge diyaliz veya ultrafiltrasyon aşaması kullanılır (1,12,61). Rutin laboratuvarlarda serbest testosteronu ölçmek için doğru ve uygulanabilir analizlerin olmaması nedeniyle, literatürde serbest testosteron tahmini için birçok alternatif yöntem bildirilmiştir (31).

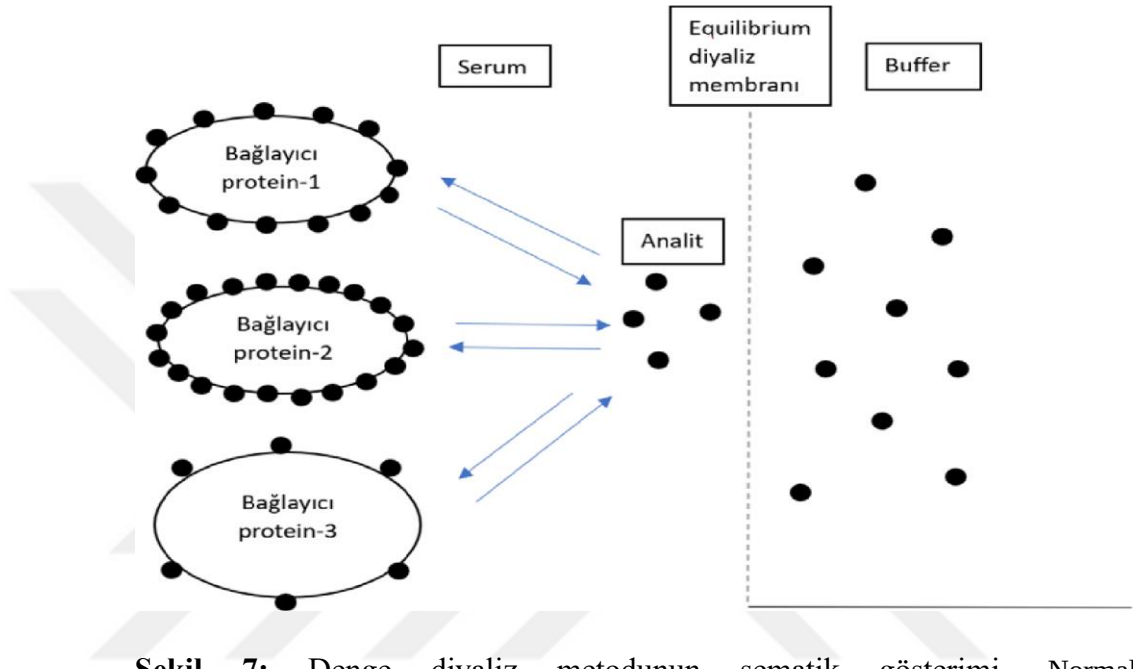
2.11.5.2.1. Equilibrium Diyaliz (Denge Diyaliz)

Direkt denge diyalizi sonrası analiz, daha önce de bahsedildiği üzere, birçok araştırmacı tarafından serbest hormonların ölçümü için referans yöntem olarak kabul edilen bir yöntemdir (55,60,62). Şekil 7'de krokisi çizilmiştir. Denge diyaliz hücresi, birbirinden yarı geçirgen bir zarla ayrılmış iki bölmeden oluşur. Bu membran küçük moleküllerin bir bölmeden diğerine serbestçe difüze olmasına izin verir ancak, büyük moleküllerin (proteinler gibi) geçişini engeller (62).

Serum numunesi bir bölmeye, tampon ise ikinci bölmeye yerleştirilir. İnkübasyon süresi boyunca, serbest hormon ve diğer küçük moleküller bir bölmeden diğerine membran boyunca difüze olur. Dengeye ulaşıldığında, tipik olarak 16-24 saat sonra, iki bölmedeki serbest hormon ve diğer küçük moleküllerin konsantrasyonları eşittir. Teorikte bu şartın sağlanması, kullanılan ED yönteminde bir dizi faktöre bağlıdır (62):

- Diyaliz tamponunun bileşimi ve pH'si (Bunlar bağlayıcı proteinlerin ilgili analite olan afinitesini etkileyecektir),
- Ortam sıcaklığı (Proteinlerin afinitesi sıcaklığa bağlıdır),
- İlgili analitin nonspesifik bağlanması (NSB) büyüklüğü (Artan NSB, ilgili analitin, bağlayıcı proteinlerinden daha fazla ayrılmasına neden olacaktır),

- Membranın doğası (Membran, sadece küçük moleküllerin difüzyonuna izin vermelidir),
- Serum hacmine göre tampon hacmi.



Şekil 7: Denge diyaliz metodunun şematik gösterimi. Normal konsantrasyonlarda bağlayıcı proteinler içeren serum, serum bölmesine yerleştirilir. Tampon ikinci bir bölmeye yerleştirilir ve yarı geçirgen bir membran ile serumdan ayrılır. Denge durumunda iki bölmedeki serbest analit konsantrasyonu eşittir. Bu nedenle, tampon bölmesinde bulunan serbest analit konsantrasyonu ölçümü serumda bulunan ilgili serbest analit konsantrasyonunu yansıtmalıdır (62).

Ticari olarak elde edilebilen denge diyaliz aparatları Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1: Ticari Olarak Elde Edilebilen Denge Diyaliz Aparatları (63)

Diyaliz aparatları	Aparat başı maliyet	Diyaliz hücresi başına maliyet	Aparattaki diyaliz hücresi sayısı
Zackary ve ark.'nın kendi yapımları	44,16\$	0,46\$	96
RED aparatı*	445,0\$	9,27\$	48
Harvard Apparatus**	446,0\$	4,65\$	96
HTD96***	4149,0\$	43,22\$	96

* Rapid Equilibrium Dialysis (RED) aparatı – Tek kullanımlık ek parçalı plate (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA).

** Harvard Apparatus 96-hücreli DispoEquilibrium Dialyzer – Tek kullanımlık plate (Harvard Bioscience, Holliston, MA).

*** HTD96b yeniden kullanılabilir komple ünite (HTDialysis, LLC, Gales Ferry, CT)

Ölçüm teknikleri, Tablo 2a ve Tablo 2b’de özetlenmiştir.

Tablo 2a: Ölçüm Teknikleri Özeti (Total testosteron, bioT, FAI) (55)

Test / Açıklama	Avantajlar	Dezavantajlar
Total testosteron		
İmmünoassay		
▪ Testosteron antikorları ve izleyici element ile karıştırılmış serum ▪ İzleyici, bir radyoizotop (RIA), enzim (EIA), floresan (FIA) veya kemilüminesan (CLIA) bileşik olabilir.	▪ Hızlı ve basit ▪ Ucuz ▪ Yaygın olarak kullanılması ▪ Çeşitli popülasyonlarda çok sayıda referans aralığı ▪ Normal testosteron seviyelerinde kabul edilebilir performans ▪ Yüksek verim	▪ Testosteron ekstraksiyonu/kromatografi, ek zaman ve teknik uzmanlık gerektirir ve organik atık oluşturur. ▪ Düşük/yüksek testosteron seviyelerinde azaltılmış doğruluk ▪ RIA radyoaktif atık üretir
Kütle Spektrometrisi		
▪ Molekülleri iyonize eder ve kütle-yük oranlarını ölçer.	▪ Altın standart teknik ▪ Mükemmel sensitivite ve spesifite ▪ Yüksek/düşük testosteron seviyelerinde doğru ▪ Multipl steroidlerin eşzamanlı ölçümü ▪ Yüksek verim (LC-MS/MS)	▪ Pahalı ▪ Kalibrasyon gerektirir ▪ GC-MS kapsamlı numune hazırlama ve uzmanlık gerektirir ▪ Ekstraksiyon, organik atık oluşturabilir
Biyoyararlı testosteron		
Amonyum-sülfat presipitasyonu		
▪ Seruma eklenen izleyici işaretli testosteron ▪ SHBG, amonyum sülfat ilavesiyle çöktürülmüştür. ▪ Kalan izleyici total testosteron ile çarpılır.	▪ Denge diyalizi ile iyi korelasyon gösterir.	▪ Zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirmesi ▪ İzleyici safsızlıkları sonuçları bozabilir. ▪ Total testosteron testinin doğruluğuna dayanır.
Serbest Androjen İndeksi (FAI)		
▪ Total testosteronun SHBG'ye oranı	▪ Hızlı ve basit	▪ Düşük seviyelerde serbest testosteron ile zayıf korelasyon ▪ Total testosteron ve SHBG testinin doğruluğuna dayanır.

Tablo 2b: Ölçüm Teknikleri Özeti (Serbest Testosteron) (55)

Test / Açıklama	Avantajlar	Dezavantajlar
Serbest testosteron		
Hesaplanan serbet testosteron		
▪ Kütle hareket yasası (Wheeler, Sodergard, Vermeulen)	▪ Denge diyalizi ile iyi korelasyon gösterir. ▪ Hızlı ve basit	▪ SHBG ve albüminin testosterona bağlanması için denge disosiasyon sabitlerine dayanır. ▪ Total testosteron ve SHBG testlerinin doğruluğuna dayanır. ▪ Gerçek değeri fazla tahmin etme eğilimindedir.
▪ Ampirik formüller (Ly)	▪ Denge diyalizi ile iyi korelasyon gösterir. ▪ Hızlı ve basit ▪ Kütle hareket yasasına dayalı hesaplamalardan daha doğru	▪ Laboratuvar spesifik ▪ Başlangıçta çok sayıda numune gerektirir.
Denge diyalizi		
▪ Diyaliz odacığına yerleştirilen serum ▪ Seruma eklenen izleyici işaretli testosteron ▪ Dengeye ulaşma ▪ Düşük moleküler ağırlıklı geçirgen membran küçük moleküllerin geçişini kısıtlar. ▪ Bağlı ve serbest işaretli testosteron oranı değerlendirilir.	▪ Serbest testosteron için altın standart metot ▪ Mükemmel sensitivite ▪ Laboratuvarlar arası tekrarlanabilir	▪ Teknik açıdan zorlu ▪ Pahalı ▪ Zaman alıcı ve yoğun iş gücü gerektirmesi ▪ İzleyici safsızlıkları sonuçları bozabilir. ▪ Total testosteron testinin doğruluğuna dayanır.
İmmünoassay		
▪ Testosteron analogu antikora bağlanmak için serbest testosteron ile yarışır.	▪ Hızlı ▪ Ekstraksiyon basamağı gerektirmez. ▪ Ucuz ▪ Otomatize	▪ Doğrusal olmayan sonuç (Inaccurate) ▪ Önerilmez

2.12. Metabolik Sendrom

2.12.1. Metabolik Sendromun Tanımı ve Tarihçesi

1998 yılında Reaven, Amerikan Diyabet Derneği yıllık toplantısı Banting Konferansı'nda Sendrom X kavramını sunmuştur. Sendrom X'i şu şekilde tanımlamıştır: (1) insülinle uyarılan glukoz *uptake*'ine direnç; (2) glukoz intoleransı; (3) hiperinsülinizm; (4) çok düşük yoğunluklu lipoprotein (trigliserid) artışı; (5) yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL) kolesterol azalması; (6) hipertansiyon.

Glukoz intoleransı veya tip2 DM'si olan çoğu kişide, genellikle bir arada görülen ve günümüzde "Metabolik Sendrom" olarak bilinen durumu oluşturan çok sayıda risk faktörü vardır. Hem insülin direnci hem de santral obezite önemli faktörler olarak kabul edilmektedir. Aynı kişide ortaya çıkan metabolik anormalliklerin kümelenmesi, her bir anormallikle ilişkili riskin toplamının üstünde önemli bir ek kardiyovasküler risk oluşturuyor gibi görünmektedir (64).

Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF), dünya yetişkin nüfusunun %20-25'inin MetS'ye sahip olduğunu ve MetS'ye sahip olmanın miyokard enfarktüsü veya serebrovasküler hadise riskini üç kat, ölüm riskini ise iki kat artırdığını tahmin etmektedir. MetS'nin tip2 DM riskini beş kat artırdığı tahmin edilmektedir. Ayrıca, sendromun daha fazla bileşeni mevcut olduğunda kardiyovasküler mortalitenin arttığını belirtmişlerdir (65).

2.12.2. İnsülin Direnci

Vücuttaki hücrelerde (karaciğer, iskelet kası ve yağ dokusu) glukoz *uptake*'ini kolaylaştırmak için pankreastaki beta hücrelerinde insülin salgılanır. İnsülin direnci, bu dokuların glukoz emilimine karşı daha az duyarlı veya sonunda dirençli hale geldiğinde ortaya çıkar. Glukoz artık hücreler tarafından *uptake* edilemez ve kanda kalır. Glukozu *uptake* etmek için giderek daha fazla insülin (hiperinsülinemi) üretilmesi ihtiyacını tetikler. Sürekli artan miktarlarda insülin üretimi beta hücrelerini zayıflatır ve sonunda yıpratır. Pankreas artık yeterli insülin üretemez hale geldiğinde kişi hiperglisemik hale gelir ve tip2 DM tanısı konur. Bu durum

gerçekleşmeden önce bile, insülin duyarlılığını daha da bozan trigliserid birikimi de dahil olmak üzere vücutta hasar meydana gelir (64).

2.12.3. Santral Obezite

Obezite, insülin direnci ve metabolik sendrom ile ilişkilidir. Obezite; hipertansiyon, yüksek serum kolesterolü, düşük HDL kolesterol ve hiperglisemiye katkıda bulunur ve bağımsız olarak daha yüksek kardiyovasküler hastalık (KVH) riski ile ilişkilidir. Tip2 DM, koroner kalp hastalığı ve bazı kanser türleri de dahil olmak üzere bir dizi başka hastalık şeklinde ciddi sağlık sonuçları riskinin VKİ'deki artışla yükseldiği gösterilmiştir (64). Ancak, bel çevresi ile ölçülen karın bölgesindeki aşırı vücut yağı, MetS profilini göstermede VKİ'den üstündür. Uluslararası Obezite Görev Gücü (IOTF), dünya nüfusunun 1,7 milyarının halihazırda tip2 DM gibi aşırı kiloya bağlı, bulaşıcı olmayan hastalıklar açısından yüksek risk altında olduğunu bildirmektedir (64).

MetS'nin küresel tip2 DM ve KVH artışına yol açması nedeniyle, yaşam tarzı müdahaleleri ve tedavinin diyabet ve/veya KVH gelişimini önleyebilmesi için MetS'li bireylerin erken tespit edilmesi büyük bir tıbbi ve ekonomik zorunluluktur (64).

Bir dizi uzman grup MetS için klinik kriterler geliştirmiştir. Bunlardan en yaygın kabul görenleri Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ), Avrupa İnsülin Direnci Çalışma Grubu (EGIR) ve Ulusal Kolesterol Eğitim Programı - Üçüncü Yetişkin Tedavi Paneli (NCEP ATP III) tarafından hazırlanmıştır. Tüm organizasyonlar, MetS'nin temel bileşenleri olan obezite, insülin direnci, dislipidemi ve hipertansiyon konusunda hemfikirdir. Ancak, klinik uygulamada MetS'li bireyleri belirlemeye çalışırken mevcut kılavuzların kullanımı ya zordu ya da çelişkili sonuçlar veriyordu (64).

Ayrıca, MetS için birden fazla tanımın varlığı kafa karışıklığına neden olmuş ve bu durum her bir tanımın değerlerini karşılaştıran birçok çalışma ve araştırma makalesi ile de sonuçlanmıştır. Sendromu tanımlamak için farklı tanımların kullanıldığı çalışmalardan elde edilen veriler arasında doğrudan karşılaştırmalar yapmak da zor olmuştur (64).

IDF uzmanları, klinik uygulamada kullanımı kolay olan ve yalnızca araştırma ortamlarında mevcut olan ölçümlere dayanmayan, evrensel olarak kabul görmüş tek bir tanı aracına ihtiyaç duyulduğunu fark etmiştir. Yeni IDF tanımı hem klinik hem de araştırma ihtiyaçlarını ele almakta, dünya çapında kullanıma uygun, erişilebilir bir tanı aracı sağlamakta olduğu söylenilmektedir (64).

2.12.4. Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri

2.12.4.1. Ulusal Kolesterol Eğitim Programı (NCEP) Yetişkin Tedavi Paneli (ATP) III Kriterleri

Ulusal Kalp, Akciğer ve Kan Enstitüsü himayesindeki NCEP ATP III'e göre, 2004 yılında yayınlanan MetS'nin tanı kriterleri Tablo 3'te özetlenmiştir (66).

ATPIII, MetS'yi esasen obezitenin metabolik komplikasyonlarının bir kümelenmesi olarak tanımlamıştır. Listelenen kriterler arasında bel çevresinin artmasıyla belirlenen abdominal obezite, yüksek trigliserit, düşük HDL kolesterol, yüksek kan basıncı ve yüksek açlık plazma glukozu yer almaktadır. Tanı için insülin direnci gerekli değildir; ancak ATP III kriterlerini karşılayan çoğu kişi insüline dirençli olacaktır (66).

Tablo 3: Metabolik sendromun NCEP ATP III klinik tanımlanması (66)

▪ Beş kriterden üçüne sahip olduğunda, metabolik sendrom tanısı konulabilir.	
Parametre	Değer
Bel Çevresi	Erkeklerde: >102 cm Kadınlarda: >88 cm
Trigliserit	≥150 mg/dL (≥1,7 mmol/L)
HDL kolesterol	Erkeklerde: <40 mg/dL (<1,04 mmol/L) Kadınlarda: <50 mg/dL (<1,3 mmol/L)
Kan Basıncı	SKB ≥130/≥85 mm Hg
Açlık Glukozu	≥110 mg/dL (≥6,1 mmol/L)

ATP: yetişkin tedavi paneli; SKB: sistolik kan basıncı; DKB: diyastolik kan basıncı

2.12.4.2. Uluslararası Diyabet Federasyonu (IDF) Tanı Kriterleri

IDF'ye göre bel çevresi için normalin üst sınırı etnik gruplara göre farklılıklar göstermektedir. Ayrıca, bel çevresi için NCEP ATP III değerlerinin Amerika Birleşik Devletleri'nde kullanılmaya devam edileceğini belirtmişlerdir (64).

Yeni IDF tanımına göre, bir kişinin MetS'li olarak tanımlanabilmesi için Tablo 4 ve 5'teki özelliklere sahip olması gerekmektedir (64).



Tablo 4: IDF Metabolik Sendrom Tanı Kriterleri (64)

Santral obezite* + Aşağıdaki dört faktörden herhangi ikisi:	
Trigliserit yükselmesi	≥150 mg/dL (1,7 mmol/L) veya bu lipid anormallığı için spesifik tedavi.
HDL-K azalması	Erkeklerde: <40 mg/dL (1,03 mmol/L) veya bu lipid anormallığı için spesifik tedavi. Kadınlarda: <50 mg/dL (1,29 mmol/L) veya bu lipid anormallığı için spesifik tedavi.
Kan basıncı (KB) yüksekliği	Sistolik KB: ≥130 mm-Hg veya diyastolik KB: ≥85 mm-Hg veya önceden tanı konulmuş hipertansiyon tedavisi.
Yükselmiş açlık plazma glukozu (APG)	APG: ≥100 mg/dL (5,6 mmol/L) veya önceden tanı konulmuş tip 2 diyabet. (APG: ≥100 mg/dL ise OGTT şiddetle tavsiye edilir ancak, sendromun varlığını tanımlamak için gerekli değildir.)

* Santral obezite etnik gruplara göre farklılık göstermekle beraber Tablo 3'te belirtilmiştir (64).

* VKİ >30kg/m² ise santral obezite varsayılabilir ve bel çevresinin ölçülmesine gerek yoktur (64).

Tablo 5: IDF'ye göre bel çevresi için etnik spesifik değerler (64)

Ülke/Etnik grup	Bel çevresi
Avrupalılar (ABD'de ATP III değerlerinin (102 cm erkek; 88 cm kadın) klinik amaçlarla kullanılmaya devam edilmesi muhtemeldir.)	Erkeklerde: ≥94 cm Kadınlarda: ≥80 cm
Güney Asyalılar (Çinli, Malay ve Asya-Hintli popülasyona dayanmaktadır.)	Erkeklerde: ≥90 cm Kadınlarda: ≥80 cm
Çinliler	Erkeklerde: ≥90 cm Kadınlarda: ≥80 cm
Japonlar	Erkeklerde: ≥90 cm Kadınlarda: ≥80 cm
Etnik Güney ve Merkez Amerikalılar	Daha spesifik veriler elde edilene kadar Güney Asya önerilerini kullanın
Sahra-altı Afrikalılar	Daha spesifik veriler elde edilene kadar Avrupa verilerini kullanın
Doğu Akdeniz ve Orta Doğu (Arap) popülasyonları	Daha spesifik veriler elde edilene kadar Avrupa verilerini kullanın

2.12.4.3. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) Tanı Kriterleri

DSÖ kılavuzları (Tablo 6) da KVH'yi, MetS'nin primer sonucu olarak görmektedir. Ancak ATP III kriterlerinden farklı olarak tanı için; yüksek kan basıncı, yüksek trigliserit, düşük HDL kolesterol ve artmış VKİ (veya artmış bel:kalça oranı) ve mikroalbuminüriden oluşan diğer iki risk faktörü ile birlikte insülin direnci gerekmektedir. ATP III kriterlerine göre daha yüksek bir kan basıncı gereklidir. DSÖ kriterlerinin potansiyel bir dezavantajı, rutin klinik değerlendirmenin ötesinde özel glukoz durumunun gerekli olabilmesidir (66).

Tablo 6: Metabolik Sendrom için DSÖ Klinik Kriterleri (66)

Aşağıdakilerden biri ile tanımlanan insülin direnci:
▪ Tip 2 diyabet
▪ Bozulmuş açlık glukozu
▪ Bozulmuş glukoz toleransı
▪ Ya da normal açlık glukoz seviyesine (<6,1 mmol/L ya da <110 mg/dL) sahip olanlar için, hiperinsülinemik, öglisemik koşullar altında incelenen arka plan popülasyonu için en düşük çeyrek dilimin altında glukoz uptake'i.
Artı, aşağıdakilerden herhangi ikisi:
▪ Antihipertansif ilaç alımı ve/veya yüksek kan basıncı (SKB: ≥ 140 mm Hg veya DKB: ≥ 90 mm Hg)
▪ Plazma trigliseridi $\geq 1,7$ mmol/L (≥ 150 mg/dL)
▪ HDL-K erkeklerde $< 0,9$ mmol/L (< 35 mg/dL) veya kadınlarda $< 1,0$ mmol/L (< 39 mg/dL)
▪ VKİ > 30 kg/m² ve/veya bel:kalça oranı erkeklerde $> 0,9$, kadınlarda $> 0,85$
▪ Üriner albümin atılım hızı ≥ 20 µg/dk veya albümin:kreatinin oranı $\geq 3,4$ mg/mmol

2.12.4.4. Amerikan Klinik Endokrinologlar Birliği (AACE) Tanı Kriterleri

AACE, insülin rezistan sendromu için üçüncü bir kriter seti önermiştir (Tablo 7). Bu kriterler, tanımlanmış sayıda risk faktörü belirtilmemesi ve tanının klinik karara bırakılması dışında ATP III ve DSÖ kriterlerinin bir karışımı gibi görünmektedir. Bir

kişide diyabet geliştiğinde, insülin direnci sendromu terimi artık geçerli değildir. Bozulmuş açlık glukozu olmayan hastalarda, bir anormallikten şüphelenildiğinde 2 saatlik bir post-glukoz testi önerilir; yüksek değerler tip2 DM öngörüsünü iyileştirecektir (66).

Tablo 7: İnsülin Direnci Sendromu Tanısı için AACE Klinik Kriterleri* (66)

Risk Faktörü Bileşenleri	Anormallik için Eşik Değerleri
Aşırı kilo/obezite	VKI ≥ 25 kg/m ²
Yükselmiş trigliserit	≥ 1.70 mmol/L (≥ 150 mg/dL)
Düşük HDL kolesterol	Erkeklerde: $<1,04$ mmol/L (<40 mg/dL) Kadınlarda: $<1,3$ mmol/L (<50 mg/dL)
Yükselmiş kan basıncı	$\geq 130/85$ mm Hg
2 saatlik glukoz testi sonrası	Glukoz $>7,8$ mmol/L (>140 mg/dL)
Açlık glukozu	6,1 ila 6,9 mmol/L (110 ila 124 mg/dL)
Diğer risk faktörleri	▪ Ailede tip 2 diyabet öyküsü ▪ Hipertansiyon veya KVH ▪ Polikistik over sendromu ▪ Sedanter yaşam tarzı ▪ İlerleyen yaş ▪ Tip 2 diyabet veya KVH için yüksek risk taşıyan etnik gruplar

* Tanı, risk faktörlerine dayalı klinik değerlendirmeye bağlıdır.

2.12.5. Metabolik Sendrom ve Testosteron İlişkisi

Obezite ve MetS'nin düşük testosteron ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (30,67). Bir yandan artan vücut yağı; pro-enflamatuar sitokinleri salgılaması, insülin direnci ve diyabet yoluyla hipotalamik-pituitar-testiküler (HPT) eksenini çoklu mekanizmalarla baskılamak; diğer yandan düşük testosteron; total ve visceral yağ kütlesinin daha fazla artmasını teşvik ederek gonadotropin inhibisyonunu şiddetlendirir (67). Son olarak, obstrüktif uyku apnesi ve hiperkortizolizm gibi obezite ile ilişkili komorbiditelerin de HPT eksenini baskılayabileceğine dair kanıtlar vardır (67,68).

Adipositlerin yüzeyinde bulunan lipoprotein lipaz (LPL), kandaki trigliseridleri parçalayarak adipositlerde birikmesine neden olur, ancak testosteron adipositlerdeki LPL'yi baskıladığından, testosteron düşük olduğunda adiposit hipertrofisi ortaya çıkar (30). Testosteron adipositlerdeki β -reseptörlerinin sayısını artırarak kök hücre düzeyinde adiposit farklılaşmasını engellediğinden ve miyosit farklılaşmasını tetiklediğinden, düşük testosteron adipoz dokuda artışa neden olur (30). Androjen reseptörü elimine edilmiş farelerde de visceral yağda artış gözlenmiştir (30).

Total testosteronun yaklaşık %98'i SHBG ve albümine bağlıdır, ancak karaciğerde sentezlenen SHBG'nin obezite, diyabet ve metabolik sendromda kan konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir ve bu koşullarda total testosteron serbest testosterondan nispeten daha düşük olmaya eğilimlidir (30). Prospektif Massachusetts Erkek Yaşlanma Çalışmasında, non-obez bir durumdan obez bir duruma geçmek, testosteron seviyelerinde 10 yaş ilerlemeyle karşılaştırılabilir bir düşüşle sonuçlanmıştır (69). Total testosteron seviyelerindeki düşüşler büyük ölçüde obezite ile ilişkili hiperinsülinemiye bağlı olarak SHBG'deki azalmaların bir sonucudur (67). Gerçekten de tartışmalı olsa da, serbest testosteron seviyelerinin ölçümü, SHBG seviyelerinin referans aralığının dışında olduğu durumlarda total testosteron ölçümüne göre androjen durumunun daha doğru bir değerlendirmesini sağlayabilir (70). Ancak, serbest testosteron seviyeleri için referans aralıkları, özellikle SHBG'nin yaşla birlikte arttığı yaşlı erkeklerde iyi belirlenmemiştir (67).

Obezite ve periferik patolojilerle ilişkili HPT ekseninin baskılanmasının çoğu reverzibl olarak görülmekte ve kilo kaybının iyileşmeyle sonuçlandığı bildirilmektedir (30). Aslında, diyet ve egzersiz yoluyla %10 kilo kaybı, kandaki total testosteron seviyelerini önemli ölçüde artırmıştır (30).

Düşük testosteron seviyeleri erkeklerde diyabet ile ilişkilidir (30). Yanal bir çalışma, kan testosteron seviyelerindeki düşüşün insülin direnci ile ilişkili bağımsız bir faktör olduğunu bildirmiştir (30). Buna ek olarak, SHBG seviyesindeki azalma, SHBG genindeki spesifik polimorfizmler ve diyabet riski arasında tutarlı bir ilişki olduğu bildirilmiştir (30). Bu arada, kan testosteron seviyesindeki düşüşün MetS riskini artırdığı görülmüştür (30). Çok sayıda kesitsel ve prospektif çalışmada,

erkeklerde hem total hem de serbest testosteron seviyeleri ile yağlanma arasında sürekli olarak negatif doğrusal korelasyonlar bulunmuştur (67).

Avrupa Erkek Yaşlanma Çalışması (EMAS)'nda 3219 erkek ile yapılan bir kohortta, normal kiloya göre obezitede 8,7 kat; aşırı kiloda 3,3 kat artmış sekonder hipogonadizm riski bulunmuştur (71). Hem total hem de serbest testosteron seviyeleri, obez erkeklerde zayıf erkeklere kıyasla daha düşük bulunmuştur; aşırı kilolu erkeklerde ise daha az ancak yine de önemli bir azalma bulunmuştur (72).

VKİ'nin testosteron düzeyi ile ters ilişkisinin eşlik eden hastalıkların varlığıyla daha da artabileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (67). Nitekim, obez ancak sağlıklı erkeklerde düşük testosteron prevalansının %12 gibi nispeten düşük bir oranda olduğu bildirilirken (73); başka bir çalışmada, üçüncü basamak hastane polikliniklerine başvuran diyabetik erkeklerde %57'lik bir prevalans bulunmuştur (74).

Blouin ve ark., daha yüksek testosteron değerlerine sahip hastaların, daha düşük testosteron değerlerine sahip olanlara kıyasla üçten az MetS bileşenine sahip olma olasılıklarının daha yüksek olduğunu gözlemlemişlerdir (75,76). Bu bulgu, Kaplan ve ark.'nin yaptığı araştırmada bazal total testosteron düzeyleri ile NCEP-ATP III bileşenlerinin sayısı arasında ters bir ilişki buldukları gözlemleriyle uyumludur (77). Laaksonen ve ark., 1896 diyabetik olmayan erkekte total testosteron düzeyleri ile MetS'ye sahip olma olasılığı oranları arasında ters bir ilişki olduğunu öne sürerek MetS'de testosteron düzeylerinin düşmesinin rolünü desteklemiştir (27). Diğer bir boylamsal çalışmada, diğer kesitsel çalışmalardaki bulgulara benzer şekilde, MetS prevalansının yaşla birlikte arttığını ve bunun daha düşük androjen seviyeleriyle ilişkili olduğu doğrulanmıştır (78). Ayrıca, düşük SHBG seviyeleri ile birlikte düşük total testosteron seviyelerinin, daha yüksek MetS insidansını öngördüğünü bulmuşlardır (78).

Testosteron replasman terapisi (TRT)'nin MetS'de etkili olması beklenmektedir (30). TRT'nin VKİ, bel çevresi, lipid metabolizması, kan basıncı, açlık glukozu, insülin direnci, damar sertliği, karaciğer yağlanması ve kemik *remodellingi* üzerindeki etkinliği yaygın olarak bildirilmiştir (30). Uzun süreli TRT, hipogonadizmi erkeklerde prediyabetin tip2 DM'ye ilerlemesini tamamen önler ve glisemiye iyileştirir (30).

Dolaşımdaki düşük androjen seviyelerinin MetS için bir risk faktörü olduğu açıktır (79). Laaksonen ve ark., başlangıçta MetS'i olan hastaların 11 yıllık takip süresi boyunca hipogonadizm geliştirme olasılığının artacağını göstermiştir (80). Makhida ve ark., hipogonadizmin MetS'nin merkezi bir özelliği olduğunu ve testosteron tedavisinin ögonadal hormon konsantrasyonlarını düzeltmenin yanı sıra MetS'nin kendisi üzerinde de faydalı bir etkisi olduğunu, diyabet ve KVVH'ye ilerlemeyi yavaşlattığını savunmuştur (81).

Buna karşın, Chen ve ark.'ye göre, total testosteron seviyelerinin MetS olma olasılığı ile ters ilişkisi olsa da, testosteronun tip2 DM gelişiminde bir rolü yoktur (82).

Visseral obezite endokrinolojik dengesizliklere yol açabilir ve insülin, glukoz ve C-peptid seviyelerinde artış ile pozitif; testosteron seviyeleri ile negatif olarak ilişkilendirilmiştir (83).

Santral veya abdominal obezite, MetS'nin klasik bir özelliğidir ve total testosteron seviyelerinin düşmesiyle ilişkilidir (84-88). Svartberg ve ark., 1548 erkek üzerinde yaptığı çalışmada (25-84 yaş) serbest testosteron ve SHBG seviyelerinin bel çevresi ile ters ilişkili olduğunu göstermiştir (86,87). Diğer çalışmalar, total testosteron ile obezite arasındaki anlamlı ters korelasyonu doğrulamıştır (27,89). Bu ters ilişkiyi açıklayabilecek makul bir mekanizma, büyük yağ rezervlerine sahip bireylerde yüksek serum leptin seviyeleridir (79). Obez bireylerde, yüksek leptin seviyelerinin LH/HCG ile uyarılan androjen üretimine müdahale ederek androjenik hormon oluşumunu baskıladığı varsayılmıştır (90). Başka bir yayında, belirgin obezitenin, serbest testosteron seviyelerinde kesin bir azalma ile ilişkili olduğu; burada LH ve FSH seviyeleri genellikle düşük olduğu veya uygunsuz bir şekilde normal olduğu; bu baskılanmanın hipotalamik-hipofiz seviyesinde meydana geldiği; nedeni olarak da yağ dokusunun, özellikle inflame ve insüline dirençli durumdayken, testosteronu E2'ye dönüştüren aromatazi eksprese etmesi olabileceği öne sürülmüştür (67). Adipoz E2 ise hipofiz gonadotropin sekresyonunu azaltmak için negatif *feedbackte* bulunabilir. Kısmen test sınırlamaları nedeniyle, artan dolaşımdaki E2 konsantrasyonlarının doğrulanması çoğu zaman zordur (67). Ek olarak, E2'nin lokal dokuya özgü artışları dolaşımdaki konsantrasyonlara yansımaz (67).

Öte yandan, yağ dokusu aromataz hipotezi diğer veriler tarafından iyi bir şekilde desteklenmemektedir (67). Obez erkeklerin aromataz inhibitörleriyle tedavisinin testosteron seviyelerini artırabildiğini ve fertilitiyi geri getirebildiğini gösteren klinik çalışmalar (91) E2 aracılı HPT eksenini baskılanmasının patofizyolojisini desteklememektedir; çünkü bu tedaviyle gonadotropinler ve testosteron seviyeleri de yükselir (67). Ayrıca, daha yeni çalışmalar diyabetik obezitenin dolaşımdaki E2'deki azalmalarla ilişkili olduğunu öne sürmektedir (92). Üstelik EMAS çalışmasında, non-diyabetik obez erkeklerde bile E2'nin düşük olduğuna ve düşük testosteron düzeyleriyle ilişkili olduğuna dair kanıtlar vardır (71,93).

Artan visseral organ yağ dokusu E2'ye ek olarak artan miktarlarda proinflatuar sitokinler, insülin ve leptin de salgılar; bunların hepsi HPT ekseninin aktivitesini birden fazla düzeyde engelleyebilir (94).

Aşırı kortizol salgısı olan hastalarda potansiyel olarak hipotalamo-hipofizer aks yoluyla testosteron üretiminin baskılanması; SHBG'nin azalması; adipositlerde testosteronun E2'ye aromatisasyonunun artması; testiküler steroid üretiminin sitokin aracılı inhibisyonu, obezitede baskılanmış testosteron üretiminin nedenleri arasında gösterilir (79). Ek olarak, visseral yağ dokusunda aromataz aktivitesi, negatif *feedback* yoluyla testosteron üretimini baskılayan daha yüksek E2 seviyelerine yol açar (79).

Prostat kanserli erkeklerde uygulanan androjen deprivasyon terapisi (ADT) sonucunda, total vücut yağ kütlelerinde ve VKİ'de artış; yağsız vücut kütlelerinde azalma saptanmıştır (79). ADT alan prostat kanserli hastalar hipogonadal hale gelir ve MetS geliştirme riski altındadır (95).

Braga-Basaria ve ark., ADT ile tedavi edilen ve edilmeyen prostat kanserli erkeklerde MetS ve bileşenlerinin prevalansını araştırmış ve bu değişiklikleri sağlıklı kontrollerle karşılaştırmıştır. Veriler, MetS'nin ADT'li erkeklerde, ADT olmayan ve kontrol gruplarına kıyasla daha yaygın olduğunu göstermiştir. Spesifik olarak, ADT alan erkeklerde VKİ, trigliseritler ve açlık glikoz seviyeleri, sağlıklı kontrollere göre önemli ölçüde yükselmiştir (96).

Plasebo ve testosteron preparatları verilerek yapılan klinik çalışmalarda, testosteronun yağsız vücut kütleini artırdığı; yağ kütleini ise önemli bir oranda azalttığı gösterilmiştir (39,97–99). Ek olarak, Kapoor ve ark., testosteron ile tedavi edilen bir grup diyabetik hastada bel çevresinin önemli ölçüde azaldığını göstermiştir (100). Buna karşın, testosteron tedavisinin MetS'nin bileşenlerini düzelteceği konusunda bir fikir birliği yoktur (79). Bir çalışmada, hipogonadal olmayan erkeklerde uygulanan testosteron tedavisinin karbonhidrat metabolizmasını, insülin sekresyonunu veya etkisini iyileştirdiği gözlemlenmedi (101). Bunun nedeni ise, testosteron tedavisinden herhangi bir fayda beklenmeden önce erkeklerin gerçekten hipogonadal olması gerektiğidir (79). Son olarak, testosteron tedavisinin yağ kütleini azalttığı birçok randomize kontrollü çalışmada doğrulanmıştır (67).

Özetle, gözlemsel çalışmalar sürekli olarak obezitenin erkeklerde düşük testosteron seviyeleri ile güçlü bir ilişkisini göstermektedir. Gerçekten de epidemiyolojik veriler, düşük testosteronun en güçlü tek belirleyicisinin obezite olduğunu ve obezitenin testosteron seviyelerinde yaşa bağlı düşüşe önemli bir katkıda bulunduğunu göstermektedir (72). Buna karşılık, sağlıklı yaşlanmanın kendi başına testosteron seviyelerinde belirgin düşüşlerle nadiren ilişkili olduğuna dair kanıtlar artmaktadır (102). Bunun nedeni, yaşa bağlı testiküler disfonksiyonun, en azından kısmen LH salgılanmasında yaşa bağlı bir artışla telafi edilmesi olabilir (71). Bununla birlikte, obezite, LH artışını baskıladığı için, yaştan bağımsız olarak fizyolojik mekanizmalarla telafi edilemeyen hipotalamik-hipofizer baskılanmaya yol açar (71).

3. MATERİYAL ve METOT

Bu çalışma Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09.12.2022 tarih ve 24/285 sayılı kararı ile Giresun Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü'nün 12.01.2023 tarih ve E-41544352-799-206912606 sayılı kararı ile yürütüldü. Ek olarak bu çalışma Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından desteklendi (SAĞ-BAP-C-301123-61).

3.1. Çalışmaya Dahil Edilen Gönüllüler

Araştırmamız, 01 Mart - 30 Kasım 2023 tarihleri arasında Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi İç Hastalıkları polikliniğine başvuran bireyler için kesitsel bir çalışma olarak planlandı. Dahil etme kriterleri, 20-49 yaş arası erkek ve gönüllü olmak idi. Paraproteinemi ve/veya kriyoglobulinemisi, otoimmün hastalığı, primer/sekonder/tersiyer hipertiroidi/hipotiroidisi, akromegalisi, hipogonadizmi, kromozom anomalileri (Klinefelter sendromu, vs.), karaciğer ve böbrek hastalığı olanlar ile anti-epileptik ilaç kullananlar ve 10-12 saatlik gece açlığı olmayanlar çalışma dışı bırakıldı. Dahil etme ve dışlama kriterlerine uygun 202 erkek gönüllü çalışmaya dahil edildi.

Bilgilendirilmiş onamı alınan gönüllülerden tüm çalışma süreci boyunca tek bir araştırmacı (E.I) tarafından yaş bilgileri ve anamnez alınarak boy, kilo, bel çevresi, sistolik ve diastolik kan basıncı ölçümleri yapıldı. Gönüllülerden 10-12 saatlik gece açlığı sorgulandı ve sabah 09:00-11:00 saatleri arasında düze jelli tüplere alınan venöz kan numunelerinden 1800 x g'de 10 dk santrifüj yapılarak elde edilen serum numuneleri alikotlanarak analizlerin yapılacağı güne kadar -80°C'de saklandı. Serum numunelerinde glukoz, total kolesterol, trigliserid, HDL kolesterol, LDL kolesterol, total protein ve albümin ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modüler analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) cobas c-702 ve cobas c-502 modülleri ile; insülin, SHBG ve total testosteron ise ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modüler analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) e-602 modülü ile çalışıldı.

İnsülin direnci için HOMA-IR, açlık insülin (mU/L) x açlık glukozu (mmol/L) değerinin 22,5'e bölünmesiyle hesaplandı (103). VKİ, vücut ağırlığı ile boy arasındaki

oranın kilogram/metrekare (kg/m^2) olarak hesaplanmasıyla belirlendi. Çalışmaya dahil edilen gönüllüler için MetS değerlendirilmesi NCEP ATPIII ve IDF kriterlerine göre yapıldı (104,105).

3.2. Total Testosteron ve SHBG Analizleri

Total testosteron, ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modular analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) e-602 modülü ile çalışıldı. Elecsys Testosterone II testinde, özellikle testosterona karşı yönlendirilmiş yüksek afiniteli bir monoklonal antikorla (koyun) yarışmalı bir test prensibi kullanılır. 2-bromoestradiol ile numuneden salınan endojen testosteron, biotinlenmiş antikordaki bağlanma yerleri için rutenyum kompleksi [Tris(2,2'-bipiridil) rutenyum(II)-kompleksi ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$)] ile işaretlenmiş ilave testosteron türeviyle yarışır (59). Metot kompetitif test prensibidir. İlk inkübasyon ile 20 μL numune ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş testosteron türevi, testosterona özgü biotinlenmiş monoklonal antikor ile inkübe edilir. İşaretlenmiş antikorun bağlanma yerleri konsantrasyona bağımlı olarak numune analiti ile dolu hale gelir. İkinci inkübasyon ile, oluşan antijen-antikor kompleksi streptavidin kaplı mikropartiküller sayesinde, biotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla katı faza bağlanmış hale gelir. Reaksiyon karışımı ölçüm hücresi içine aspire edilir ve burada, manyetik mikropartiküller sayesinde elektrodun yüzeyine manyetik olarak tutunurlar. Bundan sonra bağlanmamış maddeler ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması elektrokemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir fotomultiplier tüp ile ölçülür. Sonuçlar, iki noktalı kalibrasyonla cihaza özgü bir şekilde oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi ile belirlenir. Total testosteron için ölçüm aralığı 0,087-52,0 nmol/L, limit of blank (LoB) 0,042 nmol/L, limit of detection (LoD) 0,087 nmol/L, limit of quantitation (LoQ) 0,416 nmol/L, 20-49 yaş aralığında erkek bireyler için referans aralığı (5. – 95.persentil) 8,64-29,0 nmol/L idi. Metodun bildirilen intermediate presizyon varyasyon değerleri 0,323 nmol/L, 1,05 nmol/L, 2,49 nmol/L, 6,94 nmol/L, 46,8 nmol/L insan serum düzeyleri için sırasıyla %14,5, %5,9, %3,2, %2,1 ve %3,0 idi (59).

SHBG, ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modular analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) e-602 modülü ile çalışıldı. Elecsys SHBG testinde, özellikle

SHBG'ye karşı yönlendirilmiş yüksek afiniteli işaretli ve biyotinli olmak üzere iki monoklonal antikorla (fare) sandviç test prensibi kullanılır. Biotinlenmiş antikor ile rutenyum kompleksi [Tris(2,2'-bipiridil) rutenyum(II)-kompleksi ($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{+2}$)] ile işaretlenmiş antikor, numunedeki SHBG'nin epitoplarına bağlanır (48). İlk inkübasyon ile 10 µL numune, rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal SHBG'ye spesifik antikor ve biotinlenmiş SHBG'ye spesifik monoklonal antikor ile inkübe edilir ve böylece antijen konsantrasyonuna bağımlı olarak antikor-antijen-antikor kompleksi oluşur. Oluşan antikor-antijen-antikor kompleksi, streptavidin kaplı mikropartiküller sayesinde, biotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla katı faza bağlanmış hale gelir. Reaksiyon karışımı ölçüm hücresi içine aspire edilir ve burada manyetik mikropartiküller sayesinde elektrodun yüzeyine manyetik olarak tutunurlar. Bundan sonra bağlanmamış maddeler ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması elektrokemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir *fotomultiplier* tüp ile ölçülür. Sonuçlar, iki noktalı kalibrasyonla cihaza özgü bir şekilde oluşturulan bir kalibrasyon eğrisi ile belirlenir. SHBG için ölçüm aralığı 0,35-200 nmol/L, *limit of detection* (LoD) 0,35 nmol/L, *limit of quantitation* (LoQ) 0,35 nmol/L, 20-49 yaş aralığında erkek bireyler için referans aralığı (5. – 95.persentil) 18,3-54,1 nmol/L idi. Metodun bildirilen *intermediate* presizyon varyasyon değerleri 13,7 nmol/L, 42,0 nmol/L ve 189,0 nmol/L insan serum düzeyleri için sırasıyla %1,8, %2,1 ve %4,0 idi (48).

3.3. Serbest Testosteron ve bioT Hesaplamalarında Kullanılan Algoritmalar

Vermeulen ve ark. (8), Sodergard ve ark. (13), Emadi-Konjin ve ark. (14), Morris ve ark. (17), Ly ve ark. (18) ile Wheeler ve ark. (20)'nin bildirdiği önerilen algoritmalar için bioT ve serbest testosteron hesaplamaları yapıldı (Tablo 8 ve 9). Algoritmalar için önerilen bioT ve serbest testosteron hesaplamaları Tablo 10'da gösterilmiştir.

Tablo 8: Vermeulen ve ark. (8), Sodergard ve ark. (13) ve Emadi-Konjin ve ark. (14)'nin bildirdikleri algoritmalara göre serbest testosteron (sT) ve bioT denklemleri

$$sT \left(\frac{\text{mol}}{\text{L}} \right) = \frac{-b + \sqrt{b^2 + 4a[TT]}}{2a}$$

$$a = k_{at} + k_t + (k_{at} \times k_t) \times ([SHBG] + [albumin] - [TT])$$

$$b = 1 + k_t \times [SHBG] + k_{at} \times [albumin] - (k_{at} + k_t) \times [TT]$$

Denklemden SHBG, total testosteron (TT) ve albumin konsantrasyon birimleri mol/L olmalıdır.

$$(56) sT_v = \{TT - \text{albümin} \times 0,5217 - 1 - SHBG + \sqrt{[(\text{albümin} \times 0,5217 + 1 + SHBG - TT)^2 + 4 \times (\text{albümin} \times 0,5217 + 1) \times TT]}\} / [2 \times (\text{albümin} \times 0,5217 + 1)]$$

Denklemden SHBG, sT, ve TT için birimler nmol/L; albümin için g/L'dir.

Vermeulen ve ark. (8), Sodergard ve ark. (13) ve Emadi-Konjin ve ark. (14)'nin bildirdikleri sabitler aşağıdaki gibidir:

	Testosteronun SHBG'ye bağlanma ilişki sabiti (k_t)	Testosteronun albumine bağlanma ilişki sabiti (k_{at})
Vermeulen ve ark. (8,56)	10^9 L/mol	$3,6 \times 10^4$ L/mol
Sodergard ve ark. (13)	$5,97 \times 10^8$ L/mol	$4,06 \times 10^4$ L/mol
Emadi-Konjin ve ark. (14)	$1,4 \times 10^9$ L/mol	$1,3 \times 10^4$ L/mol

Serbest testosteron hesaplandıktan sonra bioT aşağıdaki formül ile hesaplanır:

$$\text{bioT (mol/L)} = \{k_{at} \times [albumin] \times [sT] / (1 + k_{at} \times [sT])\} + [sT]$$

SHBG (mol/L)

Testosteron (mol/L)

Tablo 9: Vermeulen ve ark. ile Sodergard ve ark.’nin bildirdikleri yaklaşımın dışında Emadi-Konjin ve ark. (14), Morris ve ark. (17), Ly ve ark. (18) ve Wheeler (20)’in bildirdiği 4 farklı algoritma

	Denklem
Emadi-Konjin ve ark. (14)	$\text{bioT (mol/L)} = \{k_{at} \times [\text{albümin, mol/L}] \times [sT, \text{mol/L}] / (1 + k_{at} \times [sT, \text{mol/L}])\} + [sT, \text{mol/L}]$ $k_t = 1,4 \times 10^9 \text{ L/mol ve } k_{at} = 1,3 \times 10^4 \text{ L/mol ve } 4,3 \text{ g/dL'lik sabit plazma albümin konsantrasyonları}$
Morris ve ark. (17)	$\text{bioT (nmol/L)} = e^{(-0.266 + 0.955 \cdot \ln[TT, \text{nmol/L}] - 0.228 \cdot \ln[SHBG, \text{nmol/L}])}$
Ly ve ark. (18)	$sT \text{ (pmol/L)} = -52,65 + 24,4 \times [TT, \text{nmol/L}] - 0,704 \times [SHBG, \text{nmol/L}] - 0,0782 \times [TT, \text{nmol/L}] \times [SHBG, \text{nmol/L}] - 0,0584 \times [TT, \text{nmol/L}]^2$ Bu denklem total testosteron > 5 nmol/L olduğu durumlar için geçerlidir. Total T’nin <5 nmol/L olduğu durumlarda aşağıdaki denklem kullanılır: $sT \text{ (pmol/L)} = -6,593 + 19,304 \times [TT, \text{nmol/L}] - 0,056 \times [SHBG, \text{nmol/L}] - 0,0959 \times [TT, \text{nmol/L}] \times [SHBG, \text{nmol/L}]$
Wheeler (20)	$sT \text{ (nmol/L)} = [2,28 - 1,38 \times \log(SHGB, \text{nmol/L}/10)] \times (TT, \text{nmol/L}) \times 10$

Tablo 10: Önerilen algoritmalar için bioT ve serbest testosteron (sT) hesaplamaları

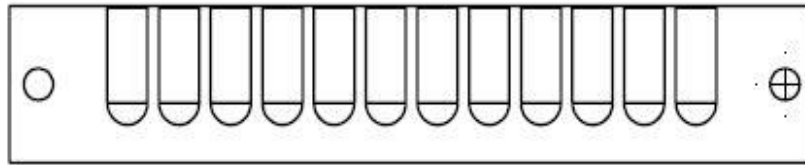
Algoritma	bioT	sT
Vermeulen ve ark. (8)	+	+
Sodergard ve ark. (13)	+	+
Emadi-Konjin ve ark. (14)	+	
Morris ve ark. (17)	+	
Ly ve ark. (18)		+
Wheeler (20)		+

3.4. Denge Diyaliz Metodu

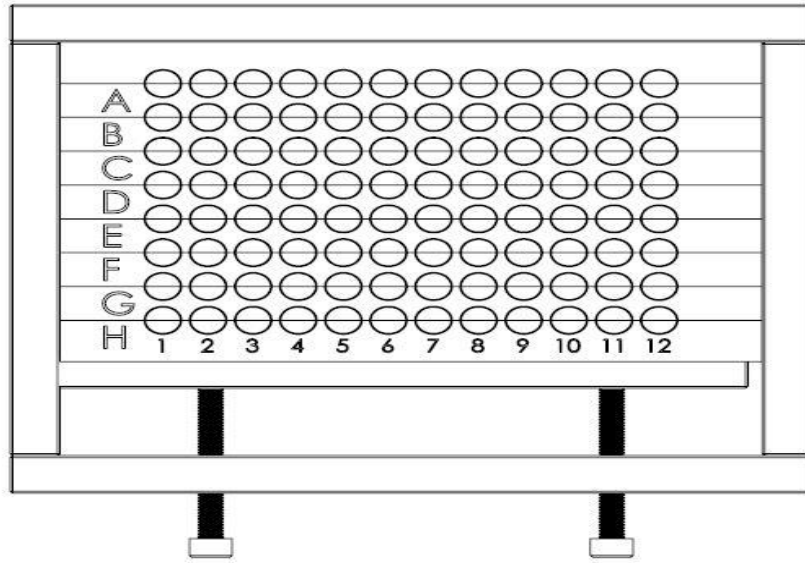
3.4.1. Denge Diyaliz Ekipmanları

3.4.1.1. 96-Kuyucuklu Denge Diyaliz Bloğu

Denge diyaliz aparatı 8 sıra ve 12 sütun olmak üzere toplamda 96 kuyucuk olarak tasarlandı. Tasarlanan 8 sıradaki kuyucukların dip kısmı konveks olacak şekilde planlandı (Şekil 8). Bloğun malzemesi, kimyasal ve sıcaklık dayanımı yüksek olan saf politetrafloroetilen (PTFE) olarak seçildi. Kuyucuklar Ø7 mm ve iç hacimleri 685 µL idi. Kuyucuklar arası mesafe 9 mm olarak belirlendi. Kuyucukların açılacağı blok, kuyucuk ortalarına membran yerleşimi yapılabilmesi için, her sıra kuyucuğun merkezinden geçecek eksenlerde 9 parçaya bölündü (Şekil 9). 9 parçadan oluşan kuyucuk blokları için hizalama ve sızdırmazlık sağlama amaçları ile mengeneli bir çerçeve tasarlandı. Çerçeve, 4 adet blok kullanılarak oluşturuldu. Mengene, 1 adet hareketli blok ve 2 adet M5 vida kullanılarak planlandı. Çerçeve alt tabanında sac kullanıldı. Kuyucuk bloklarının hizalanması için blokların iki yanından Ø5 pim geçirildi. Çerçeve blokları, çerçeve alt tablası ve mengene çene bloğu için 304 kalite paslanmaz çelik kullanıldı (Şekil 9). Kuyucuk blokları hizalama pimleri için 304 kalite paslanmaz çubuk kullanıldı. Kuyucuk blokları ve çerçeve blokları CNC dik işleme merkezinde talaş kaldırma yöntemi ile tek tek ebatlanmış ve işlenmiştir.



Şekil 8: Konveks sonlu kuyucukların enine kesiti



Şekil 9: 96-kuyucuklu diyaliz ve çerçeve blokları genel görüntüsü

3.4.1.2. Diyaliz Membranı

Membran seçimi testosteron ve bağlayıcı proteinlerin moleküler ağırlıklarına göre yapılmıştır. Testosteron, albümin, SHBG ve kortizol bağlayıcı globulin için moleküler ağırlıklar sırasıyla 0,288 kDa, 66,5 kDa, 90-100 kDa ve 58 kDa idi. Diyaliz için kullanılan membran *SnakeSkin™ Dialysis Tubing 10K MWCO* (10 kDa), 35 mm dry I.D., 35 feet (*Thermo Scientific™, Catalog Number: 88245, LOT:YG371492*) idi.

3.4.1.3. Diyaliz Tamponu

Diyaliz tamponun belirlenmesinde CLSI C45-A kılavuzu esas alınmıştır. İlgili kılavuzun tavsiyeleri; i) diyaliz tamponu, serumun iyonik ortamını mümkün olduğu kadar yakından taklit eden bir biyokimyasal bileşime sahiptir, ii) serum pH 7,40 ve 37,0 °C’de tamponlanır, iii) numune diyalizden önce seyreltilmez ve seyreltme faktörü diyalizin doğal 1:2 seyreltme değerini aşmaz, iv) diyaliz sırasında sıcaklık $37,0 \pm 0,5$ °C aralığı içinde sabit tutulur (106,107). Bu amaç için HEPES tamponu hazırlandı. Bu tampon için KrosClinic KRS-R-250 cihazından elde edilen 0,04 µS/cm iletkenlikteki deiyonize su otoklavlandı. Açıklanan sıraya göre tartılan kimyasallardan 52,75

mmol/L N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethane sulfonic acid), 22,5 mmol/L NaOH, 91,6 mmol/L NaCl, 1,65 mmol/L KH₂PO₄, 2,68 mmol/L KCl, 1,12 mmol/L MgSO₄. 7H₂O, 5,00 mmol/L üre ve 1,90 mmol/L CaCl₂.2H₂O 800 mL otoklavlanmış deiyonize su içinde çözdürüldü. Oda sıcaklığında (21,0 °C ± 0,5 °C) 1 N HCl ile tamponun pH'si 7,60'a ayarlandı ve tampon hacmi otoklavlanmış deiyonize su ile 1 L'ye tamamlandı. Hazırlanan tampon 0,22 µm'lik filtreler kullanılarak steril olarak filtrelendi ve 7 günden uzun olmayacak şekilde 2-8°C'de saklandı.

Farklı moleküller için tasarlanan denge diyalizi çalışmalarında kullanılan tamponlar Tablo 11'de gösterilmiştir.



Tablo 11: Farklı moleküller için tasarlanan denge diyalizi çalışmalarında kullanılan tamponlar

Makale	Parametre	Membran Büyüklüğü	Por	Diyaliz Aparatı	Tampon Hacmi	Numune Hacmi	Tampon
Nelson JC (108)	Tiroksin	12-14 kDa		<i>The re-usable dialysis cell</i>	2400 µL	200 µL	1 litre tamponda 131 mmol Na, 4,3 mmol K, 1,9 mmol Ca, 1,0 mmol Mg, 98 mmol Cl, 1,3 mmol PO ₄ , 1,3 mmol SO ₄ , 5,4 mmol laktat, 3,3 mmol glutamat ve 8 mmol üre (HEPES + Jelatin + IgG + antibiyotikler)
I Sinha-Hikim (109)	Testosteron	12-14 kDa		<i>The re-usable dialysis cell</i>	2400 µL	200 µL	Proteinsiz normal insan serumunun ultrafiltratı (131 mmol Na, 4,3 mmol K, 1,9 mmol Ca, 1,0 mmol Mg, 98 mmol Cl, 1,3 mmol PO ₄ , 1,3 mmol SO ₄ , 5,4 mmol lactate, 3,3 mmol glutamat ve 8 mmol üre)
Tom Fiers (61)	Testosteron	25 kDa		<i>Harvard Apparatus</i>		500 µL (erkek) 100 µL (kadın)	pH 7,28 <i>protein-free</i> tampon
Bingfang Yue (110)	T ₃ ve T ₄	5 kDa			200 µL	200 µL	Trifluoroasetik asit (>%99,0), NH ₄ OH (%29,7 NH ₃), NaCl, Na ₃ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , KH ₂ PO ₄ , KCl, MgSO ₄ .7H ₂ O, HEPES (serbest asit), üre, CaCl ₂ , NaN ₃ ve NaOH
Michael J Banker (111)	İlaçlar	12–14 kDa		<i>96-well dialysis apparatus (Pfizer)</i>	150 µL	150 µL	0,05 M sodyum fosfat (0,07 M NaCl içinde), pH 7,5
Cody W Pinger (112)	Zn	3.5 kDa		<i>Printed Equilibrium Dialysis Device</i>	700 µL	700 µL	150 mM NaCl, 21 mM Tris (pH 7,40)
Ruth E Curran (113)	İlaçlar			<i>Rapid equilibrium dialysis device (RED) (Thermo Fisher Scientific)</i>	500 µL	300 µL	100 mM sodyum fosfat ve 150 mM NaCl (pH 7,40)
Zackary M. Herbst (63)	İlaçlar	12–14 kDa		<i>In-House-Made, Microdialysis Device</i>	250 µL	300 µL	10× <i>Phosphate Buffered Saline</i> , pH 7,4, 0,1M fosfat, 0,154M NaCl

3.4.2. Denge Diyalizi Çalışma Prosedürü

96-oyuklu diyaliz blok parçaları ilk olarak %5 sodyum hipoklorit ile temizlendikten sonra KrosClinic KRS-R-250 cihazından elde edilen 0,04 µS/cm iletkenlikteki otoklavlı deiyonize su ile durulandı. Sonra, kullanımdan önce ve sonra 60 dakika %0,5 (v/v)'lik Triton X-100 çözeltisinde, sonrasında 30 dakika %70 etil alkol içinde bekletildi. Son olarak parçalar 2 kez KrosClinic KRS-R-250 cihazından elde edilen 0,04 µS/cm iletkenlikteki otoklavlı deiyonize su ile durulandı.

Diyaliz membranları kullanımdan önce 20 dk KrosClinic KRS-R-250 cihazından elde edilen 0,04 µS/cm iletkenlikteki otoklavlı deiyonize su ile 3 kez durulandı. Ardından 15 dk HEPES tamponu (pH 7,6) ile 2 kez durulandı. Kullanım zamanına kadar da HEPES tamponunda (1x HEPES buffer, pH 7,6) 2-8 °C'de bekletildi. Kuyucukların açıldığı blokların aralarına membranlar yerleştirildi ve sızdırmazlık sağlaması amacıyla mengene ile sıkıştırıldı. Membran ile iki kompartmana ayrılmış kuyucuklara 170 µL serum numunesi ve 170 µL HEPES tamponu (pH 7,6) konuldu. Kuyucukların üzeri *Thermo Scientific* marka (Lot: BK447F) gaz geçirgen sealer ile kapatıldı ve 37°C'de %5 CO₂'li inkübatörde (*Nüve* EC 160) 5 saat süre ile diyaliz gerçekleştirildi. Diyaliz sonrası her bir kuyucuktaki iki kompartmanda yer alan serum numunesi ve diyaliz tamponunun hacimleri belirlendi (sırasıyla µL birimi ile V_{SN} ve V_{DT}). Sonrasında, serum numuneleri ve diyaliz tamponlarındaki testosteron ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modular analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) e-602 modülü ile analiz edildi (konsantrasyonlar sırasıyla nmol/L birimi ile C_{SN} ve C_{DT}). Boudinot formülü (114) kullanılarak % *plasma protein binding* (PPB) aşağıdaki formül ile belirlendi:

$$\%PPB = 100 \times \left(\frac{\frac{C_{SN} \times V_{SN}}{170} - \frac{C_{DT} \times V_{DT}}{170}}{\frac{C_{SN} \times V_{SN}}{170}} \right)$$

Fraction unbound in plasma (FUB) ise “100-%PPB” formülü ile hesaplandı.

Diyaliz öncesi ve sonrasında diyaliz tamponuna olası protein bulaşının tespiti için, diyaliz sonrası tamponda benzetonyum klorür yöntemi ile ticari kitler kullanılarak cobas® 8000 modular analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) c-502 modülü ile protein ölçümleri yapıldı. Ölçüm için metodun LoD değeri olan 4 mg/dL üzerinde protein düzeylerine sahip diyaliz sonrası tampon için, farklı bir zamanda ilgili numunenin denge diyalizi uygulamaları tekrarlandı.

3.4.3. Denge Diyalizi Metot Validasyonu

3.4.3.1. Denge Diyalizi Doğrulama Deneyi

Doğrulama deneyi metil oranj (moleküler ağırlık 0,327 kDa) ve %10 dextran-40 Neofleks ile yapıldı. Metil oranj için 0,05 mM ve 0,10 mM (1x PBS içinde) çözeltiler için spektrofotometre (Optizen POP, Mecasys) ile maksimum absorbansın saptandığı dalga boyu olarak 465 nm belirlendi. Her kuyucuğun bir kompartmanına 250 µL 0,10 mM metil oranj çözeltisi diğer kompartmanına 250 µL %10 dextran-40 konuldu. Kuyucukların üzeri sealer ile kapatıldı ve 37°C’de %5 CO₂’li etüvde 6 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyucukların her iki kompartmanlarında metil oranj konsantrasyonunun aynı olduğu bulundu.

Ek olarak blokların üzerine yerleştirildiği alt tablanın üzerine diyaliz öncesi konan kağıt havlu, diyaliz sonrası kontrol edilerek, bloklar arası veya altına herhangi bir sızıntının olmadığı tespit edildi.

3.4.3.2. Olası 2-bromoestradiol İnterferansı İçin Önerilen Prosedürler

Denge diyalizi için tasarlanan HEPES tamponunda, testosteron ticari kiti kullanılarak cobas® 8000 modüler analizör serisi (Roche Diagnostics, USA) e-602 modülü ile yapılan analizlerde metodun LoQ (0,416 nmol/L) değerinin üzerinde testosteron konsantrasyonları elde edildi. PBS gibi farklı tamponlarda ve KrosClinic KRS-R-250 cihazından elde edilen deiyonize su için de benzer sonuçlar elde edildi. Bu durum; serum matriksinde bulunan albümin, SHBG ve diğer bağlayıcı proteinlerin tamponda bulunmaması nedeniyle, metot için ilk inkübasyonda proteinlere bağlı

testosteronun serbestleşmesinde kullanılan 2-bromoestradiol'ün, bağlayıcı proteinlere bağlanamaması sonucunda testostereona özgü biotinlenmiş monoklonal antikora bağlanmak için işaretli testosteron ile yarışmaya girmesi olarak değerlendirildi. Bunun için, *bovine* serum albümin içerikli HEPES tamponunda ve *human* albümin solüsyonu (Albuman 200 mg/mL, Centurion İlaç San. ve Tic. A.Ş.)'nda yapılan analizlerde yine LoQ değerinin üzerinde testosteron konsantrasyonları elde edildi. Testostereona bağlı olmayan saf SHBG temin edilemediği için SHBG içerikli tamponlar ile değerlendirme yapılamamıştır. Bu çalışmada olası 2-bromoestradiol'ün interferansı için 3 prosedür tanımlandı. **Prosedür 1** için; diyaliz sonrası tamponda herhangi bir işlem yapmadan testosteron konsantrasyonları elde edildi. **Prosedür 2** için; diyaliz sonrası tamponun analizi ile elde edilen testosteron konsantrasyon değeri, diyaliz öncesi HEPES tamponunun analizi ile elde edilen testosteron konsantrasyon değerinden çıkarıldı. **Prosedür 3** için; metodun LoD değerinden (0,087 nmol/L) düşük düzeylerde testosteron konsantrasyonlarına ve >150000 efektif sinyale sahip serum numuneleri belirlenerek, bu serum numuneleri ile diyaliz sonrası tampon, serum/tampon oranı 1:3 olacak şekilde karıştırıldı ve bu karışımdan analizlerle elde edilen testosteron konsantrasyonları 4/3 dilüsyon faktörü (1,33) ile çarpıldı.

3.4.3.3. Denge Diyalizi İçin Standart Koşulların Belirlenmesi

İnkübasyon süresinin karakterizasyonunda, seçilen bir serum numunesi kullanılarak prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar (her bir uygulama için 5 tekrar) sonrası yapılan analizlerle denge diyalizi için optimum inkübasyon süresi belirlendi.

Denge diyalizi için inkübasyon 37 °C'de yapılacağı için, oda sıcaklığında hazırlanan HEPES tamponun pH düzeyleri, 37 °C'de pH ölçümü yapan ABL90 FLEX (Radiometer Medical ApS) kan gazı cihazı sonuçları ile karşılaştırıldı. 37 °C'de pH 7,4 için en uygun, oda sıcaklığında hazırlanacak HEPES tamponun pH düzeyleri 7,6 olarak saptandı. Kan gazı cihazı pH ölçümleri ile, iki farklı serum numunesi için başlangıç pH düzeyleri belirlendi ve 37 °C'de %5 CO₂'li inkübatörde diyaliz gerçekleştirildikten sonra serum numuneleri ve HEPES tamponlarında pH ölçümleri tekrarlanarak inkübasyon süresi içinde pH değişimi değerlendirildi.

3.4.3.4. Presizyon Çalışmaları

Presizyon çalışmaları için 2 farklı seviye total testosteron düzeylerine sahip serum numuneleri seçildi. Her numune ve ölçüm prosedürü için ön hassasiyet değerlendirmesi CLSI EP05-A3 kılavuzuna göre gerçekleştirildi (115). Tekrarlanabilirlik, çalışmalar arası ve laboratuvar içi presizyon standart sapmaları, üç gün boyunca serum numunelerinin üç tekrarı ile günde iki çalışma kullanılarak belirlendi. Bu durum, 3 (gün) $\times$ 2 (günlük çalışma) $\times$ 3 (çalışma başına kopya) olarak ifade edildi.

3.4.3.5. Metot Karşılaştırma Çalışmaları

Denge diyalizi metodu için metot karşılaştırma çalışması, Maglumi 2000 Plus otomatik *immunoassay* analizöründe (Snibe Co., Ltd.) serbest testosteron analizlerinin CLIA yöntemi ile ticari kitler (referans numarası 1302022011M) kullanılması ile yapıldı. Serbest testosteron, dış kalite kontrol programına (RIQAS *Immunoassay Speciality EQA programme*) dahildi. Serbest testosteron için ölçüm aralığı 1,74-520,5 pmol/L; *limit of blank* (LoB) 1,74 pmol/L; *limit of detection* (LoD) 3,47 pmol/L; erkek bireyler için referans aralığı (5. – 95.persentil) 52,05-173,5 pmol/L idi. Metodun bildirilen laboratuvar içi % varyasyon katsayıları 10,4 pmol/L, 52,16 pmol/L ve 173,43 pmol/L serum havuzları için sırasıyla %6,68, %5,75 ve %3,55 idi.

3.5. İstatistiksel Analizler

İstatistiksel analizler *MedCalc® Statistical Software version 22.001* (MedCalc Software Ltd, Ostend, Belgium) ve *GraphPad Prism Version 9.5.1* (733) ile yapıldı. Metot karşılaştırmalar için kullanılacak istatistiksel analizler CLSI EP09-A3 kılavuzuna göre yapıldı (116). Kılavuza göre karşılaştırmalarda kullanılan istatistiksel analizler korelasyon katsayısı (r), determinasyon katsayısı (R^2), linear regresyon, Deming regresyon, Passing-Bablok regresyon, *weighted* regresyon, Bland-Altman grafikleri, *scatter plot/scatter* diagramdır. Kolmogorov-Smirnov veya Shapiro-Wilk testi ile verisetinin normal dağılıma sahip olup olmadığı kontrol edildi. Tanımlayıcı istatistik için normal dağılım sergileyen sürekli değişkenler ortalama $\pm$ standart sapma

(SS) olarak, normal dağılım sergilemeyen sürekli değişkenler ve ordinal değişkenler medyan (25. persentil - 75. persentil) olarak gösterildi. Sürekli değişkenler için iki grup karşılaştırmalarında Student's T testi veya Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kategorik değişkenler arasındaki ilişkilerin değerlendirilmesinde *Pearson's chi square* testi kullanıldı. Gauss dağılımına uymayan değişkenlerin parametrik karşılaştırmalarında değişkenler için ln-transformasyon yapıldı. Grup karşılaştırmalarında olası karıştırıcı faktörlerin (kovaryant) etkilerini test etmek için kovaryans analiz (*analysis of covariance* - ANCOVA) yapıldı. Değişkenler arasında ilişkinin yönü ve derecesinin belirlenmesinde Pearson korelasyon katsayısı (r) veya Spearman korelasyon katsayısı (rho) kullanıldı.

Beklenen ve gözlemlenen frekansların karşılaştırmalarında Pearson ki-kare testi kullanıldı. p değerinin 0,05'ten küçük olması (*two-tailed*) istatistiksel anlamlılık olarak değerlendirildi.

4. SONUÇLAR

4.1. Denge Diyalizi Metodu İçin Yapılan Validasyon Çalışmaları Sonuçları

4.1.1. Denge Diyalizi İçin Standart Koşulların Belirlenmesi Sonuçları

İnkübasyon süresinin karakterizasyonunda, seçilen bir serum numunesi kullanılarak prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar (her bir uygulama için 5 tekrar) sonrası yapılan analizlerle denge diyalizi için optimum inkübasyon süresi 5 saat olarak belirlendi. Seçilen serumun bazal total testosteron düzeyi 20,751 nmol/L ve HEPES tamponu için testosteron düzeyi ise 0,684 nmol/L idi. Optimum inkübasyon süresinin belirlenmesinde kriterlerden birincisi nmol/L ve % için serbest testosteron düzeylerinin bir önceki ve bir sonrası inkübasyon süresi ile istatistiksel olarak anlamlı farklı olmaması iken; ikincisi, ilgili inkübasyon süresi için % serbest testosteron düzeylerinin literatürde bildirilen %1,0-3,0 aralığında olması idi (1–3). Birinci kriteri prosedür 1, 2 ve 3'ün 5. saati sağlarken, ikinci kriteri prosedür 2 ve 3'ün 5.saati sağladı (Tablo 12 ve Şekil 10).

Tablo 12: Prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar (her bir uygulama için 5 tekrar) sonrası yapılan denge diyalizi analizleri ile elde edilen serbest testosteron düzeyleri (nmol/L ve % için)

		İnkübasyon süresi			
		4 saat	5 saat	6 saat	7 saat
Prosedür 1	Serbest testosteron, nmol/L	1,006 ± 0,027	1,056 ± 0,035	1,074 ± 0,089	2,254 ± 0,397
	Serbest testosteron, %	5,39 ± 0,15	5,66 ± 0,19	5,75 ± 0,47	12,07 ± 2,12
Prosedür 2	Serbest testosteron, nmol/L	0,339 ± 0,172	0,478 ± 0,025	0,491 ± 0,085	1,678 ± 0,386
	Serbest testosteron, %	2,27 ± 0,17	2,56 ± 0,14	2,63 ± 0,45	8,98 ± 2,07
Prosedür 3	Serbest testosteron, nmol/L	0,389 ± 0,198	0,478 ± 0,061	0,429 ± 0,106	1,489 ± 0,277
	Serbest testosteron, %	2,61 ± 0,21	2,56 ± 0,32	2,30 ± 0,57	7,98 ± 1,481

İnkübasyon süreleri: İS

sT (nmol/L) Prosedür 1 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,019, 0,022 ve 0,019 idi.

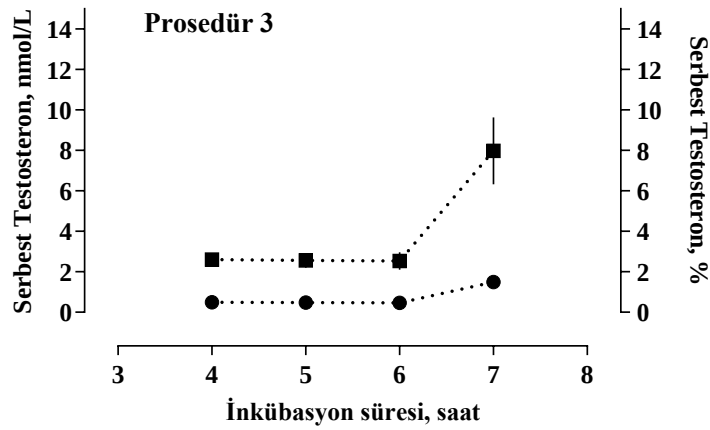
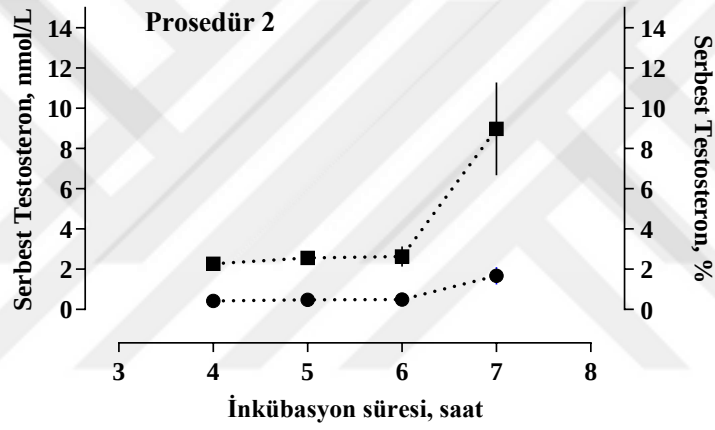
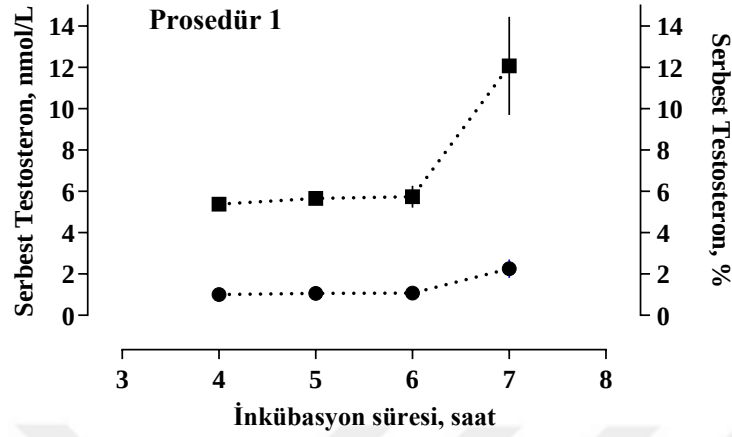
sT (%) Prosedür 1 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,019, 0,022 ve 0,019 idi.

sT (nmol/L) Prosedür 2 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,006, 0,020 ve 0,017 idi.

sT (%) Prosedür 2 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,017, 0,020 ve 0,017 idi.

sT (nmol/L) Prosedür 3 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,002, 0,009 ve 0,004 idi.

sT (%) Prosedür 3 için ANOVA sonrası post-hoc Tamhane'sT2 testi ile yapılan karşılaştırmalar ile İS_{7saat} ile İS_{4saat}, İS_{5saat} ve İS_{6saat} için elde edilen p değerleri sırasıyla 0,010, 0,009 ve 0,004 idi.



Şekil 10: Prosedür 1,2 ve 3'ün her biri için 4, 5, 6, 7 saatlik inkübasyonlar (her bir uygulama için 5 tekrar) sonrası yapılan denge diyalizi analizleri ile elde edilen serbest testosteron düzeyleri (kutucuklar ortalama $\pm$ SS'yi göstermekte olup; serbest testosteron için, içi dolu kareler %; içi dolu daireler nmol/L'yi ifade etmektedir)

Oda sıcaklığında ($21,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) hazırlanan pH 7,4 ve pH 7,6'lık HEPES tamponları ile, 2 farklı serum numunesi için $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de ve %5 CO_2 'li inkübatörde 5 saatlik inkübasyon ile denge diyalizi uygulamaları yapıldı. Diyaliz öncesi ve sonrası serum numunelerinde ve HEPES tamponlarında pH ölçümleri (37°C 'de) için, pH ölçümü yapan ABL90 FLEX (Radiometer Medical ApS) kan gazı cihazı ölçümleri karşılaştırıldı. Serum numuneleri 1 ve 2, oda sıcaklığındaki pH'si 7,5 olan konsantre HEPES tamponu (776 mM N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethane sulfonic asit) ve 220 mM NaOH) ile 9:1 oranında (9 birim serum : 1 birim tampon) diyaliz öncesi muamele edildi. Serum 3 ve 4 için herhangi bir ön işlem yapılmadı (Tablo 13). Analiz sonuçlarında, 37°C 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 5 saatlik denge diyalizi için ideal pH 7,4 için en uygun, oda sıcaklığında hazırlanacak olan HEPES tamponunun pH düzeyi 7,6 saptandı.

Tablo 13: Oda sıcaklığında ($21,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) hazırlanan pH 7,4 ve pH 7,6'lık HEPES tamponları ile 4 farklı serum numunesi için $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de %5 CO_2 'li inkübatörde 5 saatlik inkübasyon ile denge diyalizi uygulamaları sonuçları

		ABL90 FLEX Kan Gazı Cihaz Sonuçları: Diyaliz Öncesi			ABL90 FLEX Kan Gazı Cihaz Sonuçları: Diyaliz Sonrası		
Diyaliz için oda sıcaklığında ($21,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,5\text{ }^{\circ}\text{C}$) hazırlanan tampon	Denge Diyalizi için Serum/Tampon	pH	pCO ₂ (mmHg)	Glukoz (mg/dL)	pH	pCO ₂ (mmHg)	Glukoz (mg/dL)
HEPES Tamponu, pH: 7,4	Serum Numune 1	7,25	32,3	83	7,13	30,6	41
	HEPES Tampon	7,17	<12	-	7,16	27,9	41
	Serum Numune 2	7,27	29,6	86	7,13	29,6	40
	HEPES Tampon	7,17	<12	-	7,16	29,3	43
HEPES Tamponu, pH: 7,6	Serum Numune 3	7,47	36,5	100	7,29	29,1	46
	HEPES Tampon	7,37	<12	-	7,34	28,3	46
	Serum Numune 4	7,45	40	165	7,32	28,3	80
	HEPES Tampon	7,37	<12	-	7,35	28,2	78

4.1.2. Presizyon Çalışma Sonuçları

İki farklı seviye total testosteron düzeylerine sahip serum numuneleri (düzey 1 için 21,063 nmol/L, düzey 2 için 6,524 nmol/L) için yapılan presizyon çalışma sonuçları Tablo 14'te gösterilmiştir. Düzey 1 ve 2 için prosedür 1'in presizyon sonuçlarına ait %CV değerleri daha düşük olmasına rağmen, % serbest testosteron için kabul edilebilir düzeylerin üzerinde idi. Diğer iki prosedürden prosedür 3'ün tekrarlanabilirliğe ait %CV değerleri daha kabul edilebilir düzeylerde idi (Düzey 1 ve 2 için sırasıyla %4,5 ve %5,4).



Tablo 14: İki farklı seviye total testosteron düzeylerine sahip serum numuneleri (Düzey 1 için 21,063 nmol/L, düzey 2 için 6,524 nmol/L) için yapılan presizyon çalışma sonuçları

				Tekrarlanabilirlik		Çalışmalar arası		Laboratuvar içi	
		Grand Ortalama (nmol/L)	Serbest Testosteron (%)	S _r (nmol/L)	%CV	S _{rr} (nmol/L)	%CV	S _T (nmol/L)	%CV
Düzey 1	Prosedür 1	0,985	4,68	0,0354	3,6	0,0097	1,0	0,0527	5,35
	Prosedür 2	0,361	1,71	0,0316	8,8	0,0097	2,7	0,0486	13,5
	Prosedür 3	0,576	2,73	0,0257	4,5	0,0121	2,1	0,0434	7,5
Düzey 2	Prosedür 1	1,124	17,23	0,0472	4,2	0,0178	1,6	0,0641	5,7
	Prosedür 2	0,389	5,96	0,0341	8,8	0,0162	4,1	0,0442	11,3
	Prosedür 3	0,628	9,63	0,0336	5,4	0,0282	4,5	0,0672	10,7

3 (gün) × 2 (günlük çalıştırma) × 3 (çalışma başına kopya)

S_r : Tekrarlanabilirlik için standart sapma

S_{rr} : Çalışmalar arası için standart sapma

S_T : Laboratuvar içi için standart sapma

4.1.3. Metot Karşılaştırma Çalışma Sonuçları

Metot karşılaştırmaları CLSI EP09-A3 kılavuzuna göre yapıldı. 40 farklı bireyden elde edilen serum numuneleri kullanılarak, denge diyalizi uygulamaları sonrası *Elecsys Testosterone II* kiti ile elde edilen serbest testosteron ($DDsT_{ECLIA}$) sonuçları (y), *Maglumi Free Testosterone* kiti ile elde edilen serbest testosteron (sT_{CLIA}) sonuçları (x) (aday ölçüm metodu için) karşılaştırıldı. Ek olarak, $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları (y); Vermeulen ve ark. (1,8,56) tarafından önerilen, serbest testosteron hesaplamasında kullanılan formülle elde edilen serbest testosteron ($sT_{Vermeulen}$) sonuçları (x) ile de karşılaştırıldı.

Her iki metottan elde edilen ölçüm sonuçları için bias aşağıdaki formüllerle hesaplanmıştır:

$$Bias (nmol/L) = (DDsT_{ECLIA} - sT_{CLIA})$$

$$Bias (\%) = \frac{(DDsT_{ECLIA}) - (sT_{CLIA})}{(sT_{CLIA})} \times 100$$

Her bir numune için hesaplanan bias değerlerinin Gauss dağılımına uygunluğu Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edildikten sonra, normal dağılım sergileyen bias veriseti için ortalama değerler alındı. Elde edilen bias (nmol/L) ve bias (%) sonuçları ile tekrarlanabilirlik çalışmalarından elde edilen standart sapma (SS) ve %CV değerleri kullanılarak %90 güven aralığı için total analitik hata (TAH) değerleri hesaplandı ve daha önce serbest testosteron için *Wisconsin State Laboratory of Hygiene* (WSLH) tarafından bildirilen (117) total kabul edilebilir hata limitleri ile karşılaştırıldı ($\pm 1,041$ nmol/L ya da $\pm \%30$).

$$TAH = Bias + 1,65 \times SS \text{ veya}$$

$$\%TAH = \%Bias + 1,65 \times \%CV \text{ (118)}$$

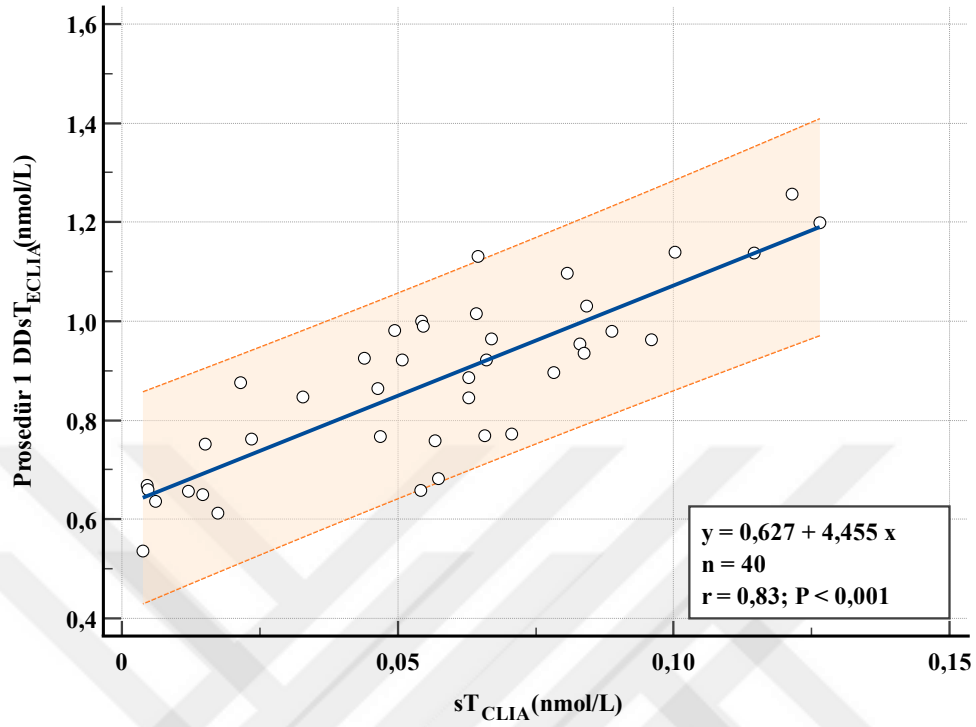
Tablo 15: sT_{CLIA} sonuçları (x) ile prosedür 1,2 ve 3 için DDsT_{ECLIA} sonuçları (y) karşılaştırma verileri (sT_{CLIA} için numune konsantrasyon aralığı 0,0038 – 0,1265 nmol/L idi)

	Numune Konsantrasyon Aralığı	Linear Regresyon Analizi	Passing/Bablok Regresyon Analizi	Bias (nmol/L) (%95 G.A.)	Bias (%) (%95 G.A.)	TAH (nmol/L)	TAH (%)
DDsT _{ECLIA} (Prosedür 1)	0,5353-1,2563 nmol/L	y = 0,627 + 4,455x r = 0,826 R ² = 0,682	y = 0,511 + 6,290x Rho: 0,786 (%95 G.A.: 0,628-0,882)	+ 0,821 nmol/L (0,773-0,870 nmol/L)	+ % 1326,2 (%1179,4-1473,1)	+0,879	+%1332,1
DDsT _{ECLIA} (Prosedür 2)	0,0628-0,6635 nmol/L	y = 0,109 + 3,918x r = 0,827 R ² = 0,684	y = -0,0437 + 5,094x Rho: 0,774 (%95 G.A.: 0,610-0,875)	+ 0,273 nmol/L (0,232-0,315 nmol/L)	+ % 448,5 (%398,4-498,5)	+0,325	+%463,0
DDsT _{ECLIA} (Prosedür 3)	0,0970-0,6712 nmol/L	y = 0,115 + 3,756x r = 0,877 R ² = 0,769	y = -0,0719 + 4,636x Rho: 0,835 (%95 G.A.: 0,708-0,910)	+ 0,270 nmol/L (0,234-0,306 nmol/L)	+ % 486,8 (%428,3-545,2)	+0,312	+%494,2
G.A.: Güven Aralığı r: Pearson korelasyon katsayısı Rho: Spearman korelasyon katsayısı R ² : Determinasyon katsayısı TAH: Total analitik hata							

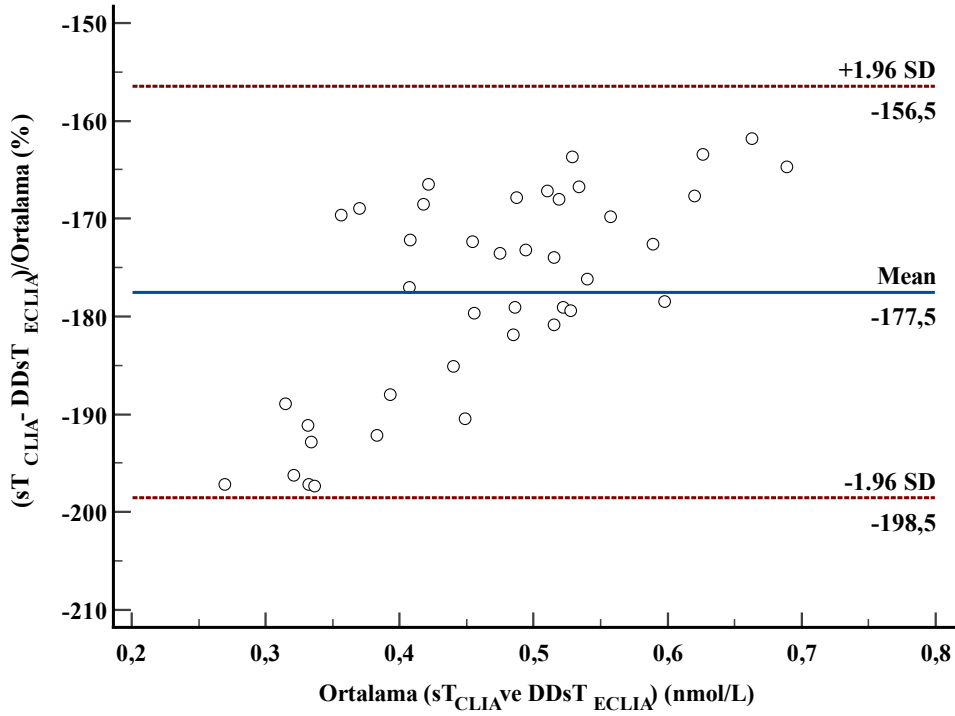
Tablo 16: sT_{Vermeulen} sonuçları (x) ile prosedür 3 için DDsT_{ECLIA} sonuçları (y) ve sT_{CLIA} sonuçlarının (y) karşılaştırma verileri (sT_{Vermeulen} için numune konsantrasyon aralığı 0,0059 – 0,5560 nmol/L idi)

	Numune Konsantrasyon Aralığı	Linear Regresyon Analizi	Passing/Bablok Regresyon Analizi	Bias (nmol/L) (%95 G.A.)	Bias (%) (%95 G.A.)	TAH (nmol/L)	TAH (%)
DDsT _{ECLIA} (Prosedür 3)	0,0970-0,6712 nmol/L	y = 0,120 + 0,795x r = 0,84 R ² = 0,71	y = 0,0874 + 0,957x Rho: 0,811 (%95 G.A.: 0,669-0,896)	+ 0,067 nmol/L (0,040-0,093 nmol/L)	+ % 20,8 (%8,5-33,1)	+0,109	+%28,2
sT _{CLIA}	0,0038 – 0,1265 nmol/L	y = 0,000680 + 0,214x r = 0,97 R ² = 0,94	y = 0,000391 + 0,219x Rho: 0,945 (%95 G.A.: 0,898-0,971)	- 0,204 nmol/L (-0,241- -0,166 nmol/L)	- % 78,7 (-%79,6- - %77,7)	-0,207	-%84,3

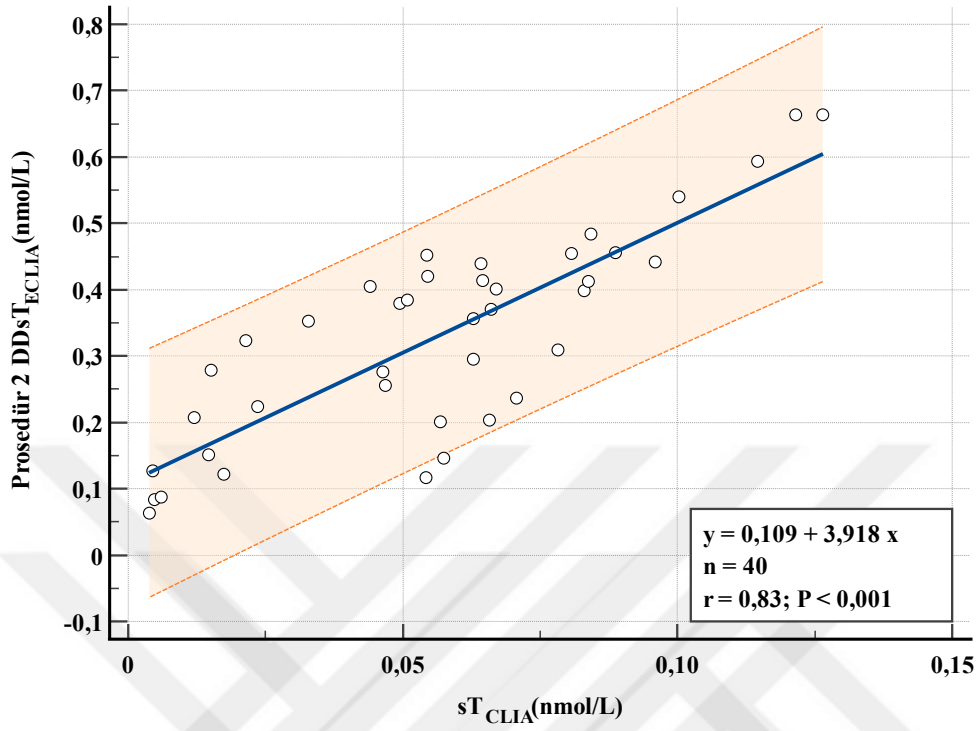
G.A.: Güven Aralığı r: Pearson korelasyon katsayısı Rho: Spearman korelasyon katsayısı R²: Determinasyon katsayı TAH: Total analitik hata



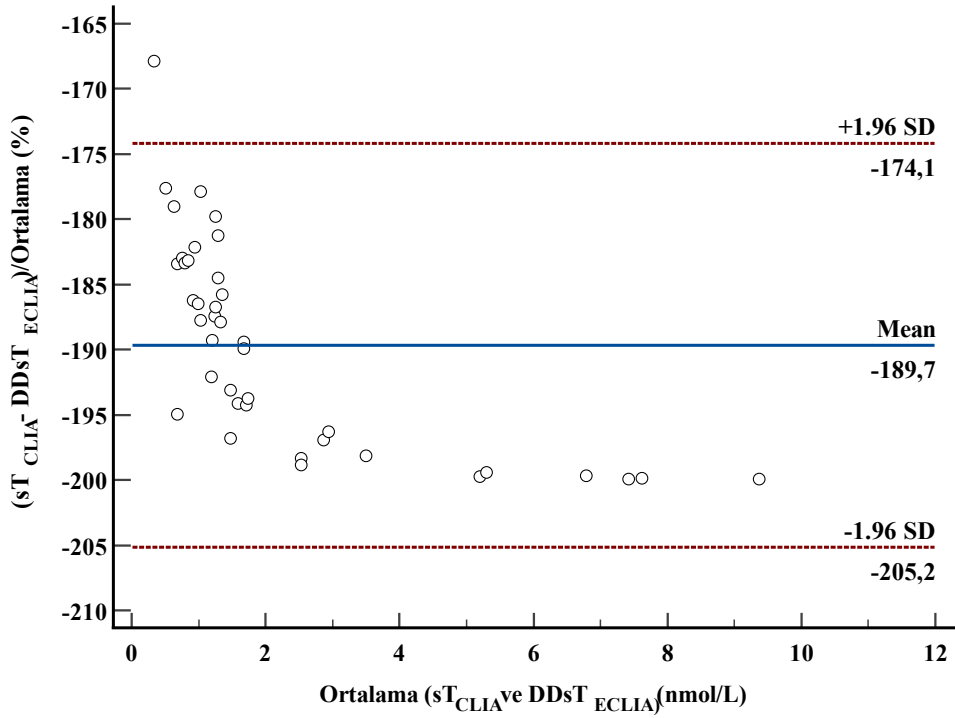
Şekil 11: Prosedür 1 için DDsT_{ECLIA} sonuçları (y) ve sT_{CLIA} sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *scatter diagram* (%95 güven aralığı)



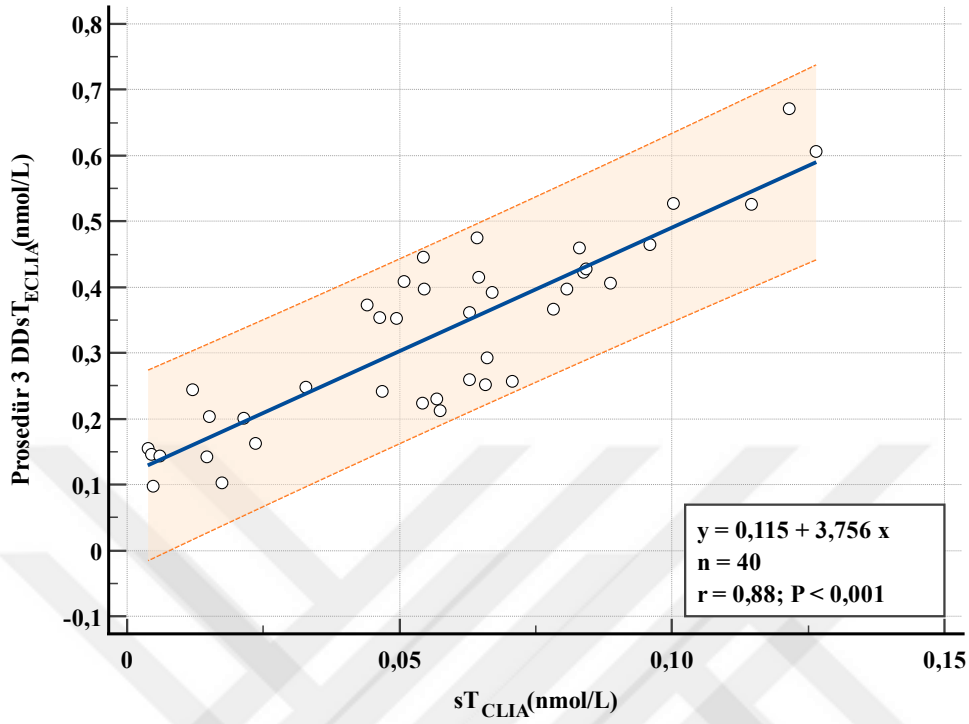
Şekil 12: Prosedür 1 için DDsT_{ECLIA} sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



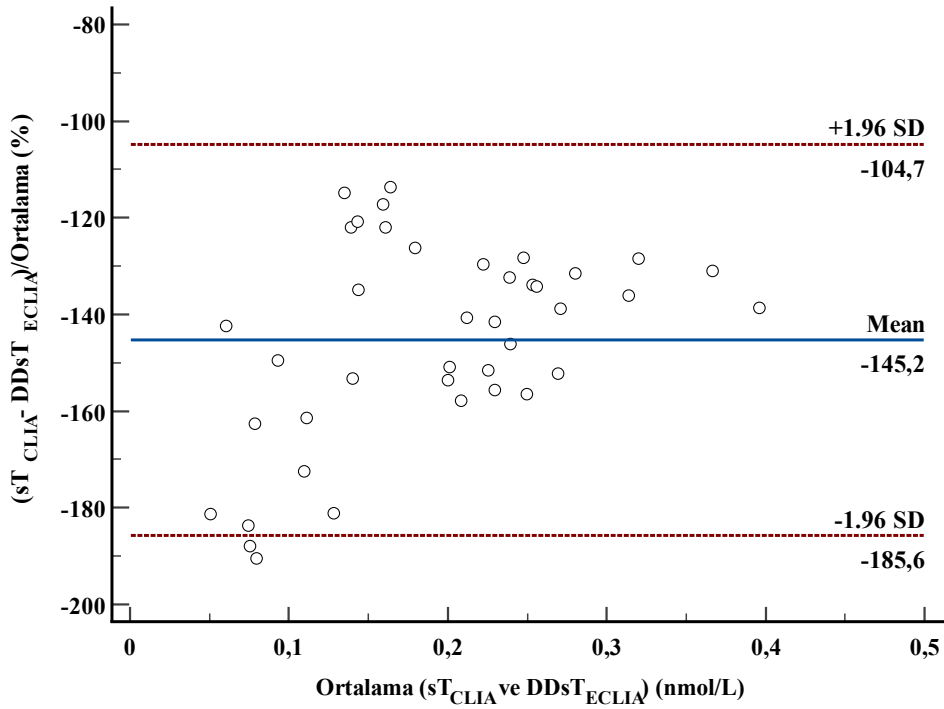
Şekil 13: Prosedür 2 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları (y) ve sT_{CLIA} sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *scatter diagram* (%95 güven aralığı)



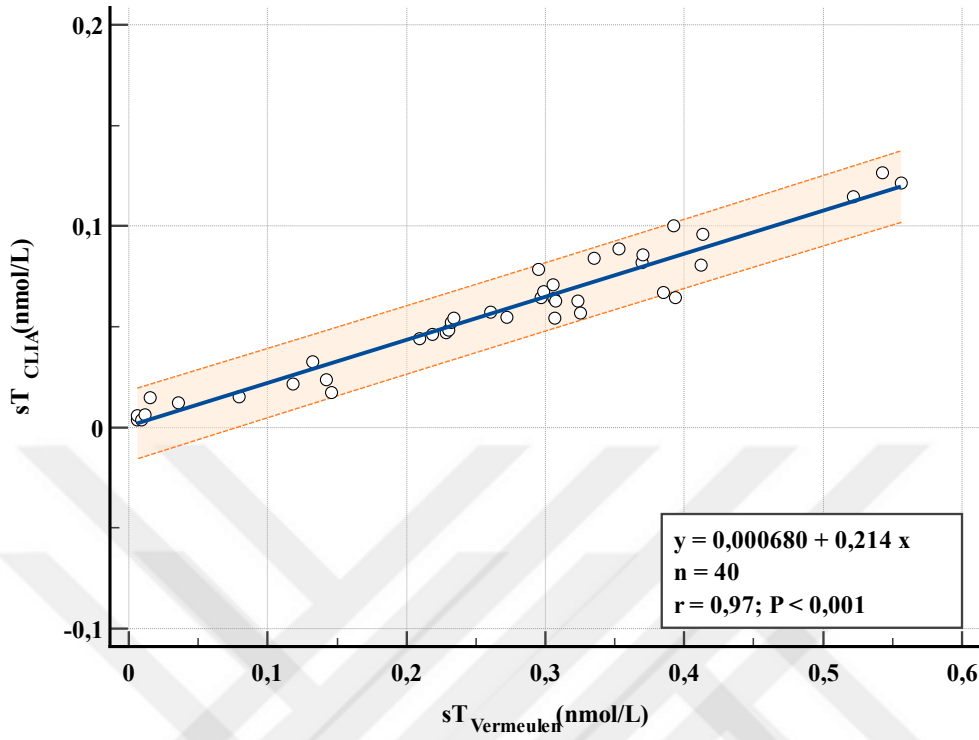
Şekil 14: Prosedür 2 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



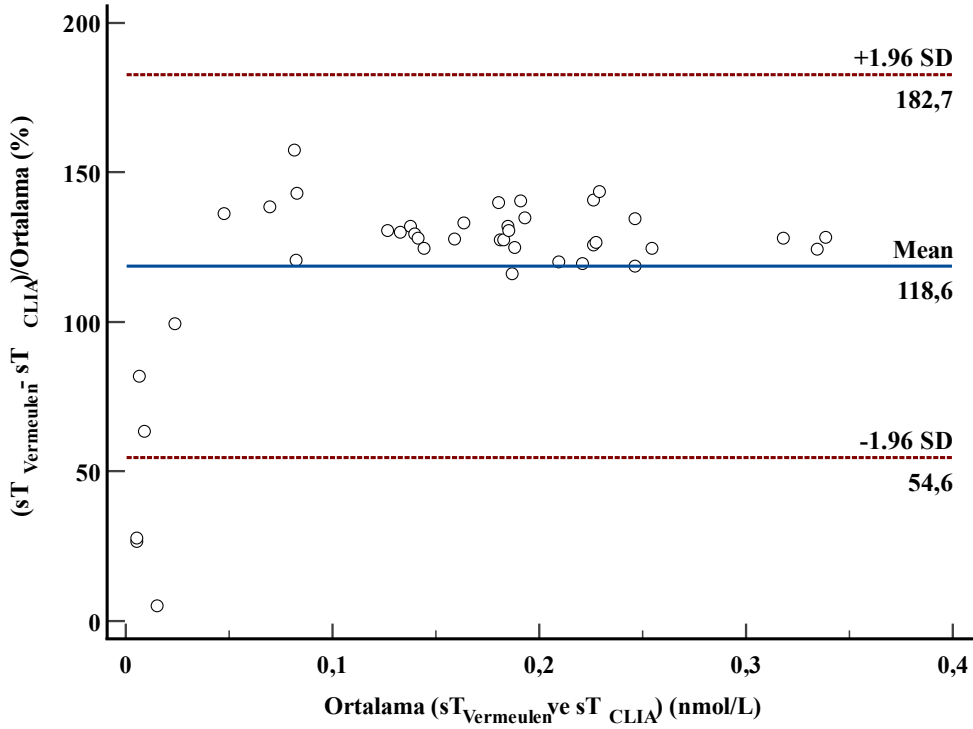
Şekil 15: Prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları (y) ve sT_{CLIA} sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *scatter diagram* (%95 güven aralığı)



Şekil 16: Prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



Şekil 17: $sT_{\text{Vermeulen}}$ sonuçları (x) ve sT_{CLIA} sonuçları (y) için yapılan linear regresyon analizine ait *scatter diagram* (%95 güven aralığı)



Şekil 18: $sT_{\text{Vermeulen}}$ sonuçları ve sT_{CLIA} sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği

Komperatif metot olarak CLIA'nın kabul edildiği durum için sT_{CLIA} sonuçlarına göre yapılan metot karşılaştırma uygulamaları ile prosedür 1,2 ve 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları için TAH (nmol/L) değerleri, bildirilen total kabul edilebilir hata limiti ($\pm 1,041$ nmol/L) içinde iken (sırasıyla $+0,879$ mol/L, $+0,325$ nmol/L ve $+0,312$ nmol/L), TAH (%) değerleri total kabul edilebilir hata limitinin ($\pm \%30$) oldukça üzerindeydi (Sırasıyla, $+\%1332,1$, $+\%463,0$ ve $+\%494,2$) (Tablo 15 ve 16, Şekil 11-18). Komperatif metot olarak Vermeulen'in algoritmasının kabul edildiği durum için $sT_{Vermeulen}$ sonuçlarına göre yapılan metot karşılaştırma uygulamaları ile prosedür 3 $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları için, TAH (nmol/L) ve TAH (%) sırasıyla $+0,109$ nmol/L ve $+\%28,2$ idi. Komperatif metot olarak Vermeulen'in algoritmasının kabul edildiği $sT_{Vermeulen}$ sonuçlarına göre yapılan metot karşılaştırma uygulamaları ile sT_{CLIA} sonuçları için, TAH (nmol/L) ve TAH(%) sırasıyla $-0,207$ nmol/L ve $-\%84,3$ idi. Linear ve Passing/Bablok regresyon analizlerinde, sT_{CLIA} sonuçları ile $sT_{Vermeulen}$ sonuçları arasındaki ilişkiyi gösterir uyum göreceli olarak daha iyi iken ($R^2 = 0,94$), TAH (%) değerlerin yüksek olması ($-\%84,3$) ölçüm/değer aralıklarının farklı olduğunu göstermiştir. Linear ve Passing/Bablok regresyon analizlerinde, prosedür 3 için $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları ile $sT_{Vermeulen}$ sonuçları arasındaki ilişkiyi gösterir uyum orta derecede iken ($R^2 = 0,71$), TAH (%) değeri ($\%28,2$) daha kabul edilebilir düzeyde idi. sT_{CLIA} sonuçları için ölçüm aralıklarının, $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları için ölçüm aralıkları ve $sT_{Vermeulen}$ sonuçları için değer aralıklarından farklı olmasından dolayı % serbest testosteron için metot karşılaştırma uygulamaları yapılamamıştır.

4.2. Denge Diyaliz Metodu İçin Esas Alınan Aplikasyon Bilgileri

Denge diyalizi için optimum inkübasyon süresinin belirlenmesi çalışmaları, seçilen tampon için optimum pH düzeylerinin belirlenmesi çalışmaları, presizyon çalışmaları ve metot karşılaştırma çalışmaları sonuçlarına göre denge diyalizi metodu için esas alınan aplikasyon bilgileri Tablo 17'de gösterilmiştir.

Tablo 17: Denge diyalizi metodu için esas alınan aplikasyon bilgileri

Aplikasyon Bilgisi	
Diyalizat tamponu	HEPES tamponu (52,75 mmol/L) pH: 7,6 (21,0 °C ± 0,5 °C)
Serum/tampon hacimleri	170 µL / 170 µL
Ortam koşulları	37 °C ve %5 CO ₂ 'li inkübatör
Membran özellikleri	Regenerated-cellulose ve 10K MWCO (10 kDa)
Sealer	Gaz geçirgen
İnkübasyon süresi	5 saat
Olası 2-bromoestradiol interferansı için seçilen prosedür	Prosedür 3
Protein bulaşımının tespiti	Diyaliz sonrası tamponda protein düzeylerinin <4 mg/dL olduğunun kontrol edilmesi

4.3. Denge Diyaliz Uygulamaları ve Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Elde Edilen Serbest Testosteron ve bioT Verilerinin MetS Profilleri İle Değerlendirme Sonuçları

Çalışmaya dahil etme ve dışlama kriterlerine göre 20-49 yaş aralığında 202 erkek gönüllü dahil edildi. Primer/sekonder/tersiyer hipertiroidi/hipotiroidisi olan 10 gönüllü, NCEP ATPIII veya IDF kriterlerinden biri veya birkaçının tam eşik değerde olmasıyla MetS olup/olmadığının net kararı verilemeyen 3 gönüllü ve IDF için bel çevresi kriterini sağlamayan ancak diğer dört kriteri sağlayan 1 gönüllü çalışmadan çıkartılarak geri kalan 188 erkek gönüllü için değerlendirmeler yapıldı.

Çalışmada değerlendirilen 188 erkek gönüllü için NCEP ATPIII ve IDF'e göre MetS kriterlerini karşılayan komponentler ve frekansları Tablo 18'de gösterilmiştir. Literatüre baktığımızda İspanyol ve Türk popülasyonda yapılan ayrı ayrı çalışmalarda NCEP ATPIII kriterlerinin MetS tanısı için sensitivitesi düşük bulunmakla beraber, IDF kriterlerinin kullanımı hassasiyeti artırmıştır (119,120). Biz de çalışmamızın geri kalanında MetS için değerlendirmeleri IDF'ye göre yaptık. IDF'ye göre MetS'si olmayan/olan gruplarda demografik ve laboratuvar verilerinin karşılaştırması Tablo 19'da gösterilmiştir. MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta yaş, VKİ, bel çevresi ortalama değerleri ile açlık glukozu, insülin, HOMA-IR, trigliserid, sistolik ve

diyastolik kan basıncı ortanca değerleri istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı yüksek iken ($p < 0,0001$), HDL kolesterol ortalama değerleri istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı düşüktü ($p < 0,0001$). Ancak iki grup arasında total kolesterol ortalama değerleri ve LDL kolesterol ortanca değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi (Sırasıyla, $p=0,327$ ve $p=0,435$).

Tablo 18: Çalışmada değerlendirilen 188 erkek gönüllü için NCEP ATPIII ve IDF'ye göre MetS kriterlerini karşılayan komponentler ve frekansları

	NCEP ATPIII'e göre	IDF'ye göre
<u>MetS Olmayan/Olan</u>		
MetS Olmayan, N(%)	109 (%58)	96 (%51,1)
MetS Olan, (N%)	79 (%42)	92 (%48,9)
<u>Kriteri Sağlayan Komponent</u>		
Bel Çevresi, N (%)	91 (%48,4)	138 (%73,4)
Açlık glukozu, N (%)	47 (%25)	74 (%39,4)
HDL-kolesterol, N (%)	76 (%40,4)	76 (%40,4)
Trigliserit, N (%)	90 (%47,9)	90 (%47,9)
Kan Basıncı, N (%)	92 (%48,4)	92 (%48,4)
<u>Kriteri Sağlayan Komponent Sayısı</u>		
0, N (%)	30 (%16,0)	21 (%11,2)
1, N (%)	46 (%24,5)	32 (%17,0)
2, N (%)	33 (%17,6)	42 (%22,3)
3, N (%)	42 (%22,3)	37 (%19,7)
4, N (%)	27 (%14,4)	37 (%19,7)
5, N (%)	10 (%5,3)	19 (%10,1)

MetS: Metabolik Sendrom

NCEP ATPIII: National Cholesterol Education Program Adult Treatment Panel III

IDF: International Diabetes Federation

Tablo 19: IDF'ye göre MetS'si olmayan/olan gruplarda demografik ve laboratuvar verilerinin karşılaştırması

Parametre	Tüm Gönüllüler (N=188)	MetS Olmayan (N=96)	MetS Olan (N=92)	P
Yaş, yıl	35,7 ± 8,7	32,5 ± 8,6	39,0 ± 7,4	<0,0001
BMI, kg/m ²	29,0 ± 5,6	26,5 ± 4,9	31,7 ± 5,0	<0,0001
Bel çevresi, cm	101,4 ± 14,4	94,5 ± 13,9	108,5 ± 11,2	<0,0001
Açlık glukozu, mg/dL	94 (88-110)	91 (85-96)	105 (94-127)	<0,0001
İnsulin, (µIU/mL)	13,21 (8,46-21,17)	10,34 (6,41-14,88)	16,84 (11,79-26,28)	<0,0001
HOMA-IR,	3,40 (1,95-5,41)	2,29 (1,47-3,74)	5,00 (3,16-8,36)	<0,0001
Trigliserit, mg/dL	142,0 (87,3-223,5)	98,5 (72,0-141,8)	191,5 (154,3-262,8)	<0,0001
Total Kolesterol mg/dL	191,8 ± 53,4	188,1 ± 61,2	195,7 ± 43,8	= 0,327
HDL-kolesterol, mg/dL	43,0 ± 10,6	48,0 ± 10,0	37,8 ± 8,7	<0,0001
LDL-kolesterol, mg/dL	116,0 (89,3-135,8)	115,0 (86,8-130,8)	116,5 (90,3-139,8)	= 0,435
SKB, mmHg	124 (117-138)	120 (110-127)	131 (120-140)	<0,0001
DKB, mmHg	80 (80-90)	80 (70-80)	90 (80-100)	<0,0001

MetS: Metabolik Sendrom SKB: Sistolik kan basıncı DKB: Diyastolik kan basıncı

MetS'si olmayan/olan gruplarda total testosteron, SHBG, $DDsT_{ECLIA}$ ve algoritmalar ile hesaplanan serbest testosteron ve bioT verilerinin karşılaştırması Tablo 20'de gösterilmiştir. MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta total testosteron ortalaması istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı düşük iken ($p<0,0001$), SHBG ortalamaları iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p=0,183$). MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L), $sT_{Sodergard}$ (nmol/L), $sT_{Wheeler}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) ortalama değerleri ile $sT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L) ortanca değeri istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı düşüktü ($p<0,0001$). MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta $bioT_{Vermeulen}$ (nmol/L), $bioT_{Sodergard}$ (nmol/L), $bioT_{Morris}$ (nmol/L) ortalama değerleri ile $bioT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L) ortanca değeri çok ileri düzeyde anlamlı düşüktü ($p<0,0001$). Her iki grupta $sT_{Vermeulen}$ (%), $bioT_{Vermeulen}$ (%), $sT_{Sodergard}$ (%), $bioT_{Sodergard}$ (%), $bioT_{Morris}$ (%) ve $sT_{Wheeler}$ (%) ortalama değerleri ile $sT_{Emadi-Konjin}$ (%), $bioT_{Emadi-Konjin}$ (%) ortanca değerleri istatistiksel olarak anlamlı farklı değildi ($p>0,05$). Farklı olarak, sT_{Ly} (%) ortalama değeri MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta istatistiksel olarak ileri derecede anlamlı düşüktü ($p=0,002$). MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı düşük iken ($p=0,012$), $DDsT_{ECLIA}$ (%) ortanca değeri MetS'si olan grupta istatistiksel olarak sınırda anlamsız yüksekti ($p=0,075$).

MetS'si olmayan grupta total testosteron referans aralığının alt sınırının altında ve üst sınırının üzerinde olanların yüzdeleri sırasıyla %1,0 ve %8,3 iken, MetS'si olan grupta ise bu yüzdeler sırasıyla %6,5 ve %2,2 idi. MetS'si olmayan grupta SHBG referans aralığının alt sınırının altında ve üst sınırının üzerinde olanların yüzdeleri sırasıyla %13,5 ve %8,3 iken, MetS'si olan grupta ise bu yüzdeler sırasıyla %19,6 ve %5,4 idi.

Tablo 20'de gösterilen karşılaştırma sonuçlarına yaşın karıştırıcı etkisinin olup/olmadığının belirlenmesi için kovaryans analizleri (*analysis of covariance - ANCOVA analyses*) sonuçları Tablo 21'de gösterilmiştir. Analiz için Gauss dağılıma uymayan $sT_{Emadi-Konjin}$ (%), $bioT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L) ve $DDsT_{ECLIA}$ (%) değişkenler için Ln-transformasyon yapıldı. ANCOVA ile, MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan grupta total testosteron ve SHBG ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktü (Sırasıyla, $p<0,001$ ve $p<0,01$). MetS'si olmayan gruba göre MetS'si olan

grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ve $\text{bio}T_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı dūřuk iken (sırasıyla, $p=0,005$ ve $p=0,004$); $sT_{\text{Vermeulen}}$ (%) ve $\text{bio}T_{\text{Vermeulen}}$ (%) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı yūksekti (Sırasıyla, $p=0,018$ ve $p=0,034$). MetS'si olmayan gruba gōre MetS'si olan grupta $sT_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L) ve $\text{bio}T_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı dūřuk iken (Sırasıyla, $p=0,003$ ve $p=0,002$); $sT_{\text{Sodergard}}$ (%) ve $\text{bio}T_{\text{Sodergard}}$ (%) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı yūksekti (Sırasıyla, $p<0,01$ ve $p=0,021$). Her iki grupta $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ (Ln-transformed) (nmol/L), $\text{bio}T_{\text{Emadi-Konjin}}$ (Ln-transformed) (nmol/L), $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%), $\text{bio}T_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ortalama deęerleri istatistiksel olarak karar sınırında olmakla beraber anlamlı farklı deęildi. MetS'si olmayan gruba gōre MetS'si olan grupta $\text{bio}T_{\text{Morris}}$ (nmol/L) ortalama deęeri istatistiksel olarak anlamlı dūřuk iken ($p=0,002$); $\text{bio}T_{\text{Morris}}$ (%) ortalama deęeri istatistiksel olarak anlamlı yūksekti ($p=0,013$). MetS'si olmayan gruba gōre MetS'si olan grupta sT_{Wheeler} (nmol/L) ortalama deęeri istatistiksel olarak anlamlı dūřuk iken ($p=0,002$); sT_{Wheeler} (%) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı yūksekti ($p=0,013$). MetS'si olmayan gruba gōre MetS'si olan grupta sT_{Ly} (nmol/L) ortalama deęeri istatistiksel olarak anlamlı dūřuk iken ($p=0,002$); sT_{Ly} (%) ortalama deęeri istatistiksel olarak anlamlı farklı deęildi ($p=0,135$). MetS'si olmayan gruba gōre MetS'si olan grupta $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı farklı deęil iken ($p=0,225$); $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (%) ortalama deęerleri istatistiksel olarak anlamlı yūksekti ($p=0,038$).

Tablo 20: MetS'si olmayan/olan gruplarda total testosteron, SHBG, DDsT_{ECLIA} ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT verilerinin karşılaştırması

Parametre	Tüm Gönüllüler (N=188)	MetS Olmayan (N=96)	MetS Olan (N=92)	P
Total testosteron, nmol/L	17,22 ± 6,49	19,04 ± 6,65	15,32 ± 5,77	< 0,0001
<u>Total testosteron için:</u>				
<8,64 nmol/L, N (%)	7 (%3,7)	1 (%1,0)	6 (%6,5)	= 0,061 [#]
8,64-29,0 nmol/L, N (%)	171 (%94,7)	87 (%90,6)	84 (%91,3)	
>29,0 nmol/L, N (%)	10 (%5,3)	8 (%8,3)	2 (%2,2)	
SHBG, nmol/L	31,50 ± 17,31	33,14 ± 19,89	29,78 ± 14,03	= 0,183
<u>SHBG için:</u>				
<18,3 nmol/L, N (%)	31 (%16,5)	13 (%13,5)	18 (%19,6)	= 0,327 [#]
18,3-54,1 nmol/L, N (%)	144 (%76,6)	75 (%78,1)	69 (%75,0)	
>54,1 nmol/L, N (%)	13 (%6,9)	8 (%8,3)	5 (%5,4)	
Total Protein, g/L	74,29 ± 4,67	73,84 ± 4,01	74,75 ± 5,24	= 0,180
Albumin, g/L	48,57 ± 3,11	49,00 ± 3,48	48,12 ± 2,62	= 0,053
sT _{Vermeulen} , nmol/L	0,346 ± 0,106	0,380 ± 0,112	0,311 ± 0,086	< 0,0001
bioT _{Vermeulen} , nmol/L	9,57 ± 3,05	10,60 ± 3,29	8,50 ± 2,36	< 0,0001
sT _{Vermeulen} , %	2,104 ± 0,412	2,074 ± 0,411	2,137 ± 0,414	= 0,295
bioT _{Vermeulen} , %	58,05 ± 11,58	57,8 ± 12,0	58,3 ± 11,2	= 0,749
sT _{Sodergard} , nmol/L	0,368 ± 0,112	0,402 ± 0,116	0,332 ± 0,096	< 0,0001
bioT _{Sodergard} , nmol/L	11,40 ± 3,60	12,58 ± 3,81	10,17 ± 2,90	< 0,0001
sT _{Sodergard} , %	2,210 ± 0,310	2,174 ± 0,308	2,247 ± 0,310	= 0,112
bioT _{Sodergard} , %	68,41 ± 9,75	68,0 ± 10,2	68,9 ± 9,3	= 0,542
sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	0,438 (0,362-0,595)	0,502 (0,397-0,643)	0,403 (0,340-0,502)	< 0,0001
bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	4,683 (3,792-6,305)	5,363 (4,224-6,919)	4,317 (3,502-5,186)	< 0,0001
sT _{Emadi-Konjin} , %	3,01 ± 1,02	3,00 ± 1,05	3,02 ± 0,99	= 0,931
bioT _{Emadi-Konjin} , %	31,96 ± 11,01	32,2 ± 11,7	31,7 ± 10,3	= 0,737
bioT _{Morris} , nmol/L	5,310 ± 1,547	5,800 ± 1,574	4,798 ± 1,347	< 0,0001
bioT _{Morris} , %	31,84 ± 3,96	31,40 ± 3,97	32,31 ± 3,91	= 0,114
sT _{Wheeler} , nmol/L	0,273 ± 0,077	0,299 ± 0,080	0,247 ± 0,065	< 0,0001
sT _{Wheeler} , %	1,66 ± 0,29	1,64 ± 0,30	1,69 ± 0,28	= 0,206
sT _{Ly} , nmol/L	0,278 ± 0,106	0,310 ± 0,110	0,244 ± 0,092	< 0,0001
sT _{Ly} , %	1,62 ± 0,13	1,65 ± 0,11	1,59 ± 0,15	= 0,002
DDsT _{ECLIA} , nmol/L	0,329 ± 0,119	0,351 ± 0,125	0,307 ± 0,108	= 0,012
DDsT _{ECLIA} , %	1,82 (1,46-2,52)	1,73 (1,38-2,37)	2,03 (1,48-2,60)	= 0,075

MetS: Metabolik Sendrom

sT: Serbest testosteron BioT: Biyoyararlı testosteron DD: Denge diyalizi

[#]p değeri Fisher's exact test ile hesaplanmıştır

Tablo 21: MetS'si olmayan/olan gruplarda kovaryant yaş için kontrol edilen kovaryans analizlerle (ANCOVA) total testosteron, SHBG, DDsT_{ECLIA} ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT verilerinin belirlenen düzeltilmiş ortalama $\pm$ standart hata değerleri ve karşılaştırma sonuçları (Modelde yer alan değişkenler yaş = 35,654 yıl için değerlendirildi)

Parametre	MetS Olmayan (N=96)	MetS Olan (N=92)	p Değeri 1	p Değeri 2
Total testosteron, nmol/L	18,79 $\pm$ 0,66	15,59 $\pm$ 0,68	= 0,158	< 0,001
SHBG, nmol/L	34,87 $\pm$ 1,78	27,97 $\pm$ 1,82	< 0,001	< 0,01
Total Protein, g/L	73,58 $\pm$ 0,49	75,02 $\pm$ 0,50	= 0,058	= 0,050
Albumin, g/L	48,61 $\pm$ 0,31	48,52 $\pm$ 0,32	< 0,0001	= 0,836
sT _{Vermeulen} , nmol/L	0,367 $\pm$ 0,01	0,325 $\pm$ 0,01	< 0,0001	= 0,005
bioT _{Vermeulen} , nmol/L	10,17 $\pm$ 0,28	8,95 $\pm$ 0,29	< 0,0001	= 0,004
sT _{Vermeulen} , %	2,031 $\pm$ 0,042	2,181 $\pm$ 0,043	< 0,0001	= 0,018
bioT _{Vermeulen} , %	56,25 $\pm$ 1,17	59,94 $\pm$ 1,19	< 0,0001	= 0,034
sT _{Sodergard} , nmol/L	0,392 $\pm$ 0,011	0,342 $\pm$ 0,011	< 0,001	= 0,003
bioT _{Sodergard} , nmol/L	12,18 $\pm$ 0,35	10,59 $\pm$ 0,35	< 0,0001	= 0,002
sT _{Sodergard} , %	2,149 $\pm$ 0,032	2,273 $\pm$ 0,033	= 0,004	< 0,01
bioT _{Sodergard} , %	66,74 $\pm$ 0,99	70,15 $\pm$ 1,01	< 0,0001	= 0,021
sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L (Ln-transformed)	-0,738 $\pm$ 0,035	-0,839 $\pm$ 0,036	< 0,0001	= 0,050
bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L (Ln-transformed)	1,621 $\pm$ 0,036	1,519 $\pm$ 0,037	< 0,0001	= 0,058
sT _{Emadi-Konjin} , %	2,88 $\pm$ 0,103	3,15 $\pm$ 0,105	< 0,0001	= 0,073
bioT _{Emadi-Konjin} , %	30,67 $\pm$ 1,10	33,30 $\pm$ 1,12	< 0,0001	= 0,108
bioT _{Morris} , nmol/L	5,661 $\pm$ 0,152	4,943 $\pm$ 0,155	< 0,001	= 0,002
bioT _{Morris} , %	31,09 $\pm$ 0,41	32,62 $\pm$ 0,42	= 0,008	= 0,013
sT _{Wheeler} , nmol/L	0,290 $\pm$ 0,007	0,256 $\pm$ 0,008	< 0,0001	= 0,002
sT _{Wheeler} , %	1,607 $\pm$ 0,030	1,718 $\pm$ 0,030	< 0,001	= 0,013
sT _{Ly} , nmol/L	0,301 $\pm$ 0,011	0,253 $\pm$ 0,011	= 0,003	= 0,002
sT _{Ly} , %	1,633 $\pm$ 0,013	1,603 $\pm$ 0,014	< 0,001	= 0,135
DDsT _{ECLIA} , nmol/L	0,340 $\pm$ 0,012	0,318 $\pm$ 0,012	= 0,002	= 0,225
DDsT _{ECLIA} , % (Ln-transformed)	0,585 $\pm$ 0,045	0,726 $\pm$ 0,046	= 0,116	= 0,038

MetS: Metabolik Sendrom

sT: Serbest testosteron; bioT: Biyoyararlı testosteron; DD: Denge diyalizi

p değeri 1: Modelde kovaryant yaş için belirlenen p değeri

p değeri 2: Kovaryant yaş için kontrol edilen edildikten sonra karşılaştırmalarda belirlenen p değeri

MetS'si olan/olmayan gruplarda total testosteron, SHBG, albümin, $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L ve %) ve algoritmalar ile hesaplanan serbest testosteron (nmol/L ve %) ve bioT (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri Tablo 22-27'de ve saçılım grafikleri ile Bland-Altman grafikleri Şekil 19-26'da gösterilmiştir.

MetS'si olmayan grupta $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (nmol/L), $sT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L), $sT_{Wheeler}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,976$, $\rho=0,911$, $r=0,988$, $r=0,931$, $p<0,0001$) saptanmış iken; $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon ($r=0,630$, $p<0,0001$) saptandı. MetS'si olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (nmol/L), $sT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L), $sT_{Wheeler}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında yine pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,972$, $\rho=0,887$, $r=0,982$, $r=0,913$, $p<0,0001$) saptanmış iken; $sT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) arasında pozitif yönde zayıf derecede korelasyon ($r=0,393$, $p<0,0001$) saptandı.

MetS'si olmayan grupta $sT_{Vermeulen}$ (%) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (%), $sT_{Emadi-Konjin}$ (%) ve $sT_{Wheeler}$ (%) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,986$, $r=0,963$, $r=0,970$, $p<0,0001$) saptanmış iken; $sT_{Vermeulen}$ (%) ile sT_{Ly} (%) arasında pozitif yönde kuvvetli korelasyon (Sırasıyla, $r=0,715$, $p<0,0001$); $sT_{Vermeulen}$ (%) ile $DDsT_{ECLIA}$ (%) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon (Sırasıyla, $r=0,630$, $p<0,0001$) saptandı. MetS'si olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (%) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (%), $sT_{Emadi-Konjin}$ (%) ve $sT_{Wheeler}$ (%) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,992$, $r=0,979$, $r=0,976$, $p<0,0001$) saptanmış iken; $sT_{Vermeulen}$ (%) ile sT_{Ly} (%) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon (Sırasıyla, $r=0,423$, $p<0,0001$); $sT_{Vermeulen}$ (%) ile $DDsT_{ECLIA}$ (%) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon (Sırasıyla, $r=0,564$, $p<0,0001$) saptandı.

MetS'si olmayan grupta $bioT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $bioT_{Sodergard}$ (nmol/L), $bioT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L) ve $bioT_{Morris}$ (nmol/L) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,980$, $\rho=0,915$, $r=0,925$, $p<0,0001$) saptanmış iken; MetS'si olan grupta $bioT_{Vermeulen}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $bioT_{Sodergard}$ (nmol/L), $bioT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L) ve $bioT_{Morris}$ (nmol/L) arasında yine pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,973$, $\rho=0,902$, $r=0,917$, $p<0,0001$) saptandı.

MetS'si olmayan grupta $\text{bioT}_{\text{Vermeulen}}$ (%) ile, ayrı ayrı $\text{bioT}_{\text{Sodergard}}$ (%), $\text{bioT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ve $\text{bioT}_{\text{Morris}}$ (%) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,990$, $r=0,970$, $r=0,946$, $p<0,0001$) saptanmış iken; MetS'si olan grupta $\text{bioT}_{\text{Vermeulen}}$ (%) ile, ayrı ayrı $\text{bioT}_{\text{Sodergard}}$ (%), $\text{bioT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ve $\text{bioT}_{\text{Morris}}$ (%) arasında yine pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,996$, $r=0,983$, $r=0,943$, $p<0,0001$) saptandı.

MetS'si olmayan grupta $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $\text{sT}_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Wheeler}}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,630$, $r=0,579$, $\rho=0,633$, $r=0,629$, $r=0,538$, $p<0,0001$) saptandı. MetS'si olan grupta $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $\text{sT}_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (nmol/L), $\text{sT}_{\text{Wheeler}}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında pozitif yönde zayıf-orta derecede korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,393$, $r=0,345$, $\rho=0,439$, $r=0,392$, $r=0,324$, $p<0,0001$) saptandı.

MetS'si olmayan grupta $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (%) ile, ayrı ayrı $\text{sT}_{\text{Vermeulen}}$ (%), $\text{sT}_{\text{Sodergard}}$ (%), $\text{sT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ve $\text{sT}_{\text{Wheeler}}$ (%) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,630$, $r=0,597$, $r=0,630$, $r=0,662$, $p<0,0001$) saptanırken; $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (%) ile sT_{Ly} (%) arasında pozitif yönde zayıf derecede ($r=0,359$, $p<0,0001$) korelasyon saptandı.

MetS'si olan grupta $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (%) ile, ayrı ayrı $\text{sT}_{\text{Vermeulen}}$ (%), $\text{sT}_{\text{Sodergard}}$ (%), $\text{sT}_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ve $\text{sT}_{\text{Wheeler}}$ (%) arasında yine pozitif yönde orta derecede korelasyonlar (Sırasıyla, $r=0,564$, $r=0,532$, $r=0,575$, $r=0,616$, $p<0,0001$) saptanırken; $\text{DDsT}_{\text{ECLIA}}$ (%) ile sT_{Ly} (%) arasında yine pozitif yönde zayıf derecede ($r=0,223$, $p=0,034$) korelasyon saptandı.

Tablo 22: Tüm gönüllüler için (N=188) total testosteron, SHBG, albümin, DDsT_{ECLIA} (nmol/Lve %) ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	sT _{Vermeulen} , nmol/L	sT _{Vermeulen} , %	sT _{Sodergard} , nmol/L	sT _{Sodergard} , %	sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	sT _{Emadi-Konjin} , %	sT _{Wheeler} , nmol/L	sT _{Wheeler} , %	sT _{Ly} , nmol/L	sT _{Ly} , %	DDsT _{ECLIA} , nmol/L	DDsT _{ECLIA} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,201	0,195	-0,339	-0,408	-0,210	-0,332	-0,147	-0,501	-0,291	-0,403	-0,193	-0,311	-0,346	-0,274	-0,077
	p	0,006	0,007	<0,0001	<0,0001	0,004	<0,0001	0,044	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,008	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,293
TT, nmol/L	r veya rho		0,635	0,021	0,812	-0,599	0,910	-0,639	0,535	-0,478	0,864	-0,690	0,941	0,093	0,395	-0,535
	p		<0,0001	0,772	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,206	<0,0001	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,333	0,119	-0,879	0,298	-0,889	-0,145	-0,799	0,203	-0,893	0,353	-0,486	-0,034	-0,654
	p			<0,0001	0,104	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,048	<0,0001	0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,647	<0,0001
Albumin	r veya rho				0,114	0,036	0,052	-0,047	0,088	0,109	0,195	0,173	0,176	0,138	0,220	0,129
	p				0,118	0,625	0,476	0,526	0,232	0,136	0,007	0,018	0,016	0,060	0,002	0,078
sT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					-0,071	0,977	-0,118	0,905	0,043	0,987	-0,206	0,931	0,538	0,559	-0,244
	p					0,331	<0,0001	0,107	<0,0001	0,558	<0,0001	0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001
sT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,265	0,988	0,277	0,968	-0,181	0,972	-0,392	0,512	0,090	0,604
	p						<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,013	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,219	<0,0001
sT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho							-0,301	0,804	-0,156	0,981	-0,398	0,978	0,394	0,509	-0,365
	p							<0,0001	<0,0001	0,032	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
sT _{Sodergard} , %	r veya rho								0,211	0,922	-0,238	0,947	-0,429	0,464	0,027	0,580
	p								0,004	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,716	<0,0001
sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho									0,386	0,853	0,145	0,706	0,820	0,546	0,013
	p									<0,0001	<0,0001	0,048	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,857
sT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho										-0,047	0,953	-0,284	0,571	0,198	0,602
	p										0,520	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,007	<0,0001
sT _{Wheeler} , nmol/L	r veya rho											-0,290	0,963	0,475	0,556	-0,291
	p											<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
sT _{Wheeler} , %	r veya rho												-0,495	0,414	0,049	0,655
	p												<0,0001	<0,0001	0,506	<0,0001
sT _{Ly} , nmol/L	r veya rho													0,288	0,478	-0,424
	p													<0,0001	<0,0001	<0,0001
sT _{Ly} , %	r veya rho														0,350	0,261
	p														<0,0001	<0,0001
DDsT _{ECLIA} , nmol/L	r veya rho															0,539
	p															<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı *rho*: Spearman korelasyon katsayısı TT:Total testosteron

sT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) ve DDsT (%) değişkenlerinin korelasyon analizlerinde katsayı olarak *rho*, geri kalan değişkenlerin analizlerinde *r* kullanılmıştır

Tablo 23: MetS’ si olmayan grupta (N=96) total testosteron, SHBG, albümin, DDsT_{ECLIA} (nmol/L ve %) ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	sT _{Vermeulen} , nmol/L	sT _{Vermeulen} , %	sT _{Sodergard} , nmol/L	sT _{Sodergard} , %	sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	sT _{Emadi-Konjin} , %	sT _{Wheeler} , nmol/L	sT _{Wheeler} , %	sT _{Ly} , nmol/L	sT _{Ly} , %	DDsT _{ECLIA} , nmol/L	DDsT _{ECLIA} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,177	0,284	-0,355	-0,432	-0,314	-0,346	-0,255	-0,572	-0,374	-0,431	-0,281	-0,326	-0,444	-0,340	-0,203
	p	0,085	0,005	<0,0001	<0,0001	0,002	0,001	0,012	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,005	0,001	<0,0001	0,001	0,047
TT, nmol/L	r veya rho		0,545	-0,011	0,785	-0,543	0,889	-0,580	0,510	-0,432	0,830	-0,638	0,910	-0,071	0,442	-0,487
	p		<0,0001	0,917	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,497	<0,0001	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,468	-0,026	-0,862	0,148	-0,885	-0,210	-0,757	0,037	-0,864	0,164	-0,690	-0,079	-0,662
	p			<0,0001	0,803	<0,0001	0,150	<0,0001	0,040	<0,0001	0,717	<0,0001	0,110	<0,0001	0,444	<0,0001
Albumin	r veya rho				0,138	0,159	0,066	0,093	0,064	0,202	0,218	0,284	0,213	0,001	0,199	0,137
	p				0,180	0,121	0,525	0,366	0,537	0,049	0,033	0,005	0,037	0,993	0,052	0,183
sT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					0,052	0,976	0,016	0,911	0,134	0,988	-0,091	0,931	0,428	0,630	-0,120
	p					0,616	<0,0001	0,880	<0,0001	0,194	<0,0001	0,376	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,244
sT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,149	0,986	0,351	0,963	-0,036	0,970	-0,259	0,715	0,163	0,630
	p						0,149	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,728	<0,0001	0,011	<0,0001	0,111	<0,0001
sT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho						-0,174	0,817	-0,072	0,976	-0,292	0,975	0,265	0,579	-0,248	
	p						0,091	<0,0001	0,488	<0,0001	0,004	<0,0001	0,010	<0,0001	0,015	
sT _{Sodergard} , %	r veya rho							0,272	0,909	-0,085	0,941	-0,284	0,685	0,101	0,597	
	p							0,007	<0,0001	0,408	<0,0001	0,005	<0,0001	0,330	<0,0001	
sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho								0,460	0,872	0,210	0,717	0,760	0,633	0,136	
	p								<0,0001	<0,0001	0,040	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,187	
sT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho									0,069	0,954	-0,188	0,727	0,265	0,630	
	p									0,503	<0,0001	0,067	<0,0001	0,009	<0,0001	
sT _{Wheeler} , nmol/L	r veya rho										-0,153	0,956	0,346	0,629	-0,164	
	p										0,136	<0,0001	0,001	<0,0001	0,111	
sT _{Wheeler} , %	r veya rho											-0,372	0,594	0,102	0,662	
	p											<0,0001	<0,0001	0,325	<0,0001	
sT _{Ly} , nmol/L	r veya rho												0,132	0,538	-0,326	
	p												0,204	<0,0001	0,001	
sT _{Ly} , %	r veya rho													0,354	0,359	
	p													<0,0001	<0,0001	
DDsT _{ECLIA} , nmol/L	r veya rho															0,586
	p															<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı rho: Spearman korelasyon katsayısı TT:Total testosteron

sT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) ve DDsT (%) değişkenlerinin korelasyon analizlerinde katsayı olarak rho, geri kalan değişkenlerin analizlerinde r kullanılmıştır

Tablo 24: MetS'si olan grupta (N=92) total testosteron, SHBG, albümin, DDsT_{ECLIA} (nmol/L ve %) ve algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	sT _{Vermeulen} , nmol/L	sT _{Vermeulen} , %	sT _{Sodergard} , nmol/L	sT _{Sodergard} , %	sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	sT _{Emadi-Konjin} , %	sT _{Wheeler} , nmol/L	sT _{Wheeler} , %	sT _{Ly} , nmol/L	sT _{Ly} , %	DDsT _{ECLIA} , nmol/L	DDsT _{ECLIA} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,002	0,199	-0,244	-0,160	-0,193	-0,089	-0,153	-0,314	-0,243	-0,144	-0,203	-0,066	-0,164	-0,064	-0,033
	p	0,988	0,058	0,019	0,129	0,065	0,399	0,145	0,002	0,019	0,170	0,052	0,535	0,121	0,542	0,752
TT, nmol/L	r veya rho		0,801	-0,036	0,809	-0,681	0,920	-0,707	0,542	-0,581	0,883	-0,770	0,972	0,130	0,254	-0,525
	p		<0,0001	0,732	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,014	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,124	0,320	-0,936	0,527	-0,927	-0,121	-0,894	0,445	-0,958	0,655	-0,398	-0,008	-0,616
	p			0,240	0,002	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,251	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,943	<0,0001
Albumin	r veya rho				-0,045	-0,106	-0,089	-0,202	0,031	-0,021	0,054	0,051	0,021	0,182	0,202	0,165
	p				0,673	0,316	0,399	0,053	0,767	0,845	0,606	0,629	0,840	0,084	0,054	0,116
sT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					-0,186	0,972	-0,222	0,887	-0,075	0,982	-0,327	0,913	0,619	0,393	-0,312
	p					0,076	<0,0001	0,033	<0,0001	0,477	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,003
sT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,390	0,992	0,220	0,979	-0,332	0,976	-0,550	0,423	0,038	0,564
	p						<0,0001	<0,0001	0,035	<0,0001	0,001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,721	<0,0001
sT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho							-0,417	0,773	-0,286	0,984	-0,525	0,977	0,453	0,345	-0,423
	p							<0,0001	<0,0001	0,006	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001	<0,0001
sT _{Sodergard} , %	r veya rho								0,178	0,948	-0,378	0,955	-0,584	0,377	-0,012	0,532
	p								0,090	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,906	<0,0001
sT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho									0,306	0,824	0,121	0,669	0,836	0,439	-0,044
	p									0,003	<0,0001	0,251	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,680
sT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho										-0,208	0,961	-0,443	0,490	0,121	0,575
	p										0,046	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,250	<0,0001
sT _{Wheeler} , nmol/L	r veya rho											-0,448	0,964	0,546	0,392	-0,348
	p											<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,001
sT _{Wheeler} , %	r veya rho												-0,654	0,340	0,023	0,616
	p												<0,0001	0,001	0,830	<0,0001
sT _{Ly} , nmol/L	r veya rho													0,341	0,324	-0,469
	p													0,001	0,002	<0,0001
sT _{Ly} , %	r veya rho														0,311	0,223
	p														0,003	0,034
DDsT _{ECLIA} , nmol/L	r veya rho															0,566
	p															<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı rho: Spearman korelasyon katsayısı TT:Total testosteron

sT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) ve DDsT (%) değişkenlerinin korelasyon analizlerinde katsayı olarak rho, geri kalan değişkenlerin analizlerinde r kullanılmıştır

Tablo 25: Tüm gönüllüler için (N=188) total testosteron, SHBG, albümin ve bioT (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	bioT _{Vermeulen} , nmol/L	bioT _{Vermeulen} , %	bioT _{Sodergard} , nmol/L	bioT _{Sodergard} , %	bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	bioT _{Emadi-Konjin} , %	bioT _{Morris} , nmol/L	bioT _{Morris} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,201	0,195	-0,339	-0,458	-0,300	-0,390	-0,278	-0,526	-0,337	-0,331	-0,134
	p	0,006	0,007	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,066
TT, nmol/L	r veya rho		0,635	0,021	0,794	-0,567	0,893	-0,605	0,526	-0,453	0,953	-0,729
	p		<0,0001	0,772	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,333	0,078	-0,898	0,239	-0,942	-0,154	-0,795	0,416	-0,838
	p			<0,0001	0,284	<0,0001	0,001	<0,0001	0,035	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Albumin	r veya rho				0,288	0,290	0,242	0,325	0,219	0,241	0,116	0,118
	p				<0,0001	<0,0001	0,001	<0,0001	0,003	0,001	0,111	0,107
bioT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					0,003	0,979	-0,029	0,911	0,098	0,927	-0,271
	p					0,967	<0,0001	0,693	<0,0001	0,180	<0,0001	0,008
bioT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,187	0,992	0,314	0,974	-0,325	0,940
	p						0,010	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho							-0,215	0,810	-0,093	0,973	-0,442
	p							0,003	<0,0001	0,203	<0,0001	<0,0001
bioT _{Sodergard} , %	r veya rho								0,265	0,941	-0,367	0,931
	p								<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho									0,415	0,720	0,080
	p									<0,0001	<0,0001	0,270
bioT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho										-0,203	0,913
	p										0,005	<0,0001
bioT _{Morris} , nmol/L	r veya rho											-0,550
	p											<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı *rho*: Spearman korelasyon katsayısı TT: Total testosteron

bioT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) değişkeninin korelasyon analizlerinde katsayı olarak *rho*, geri kalan değişkenlerin analizlerinde *r* kullanılmıştır

Tablo 26: MetS'si olmayan grupta (N=96) total testosteron, SHBG, albümin ve bioT (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	bioT _{Vermeulen} , nmol/L	bioT _{Vermeulen} , %	bioT _{Sodergard} , nmol/L	bioT _{Sodergard} , %	bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	bioT _{Emadi-Konjin} , %	bioT _{Morris} , nmol/L	bioT _{Morris} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,177	0,284	-0,355	-0,480	-0,392	-0,406	-0,373	-0,599	-0,409	-0,332	-0,224
	p	0,085	0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,001	0,028
TT, nmol/L	r veya rho		0,545	-0,011	0,767	-0,510	0,868	-0,539	0,495	-0,411	0,947	-0,685
	p		<0,0001	0,917	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,468	-0,069	-0,877	0,077	-0,934	-0,229	-0,751	0,294	-0,800
	p			<0,0001	0,504	<0,0001	0,458	<0,0001	0,025	<0,0001	0,004	<0,0001
Albumin	r veya rho				0,314	0,387	0,269	0,437	0,192	0,311	0,104	0,233
	p				0,002	<0,0001	0,008	<0,0001	0,061	0,002	0,312	0,022
bioT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					0,120	0,980	0,101	0,915	0,183	0,925	-0,153
	p					0,244	<0,0001	0,329	<0,0001	0,074	<0,0001	0,137
bioT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,067	0,990	0,401	0,970	-0,229	0,946
	p						0,515	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,025	<0,0001
bioT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho							-0,079	0,822	-0,007	0,969	-0,331
	p							0,443	<0,0001	0,944	<0,0001	<0,001
bioT _{Sodergard} , %	r veya rho								0,345	0,929	-0,263	0,927
	p								<0,001	<0,0001	0,010	<0,0001
bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho									0,498	0,735	0,148
	p									<0,0001	<0,0001	0,151
bioT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho										-0,126	0,930
	p										0,219	<0,0001
bioT _{Morris} , nmol/L	r veya rho											-0,452
	p											<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı *rho*: Spearman korelasyon katsayısı TT: Total testosteron

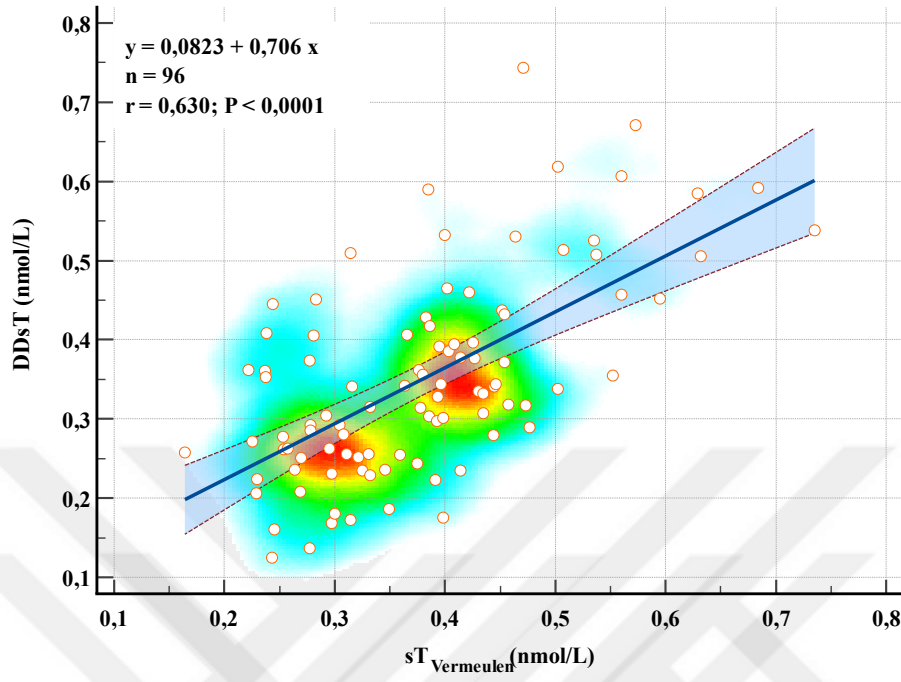
bioT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) değişkeninin korelasyon analizlerinde katsayı olarak *rho*, geri kalan değişkenlerin analizlerinde *r* kullanılmıştır

Tablo 27: MetS’ si olan grupta (N=92) total testosteron, SHBG, albümin ve bioT (nmol/L ve %) verilerinin korelasyon analizleri

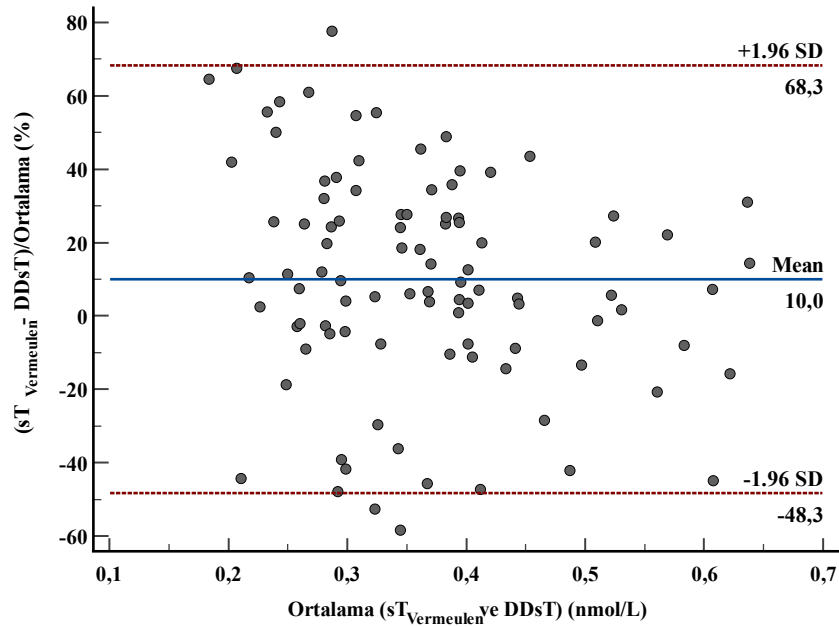
		TT, nmol/L	SHBG, nmol/L	Albumin, g/L	bioT _{Vermeulen} , nmol/L	bioT _{Vermeulen} , %	bioT _{Sodergard} , nmol/L	bioT _{Sodergard} , %	bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	bioT _{Emadi-Konjin} , %	bioT _{Morris} , nmol/L	bioT _{Morris} , %
Yaş, yıl	r veya rho	-0,002	0,199	-0,244	-0,207	-0,258	-0,137	-0,247	-0,330	-0,278	-0,105	-0,157
	p	0,988	0,058	0,019	0,048	0,013	0,194	0,018	0,001	0,007	0,320	0,134
TT, nmol/L	r veya rho		0,801	-0,036	0,793	-0,682	0,911	-0,724	0,539	-0,576	0,953	-0,793
	p		<0,0001	0,732	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001
SHBG	r veya rho			-0,124	0,290	-0,959	0,500	-0,977	-0,121	-0,898	0,612	-0,918
	p			0,240	0,005	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,252	<0,0001	<0,0001	<0,0001
Albumin	r veya rho				0,148	0,166	0,097	0,182	0,175	0,131	0,029	0,003
	p				0,160	0,114	0,355	0,082	0,095	0,215	0,786	0,979
bioT _{Vermeulen} , nmol/L	r veya rho					-0,158	0,973	-0,200	0,902	-0,047	0,917	-0,397
	p					0,134	<0,0001	0,056	<0,0001	0,655	<0,0001	0,002
bioT _{Vermeulen} , %	r veya rho						-0,374	0,996	0,234	0,983	-0,474	0,943
	p						<0,0001	<0,0001	0,025	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioT _{Sodergard} , nmol/L	r veya rho							-0,415	0,786	-0,264	0,975	-0,579
	p							<0,0001	<0,0001	0,011	<0,0001	<0,0001
bioT _{Sodergard} , %	r veya rho								0,203	0,964	-0,521	0,941
	p								0,052	<0,0001	<0,0001	<0,0001
bioT _{Emadi-Konjin} , nmol/L	r veya rho									0,321	0,696	0,060
	p									0,002	<0,0001	0,570
bioT _{Emadi-Konjin} , %	r veya rho										-0,356	0,916
	p										<0,0001	<0,0001
bioT _{Morris} , nmol/L	r veya rho											-0,663
	p											<0,0001

r: Pearson korelasyon katsayısı rho: Spearman korelasyon katsayısı TT: Total testosteron

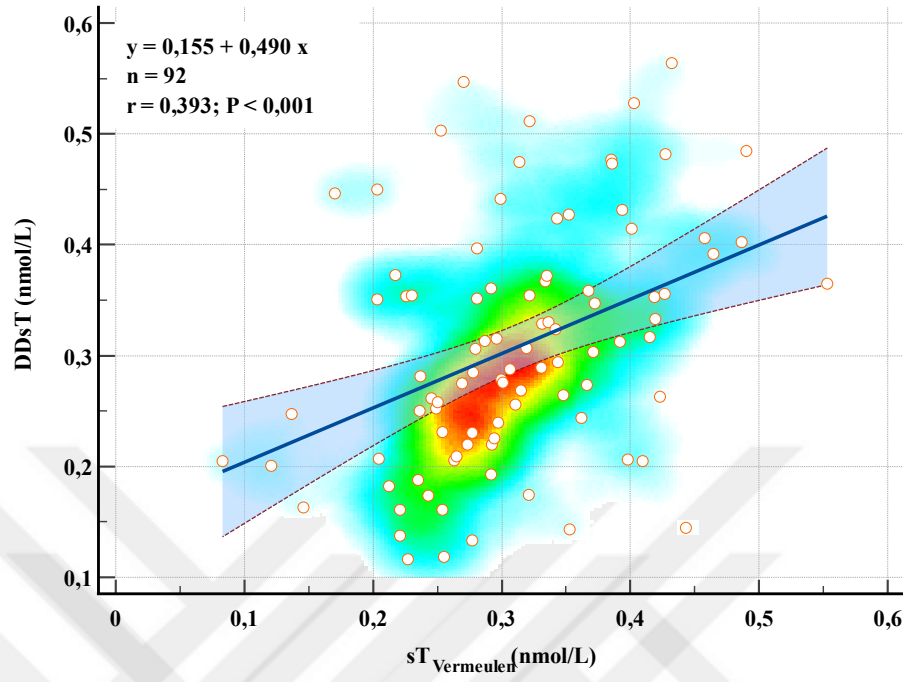
bioT_{Emadi-Konjin} (nmol/L) değişkeninin korelasyon analizlerinde katsayı olarak rho, geri kalan değişkenlerin analizlerinde r kullanılmıştır



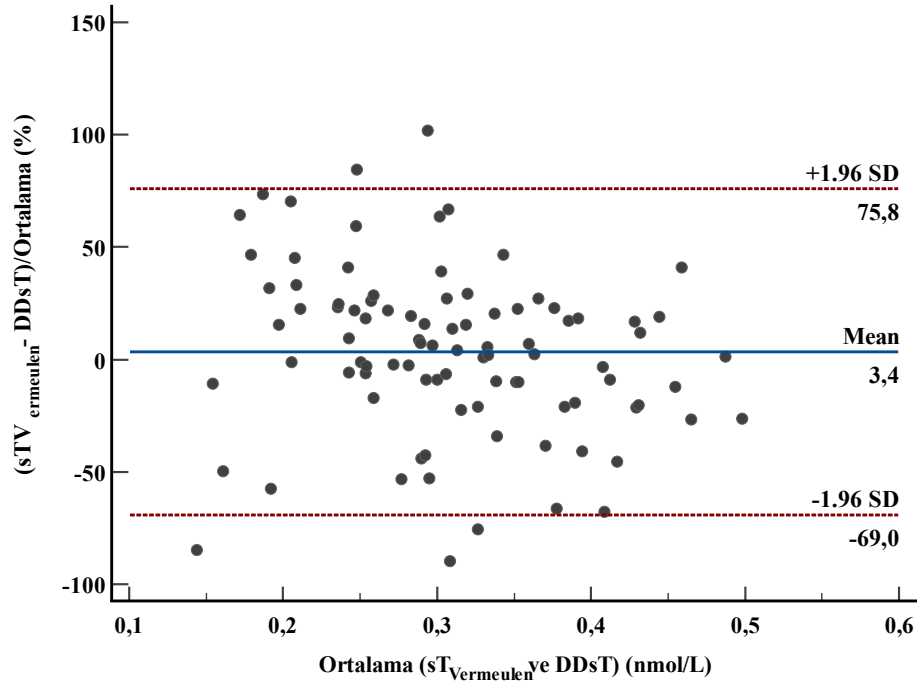
Şekil 19: MetS'si olmayan grupta DDsT_{ECLIA} (nmol/L) sonuçları (y) ve sT_{Vermeulen} (nmol/L) sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *heat map scatter diagram* (%95 güven aralığı)



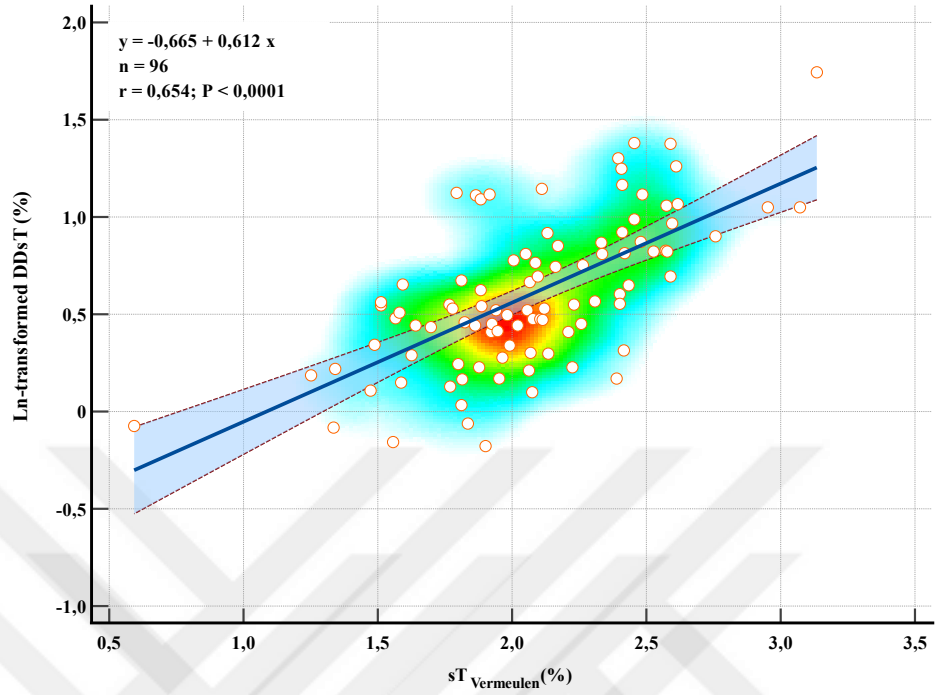
Şekil 20: MetS'si olmayan grupta sT_{Vermeulen} (nmol/L) sonuçları ve DDsT_{ECLIA} (nmol/L) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



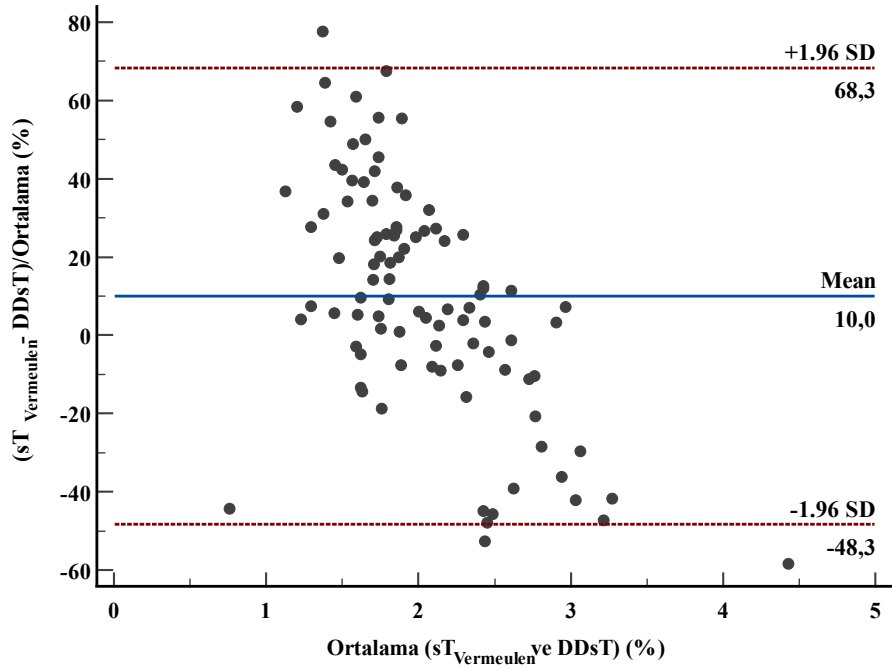
Şekil 21: MetS'si olan grupta DDsT_{ECLIA} (nmol/L) sonuçları (y) ve sT_{Vermeulen} (nmol/L) sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *heat map scatter diagram* (%95 güven aralığı)



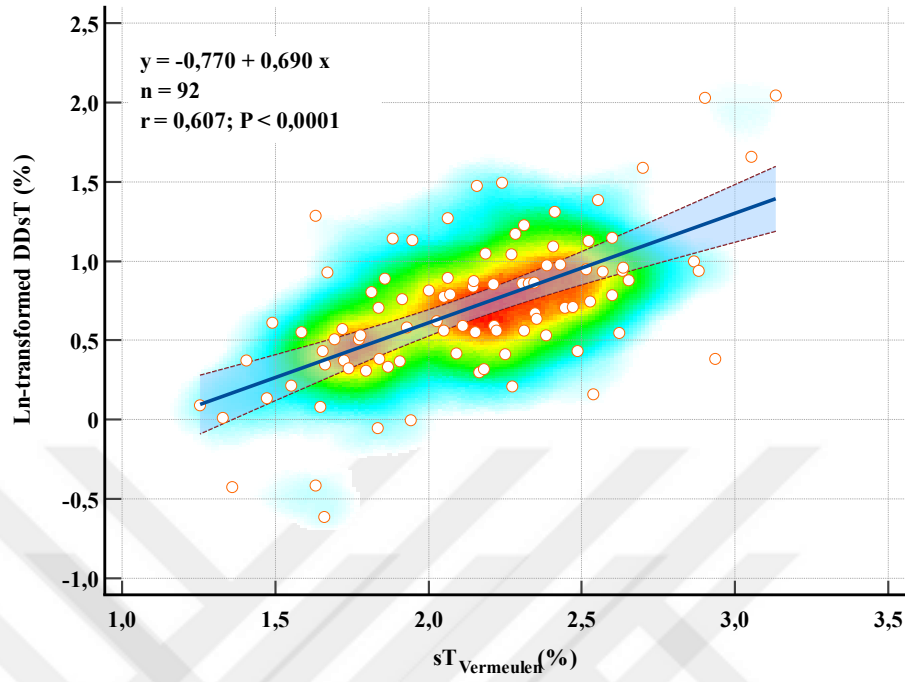
Şekil 22: MetS'si olan grupta sT_{Vermeulen} (nmol/L) sonuçları ve DDsT_{ECLIA} (nmol/L) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



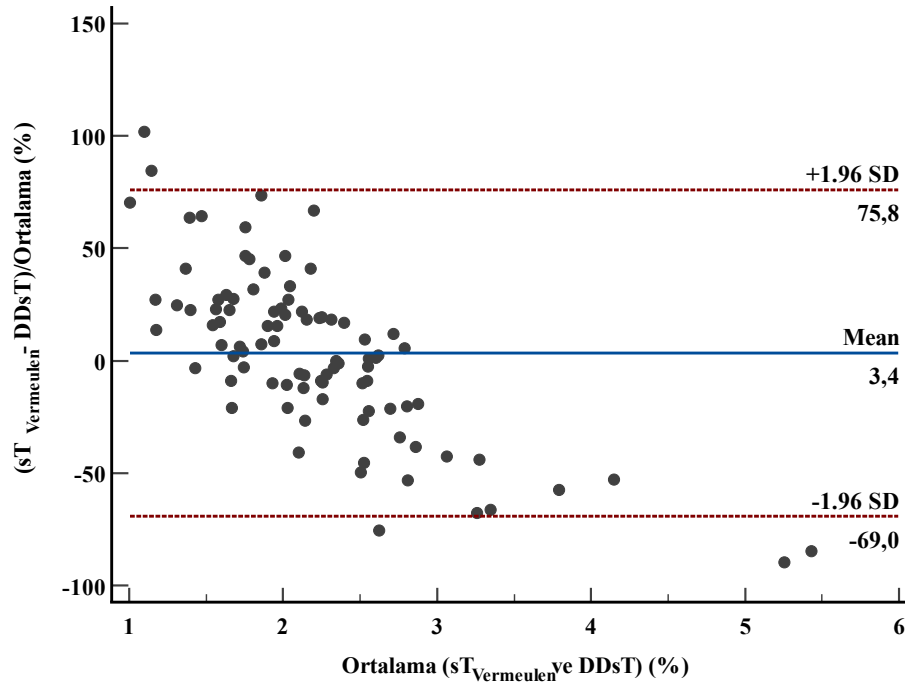
Şekil 23: MetS'si olmayan grupta DDsT_{ECLIA} (%) (Ln-transformed) sonuçları (y) ve sT_{Vermeulen} (%) sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *heat map scatter diagram* (%95 güven aralığı)



Şekil 24: MetS'si olmayan grupta sT_{Vermeulen} (%) sonuçları ve DDsT_{ECLIA} (%) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği



Şekil 25: MetS'si olan grupta DDsT_{ECLIA} (%) (Ln-transformed) sonuçları (y) ve sT_{Vermeulen} (%) sonuçları (x) için yapılan linear regresyon analizine ait *heat map scatter diagram* (%95 güven aralığı)



Şekil 26: MetS'si olan grupta sT_{Vermeulen} (%) sonuçları ve DDsT_{ECLIA} (%) sonuçları için çizilen Bland-Altman grafiği

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada yaşın etkisinden arındırılmış gruplar için MetS'si olan grupta MetS'si olmayan gruba kıyasla $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L), $sT_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), sT_{Wheeler} (nmol/L), sT_{Ly} (nmol/L) ile $\text{bio}T_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L), $\text{bio}T_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), $\text{bio}T_{\text{Morris}}$ (nmol/L) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı düşüktü. MetS'si olmayan gruba kıyasla MetS'si olan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (%), $sT_{\text{Sodergard}}$ (%), sT_{Wheeler} (%) ile $\text{bio}T_{\text{Vermeulen}}$ (%), $\text{bio}T_{\text{Sodergard}}$ (%), $\text{bio}T_{\text{Morris}}$ (%) ortalama değerleri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Emadi-Konjin ve ark.'nin serbest testosteron için hesaplama formülü kullanılarak her iki gruptan elde edilen serbest testosteron (nmol/L ve %) ve $\text{bio}T$ (nmol/L ve %) ortalama değerleri arasında anlamlı farklılık gözlemlenmedi. MetS'si olmayan gruba kıyasla MetS'si olan grupta $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ortalama değeri düşmesine rağmen fark istatistiksel olarak anlamlı değildi. Ancak, MetS'si olmayan gruba kıyasla MetS'si olan grupta $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (%) ortalama değeri istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. MetS'si olmayan grupta total testosteronu referans aralığının alt sınırının altında ve üst sınırının üzerinde olanların yüzdeleri sırasıyla %1,0 ve %8,3 iken, MetS'si olan grupta ise bu yüzdeler sırasıyla %6,5 ve %2,2 idi. Her iki grupta Sodergard ve Vermeulen algoritmaları ile hesaplanan serbest testosteron (nmol/L) ortalama değerleri, Wheeler ve Ly algoritmaları ile hesaplananlara göre daha yüksekti. Emadi-Konjin algoritması ile hesaplanan serbest testosteron (nmol/L) ortanca değeri ise diğer algoritmalarla göre çok daha yüksek bulundu. $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) ortalaması Sodergard ve Vermeulen algoritmaları ile hesaplananlara daha yakındı. MetS'si olmayan/olan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $sT_{\text{Sodergard}}$ (nmol/L), $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ (nmol/L), sT_{Wheeler} (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında, korelasyon katsayılarında MetS'si olan grupta minimal düşüşler olmakla beraber, pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı. Ancak, MetS'si olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ile $\text{DDs}T_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyon saptanırken, MetS'si olan grupta pozitif yönde zayıf derecede korelasyon saptandı. MetS'si olmayan/olan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (%) ile, ayrı ayrı $sT_{\text{Sodergard}}$ (%), $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ (%) ve sT_{Wheeler} (%) arasında, korelasyon katsayılarında MetS'si olan grupta minimal yükseklikler olmakla beraber, pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı. MetS'si olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (%) ile sT_{Ly} (%) arasında pozitif yönde kuvvetli

korelasyon saptanırken, MetS'si olan grupta pozitif yönde orta derecede korelasyon saptandı. MetS'si olmayan/olan grupta $sT_{Vermeulen}$ (%) ile $DDsT_{ECLIA}$ (%) arasında, korelasyon katsayıları MetS'si olan grupta belli derecede düşmesine rağmen, pozitif yönde orta derecede korelasyonlar saptandı. Vermeulen, Sodergard, Emadi-Konjin ve Morris algoritmalarıyla hesaplanan bioT (nmol/L ve %) değerleri arasında her iki grupta da pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı. MetS'si olmayan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (nmol/L), $sT_{Emadi-Konjin}$ (nmol/L), $sT_{Wheeler}$ (nmol/L) ve sT_{Ly} (nmol/L) arasında pozitif yönde orta derecede korelasyonlar saptanırken, MetS'si olan grupta ise pozitif yönde zayıf derecede korelasyonlar saptandı. MetS'si olmayan/olan grupta $DDsT_{ECLIA}$ (%) ile, ayrı ayrı $sT_{Sodergard}$ (%), $sT_{Emadi-Konjin}$ (%) ve $sT_{Wheeler}$ (%) arasında, korelasyon katsayıları MetS'si olan grupta belli derecede düşmesine rağmen, pozitif yönde orta derecede korelasyonlar saptandı.

Denge diyaliz metodu için literatürde ticari hızlı denge diyaliz aparatları (63,121,122) da dahil farklı denge diyaliz aparatları (63,111) mevcut olup bu metotla serbest tiroksin, serbest testosteron gibi serbest hormon düzeyleri veya ilaç-protein bağlanma afiniteleri belirlenmiştir (61,63,108,110–113,121–123). En popüler denge diyalizi cihazlarından bazıları arasında *Pierce Biotechnology*'nin *Rapid equilibrium dialysis* (RED) cihazı, *Harvard Bioscience*'ın *Harvard Apparatus*'u ve HTDialysis'in LLC'nin HTD 96'sı bulunmaktadır. Denge diyaliz aparatları için cihaz ve diyaliz hücresi başına test maliyetleri oldukça yüksektir. Zackary ve ark., Pinger ve ark. ile Banker ve ark. gibi farklı çalışma grupları maliyet etkin ve aynı anda çok sayıda numunenin diyalizinin gerçekleştirilebileceği farklı denge diyaliz aparatları tasarlamışlardır (63,111,112). Zackary ve ark. DIYM (*do-it-yourself microdialysis device*) olarak tanımladığı diyaliz aparatı standart bir polipropilen 96 kuyucuklu plaka, diyaliz tüpü ve düşük viskoziteli epoksi reçineden yapılmıştır (63). Araştırmacılar DIYM'nin sınırlı bütçeli çalışmalarda birden çok numunenin eş zamanlı diyalizi için çok kanallı pipetleme cihazlarıyla uyumlu ve daha düşük maliyetli bir seçenek sunduğunu vurgulamışlardır (63). Pinger ve ark. üç boyutlu yazıcı ile standart 96 kuyucuklu bir plakanın boyutlarına benzer gözenekli rejenerasyonlu selüloz membran içeren, birden fazla pencereye ev sahipliği yapan basılı bir tabandan oluşan denge diyalizi aparatı tasarlamışlardır (112). Entegre membranlar tabana yerleştirildiğinde

sızıntı göstermemesine rağmen her diyaliz uygulaması için membranları pencerelere doğrudan entegre etmede bir baskı-duraklatma-baskı işlemi yapılması gereklidir (112). Bizim çalışmamızda ise denge diyaliz aparatı Banker ve ark. (111)'nin tasarladığına benzer şekilde, 96 kuyucuklu, her kuyucuk kendi içinde diyaliz membranı ile bölünecek şekilde tasarlandı. Denge diyalizi aparatlarında en önemli sınırlamalardan biri kompartmanlar arası sıvı sızıntısı olup, tasarladığımız 96-kuyucuklu denge diyalizi aparatları, çerçeve blokları ve mengene ile sıkıştırılarak sıvı sızıntısı başarılı şekilde engellenmiştir. Ek olarak, denge diyalizi aparatımız aynı anda çok sayıda numunenin denge diyalizi uygulamaları için uygun olup, aynı zamanda maliyet etkindir.

Serbest testosteron direkt ölçümü için literatürde immünoluminometrik ölçüm (CLIA) ve RIA gibi metotlar kullanılmaktadır (60,124,125). LC-MS/MS ile serbest testosteron ölçümünde ise analiz öncesi denge diyalizi veya ultrafiltrasyon aşamaları gerçekleştirilmektedir (1,12,61). Denge diyalizi sonrası MS tabanlı teknikler referans metot olmakla (55,60,62,126) beraber, UF-ID-GC/MS yöntemini aday referans ölçüm yöntemi olarak belirten çalışmalar bulunmaktadır (12). RIA ve CLIA'nın serbest testosteron ölçümü için analitik performans olarak birbirine üstünlüğünü gösterir kullanılabilir bir veri literatürde bulunmamakla beraber aksine, iki yöntemi uyumlu gösteren çalışmalar bulunmaktadır (127). Fakat, serbest testosteron için CLIA metodunda referans aralıklarının yaşa göre belirlenmemiş olması (127,128), özellikle erkek hastalarda iki yöntem (CLIA ve RIA) arasında yapılan ölçümlerdeki uyumu azaltmıştır (127). Ek olarak, CLIA ve RIA için serbest testosteron referans aralıklarının alt ve üst sınırları aynı cinsiyet ve yaş grubu için birbirleri ile örtüşmemektedir. Literatüre bakıldığında, testosteron ölçümünde farklı metotlar için farklı referans materyaller kullanıldığı görülmektedir (59,128,129). *Elecsys Testosterone II* kitinin izlenebilirliği için, referans materyal, insan serumunda siklodekstrin ile ön saflaştırma basamağı sonrası ID-GC/MS ile testosteron hormonu ölçülerek elde edilmiştir (59,130). Maglumi serbest testosteron kitinde, metot USP testosteron referans materyaline göre standardize edilerek izlenebilirlik sağlanmıştır (128). Ulusal Standartlar ve Teknoloji Enstitüsü (*National Institute of Standards and Technology - NIST*) ise testosteron referans materyali için Standart Referans Materyal

971a (SRM 971a)'yı öne sürmüştür ve bu materyalin elde edilmesinde Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (*Centers for Disease Control and Prevention - CDC*) bünyesinde Steroid Hormonlar Standardizasyon Programlarının E2 ve testosteron için önerdiği ID-LC-MS/MS kullanmıştır (126,129). Tümevarıldığında, farklı metotlar için farklı referans materyallerin kullanılmasının (izlenebilirlik) laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği (*reproducibility*) etkileyeceği görülmektedir. Genel olarak, CLIA metodunun rutin tıbbi laboratuvarlarda kullanılabilecek şekilde otomatize sistemlere uyarlanabilmesi, maliyet etkin olması, basitliği, geniş lineer ölçüm aralığı ve yüksek analitik hassasiyette olması avantajları olarak gösterilmektedir (131). RIA metodunun ise özel eğitilmiş personel gerektirmesi, reaktif yarı-ömrünün kısıtlılığı ve radyoaktivite (mevzuat, imha, özel korunma gereksinimi) dezavantajlarıdır (131). Bu iki metot karşılaştırıldığında ise literatürde serum serbest testosteronun direkt ölçümünde daha çok RIA'nın kullanıldığı görülmektedir (109,127,132–134). Bunun nedeninin RIA'nın daha eski ve yerleşik bir metot olması ve CLIA'dan farklı olarak yaş gruplarına göre referans aralıklarının tanımlanmış olması (127,128) sayılabilir. Serbest testosteron ölçümü için, literatürde direkt immünölçümlerin analitik performansı sıkça eleştirilmektedir (1,31,58,133). Dalmiglio ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada, Vermeulen denklemi altın standart kabul edilerek direkt immünoluminometrik metot (Maglumi, Snibe) ile kıyaslanmış ve yapılan farklı regresyon analizlerinde CLIA ile $sT_{Vermeulen}$ arasında genel bir uyum saptanmıştır (60). Yine, bu çalışmada tüm hastalar göz önüne alındığında, direkt yöntemin %75,0 sensitiviteye ve %93,4 spesifiteye sahip olduğu bulunmuştur (60). Genel olarak, hormon ölçümlerinde immünölçümlerin analitik performansının kabul edilebilir düzeylerde olduğu bildirilmekle beraber, önemli ölçüde daha doğru ve hassas oldukları için immünölçümler yerine MS tabanlı yöntemlerin kullanılması gerektiği de güçlü bir şekilde savunulmaktadır (58). Çalışmamızda literatürde ilk olarak, denge diyaliz sonrası ECLIA metodunu kullanarak serbest testosteron analizini gerçekleştirdik. Metodun analitik performansını ortaya koymak için yapılan validasyon çalışması sonuçları kabul edilebilir düzeylerdeydi. Total testosteron ve denge diyalizi sonrası serbest testosteron ölçümlerinde kullanılan metodun aynı olması dikkate alındığında, denge diyalizi için çalışmamızda belirlenen % serbest testosteron düzeyleri (tüm çalışma grubu için ortalama %1,82 ve IQR %1,06) literatürde bildirilen %1-3'lük düzeylerle oldukça

uyumluydu (1,3,55). Metot validasyonu dışında bu uyumun saptanması, bu çalışmada tasarladığımız denge diyalizi uygulamasının analitik performansı açısından değerliydi. Ek olarak, komperatif metot olarak Vermeulen algoritmasının kabul edildiği metot karşılaştırma analizlerinde $sT_{Vermeulen}$ sonuçları ile sT_{CLIA} sonuçları, $DDsT_{ECLIA}$ sonuçlarına göre daha iyi korelasyon göstermesine rağmen (r için sırasıyla, 0,969 ve 0,841); $sT_{Vermeulen}$ sonuçları ile $DDsT_{ECLIA}$ sonuçları arasındaki bias, sT_{CLIA} sonuçlarına göre daha kabul edilebilir düzeylerde ve total kabul edilebilir hata WLSH (117) kriterlerine göre kabul edilebilir düzeydeydi (% bias için sırasıyla +%20,8 ve -%78,7; TAH için sırasıyla %28,2 ve -%84,3). Serbest testosteronun kantitatif analizlerinde CLIA ve RIA'nın izlenebilirliklerinin farklı referans materyallere göre olması, % serbest testosteron düzeylerinde metotlar arası tutarsız farklılıklara neden olabileceği dikkate alındığında, bu çalışmamızda olduğu gibi total testosteron ve denge diyalizi sonrası serbest testosteron ölçüm metodunun aynı olması güvenilir ve kullanılabilir % serbest testosteron düzeylerinin belirlenmesinde ön plana çıkmaktadır.

Çalışmamızda denge diyaliz için CLSI C45-A kılavuzunda (106) önerildiği gibi iyonik ortamın serumu taklit etmesi ve 37 °C ve pH 7,40'da tamponlama kriterlerini karşılayan HEPES tamponunu kullandık. Literatürde ise denge diyalizi için HEPES, PBS, proteinsiz normal insan serumu ultrafiltratı, TRIS *buffer* ve belirtilen tamponların modifikasyonları kullanılmıştır (61,63,108–113). HEPES tamponunda *Elecsys Testosterone II* kiti kullanılarak yapılan testosteron ölçümünde LoQ değerinin üstünde konsantrasyonlara denk gelen sinyaller elde edildi. Bu durumun olası nedeninin, deneysel ortamda *Elecsys Testosterone II* kitindeki 2-bromoestradiolün (59), SHBG ve diğer bağlayıcı proteinler için testosteron ile yarışan bir steroid olduğu; diyaliz sonucu tamponda bağlayıcı protein olmadığından 2-bromoestradiolün reaktifteki testosteronu özgü biotinlenmiş monoklonal antikora bağlanması olarak değerlendirildi. Bu interferansı diğer yarışmalı ECLIA metoduyla ölçülen kortizol (*Elecsys Cortisol II*) (135) için değerlendirdik. Ölçüm metodunda deneysel ortamda kortizolün bağlayıcı proteinlerden serbestleşmesini sağlamak için danazol kullanılmakta idi ve HEPES tamponunda kortizol ölçümünü gerçekleştirdiğimizde kortizol için yüksek sinyal ile LoD değerinin altında sonuç elde edildi. Testosteron için saptanan interferansın kortizol analizlerinde saptanmamasının nedeni, proteinsiz

ortamda reaktiften gelen antikorlara 2-bromoestradiolün ilgi göstermesine rağmen danazolün göstermemesi olarak değerlendirilmiş, ancak interferansın olası mekanizmasının ortaya konması için ileri bir çalışma yapılamamıştır. Testosteron için saptadığımız bu interferansın ölçüm sonuçlarına olan katkısının giderilmesi için üç prosedür denenmiştir. İlk prosedürde diyaliz sonrası tamponda herhangi bir işlem yapmadan testosteron konsantrasyonları elde edildi. İkinci prosedürde diyaliz sonrası tamponun analiziyle elde edilen testosteron konsantrasyon değeri, diyaliz öncesi HEPES tamponunun analiziyle elde edilen testosteron konsantrasyon değerinden çıkarmak iken, üçüncü prosedürde ise yüksek efektif sinyallerle uyumlu, metodun LoD değerinden düşük testosteron konsantrasyonlarına sahip serum numuneleri ile diyaliz sonrası tamponun 1:3 oranında muamele edilmesi idi. Çalışmamızda metod validasyon çalışmaları ile üçüncü prosedürün sonuçları daha kabul edilebilir düzeylerde olduğu için, çalışmamızın ileri aşamalarında denge diyalizi sonrası serbest testosteron analizlerinde üçüncü prosedür esas alındı.

Testosteron steroid yapıda bir hormon olup spesifik olarak SHBG'ye sıkı bağlı, %1-3'lük kısmı serbest olup geri kalanı nonspesifik şekilde plazma proteinlerine gevşek bağlı halde dolaşımda bulunur (1-3,55). Testosteronun, sekonder seks karakterleri, libido, spermatogenez, kas-kemik gelişimi, metabolizma üzerine olumlu etkileri mevcuttur (29,31,35-37,40,41). Etkilerini daha çok periferde DHT'ye dönüşerek ve AR'ye bağlanarak gösterir (30). Serbest testosteron, plazmada herhangi bir proteine bağlı olmayan fraksiyon olmakla beraber; bioT, testosteronun SHBG'ye bağlı olmayan fraksiyonunu ifade eder (1,30,31). Literatürde bioT'nin de serbest testosteron gibi biyoaktif olduğu kanaatine varılmıştır (30,31). BioT ile serbest testosteron iyi korelasyon gösterir ve birbirinin yerine kullanılabilir (1,8) iken; Ho ve ark.'ye (31) göre androjenite belirteci olarak bioT'nin serbest testosterondan daha iyi olup olmadığı konusunda fikir birliği yoktur. Testosteron testi rutin klinikte erkeklerde erektil disfonksiyon, hipogonadizm ve infertilite gibi çeşitli klinik senaryolarda tanıda ve değerlendirmede yardımcıdır (1,34,55,136). Total testosteronun serbest testosterona kıyasla klinik önemi tartışmalıdır. Yaşlanma, akut/kronik hastalıklar, hormonal değişiklikler, obezite ve diurnal ritimlerle ortaya çıkan SHBG düzey varyasyonları nedeniyle, serbest testosteronun hipogonadizmin klinik

değerlendirilmelerinde daha fazla fayda sağlayacağı öne sürülmektedir (55). Öncelikli olarak hepatositler tarafından sentezlenen SHBG seviyesine bağlı olarak serum total testosteron seviyeleri etkilenir (47,48). Obezite negatif yönde; hipertiroidizm pozitif yönde SHBG düzeylerini etkiler (47). SHBG polimorfizmleri de SHBG'nin kendisinin yanı sıra sistemik serbest testosteronun ekspresyonunu ve variabilitesini doğrudan etkilemektedir (55). Testosteronun SHBG'ye ve albümine bağlanma ilişkisini veya düzeyini bozabilecek, SHBG veya albüminin fonksiyon ve düzeyini etkileyebilecek paraproteinemi ve/veya kriyoglobulinemisi, otoimmün hastalığı, primer/sekonder/tersiyer hipertiroidi/hipotiroidisi, akromegalisi, hipogonadizmi, kromozom anomalisi, karaciğer ve böbrek hastalığı olanlar ile anti-epileptik ilaç kullananlar çalışmamıza dahil edilmedi. Çalışmamızda dışlama kriterlerine ek olarak, demografik verilerden yaşın istatistiksel değerlendirmelerdeki karıştırıcı etkisi ek analizlerle sınıandı.

Bireysellik indeksi (II), varyasyonun biyolojik bileşenlerinden birey içi varyasyonun (CV_I) bireyler arası varyasyona (CV_G) oranı olarak tanımlanmaktadır (137). II değerinin $\leq 0,6$ olması bireyselliğin yüksek olduğunu, $\geq 1,4$ ise bireyselliğin düşük olduğunu göstermekte olup, çoğu analit için bu indeks değeri $> 0,6$ ve $< 1,4$ olarak tanımlanan gri bölgeye düşmektedir ve popülasyon temelli referans aralıklarının kullanımında dikkatli olunması gerektiği vurgulanmaktadır (137,138). Analitlerin çoğunluğunun yüksek bireyselliğinden dolayı ($CV_I < CV_G$) sağlık durumundaki değişiklikler için referans değişim değerinin (RCV) kullanılması, popülasyona temelli referans aralıkları kullanımından daha iyi bir yaklaşım olarak görülmektedir (139). Çalışmamız için total testosteron, serbest testosteron ve SHBG için biyolojik varyasyon değerleri *European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* (EFLM)'nin Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubunun (*Working Group on Biological Variation*, WG-BV) veritabanından alındı (140). EFLM WG-BV veritabanında, ilgili analitin ölçütleri için biyolojik varyasyon çalışmaları sistematik literatür aramalarıyla belirlenir. İlişkili biyolojik varyasyon tahminlerinin doğruluğunu ve yararlılığını etkileyebilecek tüm temel unsurların mevcut olup olmadığı doğrulanarak biyolojik varyasyon yayınlarının kalitesini değerlendirmek üzere azalan uyumu gösteren A, B, C veya D puanları ile tanımlanan 14 kalite ögesinden oluşur.

Veritabanında total testosteron için $CV_I = \%14,5$, $CV_G = \%23,1$ ve $II = 0,6$; serbest testosteron için $CV_I = \%55,0$, $CV_G = \%68,0$ ve $II = 0,81$; SHBG için $CV_I = \%8,9$, $CV_G = \%46,9$ ve $II = 0,19$ idi. Total testosteron ve SHBG için II değerleri bireyselliğin yüksek olduğunu göstermekte olup popülasyon temelli referans aralıklarının kullanımında sınırlamalara işaret etmektedir. Çalışmamızda MetS'si olmayan gruba göre, MetS'si olan grupta total testosteron ortalamalarının istatistiksel olarak çok ileri düzeyde anlamlı düşmesine rağmen, değerlerin yine referans aralıklarının içerisinde kalması analitin bireysellik indeksi profili ile uyumluydu. Yaşın karıştırıcı etkisinin giderildiği grup karşılaştırmalarında MetS'si olan grupta, II değeri $\leq 0,6$ olan SHBG (nmol/L) ve total testosteron (nmol/L) ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düşmesine rağmen yine referans aralıklarının içerisindeydi. Bu sonuçlar klinik değerlendirmelerde total testosteron ve SHBG'nin popülasyona temelli referans aralıkları kullanımlarında sınırlamalar olduğunu ve RCV değerlerinin kullanımının faydalı olabileceğini desteklemektedir.

Testosteron veya serbest hormon ölçümü için literatürde denge diyaliz metodu için daha çok serum numunelerinin kullanımı ön plandadır (61,109,110,132,141). Maliyet ve antikoagülan maddelerin olası dilüsyon etkisi göz önüne alındığında ve ayrıca, *Elecsys Testosterone II* (59) ve *Elecsys SHBG* (48) kit prospektüsünde serum, kabul edilebilir numune türü olduğundan ve rutin kliniğimizde de hormon ölçümleri için serum tüpleri kullanıldığından serum numune türünü seçtik. Yetişkin erkeklerde serum testosteron ve SHBG diurnal değişimler gösterdiğinden, kan örneklerinin testosteron konsantrasyonlarının maksimum olduğu sabahın erken saatlerinde alınması önerilmektedir (31). Çalışmamızda, gönüllülerden venöz kan numuneleri sabah saatlerinde ve metabolik profillerinin değişmemesi için aç karnına alındı.

SHBG için 95/560 kodlu ilk uluslararası standart 1998 yılında yayınlanmıştır ve insan serum SHBG seviyelerinin ölçümüne yönelik immünölçümlerin kalibrasyonu için yaygın olarak kullanılmaktadır (142). DSÖ Biyolojik Standardizasyon Uzman Komitesi, anormal seks steroid fonksiyonu ile ilişkili durumların tanısı için önemli olan insan serum SHBG seviyelerinin ölçümüne yönelik testlerin kalibrasyonu amacıyla yeni bir uluslararası standart ihtiyacını 2008 yılında kabul etmiştir (142). 08/266 kodlu 2. jenerasyon standart, kullanımdan kaldırılan 1. jenerasyon standardın

yerini almıştır (142). SHBG ölçümünü yaptığımız *Elecsys SHBG* testi ise 95/560 kodlu 1. uluslararası SHBG standardına göre standardize edilmiştir (48). Farklı laboratuvarlarda ve farklı metotlarla ölçülen SHBG'nin izlenebilirliğinin farklı standart materyallere göre elde edilmesi laboratuvarlar arası tekrarlanabilirliği (*reproducibility*) etkileyecektir.

Literatürde NCEP ATP III (66), IDF (64) ve DSÖ (66), MetS için tanı kriterleri belirlemiş ve AACE (66) de “İnsülin direnci sendromu” tanısı için kriterler yayınlamıştır. IDF kriterlerinde, DSÖ ve NCEP ATP III kriterlerinden farklı olarak mutlak santral obezite şartı aranmış olup, santral obezite için farklı etnik kökenler için farklı eşik değerler bildirilmiştir (64). Ek olarak, tanı kriterlerinden açlık plazma glukozu için eşik değer 100 mg/dL olarak belirlenmiştir (64). Literatürde İspanyol ve Türk popülasyonda yapılan ayrı ayrı çalışmalarda NCEP ATPIII kriterlerinin MetS tanısı için sensitivitesi düşük bulunmakla beraber, IDF kriterlerinin kullanımı hassasiyeti artırmıştır (119,120). Biz de çalışmamızda MetS tanısı için IDF organizasyonun kriterlerini kullandık. Çalışmamıza katılan tüm gönüllüler için IDF kriterlerinden en fazla gereksinimi karşılanan komponent %73,4 ile bel çevresi olup, gereksinimi karşılanan diğer dört komponent yüzdeleri benzerdi (%39,4 ile %48,4 arası). NCEP ATP III kriterleri için gereksinimi karşılanan komponentlerin yüzdeleri glukoz hariç (%25,0) benzerdi (%40,4 ile %48,4 arası).

Bu çalışmada total testosteron konsantrasyonu ortalamaları, MetS'si olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu. Literatürde, Laaksonen ve ark.'nin 1896 non-diyabetik erkek üzerinde yaptığı çalışmada, MetS'i olanlarda, MetS'i olmayanlara göre total ve serbest testosteron ile SHBG düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptanmıştır (27). Yine, yapılan yayınlarda obezite ve MetS'nin düşük testosteron ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (30,67). Santral obezite, MetS'nin klasik bir özelliğidir ve total testosteron seviyelerinin düşmesiyle ilişkili olduğuna dair kanıtlar farklı araştırma grupları tarafından bildirilmiştir (84–88). MetS'de testosteron konsantrasyonlarının düşmesindeki olası mekanizma, yüksek leptin seviyelerinin LH ile uyarılan androjen üretimini inhibe etmesi (90); hatta, artan yağ dokusunun, pro-enflamatuar sitokinler salgılanması, insülin direnci ve diyabet yoluyla HPT eksenini çoklu mekanizmalarla baskılamak; düşük testosteronun, total ve

viseral yağ kütlesinin daha fazla birikmesine neden olarak gonadotropin inhibisyonunu şiddetlendirmesi olarak belirtilmektedir (67). Bir diğer açıklanan mekanizma ise, testosteronun adipositlerdeki LPL'yi baskılayarak ve β reseptör sayısını artırarak adipoz hipertrofiyi önlediğidir (30). Bu çalışmada MetS'si olan grupta total testosteron istatistiksel olarak düşmesine rağmen, bu grupta total testosteronu referans aralığının içinde olanların yüzdesi %91,3 idi. Ayrıca, çalışmanın dahil etme ve dışlama kriterlerine göre belirlenen, MetS'si olan grupta total testosteronu referans aralığının altında olanların yüzdesi %6,5 idi. Bu durumun nedeni olarak, çalışmamızın bir vaka-kontrol çalışması değil, bir kesitsel çalışma olduğu ve çalışmaya katılan gönüllülere total testosteron için referans aralığının altında veya içinde olup olmaması yönünden bir müdahalede bulunulmamasını görüyoruz. Ek olarak, total testosteronun II değerinin 0,63 olması, bireyselliğin yüksek olduğuna ve popülasyon temelli referans aralıklarının kullanımında sınırlamalara işaret etmektedir. Literatürde bizim çalışmamızın bulgularına benzer şekilde, Chubb ve ark.'nin yaptıkları çalışmada total veya serbest testosteron düzeyleri; Haring ve ark., Rodriguez ve ark. ve Maggio ve ark.'ın yaptıkları çalışmada total testosteron düzeyleri; Katabami ve ark.'ın yaptıkları çalışmada serbest testosteron düzeyleri MetS'i olan grupta MetS'i olmayan gruba göre anlamlı düşüklük göstermişken ortalama değerler referans aralıkları içinde kalmıştır (78,143–146). Ek olarak, Laaksonen ve ark.'nin yaptığı kohort çalışmasında takipte MetS gelişen erkeklerde total ve serbest testosteron anlamlı olarak düşmüşken ortalama değerler referans aralıklarının içinde kalmış olup, kohort grubunda total testosteronu referans aralığının altında olanların oranı %5'ten %7'ye çıkmış, serbest testosteron için ise %1,4'lük oran korunmuştur (25). Fui ve ark. da, aşırı kilo ve orta derecede obezitenin, ağırlıklı olarak total testosterondaki azalmalarla ilişki olduğunu; fakat, serbest testosteron seviyelerinin, özellikle genç erkeklerde referans aralıkta kaldığını belirtmiştir (67).

Çalışmamızda tüm gönüllüler için yaş ile SHBG düzeyi (nmol/L) arasında pozitif yönde zayıf korelasyon saptanmış iken; bu korelasyon MetS'si olmayan grupta kısmi olarak artmış, ancak MetS'si olan grupta azalmıştır. Yaş ile, ayrı ayrı total testosteron (nmol/L), $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ve $DDsT_{\text{ECLIA}}$ (nmol/L) arasında tüm gruplarda ve MetS'si olmayan grupta negatif yönde korelasyonlar saptanırken,

MetS'si olan grupta bu korelasyonların düzeyleri azalmıştır. Ek olarak, yaş ortalaması MetS'si olan grupta, MetS'si olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Çalışmamızda ilk grup karşılaştırmalarında SHBG ortalamaları (nmol/L) için, MetS'si olanlarla olmayanlar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmazken; yaşın karıştırıcı etkisi giderildiğinde, MetS'si olan grupta SHBG ortalaması (nmol/L) istatistiksel olarak anlamlı düşük bulundu.

SHBG'nin MetS'de düştüğü; yaşlanma ile arttığı daha önceki çalışmalarda bildirilmiştir (78,145–147). Yapılan çalışmalarda SHBG'nin MetS patofizyolojisine katkıda bulunabileceği düşünülmekle beraber, mekanizma tam olarak aydınlatılamamıştır (146). Yapılan çalışmalarda, insülinin karaciğerde SHBG üretimini negatif olarak regüle ettiği belgelenmiştir (146,148,149). Ek olarak, SHBG üretiminin seks steroidlerinin kontrolü altında olduğu; yapılan çalışmalarda E2 ve testosteronun hepatoselüler SHBG üretimini uyardığı bulunmuştur (149,150). Çalışmamızın sonuçlarına benzer şekilde, Rodriguez ve ark.'nin yaptığı çalışmada da yaşın karıştırıcı etkisi giderildiğinde MetS'si olan grupta, MetS'si olmayan gruba göre SHBG ortalamaları istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunduğu bildirilmiştir (78). Chubb ve ark. ile Maggio ve ark.'ın yaptığı bir çalışmada ise, bizim çalışmamızdan farklı olarak, MetS'si olan ve olmayan grup arasında yaş ortalamaları için istatistiksel fark yoktu ve bizim çalışmamıza benzer şekilde bu iki grup arasında SHBG ortalamaları, MetS'i olan grupta istatistiksel anlamlı olarak daha düşük bulunmuştur (145,146).

Çalışmamızda, yaşın karıştırıcı etkisi giderildiğinde, hesaplanan serbest testosteron ve bioT konsantrasyon ortalamaları MetS'si olan grupta, MetS'si olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı düşük bulunmuş iken; hesaplanan serbest testosteron ve bioT yüzdesi MetS'i olan grupta, MetS'i olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. Bu durumun olası bir nedeni, MetS'de serbest testosteron ve bioT'nin total testostere göre oransal olarak daha fazla azalması ya da MetS'de azalan SHBG ile testosteronun SHBG'ye bağlı olmayan ve serbest kısmının SHBG'ye bağlı kısmına oranının göreceli artışı olabilir. Ek olarak, karaciğerde sentezlenen SHBG'nin obezite, diyabet ve metabolik sendromda kan konsantrasyonunun azaldığı gösterilmiştir ve bu koşullarda total testosteron serbest

testosterondan nispeten daha düşük olmaya eğilimlidir (30). Ayrıca, yapılan bir çalışmada da insülinin, akut etki olarak SHBG'nin testosterona bağlanma afinitesini artırabileceği; kronik etki olarak da insülinin karaciğerde SHBG üretimini sınırladığı iddia edilmiştir (148). Bir diğer olası mekanizma, organizmanın HPT eksenindeki negatif *feedback* yoluyla testosteronun biyoaktif kısmını (serbest testosteron veya bioT) azalan total testosterona rağmen belirli bir fizyolojik düzeyde tutması olabilir. Ek olarak, MetS'de serum matriks bileşenlerinin düzeylerindeki değişiklikler hormonların serum proteinlerine bağlanma afinitelerinde değişikliklere neden olabilir. Çalışmamızda, MetS'i olan grupta total ve serbest testosteron konsantrasyonları düşmesine rağmen referans aralığının altında kalan numune oranı düşük (%6,5) olduğundan bu profil açık bir şekilde belirlenememiştir; fakat, $DDsT_{ECLIA}$ ile elde ettiğimiz sonuçlarla denklemlerden hesaplanan sonuçlar kendi içinde tutarlıdır.

Çalışmamızda yaşın karıştırıcı etkisi giderildiğinde, Emadi-Konjin algoritması ile hesaplanan serbest testosteron ve bioT ortalaması (nmol/L, %), benzer şekilde MetS'i olan grupta, MetS'i olmayan gruba göre düşük bulunmuştur; fakat, diğer algoritmalarından farklı olarak saptanan düşüklük istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durum, Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ve Emadi-Konjin ve ark.'nin yayınladığı serbest testosteron ve bioT hesaplamasında kullanılan denklemin ortak olmasına rağmen farklı testosteron-SHBG (k_t) ve testosteron-albümin (k_{at}) ilişki sabitlerinin kullanımına bağlı olabilir.

Çalışmamızda yaşın karıştırıcı etkisi giderildiğinde, $DDsT_{ECLIA}$ konsantrasyonu ortalama değeri, hesaplanmış serbest testosteron ve bioT (nmol/L) sonuçları ile benzer şekilde, MetS'si olan grupta MetS'si olmayan gruba göre düşük saptandı; fakat, hesaplamalı sonuçlardan farklı olarak, bu iki grup arasındaki $DDsT_{ECLIA}$ konsantrasyonu farkı istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durumun olası bir nedeni, serbest testosteron hesaplamasında kullanılan denklemlerin total testosteron ve SHBG ölçümüne bağımlı olmasıdır; fakat, $DDsT_{ECLIA}$ ölçümü için total testosteron ve SHBG konsantrasyonu gerekmez. Bu farklılığın olası diğer bir nedeni 2-bromoestrodolün analizlerimize olan interferansından kaynaklı olabileceğidir; ancak, interferansın mekanizmasını ortaya koyabilmek için ek bir çalışma yapılamamıştır. $DDsT_{ECLIA}$ yüzdesi ise, hesaplanmış serbest testosteron (%) ve bioT

(%) sonuçları ile benzer şekilde, MetS'si olan grupta MetS'si olmayan gruba göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu.

Çalışmamız, denge diyalizi uygulaması sonrası ECLIA metodunun kullanıldığı ve serbest testosteron analizlerinin yapıldığı ilk çalışma olmakla beraber, direkt serbest testosteron analizlerinin gerçekleştirildiği CLIA ve RIA gibi metotlardan elde edilecek sonuçlar ile elde ettiğimiz sonuçların sonraki yapılacak çalışmalarla karşılaştırılmasına ihtiyaç vardır.

Literatürde, serbest testosteron ve bioT hesaplamasında kullanılan denklemler klinik pratikte daha az maliyette ve yüksek doğrulukta serbest testosteron tahmini için kullanılmaktadır (31). Bu denklemler, SHBG ve albümin konsantrasyonu ile testosteronun SHBG ve albümine bağlanma sabitini kullanan, kütle etkisi yasasına dayananlar ve albümin konsantrasyonu ile bağlanma sabitlerinin kullanılmadığı, serbest testosteronun ampirik ölçümünden regresyon denklemiyle elde edilenler olmak üzere temelde iki kategoride toplanırlar (1,31). Denklemlerden elde edilen serbest testosteron değerleri, kullanılan albümin ve SHBG konsantrasyonları (31) ile kullanılan farklı bağlanma sabitleri (1) nedeniyle farklılık gösterebilmektedir. Denklemlerden hangisinin serum serbest testosteron konsantrasyonlarına en yakın değerleri verdiği bilinmemekle (31) beraber, çoğu yayında serbest testosteron veya bioT hesaplanması için belirli bir yöntemin seçilmesine ilişkin herhangi bir argüman sunulmamaktadır (1). Kimi yayında en sık kullanılan iki denklem olarak Vermeulen ve ark. ve Sodergard ve ark. tarafından açıklananlar olduğu belirtilirken (1); kimi yayında Vermeulen ve ark.'nin denklemi literatürde en yaygın kullanılanı olduğu belirtilmektedir (31). Hatta, Dalmiglio ve ark.'nin yaptığı bir çalışmada da, Vermeulen denklemi altın standart olarak kabul edilerek, CLIA ile Vermeulen denkleminin analitik performansı karşılaştırılmış; CLIA'nın hesaplanan yöntemle karşılaştırılabilir bir performans sergilediği bulunmuştur (60).

Çalışmamızda $sT_{Sodergard}$ ve $sT_{Vermeulen}$ ortalama değerleri (nmol/L), $sT_{Wheeler}$ ve sT_{Ly} ortalama değerlerine (nmol/L) göre daha yüksekti. Literatüre baktığımızda Ho ve ark.'nin yaptığı çalışmada, bizim bulgularımıza benzer olarak $sT_{Vermeulen}$ konsantrasyonu $sT_{Sodergard}$ konsantrasyonundan düşük, sT_{Ly} konsantrasyonundan yüksek bulunmuş; bizim bulgularımızdan farklı olarak $sT_{Vermeulen}$ konsantrasyonu

sT_{Wheeler} konsantrasyonundan düşük bulunmuştur (56). Yine, çalışmamızda $DDsT_{\text{ECLIA}}$ ortalama değeri (nmol/L), $sT_{\text{Vermeulen}}$ ortalama değeri (nmol/L) ile daha yakın olmak üzere, $sT_{\text{Sodergard}}$ ortalama değeri (nmol/L) ile, diğer denklemlerden elde edilen sonuçlara göre daha yakındı. Bu durumun nedeni farklı denklemlerin farklı sabitler ve algoritmalar kullanması olmakla beraber, Vermeulen denkleminin literatürde en çok kabul gören denklem olmasının altında yatan nedenler olabilir.

Çalışmamızda yaş ile, hesaplanan serbest testosteron ve $bioT$ değerleri arasında negatif yönde zayıf korelasyonlar saptanmış iken, $bioT_{\text{Emadi-Konjin}}$ ve sT_{Wheeler} konsantrasyonları ile yaş arasında negatif yönde orta derecede korelasyonlar vardı. $bioT_{\text{Emadi-Konjin}}$ için bu durumun olası nedeninin, SHBG düzeyinin ilerleyen yaşa bağlı olarak artış göstermesiyle beraber testosteronun SHBG'ye bağlanma sabitinin en yüksek değerinin diğer denklemler içinden Emadi-Konjin ve ark. tarafından bildirilmesi (1) olduğunun kanaatindeyiz. Benzer şekilde, Wheeler'in denkleminde bakıldığında SHBG düzeyinin logaritmik olarak işleme alındığını görmekteyiz (20,56).

Çalışmamızda, $bioT_{\text{Emadi-Konjin}}$ ve sT_{Wheeler} konsantrasyonu ortalamaları MetS'si olmayan grupta yaş ile orta derece negatif korelasyon gösterirken, MetS'si olan grupta yaş ile zayıf korelasyon gösterdi.

Testosteronun yaklaşık %50'lik bir kısmı albümine nonspesifik ve gevşek bağlı bir şekilde dolaşımda bulunmaktadır (1,55). Serbest testosteron ve $bioT$ hesaplamasında kullanılan denklemlerde, albümin konsantrasyonu ve testosteronun albümine bağlanma ilişki sabiti kullanılır (1,56). De Ronde ve ark., albümin konsantrasyonunun $bioT$ üzerine etkisini incelemek için 43 ve 33 g/L'lik farklı sabit albümin konsantrasyonlarında Vermeulen, Sodergard ve Emadi-Konjin ortak denklemleri ile $bioT$ 'yi hesaplamış; tüm algoritmalar için düşük albümin konsantrasyonu ile hesaplanan ortalama $bioT$ konsantrasyonları istatistiksel olarak anlamlı ölçüde daha düşük bulunmuştur (1). Ek olarak, değişen albümin konsantrasyonlarının etkisi, fraksiyonel $bioT$ konsantrasyonu daha düşük olduğunda daha güçlü görünmüştür (1). Ayrıca, çalışmada $bioT_{\text{Sodergard}}$ konsantrasyon ortalaması en yüksek sonuçlar verdiği için, albümin konsantrasyonundaki değişimlere daha az duyarlı olarak bulunmuştur (1). Albümin konsantrasyonunda, nefrotik sendrom veya

şiddetli malnütrisyonunda olduğu gibi büyük anormallikler beklendiğinde, gerçek albümin konsantrasyonu denkleme eklenmelidir (1). Biz de çalışmamızda nefrotik sendrom, şiddetli malnütrisyon, kronik karaciğer hasarı gibi albümin konsantrasyonuna beklenen etkisi büyük olan patolojileri dışlama kriterlerimize dahil ettik ve gönüllülerin gerçek albümin konsantrasyonunu, kullanılan denklemlere dahil ettik. Bizim çalışmamızda tüm gönüllüler için albümin düzeyleri $48,57 \pm 3,11$ g/L olup referans aralığındaydı.

MetS'si olmayan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ ile, ayrı ayrı $sT_{\text{Sodergard}}$, $sT_{\text{Emadi-Konjin}}$ ve sT_{Wheeler} arasında, nmol/L ve % düzeyleri için, pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı. MetS'si olan grupta ise bu korelasyonlarda minimal düşüklükler olsa bile yine pozitif yönde çok kuvvetliydi. Farklı olarak, MetS'si olmayan/olan grupta $sT_{\text{Vermeulen}}$ (nmol/L) ile sT_{Ly} (nmol/L) arasında pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptanırken; % düzeyi için MetS'si olmayan grupta pozitif yönde kuvvetli korelasyon; MetS'si olan grupta ise orta derecede korelasyon saptandı. Vermeulen, Sodergard, Emadi-Konjin ve Morris algoritmaları ile hesaplanan bioT (nmol/L ve %) değerleri arasında her iki grupta da pozitif yönde çok kuvvetli korelasyonlar saptandı. Bu sonuçlar, algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT düzeyleri ile $DDsT_{\text{ECLIA}}$ düzeylerinin MetS profilleriyle değerlendirildiği ilk çalışmanın verileri olması açısından değerlidir. Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ile Emadi-Konjin ve ark. tarafından tanımlanan denklemler total testosteron, SHBG ve albümin konsantrasyonları ile testosteronun SHBG (k_t) ve albümine (k_{at}) bağlanma sabitleri bilindiğinde serbest testosteron ve bioT'nin hesaplanabileceğini varsayar (1,8,13,14,56). Ly ve ark. 4000 örnekte serbest testosteronu tahmin etmek için bir ultrafiltrasyon testi kullanarak bu numunelerde serbest testosteronu tahmin etmek için regresyon modelleri sunmuştur (1). Wheeler denklemi, 100 normal erkek ve 18 normal kadından alınan serum örneklerinde jel filtrasyon yöntemiyle ölçülen serbest testosteron konsantrasyonlarının regresyon analizinden türetilmiştir (56). Proteinlere bağlanma sabiti üzerine temellendirilmiş algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT düzeyleri arasındaki korelasyonların MetS'si olan/olmayan gruplardaki yönleri ve düzeylerinin benzer olması birbirleri ile tutarlıydı. Ancak, Ly ve ark.'nin önerdiği, regresyon temelli olan algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron (%) için,

MetS'si olan grupta korelasyonların düzeyleri azalmıştı. Regresyon analizi öncelikle kavramsal olarak farklı iki amaç için kullanılır. Birincisi, yaygın olarak tahmin ve öngörü için kullanılması; ikincisi ise bağımsız ve bağımlı değişkenler arasındaki nedensel ilişkileri ortaya koymak içindir. Ancak her iki durum için de, elde edilen verisetinin çıktıları temsil ettiği popülasyona (sağlıklı bireyler veya belli bir hastalığı olanlar gibi) sıkıca bağlıdır. Bu sonuçlar, Ly ve ark.'nin önerdiği regresyon temelli modellerin MetS'si olan bireylerde serbest testosteron düzeylerinin belirlenmesinde kullanımına dair sınırlamaya işaret etmektedir. De Ronde ve ark.'ın 5 farklı denklem ile hesaplanan serbest testosteron ve bioT konsantrasyonlarının kendi içinde karşılaştırmasını yaptığı çalışmada da bizim bulgularımıza benzer şekilde denklemler arası korelasyon katsayıları pozitif yönde ve kuvvetli derecede saptanmıştır (1). Bizim çalışmamızdan farkı; De Ronde ve ark.'nin yaptığı çalışma grubu 40-80 yaş erkekten oluşmakta iken, bizim çalışma grubumuz 20-49 yaş grubu erkekten oluşmaktaydı. Ayrıca, De Ronde ve ark.'nin yaptığı çalışmada ve serbest testosteron hesaplamasında kullanılan denklemleri karşılaştıran başka bir çalışmada, bizim çalışmamızdan farklı olarak serbest testosteron ve bioT yüzdeleri değerlendirilmemiştir (1,56).

Çalışmamızda, $DDsT_{ECLIA}$ ile, ayrı ayrı $sT_{Vermeulen}$, $sT_{Sodergard}$, $sT_{Emadi-Konjin}$ ve $sT_{Wheeler}$ arasında, nmol/L ve % düzeyleri için, MetS'si olmayan grupta pozitif yönde orta derecede korelasyonlar saptanırken; MetS'si olan grupta % düzeyi için yine pozitif yönde orta derecede korelasyonlar, nmol/L düzeyi için ise pozitif yönde zayıf derecede korelasyonlar saptandı. Farklı olarak, $DDsT_{ECLIA}$ ile sT_{Ly} arasında, MetS'si olmayan grupta nmol/L düzeyi için pozitif yönde orta derecede ve % düzeyi için pozitif yönde zayıf derecede korelasyonlar; MetS'si olan grupta nmol/L ve % düzeyleri için pozitif yönde zayıf derecede korelasyonlar saptandı. MetS'si olan grupta, tüm algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ile $DDsT_{ECLIA}$ arasında korelasyonun nmol/L düzeyleri için azalmasına rağmen, % düzeyi için değişmemesinin olası nedeni; MetS'de organizmanın HPT eksenindeki negatif *feedback* yoluyla testosteronun serbest kısmını, azalan total testosteronu rağmen belirli bir düzeyde tutma/kompanse etmesine; MetS'de serbest testosteron ve bioT'nin total testosteronu göre oransal olarak daha fazla azalmasına; veya MetS'de azalan SHBG ile testosteronun SHBG'ye bağlı olmayan ve serbest kısmının SHBG'ye bağlı kısmına

oranının göreceli artışına bağlı olabilir. Ek olarak, MetS’de serum matriks bileşenlerinin düzeylerindeki değişiklikler, hormonların serum proteinlerine bağlanma afinitelerinde değişikliklere neden olabilir. Bir diğer olası neden, serbest testosteron ölçümünde denge diyalizi sonrası ECLIA metoduna olası 2-bromoestradiol interferansı da sonuçlarımızı etkilemiş olabilir. Bu profilin, diyalizat tampondaki serbest testosteron analizlerinin MS tabanlı metotlarla ya da direkt analog testlerle (RIA veya CLIA) gerçekleştirildiği çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması gerekmektedir.



6. SONUÇ

Bu çalışmada literatürde ilk olarak tasarladığımız 96-kuyucuklu denge diyaliz aparatı ve ECLIA metodu ile serum numunelerinde serbest testosteron analizlerinin yapılabileceğini gösterdik. Metot validasyon çalışmalarının sonuçları kabul edilebilir düzeylerde olmasına rağmen kullandığımız metodun, 2-bromoestradiol interferansı ve kalite gereksinimlerini karşılayacak çok daha küçük konsantrasyonlarda analizlerin yapılamaması gibi sınırlamaları vardı. Yaşın karıştırıcı etkisinin giderildiği gruplarda, MetS'si olan grupta, MetS'si olmayan gruba göre total testosteron ve SHBG konsantrasyon ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı düşük olmasına rağmen, dikkate değer bir bölümü referans aralıklarının içerisindeydi (Sırasıyla, %91,3 ve %75,0). Total testosteron ve SHBG için II değerlerinin düşük olması bireyselliğin yüksek olduğunu göstermiş olup, bu sonuçlar klinik değerlendirmelerde total testosteron ve SHBG'nin popülasyon temelli referans aralıklarının kullanımlarında sınırlamalar olduğunu ve RCV değerlerinin kullanımının daha faydalı olabileceğini desteklemektedir. Proteinlere bağlanma sabiti kullanan ve kütle etkisi yasasına dayanan algoritmalarından Emadi-Konjin ve ark. hariç, Vermeulen ve ark., Sodergard ve ark. ile Morris ve ark.'nın önerdiği algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron (nmol/L) ve bioT (nmol/L) ortalamaları MetS'si olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düşük iken; serbest testosteron (%) ve bioT (%) ortalamaları istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Regresyon temelli algoritmalarından Wheeler'in denklemiyle hesaplanan serbest testosteron (nmol/L ve %) ve bioT (nmol/L ve %) ortalamaları, gruplar arasında diğer algoritmalarla benzer profil sergilerken; Ly ve ark.'nin denklemiyle hesaplanan serbest testosteron (%) ortalamaları gruplar arasında istatistiksel anlamlı farklı değildi; serbest testosteron (nmol/L) ortalamaları ise MetS'si olan grupta istatistiksel olarak anlamlı düşüktü. $DDsT_{ECLIA}$ (nmol/L) ortalamaları MetS'si olan grupta düşmesine rağmen istatistiksel olarak anlamlı değilken; $DDsT$ (%) (Ln -transformed) ortalamaları MetS'si olan grupta istatistiksel olarak anlamlı yüksekti. Proteinlere bağlanma sabiti üzerine temellendirilmiş algoritmalarla hesaplanan serbest testosteron ve bioT düzeyleri (nmol/L, %) arasındaki korelasyonların MetS'si olan/olmayan gruplardaki yönleri ve düzeylerinin benzer olması birbirleriyle tutarlıydı. Ancak, regresyon temelli Ly ve ark.'nin önerdiği modellemelerle

hesaplanan serbest testosteron (%) için, MetS'si olan grupta korelasyonların düzeyleri azalmıştı. Gerek karşılaştırma gerekse korelasyon analizleri, Ly ve ark.'nin önerdiği regresyon temelli modellerin MetS'si olan bireylerde serbest testosteron (%) düzeylerinin belirlenmesinde kullanımına dair sınırlamaya işaret etmektedir. Ek olarak, DDsTE_{CLIA} ile, ayrı ayrı sT_{Vermeulen}, sT_{Sodergard}, sT_{Emadi-Konjin} ve sT_{Wheeler} arasında, % düzeyleri için, MetS'si olmayan/olan grupta pozitif yönde orta dereceli korelasyonlar saptanırken; nmol/L düzeyleri için, MetS'si olan grupta zayıf derecede korelasyonlar saptandı. Bu sonuçlar, klinikte serbest testosteron ve bioT'nin nmol/L düzeylerinin tek başına değerlendirilmesinin yeterli olmadığını; % değerlendirmelerinin de önemini vurgulamaktadır. Bu profilin diyalizat tampondaki serbest testosteron analizlerinin MS tabanlı metotlarla ya da direkt analog testlerle (RIA veya CLIA) gerçekleştirildiği çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılması gerekmektedir. Ancak, klinikte serbest testosteron analizlerinde kullanılan CLIA ve RIA gibi metotların ölçüm aralıklarının farklı olması ve izlenebilirlik için farklı referans materyallerin kullanılması metot farklılıklarından kaynaklı % serbest testosteron düzeylerinin belirlenmesinde tutarsızlıklara neden olabileceği dikkate alındığında, serumda total testosteron ve denge diyalizi sonrası serbest testosteron analiz yöntemlerinin aynı olması bu çalışmadaki kullandığımız metodu ön plana çıkarmaktadır. Ancak, metodumuzun sınırlamalarına yönelik, yapılacak ek çalışmalara ihtiyaç vardır.

7. KAYNAKÇA

1. De Ronde W, Van Der Schouw YT, Pols HAP, et al. Calculation of bioavailable and free testosterone in men: A comparison of 5 published algorithms. *Clin Chem*. 2006 Sep;52(9):1777–84.
2. Antonio L, Pauwels S, Laurent MR, et al. Free testosterone reflects metabolic as well as ovarian disturbances in subfertile oligomenorrheic women. *Int J Endocrinol*. 2018 Sep 10;2018:7956951.
3. Rifai N. Reproductive endocrinology and related disorders. In: Tietz Textbook of Laboratory Medicine. Ed. Chiu RWK, Young I, Burnham CD, Wittwer CT. 7th edition. Missouri, USA, Elsevier, 2023; 878.
4. Saez JM, Forest MG, Morera AM, Bertrand J. Metabolic clearance rate and blood production rate of testosterone and dihydrotestosterone in normal subjects, during pregnancy, and in hyperthyroidism. *J Clin Invest* 1972;51:1226–34.
5. Mendel CM. The free hormone hypothesis: a physiologically based mathematical model. *Endocr Rev* 1989;10:232–74.
6. Hammes A, Andreassen TK, Spoelgen R, et al. Role of endocytosis in cellular uptake of sex steroids. *Cell* 2005;122:751– 62.
7. Manni A, Pardridge WM, Cefalu W, et al. Bioavailability of albumin-bound testosterone. *J Clin Endocrinol Metab* 1985;61:705–10.
8. Vermeulen A, Verdonck L, Kaufman JM. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3666 –72.
9. Tremblay RR, Dube JY. Plasma concentrations of free and non-TeBG bound testosterone in women on oral contraceptives. *Contraception*. 1974 Dec;10(6):599-605.

10. Miller KK, Rosner W, Lee H, et al. Measurement of free testosterone in normal women and women with androgen deficiency: comparison of methods. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:525–33.
11. Rosner W. An extraordinarily inaccurate assay for free testosterone is still with us. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:2903.
12. Van Uytvanghe K, Stockl D, Kaufman JM, Fiers T, De Leenheer A, Thienpont LM. Validation of 5 routine assays for serum free testosterone with a candidate reference measurement procedure based on ultrafiltration and isotope dilution-gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Biochem* 2005;38:253– 61.
13. Sodergard R, Backstrom T, Shanbhag V, Carstensen H. Calculation of free and bound fractions of testosterone and estradiol-17 β to human plasma proteins at body temperature. *J Steroid Biochem* 1982;16:801–10.
14. Emadi-Konjin P, Bain J, Bromberg IL. Evaluation of an algorithm for calculation of serum “bioavailable” testosterone (BAT). *Clin Biochem* 2003;36:591– 6.
15. Dunn JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:58 – 68.
16. Burke CW, Anderson DC. Sex-hormone-binding globulin is an oestrogen amplifier. *Nature* 1972;240:38 – 40.
17. Morris PD, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH. A mathematical comparison of techniques to predict biologically available testosterone in a cohort of 1072 men. *Eur J Endocrinol* 2004;151:241–9.
18. Ly LP, Handelsman DJ. Empirical estimation of free testosterone from testosterone and sex hormone-binding globulin immunoassays. *Eur J Endocrinol* 2005;152:471– 8.

19. Ross HA, Meuleman EJ, Sweep FC. A simple method for estimating equilibrium constants for serum testosterone binding resulting in an optimal free testosterone index for use in elderly men. *Clin Chem Lab Med* 2005;43:613– 6.
20. Wheeler MJ. The determination of bio-available testosterone. *Ann Clin Biochem.* 1995 Jul;32:345-57.
21. Avvakumov GV, Cherkasov A, Muller YA, Hammond GL. Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Mol Cell Endocrinol.* 2010 Mar 5;316(1):13-23.
22. Vermeulen A, Kaufman JM, Giagulli VA. Influence of some biological indexes on sex hormone-binding globulin and androgen levels in aging or obese males. *J Clin Endocrinol Metab* 1996;81:1821– 6.
23. Muller M, den Tonkelaar I, Thijssen JHH, Grobbee DE, van der Schouw YT. Endogenous sex hormones in men aged 40 – 80 years. *Eur J Endocrinol* 2003;149:583–9.
24. Longcope C, Feldman HA, McKinlay JB, Araujo AB. Diet and sex hormone-binding globulin. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85:293– 6.
25. Laaksonen, DE, Niskanen, L, Punnonen K, et al. Testosterone and sex hormone-binding globulin predict the metabolic syndrome and diabetes in middle-aged men. *Diabetes Care.* 2004 May;27(5):1036-41.
26. Kupelian V, Hayes FJ, Link CL, Rosen R, McKinlay JB. Inverse association of testosterone and the metabolic syndrome in men is consistent across race and ethnic groups. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Sep;93(9):3403-10.
27. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study. *Eur J Endocrinol.* 2003 Dec;149(6):601-8.
28. Wallace IR, McKinley MC, Bell PM, Hunter SJ. Sex hormone binding globulin and insulin resistance. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2013 Mar;78(3):321-9.

29. Guyton&Hall. Erkeklerde üreme işlevleri ve hormonal işlevler (ve pineal bezin işlevleri). In: Tıbbi Fizyoloji. Ed. Çavuşoğlu H. 11. basım. Elsevier, 2007; 1003-7.
30. Ide H. The impact of testosterone in men's health. *Endocr J.* 2023 Jul 28;70(7):655-662.
31. Ho CKM. Testosterone testing in adult males. *Malays J Pathol.* 2011 Dec;33(2):71-81.
32. Testosterone. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Testosterone> adresinden 28.02.2024 tarihinde erişilmiştir.
33. Guyton ve Hall. Erkeklerde üreme işlevleri ve hormonlara bağlı işlevler (ve pineal bezin işlevleri). In: Tıbbi Fizyoloji. Ed. Çağlayan Yeğen B. 12. baskı. United Kingdom, Elsevier, 2013; 983.
34. Grinspon RP, Bergadá I, Rey RA. Male Hypogonadism and Disorders of Sex Development. *Front Endocrinol (Lausanne).* 2020 Apr 15;11:211.
35. Bain J. The many faces of testosterone. *Clin Interv Aging.* 2007;2(4):567-76.
36. Morley JE, Perry HM. Androgen treatment of male hypogonadism in older males. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2003 Jun;85(2-5):367-73.
37. Wang C, Swerdloff RS, Iranmanesh A, et al. Transdermal testosterone gel improves sexual function, mood, muscle strength and body composition parameters in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2000 Aug;85(8):2839-53.
38. Sinha-Hikim I, Cornford M, Gaytan H, Lee ML, Bhasin S. Effects of testosterone supplementation on skeletal muscle fiber hypertrophy and satellite cells in community – dwelling older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Aug;91(8):3024-33.
39. Wang C, Cunningham G, Dobs A, et al. Long-term testosterone gel (AndroGel) treatment maintains beneficial effects on sexual function and mood, lean and fat

- mass, and bone mineral density in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004 May;89(5):2085-98.
40. Davey RA, Morris HA. Effects of estradiol and dihydrotestosterone on osteoblast gene expression in osteopenic ovariectomized rats. *J Bone Miner Metab.* 2005;23(3):212-8.
 41. Tivesten A, Moverare-Skrtic S, Chagin A, et al. Additive protective effects of estrogen and androgen treatment on trabecular bone in ovariectomized rats. *J Bone Miner Res.* 2004 Nov;19(11):1833-9.
 42. Fink HA, Ewing SK, Ensrud KE, et al. Association of testosterone and estradiol deficiency with osteoporosis and rapid bone loss in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006 Oct;91(10):3908-15.
 43. Adler RA. Epidemiology and pathophysiology of osteoporosis in men. *Curr Osteoporos Rep.* 2006 Sep;4(3):110-5.
 44. Seeman E. Osteoporosis in men. *Baillieres Clin Rheumatol.* 1997 Aug;11(3):613-29.
 45. Shahidi NT. Androgens and erythropoiesis. *N Engl J Med.* 1973 Jul 12;289(2):72-80.
 46. Bhatia V, Chaudhuri A, Tomar R, Dhindsa S, Ghanim H, Dandona P. Low testosterone and high C-reactive protein concentrations predict low hematocrit in type 2 diabetes. *Diabetes Care.* 2006 Oct;29(10):2289-94.
 47. Aydın B, Winters SJ. Sex hormone-binding globulin in children and adolescents. *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 2016 Mar 5;8(1):1-12.
 48. Elecsys SHBG. Ref. 03052001190. v15.0 Türkçe. Cobas, Roche Diagnostics GmbH.
 49. Moman RN, Gupta N, Varacallo M. Physiology, Albumin. In: StatPearls. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK459198/> adresinden 07.03.2024 tarihinde erişilmiştir.

50. Yuwen P, Chen W, Lv H, et al. Albumin and surgical site infection risk in orthopaedics: a meta-analysis. *BMC Surg.* 2017 Jan 16;17(1):7.
51. Annane D, Siami S, Jaber S, et al. Effects of fluid resuscitation with colloids vs crystalloids on mortality in critically ill patients presenting with hypovolemic shock: the CRISTAL randomized trial. *JAMA.* 2013 Nov 6;310(17):1809-17.
52. Rothschild MA, Oratz M, Schreiber SS. Serum albumin. *Hepatology.* 1988 Mar-Apr;8(2):385-401.
53. Chang R, Holcomb JB. Choice of fluid therapy in the initial management of sepsis, severe sepsis, and septic shock. *Shock.* 2016 Jul;46(1):17-26.
54. Friedman AN, Fadem SZ. Reassessment of albumin as a nutritional marker in kidney disease. *J Am Soc Nephrol.* 2010 Feb;21(2):223-30.
55. Trost LW, Mulhall JP. Challenges in testosterone measurement, data interpretation, and methodological appraisal of interventional trials. *J Sex Med.* 2016 Jul;13(7):1029-46.
56. Ho CK, Stoddart M, Walton M, Anderson RA, Beckett GJ. Calculated free testosterone in men: comparison of four equations and with free androgen index. *Ann Clin Biochem.* 2006 Sep;43(Pt 5):389-97.
57. Rifai N. Reproductive endocrinology and related disorders. In: Tietz Textbook of Laboratory Medicine. Ed. Chiu RWK, Young I, Burnham CD, Wittwer CT. 7th edition. Missouri, USA, Elsevier, 2023; 880.
58. Casals G, Costa RF, Rull EU, et al. Recommendations for the measurement of sexual steroids in clinical practice. A position statement of SEQC^{ML}/SEEN/SEEP. *Adv Lab Med.* 2023 Mar 9;4(1):52-69.
59. Elecsys Testosterone II. Ref. 08946353190. v1.0 Türkçe. Cobas, Roche Diagnostics GmbH.
60. Dalmiglio C, Bombardieri A, Mattii E, et al. Analytical performance of free testosterone calculated by direct immunoluminometric method compared with

Vermeulen equation: results from a clinical series. *Hormones (Athens)*. 2024 Jun;23(2):313-319.

61. Fiers T, Wu F, Moghetti P, Vanderschueren D, Lapauw B, Kaufman JM. Reassessing free-testosterone calculation by liquid chromatography-tandem mass spectrometry direct equilibrium dialysis. *J Clin Endocrinol Metab*. 2018 Jun 1;103(6):2167-2174.
62. Free analyte immunoassay. In: *The Immunoassay Handbook. Theory and Applications of Ligand Binding, ELISA and Related Techniques*. Ed. Wild D. 4th edition. Elsevier, 2013; 128-9.
63. Herbst ZM, Shibata S, Fan E, Gelb MH. An inexpensive, in-house-made, microdialysis device for measuring drug-protein binding. *ACS Med Chem Lett*. 2017 Sep 28;9(3):279-282.
64. Alberti SG, Zimmet P, Shaw J, Grundy SM. In: *The IDF Consensus Worldwide Definition Of The Metabolic Syndrome*. International Diabetes Federation, 2006; 10-1.
65. Cunningham GR. Testosterone and metabolic syndrome. *Asian J Androl*. 2015 Mar-Apr;17(2):192-6.
66. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8.
67. Fui MNT, Dupuis P, Grossmann M. Lowered testosterone in male obesity: Mechanisms, morbidity and management. *Asian J Androl*. 2014 Mar-Apr;16(2):223-31.
68. Mah PM, Wittert GA. Obesity and testicular function. *Mol Cell Endocrinol*. 2010 Mar 25;316(2):180-6.

69. Travison TG, Araujo AB, Kupelian V, O'Donnell AB, McKinlay JB. The relative contributions of aging, health, and lifestyle factors to serum testosterone decline in men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Feb;92(2):549-55.
70. Bhasin S, Cunningham GR, Hayes FJ, et al. Testosterone therapy in men with androgen deficiency syndromes: an Endocrine Society clinical practice guideline. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Jun;95(6):2536-59.
71. Tajar A, Forti G, O'Neill TW, et al. Characteristics of secondary, primary, and compensated hypogonadism in aging men: evidence from the European Male Ageing Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010 Apr;95(4):1810-8.
72. Wu FCW, Tajar A, Pye SR, et al. Hypothalamic-pituitary-testicular axis disruptions in older men are differentially linked to age and modifiable risk factors: the European Male Aging Study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2008 Jul;93(7):2737-45.
73. Allan CA, Strauss BJ, Burger HG, Forbes EA, McLachlan RI. The association between obesity and the diagnosis of androgen deficiency in symptomatic ageing men. *Med J Aust.* 2006 Oct 16;185(8):424-7.
74. Grossmann M. Low testosterone in men with type 2 diabetes: significance and treatment. *J Clin Endocrinol Metab.* 2011 Aug;96(8):2341-53.
75. Blouin K, Richard C, Brochu G, et al. Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. *J Endocrinol.* 2006 Dec;191(3):637-49.
76. Blouin K, Despres JP, Couillard C, et al. Contribution of age and declining androgen levels to features of the metabolic syndrome in men. *Metabolism.* 2005 Aug;54(8):1034-40.
77. Kaplan SA, Meehan AG, Shah A. The age related decrease in testosterone is significantly exacerbated in obese men with the metabolic syndrome. What are the implications for the relatively high incidence of erectile dysfunction observed in these men? *J Urol.* 2006 Oct;176(4 Pt 1):1524-7; discussion 1527-8.

78. Rodriguez A, Muller DC, Metter EJ, et al. Aging, androgens, and the metabolic syndrome in a longitudinal study of aging. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 Sep;92(9):3568-72.
79. Traish AM, Guay A, Feeley R, Saad F. The dark side of testosterone deficiency: I. metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl.* 2009 Jan-Feb;30(1):10-22.
80. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, et al. The metabolic syndrome and smoking in relation to hypogonadism in middle-aged men: a prospective cohort study. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005 Feb;90(2):712-9.
81. Makhsida N, Shah J, Yan G, Fisch H, Shabsigh R. Hypogonadism and metabolic syndrome: implications for testosterone therapy. *J Urol.* 2005 Sep;174(3):827-34.
82. Chen RYT, Wittert GA, Andrews GR. Relative androgen deficiency in relation to obesity and metabolic status in older men. *Diabetes Obes Metab.* 2006 Jul;8(4):429-35.
83. Seidell JC, Bjorntorp P, Sjostrom L, Kvist H, Sannerstedt R. Visceral fat accumulation in men is positively associated with insulin, glucose, and C-peptide levels, but negatively with testosterone levels. *Metabolism.* 1990 Sep;39(9):897-901.
84. Osuna JA, Gomez-Perez R, Arata-Bellabarba G, Villaroel V. Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch Androl.* 2006 Sep-Oct;52(5):355-61.
85. Svartberg J. Epidemiology: testosterone and the metabolic syndrome. *Int J Impot Res.* 2007 Mar-Apr;19(2):124-8.
86. Svartberg J, von Mühlen D, Sundsfjord J, Jorde R. Waist circumference and testosterone levels in community dwelling men. The Tromsø study. *Eur J Epidemiol.* 2004;19(7):657-63.

87. Svartberg J, von Mühlen D, Schirmer H, Barrett-Connor E, Sundfjord J, Jorde R. Association of endogenous testosterone with blood pressure and left ventricular mass in men. The Tromsø Study. *Eur J Endocrinol*. 2004 Jan;150(1):65-71.
88. Pasquali R, Macor C, Vicennati V, et al. Effects of acute hyperinsulinemia on testosterone serum concentrations in adult obese and normal-weight men. *Metabolism*. 1997 May;46(5):526-9.
89. Pasquali R, Casimirri F, Cantobelli S, et al. Effect of obesity and body fat distribution on sex hormones and insulin in men. *Metabolism*. 1991 Jan;40(1):101-4.
90. Isidori AM, Caprio M, Strollo F, et al. Leptin and androgens in male obesity: evidence for leptin contribution to reduced androgen levels. *J Clin Endocrinol Metab*. 1999 Oct;84(10):3673-80.
91. de Boer H, Verschoor L, Ruinemans-Koerts J, Jansen M. Letrozole normalizes serum testosterone in severely obese men with hypogonadotropic hypogonadism. *Diabetes Obes Metab*. 2005 May;7(3):211-5.
92. Dhindsa S, Furlanetto R, Vora M, Ghanim H, Chaudhuri A, Dandona P. Low estradiol concentrations in men with subnormal testosterone concentrations and type 2 diabetes. *Diabetes Care*. 2011 Aug;34(8):1854-9.
93. Huhtaniemi IT, Tajar A, Lee DM, et al. Comparison of serum testosterone and estradiol measurements in 3174 European men using platform immunoassay and mass spectrometry; relevance for the diagnostics in aging men. *Eur J Endocrinol*. 2012 Jun;166(6):983-91.
94. Grossmann M, Gianatti EJ, Zajac JD. Testosterone and type 2 diabetes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2010 Jun;17(3):247-56.
95. D'Amico AV, Denham JW, Crook J, et al. Influence of androgen suppression therapy for prostate cancer on the frequency and timing of fatal myocardial infarction. *J Clin Oncol*. 2007 Jun 10;25(17):2420-5.

96. Braga-Basaria M, Dobs AS, Muller DC, et al. Metabolic syndrome in men with prostate cancer undergoing long-term androgen-deprivation therapy. *J Clin Oncol*. 2006 Aug 20;24(24):3979-83.
97. Swerdloff RS, Wang C. Three-year follow-up of androgen treatment in hypogonadal men: preliminary report with testosterone gel. *Aging Male*. 2003 Sep;6(3):207-11.
98. Katznelson L, Finkelstein JS, Schoenfeld DA, Rosenthal DI, Anderson EJ, Klibanski A. Increase in bone density and lean body mass during testosterone administration in men with acquired hypogonadism. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Dec;81(12):4358-65.
99. Tenover JS. Effects of testosterone supplementation in the aging male. *J Clin Endocrinol Metab*. 1992 Oct;75(4):1092-8.
100. Kapoor D, Goodwin E, Channer KS, Jones TH. Testosterone replacement therapy improves insulin resistance, glycaemic control, visceral adiposity and hypercholesterolaemia in hypogonadal men with type 2 diabetes. *Eur J Endocrinol*. 2006 Jun;154(6):899-906.
101. Basu R, Man CD, Campioni M, et al. Effect of 2 years of testosterone replacement on insulin secretion, insulin action, glucose effectiveness, hepatic insulin clearance, and postprandial glucose turnover in elderly men. *Diabetes Care*. 2007 Aug;30(8):1972-8.
102. Sartorius G, Spasevska S, Idan A, et al. Serum testosterone, dihydrotestosterone and estradiol concentrations in older men self-reporting very good health: the healthy man study. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2012 Nov;77(5):755-63.
103. Matthews DR, Hosker JP, Rudenski AS, Naylor BA, Treacher DF, Turner RC. Homeostasis model assessment: Insulin resistance and β -cell function from fasting plasma glucose and insulin concentrations in man. *Diabetologia*. 1985 Jul;28(7):412-9.

104. Grundy SM, Brewer HB Jr, Cleeman JI, Smith SC Jr, Lenfant C. Definition of metabolic syndrome: Report of the National Heart, Lung, and Blood Institute/American Heart Association conference on scientific issues related to definition. *Circulation*. 2004 Jan 27;109(3):433-8.
105. Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. Executive Summary of The Third Report of The National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, And Treatment of High Blood Cholesterol In Adults (Adult Treatment Panel III). *JAMA*. 2001 May 16;285(19):2486-97.
106. Thienpont L, Bunk DM, Christofides ND, et al. Measurement of free thyroid hormones; approved guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute. C45-A, Vol.24, No.31, October 2004.
107. Van Houcke SK, Van Uytvanghe K, Shimizu E, Tani W, Umemoto M, Thienpont LM. IFCC international conventional reference procedure for the measurement of free thyroxine in serum: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) Working Group for Standardization of Thyroid Function Tests (WG-STFT). *Clin Chem Lab Med*. 2011 Aug;49(8):1275-81.
108. Nelson JC, Tomei RT. Direct determination of free thyroxin in undiluted serum by equilibrium dialysis/radioimmunoassay. *Clin Chem*. 1988 Sep;34(9):1737-44.
109. Sinha-Hikim I, Arver S, Beall G, et al. The use of a sensitive equilibrium dialysis method for the measurement of free testosterone levels in healthy, cycling women and in human immunodeficiency virus-infected women. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998 Apr;83(4):1312-8.
110. Yue B, Rockwood AL, Sandrock T, La'ulu SL, Kushnir MM, Meikle AW. Free thyroid hormones in serum by direct equilibrium dialysis and online solid-phase extraction-liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2008 Apr;54(4):642-51.

111. Banker MJ, Clark TH, Williams JA. Development and validation of a 96-well equilibrium dialysis apparatus for measuring plasma protein binding. *J Pharm Sci.* 2003 May;92(5):967-74.
112. Pinger CW, Heller AA, Spence DM. A printed equilibrium dialysis device with integrated membranes for improved binding affinity measurements. *Anal Chem.* 2017 Jul 18;89(14):7302-06.
113. Curran RE, Claxton CR, Hutchison L, Harradine PJ, Martin IJ, Littlewood P. Control and measurement of plasma pH in equilibrium dialysis: influence on drug plasma protein binding. *Drug Metab Dispos.* 2011 Mar;39(3):551-7.
114. Greenblatt DJ, Sellers EM, Koch-Weser J. Importance of protein binding for the interpretation of serum or plasma drug concentrations. *J Clin Pharmacol.* 1982 May-Jun;22(5-6):259-63.
115. McEnroe RJ, Durham AP, Goldford MD, et al. Evaluation of precision of quantitative measurement procedures; approved guideline - third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP05-A3, Vol.34, No.13, October 2014.
116. Budd JR, Durham AP, Gwise TE, et al. Measurement procedure comparison and bias estimation using patient samples; approved guideline - third edition. Clinical and Laboratory Standards Institute. EP09-A3, Vol.33, No.11, August 2013.
117. <https://datainnovations.com/allowable-total-error-table/> adresinden 05.08.2024 tarihinde erişilmiştir.
118. Oosterhuis WP. Gross overestimation of total allowable error based on biological variation. *Clin Chem.* 2011 Sep;57(9):1334-6.
119. Gundogan K, Bayram F, Gedik V, et al. Metabolic syndrome prevalence according to ATP III and IDF criteria and related factors in Turkish adults. *Arch Med Sci.* 2013 Apr 20;9(2):243-53.

120. Meriño-Ibarra E, Cenarro A, Martín P, et al. Sensibilidad y especificidad de los criterios del síndrome metabólico para el diagnóstico de insulinoresistencia en la población española. *Med Clin (Barc)*. 2007;128(5):168-71.
121. van Liempd S, Morrison D, Sysmans L, Nelis P, Mortishire-Smith R. Development and validation of a higher-throughput equilibrium dialysis assay for plasma protein binding. *J Lab Autom*. 2011 Feb;16(1):56-67.
122. Ross MJ, Shimelis O. Comparison of SupelTM BioSPME 96-Pin device to rapid equilibrium dialysis technique for determination of plasma protein binding. Supelco Analytical Products, Merck.
123. Waters NJ, Jones R, Williams G, Sohal B. Validation of a rapid equilibrium dialysis approach for the measurement of plasma protein binding. *J Pharm Sci*. 2008 Oct;97(10):4586-95.
124. Christ-Crain M, Meier C, Huber P, Zimmerli L, Trummler M, Müller B. Comparison of different methods for the measurement of serum testosterone in the aging male. *Swiss Med Wkly*. 2004 Apr 3;134(13-14):193-7.
125. Kacker R, Hornstein A, Morgentaler A. Free testosterone by direct and calculated measurement versus equilibrium dialysis in a clinical population. *Aging Male*. 2013 Dec;16(4):164-8.
126. <https://www.cdc.gov/clinical-standardization-programs/php/hormones/adresinden> 09.08.2024 tarihinde erişilmiştir.
127. Godinho C, Rodrigues I. Comparison of free testosterone results by a radioimmunoassay and a chemiluminescent assay. 19th European Congress of Endocrinology, Lisbon, Portugal. 20 - 23 May 2017; EP795.
128. Maglumi free testosterone (CLIA). V9.1, 2017-11, Snibe Diagnostics.
129. Standard Reference Material® 971a Hormones in Frozen Human Serum. National Institute of Standards and Technology. 27 March 2023.
130. Thienpont LM, De Brabandere VI, Stöckl D, De Leenherr AP. Use of cyclodextrins for prepurification of progesterone and testosterone from human

- serum prior to determination with isotope dilution-gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*. 1994 Nov 15;66(22):4116-9.
131. Jandreski MA. Chemiluminescence technology in immunoassays. *Laboratory Medicine*. 1998 Sep, Vol. 29, Issue 9, Pages 555–60.
132. Fritz KS, McKean AJS, Nelson JC, Wilcox RB. Analog-based free testosterone test results linked to total testosterone concentrations, not free testosterone concentrations. *Clin Chem*. 2008 Mar;54(3):512-6.
133. Sato Y, Tanda H, Kato S, et al. Serum testosterone levels using the radioimmunoassay method in healthy Japanese male volunteers. *Reprod Med Biol*. 2006;5(1):37–41.
134. Gruschke A, Kuhl H. Validity of radioimmunological methods for determining free testosterone in serum. *Fertil Steril*. 2001 Sep;76(3):576-82.
135. Elecsys Cortisol II. Ref. 06687733190. v7.0 Türkçe. Cobas, Roche Diagnostics GmbH.
136. İbiş MA, Yaman Ö. Evaluation of Male Infertility. *Duzce Med J*, 2022;24(S1):1-6.
137. Çokluk E. Klinik biyokimya da biyolojik varyasyon: referans değişim değeri ve bireysellik indeksi. *Turk J Clin Lab* 2019; 10: 526-32.
138. Ricos C, Cava F, García-Lario JV, et al. The reference change value: a proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Clin Lab Invest*. 2004;64(3):175-84.
139. Fraser CG. Biological variation in clinical chemistry. An update: collated data, 1988-1991. *Arch Pathol Lab Med*. 1992 Sep;116(9):916-23.
140. <https://biologicalvariation.eu/> internet adresinden 06.08.2024 tarihinde erişilmiştir.
141. Ross MJ. Sample preparation of serum prior to determination of free testosterone. Supelco Analytical Products, Merck.

142. WHO International Standard 2nd International Standard for Sex Hormone Binding Globulin NIBSC code: 08/266 Instructions for use (Version 2.0, Dated 28/03/2013). Medicines & Healthcare Products Regulatory Agency. National Institute for Biological Standards and Control.
143. Katabami T, Kato H, Asahina T, et al. Serum free testosterone and metabolic syndrome in Japanese men. *Endocr J*. 2010;57(6):533-9.
144. Haring R, Völzke H, Felix SB, et al. Prediction of metabolic syndrome by low serum testosterone levels in men: results from the study of health in Pomerania. *Diabetes*. 2009 Sep;58(9):2027–31.
145. Chubb SAP, Hyde Z, Almeida OP, et al. Lower sex hormone-binding globulin is more strongly associated with metabolic syndrome than lower total testosterone in older men: The Health in Men Study. *Eur J Endocrinol*. 2008 Jun;158(6):785–92.
146. Maggio M, Lauretani F, Ceda GP, et al. Association between hormones and metabolic syndrome in older Italian men. *J Am Geriatr Soc*. 2006 Dec;54(12):1832–8.
147. Livingston M, Kalansooriya A, Hartland AJ, Ramachandran S, Heald A. Serum testosterone levels in male hypogonadism: why and when to check—A review. *Int J Clin Pract*. 2017;71:e12995.
148. Katsuki A, Sumida Y, Murashima S, et al. Acute and chronic regulation of serum sex hormone-binding globulin levels by plasma insulin concentrations in male noninsulin-dependent diabetes mellitus patients. *J Clin Endocrinol Metab*. 1996 Jul;81(7):2515-9.
149. Plymate SR, Matej LA, Jones RE, Friedl KE. Inhibition of sex hormone-binding globulin production in the human hepatoma (Hep G2) cell line by insulin and prolactin. *J Clin Endocrinol Metab*. 1988 Sep;67(3):460-4.
150. Lee IR, Dawson SA, Wetherall JD, Hahnel R. Sex hormone-binding globulin secretion by human hepatocarcinoma cells is increased by both estrogens and androgens. *J Clin Endocrinol Metab*. 1987 Apr;64(4):825-31.



8. EKLER

EK-A: Hasta Veri Toplama Formu

ARAŞTIRMANIN ADI	Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesans İmmünölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi	
PROTOKOL NO:		
TARİH:		
ADI/SOYADI:		
TELEFON:		
YAŞ:	BOY:	KİLO:
BEL ÇEVRESİ:	SKB:	DKB:
METABOLİK BİR HASTALIĞI VAR MI? (E) (H)		
EVET İSE NE?		SÜRESİ:
DEVAM:		
REÇETE EDİLMİŞ İLAÇ ALIYOR MU? (E) (H)		
EĞER EVET İSE NE?		SÜRESİ:
DEVAM:		
EN SON İLAÇ NE ZAMAN ALDI? ADI:		
SİĞARA KULLANIYOR MU? (E) (H)		
EĞER EVET İSE NE ŞEKİLDE? NE KADAR?		SÜRESİ:
ALKOL KULLANMA ALIŞKANLIĞI VAR MI? (E) (H)		
EĞER EVET İSE NE ŞEKİLDE? HANGİ SIKLIKTA?		SÜRESİ:
EN SON ALKOL NE ZAMAN ALDINIZ?		
PARAPROTEİNEMİ VE/VEYA KRİYOGLOBULİNEMİSİ VAR MI? (E) (H)		
OTO-İMMÜN HASTALIĞI VAR MI? (E) (H)		
HİPOTİROİDİ/HİPERTİRODİ VAR MI? (E) (H)		
HİRSUTİZM VAR MI? (E) (H)		
ALOPESİ VAR MI? (E) (H)		
AKROMEGALİ VAR MI? (E) (H)		
ANTİ-EPİLEPTİK KULLANIYOR MU? (E) (H)		
KARACİĞER HASTALIĞI VAR MI? (E) (H)		
HİPOGONADİZMİ VAR MI? (E) (H)		
KROMOZOM ANOMALİSİ (KLINEFELTER SENDROMU GİBİ) VAR MI? (E) (H)		

EK- B: Etik Kurul Onayı



Tarih: 14/12/2022 09:34
Sayı: E-91120229-300-0811020
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu



0000811020

T.C.
ORDU ÜNİVERSİTESİ
KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Tarihi	Toplantı Sayısı	Toplantı Saati	Karar Sayısı
09.12.2022	24	15:30	281

Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu, “Klinik Araştırmalar ve Biyoyararlanım/Biyoesdeğerlik Çalışmaları Etik Kurullarının Standart Çalışma Yöntemi Esasları” 11.2.1 maddesi uyarınca Etik Kurul Başkanı Prof. Dr. Ahmet KAYA başkanlığında toplanarak aşağıdaki kararları almıştır.

KARAR NO: 2022/281

Sorumlu yürütücü Doç. Dr. Murat USTA’nın, KAEK 302 Nolu başvurusunun değerlendirilmesi sonucu “**Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesans İmmünölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi**” başlıklı araştırmasının Giresun İl Sağlık Müdürlüğü İzni onayı sonrası başlanabileceğine toplantıya katılanların oy birliği ile karar verildi.

e-imzalıdır
Prof. Dr. Ahmet KAYA
Ordu Üniversitesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Başkanı

EK- C: Bilgilendirilmiş Olur Formu

BİLGİLENDİRİLMİŞ OLUR FORMU

Bu katıldığınız çalışma bilimsel bir araştırma olup, araştırmanın adı **Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesans İmmünoölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi**'dir. Bu araştırmanın amacı; bu çalışmada, NCEP-ATPIII ve IDF'ye göre metabolik sendromu olan ve olmayan 20-49 yaş erkek gönüllülerde serbest testosteron ve biyoyararlı testosteron hesaplamalarında kullanılan formüllerin sonuçları ile serbest testosteron ölçümünde altın standart denge diyaliz yöntemi sonuçlarının karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu çalışmada size herhangi bir tedavi uygulanmayacak olup, **venöz kan alma işlemi** vacutainer iğne seti yöntemi kullanılarak uygulanacaktır. Bu çalışmada yer almanız öngörülen süre 10 ay olup, çalışmada yer alacak gönüllülerin sayısı 200 'dür.

Bu çalışmada sizin için **kan alma işlemi sırasında dokuya kan sızma ve kan alma yerinde morluklar** gibi riskler ve rahatsızlıklar söz konusu olabilir; ancak sizin için beklenen yararlar yoktur.

Bu araştırmanın tedavi uygulamaları bulunmamaktadır.

Araştırma sırasında sizi ilgilendirebilecek herhangi bir gelişme olduğunda, bu durum size veya yasal temsilcinize derhal bildirilecektir. Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun ya da diğer rahatsızlıklarınız için 0454 3102020 – 1606 no.lu telefondan Dr. Engin IŞIK'a başvurabilirsiniz.

Bu çalışmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır; ayrıca, bu araştırma kapsamındaki bütün muayene, tetkik, testler ve tıbbi bakım hizmetleri için sizden veya bağlı olduğunuz sosyal güvenlik kuruluşundan hiçbir ücret istenmeyecektir. Bu çalışmaya destek için için Giresun Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi ve/veya TÜBİTAK Bilimsel Araştırma Projelerini Destekleme Programına başvurulacaktır.

Bu çalışmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır. Çalışmada yer almayı reddedebilirsiniz ya da herhangi bir aşamada çalışmadan ayrılabilirsiniz; bu durum herhangi bir cezaya ya da sizin yararlarınıza engel duruma yol açmayacaktır. Biyotıp Sözleşmesi VII Bölüm Madde 22'de belirtildiği üzere "Bir müdahale sırasında insan vücudunun herhangi bir parçası alındığında bu parça yalnızca uygun bilgilendirme ve muvafakat alma işlemlerini uyulduğu takdirde çıkarılma amacından başka bir amaç için saklanabilir ve kullanılabilir". Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır; çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda, sizle ilgili tıbbi veriler de gerekirse bilimsel amaçla kullanılabilir. Çalışma kapsamında alınan biyolojik numuneler ileride yapılması planlanan çalışmalarda da kullanılabilir.

Bu çalışma için Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nden kurum izni (E-53593568-929 sayılı yazı), Ordu Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu onayı (09.12.2022 tarih ve 281 sayılı yazı) ve Giresun Valiliği İl Sağlık Müdürlüğü izni (E-41544352-799-206912606 sayılı yazı) alınmıştır.

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere veri analizlerinden sonra ulaşabilirsiniz.

Çalışmaya Katılma Onayı:

Yukarıda yer alan ve çalışmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırıcıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu çalışmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formun imzalı bir kopyası bana verilecektir.

Gönüllünün, Adı-Soyadı: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:	Açıklamaları yapan araştırmacının, Adı-Soyadı: Engin IŞIK Görevi: Araştırma Görevlisi Doktor Adresi: Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tel.-Faks: 0454 3102020 - 1606 Tarih ve İmza:
	Olur alma işlemine başından sonuna kadar tanıklık eden kuruluş görevlisinin/görüşme tanığının, Adı-Soyadı: Görevi: Adresi: Tel.-Faks: Tarih ve İmza:

EK-D: Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi Kurum İzni



T.C.
GİRESUN VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü
Giresun Eğitim Ve Araştırma Hastanesi

GİRESUN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
GİRESUN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
06.12.2022 12:09 - E-53593568 - 929 - 9160



Sayı : E-53593568-929
Konu : Doç.Dr. Murat USTA (Araştırma
İzin Hk.)

Sayın: Doç. Dr. Murat USTA
(Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı)

İlgi : 02/12/2022 tarih ve 10462 sayılı yazı dilekçesi.

İlgi sayılı dilekçeniz ile "Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesas İmmünölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi" konulu çalışmanız Kişisel Verilerin Korunması Kanunu'nun mahremiyetinin korunması ile gizliliğe yönelik ilgili maddeleri dikkate alınarak, etik kurul onayı alındıktan sonra etik kurallar ve bilgi güvenliğine dikkat edilmesi koşullarıyla uygun bulunmuştur.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç. Dr. Fazıl KULAKLI
Başhekim

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu: c94d9cf2-c18f-4be1-ac62-176b96062862 Belge Doğrulama Adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/saglik-bakanligi-ebvs>

Giresun Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Bilgi için: Özlem EROL

Telefon: Faks No:

TIBBİ SEKRETER



EK-E: Giresun İl Sağlık Müdürlüğü Kurum İzni



T.C.
GİRESUN VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü



Sayı : E-41544352-799-206912606
Konu : Araştırma İzin Talebi (Doç Dr. Murat USTA)

12.01.2023

GİRESUN EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ

İlgi : 09.01.2023 tarihli ve E-53593568-929-206520369 sayılı yazınız.

İlgi tarihli ve sayılı yazınıza istinaden; Tıbbi Biyokimya Uzmanı Doç. Dr. Murat USTA' nın sorumluluğunda "Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesans İmmünölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi" konulu çalışmasını ilgi yazı ekindeki Araştırma Çalışmaları Başvuru Formunda adı soyadı belirtilen yardımcı araştırmacılar ile birlikte 01 Şubat 2023-30 Kasım2023 tarihleri arasında hastanenizde yapmaları Komisyonumuzca uygun mütalaa edilmiştir.

Söz konusu verilerin kullanılmasında kişisel verilere/özel hayata özen gösterilmesi ve çalışma sonuçlarının tarafımıza gönderilmesi hususunu,

Bilgilerinize rica ederim.

Mehmet ŞAHİN
İl Sağlık Müdürü a.
Destek Hizmetleri Başkanı

Ek: Komisyon Kararı (1 Adet)

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge doğrulama kodu: 16296FC3-73AF-456E-B5C5-A46739507E09

Belge doğrulama adresi: <https://www.turkiye.gov.tr/saglik-bakanligi-ebys>

Osmaniye Mah. Hastane Sok. No:11 GİRESUN 28100

Telefon No: 04542602000 Faks No : 04542602007

e-Posta: giresun@saglik.gov.tr İnternet Adresi: <https://giresunism.saglik.gov.tr/>

Bilgi için: Hüseyin BİÇAKÇI
Veri Hazırlama Ve Kontrol İşlt.



T.C.
GİRESUN VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü



KOMİSYON KARARI

İlimiz Eğitim ve Araştırma Hastanesi' nin 09/01/2023 tarihli ve E-53593568-929-206520369 sayılı yazısına istinaden; Tıbbi Biyokimya Uzmanı Doç. Dr. Murat USTA' nın sorumluluğunda "Biyoyararlı ve Serbest Testosteron için Hesaplamalarda Kullanılan Algoritmalar ile Denge Diyalizi/Kemilüminesans İmmünölçüm Yöntemi Arasındaki Farkların Metabolik Sendrom Profilleri ile Değerlendirilmesi" konulu çalışmasını ilgi yazı ekindeki Araştırma Çalışmaları Başvuru Formunda adı soyadı belirtilen yardımcı araştırmacılar ile birlikte 01 Şubat 2023-30 Kasım 2023 tarihleri arasında Müdürlüğümüze bağlı Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yapmaları Komisyonumuzca uygun mütalaa edilmiştir.

D.
Doç. Dr. Muhammet BULUT
İl Sağlık Müdürü

ÜYELER

Mehmet ŞAHİN
Destek Hizmetleri Başkanı

Uzm. Dr. Cevriye Ceyda KOLAYLI
Halk Sağlığı Uzmanı

Dr. Hamit ÖZTÜRK
Kamu Hastaneleri Hizmetleri Başkan Yrd.

Ahmet AYDIN
Şube Müdürü