



T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA EğİTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ

TİBBİ BİYOKİMYA KLİNİğİ

SAğLIKLI ERİşKİN BİREYLERDE TÜKÜRÜK
KORTİZOLÜNÜN BİYOLOJİK VARYASYONUNUN
DEğERLENDİRİLMESİ

Dr. Fatih SERİN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2023



T.C. SAğLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
ANKARA EğİTİM VE ARAşTIRMA HASTANESİ

TİBBİ BİYOKİMYA KLİNİğİ

SAğLIKLI ERİşKİN BİREYLERDE TÜKÜRÜK
KORTİZOLÜNÜN BİYOLOJİK VARYASYONUNUN
DEğERLENDİRİLMESİ

Dr. Fatih SERİN

Tez Danışmanı:
Prof. Dr. Mehmet şENEş

TIPTA UZMANLIK TEZİ

ANKARA/2023

TEŞEKKÜR

Bilime adanmışlığı, çalışkanlığı ve üretkenliği ile örnek aldığım; ihtisasımın en başından beri engin bilgi birikimi ve vizyonu ile beni uzmanlık yolunda heveslendiren ve bilmeye olan merakımı arttıran; öğrencisi olmaktan şeref duyduğum çok değerli hocam Prof. Dr. Doğan Yücel'e;

İhtisasım boyunca bilgisini, deneyimini ve hayata dair sahip olduğu eşsiz bakış açısını paylaşmayı esirgemeyen; her konuda destekleyici ve hoşgörülü tavrı ile hayata dair bana çok değerli katkıları olan; tez sürecimin her aşamasında yanımda olan çok değerli hocam ve ağabeyim Prof. Dr. Mehmet Şeneş'e,

Tez çalışmam ve ihtisasım boyunca bana çok değerli katkılarda bulunan; çalışma disiplinine, bilgi birikimine ve paylaşımcı ruhuna gıpta ettiğim Uzm. Dr. Elmas Ögüş'e,

İhtisasım ve tez çalışmam boyunca yardımseverliğini ve bilgi birikimini esirgemeyen, fahri tez danışmanım Doç. Dr. Medine Alpdemir'e,

Tez çalışmamın birçok aşamasında bana yardım eden ve ihtisasım boyunca bana sonsuz katkıları olan değerli arkadaşlarım Uzm. Dr. Gizem Yılmaz Çalık, Dr. Semih Fazlı Kayahan ve Dr. Hacer Doğan'a,

İhtisasım boyunca birlikte zaman geçirmekten ve bilgi paylaşımında bulunmaktan mutluluk duyduğum, yolumuzun kesiştiği tüm değerli asistan doktor arkadaşlarıma;

Her zaman yardımcı olan ve bilgi birikimlerini paylaşan, birlikte çalıştığım çok değerli uzmanlarıma ve tüm laboratuvar çalışanlarına,

Tez çalışmam için gönüllü olarak haftalar boyunca numune veren ve bu çalışmanın gerçekleşmesini sağlayan çok değerli katılımcılara,

Tez çalışmama katkılarından ötürü başta Sayın Şölen Nergiz olmak üzere tüm Rotakim Analiz Hizmetleri ailesine;

Hayat yolunda yegâne gayesi dürüst, ahlaklı ve faydalı insanlar olmak ve yetiştirmek olan özverili, emektar canım anneme ve babama,

Beni her zaman seven ve destekleyen canım kardeşim Melike'ye,

Sonsuz teşekkürler...

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	vi
TABLO LİSTESİ.....	viii
ŞEKİL LİSTESİ.....	x
ÖZET	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. BİYOANALİTİK BİR NUMUNE MATRİKSİ: TÜKÜRÜK	3
2.1.1. Tükürüğün Üretimi, Bileşimi ve Özellikleri	4
2.1.2. Tükürük Numunesinin Toplanması ve Analizi	7
Tükürük numunesi tipleri.....	7
Tükürük örnekleme için hasta hazırlığı.....	8
2.2. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ.....	9
2.2.1. Adrenal Korteks Hormonlarının Düzenlenmesi ve Metabolizması	9
2.2.2. Dolaşımdaki Serbest Kortizolün Tükürüğe Geçiş.....	17
2.2.3. Tükürük Kortizolünün Klinik Kullanımı.....	19
Cushing sendromu.....	20
Konjenital adrenal hiperplazi	23
Adrenal yetmezlik	23
2.2.4. Tükürük Kortizolü Ölçüm Yöntemleri.....	23
2.3. BİYOLOJİK VARYASYON	24
2.3.1. Toplam Test Süreci ve Test Sonuçlarında Varyasyon Kaynakları.....	24
2.3.2. Biyolojik Varyasyon Bileşenleri	26
2.3.2.1. Prospektif çalışmalar	26
2.3.2.2. Büyük veri kullanarak yapılan retrospektif çalışmalar	30
2.3.3. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Kalitesi.....	31
2.3.4. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Yorumlanması ve Kullanılması.....	32
Bireysellik indeksi.....	32

Referans değişim değeri ve iki ardışık ölçüm sonucu arasındaki farklılıklar	33
Biyolojik varyasyona dayalı analitik performans gereklilikleri.....	35
Homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayısı	36
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	37
3.1. ÇALIşMA POPÜLASYONU VE PROTOKOLÜ	37
3.1.1. Çalışmanın Gücünün Değerlendirilmesi	39
3.2. NUMUNELERİN TOPLANMASI	39
3.2.1. Tükürük Numunesi Toplama Prosedürü	39
3.2.2. Numunelerin İşlenmesi ve Saklanması	40
3.3. TÜKÜRÜKTE KORTİZOL ÖLÇÜMÜ.....	40
3.3.1. Elektrokemilüminesans İmmünölçüm Yöntemiyle Tükürük Kortizolü Analizi	40
3.3.2. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Yöntemiyle Tükürük Kortizolü Analizi	40
Numune Hazırlığı.....	41
Analitik Performans Özellikleri	41
LC-MS/MS Koşulları.....	42
Kalibratör ve Kontrol Değerleri	44
3.3.3. Tükürük Kortizolü Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Performans Özelliklerinin Değerlendirilmesi.....	46
LC-MS/MS yöntemi için kör sınırı, saptama sınırı ve ölçüm sınırının değerlendirilmesi.....	46
LC-MS/MS yöntemi için doğrusallık çalışması.....	47
LC-MS/MS yöntemi için çalışma içi impresizyonun değerlendirilmesi.....	47
LC-MS/MS yöntemi için geri kazanım çalışması.....	47
ECLIA yöntemi için kör sınırı, saptama sınırı ve ölçüm sınırının değerlendirilmesi.....	48
ECLIA yöntemi için doğrusallık çalışması	48
ECLIA yöntemi için çalışma içi ve çalışmalar arası impresizyonun doğrulanması.....	49

ECLIA yöntemi için geri kazanım çalışması	49
Metot karşılaştırma	49
3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ.....	49
3.4.1. Aykırı Değerlerin Belirlenmesi	50
3.4.2. Normal Dağılımın Kontrolü	50
3.4.3. Kararlı Durumun Değerlendirilmesi.....	51
3.4.4. Homojenitenin Değerlendirilmesi	51
3.4.5. Cinsiyet Grupları Arasındaki Farklılıkların Analizi.....	51
3.4.6. Nested ANOVA.....	52
4. BULGULAR.....	53
4.1. KATILIMCILARIN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE SAĞLIK TARAMASI SONUÇLARI.....	53
4.2. ECLIA VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİ İLE ANALİZ EDİLEN SABAH TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜM SONUÇLARI İLE BİYOLOJİK VARYASYON VERİLERİNİN HESAPLANMASI	54
4.2.1. Sabah Tükürük Kortizolünün Biyolojik Varyasyonun ECLIA Yöntemi ile Hesaplanması	54
4.2.2. Sabah Tükürük Kortizolünün Biyolojik Varyasyonunun LC-MS/MS Yöntemi ile Hesaplanması	57
4.3. SABAH TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN BİYOLOJİK VARYASYONUNUN HESAPLANMASINDA KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	61
4.3.1. LC-MS/MS Yöntemi için Kör Sınırı, Saptama Sınırı ve Ölçüm Sınırının Değerlendirilmesi	61
4.3.2. LC-MS/MS Yöntemi için Doğrusallığın Değerlendirilmesi	61
4.3.3. LC-MS/MS Yöntemi için Çalışma İçi İmpresizyonun Değerlendirilmesi	62
4.3.4. LC-MS/MS Yöntemi için Geri Kazanımın Değerlendirilmesi	63
4.3.5. ECLIA Yöntemi için Kör Sınırı, Saptama Sınırı ve Ölçüm Sınırının Değerlendirilmesi	63
4.3.6. ECLIA Yöntemi için Doğrusallığın Değerlendirilmesi	64

4.3.7. ECLIA Yöntemi için Çalışma İçi ve Çalışmalar Arası İmpresizyonun Değerlendirilmesi	65
4.3.8. ECLIA Yöntemi için Geri Kazanım Çalışması	66
4.3.9. Metot Karşılaştırma	66
5. TARTIŞMA	69
5.1. EFLM BV VERİ TABANI VE KORTİZOLÜN BV ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ	72
5.2. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN ANALİTİK, BİREY İÇİ VE BİREYLER ARASI BİYOLOJİK VARYASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ.....	74
5.3. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN BİREYSELLİK İNDEKSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	77
5.4. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN REFERANS DEĞİŞİM DEĞERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	77
5.5. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN ANALİTİK KALİTE GEREKLİLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ	78
5.6. ÇALIŞMANIN GÜCÜ	79
5.7. ALT GRUP ANALİZLERİ	80
5.8. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜMÜNDE ANALİTİK YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	81
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	85
8. ÖZGEÇMİŞ	100
9. EKLER.....	102
EK 1: SBÜ GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ TEZ İNCELEME VE DEĞERLENDİRME AKADEMİK KURULU KARARI.....	102
EK 2: ETİK KURUL KARARI.....	105
EK 3: ÇALIŞMA ÖNCESİ KATILIMCI DEĞERLENDİRME ANKET FORMU	106
EK 4: KATILIMCILARA VİZİT ÖNCESİ UYGULANAN ANKET FORMU.	108
EK 5: KATILIMCILARIN ECLIA VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİYLE ANALİZ EDİLEN TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜM SONUÇLARI	109

SİMGELER VE KISALTMALAR

ACTH	: Adrenokortikotropik hormon (Adrenocorticotrophic hormone)
ADH	: Antidiüretik hormon
ALT	: Alanin aminotransferaz
AST	: Aspartat aminotransferaz
ANOVA	: Varyans analizi (Analysis of variance)
BIVAC	: The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist
BV	: Biyolojik varyasyon
cAMP	: Siklik adenzin monofosfat (Cyclic adenosine monophosphate)
CBG	: Kortizol bağlayıcı globulin (Corticosteroid-binding globulin)
CLIP	: Kortikotropin benzeri ara peptid (Corticotropin-like intermediate peptide)
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute
CPE	: Karboksipeptidaz E
CRH	: Kortikotropin salgılatan hormon (Corticotropin-releasing hormone)
CRP	: C-reaktif protein
CS	: Cushing sendromu
CV	: Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)
CV_A	: Analitik varyasyon katsayısı
CV_G	: Bireyler arası biyolojik varyasyon katsayısı
CV_I	: Birey içi biyolojik varyasyon katsayısı
CV_P	: Preanalitik varyasyon katsayısı
DHEA	: Dehidroepiandrosteron
DST	: Deksametazon süpresyon testi
ECLIA	: Elektrokemilüminesans immünölçüm
EFLM	: European Federation for Laboratory Medicine
EGF	: Epidermal büyüme faktörü (Epidermal growth factor)
EuBIVAS	: The European Biological Variation Study
FSH	: Folikül uyarıcı hormon (Follicle-stimulating hormone)
GA	: Güven aralığı
GGT	: Gamma glutamil transferaz

GnRH	: Gonadotropin salgılatan hormon (Gonadotropin-releasing hormone)
IFCC	: International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IGF	: İnsülin benzeri büyüme faktörü (Insulin-like growth factor)
II	: Bireysellik indeksi (Index of individuality)
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein (Low-density lipoprotein)
LH	: Luteinizan hormon
LIS	: Laboratuvar bilgi sistemi (Laboratory information system)
LOB	: Kör sınırı (Limit of blank)
LOD	: Saptama sınırı (Limit of detection)
LOQ	: Ölçüm sınırı (Limit of quantitation)
MSH	: Melanosit uyarıcı hormon
N-AT	: N-Asetil transferaz
PC	: Proprotein dönüştürücü enzim
POMC	: Proopiomelanokortin
R	: Geri kazanım (Recovery)
RCF	: Göreceli santrifüj kuvveti (Relative centrifugal force)
sT4	: Serbest tiroksin
StAR	: Steroidojenik akut düzenleyici protein (Steroidogenic acute regulatory protein)
TEa	: Toplam izin verilen hata (Total allowable error)
TSH	: Tiroid uyarıcı hormon (Thyroid-stimulating hormone)
PAM	: Peptidil amitleyici monooksijenaz
POMC	: Proopiomelanokortin (Pro-opiomelanocortin)
RDD	: Referans değişim değeri
VKİ	: Vücut kitle indeksi

TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Tıbbi laboratuvardaki ölçümlerde tükürük numunesi kullanımının avantajları ve zorlukları	4
Tablo 2. Kortikosteroidlerin nispi etkileri (potens)	17
Tablo 3. Cushing sendromunun nedenleri	21
Tablo 4. 2014 Milano Stratejik Konferansı'na göre analitik performans gerekliliklerini belirlemek için kullanılacak modeller.....	35
Tablo 5. Biyolojik varyasyona dayalı analitik kalite hedefleri	36
Tablo 6. Obikrom LC-MS/MS tükürükte serbest kortizol kiti içeriği.	41
Tablo 7. LC-MS/MS'de tükürükte serbest kortizol tayini kiti analitik performans özellikleri.....	42
Tablo 8. Akış gradienti.	43
Tablo 9. LC-MS/MS parametreleri.....	43
Tablo 10. Kütle geçişleri.....	44
Tablo 11. Kalibratör konsantrasyonları.	44
Tablo 12. Beklenen ve ölçülen kontrol değerleri.....	44
Tablo 13. Katılımcıların demografik verileri ve sağlık taraması sonuçları	53
Tablo 14. ECLIA yöntemi sonuçlarına göre istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve sabah tükürük kortizolü biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılan birey/sonuç sayıları.	55
Tablo 15. ECLIA yöntemi sonuçlarına göre cinsiyet grupları ve tüm grup için hesaplanan sabah tükürük kortizolü ortalama, CV _A , CV _I ve CV _G değerleri.....	56
Tablo 16. ECLIA yöntemi ile biyolojik varyasyonu hesaplanan sabah tükürük kortizolünün bireysellik indeksi, referans değişim değeri, analitik performans gereklilikleri ve gerekli numune sayısı.	57
Tablo 17. LC-MS/MS yöntemi sonuçlarına göre istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve sabah tükürük kortizolü biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılan birey/sonuç sayıları.	58

Tablo 18. LC-MS/MS sonuçlarına göre cinsiyet grupları ve tüm grup için hesaplanan sabah tükürük kortizolü ortalama, CV_A , CV_I ve CV_G değerleri.....	60
Tablo 19. LC-MS/MS yöntemi ile biyolojik varyasyonu hesaplanan tükürük kortizolünün bireysellik indeksi, referans değişim değeri, analitik performans gereklilikleri ve gerekli numune sayısı.	60
Tablo 20. LC-MS/MS yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık çalışması sonuçları.....	61
Tablo 21. Tükürük kortizolü analizinde LC-MS/MS yöntemi için geri kazanım çalışması.....	63
Tablo 22. ECLIA yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık çalışması sonuçları..	64
Tablo 23. Tükürük kortizolü analizinde ECLIA yöntemi için geri kazanım çalışması.	66
Tablo 24. Elektrokemilüminesans immünölçüm ve sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi yöntemleri kullanılarak aynı numunelerin ölçümüyle hesaplanan sabah tükürük kortizolü biyolojik varyasyon verileri.	70
Tablo 25. Tükürük dışındaki numune matrislerinde kortizol için gerçekleştirilen BV çalışmaları.	73
Tablo 26. Tükürük kortizolü için daha önce yapılan biyolojik varyasyon çalışmalarının bizim çalışmamızla karşılaştırılması.	75
Tablo 27. Tükürük kortizolü için daha önce yapılan biyolojik varyasyon çalışmalarındaki analitik yöntemler.....	76

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1.	Tükürük bezinin fonksiyonel birimi olan "salivon"un bölümleri	6
Şekil 2.	Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın regülasyonu	10
Şekil 3.	Proopiomelanokortin ailesi ürünleri.....	11
Şekil 4.	Sağlıklı kişilerde plazma kortizol konsantrasyonunun diurnal varyasyonu	12
Şekil 5.	Kolesterol molekülü için geleneksel numaralandırma sistemi	13
Şekil 6.	Adrenal korteks steroid hormonlarının biyosentezi	15
Şekil 7.	Serumdan tükürüğe geçişte kortizol/kortizon oranının değişimi	19
Şekil 8.	Cushing sendromu şüphesinde gerçekleştirilecek birinci basamak tarama testleri algoritması.....	22
Şekil 9.	Beyinden beyine laboratuvar döngüsünün adımları.....	25
Şekil 10.	34.5 nmol/L konsantrasyondaki tükürük kortizolü standardı ve kortizol-D4 iyonizasyonuna ait kromatogram.	45
Şekil 11.	LC-MS/MS için tükürük kortizolü kalibrasyon eğrisi.	45
Şekil 12.	Bir numaralı katılımcının 1. hafta numunesinin tekrarlı ölçümüne ait tükürük kortizolü ve kortizol-D4 iyonizasyonuna ait kromatogramları. ...	46
Şekil 13.	Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra ECLIA yöntemi ile ölçülen sabah tükürük kortizolünün 10 hafta boyunca ortalama değerleri ve dağılımı. ...	55
Şekil 14.	Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra LC-MS/MS yöntemi ile ölçülen sabah tükürük kortizolünün 10 hafta boyunca ortalama değerleri ve dağılımı. ...	59
Şekil 15.	LC-MS/MS yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık grafiği.	62
Şekil 16.	ECLIA yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık grafiği.	65
Şekil 17.	Passing ve Bablok regresyon grafiği.....	67
Şekil 18.	Bland-Altman grafiği.	68

ÖZET

SAĞLIKLI ERİŞKİN BİREYLERDE TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN BİYOLOJİK VARYASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Amaç: Sağlıklı bireylerde sabah tükürük kortizolünün birey içi (CV_I) ve bireyler arası (CV_G) biyolojik varyasyonunun, LC-MS/MS ve elektrokemilüminesans immünölçüm (ECLIA) yöntemleri ile hesaplanması amaçlandı. Elde ettiğimiz biyolojik varyasyon verileri ile tükürük kortizolu için bireysellik indeksi (II), referans değişim değerleri (RDD), analitik kalite gereklilikleri ve cinsiyet alt grupları için tabakalandırma yapmanın gerekli olup olmadığı değerlendirildi.

Gereç ve Yöntem: EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu'nun dahil etme ve hariç tutma kriterleri esas alınarak belirlenen 41 sağlıklı gönüllüden (21 kadın, 20 erkek), 10 hafta boyunca haftanın belirli bir günü 08.00-10.00 arasında, preanalitik evreden kaynaklanabilecek varyasyonu minimuma indirmek amacıyla standart bir prosedür uygulanarak, tükürük numunesi toplandı. Numuneler toplanıp santrifüj edildikten sonra üç porsiyona ayrılıp, analiz gününe kadar -80°C 'de muhafaza edildi. LC-MS/MS ve ECLIA yöntemleri ile tek çalışmada, rastgele ve her iki yöntem için de ikişer tekrarlı olmak üzere tükürük kortizolu ölçümleri gerçekleştirildi. Her iki yöntem için CLSI kılavuzları esas alınarak tükürük kortizolu ölçümü için metot değerlendirme çalışması yapıldı. BIVAC kontrol listesi esas alınarak, sabah tükürük kortizolu için CV_I , CV_G , II, RDD ve analitik kalite gereklilikleri iki yöntem için ayrı ayrı belirlendi.

Bulgular: LC-MS/MS yöntemi ile gerçekleştirilen ölçümlere göre sabah tükürük kortizolu için CV_I : %31.1 (28.1-34.5; %95 GA), CV_G : %27.5 (21.2-37.6; %95 GA), II: 1.13, $RDD_{\text{yukarı}}$: +%131.1, $RDD_{\text{aşağı}}$: -%56.7, arzu edilen impresizyon <%15.6, bias <%11 ve izin verilen toplam hata (TEa) <%36 bulundu. ECLIA yöntemi ile gerçekleştirilen ölçümlere göre CV_I : %28.1 (25.7-30.8; %95 GA), CV_G : %31.3 (24.5-42.6; %95 GA), II: 0.89, $RDD_{\text{yukarı}}$: +%100.6, $RDD_{\text{aşağı}}$: -%50.2, arzu edilen impresizyon <%14, bias <%11 ve TEa <%34 bulundu. Her iki yöntemle de elde edilen biyolojik varyasyon değerlerine göre, cinsiyet grupları için tabakalandırma yapmanın gerekli olmadığı belirlendi.

Sonuç: Çalışmamız BIVAC kriterleri esas alınarak gerçekleştirilen ilk tükürük kortizolü biyolojik varyasyonu ilk çalışmasıdır. Her iki yöntem için de çalışmanın CV_I'yı saptama gücü, en yüksek değer olan, 1'dir. Her iki yöntemle elde edilen CV_I ve CV_G değerleri, güven aralıkları ile değerlendirildiğinde birbirini kapsamaktadır. Tükürük kortizolü orta derecede bireysellik göstermektedir; buna göre ölçüm sonuçlarının, bireysel referans aralıklara göre veya popülasyona dayalı referans aralıklar ve referans değişim değeri ile birlikte değerlendirilmesi uygun görünmektedir.

Anahtar kelimeler: Analitik kalite gereklilikleri, bireysellik indeksi, biyolojik varyasyon, Cushing sendromu, metot değerlendirme, referans değişim değeri, tükürük kortizolü

ABSTRACT

ESTIMATION OF THE BIOLOGICAL VARIATION OF SALIVARY CORTISOL IN HEALTHY ADULTS

Aim: We aimed to calculate the within-subject (CV_I) and between-subject (CV_G) biological variations of morning salivary cortisol in healthy subjects by LC-MS/MS and electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) methods. With the biological variation data we obtained, we evaluated the index of individuality (II), reference change values (RCV), analytical quality specifications (APS), and whether stratification for gender subgroups is necessary for salivary cortisol.

Materials and Methods: Saliva samples were collected from 41 healthy volunteers (21 females, 20 males), identified on the basis of the inclusion and exclusion criteria of the EFLM Biological Variation Working Group, between 08.00 a.m. and 10.00 a.m. on one day of the week for 10 weeks, following a standardized procedure to minimize variation due to the preanalytical phase. After collection and centrifugation, the samples were divided into three portions and stored at -80°C until the day of analysis. Salivary cortisol measurements were performed by LC-MS/MS and ECLIA methods in a single study, randomly and with two replicates for each method. Method evaluation studies were performed for salivary cortisol measurement based on CLSI guidelines for both methods. Based on the BIVAC checklist, CV_I , CV_G , II, RCV, and APS for morning salivary cortisol were determined separately for both methods.

Results: According to the measurements performed by LC-MS/MS, CV_I for morning salivary cortisol was 31.1% (28.1-34.5; 95% CI), CV_G : 27.5% (21.2-37.6; 95% CI), II: 1.13, RCV_{up} : +131.1%, RCV_{down} : -56.7%, desired imprecision <15.6%, desired bias <11% and desired total allowable error (TEa) <36%. According to the measurements performed by the ECLIA method, CV_I : 28.1% (25.7-30.8; 95% CI), CV_G : 31.3% (24.5-42.6; 95% CI), II: 0.89, RCV_{up} : +100.6%, RCV_{down} : -50.2%, desired imprecision <14%, desired bias <11% and desired TEa <34%. According to the biological variation values obtained using both methods, stratification for sex groups was not necessary.

Conclusion: Our study is the first study of salivary cortisol biological variation based on the BIVAC criteria. The power of the study to detect CV_I for both methods was 1.00, which is the highest value. The CV_I and CV_G values obtained using both methods cover each other when evaluated with confidence intervals. Salivary cortisol shows moderate individuality; therefore, we suggest evaluating the measurement results according to personalized reference intervals or in combination with population-based reference intervals and reference change values.

Keywords: Analytical quality specifications, biological variation, Cushing's syndrome, index of individuality, method verification, reference change value, salivary cortisol

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Laboratuvar tıbbında gerçekleştirilen analizlerde elde edilen verilerin güvenilirliği hastalık tanısı, tedavi izlemi ve prognoz belirlenmesinde büyük öneme sahiptir (1). Klinisyenin test istemi yapmaya karar vermesinden laboratuvar sonucunun onaylanıp klinik kararın verilmesine kadar geçen süreç toplam test süreci olarak adlandırılır; bu süreç hasta ile başlar ve biter (2). Laboratuvar tıbbında elde edilen bir ölçüm sonucu preanalitik, analitik ve biyolojik varyasyon olmak üzere üç varyasyon kaynağından etkilenir (3). Klinik karar süreçlerine etki eden laboratuvar ölçümlerinin uygun şekilde kullanılabilmesi için, bu varyasyon kaynakları hakkında bilgi sahibi olunması gerekir.

Preanalitik varyasyon, test isteminden numune analizinin hemen öncesine kadar süreçte gerçekleşen tüm adımları içerir (4). Analitik varyasyon, test yöntemleri ve ekipmanlarındaki farklılıklar nedeniyle ortaya çıkar (5). Tüm analitik teknikler, analitik impresiyon olarak adlandırılan doğal rastgele varyasyona sahip olduğundan, aynı cihaz tarafından yakın zaman aralıklarında analiz edilen aynı numunede bile farklı sonuçlar elde edilebilir.

Canlılardaki biyomoleküllerin konsantrasyon veya aktivitelerindeki varyasyonlar, sistematik ve rastgele varyasyonlar olarak sınıflandırılabilir (6). Sistematik varyasyonlar, sıklığa göre ultradiyen (<24 saat), sirkadiyen (yaklaşık 24 saat) ve infradiyen (>24 saat) olarak sınıflandırılabilir ve bunlar kısmen öngörülebilir varyasyonlardır (7, 8). Rastgele biyolojik varyasyonlar ise, birey içi biyolojik varyasyonlar (CV_I) ve bireyler arası biyolojik varyasyonlar (CV_G) olarak bilinir (5). CV_I bir analit için bireyin homeostatik ayar noktası etrafındaki dalganmayı ifade ederken; CV_G bireylerin o analit için ayar noktaları arasındaki varyasyonu temsil eder. Rastgele biyolojik varyasyon öngörülemez; ancak uygun ölçüm ve istatistiksel prosedürler kullanılarak tahmin edilebilir (9).

Çalışmamızda, Cushing sendromu tanısında kullanılan testlerden biri olan tükürük kortizolu için birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyonu, sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve elektrokemilüminesans immünölçüm olmak üzere iki farklı yöntem ile hesaplamayı amaçladık. Elde edilen

biyolojik varyasyon verileri ile tükürük kortizolünün bireysellik indeksini, referans değişim değerini ve biyolojik varyasyona dayalı analitik kalite gerekliliklerini hesaplamayı; tükürük kortizolu için popülasyona dayalı referans aralıkların kullanımının uygunluğunu değerlendirmeyi amaçladık.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. BİYOANALİTİK BİR NUMUNE MATRİKSİ: TÜKÜRÜK

Laboratuvar tıbbında hastalıkların tanı, tedavi ve takibinde en sık kullanılan tanı testleri, kan ve idrar numunelerinin hücresel ve kimyasal bileşenlerinin analizlerini içerir (10). Son zamanlarda, numune matrisi olarak tükürüğün kullanıldığı analizler yaygınlaşmaktadır. Tükürük, proteine bağlı olmayan hormonları ve küçük molekülleri analiz etmek için kullanılan alternatif bir vücut sıvısıdır (11). Tükürük örneklemesinin, filebotomiye göre stressiz ve non-invaziv olması gibi bazı avantajlara sahip olması, tükürük analizlerine olan ilgiyi artırmıştır (12). Damar delinmesinden kaçınıyor olmak özellikle glukokortikoid ve katekolamin gibi stres hormonlarının düzeylerinde filebetomiden kaynaklanan strese bağlı artışların önlenmesini sağlar (13–15). Ayrıca tükürük, genomik DNA elde etmek ve diğer nükleik asit incelemeleri için elverişli bir numune türüdür ve bu amaçla kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır (16, 17).

Tükürükte bulunan pek çok analitin konsantrasyonu, kandaki ile karşılaştırıldığında oldukça düşük düzeydedir (18). Bu nedenle tükürükte gerçekleştirilecek ölçümlerde analitik hassasiyeti yüksek yöntemlerin kullanılması gerekir (19). Birçok preanalitik değişken, tükürükteki ölçümleri etkileyebilir. Tükürük üretimi ve salgılanması; yaş, sigara kullanımı, fiziksel egzersiz, kullanılan ilaçlar, psikolojik ve hormonal faktörler, koku ve tat uyaranları, çiğneme refleksi gibi faktörlerden etkilenir. Ayrıca tükürük bileşimi, numune elde etme yönteminden de etkilenebilir. Bunun yanında, ölçümü yapılacak analit ile kontaminasyona karşı hassastır (18). Çeşitli ticari tükürük toplama kitleri geliştirilmiştir; ancak bu kitler aracılığıyla elde edilen numunelerde ölçümü yapılacak her analit ve kullanılan ölçüm metodu için validasyon çalışmaları yapılması gerekir (20). Gelecekte, hastalıkların patogenezi ve hastalıklarda tükürükte bulunan biyomoleküller ile ilişkili bilgiler arttıkça ve analitik hassasiyeti yüksek metodların geliştirilmesiyle birlikte, tükürüğün tanı aracı olarak kullanılmasının önemi artabilir (21). Tükürük numunesini kullanımının bazı avantajları ve dezavantajları Tablo 1’de gösterilmiştir (4).

Tablo 1. Tıbbi laboratuvaradaki ölçümlerde tükürük numunesi kullanımının avantajları ve zorlukları (4)

Avantajları
• Minimum düzeyde eğitimle hızlı ve kolayca numune toplanabilir. • Hastane dışında hastanın kendisi tarafından toplanabilir. • Çoklu numune toplanabilmesi mümkündür. • Hasta için güvenli ve ağrısızdır. • Çocuklarda, psikiyatri hastalarında ve stresle ilgili araştırmalar için uygundur. • Numune elde etmek kolaydır. • Numune alımında maliyet düşüktür ve eğitilmiş personel gerektirmez. • Nüfus tarama programları için elverişlidir. • Numune toplanmasında enfeksiyon bulaş riski düşüktür.
Zorlukları
• Düşük analit konsantrasyonları nedeniyle yüksek analitik hassasiyet gerekir. • Bazı analitler sirkadiyen ritimden etkilenebilir. • Geri kazanım (recovery) çalışması yapmak zordur. • Numune toplanırken kontaminasyon riski vardır. • Çocuklarda ve yaşlı bireylerde düşük hasta uyumu görülebilir ve numune toplamada zorluklar olabilir.

2.1.1. Tükürüğün Üretimi, Bileşimi ve Özellikleri

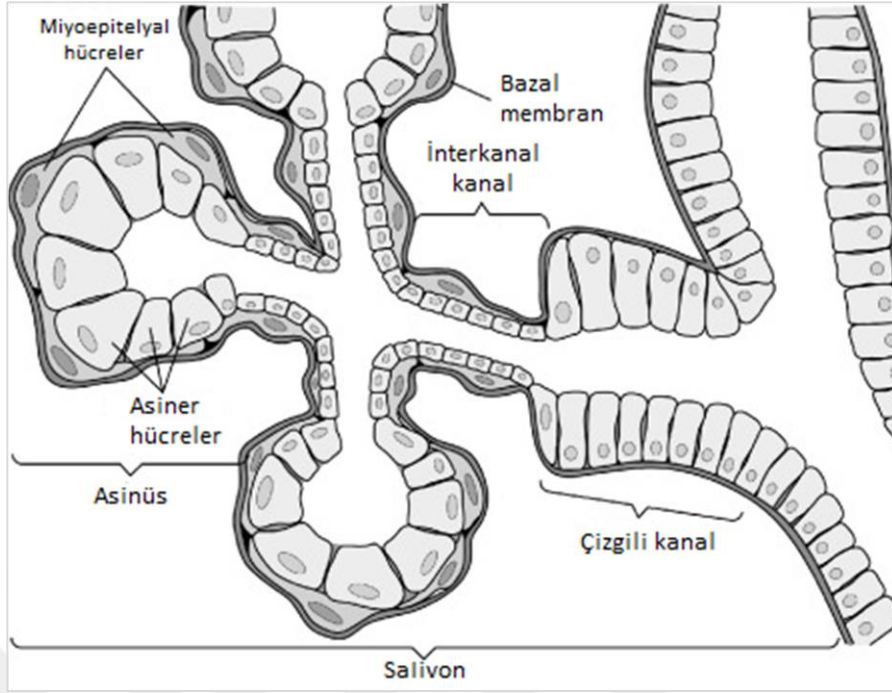
Tükürük terimi, büyük tükürük bezleri (submandibular, parotis ve sublingual) ile oral mukozada yer alan çok sayıdaki minör tükürük bezinin salgısından oluşan berrak, hafif asidik, hipotonik ve seromüköz ekzokrin biyolojik ortamı ifade eder (22). Tükürük, oral mukozada homeostazı sağlayarak ağız sağlığının sürdürülmesinde önemli bir rol oynar (23). Besinleri sindirime hazırlayan amilaz ve lipaz gibi çeşitli enzimler tükürük ile sağlanır (24–26). Sürtünme kaynaklı mekanik yaralanmalara karşı oral mukozayı korur. Yutma, çiğneme, konuşma ve tat almayı desteklemek için ağızdaki dokuları kayganlaştırır ve nemlendirir (27). Ayrıca, mikroorganizmaların ağızda çoğalmasını engelleyen salgısal IgA, katelisin ve adrenomedullin gibi bağışıklık cevabında rol alan faktörleri içerir (28–30).

Submandibular bez, parotis bezi ve sublingual bezin toplam tükürük miktarına katkısı sırasıyla %65, %23 ve %4'tür. Geriye kalan %10'luk kısım minör tükürük bezleri tarafından üretilir (31). Günlük toplam salgılanan hacim, vücuttaki su dengesine ve bezin uyarılmasına bağlı olarak 500-1500 mL arasında değişir (32, 33). Bazal tükürük akış hızı yaklaşık 0.5 mL/dk'dır (22).

Yaklaşık %99'u sudan oluşan tükürük; bazı inorganik ve organik bileşikleri, polipeptitleri ve hormonları içerir (34). Tükürüğün akışı ve bileşimi esas olarak otonom sinir sisteminin aktivitesi ile düzenlenir (23). Parasempatik ve sempatik uyarılma, tükürük akış hızı ve hacminin yanı sıra; tükürükteki organik ve inorganik bileşiklerin konsantrasyonlarını da değiştirir (22). Uyarılma durumunda, kişiden kişiye değişiklik göstermekle birlikte, akış hızı yaklaşık 4 mL/dk'ya kadar çıkabilir (35).

Tükürük; içerdiği bikarbonat, fosfat ve proteinler aracılığıyla az da olsa bir tampon kapasitesine sahiptir (36). Uyarılmamış tükürükte pH 6-7 arasında iken, akış hızı değiştiğinde pH 5.3 ile 7.8 arasında farklılık gösterebilir (37). Uyarılmış durumda, tükürükteki bikarbonat iyonları daha yüksek konsantrasyona sahip olduğu için pH artar (38). Akış hızı yükseldiğinde, sodyum ve klor düzeyleri artar. Potasyum ve fosfat konsantrasyonları ise azalır ve böylece tükürük tonisitesi artar (39). Bu nedenle, tükürüğün tamponlama etkisi, uyarılmış hâlde (yüksek akış hızlarında) daha etkilidir. Bazal durumda düşük akış hızındaki uyarılmamış sekresyon ise oral mukozayı kaplayarak nemlendirir ve kayganlaştırır (27).

Tükürük, bezlerin asinüs denilen salgılayıcı uç kısımlarında üretilir. Tükürük bezlerinin kanal sistemi; asinüslerden ağız boşluğuna kadar uzanan, gitgide çapı artan tübüler bir ağdır. İnterkalar kanallar birleşerek çizgili kanalı, çizgili kanallar da birleşerek boşaltım kanalını oluşturur, tükürük bu kanallardan ağız boşluğuna drene olur (bkz. Şekil 1) (40).



Şekil 1. Tükürük bezinin fonksiyonel birimi olan "salivon"un bölümleri (40).

Plazmadan ağız boşluğuna madde geçişinde farklı mekanizmalar rol alır (23). Ultrafiltrasyon ile geçiş en yaygın mekanizmadır (36). Ağırlığı 1900 Da'dan düşük olan moleküller (su, iyonlar, katekolaminler ve steroidler) ultrafiltrasyonla, salgı birimi hücrelerinin arasındaki bağlantı bölgelerinden (gap junction) direkt geçebilir (41). Diğer bir geçiş mekanizması, plazma bileşiklerinin ağız mukozasından doğrudan ağız boşluğuna sızmasıdır (transüstasyon) (36). Steroid hormonlar ve yüksek lipofilik özellikteki bazı ilaçlar, tükürük bezi hücrelerinin membranlarından pasif difüzyonla aktarılır (36). Hücre membranındaki porlardan aktif taşıma ve ultrafiltrasyon, ilaçların ve metabolitlerinin kandan ağız sıvısına geçişini sağlayan başka bir mekanizmadır (42). Aktif taşıma mekanizması, ilacın lipitteki çözünürlüğüne, moleküler ağırlığına ve pKa'sına bağlı olmakla birlikte; tükürüğün akış hızına, pH'sına ve plazmadaki bağlayıcı proteinlere göre düzenlenir (43).

Peptik ülser ve gastroözofageal reflü hastalığının tedavisinde yaygın olarak kullanılan histamin H₂-reseptör blokörleri (nizatidin, simetidin ve ranitidin gibi) ve üst gastrointestinal sistemde motiliteyi artıran serotonin 5-HT₄ reseptör agonisti (sisaprid) gibi bazı farmakolojik ajanlar, salgı uç kısımlarındaki sıkı bağlantıları genişleterek tükürük salgısını arttırırken; Sjögren sendromu ve radyasyon ilişkili kserostomi gibi bazı hastalıklarda tükürük üretiminde ciddi bir azalma görülür (44, 45).

2.1.2. Tükürük Numunesinin Toplanması ve Analizi

Tükürük numunesi tipleri

Tükürük numunesi elde etmenin en kolay yolu tüm ağız sıvısını (tüm tükürük, "whole saliva") toplamaktır. Tüm tükürük, oral ortamı temsil eder. Ancak numune toplamanın amacına ve test edilecek analite bağlı olarak; glandüler kanal tükürüğü, dış oluğu sıvısı ve mukozal transüda gibi özel toplama yöntemleri mevcuttur (36). Tüm tükürük dışındaki diğer örnek alma yöntemleri daha karmaşıktır, eğitimli personel gerektirir ve yaygın olarak kullanılmaz. Çeşitli tükürük numunesi toplama cihazları da mevcuttur. Tükürük numunesi elde edilmesinin standardizasyonu analitik ve postanalitik evre için büyük öneme sahiptir; çünkü tükürüğün akışını ve bileşimini etkileyen birçok faktör vardır (36).

Tüm tükürük, hem uyarılmamış hem de uyarılmış olarak toplanabilir. Ağız hareketleriyle (esneme, sakız çiğneme) veya sitrik asitle ıslatılmış bir pamuğun kullanılmasıyla tükürük salgılanması uyarılabilir. Uyarılmış ve uyarılmamış tükürük, farklı bezler tarafından üretilir ve bazı analitlerin konsantrasyonu değişiklik gösterebilir. Bu nedenle her analit için eşit derecede uygun olmadıklarına dikkat edilmelidir (46). Uyarılmamış tükürük çoğunlukla submandibular bez tarafından üretilirken, uyarılmış tükürük daha çok parotis bezinden kaynaklanır (47). Bununla birlikte, sitrik asitle uyarılma pH'ı düşürür ve antijen-antikor bağlanmasını gerektiren immünolojik testleri etkileyebilir (48).

Uyarılmamış tüm tükürük, plastik bir kaba pasif salya akıtılarak (*passive drool*) veya bir toplayıcı şişeye tükürülerek toplanabilir. Pasif salya akıtma yöntemi hem majör hem de minör bezlerden üretilen tükürük bileşimini en iyi şekilde yansıttığı için altın standart toplama yöntemi olarak kabul edilir (49). Ayrıca, pasif salya akıtma yerine aktif tükürme tercih edilirse, tükürüğün bakterilerle kontamine olma olasılığı daha yüksektir (50).

Uyarılmış tükürük; tükürüğün pamuk topları, pamuklu çubuklar veya filtre kağıdına emdirilmesiyle elde edilebilir. Bazı analitlerin pamuktan ayrıştırılması zor olduğu için pamuk ideal bir toplama materyali değildir. Bu sorunu çözmek için, inert polimerler, polistiren, rayon ve polyester gibi bazı sentetik malzemeler

kullanılabilmektedir (36). Çeşitli adsorbanlar kullanılarak toplanan tükürüğün bileşiminin farklı olabileceği unutulmamalıdır; çünkü adsorbanlar ile toplanan tükürük, tüm tükürüğü yansıtmayan, lokalize tükürük toplar. Toplama yönteminin, özelliklerinin ve performansının iyi bilinmesi önemlidir.

Numune alındıktan sonra, bakteri üremesini önlemek ve numune bütünlüğünü korumak için tükürük uygun koşullarda saklanmalıdır (4, 36). Saklama koşulları, tükürüğün kullanım amacına ve saklama süresine göre değişebilir (4). Sodyum azid gibi bazı katkı maddeleri, proteaz aktivitesini inhibe etmek ve bakteri üremesini geciktirmek için kullanılabilir (36). Ancak azidlerin peroksidaz aktivitesini inhibe ederek, enzimlerin kullanıldığı immünölçümlerde interferensa neden olabileceği unutulmamalıdır.

Geriatrik popülasyonda kserostomi (ağız kuruluğu) oldukça yaygın olduğundan ve düşük uyum nedeniyle tükürük toplamak zor olabilir. Bebek ve küçük çocuklarda karşılaşılan zorluklar ise şunlardır (51):

- Uyku uyanıklık periyotlarının düzensiz olması.
- Sık uyuklama (Küçük bebekler toplama sırasında bile genellikle uykuya dalar).
- Ağızda katı ve sıvı gıda kalıntıları olması.
- Yabancılarla ilgili kaygı.
- Düşük uyum.

Tükürük örnekleme için hasta hazırlığı

Tükürük toplamanın amacı, toplamaya nasıl hazırlanılacağı ve tükürüğün nasıl toplanacağı hakkında hastaya bilgi verilmesi tıbbi laboratuvarların sorumluluğundadır (4). Tükürük toplanması sırasında numune kontaminasyonunu önlemek amacıyla eldiven giyilmelidir. Hataları en aza indirmek ve yüksek kalitede tükürük numunesi elde etmek için alınması gereken bazı önlemler şunlardır (4):

- Klinisyen tarafından aksi belirtilmemişse; sabahları, tercihen aç iken alınmalıdır. Bazı analitler diurnal varyasyona sahip olabileceğinden, alımın tam zamanı önemlidir.

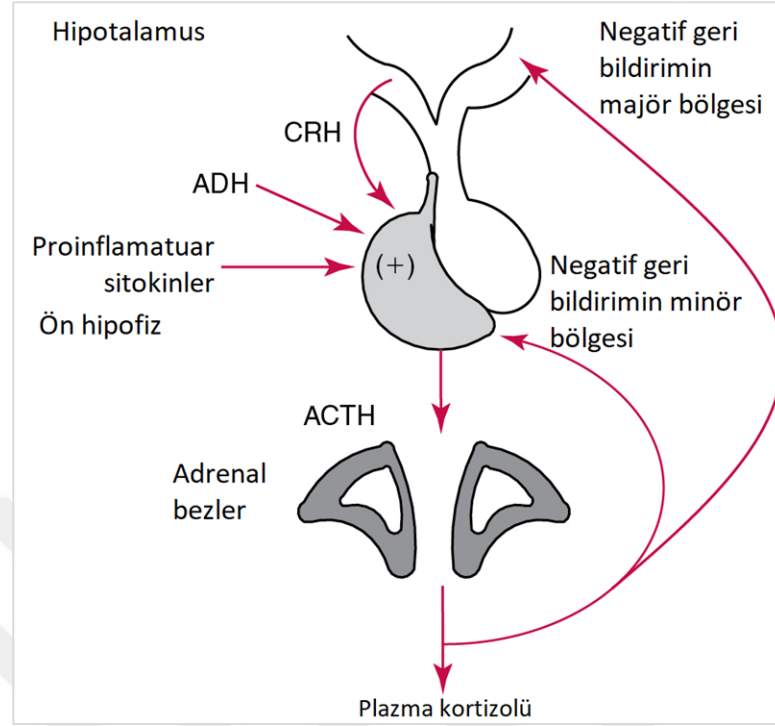
- Cilt bakım ürünleri ile kontaminasyonu önlemek için hasta yüzünü su ve sabunla yıkamalı ve iyice durulmalıdır.
- Numune toplanmasından önceki 12 saatlik zaman diliminde alkol tüketilmemelidir.
- Tükürük toplamadan önce en az 30 dakika boyunca diş fırçalanmamalı veya diş ipi kullanmamalıdır.
- Tükürük toplanmadan önceki 2 günde diş tedavisiyle ilgili işlem yapılmamalıdır. Diş ve diş eti kanaması test sonuçlarını etkileyebilir.
- Hasta numune vermeden 30 dakika önce su dışında yiyecek veya içecek tüketmemelidir.
- En az 30 dakika önce sakız çiğnenmemelidir.
- Toplamadan önce hasta, gıda kalıntılarını gidermek için ağzını suyla çalkalamalıdır. Numunenin seyreltilmesini önlemek için, numune ağız çalkalandıktan 10 ila 15 dakika sonra alınmalıdır.

Kan veya gıda kalıntıları ile gözle görülür şekilde kontamine olmuş bir tükürük numunesi reddedilmeli ve prosedürlere uygun bir şekilde tekrar alınması istenmelidir (4).

2.2. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ

2.2.1. Adrenal Korteks Hormonlarının Düzenlenmesi ve Metabolizması

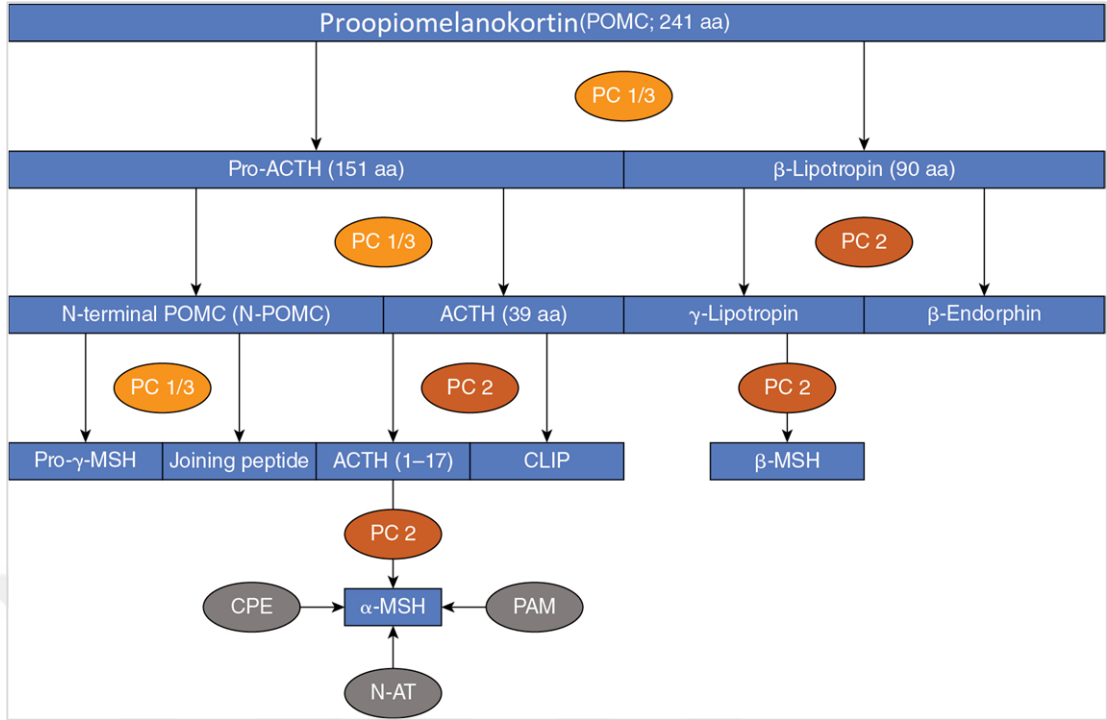
Adrenokortikotropik hormon (kortikotropin; ACTH), en aktifi kortizol olan glukokortikoidlerin adrenal korteksten üretimi ve salgılanması için primer düzenleyici hormondur (bkz. Şekil 2) (52). Hipotalamustaki parvosellüler nöroendokrin hücrelerde sentezlenen, 41 amino asitli bir peptit olan kortikotropin salgılatıcı hormon (corticotropin-releasing hormone; CRH), hipotalamus-hipofiz portal sistemine salınarak buradan ön hipofize ulaşır; ACTH sentezini ve salınımını düzenler (52). CRH ayrıca β -endorfin gibi proopiomelanokortin (POMC) ailesindeki diğer peptitlerin üretimini ve salgılanmasını da uyarır (53). CRH, protein kinazı aktive etmek için aracı olarak cAMP ve kalsiyumu kullanan reseptörlerine bağlanarak etkisini gösterir; bu da ACTH sentezi ve salınımıyla sonuçlanan bir fosforilasyon ve defosforilasyon olayları kaskadına yol açar (52).



CRH: Kortikotropin salgılatıcı hormon, ADH: Antidiüretik hormon, ACTH: Adrenokortikotropik hormon.

Şekil 2. Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın regülasyonu (52).

ACTH, ön hipofiz bezinde yer alan bazofilik kortikotrop hücrelerde POMC'den üretilir. Kortikotroplarda, subtilizin benzeri bir serin endoproteaz olan, proprotein (prohormon) dönüştürücü enzim (PC 1/3) ile, POMC iki fragmana ayrılır: ACTH öncü parçası (pro-ACTH) ve β -lipotropin (bkz. Şekil 3) (54). β -lipotropin için bir reseptör tanımlanmamıştır, bu nedenle işlevi bilinmemektedir (52). PC 1/3 enzimi, daha sonra POMC'nin pro-ACTH fragmanından, 39 amino asitten oluşan bir peptid hormon olan ACTH'yi serbest bırakır. Geriye kalan N-terminal fragman, bir bağlayıcı peptit içeren pro-gama-melanosit uyarıcı hormonu (MSH) oluşturmak üzere bölünür. ACTH, kortikotroplarda başka bir değişime uğramaz (52). Hipotalamus, deri ve hipofiz melanotrof hücrelerinde; ikinci bir proprotein dönüştürücü enzim olan PC2, pro-gamma-MSH'den bağlayıcı peptidi uzaklaştırır ve ACTH'yi alfa-MSH ve kortikotropin benzeri ara lob peptidine böler (55).

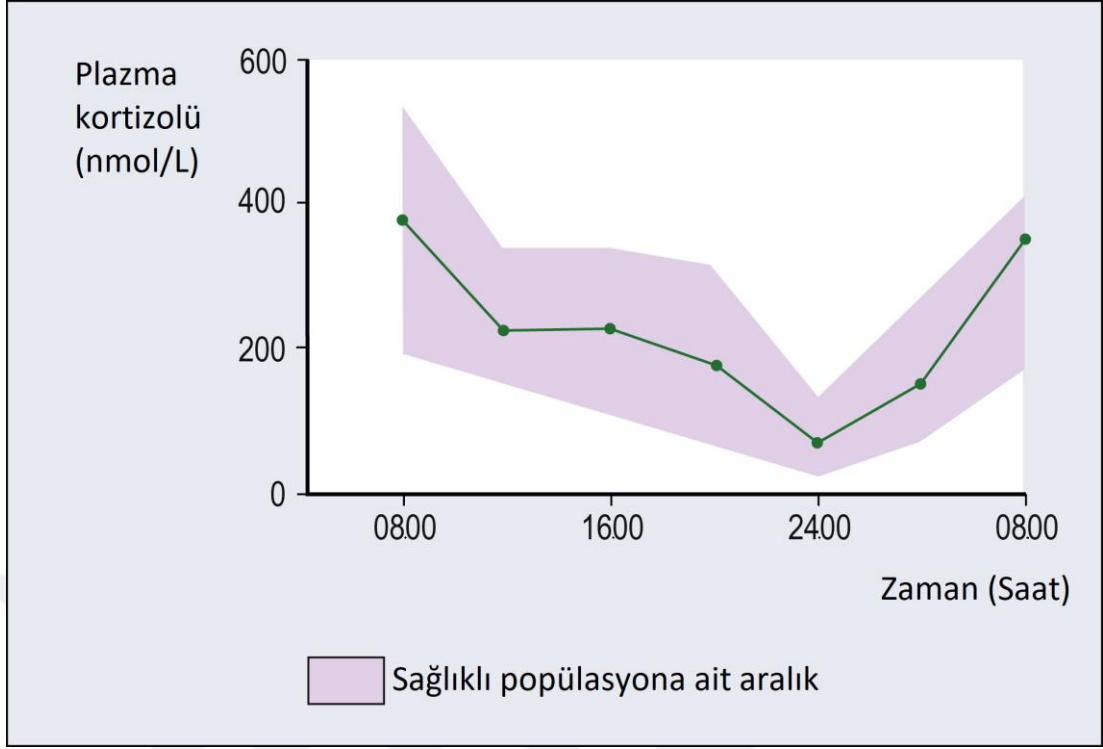


ACTH: Adrenokortikotropik hormon, POMC: Proopiomelanokortin, PC 1/3: Proprotein dönüştürücü enzim 1/3, PC 2: Proprotein dönüştürücü enzim 2, MSH: Melanosit uyarıcı hormon, CLIP: Kortikotropin benzeri ara peptid, CPE: Karboksipeptidaz E, PAM: Peptidil amitleyici monooksijenaz, N-AT: N-Asetil transferaz.

Şekil 3. Proopiomelanokortin ailesi ürünleri (52)

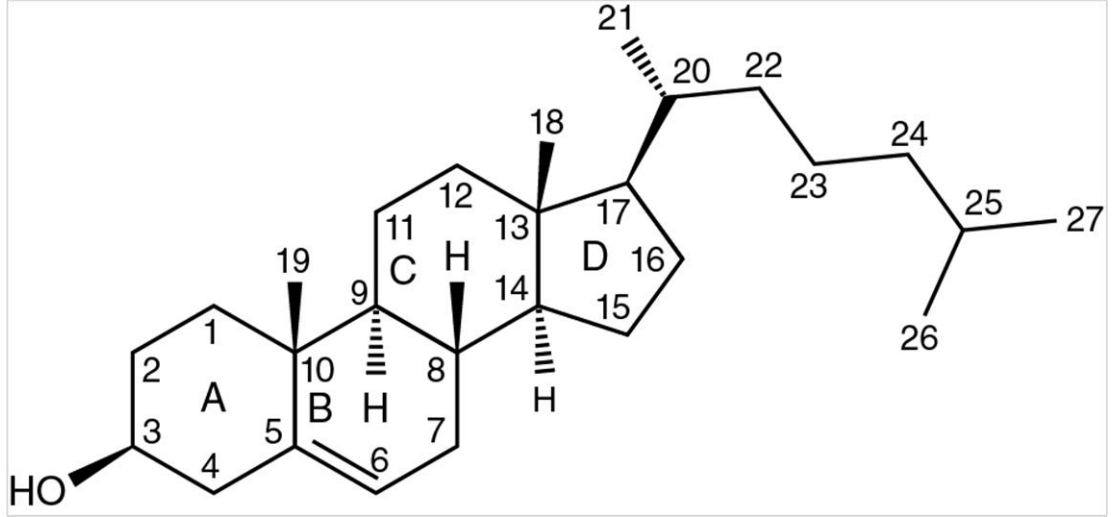
ACTH sistemik dolaşıma salınır ve adrenal korteksteki hücrelerde bulunan melanokortin reseptörü 2'ye bağlanarak; adrenokortikal hücrelerin boyutunda, sayısında, hücresel organellerin boyutunda ve işlevinde artışa yol açarak steroidogeneze neden olur (52). Böylelikle kortizol sentezi ve salınımı gerçekleşir.

Kortizol, hipotalamus-hipofiz son organ negatif geri bildirim ile hipotalamus ve hipofizden sırasıyla CRH ve ACTH salınımını inhibe eder (52). Diğer düzenleyici mekanizmalar, ACTH'nin hipotalamusta CRH'yi baskıladığı kısa bir negatif geri bildirim ve ACTH'nin kendi salınımını baskıladığı ultra kısa bir negatif geri bildirim döngüsünü içerir (bkz. Şekil 2) (53, 56). Kortizol; adrenal bezin zona fasikülata tabakasında, sirkadiyen bir ritimde pulsatil olarak üretilir ve salınır. Geleneksel uyku-uyanıklık döngüsüne sahip kişilerde kandaki kortizol düzeyi sabah 02:00-04:00 arasında yükselmeye başlar, uyandıktan kısa bir süre sonra zirve yapar, ardından gün içinde düşerek gece yarısında en düşük seviyeye ulaşır (bkz. Şekil 4) (52,57,58).



Şekil 4. Sağlıklı kişilerde plazma kortizol konsantrasyonunun diurnal varyasyonu (58).

Adrenal korteks, gonadlar ve plasenta; kolesterolden sentezlenen bir biyo-düzenleyici molekül sınıfı olan steroid hormonların sentezi ve salgılanması için özelleşmiş anatomik bölgelerdir (52). Adrenal kortekste üç sınıf steroid hormon üretilir: Mineralokortikoidler, glukokortikoidler ve adrenal androjenler. Steroidler, mevalonat yolu tarafından üretilen bir triterpen olan skualenin halkalaşması ile sentezlenen, dört alifatik halkadan oluşan, 17 karbonlu bir tetrasiklik çekirdek ile karakterize edilir (52). Steroid omurgası; A, B, C ve D olarak adlandırılan üç hekzasiklik ve bir pentasiklik karbon halkasından oluşur. Kolesterol için geleneksel karbon numaralandırma sistemi, Şekil 5'de gösterilmektedir (52). A halkasının 3. pozisyonunda hidroksil grubuna sahip steroidler, sterol alt grubunu oluşturur. Kolesterol de bir steroldür. Kolesterol, 5. ve 6. karbonları arasında bir çift bağa ve sekiz karbonlu alifatik bir yan gruba sahiptir. Diyetle alınan ve de novo sentezlenen kolesterol, insanlardaki tüm steroid hormonların öncüsüdür (52).



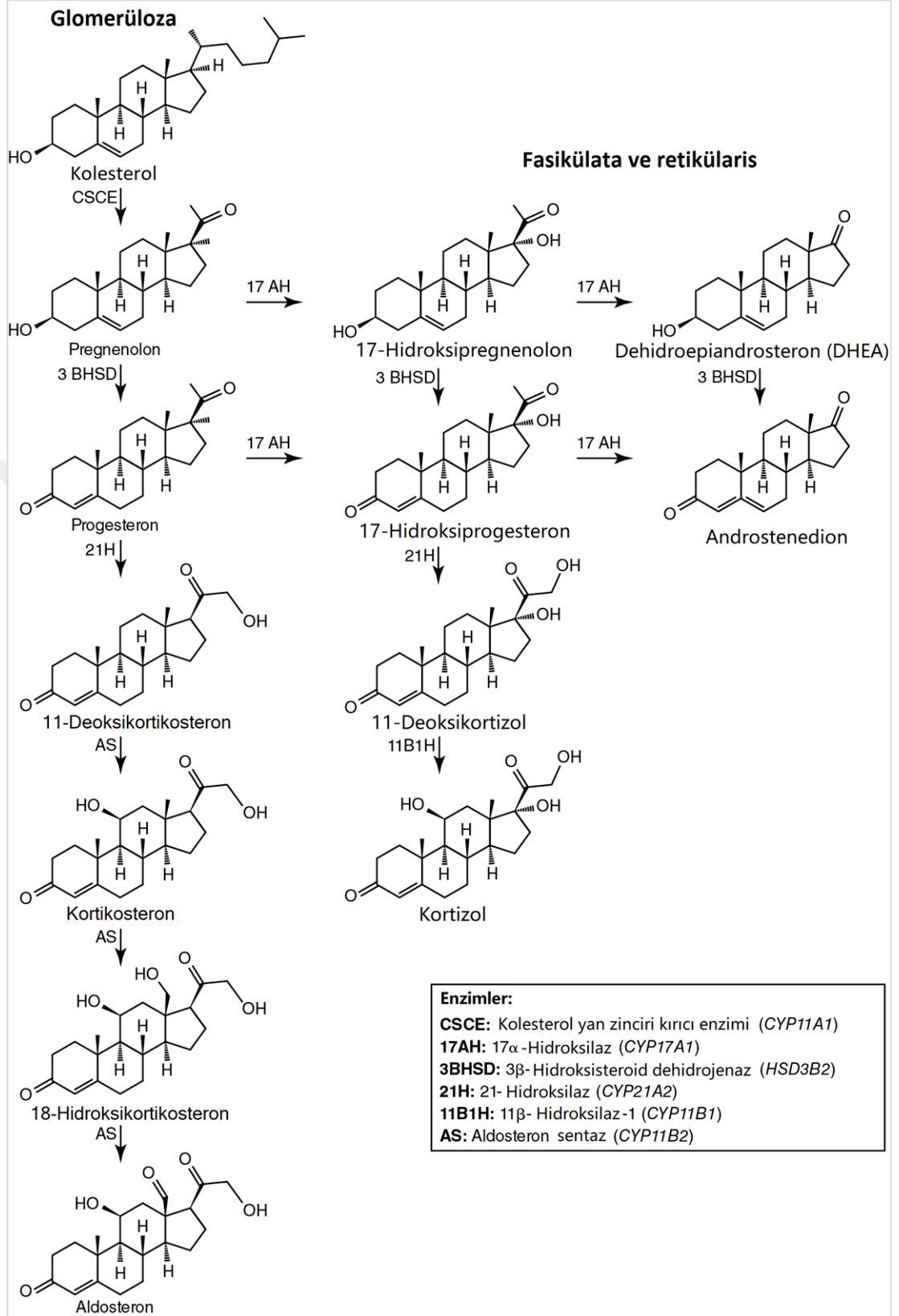
Şekil 5. Kolesterol molekülü için geleneksel numaralandırma sistemi (52).

Adrenal korteks hücreleri kolesterol sentezleme kapasitesine sahip olmasına rağmen, kolesterolün çoğu (toplamın yaklaşık %80'i) hücrelere düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörleri (low-density lipoprotein; LDL) tarafından alınır (52). Sitozolik kolesterol esterase, serbest kolesterol elde etmek için kolesterol esterlerini hidrolize eder; bu, kolesterolün mitokondriye taşınmasından önce gerçekleşen önemli bir adımdır (59). Steroid hormon biyosentezinin hız sınırlayıcı basamağında; kolesterol, 8p11.2 kromozomu üzerinde StAR geni tarafından kodlanan 285 amino asitlik bir taşıma proteini olan steroidojenik akut düzenleyici (StAR) proteinin yardımıyla mitokondri iç zarına geçer. Adrenal bezde StAR ekspresyonu ACTH tarafından düzenlenir. Luteinizan hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) diğer steroidojenik dokularda StAR ekspresyonunu uyarır (60). Ayrıca epidermal büyüme faktörü (EGF), insülin benzeri büyüme faktörü (IGF), prolaktin, gonadotropin salgılatıcı hormon (GnRH) ve makrofaj kaynaklı faktörler gibi ek düzenleyici faktörler de StAR ekspresyonunu etkileyebilir (61). Kolesterol, mitokondri iç zarının yüzeyine taşındığında, kolesterol yan zinciri kırıcı enzimi (kolesterol desmolaz; CYP11A1), 17. karbondaki yan zincirden bir 4-metilpental grubunu hidrolitik olarak ayırır ve tüm adrenal steroidlerin öncüsü olan 19 karbonlu pregnenolon oluşur (52).

Pregnenolondan; aldosteron, kortizol, dehidroepiandrosteron (DHEA) ve androstenedion sentezine giden biyosentetik yollar Şekil 6'da gösterilmiştir (52). Tüm adrenal steroidler, beş tanesi sitokrom p450 ailesine ait altı farklı enzimin etkisiyle kolesterolden sentezlenir. Enzimlerin her birindeki genetik eksiklik, hafif

adrenokortikal yetmezlikten, adrenokortikal hormonların tümünün kaybına kadar değişen bozukluklara neden olabilir. Aldosteron üretimi yalnızca zona glomerülozada gerçekleşirken; zona fasikülata ve zona retikülaris tabakalarının her ikisi de kortizol ve adrenal androjenleri üretir (52).

Zona glomerülozada pregnenolon, 3β -hidroksisteroid dehidrojenaz-2 (HSD3B2) tarafından progesterona oksitlenir (52). 21-hidroksilaz enziminin (CYP21A2) etkisiyle 21. pozisyonundaki (yan zincirde) metil grubuna bir hidroksil grubu eklenir ve 11-Deoksikortikosteron (11-DOC) üretilir. 11-DOC daha sonra aldosteron sentaz tarafından katalize edilen, 11. pozisyona bir hidroksil grubunun eklenmesiyle kortikosterona dönüştürülür. Aldosteronun biyosentezindeki son iki adımın her ikisi de aldosteron sentaz tarafından katalize edilir. Birinci adımda, 18-hidroksikortikosteron, kortikosteronun 18. pozisyonundaki metil grubunun hidroksilasyonu ile üretilir ve ikinci adımda, yeni eklenen hidroksil grubu, aldosteron üreten bir aldehite oksitlenir (bkz. Şekil 6) (62).



Şekil 6. Adrenal korteks steroid hormonlarının biyosentezi (52).

Zona fasikülatada 17 α -hidroksilaz (CYP17A1), sırasıyla 17-hidroksipregnenolon ve 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) oluşturmak için sırasıyla pregnenolon veya progesteronun 17. pozisyona bir hidroksil grubu ekler. Pregnenolonun zona glomerülozada progesterona dönüştürülmesi gibi; 17-hidroksipregnenolon, zona fasikülatada 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz-2 tarafından 17-hidroksiprogesterona dönüştürülebilir. 17-hidroksiprogesteronun 21. karbonu, 21-hidroksilaz enzimi tarafından hidroksile edilerek 11-deoksikortizol (11-DC) üretilir. Daha sonra 11-DC, 11. konumunda 11 β -hidroksilaz-1 ile hidroksile edilerek kortizol üretilir (bkz. Şekil 6) (52).

Zona retiküleriste 17 α -hidroksilaz enzimi, 17-hidroksipregnenolon ve 17-hidroksiprogesteronu 17. karbonlarındaki hidroksil grubunu çıkararak sırasıyla 19 karbonlu DHEA ve androstenediona dönüştürür. Androstenedion ayrıca 3 β -hidroksisteroid dehidrogenaz tarafından katalize edilen C-3 hidroksil grubunun Δ^{5-4} izomerizasyonu ve oksidasyonu ile DHEA'dan da üretilebilir. (bkz. Şekil 6) (52).

Çeşitli sentetik ve endojen adrenokortikal steroidlerin göreceli glukokortikoid ve mineralokortikoid aktiviteleri Tablo 2'de verilmiştir (52). Aldosteronun bağlandığı mineralokortikoid reseptörü (MR, NR3C2), aldosteron ve kortizol için eşit afiniteye sahiptir; ancak nefronun distal tübülü gibi dokularda mineralokortikoid reseptörü, 11 β -hidroksisteroid dehidrogenaz-2 (HSD11B2) enzimiyle beraber eksprese edilir. Bu sayede kortizol, HSD11B2 enzimi ekspere eden dokularda MR reseptörüne bağlanmayan kortizona dönüştürür (63). Fizyolojik koşullarda dolaşımdaki kortizol konsantrasyonu (275-550 nmol/L), aldosteron konsantrasyonundan (55-250 pmol/L) 1000 kat daha yüksektir (52). Mineralokortikoid reseptörlerin, HSD11B2 enzimi olmadan eksprese edildiği dokularda, aldosteron önemli ölçüde yükselmediği sürece MR'nin ana ligandı kortizoldür. Eşdeğer afinite ile bağlanmalarına rağmen kortizol ve aldosteron, MR'de farklı fizyolojik etkilere karşılık gelen farklı değişikliklere neden olur. Kortizol, bir aldosteron antagonisti olarak işlev görür (64). Hepatik UDP-glukuronosiltransferaz enzimleri; aldosteronu, 18 β -glukuronidasyon ile tetrahidroglukuronid metabolitine dönüştürür (65). Aldosteronun plazma yarı ömrü 20 dakikadan azdır (52).

Tablo 2. Kortikosteroidlerin nispi etkileri (potens) (52).

Kortikosteroid	Glukokortikoid aktivite	Mineralokortikoid aktivite
Aldosteron	0.1	400
Kortikosteron	0.2	2
Kortizol	1	1
Kortizon ^a	0.7	0.7
Deksametazon ^b	50-150	2
11-Deoksikortikosteron	0	20
Fludrokortizon ^b	10	400
6 α -Metilprednizolon ^b	5	0.5
Prednizolon ^b	4	0.7
Prednizon ^{a,b}	4	0.7
Triamsinolon ^b	3	0

a: Kortizon ve prednizon, karaciğerde sırasıyla kortizol ve prednizolona dönüşene kadar inaktiftir. b: Sentetik kortikosteroidler.

Glukokortikoid reseptörü (GR, NR3C1) de MR ile aynı nükleer reseptör alt grup 3C transkripsiyon faktörleri ailesinin bir üyesidir ve hemen hemen tüm omurgalı hücrelerinde eksprese edilir (66). Çeşitli endojen ve sentetik glukokortikoidler, GR'ye bağlanarak büyüme, gelişme, metabolizma, stres cevabı, inflamasyon ve bir dizi başka işlev ile ilişkili binlerce genin ifadesinde artış veya azalışının düzenlenmesiyle sonuçlanan bir dizi moleküler olayı başlatır (52).

Dolaşımdaki kortizol çoğunlukla hepatik UDP-glukuronosiltransferaz enzimleri tarafından glukuronide konjuge edilen dihidrokortizol ve tetrahidrokortizole indirgenir (52). Kortizolün %10'u, idrarla atılmadan önce glukuronik asit veya sülfata konjuge olan 17-ketosteroid metabolitine dönüştürülür. Kortizolün plazma yarı ömrü 60 dakikanın biraz üzerindedir; ancak kortizol konsantrasyonları çok yüksek olduğunda yarı ömrü daha uzun olabilir (67).

2.2.2. Dolaşımdaki Serbest Kortizolün Tükürüğe Geçişi

Dolaşımdaki kortizolün yaklaşık %90'ı kortikosteroid bağlayıcı globuline (CBG) bağlıdır; az miktarda kortizol albümine bağlanır ve toplam kortizolün yalnızca

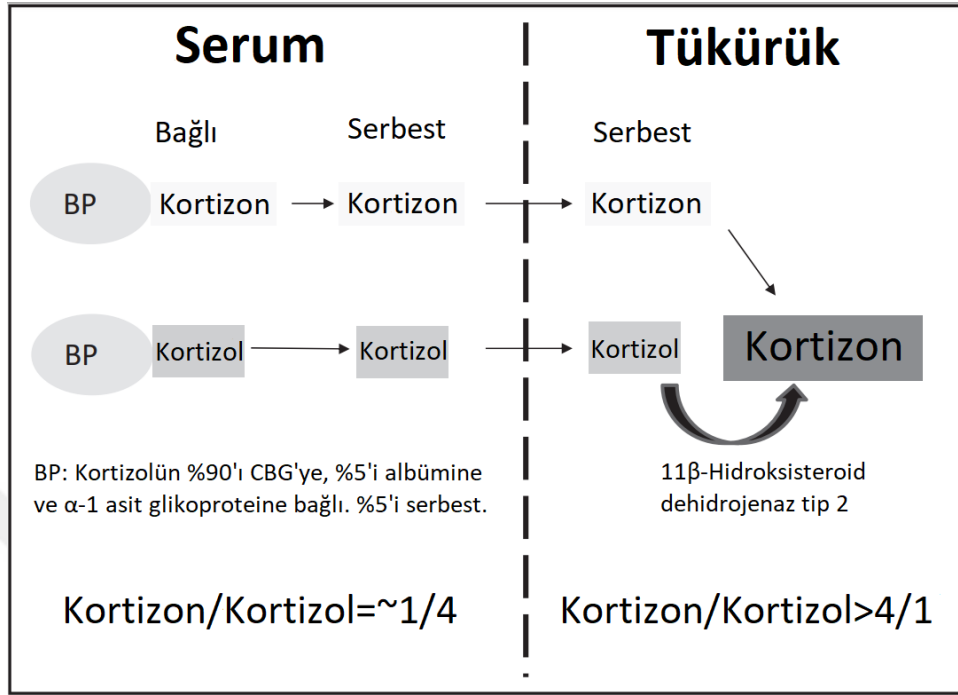
yaklaşık %4'ü serbest yani aktif durumdadır (68). CBG'nin afinitesi glikozilasyon ve sıcaklık gibi faktörlerin etkisiyle değişkenlik gösterebilir (52). Bağlayıcı proteinler, dolaşımdaki hormonun büyük bir oranını inaktif (bağlı) bir formda tutarak; serbest hormon konsantrasyonunun ve hormonal aktivitenin düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.

Steroidler tükürüğe, hücre içi difüzyon ve ultrafiltrasyon olmak üzere iki yolla ulaşır (69). Tükürük bezi asiner hücrelerinin lipitten zengin hücre membranında çözünen plazma bileşenleri, basit difüzyonla hücreye ve buradan tükürüğe geçer (70). Bu mekanizma, yağda çözünen ve proteinlere bağlı olmayan steroidler için geçerlidir (70). Hücre içine difüzyondan farklı olarak, molekül ağırlığı yaklaşık 1900 kDa'dan az olan plazmadaki proteine bağlı olmayan bileşenler, su ile asiner hücrelerin sıkı bağlantıları arasından geçerek de tükürüğe ulaşabilir (41). Steroid sülfat veya glukuronid konjugatları gibi küçük polar moleküllerin tükürüğe girişi, bu ultrafiltrasyon yolu ile sınırlıdır (69). Bu iki mekanizmanın bir sonucu olarak kortizol, östradiol ve testosteron gibi konjuge olmayan steroidlerin tükürükteki konsantrasyonları serumdaki serbest konsantrasyonlarını yansıtır (71).

Tükürük bezleri, steroidleri metabolize etme kapasitesine sahiptir (72). Bu nedenle tükürük ve serum serbest steroid konsantrasyonları arasında bir korelasyon olmasına rağmen konsantrasyonlar farklılık gösterebilir (69). Plazmadaki kortizol düzeyi kortizondan 4 kat daha yüksek olmasına rağmen; tükürükte bu durum tersine döner. Tükürükte, kortizon düzeyi kortizolün 4 katına çıkar (70). Serum ve tükürük kortizol/kortizon oranlarındaki bu belirgin farkın iki ana sebebi vardır (69):

- Serumdaki CBG, kortizolü kortizona göre 10 kat daha güçlü bir şekilde bağlar (69). Bu nedenle serumdaki serbest kortizon oranı, kortizole göre daha yüksektir ve bu durum tükürüğe geçen steroid konsantrasyonlarına yansır.
- İkinci neden, tükürük bezlerinin mineralokortikoid hormonların hedef organlarından olması ve 11 β -hidroksisteroid dehidrojenaz-2 (HSD11B2) enzimi eksprese etmesidir (73). Bu enzim, kortizolü geri dönüşümsüz olarak kortizona metabolize ederek mineralokortikoid reseptörlerini kortizolün etkisinden korur (74). HSD11B2 enzimi, tükürük bezinden

geçen kortizolün bir kısmını kortizona metabolize ederek tükürükteki daha yüksek kortizon/kortizol oranına katkıda bulunur (bkz. Şekil 7) (69).



BP: Bağlayıcı protein.

Şekil 7. Serumdan tükürüğe geçişte kortizol/kortizon oranının değişimi (72).

2.2.3. Tükürük Kortizolünün Klinik Kullanımı

Serumdaki serbest veya total kortizol ile tükürük kortizolü arasında güçlü korelasyon olduğunu bildiren önemli sayıda çalışma vardır (69, 75–78). Bununla birlikte Dorn ve arkadaşları, tükürük ve serum kortizolünün sirkadiyen ritmini 24 saat boyunca, saatlik numuneler toplayarak karşılaştırdılar (79). İki profilin senkronize olduğu ve dolaşımdaki kortizol ritmini değerlendirilmek için tükürük kortizolünün serum kortizolü yerine kullanılabileceği sonucuna vardılar (79).

Adrenal yetmezlikte sabah tükürük kortizolü konsantrasyonları azalırken; Cushing sendromunda gece yarısı tükürük kortizolü konsantrasyonları artar (80). Tükürük kortizolü ölçümü, oral kontraseptif kullanımı gibi CBG düzeyinde değişkenliğe yol açan durumlarda toplam plazma kortizolüne göre daha iyi performans gösterir (80). Karaciğer hastalığı, nefrotik sendrom, multipl miyelom, hipotiroidizm ve obezite gibi CBG eksikliği ile ilişkili durumlar, toplam plazma kortizol

düzeylerinde düşüklüğe neden olduğundan, bu durumlarda tükürükte serbest kortizol ölçümü faydalıdır (81).

Cushing sendromu

Tükürükte kortizol ölçümünün klinik yararı için en iyi kanıtı sahip olan durum Cushing sendromudur (81). Vücutta aşırı glukokortikoid üretimi; hipertansiyon, santral obezite, deride strialar, "ay dede yüz", torasik kifoz, akne, hipertrikoz, supraklaviküler yağ birikimi, halsizlik, adet düzensizliği, cinsel işlev bozukluğu, yorgunluk, baş ağrısı, psikoz ve hiperglisemi gibi klinik bulguların görüldüğü Cushing sendromuna (CS) neden olur (82). Hastalığa özgü klinik bulguların olmaması ve bazı hastalarda yalnızca birkaç belirti ve bulgu göstermesi nedeniyle CS teşhisi karmaşıktır (bkz. Tablo 3) (52).

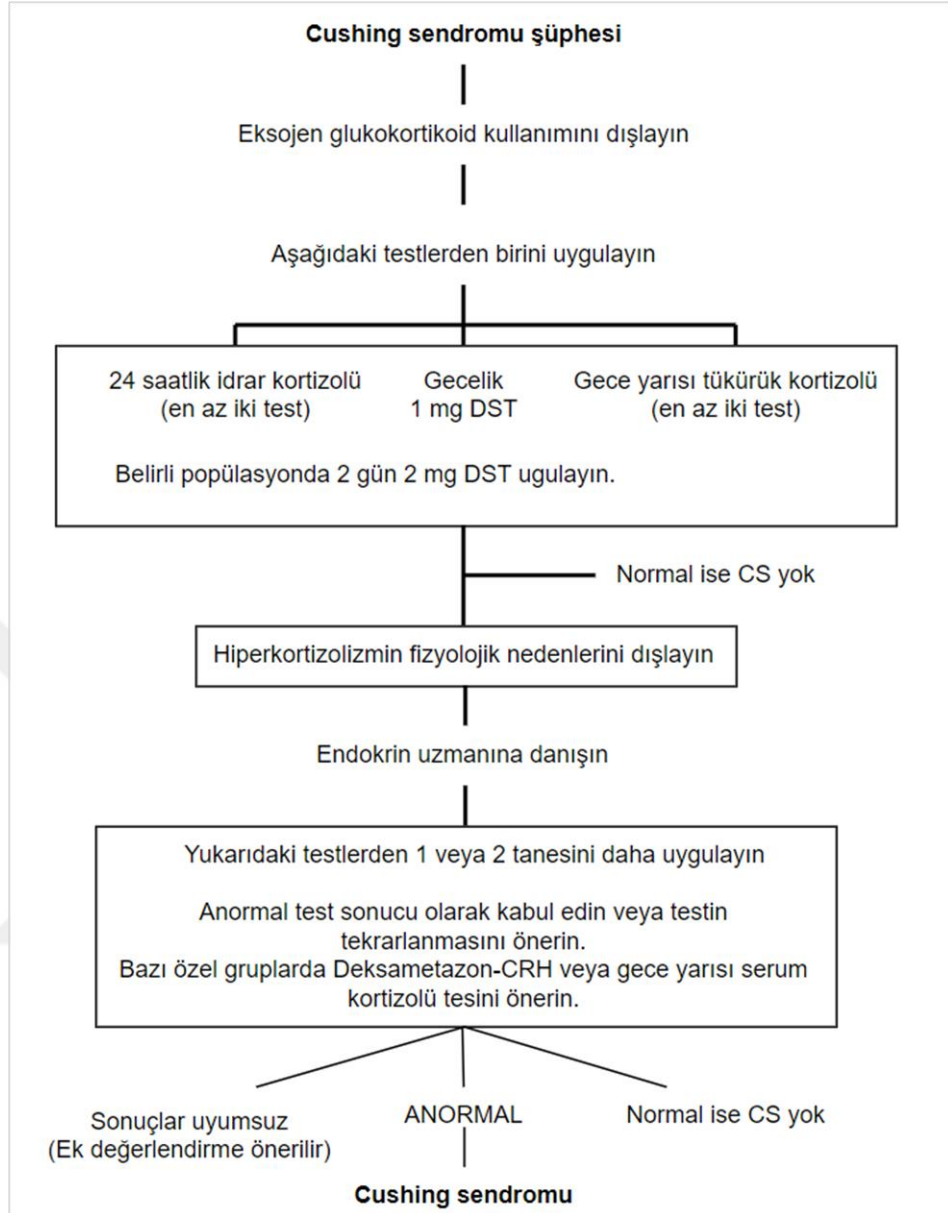
CS'nin en sık nedeni, tedavi amaçlı uzun süreli glukokortikoid kullanımına bağlı, iatrojenik Cushing sendromudur (83). İatrojenik CS hariç tutulacak olursa, endojen kaynaklı CS; hipofiz ve hipofiz dışı kaynaklardan ACTH ve CRH salgılanması ve daha az oranda adrenal bezin kendi patolojileri sonucunda, aşırı miktarda glukokortikoid salgılanması sonucu oluşmaktadır (bkz. Tablo 3) (83). Endojen kaynaklı CS nadir görülen bir hastalıktır ve yıllık insidansı milyonda 0.7-2.4 olarak bilinmektedir (84). Hiperkortizolizm prevalansı, kötü kontrollü diabetes mellitus ve hipertansiyonlu olgularda %2-5'e ulaşmaktadır (84). Kadınlarda erkeklerden 3 kat daha fazla görülmektedir. Nadir görülmesine rağmen, tedavi edilmezse yüksek oranda morbidite ve mortaliteye neden olduğu için tanısı, tedavisi ve takibi önemli olan bir hastalıktır (83).

Tablo 3. Cushing sendromunun nedenleri (83).

ACTH bağımlı olanlar
• Hipofiz adenomu (Cushing Hastalığı) • Ektopik ACTH sendromu • Ektopik CRH sendromu
ACTH bağımlı olmayanlar
• Adrenal neoplazi (Adenom, karsinom) • Nodüler adrenal hiperplazi ◦ Primer pigmente nodüler hastalık ◦ Masif makronodüler adrenonodüler hiperplazi ◦ Besinlere bağlı (Gastrik inhibitör peptid aracılı)
Psödo-Cushing sendromu
• Obezite • Depresyon • Alkol bağımlılığı

Cushing sendromu tanısında tükürük kortizolünün önemi

Sağlıklı gönüllülerde ve Cushing sendromlu hastalarda, tükürük ve plazma kortizolünü karşılaştıran araştırmalar, tükürük kortizolünün plazmadaki günlük ritimle tam olarak paralel olduğunu göstermiştir (85). Bununla birlikte; ACTH ve deksametazon ile tükürük kortizolü düzeylerinde meydana gelen değişikliklerin, plazmadaki kortizol değişikliklerine benzer olduğu gösterilmiştir (77). Gece yarısı tükürük kortizolü (23.00-24.00 saatleri arasında), Endokrin Derneği'nin (*Endocrine Society*) Cushing Sendromu Tanı Kılavuzu'nda üç tarama testinden biri olarak yer almaktadır (bkz. Şekil 8) (86). Hiperkortizolizm şüphesinde birinci basamak tarama testlerine başlanmadan önce, eksojen steroid kullanımı ekarte edilmelidir (83).



CS: Cushing sendromu, DST: Deksametazon süpresyon testi, CRH: Kortikotropin salgılatan hormon.

Şekil 8. Cushing sendromu şüphesinde gerçekleştirilecek birinci basamak tarama testleri algoritması (86).

Gece yarısı tükürük kortizolü konsantrasyonunun, sağlıklı kişilerde olduğu gibi 23.00-24.00 saatleri arasında düşük düzeylere inmemesi, Cushing sendromunda sirkadiyan ritimin bozulmasıyla tutarlı bir laboratuvar bulgusudur (87). Cushing sendromundaki bu fizyolojik değişiklik, gece yarısı serum veya tükürük kortizolü ölçümlerinin temelini oluşturur (86). Gece yarısı tükürük kortizolünün Cushing sendromu için tanısal performansını değerlendiren çalışmalarda, genellikle %90'ın üzerinde duyarlılık ve özgüllük bulunmuştur (88–91).

Tükürük numunesi toplanmadan önce; ağız hijyeni işlemlerinden, tütün kullanımından ve su dışında herhangi bir şey yeme veya içmeden kaçınılmalıdır. Bu önlemlere numune alımından ne kadar süre önce başlanacağına dair standart bir yaklaşım yoktur; 30 dakika (92), 60 dakika (93) veya 2 saat (94) olmak üzere farklı uygulamalar kullanılmaktadır. Badrick ve arkadaşları; tükürük kortizolü düzeylerinin sigara içenlerde, içmeyenlere göre daha yüksek olduğunu göstermiştir (95). Ağız boşluğundan kaynaklanabilecek olası kan kontaminasyonu, tükürük kortizolü ölçümlerinde yanlış yüksek sonuçlara neden olabilir (81).

Konjenital adrenal hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazinin (KAH) tedavisi, ACTH sekresyonunu baskılayarak adrenal androjen üretimini azaltmayı amaçlar (81). İzlemde laboratuvar bulgusu olarak, serumda 17-hidroksiprogesteron (17-OHP) ölçümü kullanılır; ancak 17-OHP düzeylerindeki dalgalanmalar nedeniyle, tedavi takibinde bu analitin değerlerini normale döndürmek, aşırı tedaviye neden olabilir (96). Bu amaçla tükürük kortizolünün, KAH'de steroid tedavisinin ayarlanmasında kullanılabileceği önerilmiştir (97, 98).

Adrenal yetmezlik

Addison hastalığı olan hastaların değerlendirilmesinde tek bir sabah plazma ve tükürük kortizolü korelasyon gösterse de ($r=0.73$, $p=0.011$), adrenal yetmezlik tanısında yararlı değildirler (81, 99). Tek bir sabah tükürük kortizolü ölçümü, Addison hastalığının tespiti için sırasıyla yalnızca %33 ve %20'lik bir duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir (99).

2.2.4. Tükürük Kortizolü Ölçüm Yöntemleri

1978 yılında tükürükte kortizol analizinde, direkt radyo immünölçüm kullanılan bir yöntem geliştirildi (100). 2000'li yılların başında, immünölçüm temelli otomatize yöntemlerde gerçekleştirilen serum kortizolü ölçümlerinde analitik hassasiyet artırılarak; tükürükteki serbest kortizolün analizi, bu sistemlerde mümkün hâle geldi (101). Ancak, özellikle tükürükte yüksek konsantrasyonda bulunan kortizon olmak üzere diğer steroidlerle meydana gelen çapraz reaksiyonlar, immünölçüm

yöntemlerinde analitik özgüllüğün azalmasına neden olabilmektedir (102). Gece yarısı tükürük kortizolü konsantrasyonları, alt ölçüm sınırına yakın olduğu için, analitik duyarlılık ile ilgili problemlerle de karşılaşmaktadır (93).

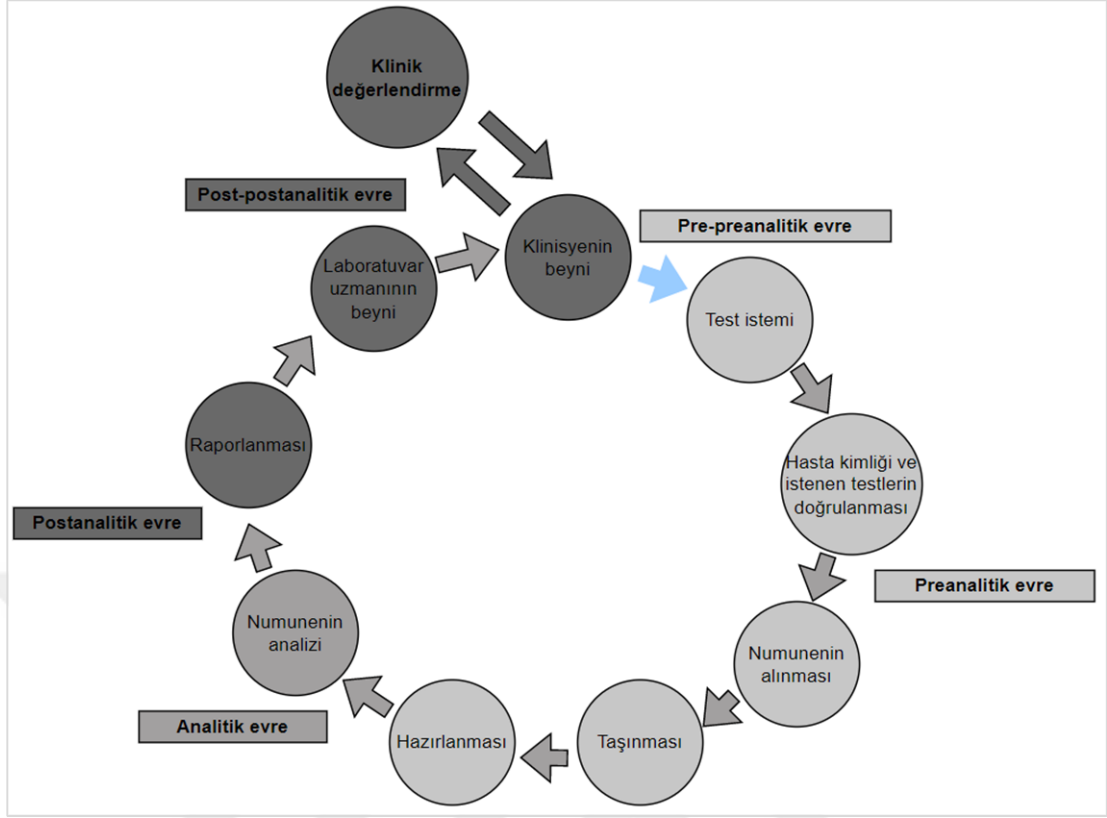
LC-MS/MS ile tükürük kortizolü ölçüm yöntemi ilk kez 2003 yılında geliştirildi ve analitik özgüllüğün, daha önceki yöntemlere göre arttığı görüldü (103). Sonrasında, daha hızlı ve yüksek verimli analizler gerçekleştirebilmek amacıyla tükürük kortizolü ölçümünde birçok LC-MS/MS yöntemi geliştirildi (104, 105). Ancak, bu yöntemler, standardizasyon eksikliği nedeniyle rutin uygulamada henüz yaygın kullanılmamaktadır (92, 106). LC-MS/MS ekipmanlarının maliyetli oluşu ve bu ölçümlerin tecrübeli personel gerektirmesi nedeniyle, kullanımı kolay olan otomatize immünölçüm yöntemleri daha yaygın kullanılmaktadır (81).

Tükürükte kortizol, kararlı bir yapıya sahiptir. Bir çalışmada santrifüj edilmiş tükürük numuneleri 5°C'de 3 ay ve -80°C'de 1 yıl kadar saklanmış ve kortizol düzeylerinde başlangıca göre belirgin bir fark görülmemiştir (107).

2.3. BİYOLOJİK VARYASYON

2.3.1. Toplam Test Süreci ve Test Sonuçlarında Varyasyon Kaynakları

Tıbbi laboratuvarlarda toplam test süreci Lundberg tarafından 1981 yılında “Beyinden Beyine Laboratuvar Döngüsü” olarak tanımlanmıştır (2). Bu döngüde, laboratuvar sonuçlarının elde edilmesine kadar geçen 9 basamaklı süreç, klinisyenin testi istemesi ile başlar ve laboratuvar tarafından sağlanan bilgilere dayalı olarak hasta için verilen tıbbi kararlar ile biter (bkz. Şekil 9) (108).



Şekil 9. Beyinden beyine laboratuvar döngüsünün adımları (108).

Laboratuvar tıbbında üretilen herhangi bir sonucun belirsizliğine katkıda bulunan, toplam test süreci varyasyonlarının yanında farklı değişkenler de vardır. Bu değişkenlerden birisi de biyolojik varyasyondur (3). Biyolojik varyasyon "homeostatik bir ayar noktası etrafındaki rastgele dalgalanmalar" olarak tanımlanır (109). Biyolojik varyasyon (BV), en önemli varyasyon kaynaklarından biridir ve bir laboratuvar ölçümüyle ilgili yapılacak herhangi bir yorumda dikkate alınmalıdır.

Biyolojik varyasyonun çeşitli türleri vardır. Ölçülen büyüklüklerin konsantrasyonu veya aktivitesi, yaşam süresi boyunca, bazıları yavaş, bazıları daha hızlı değişir. Bu değişiklikler özellikle yenidoğan dönemi, çocukluk, ergenlik, menopoz, yetişkinlik ve ileri yaş gibi hızlı fizyolojik gelişme zamanlarında farklıdır (5). Ölçülen büyüklüklerin konsantrasyonu veya aktivitesi kadın ve erkek arasında da farklılık gösterebilir. Bu varyasyon, yaşa ve/veya cinsiyete göre referans aralıklarının oluşturulmasıyla halledilir. Bazı analitler, tahmin edilebilir döngüsel ritimlere sahiptir. Bunlar doğada günlük (demir vb.), aylık (kadınlarda hipofiz gonadotropinleri vb.) veya mevsimsel (vitamin D vb.) olabilir. Yukarıda bahsedilen döngüler boyunca

beklenen değerlerin bilinmesi klinik yorumlama için hayati önem taşır. Analiz için numunelerin alınması uygun zamanlarda gerçekleştirilmelidir. Beklenen ritmin olmaması bir hastalığın göstergesi olabilir (3).

1960 yılında Schneider, bir grupta gözlemlenen değerlerin dağılımını "grubun bireysel üyelerinin değerlerini gerçek grup değerinden uzaklaştırmak için rastgele hareket eden çok sayıda tanımlanmamış kuvvetin etkisi" olarak tanımladı (110). Her bireyden bir sonucun dahil edildiği bir veri setindeki genel varyasyona katkıda bulunan üç faktörü tanımladı:

- Bireyler arasında gerçek farklılıklar yaratan faktörler (bireyler arası).
- Her bir bireyde zaman zaman gerçek farklılıklar yaratan faktörler (birey içi).
- Ölçülebilen (analitik) her analitin ölçümünden ölçümüne fark yaratan faktörler (analitik) (110).

2.3.2. Biyolojik Varyasyon Bileşenleri

Biyolojik varyasyona ilişkin verilerin üretilmesi, çok sayıda referans bireyden alınan bir örnek yerine aynı bireylerden en az iki örneğe ihtiyaç duyulması dışında, popülasyona dayalı referans aralıkların elde edilmesi çalışmalarına oldukça benzerdir (3). BV çalışmaları genellikle, daha küçük bir referans birey kohortundan alınan daha yüksek sayıda örneği içeren prospektif deneysel çalışmalar olarak planlanır (111). BV bileşenlerini hesaplamada; varyans analizi, ANOVA veya benzeri geleneksel bir istatistiksel yaklaşım kullanılabilir; bununla birlikte yakın zamanda yayınlanan Bayes yaklaşımının kullanımı da önerilmektedir (112, 113). Ayrıca, laboratuvar bilgi sisteminde yer alan büyük veri kohortlarını kullanarak, retrospektif olarak indirekt yöntemle biyolojik varyasyon hesaplamaya yönelik ilgi de giderek artmaktadır (114–119).

2.3.2.1. Prospektif çalışmalar

2.3.2.1.1. Prospektif çalışmaların tasarımı

Prospektif yaklaşımda, biyolojik varyasyonun bileşenleri olan birey içi biyolojik varyasyon (CV_I), bireyler arası biyolojik varyasyon (CV_G) ve analitik varyasyonun (CV_A) hesaplanmasında aşağıdaki çalışma tasarımı önerilir (109):

- Referans bireylerden oluşan bir grubun belirlenmesi.
- Tüm preanalitik varyasyon kaynaklarının en aza indirilerek, bireylerden düzenli zaman aralıklarında bir dizi numune alınması.
- Numune transportunun standart bir prosedürle sağlanması ve numunelerin analiz gününe kadar kontrollü koşullar altında saklanması.
- Analitik varyasyonu en aza indirerek numunelerin tek çalışmada en az iki tekrarlı analiz edilmesi.

Yaygın olarak kullanılan bu tasarım, sıkı homeostatik kontrole ve düşük CV_I'ya sahip analitler için oldukça uygundur (3). Tipik bir çalışma tasarımı, 20 kişiden oluşan bir referans birey kohortundan haftalık olarak toplanan 10 örnekten oluşur. Bu çalışmalarda amaç, her bireyden aynı sayıda örneğin olduğu dengeli bir tasarıma sahip olmaktır; ancak gerçekte, tüm katılımcılar her hafta katılım sağlayamadığından veya bazı ölçümler aykırı değer olarak kabul edileceğinden her bir bireyden eşit sayıda numune elde edilmesi zordur (3).

Tasarımın küçük bir denek grubuna dayandırılması, özellikle alt grupların farklı CV'lara sahip olup olmadığının değerlendirilmesinde bazı zayıflıklar içerebilir (111). Örneğin; çalışma kohortu, eşit sayıda kadın ve erkekten oluşan 20 bireyi kapsıyorsa, cinsiyet alt grupları için yapılan hesaplamalar 10'ar kişiden oluşacaktır (109). Bu tasarımda, cinsiyetin yanında yaş veya etnik köken gibi durumlar değerlendirilmek istendiğinde, alt gruplar için birey sayıları daha da az olacaktır (3). Bu nedenle alt grupları değerlendirmek için klinik bir öngörü mevcut ise; bu durumu göz önünde bulundurarak bir çalışma planlamak gerekir (5). Bunun yanında, biyolojik varyasyon çalışmalarını yürütmeye kolaylık sağladığı için, katılımcılar yaygın olarak hastanedeki yerel personellerden seçilmektedir. Benzer özelliklere sahip katılımcılar ile yapılacak biyolojik varyasyon hesaplamalarının, genel popülasyonu tümüyle yansıtamayacağını bilmek önemlidir (3).

CV_I ve CV_G verilerini güven aralıkları ile hesaplamak; çalışma sonuçlarını değerlendirmek ve benzer çalışmaların bulguları ile karşılaştırma yapabilmek için gereklidir (120). Røraas ve arkadaşları, çalışmaya dahil edilen katılımcı sayısı, kişi başına alınan numune sayısı ve numune başına tekrarlı ölçüm sayısının; o analit için elde edilen CV_I tahmininin güvenilirliği üzerinde etkisi olduğunu gösterdiler (111). Bu

değişkenlerin etkisi, CV_A 'nın CV_I 'ya oranından da etkilenir (111). Oran ne kadar düşük olursa, CV_I için hesaplanacak güven aralıkları da o kadar dar olacaktır. Dolayısıyla çalışmanın CV_I 'yı hesaplama gücü artar (111).

CV_A 'nın hesaplanmasında tavsiye edilen yaklaşım, katılımcılardan alınan numuneleri, analizin gerçekleştirileceği güne kadar donmuş hâlde saklayıp; sonrasında tüm numuneleri aynı günde oda sıcaklığına getirdikten sonra, tek bir çalışmada rastgele ve tekrarlı (en az iki kez) analiz etmektir (120). Biyolojik varyasyon bileşenleri hesaplanacak bazı analitler kararsız yapıda olabilir; ölçümlerin numunelerin toplanmasından hemen sonra yapılması gerekebilir. Bu durumda; CV_A , her numune alma gününde alınan tüm numunelerin iki kez analiz edilmesiyle hesaplanabilir (3). Ancak bu şekilde hesaplanan CV_A , yalnızca çalışma içi impresizyonu temsil eder. Bu nedenle, numunelerin tekrarlı ölçümlerine ek olarak, sistematik bir hata olmadığından emin olmak amacıyla her çalışma günü kalite kontrol materyali de analiz edilmelidir (3). Numunelerin ve kalite kontrol materyalinin ölçüm sonuçlarının varyasyonlarının karşılaştırılabilir olması için kalite kontrol materyalinin matriksi, tercihen numune matriksi ile aynı yapıda olmalıdır (121). Ayrıca, CV_A genellikle konsantrasyon veya aktive düzeyine göre değişiklik gösterebildiğinden; kalite kontrol materyallerinin düzeyleri bireylerden alınan numunelerinkine yakın olmalıdır (122).

2.3.2.1.2. Geleneksel yaklaşımda veri analizi

Numune toplama ve veri analizi için en sık kullanılan yöntem, Fraser ve Harris tarafından detaylandırılmıştır; çalışmaya dahil edilen bireylerden belirli aralıklarla alınan numunelerin tekrarlı ölçümleri gerçekleştirilir (109). Bu yöntemle varyasyon bileşenlerini hesaplamadan önce:

- Bireylerin çalışma boyunca “kararlı durum”da (*steady-state*) oldukları doğrulanmalıdır.
- Veri kümesindeki aykırı değerler dışlanmalıdır.
- Bireylerin kendi içinde homojen olarak dağılmış CV_I 'lara sahip olduğu doğrulanmalıdır.

Kararlı durum (steady-state)

Biyolojik varyasyon verilerinin hesaplanması, değerlendirilen bireylerin homeostatik ayar noktalarının çalışma süresince değişmediğini varsayar (120). Popülasyon, numune alma periyodu boyunca belirli bir yönde eğilim sergiliyorsa; ölçüm sonuçlarının doğal logaritması veya medyanların katlarının (MoM) doğal logaritması alınması yoluyla regresyon eğrisindeki yönelmeler düzeltilerek veriler "kararlı durum" istatistiksel olarak sağlanmalıdır (123).

Normal dağılım ve veri dönüşümü

Biyolojik varyasyonun bileşenlerini güven aralıklarıyla beraber hesaplanmak için kullanılan çoğu istatistiksel yöntem, verilerin normal dağılımını gerektirir (3). Biyolojik veriler genellikle normal dağılım göstermediğinden, ölçüm sonuçlarına logaritmik dönüşüm yapmak gerekebilir (109). Bu yaklaşım sayesinde, CV'ler elde edilirken, dağılımın normale yakın olması sağlanır (124). Buna alternatif bir yaklaşım, Røraas ve arkadaşları tarafından geliştirilen CV-ANOVA yöntemini kullanmaktır (124). Bu yaklaşımda veriler, her bireyin ölçüm değerleri o bireyin ortalama değerine bölünerek dönüştürülür; böylece 1 civarında bir değer dağılımı elde edilir ve tüm katılımcıların ortalaması 1 olduğu için CV_A ve CV_I başka bir dönüşüme gerek kalmadan hesaplanabilir. CV-ANOVA yaklaşımı CV_G 'nin hesaplanmasına uygun değildir (124).

Aykırı değerler

Fraser ve Harris'in yöntemi veya benzer bir yaklaşım uygulanacaksa, aykırı değerlerin çıkarılmaması, biyolojik varyasyon bileşenlerinin hatalı hesaplanmasına yol açar (109). Aykırı değer araştırması üç aşamada gerçekleştirilir (125):

- Tekrarlı ölçümler arasında.
- Her bireyin kendi numuneleri arasında.
- Bireyler arasında.

İlk aşamadaki tekrarlı ölçümlere göre belirlenen aykırı değerlerin dışlanmaması, CV_A 'nın yanlış yüksek ve CV_I 'nin hatalı hesaplanmasına neden olabilir

(3). İkinci aşamada, bireylerin kendi içindeki aykırı değerlerin çıkarılmaması, CV_I'nin yanlış yüksek hesaplanmasına neden olabilir. Üçüncü aşamada bireylerin ortalama değerlerine göre aykırı değerler olarak belirlenip dışlanmaması, CV_G'nin hatalı olarak yüksek hesaplanması ile sonuçlanacaktır; bu durum, yapılan dönüşüme göre CV_A ve CV_I'yı etkileyebilir (3). Bireyler arasındaki aykırı değerlerin değerlendirilmesi için yararlı başka bir yaklaşım, bireylerin ortalama değer ve değer aralıklarının çizgi grafiklerinin gözle değerlendirilmesidir (3). Bulunan aykırı değerlerin sayısı ve biyolojik varyasyon bileşenlerini hesaplamak için kullanılan değerlerin sayısı çalışmada rapor edilmelidir (120).

Homojen dağılım

CV_I verilerinden, özellikle referans değişim değeri elde ederken, birey içi varyansların homojen dağılması önemlidir (3). BV verileri, heterojen dağılım gösteren birey içi varyanslara sahip bir çalışma kohortundan türetilmişse, sonuçlar tüm popülasyona genellenemez (109).

2.3.2.2. Büyük veri kullanarak yapılan retrospektif çalışmalar

BV hesaplanmasında kullanılan prospektif çalışmalar; belirli bir sayıda katılımcıya ihtiyaç duyulması, katılımcılardan belirli bir zaman diliminde birden çok numune alınması ve her numunenin birden fazla kez analiz edilmesine gerek olması nedeniyle uzun zaman ve çaba gerektiren maliyetli çalışmalardır (119). Direkt yöntemlerin dezavantajlarını aşmak amacıyla, laboratuvar bilgi sistemlerinde (LIS) bulunan ölçüm sonuçlarını kullanarak, BV hesaplanmasında indirekt metotların kullanılmasını öneren çalışmalar artmaktadır (114–118, 126). Bu indirekt yöntemler, referans popülasyonun seçilmesinde, veri madenciliği stratejilerinin istatistiksel uygulamalarına dayanmaktadır (127). Biyolojik varyasyonun hesaplamasında indirekt yöntemler birçok avantaj sağlar (119):

- Daha az invazivdir.
- Daha ucuzdur.
- Daha kolay uygulanabilir.

- Büyük örneklemeler kullanıldığından, mevsimsel değişimlerin ve çeşitli gruplar arasındaki farklılıkların daha ayrıntılı analiz edilmesine olanak sağlar.

Ayrıca, pediatrik popülasyon gibi etik nedenlerden dolayı direkt yöntemle BV çalışması yapılamayan veya yalnızca belirli bir hastalık grubunda ölçümü yapılabilen bir analitin biyolojik varyasyonu hesaplamak için indirekt yöntemlerin kullanılması avantaj sağlayabilir (3). Bu avantajlarına rağmen, indirekt yöntemlerin nasıl uygulanması gerektiğiyle ilgili çalışmalar oldukça az sayıdadır (119). Direkt yöntemlerdeki gibi standart protokoller henüz geliştirilmemiştir.

2.3.3. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Kalitesi

BV verileri; popülasyona dayalı referans aralıkların kullanılabilirliğini değerlendirme, referans değişim değeri ve analitik kalite hedeflerinin belirlenmesi gibi hasta güvenliği için önemli olan bilgilerin elde edilmesinde son derece önemlidir. Bu nedenle BV verilerinin güvenilir ve yüksek kalitede olması gerekir (3). Díaz-Garzón ve arkadaşları, lipit profili parametreleri için literatürdeki biyolojik varyasyon verilerinin kalitesini değerlendirdikleri bir çalışmada, birbirinden önemli ölçüde farklılık gösteren hesaplamalar elde edildiğini göstermişlerdir (128). Bu farklılıkların nedeni çok faktörlüdür; ancak en önemli nedenleri çalışma tasarımlarındaki uyum eksikliği, analitik yöntem farklılıkları ve biyolojik varyasyon hesaplamalarında kullanılan farklı istatistiksel yaklaşımlardır (120, 128).

Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu (European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine; EFLM) tarafından 2014 yılında düzenlenen, analitik performans gerekliliklerinin tartışıldığı Milano Konferansı'nın ardından, literatürdeki biyolojik varyasyon çalışmalarının ve verilerinin kalitesini değerlendirmek amacıyla Biyolojik Varyasyon Veri Tabanı Görev ve Çalışma Grubu (Task and Finish Group for the Biological Variation Database; TFG-BVD) oluşturuldu (129). Bu çalışma grubunun hedefleri arasında; BV çalışmalarının değerlendirilmesi için bir kontrol listesi geliştirmek, bu kontrol listesini literatürdeki biyolojik varyasyon çalışmaları üzerine değerlendirmek ve bu çalışmaların temel özelliklerini özetlemek yer almaktadır (130). TFG-BVD ve EFLM

Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu iş birliğiyle, literatürdeki çalışmaların kalitesini değerlendirmede bir standart olarak kullanılmak üzere Biyolojik Varyasyon Verilerini Değerlendirme Kontrol Listesi (Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist; BIVAC) geliştirildi (120). Sonrasında BIVAC ile uyumlu benzer çalışmalardan elde edilen biyolojik varyasyon hesaplamalarından bir havuz elde etmek amacıyla bir meta-analiz yaklaşımı oluşturuldu (131). Son olarak, çok sayıda analit için biyolojik varyasyon verilerini içeren EFLM Biyolojik Varyasyon Veri Tabanı tasarlandı (132).

BIVAC, literatürde yer alan biyolojik varyasyon çalışmalarının güvenilirliğini etkileyebilecek unsurların mevcut olup olmadığını doğrulayarak, bu yayınların metodolojik kalitesini değerlendirmede kullanılacak bir araç olarak tasarlanmıştır (120). Bu kontrol listesi, esas olarak çalışmanın tasarımına, ölçüm prosedürüne ve CV'nın hesaplanmasında kullanılan istatistiksel yaklaşıma odaklanır (3).

2.3.4. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Yorumlanması ve Kullanılması

Bireysellik indeksi

Laboratuvar tıbbında ölçümü gerçekleştirilen çoğu analit, popülasyona dayalı referans aralıklara veya sabit klinik karar verme sınırlarına göre değerlendirilir (3). Bu değerlendirme, hastalık tanısı ve taramalarında hastaya ait önceki sonuçlar mevcut olmadığında zorunludur. 1974 yılında Harris, sağlıklı bireylerden alınan numunelerden ölçülen değerlerin popülasyona dayalı referans aralığa göre dağılımlarını açıklayan “bireysellik indeksi” kavramını ortaya attı (133). Bir analit için CV_I , CV_G 'ye kıyasla yüksek olduğunda; tek bir kişiden elde edilen değerlerin dağılımı, referans bireylerden elde edilen referans aralığının çoğunu kapsayacaktır (134). Bu durumda, popülasyona dayalı referans aralıklar, klinik değerlendirmede yeterli olacaktır (134). Ancak bir analit için CV_I , CV_G 'den daha küçükse; o analit için bir kişiden elde edilen ölçümlerin dağılımı, popülasyona dayalı geleneksel referans aralığının yalnızca küçük bir bölümünü kapsayacaktır (134).

Bireysellik indeksi (II), birey içi biyolojik varyasyon ve analitik varyasyonun karelerinin toplamının karekökünün, bireyler arası biyolojik varyasyona oranı olarak hesaplanır, matematiksel olarak şu şekilde ifade edilir (109):

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

Modern analitik teknoloji ve metodolojilerde CV_A genellikle CV_I 'nin yarısından daha düşük elde edilir. Bu nedenle, formülde CV_A ihmal edilerek II'nin CV_I/CV_G olarak sadeleştirilerek hesaplanması yaygın olarak kabul edilmektedir (3).

CV_I/CV_G yüksek olduğunda (1.4'ün üzerinde daha belirgin olmak üzere), bir kişiden elde edilen ölçüm sonuçları, referans bireylerde bulunan değerlerden türetilen referans aralığının neredeyse tamamını kapsayacaktır. Buna karşılık, CV_I/CV_G düşükse (özellikle 0.6'nın altındaysa); sonuçlar, popülasyona dayalı referans aralığının yalnızca küçük bir bölümünü kapsayacaktır (135).

Bireysellik indeksi düşük yani bireyselliği yüksek olan bir analitin ölçüm sonucu, referans aralık içinde olsa bile, bireyin kendi içinde patolojik bir durumun göstergesi olabilir (5). Popülasyona dayalı referans aralıklar kullanılacak ise, daha yüksek klinik yararlılık elde etmek için CV_I/CV_G oranı artırılmalıdır (3). Biyolojik varyasyon hesaplamasında kullanılan veriler için cinsiyet, yaş gibi özelliklere göre tabakalandırma yapılarak CV_G küçültülebilir ve CV_I/CV_G oranı artırılabilir (133).

Referans değişim değeri ve iki ardışık ölçüm sonucu arasındaki farklılıklar

Referans değişim değeri (RDD), bir kişinin ardışık ölçüm sonuçları arasındaki farklılıkların klinik öneminin değerlendirilmesinde kullanılan nesnel bir araçtır (136). Analitlerin çoğu belirgin bireyselliğe sahip olduğundan; popülasyona dayalı referans aralıklar, bir kişiden elde edilen ardışık ölçüm sonuçlarının yorumlanmasında dezavantajlara sahiptir. Ardışık ölçüm sonuçlarındaki değişimler, kişinin klinik olarak iyileşmesi veya kötüleşmesinden kaynaklanabilir; bunun yanında preanalitik varyasyon (CV_P), analitik varyasyon (CV_A) ve birey içi biyolojik varyasyon (CV_I) olmak üzere üç doğal varyasyon kaynağından da etkilenir (136). Ardışık ölçümler arasında klinik olarak anlamlı fark olup olmadığını anlamamıza yardımcı olan RDD şu formülle ifade edilir (3):

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

Formüldeki Z değeri, istenen güven aralığının standart sapmasının değerini temsil eder. Biyolojik varyasyon çalışmalarında Z değeri genellikle $p < 0.05$ için 1.96, $p < 0.01$ için ise 2.58 olarak kullanılır.

Analizden önceki numune toplama, taşıma, işleme ve saklama aşamaları; personelin iyi eğitimi ve standart çalışma prosedürlerine bağlı kalınarak optimize edilebilir (137). Bu sağlanırsa CV_P 'nin etkisi ihmal edilebilir ve formül şu şekilde sadeleştirilebilir (3):

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

İki yönlü RDD hesaplanmasında kullanılan bu geleneksel yaklaşım, analitik varyasyonun rastgele olduğunu ve bu nedenle CV_A cinsinden tanımlanabileceğini varsaydığı gibi; birey içi biyolojik varyasyonun da homeostatik bir ayar noktası etrafındaki rastgele dalgalanma ile normal dağılım gösterdiğini ve CV_I cinsinden tanımlanabileceğini varsayar (3). Fokkema ve arkadaşları, beyin natriüretik peptitin RDD'sini hesaplanmayı amaçladıkları bir çalışmada, bireylerin ölçümlerinin kendi içlerindeki dağılımının normalden ziyade log-normal olduğunu değerlendirdiler ve RDD'nin hesaplanmasında oldukça farklı bir yaklaşım kullandılar (138). Geleneksel yaklaşımda CV_I , tüm zaman noktalarında tekrarlı ölçümler ve total varyasyon (CV_T) kullanılarak şu şekilde hesaplanır:

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

Log-normal yaklaşımda ise, log-normal dağılımın medyan normal sapması (σ) ve medyan CV_T (ondalık bir değer olarak) kullanılarak şu şekilde hesaplanır (138):

$$\sigma = [\ln(CV_T^2 + 1)]^{1/2}$$

Log-normal yukarı yönlü RDD ($RDD_{yukarı}$) ve log-normal aşağı yönlü RDD ($RDD_{aşağı}$) için asimetric sınırlar şu şekilde belirlenir:

$$RDD_{yukarı} = [e^{(Z \times \sqrt{2} \times \sigma)} - 1] \times 100$$

$$RDD_{aşağı} = [e^{(-Z \times \sqrt{2} \times \sigma)} - 1] \times 100$$

e: Euler sayısı.

Fokkema ve arkadaşlarının log-normal yaklaşımında ardışık ölçüm sonuçlarındaki artış ve azalış için farklı RDD yüzdeleri elde edilir (138). İncelenmekte

olan analit normal dağılım yerine log-normal bir dağılıma sahip olduğunda bu yaklaşımın kullanılması daha uygundur (136).

Biyolojik varyasyona dayalı analitik performans gereklilikleri

Laboratuvar tıbbında gerçekleştirilen ölçümlerde, hasta güvenliğini sağlamak amacıyla ne derecede kaliteye ihtiyaç duyulduğu, her bir analit için kesin olarak tanımlanmalı ve belirtilmelidir (139). 1999 yılında IFCC ve Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'nin (IUPAC) tarafından düzenlenen Stokholm Konferansı'nda, tıbbi laboratuvarlarda gerçekleştirilen ölçümlerde analitik kalite hedeflerini belirlemek için kullanılabilecek yöntemler arasında bir hiyerarşik yaklaşım ilk kez ele alındı (140). Bununla birlikte; konferansı takip eden 10 yıl içinde kaydedilen ilerlemeleri gözden geçirme, uygulamadaki zorlukları aşma ve konuyu daha farklı yönleriyle yeniden değerlendirme gereği fark edildi (141). Bu amaçla EFLM tarafından 2014 yılında Milano'da, analitik kalite gerekliliklerinin nasıl tanımlanacağına ilişkin Stratejik Konferans düzenledi (129). Milano Konferansı'nda sağlanan uzlaşi ile analitik kalite gerekliliklerini belirlemek için Tablo 4'de gösterilen üç farklı model önerildi (142).

Tablo 4. 2014 Milano Stratejik Konferansı'na göre analitik performans gerekliliklerini belirlemek için kullanılacak modeller.

Model 1: Test performansının klinik sonuçlar üzerindeki etkisine dayanır.
a. Direkt çalışmalara dayalı: Test performansının klinik sonuçlar üzerindeki etkisinin araştırılması.
b. İndirekt çalışmalara dayalı: Simülasyon gibi yöntemlerle testin analitik performansının klinik sınıflandırma veya karar sınırları açısından hasta sonuçlarına etkisinin araştırılması.
Model 2: Analitin biyolojik varyasyon verilerine dayanır.
Model 3: Teknik olarak ulaşılabilen en yüksek performans seviyesi olarak tanımlanan ölçüm teknolojisinin son durumuna (state-of-the-art) dayanmaktadır.

Üç model de birbirinden farklı prensiplere sahiptir ve hangisinin en uygun model olduğu, değerlendirilen analite göre değişir (3).

Analitik kalite gerekliliklerinin, klinik etkileri değerlendirerek deneysel çalışmalardan elde edilmesi pratikte zor olduğundan; biyolojik varyasyon verileri, analitlerin birçoğu için kalite hedeflerinin belirlenmesinde en güvenilir bilgi kaynağını oluşturur (125). Fraser ve arkadaşları, biyolojik varyasyon verilerini kullanarak impresizyon, bias ve izin verilen toplam hata (allowable total error; TEa) için analitik kalite hedeflerini; minimum, arzu edilen ve optimal olmak üzere üç kalite düzeyinde hesaplanmasını sağlayan formüller önerdiler (143). Tablo 5’de formülleri gösterilen bu klasik Fraser modeli, laboratuvar tıbbında analitik hedeflerin belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır (125).

Tablo 5. Biyolojik varyasyona dayalı analitik kalite hedefleri

İmpresizyon hedefi	
Minimum	$\dot{I} < 0.75 \times CV_I$
Arzu edilen	$\dot{I} < 0.50 \times CV_I$
Maksimum	$\dot{I} < 0.25 \times CV_I$
Bias hedefi	
Minimum	$B < 0.375 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$
Arzu edilen	$B < 0.250 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$
Maksimum	$B < 0.125 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$
İzin verilen toplam hata	
Minimum	$TEa < 1.65 \times (0.75 \times CV_I) + 0.375 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$
Arzu edilen	$TEa < 1.65 \times (0.50 \times CV_I) + 0.250 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$
Maksimum	$TEa < 1.65 \times (0.25 \times CV_I) + 0.125 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$

İ: İmpresizyon (%), B: Bias (%), TEa: İzin verilen toplam hata (%), CV_I: Birey içi biyolojik varyasyon, CV_G: Bireyler arası biyolojik varyasyon.

Homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayısı

İstenen olasılık ve belirli bir yüzde hata oranı içerisinde homeostatik ayar noktasını belirlemek için gereken numune sayısı (n) şu formülle hesaplanır (109):

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

Burada Z değeri istenilen olasılığa uygun standart sapmayı ve D ise homeostatik ayar noktasına istenilen yakınlık yüzdesini ifade eder.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışmamız T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Tıp Fakültesi Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu tarafından 04.03.2022 tarihli 109991 sayılı kararı ile ve T.C. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Uygulama Merkezi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 22.06.2022 tarihli 1025 numaralı kararı ile onaylanmış olup, karar formları sırasıyla Ek 1 ve Ek 2'de bulunmaktadır.

3.1. ÇALIŞMA POPÜLASYONU VE PROTOKOLÜ

BV hesaplamalarından elde edilecek verilerin rutin klinik uygulamada güvenilir bir şekilde kullanılabilmesi için, BV hesaplanmasına dahil edilen gönüllülerin hedef popülasyon grubunu temsil etmesi gerekir (120). Çalışma protokolümüz EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu'nun yayınladığı “*Biyolojik Varyasyon Üzerine Çalışmaları Değerlendirmek İçin Bir Standart: Biyolojik Varyasyon Verilerini Değerlendirme Kontrol Listesi (BIVAC)*” çalışması göz önünde bulundurularak oluşturuldu (120). Hedeflenen katılımcı sayısı, kişi başına numune sayısı ve tekrarlı ölçümlerin sayısı Røraas ve arkadaşlarının “*Birey İçi Biyolojik Varyasyon için Güven Aralıkları ve Güç Hesaplamaları: İmpresizyon, Tekrar Sayısı, Örnek Sayısı ve Birey Sayısının Etkisi*” çalışması göz önüne alınarak planlandı (111). Çalışmaya sağlıklı 41 gönüllü (21 kadın ve 20 erkek) dahil edildi. Dahil etmede ve hariç tutmada Avrupa Biyolojik Varyasyon Çalışması'nın (EuBIVAS; The European Biological Variation Study) kriterleri uygulandı (144).

Dahil etme kriterleri: Çalışmaya aşağıdaki kriterlerin tümünü karşılayan ve kabul eden adaylar dahil edildi:

1. Bilgilendirilmiş onayı formunu kabul etmek ve imzalamak.
2. Kendini sağlıklı hissetmek, herhangi bir şikâyeti bulunmamak.
3. 18 yaşından büyük olmak.
4. İlaç ve vitamin/mineral takviyesi kullanmamak. Çalışma süresince kullanılması durumunda etken maddenin adını, dozunu ve sıklığını bildirmek.

5. Tütün mamulleri ve alkol kullanmamak. Çalışma süresince kullanılması durumunda türünü ve miktarını bildirmek.

Dışlama kriterleri: Aşağıdaki kriterlerden herhangi birine sahip bireyler çalışmaya dahil edilmedi:

1. Bilinen diyabet tanısı veya serum açlık glukozunun 126 mg/dL (7 mmol/L)'den yüksek olması.
2. Kronik karaciğer veya böbrek hastalığı öyküsü (GGT'nin 150 U/L'den yüksek olması, CKD-EPI formülü kullanılarak hesaplanan GFR'nin 60 ml/dk/1.73 m²'den düşük olması) (145).
3. Dislipidemi (Total kolesterolün 250 mg/dL (6.5 mmol/L)'den yüksek olması.
4. Ailede hemoglobinopati öyküsü.
5. Kronik (kanser, kardiyovasküler veya nörolojik) veya akut hastalığa işaret eden muayene sonucu [CRP'nin 5 mg/L (47.6 nmol/L)'den yüksek olması].
6. HBV/HCV taşıyıcılığı veya HIV enfeksiyonu.
7. Son 4 hafta içinde hastane yatışı veya ağır hastalık öyküsü.
8. Son 3 ay içinde kan bağışında bulunmak.
9. Hamile, emziren veya son 1 yıl içinde doğum yapmış olmak.
10. Araştırmacının görüşüne göre, gönüllüleri çalışmaya katılım nedeniyle risk altına sokabilecek veya çalışmanın sonuçlarını etkileyebilecek herhangi bir diğer önemli hastalık veya bozukluk.

Yaşam tarzları ve sağlık durumları hakkında bilgi sağlamak amacıyla, çalışmaya dahil edilmeden önce katılımcı adaylarından fiziksel aktivite, diyet alışkanlıkları, vitamin/mineral takviyeleri, tütün ve alkol kullanımlarıyla ilgili bilgileri içeren Ek 3'te bulunan anketi doldurmaları istendi.

Çalışmaya başlamadan önce katılımcı adaylarından venöz kan alındı. Tam kan sayımı, HbA1c, biyokimya (açlık glukozu, üre, kreatinin, albümin, total protein, total kolesterol, trigliserit, ALT, AST, GGT, kreatin kinaz, CRP) ve hormon parametreleri (TSH, sT4, serum ACTH ve serum kortizolü) çalışıldı.

Çalışmaya dahil edilen gönüllülerden çalışma protokolünü anlatan bilgilendirilmiş yazılı onam alındı. Katılımcılardan numune alımından önceki 3 gün

içinde aşırı yemek ve fiziksel aktiviteden kaçınmaları istendi. On hafta boyunca her numune alınmasından önce Ek 4'te bulunan kısa anket dolduruldu.

3.1.1. Çalışmanın Gücünün Değerlendirilmesi

Çalışma tasarımı planlanırken, Røraas ve arkadaşlarının bir BV çalışmasının CV_I'yi saptama gücü üzerinde; dahil edilen katılımcı sayısı, kişi başına alınan numune sayısı, numune başına tekrarlı ölçüm sayısı ve CV_A/CV_I oranının etkilerini gösterdikleri çalışma esas alınarak, CV_I hesaplama gücünün en yüksek değer olan 1.00 olması amaçlandı (111).

3.2. NUMUNELERİN TOPLANMASI

Tükürük numuneleri 10 hafta boyunca her pazartesi sabah 08.00-10.00 saatleri arasında polipropilen toplama kaplarına alındı.

Preanalitik evreden kaynaklanan varyasyonu en aza indirmek amacıyla numunelerin standart koşullarda toplanması sağlandı. Kortizol sirkadiyen ritimde salınır; düzeyi sabah 02.00-04.00 saatleri arasında yükselmeye başlar, uyandıktan kısa bir süre sonra zirve yapar, ardından gün içinde düşerek gece yarısında en düşük seviyeye ulaşır (57). Gönüllülerden sabah saat 08.00-10.00 arasına denk gelen uyandıktan sonraki 2. saatte tükürük numunesi vermeleri istendi.

3.2.1. Tükürük Numunesi Toplama Prosedürü

- Katılımcılara numune alma prosedürü ve zamanı ayrıntılı biçimde anlatıldı. Numune alımından 1 saat önce yeme, içme ve ağız hijyeni prosedürlerinden kaçınmaları istendi.
- Toplama zamanı geldiğinde katılımcılardan ağızlarını deiyonize suyla 1 dakika boyunca çalkalayarak temizlemeleri istendi.
- Deiyonize suyla ağız temizlendikten 10 dakika sonra katılımcılardan 100 mL'lik steril polipropilen numune kabına (Fıratmed; lot no: 8870000004) tükürmeleri istendi.
- 10 mL seviyesine kadar tükürükle doldurmaları istendi.
- Numuneleri bekletmeden numune kabul birimine getirmeleri istendi (146).

3.2.2. Numunelerin İşlenmesi ve Saklanması

Çalışmamızda; numune kabul edildikten sonra tükürük, pipet kullanılarak sekonder test tüpüne aktarıldı. 1500 RCF'de 15 dakika santrifüj ettikten sonra supernatan 3 ayrı 1.5 mL'lik altı konik kapaklı polipropilen tüplere (Fıratmed; lot no: 8870000023) porsiyonlandı; etiketlenmesi yapıp kortizol ölçümü yapılacak güne dek -80 °C'de muhafaza edildi (81).

3.3. TÜKÜRÜKTE KORTİZOL ÖLÇÜMÜ

3.3.1. Elektrokemilüminesans İmmünölçüm Yöntemiyle Tükürük Kortizolü Analizi

Çalışma günü, her numuneye ait bir tüp -80°C dondurucudan çıkarıldı ve oda sıcaklığına getirildi. Sonrasında Roche Cobas 8000 e801 modülünde 59557200 lot. numaralı Elecsys® Cortisol II reaktifi kullanılarak aynı gün içinde rastgele ve iki tekrarlı olarak tükürükte kortizol ölçümleri yapıldı. Kalibratör lot. numarası 56122100 idi. Bu yöntem, Referans Malzemeler ve Ölçümler Enstitüsü/IFCC- 451 paneline (ID- GC/MS, izotop dilüsyon gaz kromatografisi kütle spektrometresi) göre standardize edilmiştir (147). Çalışmaya başlamadan önce 55801200 lot. numaralı Elecsys® Precicontrol Universal 1 (PC U1) ve 55801400 lot. numaralı Elecsys® Precicontrol Universal 2 (PC U2) materyali ile kalite kontrol çalışıldı. İki aylık iç kalite kontrol ölçüm sonuçlarına göre impresizyon için CV'ler düşük düzey için %4.75, yüksek düzey için %4.80 idi.

Ölçümler, Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.3.2. Sıvı Kromatografisi Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS) Yöntemiyle Tükürük Kortizolü Analizi

Kütle spektrometresi ile yapılan analizler, pozitif modda çalışan bir elektro sprey iyon kaynağı (ESI) ile donatılmış AB Sciex QTRAP® 5500 triple kuadropol kütle spektrometresi (Massachusetts, ABD) ile entegre bir Shimadzu LC-20-AD (Kyoto, Japonya) kromatografi sistemi kullanılarak gerçekleştirildi. Ölçümler Obikrom (Ankara, Türkiye) marka tükürükte serbest kortizol LC-MS/MS ticari kiti ile

Özel Delta Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda (Ankara, Türkiye) gerçekleştirildi. Kit içeriği Tablo 6'da verilmiştir.

Tablo 6. Obikrom LC-MS/MS tükürükte serbest kortizol kiti içeriği.

Reaktif
Mobil Faz M1 (Lot no: SK220801m1)
Mobil Faz M2 (Lot no: SK220801m2)
Reaktif A (İnternal Standart) (Lot no: SK220801ra)
Reaktif B (Lot no: SK220801rb)
Reaktif C (Lot no: SK220801rc)

Numune Hazırlığı

1.Aşama: Temiz bir polipropilen 1.5 mL'lik altı konik tüpe; 500 µL numune (kalibratör veya kontrol), 10 µL Reaktif A ve 20 µL Reaktif B eklenerek 20 saniye vortekslendi. Daha sonra 22000 RCF'de 10 dk. santrifüj edildi.

2. Aşama: 300 µL süpernatant ayrı bir eppendorfa alındı. 100 µL Reaktif C eklenerek 20 saniye vortekslendi. Hazırlanan örnekler cam viallere alınarak LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

Analitik Performans Özellikleri

Obikrom LC-MS/MS tükürükte serbest kortizol kitinin performans özellikleri Tablo 7'de verilmiştir.

Tablo 7. LC-MS/MS'de tükürükte serbest kortizol tayini kiti analitik performans özellikleri.

		Tükürükte Serbest Kortizol
Doğrusallık		0.2759-1379.5 nmol/L (0.1-500 ng/mL), $r^2=0.9989 \pm 0.0009$
LOD		0.083 nmol/L
LOQ		0.276 nmol/L
Çalışma içi impresizyon	0.276 nmol/L'de	% 5.10
	27.6 nmol/L'de	% 4.76
Günler arası impresizyon	0.276 nmol/L'de	% 10.4
	27.6 nmol/L'de	% 6.44
Çalışma içi doğruluk	2.76 nmol/L'de	% 3.59
	6.90 nmol/L'de	% 1.03
Günler arası doğruluk	2.76 nmol/L'de	% 11.4
	6.90 nmol/L'de	% 2.61

LOD: Limit of detection (saptama sınırı), LOQ: Limit of quantitation (ölçüm sınırı).

LC-MS/MS Koşulları

Kromatografik ayırım ters faz kromatografi tekniği ile, kolon olarak Dr. Marisch C18 kolon (50 mm x 2.1 mm, 2.7 µm ters faz), mobil faz olarak ise mobil faz A ve B'nin gradient elüsyonla uygulanmasıyla sağlandı. Gradient akış programı Tablo 8'de belirtilen şekilde uygulandı. Enjeksiyon hacmi 10 µL olup, autosampler ve kolon fırını sıcaklığı sırasıyla 15°C ve 50°C'ye ayarlandı. Yöntemin toplam analiz süresi 10 dakikaydı. LC-MS/MS parametreleri Tablo 9'da, kütle geçişleri Tablo 10'da verildi. Verilerin analizi AB Sciex Analyst® 1.7.2 programı ile yapıldı. Standartlardan hareketle kalibrasyon eğrisi, nominal analit konsantrasyonuna karşı analit/internal standart (kortizol-D4) pik alanlarının oranlanarak çizilmesiyle elde edildi. İnternal standart, tükürük örneklerinin üzerine eklenerek tüm numune hazırlama ve analiz aşamalarında analitle aynı işlemlere maruz bırakıldı. Bu sayede, analitte ekstraksiyon ya da analiz işlemleri sırasında oluşabilecek kantitatif değişiklikler internal standarda oranlanarak minimuma indirildi.

Tablo 8. Akış gradienti.

Zaman (dk)	% M1 (Pompa A)	% M2 (Pompa B)	Akış (µL/dk)
0.50	85	15	300
5.00	40	60	300
5.10	2	98	300
7.00	2	98	300
7.10	85	15	300
10.00	85	15	300

Tablo 9. LC-MS/MS parametreleri.

Parametre	Değer
Curtion Gas	25
Collision Gas	8
Ionsprey Voltage (IS)	5500
Temperature	450°C
Ion Source Gas 1	50
Ion Source Gas 2	50
Interface Heater	On
Ionisation Source	Turbo Sprey
Collision Gas	N ₂ (Azot)
Pompa Modu	Binary Flow
Total akış	300 µL/dk
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Analiz süresi	10 dk
Kolon	Dr. Maisch C18, 50 x 2.1 mm, 2.7 µm ters faz (Lot No: 210731.1)

Tablo 10. Kütle geçişleri

Analit	Öncül iyon (Q1), m/z	Ürün iyon (Q3), m/z	Retansiyon zamanı, dk	DP, V	EP, V	CE, V	CXP, V
Kortizol	363.1	121	6.00	50	10	30	6
Kortizol-D4	367.1	121	6.00	60	10	30	6

Q1: Kuadropol 1, Q3: Kuadropol 3, DP: Declustering potent (Kümeleme potansiyeli), EP: Entrance potential (Giriş potansiyeli), CE: Collision energy (Çarpışma enerjisi), CXP: Collitersion cell exit potential (Çarpışma hücresi çıkış potansiyeli), V: Volt.

Kalibratör ve Kontrol Değerleri

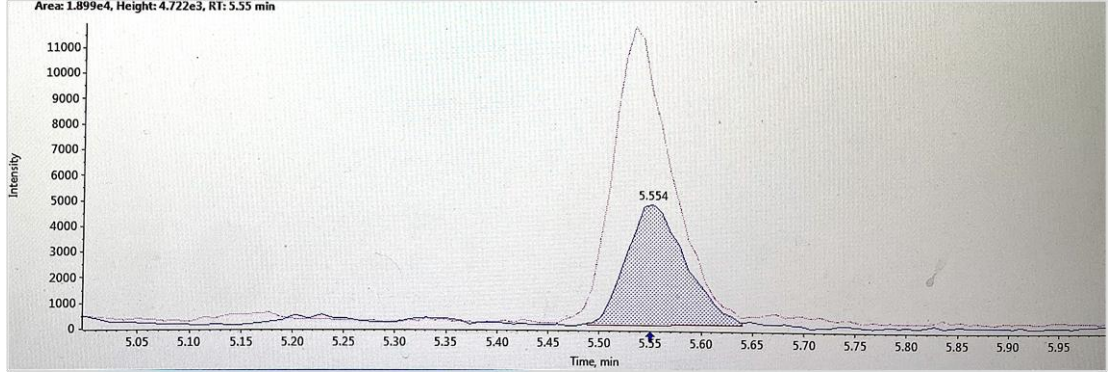
Kit içeriğinde yer alan kalibratör ve kontrol değerleri sırasıyla Tablo 11 ve Tablo 12'de verildi. Standart 4'e ait kromatogram Şekil 10'da gösterildi. Elde edilen kalibrasyon eğrisi Şekil 11'de görülmektedir.

Tablo 11. Kalibratör konsantrasyonları.

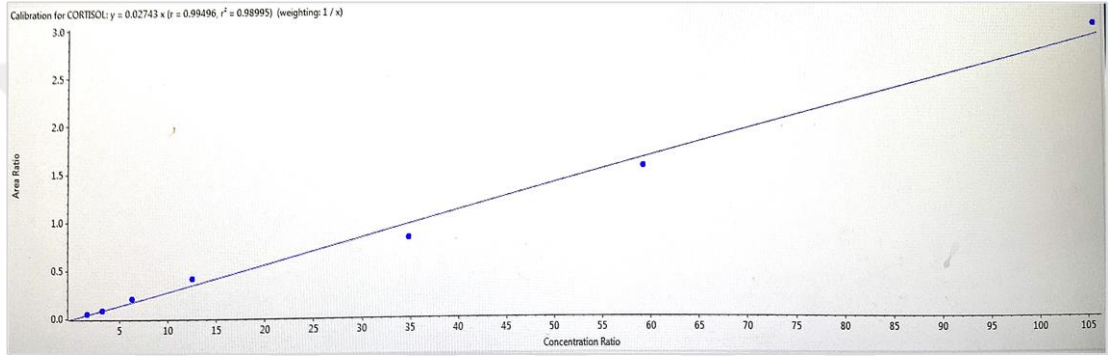
Kalibratör (Lot no: SK220801K)	Değer, nmol/L
Standart 1	4.41
Standart 2	8.83
Standart 3	17.4
Standart 4	34.5
Standart 5	96
Standart 6	163.9
Standart 7	292.2

Tablo 12. Beklenen ve ölçülen kontrol değerleri.

Kontrol (Lot no: SK220801K1)	Ortalama değer; nmol/L	Kontrol aralığı	Ölçüm sonucu; nmol/L
Seviye 1	3.86	3.47-4.25	4.11
Seviye 2	7.73	6.96-8.50	7.35
Seviye 3	16.8	15.12-18.48	15

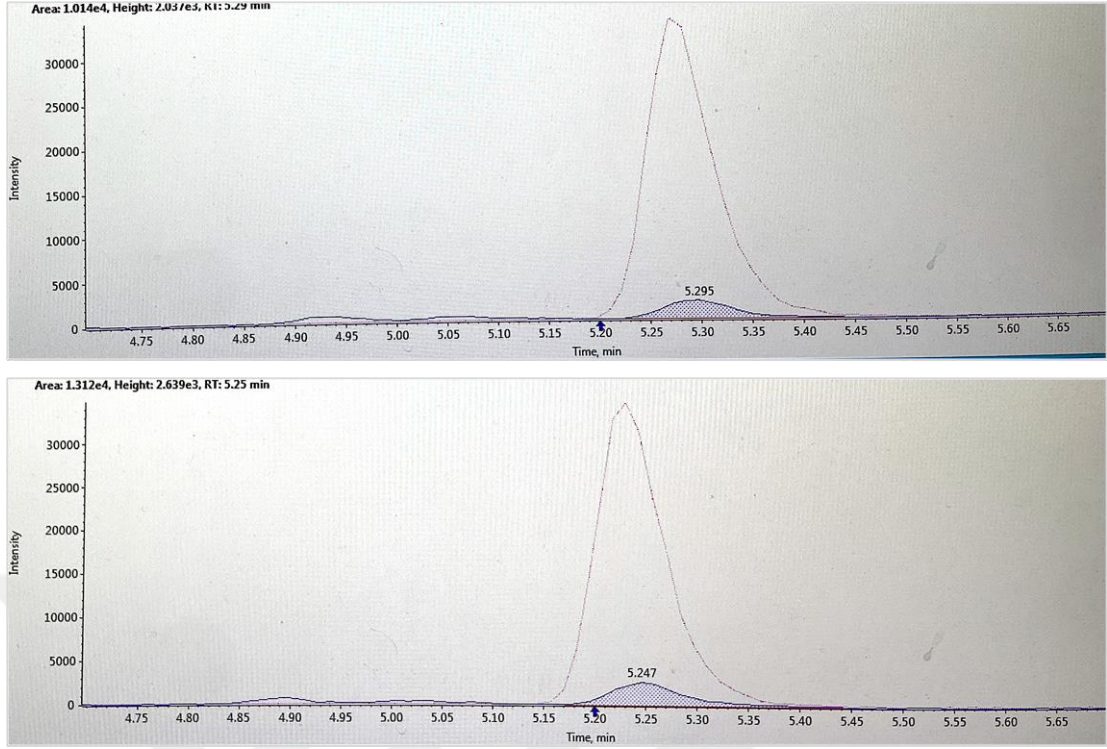


Şekil 10. 34.5 nmol/L konsantrasyondaki tükürük kortizolu standardı ve kortizol-D4 iyonizasyonuna ait kromatogram.



Şekil 11. LC-MS/MS için tükürük kortizolu kalibrasyon eğrisi.

Bir numaralı katılımcının 1. hafta numunesinin ilk ve ikinci ölçümüne ait kromatogramlar Şekil 12'de verildi.



Şekil 12. Bir numaralı katılımcının 1. hafta numunesinin tekrarlı ölçümüne ait tükürük kortizolu ve kortizol-D4 iyonizasyonuna ait kromatogramları.

3.3.3. Tükürük Kortizolu Analizinde Kullanılan Yöntemlerin Performans Özelliklerinin Değerlendirilmesi

LC-MS/MS yöntemi için kör sınırı, saptama sınırı ve ölçüm sınırının değerlendirilmesi

Kit prospektüsünde kör sınırı (LOB; limit of blank) değeri bulunmadığı için, CLSI EP17-A2 kılavuzu esas alınarak LOB değeri valide edildi. Analit içermeyen distile su 60 kez çalışılarak ortalama_{kör} ve standart sapma_{kör} (S_{kör}) hesaplandı. $LOB = ortalama_{kör} + (1.645 \times S_{kör})$ formülü ile kör sınırı değeri hesaplandı (148).

CLSI EP17-Ed2-IG esas alınarak üreticinin bildirdiği saptama sınırı (LOD; limit of detection) ve ölçüm sınırı (LOQ; limit of quantitation) değerlerini doğrulamak için, Obikrom kortizol standardının (lot. no: SK220801K) distile su ile seyreltilmesiyle LOD için elde edilen 0.083 nmol/L ve LOQ için elde edilen 0.276 nmol/L'lik konsantrasyonlar 20'şer kez çalışıldı (149).

LC-MS/MS yöntemi için doğrusallık çalışması

CLSI EP06 kılavuzu baz alınarak gerçekleştirilen doğrusallık çalışmasında, LC-MS/MS yöntemi ile tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılacak konsantrasyonları kapsayacak şekilde doğrusallığın değerlendirilmesi amaçlandı (150).

Obikrom kortizol standardı (lot. no: SK220801K) ile distile suyun farklı oranlarda karıştırılması ile elde edilen 0.690-41.4 nmol/L aralığındaki 5 seviye konsantrasyon aynı çalışmada iki tekrarlı olarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlar ile ortalama, standart sapma (SD), %CV, bias ve TH hesaplandı. Her konsantrasyon için %TH değerleri, tükürük kortizolü için BIVAC kriterlerini karşılayan herhangi bir veri bulunmadığından, serum kortizolü için EFLM BV Veri Tabanı'nda yer alan $\pm\%26.3$ arzu edilen TEa ile karşılaştırıldı (132). TEa sınırları içinde kalan konsantrasyon değerleri aralığı, lineer aralık olarak belirlendi.

Bias için $\%Bias = [(Ortalama\ de\ ger - Teorik\ de\ ger) / Teorik\ de\ ger] \times 100$ formülü kullanıldı. Total analitik hata $\%TH = \%bias + (1.65 \times \%CV)$ formülü ile hesaplandı. Hedef konsantrasyonlar ve elde edilen ölçüm değerlerinin ortalamaları ile lineer regresyon grafiğı çizildi. Doğrusallık hem görsel olarak hem de regresyon denklemi ve R^2 ile değerlendirildi.

LC-MS/MS yöntemi için çalışma içi impresizyonun değerlendirilmesi

LC-MS/MS yöntemi ile tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanacağı aralıktaki çalışma içi tekrarlanabilirliği değerlendirmek amaçlandı. SK220801K lot. numaralı Obikrom tükürük kortizolü kontrol materyali seyreltilerek kit prospektüsünde bildirilen %CV değerleri bildirilen 0.279 nmol/L ve 27.9 nmol/L konsantrasyonları, tek çalışmada 10'ar kez çalışıldı (151).

LC-MS/MS yöntemi için geri kazanım çalışması

Katılımcıların yedek numunelerinden elde edilen havuz ve SK220801K lot. numaralı Obikrom standardı ile hazırlanan düşük (D) ve yüksek (Y) konsantrasyondaki havuzlar 3Y/1D, 2Y/1D, 1Y/1D 1Y/2D, 1Y/3D oranlarında karıştırılarak aynı çalışmada iki tekrarlı olarak çalışıldı. Geri kazanım (recovery)

yüzdesi, $\%R = (\text{Ölçülen analit konsantrasyonu} / \text{Beklenen analit konsantrasyonu}) \times 100$ formülü ile hesaplandı.

ECLIA yöntemi için kör sınırı, saptama sınırı ve ölçüm sınırının değerlendirilmesi

CLSI EP17-Ed2-IG esas alınarak, Roche CORTII reaktifinin kit prospektüsünde bildirilen LOB, LOD ve LOQ değerleri için verifikasyon çalışması yapıldı (149). LOB değerinin doğrulanması için deiyonize su 20 kez analiz edildi. LOD ve LOQ değerlerinin doğrulanmasında Obikrom tükürük kortizolü standardının (lot. no: SK220801K) deiyonize su ile seyreltilmesiyle LOD elde edilen 1.5 nmol/L ve 3 nmol/L'lik konsantrasyonlar 20'şer kez analiz edildi.

ECLIA yöntemi için doğrusallık çalışması

CLSI EP06 kılavuzu baz alınarak gerçekleştirilen doğrusallık çalışmasında, ECLIA yöntemi ile tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılacak konsantrasyonları kapsayacak şekilde doğrusallığın değerlendirilmesi amaçlandı (150).

Obikrom kortizol standardı (lot. no: SK220801K) ile distile su kullanılarak elde edilen 70 nmol/L'lik standardın seri dilüsyonu ile elde edilen 2.13-68 nmol/L aralığındaki 6 seviye konsantrasyon aynı çalışmada iki tekrarlı olarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlar ile ortalama, standart sapma (SD), %CV, bias ve TH hesaplandı. Her konsantrasyon için %TH değerleri, tükürük kortizolü için BIVAC kriterlerini karşılayan herhangi bir veri bulunmadığından, serum kortizolü için EFLM BV Veri Tabanı'nda yer alan $\pm\%26.3$ arzu edilen TEa ile karşılaştırıldı (132). TEa içinde kalan konsantrasyon değerleri aralığı, lineer aralık olarak belirlendi.

Bias için $\%Bias = [(\text{Ortalama değer} - \text{Teorik değer}) / \text{Teorik değer}] \times 100$ formülü kullanıldı. Total analitik hata, $\%TH = \%bias + (1.65 \times \%CV)$ formülü ile hesaplandı. Hedef konsantrasyonlar ve elde edilen ölçüm değerlerinin ortalamaları ile lineer regresyon grafiği çizildi. Doğrusallık hem görsel olarak hem de regresyon denklemi ve R^2 ile değerlendirildi.

ECLIA yöntemi için çalışma içi ve çalışmalar arası impresizyonun doğrulanması

Roche Cobas 8000 e801 modülünde CORT II reaktifi ile gerçekleştirilen tükürük kortizolü analizi için üreticinin bildirdiği çalışma içi ve çalışmalar arası %CV'leri değerlendirmek amacıyla, CLSI EP15 Ed-3 kılavuzu esas alınarak verifikasyon çalışması gerçekleştirildi (152). Sabah tükürük kortizolü için beklenen değerleri kapsayan düşük ve yüksek iki düzey konsantrasyon hazırlanarak 5 gün boyunca günde 5'er kez çalışmak üzere porsiyonlandı. Düşük düzey kontrol için, katılımcıların yedek numunelerinden elde edilen tükürük havuzu kullanıldı. Yüksek düzey kontrol elde etmek için, hazırladığımız havuza, hedef ortalama değeri 305.8 nmol/L olan 558012 lot. numaralı "PC U1" ticari kontrol materyali eklendi.

ECLIA yöntemi için geri kazanım çalışması

Katılımcıların yedek numunelerinden elde edilen havuz ve SK220801K lot. numaralı Obikrom standardı kullanılarak hazırlanan düşük (D) ve yüksek (Y) konsantrasyondaki havuzlar 3Y/1D, 2Y/1D, 1Y/1D 1Y/2D, 1Y/3D oranlarında karıştırılarak, Roche Cobas 8000 e801 modülünde CORTII reaktifi ile aynı çalışmada iki tekrarlı olarak çalışıldı. Geri kazanım (recovery) yüzdesi, %R = (Ölçülen analit konsantrasyonu / Beklenen analit konsantrasyonu) x 100 formülü ile hesaplandı.

Metot karşılaştırma

ECLIA ve LC-MS/MS tükürük kortizolü ölçüm yöntemlerinin karşılaştırılması için, katılımcıların tüm numunelerinden elde edilen iki tekrarlı sonuçların ortalama değerleri kullanıldı. Ayrıca yüksek düzey numuneler elde etmek için, katılımcıların numunelerinden oluşturulan tükürük havuzuna, Roche Elecsys PC U1 (lot. no: 558012) kalite kontrol materyali katılarak hazırlanan 40 farklı konsantrasyon elde edildi. Metot karşılaştırma için toplamda 434 ölçüm sonucu kullanılarak Bland-Altman ve Passing & Bablok regresyon grafikleri elde edildi (153).

3.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analizler *Microsoft Excel 2019* ve çevrimiçi bir yazılım olan "*BioVar: Biological Variation Analysis Tool 1.0*" kullanılarak yapıldı (154). Yöntem

karşılaştırma çalışmasında verilerin analizi için *MedCalc 15.8* ve *GraphPad Prism 9.5.1*. paket programları kullanıldı.

3.4.1. Aykırı Değerlerin Belirlenmesi

BV verilerinin istatistiksel değerlendirmesinin ilk aşaması olan aykırı değerlerin tespiti; Cochran's C testi ve Reed kriteri kullanılarak üç adıma gerçekleştirildi:

1. Adım: Cochran's C testi kullanılarak tekrarlı ölçümlerdeki aykırı değerler tespit edildi.

2. Adım: Cochran's C testi kullanılarak bir katılımcının varyansının bir bütün olarak grubunkinden daha büyük veya daha küçük olup olmadığı değerlendirildi.

3. Adım: Reed kriteri kullanılarak her bir katılımcının ortalama değerinin diğer katılımcılara kıyasla önemli ölçüde daha büyük veya daha küçük olup olmadığına bakıldı.

Aykırı değerler tespit edilip çıkarıldıktan sonra geriye kalan bireyler ve ölçüm sonuçları ile istatistiksel analize devam edildi.

3.4.2. Normal Dağılımın Kontrolü

Nested ANOVA kullanılarak varyans bileşenlerinin hesaplanmasında, verilerin normal veya başka herhangi bir dağılım gösterip göstermediği önemsizdir (109). Ancak, güven aralıklarının hesaplanması ve istatistiksel anlamlılık testleri genellikle normal dağılım varsayımını gerektirir (155). BIVAC, biyolojik varyasyon çalışmalarından elde edilen varyasyon katsayılarını değerlendirmek ve farklı çalışmalar arasında karşılaştırma yapabilmek için biyolojik varyasyon tahminlerinin güven aralıklarıyla beraber hesaplanmasını önermektedir (120).

Braga ve Panteghini tarafından önerilen şekilde normal dağılımın kontrolü iki adımda gerçekleştirildi (125). Önce ölçülen her büyüklüğün, ardından katılımcıların ortalama değerlerinin normal dağılım varsayımı Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi.

3.4.3. Kararlı Durumun Değerlendirilmesi

Biyolojik varyasyon bileşenleri, bireyin kararlı sağlık durumunda (steady-state), bir analitin homeostatik ayar noktası etrafında dalgalanması olarak tanımlanan CV_I ve o analit için farklı bireylerin homeostatik ayar noktaları arasındaki değişkenlik olarak tanımlanan CV_G 'den oluşur (109).

Çalışma süresi boyunca ölçülen büyüklüğün konsantrasyonunda sistematik bir değişiklik olmamalıdır; eğer varsa, verilere logaritmik dönüşüm uygulanmalıdır (120).

Katılımcıların çalışma boyunca kararlı durumda olup olmadığı; her numune alma haftasında tüm bireylerden elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalama değerinin, karşılık gelen numune alma haftasına karşı doğrusal regresyon analiziyle değerlendirildi. Regresyon çizgisinin eğimi %95 güven aralığında 0 (sıfır)'ı içeriyorsa, katılımcıların kararlı durumu sağladığı kabul edildi (156).

3.4.4. Homojenitenin Değerlendirilmesi

Biyolojik varyasyon bileşenlerinden elde edilen verilerin (RDD vb.) popülasyona genellenebilmesi ve kullanılabilmesi; birey içi ve analitik varyansların homojen dağılımını gerektirir (109). Varyans homojenliğini değerlendirmede BIVAC tarafından kabul edilebilir testler arasında Bartlett, Cochran, Levene, Brown-Forsythe ve Fligner-Killeen bulunur (120). Çalışmamızda birey içi ve analitik varyansların homojenliği Cochran ve Bartlett testleri ile değerlendirildi. Heterojenite durumunda, homojenlik elde edilene dek aykırı değerler çalışmadan çıkarıldı.

3.4.5. Cinsiyet Grupları Arasındaki Farklılıkların Analizi

Güven aralıkları birbirini kapsamıyor ise, CV_I ve CV_G tahminleri cinsiyetler için ayrı ayrı raporlanmalıdır (157). Çalışmamızda CV_I ve CV_G cinsiyetler için ayrı ayrı hesaplandı. CV_I ve CV_G 'lerin cinsiyetler arasında %95 güven aralığı içine örtüşüp örtüşmediği değerlendirildi.

Bunun dışında, kadın ve erkeklerin ortalama değerleri arasındaki farklar Student *t*-testi kullanılarak değerlendirildi. Cinsiyetlerin ortalama değerleri arasında önemli bir fark olmadığından, analitik performans gerekliliklerini hesaplamak için tüm deneklerden elde edilen CV_I ve CV_G değerleri kullanıldı.

3.4.6. Nested ANOVA

Aykırı değerler belirlenip çıkarıldıktan sonra; normal dağılım varsayımları, kararlı durum, homojenlik varsayımları ve cinsiyet gruplarının ölçüm sonuçlarının ortalamaları arasındaki farklar değerlendirildi. Sonrasında cinsiyet grupları ve tüm grup için CV_I , CV_G ve CV_A değerleri nested ANOVA ile %95 güven aralıklarıyla hesaplandı.

Güven aralıklarının hesaplanması ve istatistiksel anlamlılık testleri ile RDD'nin doğrudan hesaplanması normal dağılım varsayımını gerektirir. Çalışmamızda veriler normal olmayan dağılım gösterdiğinden doğal logaritmik (ln) dönüşüm uygulandı. Doğal logaritmik dönüşüm uygulanan verilere nested ANOVA yöntemi ile BV verileri hesaplandı. Son olarak, dönüştürülen sonuçlar orijinal ölçeğe geri çevrildi (124).

Sabah tükürük kortizolü için elektrokemilüminesans immünölçüm ve LC-MS/MS yöntemleriyle ayrı ayrı elde edilen CV_A , CV_I ve CV_G değerleri ile II, RDD, analitik performans gereklilikleri ve homeostatik ayar noktasının belirlenmesi için gerekli numune sayıları hesaplandı.

4. BULGULAR

4.1. KATILIMCILARIN DEMOGRAFİK VERİLERİ VE SAĞLIK TARAMASI SONUÇLARI

Çalışmaya 21 kadın ve 20 erkek olmak üzere sağlıklı olduğu düşünülen toplam 41 birey dahil edildi. Katılımcıların yaş, vücut kitle indeksi ve çalışma öncesi sağlık taraması ölçüm sonuçları ortalaması Tablo 13’de verildi.

Tablo 13. Katılımcıların demografik verileri ve sağlık taraması sonuçları

	Tüm grup (n=41)	Kadın (n=21)	Erkek (n=20)
Yaş, yıl	36 (26-60)	40 (26-60)	32.5 (28-56)
VKI, kg/m ²	24.4 (19.9-30.2)	23.9 (19.9-29.9)	24.5 (22.4-30.2)
Açlık glukozu, mmol/L	4.83 (3.72-6.05)	4.72 (4.16-5.61)	4.88 (3.72-6.05)
Üre, mmol/L	10.6 (6.78-17.1)	9.99 (7.14-14.6)	10.7 (6.78-17.1)
Kreatinin, µmol/L	0.33 (0.21-0.54)	0.32 (0.23-0.46)	0.34 (0.21-0.54)
Albümin, g/L	48.7 (44.4-54.8)	48.1 (44.4-53.9)	50.1 (44.8-54.8)
Total protein, g/L	75.3 (68.8-85)	74.1 (68.8-83.6)	75.7 (72.7-85)
Total kolesterol, mmol/L	4.82 (3.32-5.80)	4.97 (3.78-5.62)	4.51 (3.32-5.80)
Trigliserit, mmol/L	1.07 (0.50-1.88)	1.02 (0.50-1.46)	1.10 (0.69-1.88)
ALT, U/L	19 (9-46)	14 (9-35)	27 (11-46)
AST, U/L	17 (12-42)	16 (12-28)	23 (14-42)
GGT, U/L	16 (8-46)	13 (8-43)	26 (8-46)
CK, U/L	93 (35-196)	79 (35-173)	122 (64-196)
CRP, mg/L	2 (0.5-3.3)	2.4 (0.1-4.8)	1.7 (0.5-3.3)
Hemoliz indeksi	7 (3-23)	6 (3-14)	9 (4-23)
İkter indeksi	1 (1-2)	1 (1-2)	1 (1-2)
Lipemi indeksi	6 (2-16)	5 (2-9)	7 (2-16)
WBC, 10 ⁹ /L	6.30 (4.25-8.53)	5.76 (4.25-8.53)	6.66 (4.91-8.30)
RBC, 10 ¹² /L	5.02 (4.21-6.02)	4.77 (4.21-5.39)	5.25 (4.96-6.02)
HGB, g/L	148 (121-174)	140 (121-155)	160 (147-174)
Hct, L/L	0.437 (0.361- 0.501)	0.415 (0.361-0.468)	0.450 (0.428-0.501)
PLT, 10 ⁹ /L	258 (174-376)	272 (213-358)	251 (174-376)
HbA1c, mmol/mol	33 (22-38)	34 (28-38)	31 (22-38)
Serum ACTH (sabah), pmol/L	2.22 (0.95-6.27)	2.02 (0.95-5.10)	3.94 (1.46-6.27)
Serum kortizolü (sabah), nmol/L	235 (141-411)	243 (141-411)	235 (157-361)
TSH, mIU/L	1.76 (0.647-4.20)	1.76 (0.665-4.20)	1.69 (0.647-3.95)
sT4, pmol/L	14.9 (8.89-20.8)	15.2 (12.4-20.8)	15.1 (12.5-19.7)

Veriler ortanca ve sınır değerler (minimum-maksimum) olarak verildi. VKI: Vücut kitle indeksi, ALT: Alanin aminotransferaz, AST: Aspartat aminotransferaz, GGT: γ-glutamilttransferaz, CK: Kreatin kinaz, CRP: C-reaktif protein, WBC: Lökosit sayısı, RBC: Eritrosit sayısı, HGB: Hemoglobin, Hct: Hematokrit, PLT: Trombosit sayısı, HbA1c: Hemogloblin A1C, ACTH: Adrenokortikotropik hormon, TSH: Tiroit stimulan hormon, sT4: Serbest T4.

4.2. ECLIA VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİ İLE ANALİZ EDİLEN SABAH TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜM SONUÇLARI İLE BİYOLOJİK VARYASYON VERİLERİNİN HESAPLANMASI

Katılımcıların, ECLIA ve LC-MS/MS yöntemleri ile aynı çalışmada iki tekrarlı olarak analiz edilen sabah tükürük kortizolü ölçüm sonuçlarının tümü nmol/L birimiyle Ek 5’de sunulmuştur (bkz. Tablo 28 ve Tablo 29).

4.2.1. Sabah Tükürük Kortizolünün Biyolojik Varyasyonun ECLIA Yöntemi ile Hesaplanması

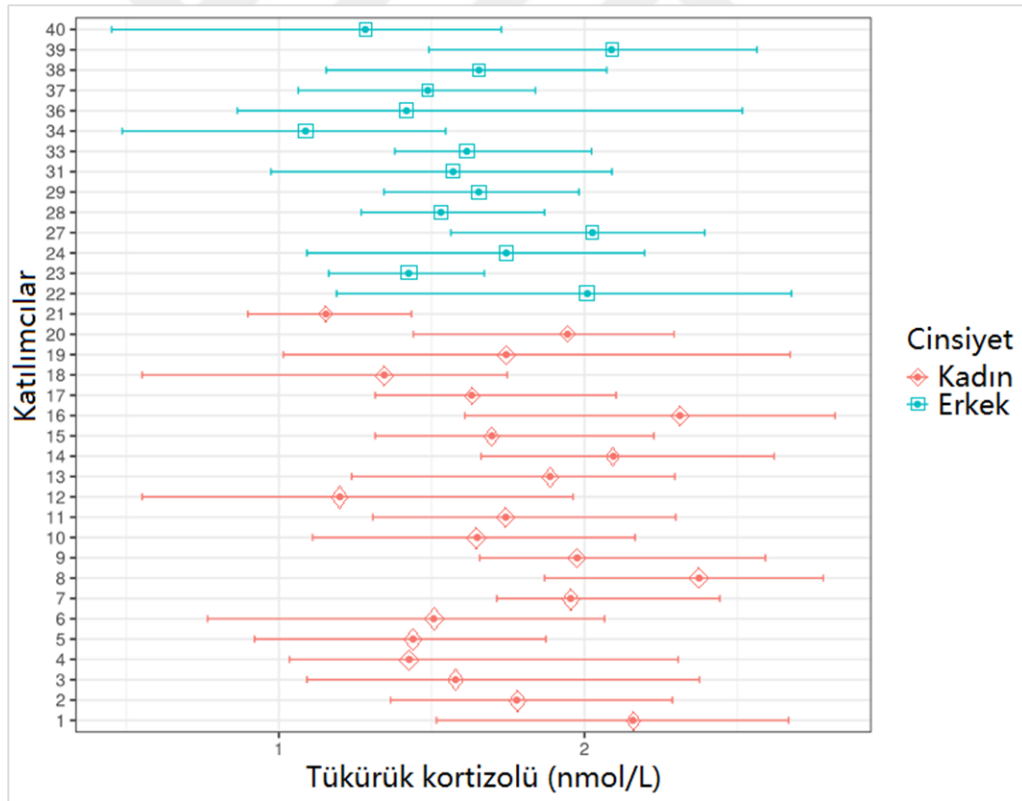
Aykırı değerlerin belirlenmesinde; 1. adımda tekrarlı ölçümler arasındaki uç değerler Cochran's C testi ile değerlendirildi. Aykırı değer bulunmadı. 2. adımda; bir katılımcının varyansının tüm gruptan daha büyük veya küçük olup olmadığı Cochran's C testi ile değerlendirildi. 25, 26, 30, 35 ve 41 numaralı bireylere ait veriler aykırı değer olarak belirlendi ve çıkarıldı. Reed kriteri kullanılarak her bir katılımcının ortalama değerinin diğer katılımcılara kıyasla önemli ölçüde daha büyük ya da küçük olup olmadığının değerlendirildiği 3. adımda, aykırı değer tespit edilmedi.

Katılımcıların ortalama değerlerinin normal dağılım varsayımının değerlendirildiği Shapiro-Wilk testinde, ortalama değerlerin normal dağılıma uymadığı görüldü. Bu nedenle ölçüm sonuçlarına doğal logaritmik (ln) transformasyon uygulandı ve normal dağılım sağlandı. Yeniden aykırı değer analizi yapıldı; 1. adıma göre 37 numaralı bireyin dördüncü hafta sonuçları ile 2. adıma göre 32 numaralı birey uç değer olarak belirlendi ve çıkarıldı (bkz. Tablo 14 ve Şekil 13).

Tablo 14. ECLIA yöntemi sonuçlarına göre istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve sabah tükürük kortizolu biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılan birey/sonuç sayıları.

Grup	Homojenlik varsayımı sağlanana kadar dışlanan aykırı değer sayısı			Aykırı ölçüm sonucu sayısı	Biyolojik varyasyon hesaplanmasında kullanılan birey/ölçüm sonucu sayısı		Toplam aykırı değer yüzdesi
	1.adım	2. adım	3. adım		Birey sayısı	Sonuç sayısı	
Tüm grup	1 çift	6 birey	-	108	35 birey	678	%13.7
Kadınlar	-	-	-	0	21 kadın	414	%0
Erkekler	1 çift	6 birey	-	108	14 erkek	264	%29

ECLIA: Elektrokemilüminesans.



Şekil 13. Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra ECLIA yöntemi ile ölçülen sabah tükürük kortizolünün 10 hafta boyunca ortalama değerleri ve dağılımı.

Kararlı durum (steady-state), her numune alma haftasında tüm bireylerden elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalama değerlerinin, karşılık gelen numune alma haftasına karşı doğrusal regresyon analiziyle değerlendirildi. Regresyon çizgisinin eğimi %95 güven aralığında ‘sıfır’ı kapsadığı için, katılımcıların kararlı durumda olduğu kabul edildi.

Bartlett ve Cochran's C testleri ile değerlendirildiğinde; analitik ve birey içi varyansların, homojenlik varsayımını sağladığı görüldü.

Nested ANOVA ile cinsiyet alt gruplarının ve tüm grubun CV_A , CV_I ve CV_G değerleri hesaplandı ve sonuçlar orijinal ölçeğe çevrildi (Tablo 15). Birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon katsayıları, cinsiyet grupları arasında %95 güven aralığında birbirini kapsadığı için CV_I ve CV_G için cinsiyetler arasında anlamlı fark olmadığı kabul edildi. Cinsiyet gruplarının analitik varyasyon katsayılarının %95 güven aralığında birbirini kapsamadığı; yani CV_A 'lar arasında anlamlı bir fark olduğu görüldü. Cinsiyet gruplarının ölçüm sonuçlarının ortalamaları arasında fark olup olmadığı Student t-testi ile değerlendirildi; anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 15. ECLIA yöntemi sonuçlarına göre cinsiyet grupları ve tüm grup için hesaplanan sabah tükürük kortizolu ortalama, CV_A , CV_I ve CV_G değerleri.

Grup	Birey sayısı	Toplam sonuç sayısı	Kişi başına ortalama numune sayısı	Ortalama sonuç (%95 GA)	CV_A (%95 GA)	CV_I (%95 GA)	CV_G (%95 GA)
Tüm grup	35	678	9.66	5.95 nmol/L (5.93-5.97)	%12 (11.2-13)	%28.1 (25.7-30.8)	%31.3 (24.5-42.6)
Kadınlar	21	414	9.86	6.30 nmol/L (6.25-6.34)	%13.7 (12.5-15.1)	%27.1 (24.1-30.1)	%33.4 (24.5-50.6)
Erkekler	14	264	9.43	5.45 nmol/L (5.40-5.50)	%8.9 (7-10.1)	%29.5 (25.6-34.2)	%27.6 (18.3-47.1)

CV_A : Analitik varyasyon, CV_I : Birey içi biyolojik varyasyon, CV_G : Bireyler arası biyolojik varyasyon, GA: Güven aralığı.

ECLIA yöntemi ile edilen biyolojik varyasyon verilerinden hesaplanan bireysellik indeksi, referans değişim değerleri, analitik kalite spesifikasyonları ve homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayıları Tablo 16'da verildi.

Tablo 16. ECLIA yöntemi ile biyolojik varyasyonu hesaplanan sabah tükürük kortizolünün bireysellik indeksi, referans değişim değeri, analitik performans gereklilikleri ve gerekli numune sayısı.

Bireysellik indeksi		0.89
Referans değişim değeri		
RDD yukarı yönlü (%95 GA)		+ %100.6
RDD aşağı yönlü (%95 GA)		- %50.2
RDD yukarı yönlü (%99 GA)		+ %129.8
RDD aşağı yönlü (%99 GA)		- %56.5
Analitik performans gereklilikleri		
İmpresizyon hedefi	Optimum	%7
	Arzu Edilen	%14
	Minimum	%21
Bias hedefi	Optimum	%5
	Arzu edilen	%11
	Minimum	%16
İzin verilen toplam hata	Optimum	%17
	Arzu Edilen	%34
	Minimum	%50
Farklı olasılıklarda homeostatik ayar noktasını hesaplamak için gerekli numune sayısı		
%5 olasılık ile %95 güven aralığında n		143
%10 olasılık ile %95 güven aralığında n		36
%20 olasılık ile %95 güven aralığında n		9

RDD: Referans değişim değeri, GA: Güven aralığı, n: Homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayısı.

4.2.2. Sabah Tükürük Kortizolünün Biyolojik Varyasyonunun LC-MS/MS Yöntemi ile Hesaplanması

Aykırı değerlerin belirlenmesinde; 1. adımda tekrarlı ölçümler arasındaki uç değerler Cochran's C testi ile değerlendirildi. 39 numaralı bireyin 6. hafta sonuçları aykırı değer olarak belirlendi ve çıkarıldı. 2. adımda; bir katılımcının varyansının tüm gruptan daha büyük veya küçük olup olmadığı Cochran's C testi ile değerlendirildi. 26, 30, 37, 38 ve 41 numaralı bireyler aykırı değer olarak belirlendi ve çıkarıldı. Reed

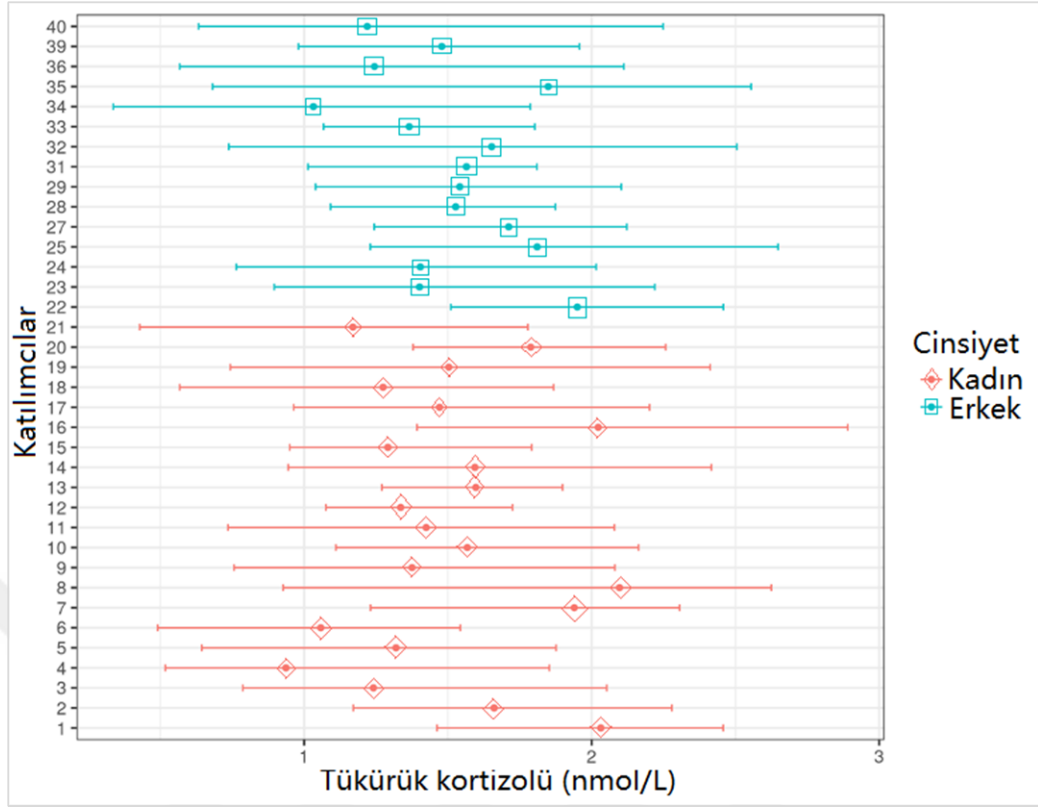
kriteri kullanılarak her bir katılımcının ortalama değerinin diğer katılımcılara kıyasla önemli ölçüde daha büyük ya da küçük olup olmadığının değerlendirildiği 3. adımda, aykırı değer tespit edilmedi.

Katılımcıların ortalama değerlerinin normal dağılım varsayımının değerlendirildiği Shapiro-Wilk testinde, ortalama değerlerin normal dağılıma uymadığı görüldü. Bu nedenle ölçüm sonuçlarına doğal logaritmik (ln) transformasyon uygulandı ve normal dağılım sağlandı. Yeniden aykırı değer analizi yapıldı; 1. adıma göre 32. katılımcının 3. hafta ve 34. katılımcının 7. hafta ölçüm birey uç değer olarak belirlendi ve çıkarıldı (bkz. Tablo 17 ve Şekil 14).

Tablo 17. LC-MS/MS yöntemi sonuçlarına göre istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerler ve sabah tükürük kortizolü biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında kullanılan birey/sonuç sayıları.

Grup	Homojenlik varsayımı sağlanana kadar dışlanan aykırı değer sayısı			Aykırı ölçüm sonucu sayısı	Biyolojik varyasyon hesaplanmasında kullanılan birey/ölçüm sonucu sayısı		Toplam aykırı değer yüzdesi
	1.adım	2. adım	3. adım		Birey sayısı	Sonuç sayısı	
Tüm grup	3 çift	5 birey	-	100	36 birey	686	%12.7
Kadınlar	-	-	-	0	21 kadın	414	%0
Erkekler	3 çift	5 birey	-	100	15 erkek	272	%26.8

LC-MS/MS: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi.



Şekil 14. Aykırı değerler çıkarıldıktan sonra LC-MS/MS yöntemi ile ölçülen sabah tükürük kortizolünün 10 hafta boyunca ortalama değerleri ve dağılımı.

Kararlı durum (steady-state), her numune alma haftasında tüm bireylerden elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalama değerlerinin, karşılık gelen numune alma haftasına karşı doğrusal regresyon analiziyle değerlendirildi. Regresyon çizgisinin eğimi %95 güven aralığında ‘sıfır’ı kapsadığı için, katılımcıların kararlı durumda olduğu kabul edildi.

Cochran's C testi ile değerlendirildiğinde; analitik ve birey içi varyansların, homojenlik varsayımını sağladığı görüldü.

Nested ANOVA ile cinsiyet alt gruplarının ve tüm grubun CV_A , CV_I ve CV_G değerleri hesaplandı ve sonuçlar orijinal ölçeğe çevrildi (bkz. Tablo 18). Analitik varyasyon ile birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon katsayıları, cinsiyet grupları arasında %95 güven aralığında birbirini kapsadığı için CV_A , CV_I ve CV_G için cinsiyetler arasında anlamlı fark olmadığı kabul edildi. Cinsiyet gruplarının ölçüm sonuçlarının ortalamaları arasında fark olup olmadığı Student t-testi ile değerlendirildi; anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Tablo 18. LC-MS/MS sonuçlarına göre cinsiyet grupları ve tüm grup için hesaplanan sabah tükürük kortizolü ortalama, CV_A, CV_I ve CV_G değerleri.

Grup	Birey sayısı	Toplam sonuç sayısı	Kişi başına ortalama numune sayısı	Ortalama sonuç (%95 GA)	CV _A (%95 GA)	CV _I (%95 GA)	CV _G (%95 GA)
Tüm grup	36	686	9.53	5.03 nmol/L (5.01-5.05)	%19.7 (18.3-21.3)	%31.1 (28.1-34.5)	%27.5 (21.2-37.6)
Kadınlar	21	414	9.86	5.03 nmol/L (5-5.06)	%18.9 (17.2-20.9)	%29.2 (25.7-33.4)	%31.4 (22.8-48)
Erkekler	15	272	9.07	5.04 nmol/L (5-5.08)	%20.9 (18.7-23.8)	%33.9 (28-40.1)	%22 (13.6-38.7)

CV_A: Analitik varyasyon, CV_I: Birey için biyolojik varyasyon, CV_G: Bireyler arası biyolojik varyasyon, GA: Güven aralığı.

LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen BV verilerinden hesaplanan bireysellik indeksi, referans değişim değerleri, analitik performans gereklilikleri ve homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayıları Tablo 19’da verildi.

Tablo 19. LC-MS/MS yöntemi ile biyolojik varyasyonu hesaplanan tükürük kortizolünün bireysellik indeksi, referans değişim değeri, analitik performans gereklilikleri ve gerekli numune sayısı.

Bireysellik indeksi	1.13	
Referans değişim değeri		
RDD yukarı yönlü (%95 GA)	+ %131.1	
RDD aşağı yönlü (%95 GA)	- %56.7	
RDD yukarı yönlü (%99 GA)	+ %172.1	
RDD aşağı yönlü (%99 GA)	- %63.3	
Analitik performans spesifikasyonları		
İmpresizyon hedefi	Optimum	%7.8
	Arzu Edilen	%15.6
	Minimum	%23.3
Bias hedefi	Optimum	%5
	Arzu edilen	%11
	Minimum	%16
İzin verilen toplam hata	Optimum	%18
	Arzu Edilen	%36
	Minimum	%54
Farklı olasılıklarda homeostatik ayar noktasını hesaplamak için gerekli numune sayısı		
%5 olasılık ile %95 güven aralığında n		209
%10 olasılık ile %95 güven aralığında n		52
%20 olasılık ile %95 güven aralığında n		13

RDD: Referans değişim değeri, GA: Güven aralığı, n: Homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli numune sayısı.

4.3. SABAH TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN BİYOLOJİK VARYASYONUNUN HESAPLANMASINDA KULLANILAN ANALİTİK YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

4.3.1. LC-MS/MS Yöntemi için Kır Sınırı, Saptama Sınırı ve Ölçüm Sınırının Değerlendirilmesi

LOB değerin belirlenmesi için distile su ile 60 ölçüm gerçekleştirildi. Ortalama_{kör} değeri 0.041 nmol/L ve _{skör} değeri 0.014 nmol/L olarak belirlendi. $LOB = ortalama_{kör} + (1.645 \times skör)$ formülüne göre LOB değeri 0.065 nmol/L olarak hesaplandı (148).

LOD değerin doğrulamak amacıyla Obikrom kortizol standardı (lot. no: SK220801K) ile hazırlanan 0.087 nmol/L'lik standart 20 kez analiz edildi. Tüm ölçüm sonuçları, valide edilen LOB değerin üzerinde olduğu için üretici tarafından 0.087 nmol/L olarak bildirilen LOD değeri doğrulanmış oldu (149).

LOQ değerin doğrulamak amacıyla, Obikrom kortizol standardı (lot. no: SK220801K) ile hazırlanan 0.276 nmol/L'lik standart ile yapılan 20 analizde, tüm sonuçlar hedef değere göre %10'luk hata aralığı içinde idi. Buna göre üretici tarafından 0.276 nmol/L olarak bildirilen LOQ değeri doğrulanmış oldu (149).

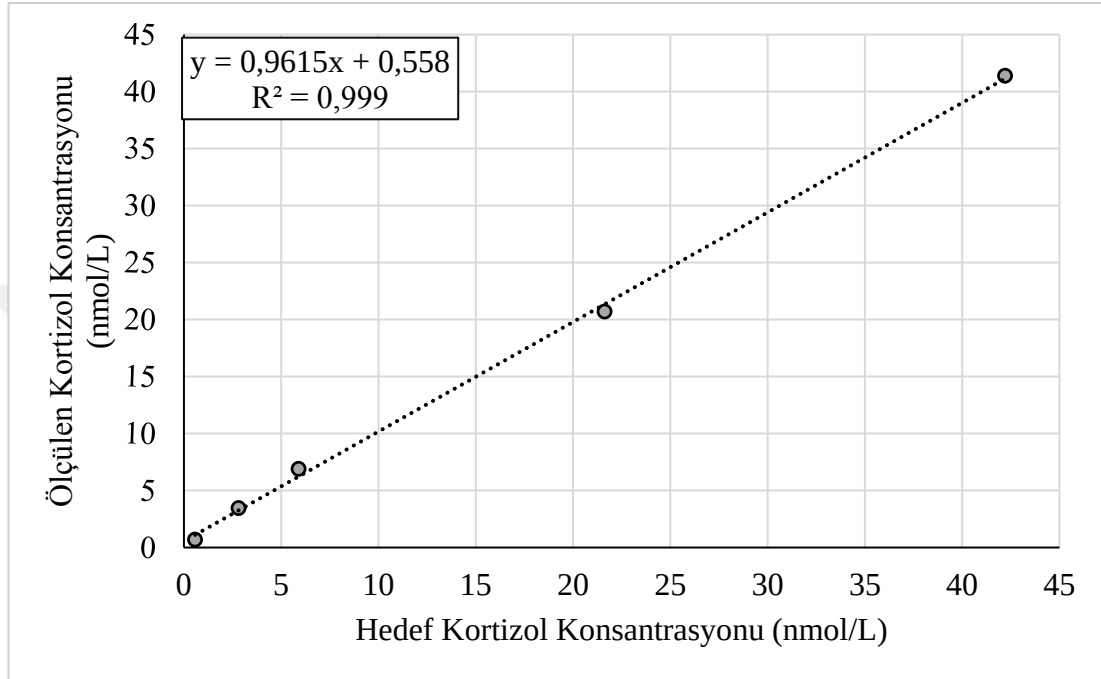
4.3.2. LC-MS/MS Yöntemi için Doğrusallığın Değerlendirilmesi

Hedef konsantrasyonları 0.690-41.4 nmol/L arasında değişen 5 numune tek çalışmada iki tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre ortalama, SD, %CV, %Bias ve %TE değerleri Tablo 20'de gösterilmektedir.

Tablo 20. LC-MS/MS yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık çalışması sonuçları.

Hedef konsantrasyon, nmol/L	1. tekrar, nmol/L	2. tekrar, nmol/L	Ortalama, nmol/L	SD	CV, %	Bias, %	±%26.3 için hedef aralık	Total analitik hata, %	SONUÇ
0.690	0.579	0.650	0.615	0.05	8.12	10.9	0.51-0.87	24.3	Lineer
3.45	2.81	2.98	2.90	0.12	4.05	16	2.54-4.36	22.7	Lineer
6.90	5.90	6.05	5.98	0.10	1.72	13.4	5.09-8.71	16.2	Lineer
20.7	21.6	21.6	21.6	0.03	0.13	-4.40	15.3-26.1	4.62	Lineer
41.4	42.2	42	42.1	0.13	0.31	-1.74	30.5-52.3	2.25	Lineer

Tüm konsantrasyonlar için tekrarlı ölçümlerin ortalama değerlerinin, hedef konsantrasyonlara göre $\pm\%26.3$ aralıkta olduğu görüldü. Ayrıca tüm konsantrasyonlar için total analitik hata değerleri, arzu edilen izin verilebilir total hatadan ($\%26.3$) daha düşük olduğu için, LC-MS/MS yönteminin 0.690-41.4 nmol/L arasında doğrusal olduğu değerlendirildi.



Şekil 15. LC-MS/MS yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık grafiği.

Lineer regresyon analizi ile doğru denklemi $y=0.9615x+0.558$ ve $R^2=0.999$ olarak bulunmuştur. Şekil 15'in görsel değerlendirilmesi ve R^2 değerinin ≥ 0.99 olması, LC-MS/MS yönteminin 0.690-41.4 nmol/L aralığında doğrusal olduğunu desteklemektedir.

4.3.3. LC-MS/MS Yöntemi için Çalışma İçi İmpresizyonun Değerlendirilmesi

Obikrom kortizol standardı (Lot. no: SK220801K) seyreltilerek elde edilen, 0.276 nmol/L ve 27.6 nmol/L olmak üzere iki düzey konsantrasyon için sırasıyla CV değerleri $\%4.82$ ve $\%4.57$ CV bulundu. Çalışmamızda, üreticinin bu konsantrasyonlar için çalışma içi tekrarlanabilirlik olarak sırasıyla $\%5.10$ ve $\%4.76$ olarak bildirilen CV'lerden düşük değerler elde edilmiş oldu.

4.3.4. LC-MS/MS Yöntemi için Geri Kazanımın Değerlendirilmesi

Hazırlanan havuzların ortalamaları üzerinden, LC-MS/MS yöntemi ile tükürük kortizolu analizinde ortalama %R değeri %96.2 olarak bulundu. Ölçüm sonuçları Tablo 21'de gösterilmiştir.

Tablo 21. Tükürük kortizolu analizinde LC-MS/MS yöntemi için geri kazanım çalışması.

Oran	Beklenen değer (nmol/L)	Ölçülen değer (nmol/L)	%R
Y	-	35.5	-
3Y/1D	26.9	26.6	98.7
2Y/1D	24.1	22.7	94.4
1Y/1D	18.4	17.3	94.5
1Y/2D	12.7	12.2	96.6
1Y/3D	9.80	9.46	96.6
D	-	1.24	-
Ortalama			96.2

Y: Yüksek düzey havuz, D: Düşük düzey havuz, %R: Geri kazanım yüzdesi.

4.3.5. ECLIA Yöntemi için Kör Sınırı, Saptama Sınırı ve Ölçüm Sınırının Değerlendirilmesi

Roche Cobas 8000 e801 analizöründe CORTII reaktifi kullanılarak distile su ile gerçekleştirilen 20 analizde elde edilen tüm cihaz sonuçları, LOD değeri olan "1.5 nmol/L'nin altında" olduğu için kit prospektüsünde verilen LOB değerlendirilemedi.

LOD değerini doğrulamak amacıyla Obikrom kortizol kalibratörü (lot. no: SK220801K) ile hazırlanan 1.5 nmol/L'lik standart 20 kez analiz edildi. Tüm ölçüm sonuçları, LOB değerinin üzerinde olduğu için 1.5 nmol/L olarak bildirilen LOD değeri doğrulanmış oldu (149).

LOQ değerini doğrulamak amacıyla Obikrom kortizol kalibratörü (lot. no: SK220801K) ile hazırlanan 3 nmol/L'lik standart ile gerçekleştirilen 20 analizde, tüm sonuçlar hedef değere göre %10'luk hata aralığı içinde idi. Buna göre, üreticinin LOQ olarak bildirdiği 3 nmol/L değeri doğrulanmış oldu (149).

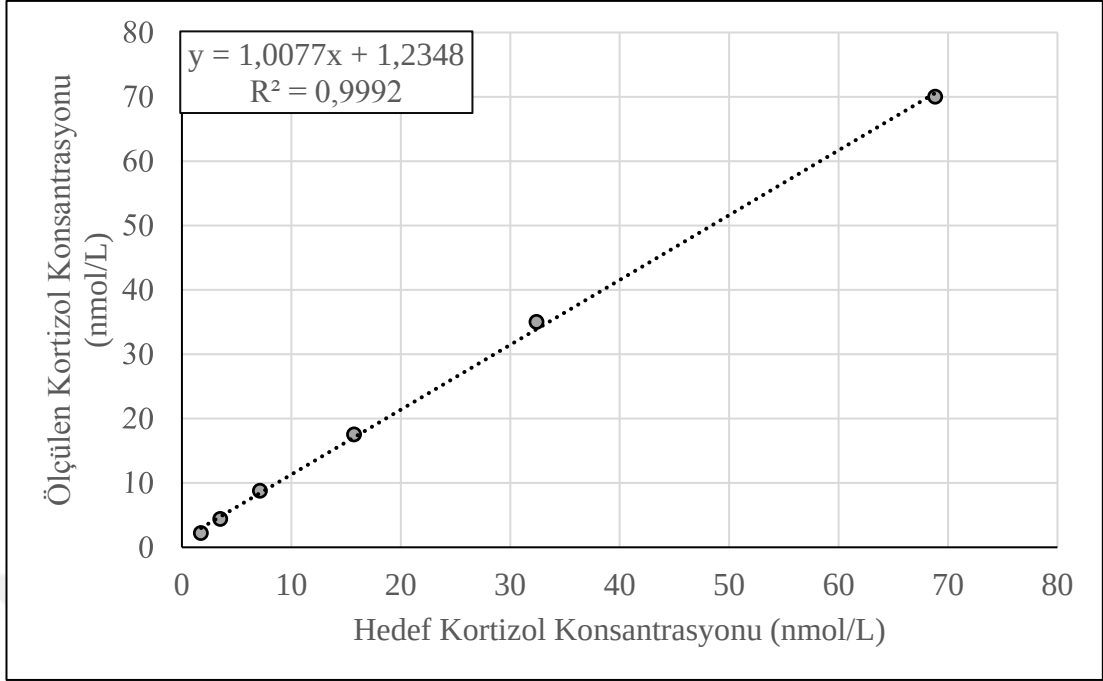
4.3.6. ECLIA Yöntemi için Doğrusallığın Değerlendirilmesi

Hedef konsantrasyonları 2.13-68 nmol/L arasında değişen 6 numune tek çalışmada iki tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen ölçüm sonuçlarına göre ortalama, SD, %CV, %Bias ve %TE değerleri Tablo 22'de gösterilmektedir.

Tablo 22. ECLIA yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık çalışması sonuçları.

Hedef konsantrasyon, nmol/L	1. tekrar, nmol/L	2. tekrar, nmol/L	Ortalama, nmol/L	SD	CV, %	Bias, %	±%26.3 için hedef aralık	Total analitik hata, %	SONUÇ
2.13	1.66	1.69	1.67	0.02	1.28	21.4	1.57-2.68	23.5	Lineer
4.25	3.51	3.72	3.62	0.15	4.18	14.9	3.13-5.37	21.8	Lineer
8.5	7.04	7.26	7.15	0.16	2.18	15.9	6.26-10.7	19.5	Lineer
17	15.1	16.4	15.7	0.92	5.83	7.41	12.5-21.5	17	Lineer
34	32	32.8	32.4	0.59	1.81	4.65	25.1-42.9	7.63	Lineer
68	68.2	69.5	68.8	0.98	1.42	-1.23	50.1-85.9	3.57	Lineer

Tüm konsantrasyonlar için tekrarlı ölçümlerin ortalama değerlerinin, hedef konsantrasyonlara göre $\pm\%26.3$ aralıkta olduğu görüldü. Ayrıca tüm konsantrasyonlar için total analitik hata değerleri, arzu edilen izin verilebilir total hatadan ($\%26.3$) daha düşük olduğu için, ECLIA yönteminin 2.13-68 nmol/L arasında doğrusal olduğu değerlendirildi.



Şekil 16. ECLIA yöntemi ile kortizol analizinde doğrusallık grafiği.

Lineer regresyon analizi ile doğru denklemi $y=1.0077x+1.2348$ ve $R^2=0.9992$ olarak bulunmuştur.

Şekil 16'nın görsel değerlendirilmesi ve R^2 değerinin ≥ 0.99 olması, ECLIA yönteminin 2.13-68 nmol/L aralığında doğrusal olduğunu desteklemektedir.

4.3.7. ECLIA Yöntemi için Çalışma İçi ve Çalışmalar Arası İmpresizyonun Değerlendirilmesi

Düşük ve yüksek düzey olarak hazırlanıp porsiyonlanan iki seviye kontrol, 5 gün boyunca günde 5'er kez çalışıldı. CLSI EP15-Ed3-WB excel makrosu aracılığıyla 2 düzey kontrole ait gün içi ve günler arası impresizyon için CV değerleri hesaplandı (158).

Düşük düzey kontrol için tüm ölçüm sonuçlarının ortalaması 5.16 nmol/L idi. Çalışma içi CV %3.85 ve çalışmalar arası CV %5.50 olarak bulundu. Bu düzeye en yakın olarak, üretici 3.22 nmol/L için çalışma içi CV'yi %4.5 ve çalışmalar arası CV'yi %6.3 olarak bildirmiştir. Elde ettiğimiz CV değerleri, CLSI EP15-Ed3-WB'a göre verifikasyon limitlerini aşmadığı için, üreticinin bu düzey için bildirdiği CV değerleri doğrulanmış oldu (158).

Yüksek düzey kontrol için tüm ölçüm sonuçlarının ortalaması 32.8 nmol/L idi. Çalışma içi CV %1.37 ve çalışmalar arası CV %2.54 olarak bulundu. Bu düzeye en yakın olarak, üretici 29.9 nmol/L için çalışma içi CV'yi %1.4 ve çalışmalar arası CV'yi %2.1 olarak bildirmiştir. Elde ettiğimiz CV değerleri, CLSI EP15-Ed3-WB'a göre verifikasyon limitlerini aştığı için, üreticinin bu düzey için bildirdiği CV değerleri doğrulanmış oldu (158).

4.3.8. ECLIA Yöntemi için Geri Kazanım Çalışması

Hazırlanan havuzların ortalamaları üzerinden, Roche Cobas 8000 e801 modülünde CORTII reaktifi kullanılan ECLIA yöntemi için tükürük kortizolünün geri kazanımı (recovery) %100.3 olarak bulundu. Ölçüm sonuçları Tablo 23'de gösterilmiştir.

Tablo 23. Tükürük kortizolü analizinde ECLIA yöntemi için geri kazanım çalışması.

Oran	Beklenen değer (nmol/L)	Ölçülen değer (nmol/L)	%R
Y	-	49.9	-
3Y/1D	38.4	38.4	99.9
2Y/1D	34.5	35	101.5
1Y/1D	26.8	27.4	102.2
1Y/2D	19.1	19.4	101.8
1Y/3D	15.2	14.7	96.4
D	-	1.24	-
Ortalama			100.3

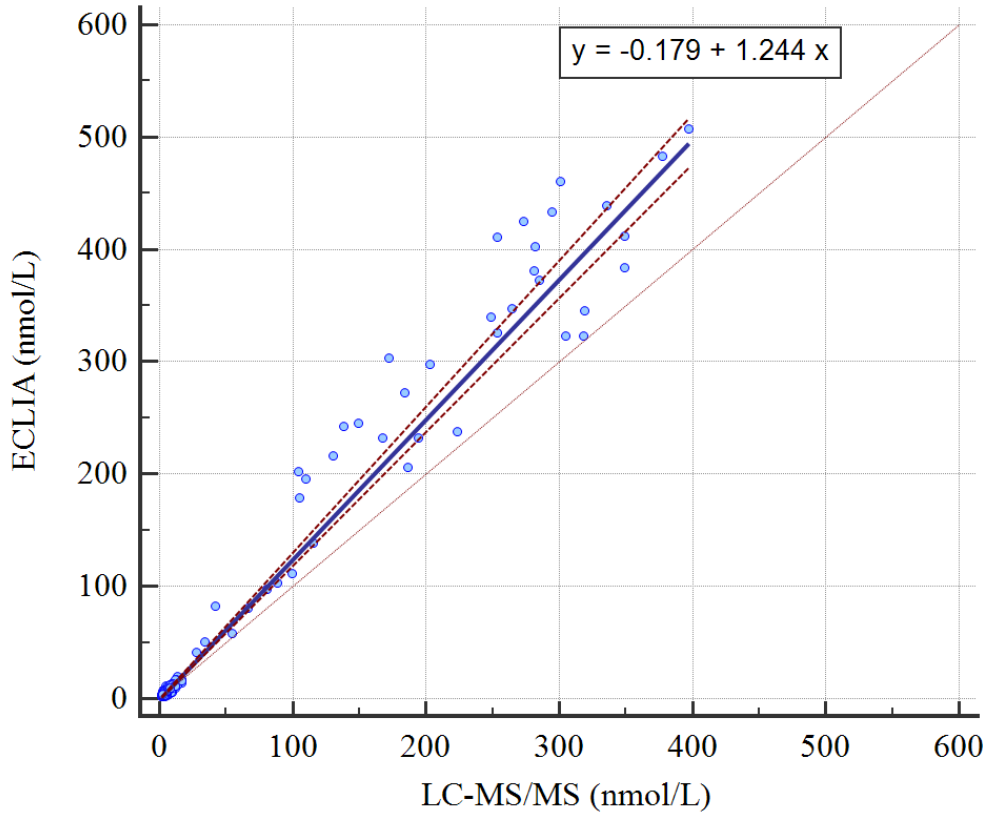
Y: Yüksek düzey havuz, D: Düşük düzey havuz, %R: Geri kazanım yüzdesi.

4.3.9. Metot Karşılaştırma

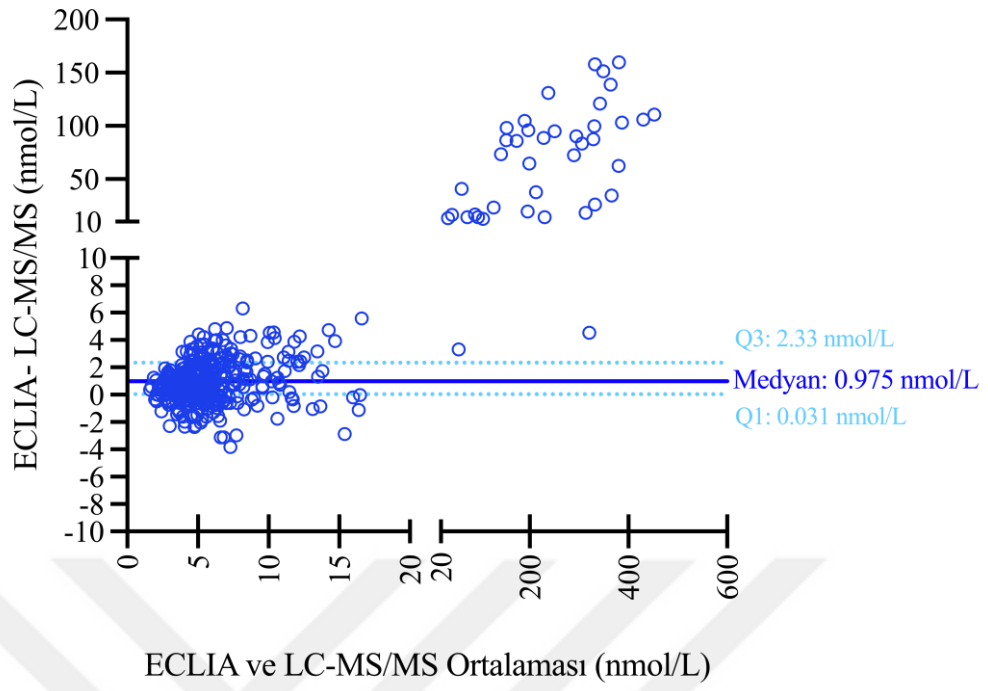
Tükürük kortizolü ölçümünde ECLIA ve LC-MS/MS yöntemlerini karşılaştırmak için, hem tüm katılımcıların numunelerinden elde edilen 394 ölçüm sonucu hem de daha yüksek konsantrasyonlar elde etmek amacıyla katılımcıların tükürük havuzuna PC U1 (lot. no: 558012) kalite kontrol materyali katılarak hazırlanan 40 farklı düzey olmak üzere, toplam 436 numune kullanıldı.

Her iki yöntemle de elde edilen sonuçların Shapiro-Wilk testine göre normal dağılıma uymadığı görüldü.

Numunelerin ortanca (1. ve 3. çeyreklik) değerleri LC-MS/MS yöntemiyle 4.80 (3.60-7.14) nmol/L, ECLIA yöntemiyle 5.71 (4.17-8.46) nmol/L bulundu ve Wilcoxon testine göre iki grup arasında anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). Passing ve Bablok regresyon analizine göre regresyon denklemi $y = -0.179 + 1.244 x$ olarak ve $r = 0.988$ bulundu. Cusum testine göre doğrusallıktan anlamlı bir sapma yoktu ($p = 0.67$). Bland-Altman analizine göre ECLIA yönteminin biası, farkların ortanca değeri olan 0.975 nmol/L (Q1: 0.031 nmol/L, Q2: 2.33 nmol/L) bulundu. Passing ve Bablok regresyon ve Bland-Altman grafikleri sırasıyla Şekil 17 ve Şekil 18'de gösterilmektedir.



Şekil 17. Passing ve Bablok regresyon grafiği.



Şekil 18. Bland-Altman grafiği.

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda, tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunu değerlendirmek amacıyla; sağlıklı 41 kişiden (21 kadın ve 20 erkek), 10 hafta boyunca, haftanın aynı günü, sabah 08.00-10.00 saatleri arasında, standart tükürük numune toplama prosedürü ile numuneler toplandı. Aynı numunelerde hem ECLIA hem de LC-MS/MS yöntemi ile ikişer tekrarlı ve rastgele olmak üzere tükürük kortizolü ölçümleri gerçekleştirildi; tüm çalışma grubunda ve cinsiyet alt gruplarında, sabah tükürük kortizolünün %95 güven aralıklarıyla CV_I ve CV_G 'si hesaplandı (bkz. Tablo 24). Biyolojik varyasyon verilerinden, tükürük kortizolünün iki yöntem için ayrı ayrı II, RDD, analitik kalite hedefleri ve homeostatik ayar noktasını elde etmek için gerekli numune sayısını belirlendi.

Tablo 24. Elektrokemilüminesans immünölçüm ve sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi yöntemleri kullanılarak aynı numunelerin ölçümüyle hesaplanan sabah tükürük kortizolü biyolojik varyasyon verileri.

Bulgu		ECLIA	LC-MS/MS
CV _A (%95 GA)		%12 (11.2-13)	%19.7 (18.3-21.3)
CV _I (%95 GA)		%28.1 (25.7-30.8)	%31.1 (28.1-34.5)
CV _G (%95 GA)		%31.3 (24.5-42.6)	%27.5 (21.2-37.6)
Bireysellik indeksi		0.89	1.13
Ortalama konsantrasyon		5.95 nmol/L (5.93-5.97, %95 GA)	5.03 nmol/L (5.01-5.05, %95 GA)
Referans değişim değeri (RDD)			
RDD yukarı yönlü (%95 GA için)		+ %100.6	+ %131.1
RDD aşağı yönlü (%95 GA için)		- %50.2	- %56.7
RDD yukarı yönlü (%99 GA için)		+ %129.8	+ %172.1
RDD yukarı yönlü (%99 GA için)		- %56.5	- %63.3
Analitik kalite gereklilikleri			
İmpresizyon hedefi	Optimum	%7	%7.8
	Arzu edilen	%14	%15.6
	Minimum	%21	%23.3
Bias hedefi	Optimum	%5	%5
	Arzu edilen	%11	%11
	Minimum	%16	%16
İzin verilen toplam hata	Optimum	%17	%18
	Arzu edilen	%34	%36
	Minimum	%50	%54

ECLIA: Elektrokemilüminesans immünölçüm, LC-MS/MS: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi, CV_A: Analitik varyasyon, CV_I: Birey içi biyolojik varyasyon, CV_G: Bireyler arası biyolojik varyasyon, GA: Güven aralığı.

Laboratuvar tıbbında ölçümü gerçekleştirilen bir analitin, bir kişiden elde edilen ardışık sonuçları incelendiğinde, o kişinin sağlık durumunda değişiklik olmasa bile, aynı değerleri elde etmenin pek olası olmadığı görülür (159). Bunun nedeni; preanalitik ve analitik evrelerde birçok varyasyon kaynağının mevcut olmasıdır. Bunun dışında, o bireyin kendi içindeki biyolojik varyasyonu da buna katkıda bulunur ve çoğu zaman varyasyonun en önemli kaynağıdır (5). Bazı analitler; yenidoğan dönemi, ergenlik ve menopoz gibi hızlı fizyolojik gelişim zamanlarındaki önemli değişikliklerle birlikte, yaşam boyunca biyolojik varyasyona sahiptir. Bazı analitler ise doğası gereği günlük, aylık veya mevsimsel öngörülebilir döngüsel varyasyon gösterir. Ölçülen büyüklüklerin çoğu, bireyler arasında farklılık gösteren homeostatik ayar noktalarında rastgele varyasyona sahiptir. Biyolojik varyasyonun bu her iki bileşenine ilişkin verilerin türetilmesi ve uygulamada kullanılmasına ilişkin çalışmalar, ölçüm sonuçlarının doğru yorumlanması için gereklidir.

Teşhis için hızlı ve daha az girişimsel yöntemler ile alınan numunelere olan ilgi son yıllarda giderek artmaktadır (160). Bu durum, tükürüğün bir biyolojik materyal olarak tanı ve takipte kullanımıyla ilgili araştırmalarda da artışa yol açtı (161). Tükürük; klinik biyokimya laboratuvarlarında en sık kullanılan iki vücut sıvısı olan kan ve idrara kıyasla bazı avantajlara sahiptir (162). Bu avantajlarına rağmen; tükürüğün kullanımında, toplama yöntemlerinin doğru seçimi (uyarılmış veya uyarılmamış), kan ve gıda artıkları ile numune kontaminasyonunun kontrol edilmesi gibi preanalitik değişkenlerin standardizasyonu dikkatlice değerlendirilmelidir (163). Ayrıca, tükürüğün kullanıldığı analitik yöntemler, yüksek hassasiyet ve yeniden üretilebilirlik sağlayacak şekilde geliştirilmelidir.

Tükürük kortizolü, serumdaki serbest (bağlanmamış) kortizol ile korelidir ve 24 saatlik idrardaki serbest kortizol gibi, serumdaki serbest kortizolü yansıtan güvenilir bir alternatif olarak kabul edilir (164). Serbest hormon hipotezine göre, bir hormonun bağlı olmayan formunun seviyesi onun biyolojik aktivitesini belirler (165). Cushing sendromu şüphesinde gece yarısı tükürük kortizolü ölçümünün patofizyolojik temeli; sirkadiyen ritmin kaybolması ve kortizol düzeyinin gece yarısında en düşük seviyeye düşmemesi üzerinedir (166). Gece yarısı tükürük kortizolü ölçümü, uluslararası bir topluluk olan *Endokrin Derneği*'nin 2008'de yayınladığı *Cushing Sendromunun Tanısında Klinik Uygulama Rehberi*'nde, birinci basamak testlerden biri

olarak önerilmektedir (86). Hâlen geçerli olan bu kılavuzda, farklı günlerde alınan iki ayrı tükürük numunesinde kortizolün değerlendirilmesi önerilmektedir (86).

5.1. EFLM BV VERİ TABANI VE KORTİZOLÜN BV ÇALIŞMALARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Literatürdeki BV çalışmaları, EFLM BV Çalışma Grubu tarafından BIVAC kriterlerine göre skorlanarak meta-analiz verisi olarak güncellenmekte ve yayınlanmaktadır (132). EFLM BV Veri Tabanı'nda kortizolün meta-analizine sadece plazma ve serum kortizolü için gerçekleştirilen BV çalışmaları dahil edilmiştir (bkz. Tablo 25) (132, 167–169). Serum kortizolü için CV_I değeri %16.3 (%95 GA'ları %15.5-26.6) ve CV_G değeri %48.7 (%95 GA'ları %46.2-%53.1) olarak bildirilmektedir (132).

Tablo 25. Tükürük dışındaki numune matrislerinde kortizol için gerçekleştirilen BV çalışmaları.

Çalışma	Cinsiyet	Sağlık durumu	Katılımcı sayısı (K/E)	Numune matrisi	Analitik yöntem	Numune toplama sıklığı	Katılımcı başına numune sayısı	Ortalama değer, nmol/L (%95 GA)	CV _A (%95 GA)	CV _I (%95 GA)	CV _G (%95 GA)	BIVAC skoru
Hammond ve ark. 1976 (167) *	Karma	Sağlıklı	14 (6/8)	Serum	RIA	Haftada üç, 2 hafta boyunca.	6	508	12.4 (10.8–14.6)	26.6 (22.3–32.4)	53.1 (38.1–84.9)	C _{7,8,10}
Ricos ve ark. 1990 (170)	Karma	Sağlıklı	15 (9/6)	Belirtilmemiş.	RIA	Günde bir, 7 gün boyunca.	7	Belirtilmemiş.	5 (4.4–5.8)	15.2 (13.1–17.9)	38.1 (27.8–59.4)	C _{4,7,8,10}
Maes ve ark. 1997 (168) *	Karma	Sağlıklı	26 (13/13)	Plazma	FIA	Ayda bir, 12 ay boyunca.	12	618	5.8 (4.6–7.7)	21.7 (19.9–23.8)	46.2 (36.2–63.6)	C _{7,8,10,13}
Ahokoski ve ark. 1999 (171)	Erkek	Sağlıklı	8 (0/8)	Serum	RIA	Günde bir, 6 gün boyunca.	6	579	6.5 (3.9–18.7)	13 (0–17.4)	12 (6.6–24.9)	C _{7,8,10}
Dittadi ve ark. 2018 (6)	Karma	Sağlıklı	18 (11/7)	Serum	RIA	Ayda bir, 4 ay boyunca.	4	420	9.7 (6.4–19.7)	30.9 (23.9–38.7)	31.3 (20.7–49.5)	C ₇
Carobene ve ark. 2020 (169) *	Tüm grup	Sağlıklı	91	Serum	ECLIA	Haftada bir, 10 hafta boyunca.	10	361 (354–369)	3.6 (3.4–3.8)	15.5 (14.8–16.4)	-	A
	Erkekler		38					302 (295–308)		15.9 (14.7–17.3)	20.6 (17.4–28.8)	A
	Kadınlar (<50 yaş)		43					414 (401–428)		14.9 (13.9–16.1)	36.3 (29.5–47.3)	A
	Kadınlar (>50 yaş)		10					349 (333–366)		14.1 (12.2–16.8)	26.6 (17.2–49.4)	A

*: EFLM BV Veri Tabanı'nda kortizol BV verisi hesaplanırken meta-analizine dahil edilen çalışmaları belirtmektedir. K: Kadın, E: Erkek, GA: Güven aralığı, CV_A: Analitik varyasyon, CV_I: Birey içi biyolojik varyasyon, CV_G: Bireyler arası biyolojik varyasyon, RIA: Radyo immünölçüm, FIA: Floresans immünölçüm, ECLIA: Elektrokemilüminesans immünölçüm.

Literatürde, tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanmasıyla ilgili iki yayın mevcuttur (94,172). Chiu ve arkadaşlarının yaptığı çalışma; BIVAC'a göre, kararlı durum (steady-state) ve istatistiksel analiz ile ilgili kriterlerde düşük skor almıştır (120,132,172). Casals ve arkadaşlarının iki ayrı sağlıklı grupta yaptığı çalışma ise analitik yöntem, kararlı durum, istatistiksel analiz ve dahil edilen ölçüm sonuçlarının sayısı kriterlerinde düşük skor elde etmiştir (94,132). Çalışmamız, tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında BIVAC kriterleri esas alınarak tasarlanan ilk çalışma olma özelliğine sahiptir.

5.2. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN ANALİTİK, BİREY İÇİ VE BİREYLER ARASI BİYOLOJİK VARYASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ

Roche Cobas 8000 e801 analizöründe ECLIA yöntemiyle, sabah tükürük kortizolü için, iki tekrarlı ölçümler ile elde ettiğimiz CV_A %12 (%11.2-%13, %95 GA), CV_I %28.1 (%25.7-%30.8, %95 GA) ve CV_G %31.3 (%24.5-%42.6, %95 GA) idi. Aynı numuneleri kullanarak LC-MS/MS yöntemiyle iki tekrarlı ölçümler ile elde ettiğimiz CV_A %19.7 (%18.3-%21.3, %95 GA), CV_I %31.1 (%28.1-%34.5, %95 GA) ve CV_G %27.5 (%21.2-%37.6, %95 GA) idi. LC-MS/MS yönteminde ECLIA'ya göre daha yüksek bir analitik varyasyon katsayısı elde ettik. Bu yüksekliğin, LC-MS/MS yönteminde numune hazırlığındaki manuel ön işlemlerden kaynaklandığını düşünmekteyiz. İki yöntemle elde ettiğimiz CV_I ve CV_G ise, %95 güven aralıkları ile karşılaştırıldığında birbiriyle örtüşmekteydi (bkz. Tablo 24).

Chiu ve arkadaşları sabah tükürük kortizolü için CV_I 'yı %6.3 (%3.55-%7.83, %95 GA) ve CV_G 'yi %20.5 (%16.1-%27.9, %95 GA) olarak hesapladılar (bkz. Tablo 26) (172). CV_A 'yı %3.8 (%2.69-%6.45, %95 GA) olarak bildirmişlerdir. Ancak bu çalışmada numuneler tekrarlı değil bir kez çalışılmış ve CV_A 'nın nasıl hesaplandığı belirtilmemiştir (172). Chiu ve arkadaşlarının bu çalışmasında CV_I 'nın bizim çalışmamıza göre düşük bulunması katılımcı sayısının ve toplanan numune sayısının az olması ile açıklanabilir.

Tablo 26. Tükürük kortizolu için daha önce yapılan biyolojik varyasyon çalışmalarının bizim çalışmamızla karşılaştırılması.

	CV _A (%95 GA)	CV _I (%95 GA)	CV _G (%95 GA)	II	Kişi sayısı (Kadın/Erkek)	Numune alma zamanı	Çalışma süresi	Numune alma sıklığı ve sayısı	Tekrarlı ölçüm sayısı	Ölçüm ortalaması (%95 GA)	BIVAC skoru
Chiu ve arkadaşları (2003)	%3.8 (2.69-6.45)	%6.3 (3.55-7.83)	%20.5 (16.1-27.9)	0.36	28 (16/12)	Sabah	2 hafta	2 hafta boyunca, toplam 5.	Yapılmamış.	20.4 nmol/L	C _{7,11}
Casals ve arkadaşları - Çalışma A (2011)	%15.4	%34.1	%35.3	1.06	7 (4/3)	Gece	4 hafta	Haftada 2, toplam 8.	2	1.27 nmol/L	C _{4,7,11,13}
Casals ve arkadaşları - Çalışma B (2011)	%14.6	%32.1	%38.1	0.93	20 (13/7)	Gece	2 gün	Günde 1, toplam 2.	2	1.35 nmol/L	C _{4,7,11,13}
Bizim çalışmamız - LC-MS/MS	%19.7 (18.3-21.3)	%31.1 (28.1-34.5)	%27.5 (21.2-37.6)	1.13	41 (21/20)	Sabah	10 hafta	Haftada 1, toplam 10.	2	5.03 nmol/L (5.01-5.05)	-
Bizim çalışmamız - ECLIA	%12 (11.2-13)	%28.1 (25.7-30.8)	%31.3 (24.5-42.6)	0.89	41 (21/20)	Sabah	10 hafta	Haftada 1, toplam 10.	2	5.95 nmol/L (5.93-5.97)	-

CV_A: Analitik varyasyon, CV_I: Birey içi biyolojik varyasyon, CV_G: Bireyler arası biyolojik varyasyon, II: Bireysellik indeksi, GA: Güven aralığı, LC-MS/MS: Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi, ECLIA: Elektrokemilüminesans immünölçüm.

Casals ve arkadaşlarının yayınındaki çalışmada A'da CV_A %15.4, CV_I %34.1 ve CV_G %35.3 olarak bildirilmiştir ancak güven aralıkları verilmemiştir (94). Aynı yayındaki çalışma B'de, yine güven aralıkları verilmeden CV_A %14.6, CV_I %32.1 ve CV_G %38.1 olarak bildirildi (94). Bu yayında, her iki çalışmada da elde edilen gece tükürük kortizolu için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri bizim çalışmamızdaki sonuçlar ile yakın görünmektedir (bkz. Tablo 26). Bunun yanında, CV_A 'ların yukarıda bahsedilen iki yayın ile bizim çalışmamızda elde ettiğimiz değerlerden farklı hesaplanması, ölçümlerde kullanılan analitik yöntemlerin farklı olması ile açıklanabilir (bkz. Tablo 27).

Tablo 27. Tükürük kortizolu için daha önce yapılan biyolojik varyasyon çalışmalarındaki analitik yöntemler.

Tükürük kortizolu BV çalışmaları	Analitik yöntem
Chiu ve arkadaşları (2003 yılında) (172)	Poliklonal antikor kullanılan yarışmalı elektrokemilüminesans immünölçüm (Roche Elecsys Cortisol testi).
Casals ve arkadaşları - Çalışma A (2011 yılında) (94)	Monoklonal antikor kullanılan enzim immünölçüm (Salimetrics HS-Cortisol testi).
Casals ve arkadaşları - Çalışma B (2011 yılında) (94)	Monoklonal antikor kullanılan enzim immünölçüm (Salimetrics HS-Cortisol testi).
Bizim çalışmamız - LC-MS/MS	Sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi.
Bizim çalışmamız - ECLIA	Monoklonal antikor kullanılan yarışmalı elektrokemilüminesans immünölçüm (Roche Elecsys Cortisol II testi).

5.3. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN BİREYSELLİK İNDEKSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Bireysellik indeksi (II), geleneksel popülasyona dayalı referans aralıkların yararlılığını değerlendirmeyi sağlayan bir araçtır. Bu indeks 0.6'dan düşük olduğunda; o analit, yüksek bireysellik gösterir ve referans aralığı ile karşılaştırıldığında tek bir sonucun düşük tanı değerine sahip olduğu kabul edilir. Tersine, II 1.4'ten yüksek olduğunda, analit düşük bireysellik gösterir ve referans aralıkların klinik olarak faydalı olduğu kabul edilir (173). Chiu ve arkadaşları sabah tükürük kortizolünün bireysellik indeksini 0.36 olarak hesapladılar (172). Casals ve arkadaşlarının yayınındaki çalışma A'da gece tükürük kortizolu için II 1.06; çalışma B'de II 0.93 olarak bulundu (94). Bizim çalışmamızda ise ECLIA yöntemiyle II, 0.89, LC-MS/MS yöntemiyle ise 1.13 bulduk. İki yöntemle de elde ettiğimiz II göre sabah tükürük kortizolu Casals ve arkadaşlarının çalışmalarına benzer şekilde orta derecede bireysellik göstermektedir. Tükürük kortizolu sonuçlarının yorumlanmasında, popülasyona dayalı referans aralıkları tek başına kullanmak yerine RDD ile birlikte değerlendirilmenin daha faydalı olacağını düşünmekteyiz.

5.4. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN REFERANS DEĞİŞİM DEĞERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Endokrin Derneği'nin 2008 yılında yayınlanan Cushing Sendromunun Tanısında Klinik Uygulama Rehberi'nde; gece yarısı tükürük kortizolünün, iki farklı günde alınan numuneler ile değerlendirilmesi önerilmektedir (86). Klinisyenler, kantitatif bir laboratuvar test sonucunda, günden güne meydana gelen bir değişikliğin klinik olarak anlamlı olup olmadığına karar vermek için, hastanın sağlık durumundaki herhangi bir değişiklikten bağımsız olarak sağlıklı kişilerde meydana gelen varyasyonun kaynakları ve büyüklükleri hakkında farkındalığa sahip olmalıdır (167). Referans değişim değeri (RDD); bir kişiden elde edilen iki ardışık laboratuvar sonucu arasındaki farkın, birey içi biyolojik varyasyon ile analitik varyasyonun birlikte neden olduğu varyasyondan daha büyük olup olmadığını; yani klinik olarak anlamlı bir değişiklik meydana gelip gelmediğini belirlemek için kullanışlı bir araçtır. Bununla birlikte; tükürük numunesinin toplanma zamanını, numunenin saklanma koşullarını ve toplama talimatını hastanın anlamasını sağlamak preanalitik evreyi kontrol altına

almak açısından önemli bir role sahiptir (94). Klinik karar verme süreçlerinin karmaşıklığı arttıkça, tıbbi laboratuvar uzmanları ile klinisyenler arasında kurulması gereken iş birliğinin önemi artmaktadır (174). Ölçüm sonuçlarını yorumlamada ne referans aralıklar ne de RDD tek başına yeterli görünmemektedir. Her ikisini birden kullanmak, hastalığın progresyonunu ve tedavi etkinliğini izlemek için daha iyi bir alternatif olabilir. Her laboratuvarın kendi analitik varyasyonunu kullanarak hesapladığı RDD'nin laboratuvar bilgi yönetim sistemine tanımlaması ve bu değeri aşan ardışık değerlerin sonuç raporunda belirtmesi faydalı görünmektedir. Chiu ve arkadaşları sabah tükürük kortizolü için iki yönlü RDD'yi %20.4 olarak hesapladılar (172). Casals ve arkadaşları ise gece tükürük kortizolü için 4 haftalık çalışmalarında (Çalışma A) iki yönlü RDD'yi %103.6; 2 günlük çalışmalarında (Çalışma B) ise iki yönlü RDD'yi %98.6 olarak bildirdiler (94). Çalışmamızda ECLIA yöntemi kullanarak hesapladığımız BV verilerine göre sabah tükürük kortizolü için %95 güven aralığında yukarı yönlü RDD %101.6 iken, aşağı yönlü RDD %50.2 idi. LC-MS/MS yönteminde ise %95 güven aralığında yukarı yönlü RDD'yi %131.1, aşağı yönlü RDD'yi ise %56.7 olarak bulduk. LC-MS/MS yönteminde elde ettiğimiz RDD'nin daha yüksek olması, bu yöntemdeki analitik varyasyonun daha yüksek olmasından kaynaklanmaktadır.

5.5. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜNÜN ANALİTİK KALİTE GEREKLİLİKLERİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Laboratuvar tıbbında, hasta güvenliğini sağlamak için ihtiyaç duyulan analitik kalite hedefleri, her bir analit için kesin olarak tanımlanmalı ve belirtilmelidir (142). 1999 yılında Stokholm'de, IFCC ve IUPAC tarafından düzenlenen konferansta, tıbbi laboratuvarlarda yapılan ölçümlerde analitik kalite hedeflerini belirlemede "strateji hiyerarşisi" ilk kez ele alındı (140). Sonrasında 2014 yılında Milano'da, EFLM tarafından düzenlenen bir konferansta, Stockholm Konferansı'nda oluşturulan orijinal hiyerarşinin bir revizyonu, konferans katılımcılarının tartışma ve geri bildirimleri ile değerlendirmeye sunuldu (129). Bu revizyon, hiyerarşiyi sadeleştirmek ve çeşitli paydaşlar tarafından uygulanabilirliğin iyileştirilmesi amacıyla bilimsel program komitesi tarafından değişikliğe tabi tutuldu ve uzlaşi beyanı olarak yayınlandı. Buna göre; hiyerarşide ilk sırada yer alan, analitik performansın klinik etkisini değerlendiren

deneysel çalışmalar yaparak kalite hedeflerini belirlemek, uygulamada zordur. Bu nedenle; hiyerarşide ikinci sırada yer alan, analitik kalite göstergelerinin biyolojik varyasyon verileri kullanılarak belirlenmesi, çoğu parametre için daha uygulanabilir bir model olarak görünmektedir (129). Çalışmamızda ECLIA yöntemi için tükürük kortizolünün arzu edilen impresizyon hedefi $<14\%$, arzu edilen bias hedefi $<11\%$ ve arzu edilen TEa hedefi $<34\%$ olarak belirlendi. Aynı hedefler LC-MS/MS yöntemi için sırasıyla $<16\%$, $<11\%$ ve $<36\%$ idi (bkz. Tablo 24). Çalışmamızda her iki yöntem için 95% güven aralıkları ile hesapladığımız CV_I ve CV_G 'ler birbiriyle örtüştüğünden, analitik performans gereklilikleri birbirine yakın olarak belirlenmiş oldu. Casals ve arkadaşlarının, gece tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunu hesapladıkları iki çalışmadan da elde ettikleri analitik kalite hedefleri, çalışmamızdaki BV verilerinden türettiğimiz analitik kalite hedefleri ile benzerdi (94).

5.6. ÇALIŞMANIN GÜCÜ

Røraas ve arkadaşlarının, birey içi biyolojik varyasyonun hesaplamasında güç analizi ile ilgili yaptıkları bir çalışmaya göre, klasik nested ANOVA metoduyla hesaplama yapılırken; çalışma tasarımı (kişi sayısı, kişi başına alınan numune sayısı ve numunelerin tekrarlı ölçüm sayısı), CV_I 'nin gücünün belirlenmesinde oldukça etkilidir (109,111,175). CV_I 'nin gücünü değerlendirmek için çalışma tasarımı ile birlikte, hesaplanan CV_A/CV_I oranının kullanılması önerilir (111). Røraas ve arkadaşları, söz konusu yayında açıkladıkları simülasyon çalışmasına göre CV_A/CV_I oranının, yeterli güç elde etmek için hayati önem taşıdığını bildirmişlerdir. Oran ne kadar düşük olursa, CV_I için güven aralığı o kadar dar ve algılama gücü o kadar iyi olur. CV_A/CV_I yüksek olduğunda, çok sayıda birey ve numune bile, genellikle 80% 'in üzeri olarak tanımlanan yeterli güce asla ulaşamayacaktır; ancak tekrarlı ölçüm sayısının artırılması, gücü artıracaktır. CV_A ve CV_I arasındaki oran 1'in altında olduğunda, çoğu tasarım için güç 1.00 olacaktır. Bu nedenle CV_A/CV_I 'nin <1 olması tavsiye edilir ve hatta <0.5 olması arzu edilir (111).

Chiu ve arkadaşlarının sabah tükürük kortizolü için BV hesaplanmasıyla ilgili yaptıkları çalışmaya 28 kişi (16 kadın ve 12 erkek) dahil edilmiş olup; çalışmada her bireyden 2 hafta içerisinde 4'er numune toplanmış ve numunelerde tek ölçüm

gerçekleştirilmiştir (172). Numunelerde tekrarlı ölçüm gerçekleştirilmediğinden çalışmanın gücü değerlendirilememektedir.

Casals ve arkadaşları, gece tükürük kortizolu için BV hesaplanmasıyla ilgili yaptıkları araştırmadaki birinci çalışmada (Çalışma A), sağlıklı 7 kişiyi (4 kadın ve 3 erkek) dahil etmiş olup; 4 hafta boyunca her bireyden 8'er numune topladıktan sonra numuneleri tekrarlı olarak çalışmışlardır (94). Çalışma A'da, çalışmanın gücünü değerlendirmek için gerekli olan minimum 10 katılımcı sayısı sağlanamadığından, çalışmanın gücü değerlendirilememektedir (94, 111). Casals ve arkadaşlarının aynı araştırmada yaptıkları ikinci çalışmada (Çalışma B) ise sağlıklı 20 kişiden (13 kadın ve 7 erkek) oluşan gruptan, 2 gün için her bireyden gece 2'ser numune toplamış ve numuneler tekrarlı olarak çalışılmıştır (94). Çalışma B için çalışmanın gücü yaklaşık 0.88 görünmektedir (94, 111).

Bizim çalışmamızda her iki yöntemle de yapılan hesaplamalarda CV_I'yı saptama gücü, Røraas ve arkadaşlarının güç analizi tablosuna göre en yüksek değer olan, 1.00'dir (111).

5.7. ALT GRUP ANALİZLERİ

EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu'nun Avrupa Biyolojik Varyasyon Çalışması'nda (EuBIVAS); sabah serum kortizolu için CV_I değeri erkekler, menopoza öncesi kadınlar ve menopoza sonrası kadınlar olmak üzere üç grup için ayrı ayrı hesaplanmış ve bu alt gruplar arasında CV_I için anlamlı fark bulunmamıştır (169). Çalışmamızda her iki yöntemle elde ettiğimiz CV_I ve CV_G değerleri, %95 güven aralıkları ile değerlendirildiğinde, her iki cinsiyet için birbiriyle örtüşmektedir. Buna göre tükürük kortizolu için cinsiyetler arası tabakalandırma yapılması gerekli değildir. Postmenopozal kadın katılımcı sayımız yeterli olmadığından, bu alt grupları için biyolojik varyasyon verilerini hesaplayamadık ve diğer gruplar ile kıyaslayamadık. Daha önce literatürde mevcut iki tükürük kortizolu BV çalışmasında da postmenopozal kadın alt grubun BV'u değerlendirilmemiştir (94, 172). Bununla beraber gelecekte, tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonun hesaplanması ile ilgili yapılacak çalışmalarda; postmenopozal kadın katılımcı sayısının artırılması, bu grup için tabakalandırmanın gerekli olup olmadığını değerlendirmede faydalı olacaktır.

5.8. TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜMÜNDE ANALİTİK YÖNTEMLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Serum kortizolünün ölçümünde LC-MS/MS yöntemi referans yöntem olarak kabul edilmektedir; ancak idrar veya tükürük kortizolü için henüz referans yöntem mevcut değildir (176,177). Tükürük kortizolü, hem immünölçüm yöntemleri hem de LC-MS/MS yöntemi ile ölçülebilmektedir. İmmünölçüm temelli otomatize yöntemler, kütle spektrometresinin aksine daha pratik bir yaklaşım sunar; ancak bu yöntemlerde tükürükte bulunan diğer steroid hormonlarla çapraz reaksiyonlar görülebilir (177,178). Özellikle tükürükte yüksek seviyelerde bulunan kortizon ile önemli ölçüde antikor çapraz reaksiyonu meydana gelebilir (177). Bu yöntemlerin çoğu metrolojik olarak izlenebilir değildir; bu da rutin uygulamada sık kullanılan bu immünölçüme dayalı analizlerin zayıf standardizasyonuna neden olmaktadır. Çalışmamızda LC-MS/MS yöntemiyle tüm numunelerin sabah tükürük kortizolü ortalaması 5.03 nmol/L (5.01-5.05, %95 GA), ECLIA yönteminde ise 5.95 nmol/L (5.93-5.97, %95 GA) idi. Vogeser ve arkadaşları, Roche firmasına ait elektrokemilüminesans immünölçüme dayalı ikinci jenerasyon kortizol testinin performansını değerlendirdikleri çalışmada, birinci nesil kortizol testine göre, LC-MS/MS ile daha uyumlu sonuçlar gözlemlediler (179). Çalışmamızda, Vogeser ve arkadaşlarının bulguları ile uyumlu sonuçlar elde ettik. Passing ve Bablok regresyon analizine göre regresyon denklemini $y = -0.179 + 1.244x$ olarak ve $r = 0.988$ bulduk. Cusum testine göre doğrusallıktan anlamlı bir sapma yoktu ($p=0.67$). Bland-Altman analizine göre ECLIA yönteminin biası konsantrasyon olarak 0.975 nmol/L, yüzde olarak ise %17.9 bulundu.

ECLIA yönteminde tükürükte bulunan diğer steroidlerle meydana gelen çapraz reaksiyon, aynı numunelerde LC-MS/MS yöntemine göre daha yüksek bir ortalama elde etmemizin nedeni olabilir (177). Serbest kortizol difüzyonla tükürüğe girdikten sonra, 11 beta-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 2 enzimi tarafından hızla kortizona dönüştürülür ve bu da tükürükteki kortizolden dört ila dokuz kat daha fazla kortizon oluşması ile sonuçlanır (180). Kortizona ek olarak, diğer steroidler de tükürük kortizolünün immünölçümlerinde çapraz reaksiyon gösterebilir (177). Tükürük kortizolünün kütle spektrometresi ile ölçümü, kortizon ve diğer steroidlerle çapraz reaksiyon etkisini ortadan kaldırarak daha spesifik bir analitik yöntem sunar. Sonuç olarak, sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi ile ölçümde; radyo

immünölçüm, enzimatik immünölçüm veya otomatize kemilüminesans immünölçümlerden önemli ölçüde daha düşük sonuçlar elde edilebilir (3,177,180).

Endokrin Derneği'nin Cushing Sendromu Tanı Rehberi'nde tükürük kortizolü ölçümünde kütle spektrometresi gibi ileri analiz yöntemlerinin kullanılması önerilmektedir (86). Kütle spektrometrik yöntemlerin dezavantajı ise oldukça zahmetli, zaman alıcı, pahalı ve karmaşık olmaları nedeniyle, günümüzde rutinde kullanımının sınırlı olmasıdır. Literatürde tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanması ile ilgili mevcut her iki çalışmada da immünölçüme dayalı yöntemler kullanılmıştır (94,172). Bizim çalışmamız hem monoklonal antikor kullanılan yarışmalı ECLIA hem de LC-MS/MS yöntemleri ile tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olma niteliğindedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Klinik laboratuvarında ölçümü yapılan bir analitin birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyonunun bilinmesi; o analitin bireyselliğini ve dolayısıyla popülasyona dayalı referans aralıkların kullanılabilirliğini değerlendirmede, referans değişim değerinin hesaplanmasında ve analitik kalite gerekliliklerinin belirlenmesinde önemlidir. EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu, yayınladıkları BIVAC kontrol listesini göz önünde bulundurarak, birçok analit için literatürdeki biyolojik varyasyon çalışmalarının kalitesini değerlendirip EFLM Biyolojik Varyasyon Veri Tabanı'nda bu verileri güncel ve ulaşılabilir hâle getirmektedir (120,132). Tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonu ile ilgili daha önce yayınlamış olan iki çalışma; katılımcı sayısı, çalışma tasarımı ve istatistiksel analiz bakımından günümüzdeki standartlar için yetersiz görünmektedir. Tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunu hesaplamayı amaçladığımız bu çalışmanın tasarımını, güncel kontrol listesini göz önünde bulundurarak planladık ve preanalitik evreden kaynaklanabilecek varyasyonu düşük düzeyde tutabilmek için numune alımında standart bir prosedür uyguladık. Çalışmamız, tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun hesaplanmasında, BIVAC kriterleri esas alınarak gerçekleştirilen ilk çalışmadır.

Sabah tükürük numunelerinde hem ECLIA hem de LC-MS/MS yöntemleriyle tekrarlı ölçümler yaparak elde ettiğimiz sonuçlardan hesapladığımız birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyon verileri, %95 güven aralıkları ile değerlendirildiğinde birbiriyle örtüşmektedir [ECLIA yöntemi ile CV_I %28.1 (25.7-30.8), CV_G %31.3 (24.5-42.6); LC-MS/MS yöntemi ile CV_I %31.1 (28.1-34.5), CV_G %27.5 (21.2-37.6)]. Çalışmamız, monoklonal antikor kullanılan yarışmalı ECLIA ve LC-MS/MS yöntemleri ile tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun değerlendirildiği ilk çalışma olma niteliğindedir.

Çalışmamıza göre sabah tükürük kortizolü orta derecede bireysellik göstermektedir (ECLIA için II:0.89; LC-MS/MS için II:1.13). Bu nedenle, tükürük kortizolü ölçüm sonuçlarının değerlendirilmesinde popülasyona dayalı referans aralıkların, referans değişim değeri ile kullanılmasının faydalı olacağı görüşündeyiz.

Tükürük kortizolü için elde ettiğimiz BV verilerine göre ECLIA yöntemi için arzu edilen impresizyon hedefi <%14, bias hedefi <%11 ve TEa hedefi <%34 idi. LC-MS/MS yöntemi için ise arzu edilen impresizyon hedefi <%15.6, bias hedefi <%11 ve TEa hedefi <%36 idi.

Bulgularımıza göre sabah tükürük kortizolü için CV_I, CV_G ve bireysellik indeksi, cinsiyetler arasında anlamlı farklılık göstermediği için; referans aralıkların kullanımında cinsiyete göre tabakalandırma yapılmasına gerek yoktur. Katılımcılar arasında menopoza sonrası dönemdeki kadın sayısı yeterli sayıda olmadığından, bu alt grup için tabakalandırma yapmanın gerekli olup olmadığı değerlendirilemedi. Postmenopozal dönemdeki kadın sayısının yeterli olmaması, çalışmamızın sınırlamalarından biridir. Gelecekteki çalışmalarda, postmenopozal kadın katılımcı sayısı artırılarak bu alt grup için tabakalandırma gerekip gerekmediği araştırılmalıdır.

Cushing ve Psödo-Cushing sendromu hastalarında tükürük kortizolünün birey içi biyolojik varyasyonunun sağlıklı popülasyondan farklı olabileceğini göz önünde bulundurmak önemlidir. Çalışmamızda tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun yalnızca sağlıklı popülasyon için hesaplanması, bulguların klinik kullanımı açısından çalışmamızın bir diğer sınırlamasıdır. Gelecekte yapılacak tükürük kortizolü BV çalışmalarına, hasta gruplarının dahil edilmesinin literatüre katkı sağlayacağı görüşündeyiz.

Preanalitik evreden kaynaklanabilecek varyasyonu düşük tutmak ve elektrokemilüminesans immünölçüm yöntemi için analitik saptama sınırının altında ölçüm sonuçları elde etmemek amacıyla; kortizol düzeyinin yüksek olduğu sabah 08.00-10.00 saatleri arasında numuneleri topladık (181). Sağlıklı bireylerin tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunu, sabah numuneleri ile hesaplamamız, çalışmamızın bir diğer sınırlamasıdır. Cushing sendromu şüphesinde, gece yarısı tükürük kortizolü ölçümü önemlidir. Bu nedenle; gelecekte yapılacak tükürük kortizolü BV çalışmalarının, 23.30-00.30 saatleri arasında toplanan numuneler ile planlanmasının literatüre katkı sağlayabileceği görüşündeyiz (86).

7. KAYNAKLAR

1. Miller WG, Sandberg S. Quality control of the analytical examination process. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2022. 7th edition. Elsevier Inc.; p129-163.e4.
2. Lundberg GD. Acting on Significant Laboratory Results. JAMA. 1981;245(17):1762.
3. Sandberg S, Røraas T, Aarsand AK. Biological variation and analytical performance specifications. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2022. 7th edition. Elsevier Inc.; p.165-165.e22
4. Simundic AM, Dukić L, Biljak VR. Preanalytical variation and pre-examination processes. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2022. 7th edition. Elsevier Inc.; p.80-128.e16.
5. Fraser CG. Biological Variation: From Principles to Practice. AACC Press; 2001.
6. Dittadi R, Fiorin Damiani A, Olcese C. Evaluation of serum cortisol biological variation in the evening withdrawal. Clin Chem Lab Med. 2017;55(12).
7. Laerum OD, Smaaland R. Circadian and infradian aspects of the cell cycle: from past to future. Chronobiologia 1989;16(4):441–53.
8. Prendergast BJ, Zucker I. Ultradian rhythms in mammalian physiology and behavior. Curr Opin Neurobiol. 2016;40:150–154.
9. Coskun A, Zarepour A, Zarrabi A. Physiological Rhythms and Biological Variation of Biomolecules: The Road to Personalized Laboratory Medicine. Int J Mol Sci. 2023;24(7):6275.
10. Kaufman E, Lamster IB. The Diagnostic Applications of Saliva— A Review. Crit Rev Oral Biol 2002;13(2):197–212.
11. Martí-Álamo S, Mancheño-Franch A, Marzal-Gamarra C, Carlos-Fabuel L. Saliva as a diagnostic fluid. Literature review. J Clin Exp Dent 2012;4(4):e237-43.
12. Gröschl M. Saliva: a reliable sample matrix in bioanalytics. Bioanalysis 2017;9(8):655–668.
13. Rose RM, Hurst MW. Plasma Cortisol and Growth Hormone Responses to Intravenous Catheterization. J Human Stress 1975;1(1):22–36.
14. Herndon J, Turner J, Perachio A, Blank M, Collins D. Endocrine changes induced by venipuncture in rhesus monkeys. Physiol Behav 1984;32(4):673–676.

15. Beerda B, Schilder MBH, Janssen NSCRM, Mol JA. The Use of Saliva Cortisol, Urinary Cortisol, and Catecholamine Measurements for a Noninvasive Assessment of Stress Responses in Dogs. *Horm Behav* 1996;30(3):272–279.
16. Ellervik C, Vaught J. Preanalytical Variables Affecting the Integrity of Human Biospecimens in Biobanking. *Clin Chem* 2015;61(7):914–934.
17. Patrick M. Sluss, Frances J. Hayes. *Laboratory Techniques for Recognition of Endocrine Disorders*. Williams Textbook of Endocrinology. 2020. 14th edition. Elsevier Inc.; p.62-90.e6.
18. Darci R. Block, Christopher M. Florkowski. *Body fluids*. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2022. 7th edition. Elsevier Inc.; p.456-456.e36.
19. Gröschl M. Current Status of Salivary Hormone Analysis. *Clin Chem* 2008;54(11):1759–1769.
20. Gröschl M, Rauh M. Influence of commercial collection devices for saliva on the reliability of salivary steroids analysis. *Steroids* 2006;71(13–14):1097–1100.
21. Pfaffe T, Cooper-White J, Beyerlein P, Kostner K, Punyadeera C. Diagnostic Potential of Saliva: Current State and Future Applications. *Clin Chem* 2011;57(5):675–687.
22. Humphrey SP, Williamson RT. A review of saliva: Normal composition, flow, and function. *J Prosthet Dent* 2001;85(2):162–169.
23. Bellagambi FG, Lomonaco T, Salvo P, Vivaldi F, Hangouët M, Ghimenti S, et al. Saliva sampling: Methods and devices. An overview. *TrAC, Trends Anal Chem* 2020;124:115781.
24. Hodge C, Lebenthal E, Lee PC, Topper W. Amylase in the Saliva and in the Gastric Aspirates of Premature Infants: Its Potential Role in Glucose Polymer Hydrolysis. *Pediatr Res* 1983;17(12):998–1001.
25. Lebenthal E. Role of salivary amylase in gastric and intestinal digestion of starch. *Dig Dis Sci* 1987;32(10):1155–1157.
26. Kulkarni B v., Mattes RD. Lingual lipase activity in the orosensory detection of fat by humans. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 2014;306(12):R879–R885.
27. de Almeida PDV, Grégio AMT, Machado MAN, de Lima AAS, Azevedo LR. Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J Contemp Dent Pract* 2008;9(3):72–80.
28. Brandtzaeg P. Secretory IgA: Designed for Anti-Microbial Defense. *Front Immunol* 2013;4(8):222.

29. Murakami M, Ohtake T, Dorschner RA, Gallo RL. Cathelicidin Antimicrobial Peptides are Expressed in Salivary Glands and Saliva. *J Dent Res* 2002;81(12):845–850.
30. Gröschl M, Wendler O, Topf H-G, Bohlender J, Köhler H. Significance of salivary adrenomedullin in the maintenance of oral health: Stimulation of oral cell proliferation and antibacterial properties. *Regul Pept* 2009;154(1–3):16–22.
31. Porcheri C, Mitsiadis T. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells* 2019;8(9):976.
32. Lagerlof F, Dawes C. The Volume of Saliva in the Mouth Before and After Swallowing. *J Dent Res* 1984;63(5):618–621.
33. Speirs RL. Secretion of saliva by human lip mucous glands and parotid glands in response to gustatory stimuli and chewing. *Arch Oral Biol* 1984;29(11):945–948.
34. Aps JKM, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;150(2–3):119–131.
35. Iorgulescu G. Saliva between normal and pathological. Important factors in determining systemic and oral health. *J Med Life* 2009;2(3):303–7.
36. Chiappin S, Antonelli G, Gatti R, De Palo EF. Saliva specimen: A new laboratory tool for diagnostic and basic investigation. *Clin Chim Acta* 2007;383(1–2):30–40.
37. Aframian D, Davidowitz T, Benoliel R. The distribution of oral mucosal pH values in healthy saliva secretors. *Oral Dis* 2006;12(4):420–423.
38. Bardow A, Madsen J, Nauntofte B. The bicarbonate concentration in human saliva does not exceed the plasma level under normal physiological conditions. *Clin Oral Investig* 2000;4(4):245–253.
39. Jensdottir T, Nauntofte B, Buchwald C, Bardow A. Effects of Sucking Acidic Candy on Whole-Mouth Saliva Composition. *Caries Res* 2005;39(6):468–474.
40. Porola P, Mackiewicz Z, Laine M, Baretto G, Stegaev V, Takakubo Y, et al. Laminin isoform profiles in salivary glands in Sjögren's syndrome. *Adv Clin Chem* 2011;55:35–59.
41. Mazariegos MR. Alteration of tight junctional permeability in the rat parotid gland after isoproterenol stimulation. *J Cell Biol* 1984;98(5):1865–1877.
42. Link B, Haschke M, Grignaschi N, Bodmer M, Aschmann YZ, Wenk M, et al. Pharmacokinetics of intravenous and oral midazolam in plasma and saliva in humans:

- usefulness of saliva as matrix for CYP3A phenotyping. *Br J Clin Pharmacol* 2008;66(4):473–484.
43. Jusko WJ, Milsap RL. Pharmacokinetic Principles of Drug Distribution in Saliva. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694(1):36–47.
 44. Adachi K, Ono M, Kawamura A, Yuki M, Fujishiro H, Kinoshita Y. Nizatidine and cisapride enhance salivary secretion in humans. *Aliment Pharmacol Ther* 2002;16(2):297–301.
 45. Ohyama K, Moriyama M, Hayashida J-N, Tanaka A, Maehara T, Ieda S, et al. Saliva as a potential tool for diagnosis of dry mouth including Sjögren's syndrome. *Oral Dis* 2015;21(2):224–231.
 46. Ameringer S, Munro C, Elswick RK. Assessing Agreement Between Salivary Alpha Amylase Levels Collected by Passive Drool and Eluted Filter Paper in Adolescents With Cancer. *Oncol Nurs Forum* 2012;39(4):E317–E323.
 47. Mohamed R, Campbell J-L, Cooper-White J, Dimeski G, Punyadeera C. The impact of saliva collection and processing methods on CRP, IgE, and Myoglobin immunoassays. *Clin Transl Med* 2012;1(1):e19.
 48. Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibel LC, Schwartz EB, et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav* 2007;92(4):583–590.
 49. Ali A, Starck C, Dulson DK, Rutherford-Markwick K. Comparison of Three Saliva Collection Methods to Assess Physiological Markers. *J Nutr Metab* 2020;2020(1):1–11.
 50. Nurkka A, Obiero J, Käyhty H, Scott JAG. Effects of Sample Collection and Storage Methods on Antipneumococcal Immunoglobulin A in Saliva. *Clin Vaccine Immunol* 2003;10(3):357–361.
 51. Granger DA, Kivlighan KT, Fortunato C, Harmon AG, Hibel LC, Schwartz EB, et al. Integration of salivary biomarkers into developmental and behaviorally-oriented research: Problems and solutions for collecting specimens. *Physiol Behav* 2007;92(4):583–590.
 52. Roger L. Bertholf, Mark Cooper, William E. Winter. Adrenal cortex. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 2022. 7th edition. Elsevier Inc.; p.805-805.e37.
 53. Taylor AL, Fishman LM. Corticotropin-Releasing Hormone. *N Engl J Med* 1988;319(4):213–222.

54. Seidah NG, Sadr MS, Chrétien M, Mbikay M. The multifaceted proprotein convertases: their unique, redundant, complementary, and opposite functions. *J Biol Chem* 2013;288(30):21473–81.
55. Kitabgi P. Neurotensin and Neuromedin N Are Differentially Processed from a Common Precursor by Prohormone Convertases in Tissues and Cell Lines. In: *Cellular Peptide Hormone Synthesis and Secretory Pathways*. 2009. Springer Berlin, Heidelberg; p.63–84.
56. Boscaro M, Sonino N, Paoletta A, Rampazzo A, Mantero F. Evidence for Ultra-Short Loop Autoregulation of Adrenocorticotropin Secretion in Man. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66(2):255–257.
57. William J. Marshall, Marta Lapsley, Andrew Day, Kate Shipman. The adrenal glands. *Clinical Chemistry*. 2021. 9th edition. Elsevier Inc.; p.175-193.
58. Nishikawa T, Mikami K, Yoshida A, Omura M, Saito Y, Tamura Y, et al. Regulation of Cholesterol Metabolism in Adrenal Cortex: Comparative Studies on Cholesterol Esterase in Human Adrenal Glands. *Endocr J* 1993;40(4):453–459.
59. Manna PR, Stocco DM. Regulation of the Steroidogenic Acute Regulatory Protein Expression: Functional and Physiological Consequences. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord* 2005;5(1):93–108.
60. Manna PR, Dyson MT, Stocco DM. Regulation of the steroidogenic acute regulatory protein gene expression: present and future perspectives. *Mol Hum Reprod* 2009;15(6):321–333.
61. Strushkevich N, Gilep AA, Shen L, Arrowsmith CH, Edwards AM, Usanov SA, et al. Structural Insights into Aldosterone Synthase Substrate Specificity and Targeted Inhibition. *Molecular Endocrinology* 2013;27(2):315–324.
62. Odermatt A, Kratschmar D v. Tissue-specific modulation of mineralocorticoid receptor function by 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: An overview. *Mol Cell Endocrinol* 2012;350(2):168–186.
63. Fuller PJ. Novel interactions of the mineralocorticoid receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2015;408:33–37.
64. Knights KM, Winner LK, Elliot DJ, Bowalgaha K, Miners JO. Aldosterone glucuronidation by human liver and kidney microsomes and recombinant UDP-glucuronosyltransferases: Inhibition by NSAIDs. *Br J Clin Pharmacol* 2009;68(3):402–412.

65. Weikum ER, Liu X, Ortlund EA. The nuclear receptor superfamily: A structural perspective. *Protein Sci* 2018;27(11):1876–1892.
66. Lorraine I. McKay, John A. Cidlowski. Pharmacokinetics of Corticosteroids. In: Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., editors. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton (ON): BC Decker; 2003.
67. Chan WL, Carrell RW, Zhou A, Read RJ. How Changes in Affinity of Corticosteroid-binding Globulin Modulate Free Cortisol Concentration. *J Clin Endocrinol Metab* 2013;98(8):3315–3322.
68. Wood P. Salivary steroid assays – research or routine? *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 2009;46(3):183–196.
69. Debono M, Harrison RF, Whitaker MJ, Eckland D, Arlt W, Keevil BG, et al. Salivary Cortisone Reflects Cortisol Exposure Under Physiological Conditions and After Hydrocortisone. *J Clin Endocrinol Metab* 2016;101(4):1469–1477.
70. Vining RF, McGinley RA, Symons RG. Hormones in saliva: mode of entry and consequent implications for clinical interpretation. *Clin Chem* 1983;29(10):1752–1756.
71. Blair J, Adaway J, Keevil B, Ross R. Salivary cortisol and cortisone in the clinical setting. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* 2017;24(3):161–168.
72. Shimojo M, Ricketts ML, Petrelli MD, Moradi P, Johnson GD, Bradwell AR, et al. Immunodetection of 11 β -Hydroxysteroid Dehydrogenase Type 2 in Human Mineralocorticoid Target Tissues: Evidence for Nuclear Localization. *Endocrinology* 1997;138(3):1305–1311.
73. Chapman K, Holmes M, Seckl J. 11 β -hydroxysteroid dehydrogenases: intracellular gatekeepers of tissue glucocorticoid action. *Physiol Rev* 2013;93(3):1139–206.
74. Riad-Fahmy D, Read GF, Walker RF, Griffiths K. Steroids in Saliva for Assessing Endocrine Function. *Endocr Rev* 1982;3(4):367–395.
75. Vining RF, McGinley RA, Maksvytis JJ, Ho KY. Salivary Cortisol: A Better Measure of Adrenal Cortical Function than Serum Cortisol. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 1983;20(6):329–335.
76. Luthold WW, Marcondes JAM, Wajchenberg BL. Salivary cortisol for the evaluation of Cushing's syndrome. *Clin Chim Acta* 1985;151(1):33–39.

77. Gallagher P, Leitch MM, Massey AE, McAllister-Williams RH, Young AH. Assessing cortisol and dehydroepiandrosterone (DHEA) in saliva: effects of collection method. *Journal of Psychopharmacology* 2006;20(5):643–649.
78. Dorn LD, Lucke JF, Loucks TL, Berga SL. Salivary cortisol reflects serum cortisol: analysis of circadian profiles. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 2007;44(3):281–284.
79. Laudat MH, Cerdas S, Fournier C, Guiban D, Guilhaume B, Luton JP. Salivary Cortisol Measurement: A Practical Approach to Assess Pituitary-Adrenal Function. *J Clin Endocrinol Metab* 1988;66(2):343–348.
80. Inder WJ, Dimeski G, Russell A. Measurement of salivary cortisol in 2012 - laboratory techniques and clinical indications. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2012;77(5):645–651.
81. Buliman A, Tataranu LG, Paun DL, Mirica A, Dumitrache C. Cushing's Disease: A Multidisciplinary Overview of the Clinical Features, Diagnosis, And Treatment. *J Med Life* 2016;9(1):12–18.
82. Türkiye Endokrinoloji ve Metabolizma Derneği Adrenal ve Gonadal Hastalıklar Çalışma Grubu. Adrenal Ve Gonadal Hastalıklar Kılavuzu. 2020.
83. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *The Lancet* 2006;367(9522):1605–1617.
84. Evans PJ, Peters JR, Dyas J, Walker RF, Riad-Fahmy D, Hall R. Salivary Cortisol Levels In True And Apparent Hypercortisolism. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1984;20(6):709–715.
85. Nieman LK, Biller BMK, Findling JW, Newell-Price J, Savage MO, Stewart PM, et al. The Diagnosis of Cushing's Syndrome: An Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1526–1540.
86. Glass AR, Zavadil AP, Halberg F, Cornelissen G, Schaaf M. Circadian Rhythm of Serum Cortisol in Cushing's Disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;59(1):161–165.
87. Barrou Z, Guiban D, Maroufi A, Fournier C, Dugué M-A, Luton J-P, et al. Overnight Dexamethasone Suppression Test: Comparison of Plasma and Salivary Cortisol Measurement for the Screening of Cushing's Syndrome. *Eur J Endocrinol* 1996;134(1):93–96.
88. Putignano P, Toja P, Dubini A, Giralaldi FP, Corsello SM, Cavagnini F. Midnight Salivary Cortisol Versus Urinary Free and Midnight Serum Cortisol as Screening Tests for Cushing's Syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(9):4153–4157.

89. Yaneva M, Mosnier-Pudar H, Dugué M-A, Grabar S, Fulla Y, Bertagna X. Midnight Salivary Cortisol for the Initial Diagnosis of Cushing's Syndrome of Various Causes. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3345–3351.
90. Nunes M-L, Vattaut S, Corcuff J-B, Rault A, Loiseau H, Gatta B, et al. Late-Night Salivary Cortisol for Diagnosis of Overt and Subclinical Cushing's Syndrome in Hospitalized and Ambulatory Patients. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(2):456–462.
91. Baid SK, Sinaii N, Wade M, Rubino D, Nieman LK. Radioimmunoassay and Tandem Mass Spectrometry Measurement of Bedtime Salivary Cortisol Levels: A Comparison of Assays to Establish Hypercortisolism. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(8):3102–3107.
92. Vogeser M, Durner J, Seliger E, Auernhammer C. Measurement of Late-Night Salivary Cortisol with an Automated Immunoassay System. *Clin Chem Lab Med* 2006;44(12):1441–1445.
93. Casals G, Foj L, de Osaba MJM. Day-to-day Variation of Late-Night Salivary Cortisol in Healthy Volunteers. *Clin Biochem* 2011;44(8–9):665–668.
94. Badrick E, Kirschbaum C, Kumari M. The Relationship between Smoking Status and Cortisol Secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 2007;92(3):819–824.
95. Dauber A, Kellogg M, Majzoub JA. Monitoring of Therapy in Congenital Adrenal Hyperplasia. *Clin Chem* 2010;56(8):1245–1251.
96. Hampl R, Foretová L, Šulcová J, Stárka L. Daily Profiles of Salivary Cortisol in Hydrocortisone Treated Children with Congenital Adrenal Hyperplasia. *Eur J Pediatr* 1990;149(4):232–234.
97. Gröschl M, Rauh M, Dörr HG. Cortisol and 17-Hydroxyprogesterone Kinetics in Saliva after Oral Administration of Hydrocortisone in Children and Young Adolescents with Congenital Adrenal Hyperplasia due to 21-Hydroxylase Deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(3):1200–1204.
98. Restituto P, Galofré JC, Gil MJ, Mugueta C, Santos S, Monreal JJ, et al. Advantage of Salivary Cortisol Measurements in the Diagnosis of Glucocorticoid-Related Disorders. *Clin Biochem* 2008;41(9):688–692.
99. Walker RF, Riad-Fahmy D, Read GF. Adrenal Status Assessed by Direct Radioimmunoassay of Cortisol in Whole Saliva or Parotid Saliva. *Clin Chem* 1978;24(9):1460–1463.
100. Van Aken MO, Romijn JA, Miltenburg JA, Lentjes EGWM. Automated Measurement of Salivary Cortisol. *Clin Chem* 2003;49(8):1408–1409.

101. Sesay AM, Micheli L, Tervo P, Palleschi G, Virtanen V. Development of a Competitive Immunoassay for the Determination of Cortisol in Human Saliva. *Anal Biochem* 2013;434(2):308–314.
102. Jönsson BAG, Malmberg B, Amilon Å, Helene Garde A, Ørbæk P. Determination of Cortisol in Human Saliva Using Liquid Chromatography–Electrospray Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B* 2003;784(1):63–68.
103. Perogamvros I, Owen LJ, Newell-Price J, Ray DW, Trainer PJ, Keevil BG. Simultaneous Measurement of Cortisol and Cortisone in Human Saliva Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry: Application In Basal and Stimulated Conditions. *Journal of Chromatography B* 2009;877(29):3771–3775.
104. Montskó G, Tarjányi Z, Mezősi E, Kovács GL. A Validated Method for Measurement of Serum Total, Serum Free and Salivary Cortisol Using High-Performance Liquid Chromatography Coupled with High-Resolution ESI-TOF Mass Spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2014;406(9–10):2333–2341.
105. Zerikly RK, Amiri L, Faiman C, Gupta M, Singh RJ, Nutter B, et al. Diagnostic Characteristics of Late-Night Salivary Cortisol Using Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(10):4555–4559.
106. Florkowski C, Don-Wauchope A, Gimenez N, Rodriguez-Capote K, Wils J, Zemlin A. Point-of-care testing and evidence-based laboratory medicine – does it leverage any advantage in clinical decision making? *Crit Rev Clin Lab Sci* 2017;54(7–8):471–494.
107. Fraser GG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* 1989;27(5):409–437.
108. Schneider AJ. Some thoughts on normal, or standard, values in clinical medicine. *Pediatrics* 1960;26(6):973–984.
109. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence Intervals and Power Calculations for Within-Person Biological Variation: Effect of Analytical Imprecision, Number of Replicates, Number of Samples, and Number of Individuals. *Clin Chem* 2012;58(9):1306–1313.
110. Røraas T, Sandberg S, Aarsand AK, Støve B. A Bayesian Approach to Biological Variation Analysis. *Clin Chem* 2019;65(8):995–1005.
111. Gelman A, Carlin JB, Stern HS, Rubin DB. *Bayesian Data Analysis*. Chapman and Hall/CRC; 1995.

112. Loh TP, Ranieri E, Metz MP. Derivation of Pediatric Within-Individual Biological Variation by Indirect Sampling Method. *Am J Clin Pathol* 2014;142(5):657–663.
113. Loh TP, Metz MP. Indirect Estimation of Pediatric Between-Individual Biological Variation Data for 22 Common Serum Biochemistries. *Am J Clin Pathol* 2015;143(5):683–693.
114. Jones GRD. Estimates of Within-Subject Biological Variation Derived from Pathology Databases: An Approach to Allow Assessment of the Effects of Age, Sex, Time between Sample Collections, and Analyte Concentration on Reference Change Values. *Clin Chem* 2019;65(4):579–588.
115. Tan RZ, Markus C, Vasikaran S, Loh TP. Comparison of two (data mining) indirect approaches for between-subject biological variation determination. *Clin Biochem* 2022;105–106:57–63.
116. Tan RZ, Markus C, Vasikaran S, Loh TP. Comparison of four indirect (data mining) approaches to derive within-subject biological variation. *Clin Chem Lab Med* 2022;60(4):636–644.
117. Marqués-García F, Nieto-Librero A, González-García N, Galindo-Villardón P, Martínez-Sánchez LM, Tejedor-Ganduxé X, et al. Within-subject biological variation estimates using an indirect data mining strategy. Spanish multicenter pilot study (BiVaBiDa). *Clin Chem Lab Med* 2022;60(11):1804–1812.
118. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Díaz-Garzón J, Jonker N, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem* 2018;64(3):501–514.
119. Miller Wg, Erek A, Cunningham TD, Oladipo O, Scott MG, Johnson RE. Commutability Limitations Influence Quality Control Results with Different Reagent Lots. *Clin Chem* 2011;57(1):76–83.
120. White GH, Farrance I, AACB Uncertainty of Measurement Working Group. Uncertainty of measurement in quantitative medical testing: A laboratory implementation guide. *Clin Biochem Rev* 2004;25(4):S1-24.
121. Kristoffersen A-H, Petersen PH, Sandberg S. A model for calculating the within-subject biological variation and likelihood ratios for analytes with a time-dependent change in concentrations; exemplified with the use of D-dimer in suspected venous thromboembolism in healthy pregnant women. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 2012;49(6):561–569.

122. Røraas T, Støve B, Petersen PH, Sandberg S. Biological Variation: The Effect of Different Distributions on Estimated Within-Person Variation and Reference Change Values. *Clin Chem* 2016;62(5):725–736.
123. Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2016;53(5):313–325.
124. Ma C, Wang X, Wu J, Cheng X, Xia L, Xue F, et al. Real-world big-data studies in laboratory medicine: Current status, application, and future considerations. *Clin Biochem* 2020;84:21–30.
125. Martínez-Sánchez L, Marques-García F, Ozarda Y, Blanco A, Brouwer N, Canalias F, et al. Big data and reference intervals: rationale, current practices, harmonization and standardization prerequisites and future perspectives of indirect determination of reference intervals using routine data. *Adv Lab Med* 2021;2(1):9–16.
126. Díaz-Garzón J, Fernández-Calle P, Minchinela J, Aarsand AK, Bartlett WA, Aslan B, et al. Biological variation data for lipid cardiovascular risk assessment biomarkers. A systematic review applying the biological variation data critical appraisal checklist (BIVAC). *Clin Chim Acta* 2019;495:467–475.
127. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(6):833–835.
128. Panteghini M, Sandberg S. Defining analytical performance specifications 15 years after the Stockholm conference. *Clin Chem Lab Med* 2015;53(6).
129. Aarsand AK, Røraas T, Bartlett WA, Coşkun A, Carobene A, Fernandez-Calle P, et al. Harmonization initiatives in the generation, reporting and application of biological variation data. *Clin Chem Lab Med* 2018;56(10):1629–1636.
130. Aarsand AK, Fernandez-Calle P, Webster C, Coskun A, Gonzales-Lao E, Diaz-Garzon J, et al. The EFLM Biological Variation Database. <https://biologicalvariation.eu/> [26.04.2023].
131. Hyltoft Petersen P, Fraser CG, Sandberg S, Goldschmidt H. The Index of Individuality Is Often a Misinterpreted Quantity Characteristic. *Clin Chem Lab Med* 1999;37(6):655–661.
132. Harris EK. Effects of Intra-and Interindividual Variation on the Appropriate Use of Normal Ranges. *Clin Chem* 1974;20(12):1535–1542.

133. Harris EK. Some theory of reference values. II. Comparison of some statistical models of intraindividual variation in blood constituents. *Clin Chem* 1976;22(8):1343–1350.
134. Fraser CG. Reference change values. *Clin Chem Lab Med* 2012;50(5).
135. Fraser CG. Reference change values: the way forward in monitoring. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 2009;46(3):264–265.
136. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, Moecks J. Reference Change Values for Brain Natriuretic Peptides Revisited. *Clin Chem* 2006;52(8):1602–1603.
137. Panteghini M. Application of traceability concepts to analytical quality control may reconcile total error with uncertainty of measurement. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(1).
138. Kallner A, McQueen M, Heuck C. The Stockholm Consensus Conference on Quality Specifications in Laboratory Medicine, 25-26 April 1999. *Scand J Clin Lab Invest* 1999;59(7):475–475.
139. Petersen PH, Fraser CG. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine: 10 years on from the Stockholm consensus conference. *Accreditation and Quality Assurance* 2010;15(6):323–330.
140. Panteghini M, Ceriotti F, Jones G, Oosterhuis W, Plebani M, Sandberg S. Strategies to define performance specifications in laboratory medicine: 3 years on from the Milan Strategic Conference. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(12).
141. Fraser CG, Petersen PH, Libeer J-C, Ricos C. Proposals for Setting Generally Applicable Quality Goals Solely Based on Biology. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 1997;34(1):8–12.
142. Carobene A, Strollo M, Jonker N, Barla G, Bartlett WA, Sandberg S, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* 2016;54(10):1599–1608.
143. Levey AS, Stevens LA, Schmid CH, Zhang Y (Lucy), Castro AF, Feldman HI, et al. A New Equation to Estimate Glomerular Filtration Rate. *Ann Intern Med* 2009;150(9):604.
144. Debono M, Ghobadi C, Rostami-Hodjegan A, Huatan H, Campbell MJ, Newell-Price J, et al. Modified-Release Hydrocortisone to Provide Circadian Cortisol Profiles. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(5):1548–1554.

145. Henson BS, Wong DT. Collection, Storage, and Processing of Saliva Samples for Downstream Molecular Applications. In: Methods in molecular biology. Vol 666. Humana Press, Totowa, NJ; 2010:21–30.
146. Garde AH, Hansen ÅM. Long-term stability of salivary cortisol. Scand J Clin Lab Invest 2005;65(5):433–436.
147. Thienpont LM. The characterisation of cortisol concentrations in a reference serum panel: IRMM/IFCC-451. [Geel, Belgium]: Directorate General Joint Research Centre; 1999.
148. CLSI. Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation; approved guideline. CLSI document EP17-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.
149. CLSI. Evaluation of Detection Capability Implementation Guide. 1st ed. CLSI implementation guide EP17-Ed2-IG. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
150. CLSI. EP06 Evaluation of Linearity of Quantitative Measurement Procedures, 2nd Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2020.
151. Doğan Yücel. Türk Biyokimya Derneği. Pratik Metot Validasyonu ve Verifikasyonu TBD Kılavuzu. 2014. [https://www.turkbiyokimyadernegi.org.tr/upload/48/Dosyalar/tmp/Metot.Validasyonu.pdf]. 23.3.2023 tarihinde erişilmiştir.
152. CLSI. EP15 User Verification of Precision and Estimation of Bias, 3rd Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2014.
153. CLSI. EP09 Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples, 3rd Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute 2018.
154. BioVar: Biological Variation Analysis Tool v.1.0. [https://turcosa.shinyapps.io/biovar/]. 1.8.2022 tarihinde erişilmiştir.
155. Burdick. Confidence Intervals on Variance Components. CRC Press; 1992.
156. Carobene A, Aarsand AK, Guerra E, Bartlett WA, Coşkun A, Díaz-Garzón J, et al. European Biological Variation Study (EuBIVAS): Within- and Between-Subject Biological Variation Data for 15 Frequently Measured Proteins. Clin Chem 2019;65(8):1031–1041.
157. Aarsand AK, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, Guerra E, Locatelli M, Bartlett WA, et al. The EuBIVAS: Within- and Between-Subject Biological Variation Data for Electrolytes, Lipids,

Urea, Uric Acid, Total Protein, Total Bilirubin, Direct Bilirubin, and Glucose. *Clin Chem* 2018;64(9):1380–1393.

158. CLSI. User Verification of Precision Implementation Guide. 1st ed. CLSI implementation guide EP15-Ed3-IG1. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2021.
159. Fraser CG. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine. *J Lab Precis Med* 2017;2:35–35.
160. Nunes LAS, Mussavira S, Bindhu OS. Clinical and diagnostic utility of saliva as a non-invasive diagnostic fluid: a systematic review. *Biochem Med (Zagreb)* 2015;25(2):177–92.
161. Sun F, Reichenberger EJ. Saliva as a source of genomic DNA for genetic studies: review of current methods and applications. *Oral Health Dent Manag* 2014;13(2):217–22.
162. Liu J, Duan Y. Saliva: A potential media for disease diagnostics and monitoring. *Oral Oncol* 2012;48(7):569–577.
163. Nunes LAS, Brenzikofer R, Macedo DV. Reference intervals for saliva analytes collected by a standardized method in a physically active population. *Clin Biochem* 2011;44(17–18):1440–1444.
164. Elamin MB, Murad MH, Mullan R, Erickson D, Harris K, Nadeem S, et al. Accuracy of Diagnostic Tests for Cushing’s Syndrome: A Systematic Review and Metaanalyses. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93(5):1553–1562.
165. Mendel CM. The Free Hormone Hypothesis: A Physiologically Based Mathematical Model. *Endocr Rev* 1989;10(3):232–274.
166. Carroll T, Raff H, Findling JW. Late-Night Salivary Cortisol for the Diagnosis of Cushing Syndrome: a Meta-Analysis. *Endocrine Practice* 2009;15(4):335–342.
167. Hammond J, Wentz P, Statland BE, Phillips JC, Winkel P. Daily variation of lipids and hormones in sera of healthy subjects. *Clin Chim Acta* 1976;73(2):347–352.
168. Maes M, Mommen K, Hendrickx D, Peeters D, D’Hondt P, Ranjan R, et al. Components of biological variation, including seasonality, in blood concentrations of TSH, TT3, FT4, PRL, cortisol and testosterone in healthy volunteers. *Clin Endocrinol (Oxf)* 1997;46(5):587–598.
169. Carobene A, Guerra E, Marqués-García F, Boned B, Locatelli M, Coşkun A, et al. Biological variation of morning serum cortisol: Updated estimates from the European biological variation study (EuBIVAS) and meta-analysis. *Clin Chim Acta* 2020;509:268–272.

170. Ricós C, Arbós MA. Quality Goals for Hormone Testing. *Annals of Clinical Biochemistry: International Journal of Laboratory Medicine* 1990;27(4):353–358.
171. Ahokoski O, Virtanen A, Kairisto V, Scheinin H, Huupponen R, Irjala K. Biological Day-to-Day Variation and Reference Change Limits of Serum Cortisol and Aldosterone in Healthy Young Men on Unrestricted Diets. *Clin Chem* 1999;45(7):1097–1099.
172. Chiu SK, Collier CP, Clark AF, Wynn-Edwards KE. Salivary cortisol on ROCHE Elecsys immunoassay system: pilot biological variation studies. *Clin Biochem* 2003;36(3):211–214.
173. Fraser CG. Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(7):758–764.
174. Öztürk ÖG. Using Biological Variation Data for Reference Change Values in Clinical Laboratories. *Biochemistry & Analytical Biochemistry* 2012;1(4).
175. Díaz-Garzón Marco J, Fernández-Calle P, Ricós C. Models to estimate biological variation components and interpretation of serial results: strengths and limitations. *Adv Lab Med* 2020;1(3).
176. Hawley JM, Owen LJ, MacKenzie F, Mussell C, Cowen S, Keevil BG. Candidate Reference Measurement Procedure for the Quantification of Total Serum Cortisol with LC-MS/MS. *Clin Chem* 2016;62(1):262–269.
177. Casals G, Hanzu FA. Cortisol Measurements in Cushing's Syndrome: Immunoassay or Mass Spectrometry? *Ann Lab Med* 2020;40(4):285–296.
178. Leung KS-Y, Fong BM-W. LC-MS/MS in the routine clinical laboratory: has its time come? *Anal Bioanal Chem* 2014;406(9–10):2289–2301.
179. Vogeser M, Kratzsch J, Ju Bae Y, Bruegel M, Ceglarek U, Fiers T, et al. Multicenter performance evaluation of a second generation cortisol assay. *Clin Chem Lab Med* 2017;55(6):826–835.
180. Monaghan PJ, Keevil BG, Trainer PJ. The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis. *Rev Endocr Metab Disord* 2013;14(2):143–157.
181. Edwards S, Evans P, Hucklebridge F, Clow A. Association between time of awakening and diurnal cortisol secretory activity. *Psychoneuroendocrinology* 2001;26(6):613–622.

8. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı : Fatih Serin
Doğum yeri ve tarihi :
Uyruğu : T.C., K.K.T.C
İletişim adresi ve telefonu :
Yabancı dili : İngilizce

II- Eğitimi

2019-2023: SBÜ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Tıbbi Biyokimya
İhtisası
2011-2017: Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Lisans

III- Ünvanları

IV- Mesleki Deneyimi

2017: Bayburt Devlet Hastanesi
2019-2023: SBÜ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

Türk Biyokimya Derneği

VI- Bilimsel İlgi Alanları

Yazılı bildiri:

Evaluation of serum angiotensin converting enzyme activity in pediatric pneumonia patients- TBS International Biochemistry Congress 2021, 27-31 October 2021- Gaziantep

Example of measurement uncertainty in calculated tests: Calculated plasma osmolality- TBS International Biochemistry Congress 2021, 27-31 October 2021- Gaziantep

Evaluation of imprecision and reference change value of tumor markers on Roche Cobas 8000 analyzer- TBS International Biochemistry Congress 2021, 27-31 October 2021- Gaziantep

The role of MCV in the rational test request of vitamin B12- TBS
International Biochemistry Congress 2021, 27-31 October 2021- Gaziantep

Calculation of reference change values of the d-dimer test- TBS International
Biochemistry Congress 2021, 27-31 October 2021- Gaziantep

The importance of calculated lipid parameters in coronary artery disease: A
preliminary study- TBS International Biochemistry Congress 2021, 27-31
October 2021- Gaziantep

Calculation of measurement uncertainty of immunochemistry parameters-
XXXI. National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, 18-20
December 2020- Virtual Congress, Türkiye

Evaluation of lipid profile and T3 / T4 ratio according to tsh groups in
hypothyroid patients receiving hormone replacement therapy- XXXI.
National Congress of the Turkish Biochemical Society 2020, 18-20
December 2020- Virtual Congress, Türkiye

Determination of median values of biochemical parameters in double and
quadruple prenatal screening tests- 27th Balkan Clinical Laboratory
Federation Meeting BCLF 2019, 27-31 October 2019- Antalya

Sözlü bildiri:

Evaluation of Biological Variation of Salivary Cortisol- TBS International
Biochemistry Congress 2022 - 33rd National Biochemistry Congress- 26-30
October 2022, İzmir, Türkiye

9. EKLER

EK 1: SBÜ GÜLHANE TIP FAKÜLTESİ TEZ İNCELEME VE DEĞERLENDİRME AKADEMİK KURULU KARARI

Evrak Tarih ve Sayısı: 04.03.2022-109991



T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
Gülhane Tıp Fakültesi Dekanlığı

Sayı :E-86241737-100-109991
Konu :GTF Tez İnceleme ve Değerlendirme
Akademik Kurulu Kararları

04.03.2022

DAĞITIM YERLERİNE

Gülhane Tıp Fakültesi Tez İnceleme ve Değerlendirme Akademik Kurulu, 03.03.2022 tarihinde saat 14:00'da Dekan Yardımcısı Prof.Dr. Sedat YILMAZ başkanlığında üyelerin uzaktan dijital ortamda online olarak katılımı ile toplanmıştır. Toplantıda, Dekanlığımızla afiliye olan SUAM'larda görevli 93 (doksan üç) uzmanlık öğrencisine ait tez incelenerek değerlendirilmiş olup; tezlerle ilgili Ekteki kararların alınmasına oy birliği ile karar verilmiştir.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.

Prof. Dr. Cüneyt GÖKSOY
Dekan V.

Ek-Kurul Kararı

Dağıtım:
Anesteziyoloji ve Reanimasyon Anabilim Dalı
Başkanlığına
Acil Tıp Anabilim Dalı Başkanlığına
Hava ve Uzay Hekimliği Anabilim Dalı
Başkanlığına
Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı
Başkanlığına
Aile Hekimliği Anabilim Dalı Başkanlığına
Sualtı Hekimliği ve Hiperbarik Tıp Anabilim Dalı
Başkanlığına
Adli Tıp Anabilim Dalı Başkanlığına
Fiziksel Tıp ve Rehabilitasyon Anabilim Dalı
Başkanlığına
Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Başkanlığına
Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı
Başkanlığına
Ankara Atatürk Sanatoryum Sağlık Uygulama ve

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : *BSNBFJV0UP* Pin Kodu : 95392

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-chys>

Adres: Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Yerleşkesi Emrah Mah. 0618

Bilgi için: Levent YILDIRIM

Elektronik/Keşif/ANKARA

Unvan: Uzman

Telefon: 0 312 304 61 73 Faks: 0 312 304 61 90

Web: <http://sbu.edu.tr>

Keşif Adresi: sbu@hs01.kep.tr



Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

1/2

Araştırma Merkezi Müdürlüğüne
Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt Sağlık
Uygulama ve Araştırma Merkezi Müdürlüğüne
Ankara Dr. Abdurrahman Yurtaslan Onkoloji
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Müdürlüğüne
Ankara Dr. Sami Ulus Kadın Doğum Çocuk
Sağlığı ve Hastalıkları Sağlık Uygulama ve
Araştırma Merkezi Müdürlüğüne
Ankara Etlik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Müdürlüğüne
Ankara Gülhane Sağlık Uygulama ve Araştırma
Merkezi Müdürlüğüne
Ankara Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi
Müdürlüğüne
Ankara Şehir Sağlık Uygulama ve Araştırma
Merkezi Müdürlüğüne

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu : *BSNBFJV0UP* Pin Kodu :95392

Belge Takip Adresi : <https://www.turkiye.gov.tr/sbu-ebys>

Adres:Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Yerleşkesi Emrah Mah. 0618

Etlik/Keçiören/ANKARA

Telefon:0 312 304 61 73 Faks:0 312 304 61 90

Web:<http://sbu.edu.tr>

Kep Adresi:sbu@hs01.kep.tr

Bilgi için: Levent YILDIRIM

Unvanı: Uzman



S.No	ADI SOYADI	GÖREVLİ OLDUĞU SUAM	TEZ KONUSU	AÇIKLAMA
40	Dr.Gül Özlem AKGÜL	Ankara Şehir SUAM	Spinal Anestezi sonrası gelişen hipotansiyonu öngörmeye dalga değişkenlik indeksi ve internal juguler ven kollapsibilite indeksi ölçümü yöntemlerinin karşılaştırılması	Kabul Edildi.
41	Dr. Seda YILMAZER	Ankara Şehir SUAM	Türkiye' de Aile Hekimliği Asistanları ve uzmanlarının kendi bölümlerine bakışları ve bu bölümü seçerken düşündükleri kariyer planları	Kabul Edildi.
42	Dr.Damla TOSUN	Ankara Şehir SUAM	Femur kırığı Ameliyatlarında Uygulanan Fasya İliaka Kompartman Bloğunda İki fraklı yaklaşımın karşılaştırılması	Kabul Edilmedi: Tez Onay Formu ve iki adet Hakem Değerlendirme Formu üst yazı ekinde bulunmadığından değerlendirme yapılamamıştır. Başvurunun ilgili formlarla yeniden yapılması gerekmektedir.
43	Dr.Ali AVŞAR	GTF Aile Hek.AD.Bşk.lığı	Diyabetik ayak gelişen hastalarda sağlık okuryazarlığı düzeyi ile diyabetik ayak bilgi, tutum ve davranışı arasındaki ilişkinin incelenmesi	Kabul Edildi.
44	Dr. Zeliha Nur BÜLBÜL	GTF Ruh. Sağ ve Hst AD.Bşk.lığı	Bipolar bozukluk tanılı hastalarda erken replaks ile ilişkili klinik ve sosyodemografik özelliklerin belirlenmesi	Kabul Edildi.
45	Dr. Baran BUCAĞA	Ankara Sağlık SUAM	Nazal mukozası hasarlanan rat modelinde topikal antibiyotik emdirilmiş cutanplast'ın yara iyileşmesi üzerine etkisi	Kabul Edildi.
46	Dr. Melike MERT	Ankara Etik Zübeyde Hanım Kadın Hastalıkları SUAM	Epitelial over kanseri hastalarının hastalarında postoperatif ilk 30 gün içinde hastaneye yeniden kabul sebepleri nelerdir ve sağkalım üzerinde etkisi var mıdır?"	Kabul Edildi.
47	Dr. Bekir ÇOKER	GTF Tıbbi Mikrobiyoloji ve Klinik Mik AD Bşk.lığı	2018-2022 yılları arasında Covid-19 öncesi ve sonrası dönemde kan kültür isteklerinin ve saptanan üremelerinin çeşitli parametreler yönünden incelenmesi	Kabul Edildi.
48	Dr.Kürşat GÜMÜŞ	GTF Acil Tıp AD.Bşk.k.lığı	Santral venöz kateterizasyon işleminde simülasyon destekli tam öğrenmeye dayalı eğitim modelinin etkisinin araştırılması	Kabul Edildi.
49	Dr.Sıdika GÜLLÜ	Ankara Atatürk Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi SUAM	Nondiyabetik hipertansif hastalarda spot idrar sodyum potasyum oranının arteriyel sitiffles ve proteinüri ile ilişkisi	Kabul Edilmedi: Tez Onay Formu ve iki adet Hakem Değerlendirme Formu üst yazı ekinde bulunmadığından değerlendirme yapılamamıştır. Başvurunun ilgili formlarla yeniden yapılması gerekmektedir.
50	Dr. Burak KAYA	GTF Adli Tıp AD.Bşk.lığı	İşitme kayıplarının Adli Tıp açısından değerlendirilmesi	Kabul Edildi.
51	Dr. Oğuzhan TOKUR	Ankara Sağlık SUAM	Maliğnite açısından şüpheli aksillar lenf nodlarının değerlendirilmesinde Super Mikrovasküler Görüntüleme (SMI) yönteminin katkısı	Kabul Edildi.
52	Dr. Fatih SERİN	Ankara Sağlık SUAM	Sağlıklı erişkin bireylerde tükürük kortizolünün biyolojik varyasyonunun değerlendirilmesi	Kabul Edildi.
53	Dr. Çağrı ÖZCAN	Ankara Sağlık SUAM	Normal popülasyonda yaş ve cinsiyete göre mikokardiyal T1,T2, T2* zamanları ile sentetik ECV değerlerinin belirlenmesi ve fonksiyonel analiz verileri ile ilişkisinin araştırılması	Kabul Edildi.
54	Dr. Didem ÖZKAN	Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt SUAM	2018-2021 yılları arasında hastanemiz yoğun bakım ünitelerinden gönderilen kan kültürü ve alt solunum yolu örneklerinden izole edilen gram negatif bakterilerin antibiyotik duyarlılık verileri ve direnç profiline Covid-19 pandemisinin etkisi	Kabul Edildi.
55	Dr. Ayşe ERSOY	Ankara Dışkapı Yıldırım Beyazıt SUAM	Akut dekompanse karaciğer yetmezliği ile acil servise başvuran siroz hastalarında mortalite öngörücü olarak 4 farklı skorlama sisteminin karşılaştırılması:MELD, CHILD, PUGH, CLIF-C, ACLF, ve CLIF, SOFA	Kabul Edildi.

EK 2: ETİK KURUL KARARI



T.C.
ANKARA VALİLİĞİ
İL SAĞLIK MÜDÜRLÜĞÜ
Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Sayı : E-93471371-514.99
Konu : E.Kurul – E-22-1025- Etik Kurul
Kararı

1025 - no'lu çalışma

SBÜ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Kliniği'nden "Sağlıklı Erişkin Bireylerde Tükürük Kortizolünün Biyolojik Varyasyonunun Değerlendirilmesi" konulu çalışma incelenmiş olup, Etik açıdan oy birliğiyle uygun görülmüştür.

22/06/2022

Prof. Dr. Uğur KOÇER
Etik Kurul Başkanı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

~~Belge Doğrulama Kodu: tddat1062-c20-197-c456-b150-895311 — Belge Doğrulama Adresi: https://www.turkiye.gov.tr/saglik-bakanligi-cbys~~
SBÜ Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Etik Kurul Birimi, Hacettepe Mah.

Uluçanlar Cad. No: 89 Altıdağ/ANKARA

Telefon: Faks No: 0 312 363 33 96

e-Posta: sibel.tokul@saglik.gov.tr İnternet Adresi: sibel.tokul@saglik.gov.tr

Bilgi için: Sibel TOKU

SAĞLIK TEKNİKERİ

Telefon No: (0 312) 595 31 89



EK 3: ÇALIŞMA ÖNCESİ KATILIMCI DEĞERLENDİRME ANKET FORMU

Adı Soyadı:

Demografik veriler

Doğum Tarihi: / /

Cinsiyet:

Kilo:

Boy:

Yaşam tarzı

En son kaç saat önce yemek yediniz?

Özel bir diyet uyguluyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise belirtiniz.....

Alkol tüketiyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise sıklığını ve miktarını belirtiniz.....

Tütün mamulleri kullanıyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

Düzenli fiziksel aktivite ve egzersiz yapıyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

Tıbbi Durum

En son ne zaman bir hastalık geçirdiniz?.....

Hiç hastane yatışınız oldu mu? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise belirtiniz.....

Herhangi bir şeye alerjiniz var mı? Evet ☐ Hayır ☐

Tansiyonunuz hiç yüksek ya da düşük ölçüldü mü? Evet ☐ Hayır ☐

Düzenli ilaç, vitamin/mineral veya bitkisel ürün kullanıyor musunuz?

Evet ☐ Hayır ☐

Mesleğiniz gereği herhangi bir kimyasal maddeye maruziyetiniz var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Kadınlar için

Adet döngünüz düzenli mi? Evet ☐ Hayır ☐

Kaç günde bir adet olursunuz? Kaç gün sürer?...../.....

Hormon tedavisi veya doğum kontrol ilacı alıyor musunuz? Evet ☐ Hayır ☐

Aile öyküsü (Anne, baba ve kardeşleriniz için cevap veriniz.)

Kanser hastası olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Kalp ve damar hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Böbrek hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Diyabeti olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Karaciğer hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Tiroit hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Talasemi gibi bir hemoglobin bozukluğu olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Nörolojik hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

Psikiyatrik hastalığı olan var mı?

Evet ☐ Hayır ☐

**EK 4: KATILMCILARA VİZİT ÖNCESİ UYGULANAN ANKET
FORMU**

Adı Soyadı:

Vizit sayısı:

Tarih:/...../.....

Saat:

1. En son saat kaçta yemek yediniz?

2. Son 48 içerisinde alkollü içecek tükettiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise türünü ve miktarını belirtiniz.....

3. Sigara içtiniz mi? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise en son ne zaman içtiniz?.....

4. Özel bir diyetle başladınız mı? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise içeriğini belirtiniz.....

5. Geçen hafta içinde hasta oldunuz mu? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise hastalığı ve ne zaman olduğunuzu açıklayınız.....

6. Herhangi bir vitamin/mineral takviyesi veya ilaç kullandınız mı? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise her birinin adını, dozunu ve sıklığını açıklayınız.....

.....

7. Geçen hafta içinde ağır fiziksel aktivitede bulundunuz mu? Evet ☐ Hayır ☐

Evet ise faaliyet türünü ve zamanını belirtiniz.....

.....

8. Kadınlar için: En son ne zaman adet oldunuz?.....

EK 5: KATILIMCILARIN ECLIA VE LC-MS/MS YÖNTEMLERİYLE ANALİZ EDİLEN TÜKÜRÜK KORTİZOLÜ ÖLÇÜM SONUÇLARI

Tablo 28. Elektrokemilüminesans immünölçüm yöntemiyle analiz edilen sabah tükürük kortizolü sonuçları (nmol/L).

Katılımcı No	Cinsiyet	1. Hafta		2. Hafta		3. Hafta		4. Hafta		5. Hafta		6. Hafta		7. Hafta		8. Hafta		9. Hafta		10. Hafta	
		İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm
1	Kadın	9.19	10.54	7.97	9.27	4.55	5.88	13.11	14.40	8.55	10.02	8.30	9.30	7.04	7.95	5.85	6.95	11.51	12.53	7.53	9.38
2	Kadın	5.52	6.46	5.27	6.26	5.05	6.18	4.55	5.55	5.38	5.93	5.44	6.98	3.92	4.52	5.60	6.43	6.51	7.39	8.19	9.85
3	Kadın	4.22	5.24	3.01	4.36	4.25	5.93	6.95	8.97	4.14	5.60	3.50	4.86	8.58	10.76	3.23	4.69	2.98	4.61	3.37	4.39
4	Kadın	3.12	4.11	7.84	10.04	4.25	5.63	3.03	4.36	3.06	4.36	2.90	4.28	2.81	3.64	3.34	4.52				
5	Kadın	5.05	5.55	6.18	6.07	3.28	3.31	3.89	4.28	5.46	6.51	3.81	4.19	4.00	4.58	2.51	2.95	5.30	5.52	2.59	2.84
6	Kadın	6.65	7.89	4.94	5.99	3.17	4.44	4.58	5.99	2.15	3.09	4.72	5.68	3.64	4.52	2.98	4.17	3.48	3.81	5.88	7.15
7	Kadın	6.40	7.04	5.71	6.29	6.24	6.43	5.79	5.93	10.98	11.51	5.55	6.40	5.55	6.35	6.04	6.43	10.15	10.82	7.86	8.06
8	Kadın	13.19	16.14	8.97	11.84	10.15	11.26	12.75	15.56	6.48	8.50	7.37	9.57	10.70	14.32	9.55	12.80	13.05	15.62	6.73	8.30
9	Kadın	9.08	9.90	11.34	13.35	6.46	7.15	6.57	7.48	5.71	6.10	5.24	7.01	5.82	6.98	6.01	7.26	6.73	8.30	5.68	6.57
10	Kadın	3.37	3.78	7.89	8.72	4.19	5.74	3.03	3.78	6.01	7.50	5.32	6.73	3.23	4.17	4.47	5.88	5.32	6.81	5.90	7.15
11	Kadın	4.69	5.60	3.70	5.49	3.86	5.35	4.41	5.79	4.03	5.55	5.02	6.12	5.52	7.37	7.04	9.96	5.55	6.84	6.98	9.30
12	Kadın	1.74	1.85	2.35	2.90	2.68	3.50	2.37	2.76	3.97	4.88	2.59	3.56	2.87	3.56	3.09	4.39	6.43	7.12	3.97	4.36
13	Kadın	3.45	4.41	6.04	7.23	7.28	9.24	7.73	9.93	6.73	7.78	6.54	8.00	7.20	8.83	4.17	4.36	7.78	9.30	5.16	6.07
14	Kadın	5.32	6.54	7.34	8.11	10.48	11.81	5.27	6.29	6.35	7.48	7.56	9.08	8.33	9.19	12.75	13.74	7.23	8.28	7.95	8.86
15	Kadın	4.55	5.57	4.41	5.21	6.51	7.48	7.97	9.27	4.25	4.88	5.66	6.87	5.35	6.26	3.72	4.22	4.77	4.94	4.77	5.49
16	Kadın	9.05	11.31	11.67	14.82	4.99	5.21	10.21	10.43	13.30	16.77	9.49	10.70	11.17	11.45	11.81	13.46	6.95	7.53		
17	Kadın	4.36	4.72	4.64	5.41	5.79	6.48	4.55	5.82	7.45	8.19	3.84	4.44	3.72	4.22	6.26	6.07	3.89	4.17	5.24	5.38
18	Kadın	3.81	4.08	3.92	3.97	5.13	5.10	5.30	5.74	3.42	3.34	5.60	4.94	3.92	3.84	5.08	5.16	2.40	1.74	2.29	2.10
19	Kadın	2.76	3.26	5.46	6.18	4.06	4.88	6.26	7.09	6.07	6.95	4.61	5.24	4.50	5.27	5.13	5.85	6.04	6.62	12.47	14.48
20	Kadın	5.08	6.07	7.92	9.08	6.29	7.09	5.44	6.40	4.22	5.30	6.24	7.01	6.65	7.61	8.39	9.30	7.15	8.64	9.57	9.90
21	Kadın	3.86	3.81	2.57	3.23	2.54	2.87	2.57	2.65	3.72	4.03	2.81	3.12	3.95	4.19	2.92	3.12	2.46	2.57	3.53	3.97
22	Erkek	7.95	8.41	3.28	4.17	5.10	6.18	9.99	12.36	8.39	9.99	6.48	7.34	6.18	7.12	5.99	7.12	13.22	14.54		
23	Erkek	4.11	4.08	5.32	4.91	5.19	4.94	3.75	3.31	5.32	4.94	4.06	3.20	5.05	4.11	3.56	3.23	3.70	3.26		
24	Erkek	7.28	6.93	3.45	2.98	6.84	5.85	6.04	5.82	5.77	5.66	5.41	4.99	7.75	6.73	5.21	5.24	8.99	8.61	4.99	3.97
25	Erkek	5.55	4.28	19.45	19.29	6.40	5.88	4.86	4.52	5.66	5.27	5.44	4.77	6.59	6.07	11.62	11.39	9.24	9.52		
26	Erkek	5.35	4.52	14.18	13.74	12.36	12.86	9.60	9.88	4.25	3.61	4.14	3.59	4.33	3.75						
27	Erkek	4.77	5.32	6.65	7.09	6.65	6.87	6.98	7.78	6.15	6.51	8.55	9.46	8.03	8.30	10.76	10.95	8.72	7.84	9.30	8.25
28	Erkek	3.84	3.81	3.56	4.08	3.56	3.78	5.19	5.88	4.11	4.61	4.11	3.70	5.49	4.99	5.32	5.16	6.48	5.57	5.82	4.91
29	Erkek	5.05	5.41	6.35	7.26	4.86	5.27	5.02	6.21	6.01	6.54	4.69	5.57	4.94	5.57	4.14	5.08	3.84	4.19	4.58	5.27
30	Erkek	6.07	6.54	3.86	4.50	6.98	8.50	3.42	3.64	15.73	17.22	15.23	16.53	3.23	3.56	3.03	3.31	2.37	2.62	2.98	3.48
31	Erkek	6.54	6.62	3.81	4.64	2.65	3.45	4.66	5.85	3.59	3.97	7.70	8.08	3.45	3.92	4.28	4.17	4.33	4.61	7.04	7.61
32	Erkek	3.45	3.95	1.57	2.12	1.88	2.12	4.52	5.13	7.04	7.50	5.27	5.63	7.45	7.95	11.31	11.78				
33	Erkek	4.99	5.79	3.97	4.36	4.08	4.83	6.54	6.84	7.06	7.56	4.55	4.80	4.17	4.33	4.14	4.33				
34	Erkek	3.81	4.25	4.17	4.08	3.64	3.70	2.65	2.32	1.82	1.77	1.63	1.99	2.87	2.68	4.22	4.69				
35	Erkek	2.70	3.09	2.48	3.39	15.67	17.66	2.54	3.06	3.97	5.05	4.30	5.88	12.61	13.88	15.59	17.66	11.81	14.13		
36	Erkek	3.31	3.42	2.37	2.51	4.77	5.19	2.70	2.65	3.15	3.23	4.11	4.97	4.44	5.02	3.53	4.41	11.34	12.39		
37	Erkek	5.21	6.21	4.28	4.86	3.23	3.50	1.90	4.33	2.90	4.11	3.34	3.81	5.46	5.96	4.47	5.27	3.37	4.06	5.57	6.29
38	Erkek	3.20	3.17	4.28	4.66	3.61	4.33	5.10	5.10	4.75	5.05	4.03	4.69	7.95	7.89	5.99	6.68	7.67	7.81	5.96	7.04
39	Erkek	4.44	5.13	5.30	5.44	8.99	9.49	12.36	12.99	5.88	6.32	7.06	8.25	8.14	8.58	12.14	12.75	11.64	11.51	6.79	7.17
40	Erkek	3.64	3.84	2.65	2.92	4.19	4.64	4.00	4.08	3.75	4.69	5.16	5.63	2.54	3.34	3.34	3.31	1.57	2.12	4.83	5.24
41	Erkek	14.62	17.02	5.49	6.57	4.55	5.02	4.69	5.82	9.52	10.10	10.59	12.11	5.85	7.09	8.91	9.57	3.70	4.33	2.43	2.68

Tablo 29. LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen sabah tükürük kortizolu sonuçları (nmol/L).

Katılımcı No	Cinsiyet	1. Hafta		2. Hafta		3. Hafta		4. Hafta		5. Hafta		6. Hafta		7. Hafta		8. Hafta		9. Hafta		10. Hafta	
		İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm	İlk ölçüm	İkinci ölçüm
1	Kadın	10.61	7.92	9.18	8.78	4.60	4.92	11.12	8.64	6.33	8.85	9.54	9.68	7.25	8.95	4.32	6.00	8.90	11.68	5.56	6.01
2	Kadın	6.34	6.90	5.64	6.86	5.08	4.65	3.87	3.90	4.97	5.20	4.25	5.35	3.23	5.39	4.46	4.59	4.46	8.05	6.02	9.77
3	Kadın	3.46	4.12	2.20	2.34	3.32	4.52	6.78	7.58	3.23	2.69	3.07	2.58	6.82	7.79	2.51	2.58	2.46	2.34	2.78	2.83
4	Kadın	2.20	2.30	5.57	6.38	2.43	3.13	2.17	2.13	2.23	1.90	2.39	2.77	1.88	2.24	1.68	2.59				
5	Kadın	5.36	6.53	4.42	5.38	2.80	2.36	3.82	2.86	5.76	6.24	2.30	4.17	3.23	3.71	2.89	3.39	4.64	5.15	2.63	1.90
6	Kadın	3.45	3.75	2.08	2.58	3.06	3.00	3.31	3.94	2.78	1.87	4.06	4.68	2.52	3.20	1.94	2.41	1.63	1.81	4.52	3.72
7	Kadın	6.62	8.04	3.42	6.17	6.95	4.15	6.36	7.30	10.03	9.95	6.12	6.49	4.49	7.75	8.56	9.84	8.04	9.92	5.72	8.79
8	Kadın	12.46	13.43	7.48	8.03	10.40	9.06	11.88	13.80	5.72	6.69	6.79	5.36	9.74	7.01	9.58	11.02	10.34	9.81	2.53	4.09
9	Kadın	3.88	5.34	7.64	8.01	3.77	3.64	3.67	3.07	4.14	3.25	3.50	2.88	2.92	2.13	3.49	4.06	4.69	5.24	3.74	4.10
10	Kadın	3.88	3.03	6.39	8.70	4.17	3.86	3.90	4.15	7.95	5.08	3.88	6.16	5.94	4.77	4.23	3.97	6.11	4.32	4.38	4.55
11	Kadın	4.50	3.18	3.89	4.40	3.09	4.29	5.02	4.78	3.22	4.44	3.10	3.62	5.77	5.37	5.64	8.00	2.09	3.69	4.59	3.82
12	Kadın	2.93	3.11	3.23	3.02	4.27	4.19	3.29	3.32	4.66	3.94	5.61	4.47	4.11	3.24	4.40	3.00	5.20	4.93	3.46	3.21
13	Kadın	4.59	6.43	3.71	4.27	6.68	6.68	5.42	6.20	4.33	3.86	5.45	4.75	5.29	5.45	4.36	3.68	5.54	6.53	4.13	3.56
14	Kadın	2.75	3.22	4.68	4.00	8.80	8.66	2.57	2.67	3.29	5.77	3.72	4.91	4.89	4.64	11.21	10.46	6.83	4.24	5.03	6.01
15	Kadın	2.88	3.30	3.53	2.78	4.39	6.00	3.03	4.63	4.16	4.52	4.53	3.26	4.00	2.59	3.18	3.64	3.28	3.95	3.82	2.87
16	Kadın	11.22	9.52	18.01	10.18	4.65	5.86	10.37	7.58	8.24	15.52	6.20	5.58	5.16	4.86	5.71	10.45	5.80	4.03		
17	Kadın	4.44	2.81	4.73	3.63	5.20	5.04	5.12	4.42	5.03	9.04	2.62	4.19	2.81	3.54	3.83	4.80	3.57	4.50	6.27	5.12
18	Kadın	3.71	4.21	2.99	2.79	4.89	5.44	4.24	6.47	3.44	2.70	4.00	6.13	3.94	4.54	3.74	4.15	1.78	2.30	2.70	1.76
19	Kadın	2.10	3.07	3.27	3.55	3.69	3.05	6.30	5.34	7.02	7.06	3.53	4.35	3.79	3.12	3.12	5.09	4.47	5.13	11.16	10.91
20	Kadın	3.97	3.99	6.35	9.54	4.05	4.51	4.35	5.13	6.24	5.44	6.60	7.45	6.81	7.78	9.56	8.63	5.34	4.29	6.52	7.95
21	Kadın	4.65	5.92	3.70	3.35	2.98	2.45	1.71	2.28	4.72	4.59	2.80	2.41	3.43	5.61	5.32	2.88	2.21	3.43	2.95	1.53
22	Erkek	6.75	7.53	4.63	4.53	7.80	6.61	10.93	9.93	6.73	8.02	5.20	8.67	5.58	6.89	4.93	5.15	10.62	11.68		
23	Erkek	4.86	4.64	2.79	4.36	9.20	7.14	3.88	2.71	4.87	6.73	2.95	3.36	3.73	4.89	3.41	3.64	2.45	2.64		
24	Erkek	5.08	7.51	3.06	2.63	6.36	3.63	4.29	3.67	2.90	4.17	3.95	3.67	3.90	6.38	4.71	2.96	4.31	6.08	4.12	2.15
25	Erkek	4.97	5.40	13.46	14.13	3.67	3.87	3.42	5.75	6.41	5.69	3.54	3.74	6.54	6.27	11.79	11.74	3.94	9.20		
26	Erkek	3.18	3.43	18.83	14.85	14.48	12.82	10.21	12.76	3.40	3.57	2.73	2.76	3.44	3.47						
27	Erkek	3.55	5.57	3.96	5.28	4.20	3.47	5.60	6.24	6.42	5.05	6.08	5.28	5.05	7.30	6.96	6.14	5.36	6.94	8.35	6.84
28	Erkek	3.07	3.64	3.58	4.57	4.91	2.98	6.32	5.35	6.51	5.91	4.74	4.75	4.40	5.11	5.95	4.13	5.20	4.46	5.94	3.08
29	Erkek	2.99	4.83	5.66	5.83	3.60	4.06	6.85	8.19	6.53	6.69	3.32	3.56	6.38	6.12	3.46	4.75	2.83	2.96	3.90	5.79
30	Erkek	6.37	7.13	5.60	6.85	8.36	9.24	2.20	3.02	15.71	17.29	16.48	15.66	2.59	2.28	3.09	2.33	1.19	1.31	2.36	1.85
31	Erkek	4.64	5.43	4.69	4.66	4.55	4.14	5.66	5.69	2.87	3.94	5.99	5.12	2.75	5.17	5.93	5.49	4.51	4.65	5.64	6.11
32	Erkek	4.55	3.26	5.26	3.04	0.71	2.10	3.67	4.42	2.09	3.65	7.23	6.25	6.46	9.19	11.55	12.24				
33	Erkek	4.00	4.64	3.18	3.49	3.27	3.86	2.91	3.39	5.66	6.06	3.64	3.84	3.96	4.16	3.94	3.85				
34	Erkek	3.04	2.81	5.71	3.27	5.97	5.91	2.11	1.84	1.44	1.40	2.78	1.50	0.86	3.12	2.72	3.75				
35	Erkek	4.84	5.62	1.98	2.71	12.59	12.87	2.44	6.03	6.25	4.04	4.12	4.71	11.15	10.99	12.53	11.26	10.46	9.17		
36	Erkek	3.45	2.64	2.00	2.73	5.73	4.15	1.76	2.15	2.82	2.58	2.77	4.20	4.81	3.82	2.77	4.30	7.74	8.27		
37	Erkek	2.53	3.47	3.81	4.09	4.40	3.50	3.75	4.78	4.46	3.95	5.24	3.75	7.41	4.27	4.75	6.22	3.87	4.98	4.06	3.52
38	Erkek	6.05	6.74	5.16	4.92	5.66	7.62	10.44	9.93	3.62	5.06	6.40	6.36	6.57	5.87	8.09	11.32	12.64	10.12	7.43	7.73
39	Erkek	7.08	4.98	6.47	3.42	3.89	3.04	3.46	5.98	3.29	2.67	8.85	3.03	3.10	4.78	4.46	5.04	4.46	3.24	6.65	6.74
40	Erkek	2.60	2.96	1.88	2.59	3.35	3.81	4.19	4.15	4.29	3.98	8.98	9.47	2.07	2.02	3.08	2.88	2.02	2.64	4.20	3.86
41	Erkek	17.45	16.45	4.89	4.93	3.74	6.15	8.11	8.66	7.43	11.17	11.88	12.49	7.20	6.13	7.20	9.06	4.96	2.38	1.09	1.95