T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA

D VİTAMİNİ BAĞIMLI İNTAKT PARATİROİD HORMON REFERANS DEĞER ÇALIŞMASI

Büşra Efem Toy

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2018

T.C. SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
HAYDARPAŞA NUMUNE SAĞLIK UYGULAMA VE ARAŞTIRMA MERKEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA

D VİTAMİNİ BAĞIMLI İNTAKT PARATİROİD HORMON REFERANS DEĞER ÇALIŞMASI

Büşra Efem Toy

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Fatih Özçelik

(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

İSTANBUL/2018

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
SİMGELER VE KISALTMALAR	ii
TABLO LİSTESİ	iv
ŞEKİLLER LİSTESİ	v
ÖZET	vii
ABSTRACT	ix
GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	2
GEREÇ VE YÖNTEM	27
BULGULAR	33
TARTIŞMA	63
SONUÇLAR	74
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	89
EKLER	90

TEŞEKKÜR

Uzmanlık ihtisasımın büyük bir döneminde bilgi ve birikimlerini benimle paylaşan, çalışmalarıma destek veren emekli hocam Sayın Uz. Dr. Ahmet Rıza URAS'a, tez danışmanım değerli hocam Sayın Doç. Dr. Fatih ÖZÇELİK'e, İdari sorumlumuz Sayın Uz.Dr. Saadet KURÇENLİ'ye, eğitim görevlimiz Sn. Prof. Dr. Mevlüt Sait KELEŞ'e, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan başasistanımız Sayın Uz. Dr. Mehmet Murat YEKREK'e, çalışmama katkı sağlayan Sn. Muhittin A. SERDAR'a, çalışma esnasında gerekli yardımları benden esirgemeyen eşim Dr. Mehmet Kadri TOY'a, kliniğimde birlikte görev yaptığım ve desteklerini her zaman hissettiğim değerli asistan arkadaşlarım Sayın Asistan Dr. Nagehan Esra AYDIN'a, Şerif KAÇTAŞ'a, Alper KÜTÜKCÜ'ye ve Hilal YALÇIN ÖZTÜRKERİ'ye, kan alma aşamasında destek veren hastanemiz kan alma birimi hemşireleri ile laboratuvarda çalışan tekniker ve teknisyenlere ve çalışma için gerekli tüm masrafları karşılayan Abbott Laboratuvarları İthalat İhracat ve Ticaret Ltd. Şti.'ye teşekkür ederim.

Kızlarım Berfinur ve Deniz Ece'ye ve eğitim hayatım boyunca desteklerini her zaman hissettiğim aileme minnettarım.

Büşra Efem Toy

SİMGELER VE KISALTMALAR

ABD: Amerika Birleşik Devletleri

ALP: Alkalen fosfataz

ATP: Adenosin Trifosfat

BUN: Kan Üre Azotu, Blood Urea Nitrogen

Ca: Kalsiyum

CAP: Amerikan Patologlar Koleji, College of American Pathologists

CAPTH: Siklaz aktifleştirici PTH

CaSr: Kalsiyum Duyarlı Reseptörler, Calcium Sensing Receptör

CLSI: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü, Clinical and Laboratory Standards Institute

CMIA: Kemilüminesans Mikropartikül İmmünolojik Tetkik

eGFR: Tahmini GFR

EIA: Enzim İmmüno Analizi

ELISA: Enzim bağlı immünosorbent analizi, Enzyme-linked immunosorbent assay

GFR: Glomerüler Filtrasyon Oranı

GLD: Glutamat dehidrojenaz

GTP: Guanozin Trifosfat

hPTH: İnsan PTH

HPLC: Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografi, High Pressure Liquid Chromatography

ICMA: İmmüno Kemilüminesans Analizi

IFCC: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu, International Federation of Clinical Chemistry

İ-PTH: İntaktParatiroid Hormon

KBH: Kronik Böbrek Hastalığı

KBY: Kronik Böbrek Yetmezliği

K-S: Kolmogorov-Simirnov testi

K/DOQI: Böbrek Hastalığı Kalite Girişimi Sonucu, The Kidney Disease Outcomes Quality Initiative

MDRD: Modification of Diet in Renal Diseases Study

Mg: Magnezyum

MKB: Mineral ve Kemik Bozuklukları

NAD: Nikotinamid Adenin Dinükleotid

NADH: Adenin Dinükleotid

NCCLS: Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi, National Committeefor Clinical Laboratory Standards

P:Fosfor

Pi: İnorganik Fosfat

pHPT: Primer Hiperparatiroidizm

PTH: Paratiroid Hormon

PTHrP: PTH-ilişkili-protein, Parathyroid hormone-related protein

RAAS: Renin Anjiotensin Aldosteron Sistemi

RCPA: TheRoyal College of Pathologists of Australasia

RIA: Radyoimmünoassay

RLUs: Relatif Işık Üniteleri

SHPT: Sekonder hiperparatiroidisi

SD: Standart Sapma

TND: Türk Nefroloji Derneği

ULN: Referans aralık üst sınırı, Upper normal limit

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

X2: Chi-Square, Ki-kare Uygunluk testi:

TABLO LİSTESİ

Tablo 1.	Dışlama Kriterleri (NCCLS 2)	4
Tablo 2.	Referans Kitlenin Gruplaşmasına Etki Eden Faktörler	6
Tablo 3.	Preanalitik Biyolojik Faktörler	6
Tablo 4.	Peanalitik Metodolojik Faktörler	7
Tablo 5.	Referans Gruplarını Ayırma Kriterleri	8
Tablo 6.	İ-PTH kit özelliklerinin karşılaştırılması	31
Tablo 7.	Abbott İ-PTH düzeyleri için kullanılan 7 değişkenli model	33
Tablo 8.	Abbott İ-PTH düzeyleri için kullanılan 2 değişkenli model	34
Tablo 9.	Cihazların %CV değerleri	35
Tablo 10.	Cinsiyete göre 3 farklı markanın İ-PTH Korelasyon Matrix sonuçları	36
Tablo 11.	Üç farklı markanın serum İ-PTH düzeylerinin karşılaştırılması	36
Tablo 12.	Tüm erkek olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix çalışması	43
Tablo 13.	Tüm kadın olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix çalışması	44
Tablo 14.	Tüm olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix sonuçları	45

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1.	Abbott İ-PTH düzeylerinin tahmini için kullanılan 3 bağımsız değişkenli model	34
Şekil 2.	Abbott İ-PTH düzeyleri Siemens ve Roche İ-PTH düzeyleri	37
Şekil 3.	Abbott ve Siemens İ-PTH Bland-Altman uyum sınırları grafiği ve Deming regresyon sonuçları tablosu	39
Şekil 4.	Abbott ve Roche İ-PTH Bland-Altman uyum sınırları grafiği ve Deming regresyon sonuçları tablosu	40
Şekil 5.	Tüm erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit-D3 düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon grafiği	41
Şekil 6.	Toplamda tüm olguların (erkek + kadın) Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit-D3 düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman Korelasyon grafiği	42
Şekil 7.	25 OH Vit D3 düzeylerine göre Abbott İ-PTH düzeylerinin nonparametrik yöntem kullanılarak belirlenmiş referans aralıklar grafiği.	46
Şekil 8.	25-OH Vit D3 düzeyi 20 ng/ml altındaki erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik	47
Şekil 9.	25-OH Vit D3 düzeyi ≥ ve < 30 ng/ml arasındaki erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik	48
Şekil 10.	25 OH Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik	49
Şekil 11.	Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan erkek olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri	51
Şekil 12.	Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan kadın olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri	52
Şekil 13.	Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan tüm olgularda (kadın-erkek) Abbott İ-PTH referans aralık değerleri	53

Şekil 14. 20 ≤ Vit D3 düzeyi < 30 ng/ml olan erkeklerde Abbott İ-PTH referans aralık değerleri. 54
Şekil 15. 20≤ Vit D3 düzeyi <30 ng/ml olan kadınlarda Abbott İ-PTH referans aralık değeri. 55
Şekil 16. 20≤ Vit D3 düzeyi <30 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri 56
Şekil 17. Vit D3 düzeyi <20 ng/ml olan erkek olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri 57
Şekil 18. Vit D3 düzeyi <20 ng/ml olan kadın olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri 58
Şekil 19. Vit D3 düzeyi < 20 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değeri 59
Şekil 20. Vit D3 düzeyi ≥20 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri. 60
Şekil 21. Tüm Vit D3 düzeyleri için olan tüm sağlıklı referans popülasyonda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri 61
Şekil 22. Vit D3 düzeyleri bağımsız olarak üç yöntemin referans aralıklarının karşılaştırılması. 62

ÖZET

Amaç: Farklı D vitamini düzeylerine göre intakt paratiroid hormonun CMIA yöntemine göre referans aralığını belirlemeyi ve farklı cihazların paratitoid hormon referans değerlerini karşılaştırmayı amaçladık. Bu sayede kendi populasyonumuz için klinik ihtiyaçlarımız doğrultusunda belirlediğimiz İ-PTH referans aralığı ile IFCC standartlarına uygun, tanı ve tedavide daha etkin sonuçlar vermeyi hedefledik.

Gereç ve Yöntem: Araştırma, Eylül 2017-Mart 2018 tarihleri arasında Sağlık Bilimleri Üniversitesi'ne bağlı Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi'nde yapıldı. Çalışmaya 513 kişi alındı. Çalışmaya dahil edilen kişiler 25-OH Vit D3 düzeylerine göre 3 gruba ayrıldı. Tüm katılımcıların serum örneklerinde kalsiyum, magnezyum, fosfor, BUN, kreatinin, 25-OH Vit D3 ve PTH parametreleri çalışıldı ve ayrıca MDRD formülü kullanılarak eGFR değerleri hesaplandı. Farklı D vitamini düzeylerine göre Abbott İ-PTH referans aralığı hesaplandı. Hesaplama için, 25-OH Vit D3 düzeyi 20-30 ng/ml olan grup için Robust testi, diğer gruplar için ise non-parametrik yöntem kullanıldı. Ayrıca farklı yöntemler arasındaki ilişkinin belirlenmesi için çalışma popülasyonunun 472'sinde Roche ve Siemens cihazlarında da İ-PTH düzeyleri ölçüldü.

Bulgular: Sağlıklı popülasyonun 154'ünde 25-OH Vit D3 düzeyi 20 ng/mL'den küçük, 111'inde 25-OH Vit D3 düzeyi 20-30 ng/ml arasında ve 248'inde ise 25-OH Vit D3 düzeyi 30 ng/mL'den yüksek bulundu. Tüm sağlıklı referans popülasyonunun İ-PTH düzeyleri, 25-OH Vit D3 düzeyleri ile orta derecede anlamlı bir korelasyon gösterdiği saptandı (Spearman r= -0.568, P<0.001). Toplam olarak Abbott İ-PTH değerleri, Siemens ve Roche İ-PTH değerleriile yüksek korelasyon göstermesine karşın (sırasıyla r= 0.941 ve r=0.957, P<0.0001), her birinin İ-PTH ortanca ve ortalama değerleri istatistiksel olarak birbirinden oldukça farklıydı (sırasıyla; 56.2/62.7±26.0, 44.7/50.3±20.9 ve 33.6/37.1±14.8, P<0.0001). Ayrıca her üç test yöntemi arasında en geniş referans aralığının Abbott yöntemine ait olduğu saptandı (sırasıyla 23.4 – 128.4, 17.1 – 98.3 ve 14.3 – 63.7 pg/ml). Abbott İ-PTH düzeyleri 25-OH Vit D3 düzeylerinden etkilendiğinden 25 OH Vit D3 ≥30 ng/mL olan

referans popülasyon için klinik ihtiyacı karşılayacak (cinsiyet bağımsız olarak) referans aralık değeri, 17.7 – 90.9 pg/ml olarak belirlendi.

Sonuç: Her laboratuvar, mutlak uyum göstermeyen her yöntem için kendi popülasyonuna göre, klinik ihtiyaçlarını da göz önünde bulundurarak referans aralığını belirlemelidir. Ayrıca D vitamini parathormon düzeyini etkilediği için İ-PTH referans aralık çalışmasının farklı 25-OH Vit D3 düzeylerine göre de belirlenmesi ve mümkünse İ-PTH referans aralıklarının 25-OH Vit D3 düzeyine göre raporlanması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

Anahtar Kelimeler: Paratiroid hormon, 25-OH Vit D3, Referans aralık

ABSTRACT

Aim: We aimed to determine the reference interval using the CMIA method of intact parathyroid hormone according to different vitamin D levels and compare the paratitoid hormone reference values of different devices. In this respect, we aimed to give more effective results in diagnosis and treatment in accordance with IFCC standards in diagnosis and treatment with the I-PTH reference interval determined in the direction of our clinical needs for our own population.

Materials and Methods: The research was carried out at Haydarpaşa Numune Training and Research Hospital affiliated to Health Sciences University between September 2017 and March 2018. 513 people were employed to work. Subjects included in the study were divided into 3 groups according to 25-OH Vit D3 levels. BUN, creatinine, 25-OH Vit D3 and Abbott I-PTH parameters were studied in serum samples of all participants and also eGFR values were calculated using the MDRD formula. The I-PTH reference interval was calculated based on different D vitamine levels. For the calculation, Robust test was used for the group with 25-OH Vit D3 level of 20-30 ng / ml, and non-parametric method was used for the other groups. In addition, to determine the relationship between the different methods, PTH levels were measured in Roche and Siemens instruments at 472 of the study population.

Results: In healthy reference population, 154 particpants' 25-OH Vit D3 level is is found lower than 20 ng/ml, 111 participans' between 20-30 ng/ml and 248 participans' more than 30 ng/ml. All healthy reference populations showed a moderate correlation with I-PTH levels, 25 OH Vit D3 levels (Spearman r= -0.568, P<0.001). Although the total Abbott I-PTH values showed a high correlation with Siemens and Roche I-PTH values (r = 0.941 and r = 0.957, P <0.0001, respectively), the median and mean values of I-PTH were statistically significantly different from each other (56.2/62.7±26.0, 44.7/50.3±20.9 ve 33.6/37.1±14.8, P<0.0001, respectively). It was also found that the largest reference interval belonged to the Abbott method among the three test methods (23.4 - 128.4, 17.1 - 98.3 and 14.3 - 63.7 pg / ml, respectively).

Since the Abbott I-PTH levels were influenced by 25-OH Vit D3 levels, the reference interval value for the reference population of 25 OH Vit D3 ≥30 ng/ml to meet the clinical need (sex independent) was determined to be 17.7 to 90.9 pg /ml.

Conclusion: Each laboratory should determine the reference interval for each method that does not have absolute compliance, taking into account its clinical needs according to its own population. In addition, as the vitamine D affects the parathormone level, I-PTH reference interval study was also determined to be different 25-OH Vit D3 levels and, if possible, I-PTH reference intervals should be reported according to the 25-OH Vit D3 level.

Keywords: Parathyroid hormone, 25-OH Vit D3, Reference value

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde paratiroid hormonunun (PTH) periferik metabolizması hakkındaki bilgilerimiz büyük ölçüde artmıştır. PTH'nin belirlenmesi, böbrek yetmezliğinde paratiroid fonksiyonunun değerlendirilmesinde, kemik ve mineral bozukluklarında paratiroid fonksiyonunun uyarılmasında, hiperkalsemi ve hipokalsemi ayırıcı tanısında yararlıdır. Bu nedenle bazı hastalıkların tanısı ve takibinde klinik kullanımı da yaygınlaşmaktadır. Ancak PTH sekrete edildikten sonraki metabolik süreçlerde farklı aktiviteye sahip intakt-PTH ve çeşitli fragmanlar şeklinde kanda bulunabildiğinden (yüksek heterojenite özelliği) ve farklı ölçüm yöntemlerine bağlı olarak PTH sonuçlarının çok fazla etkileniyor olmasından dolayı PTH'nin standardizasyonu konusundaki tartışmalar devam etmektedir.

Her üretici firma, PTH için bir referans aralık önerse de hitap edeceği toplumun referans değerlerini tamamen doğru yasıtamayacağından klinik kullanım için uygun gözükmemekte ve çeşitli şüphelere neden olmaktadır. Çünkü PTH, moleküler yapısından, yöntem temelli hedeflenen fraksiyonlardan, böbrek fonksiyonları, Vit D3, kalsiyum ve fosfor düzeyleri gibi çeşitli metabolik süreçlerden, ırksal ve çevresel etkenlerden güçlü bir şekilde etkilenmektedir. Tüm bu sebeplerden dolayı üreticiler ve güncel literatürler, PTH testini klinik kullanıma sokmadan önce her laboratuvarın kendi referans değerlerini belirlemeleri gerektiğini önermektedir. Ayrıca bu tür testlerin referans aralık çalışmalarında, testin etkilendiği süreçlerin göz önüne alındığı uygun bir referans popülasyonun oluşturulması da kritik noktalardan biridir.

Biz de paratiroid hormon için laboratuvarımızda ölçtüğümüz PTH sonuçlarının verilen referans aralığın çok üstünde olduğundan ve farklı immünolojik tayin yöntemleri ile laboratuarımızda analiz yaptığımız yöntem arasında mutlak uyumun olmamasından dolayı İ-PTH için yeniden referans aralık çalışması yapma ihtiyacı duyduk. Bu sebeple Kemilüminesans Mikropartikül İmmünolojik Tetkik (CMIA) yöntemine göre İ-PTH'nin referans aralığını laboratuvar şartlarımıza ve çeşitli metabolik süreçleri (eGFR, kan kalsiyum, magnezyum, fosfor ve 25 OH Vit D3) de dikkate alarak kendi referans popülasyonumuza göre belirleyerek, teşhis ve tedavide daha etkin kullanımının sağlanmasını amaçladık.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. REFERANS DEĞER

2.1.1. Tanımı

Dünya Sağlık Örgütü (WHO)'ne göre sağlık; kişinin sadece hastalık ya da güçsüzlük halinin olmamasını değil, aynı zamanda bedenen, ruhen ve sosyal yönden tam bir iyilik halinde olmasını ifade eder (1). Bir bireyde sağlıklı olma veya hastalıklı olma durumu tıbbi anamnez, klinik muayene ve destek incelemelerden elde edilen referans veriler dikkate alınarak tanımlanır (2). Referans veriler sadece klinik tanının konmasında değil tedavinin takibinde, hastalığın prognozunda, taramada, toksikolojide ve daha birçok klinik basamakta da yer almaktadır.

Klinik laboratuvarlardan elde edilen sonuçlar, referans aralık değerleri göz önüne alınarak yorumlanır. Klinisyenin bu laboratuvar sonuçlarından verimli bir şekilde yararlanabilmesi için sonuçların, doğru ve güvenilir referans aralıkları içerisinde sunulması gerekir. Referans aralıklarının belirlenmesi, Klinik Laboratuvar Standartları Ulusal Komitesi (National Committee for Clinical Laboratory Standards, NCCLS) ve Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry, IFCC) önerilerine göre yapılmaktadır (3,4). Aynı şekilde referans bireylerinin seçimi de NCCLS ve IFCC'nin ilgili dökümanlarında standardize edilmiştir. Her test için üretici firma tarafından belirlenmiş bir referans aralığı olsa da belirtilen referans aralığın, o toplumun referans değerlerini tamamen doğru yansıtıp yansıtmadığı bilinemeyeceğinden her laboratuvar kendi referans değerlerini belirlemeli ve kendi değerlerini kullanmalıdır.

Referans değerler geçmişte "normal aralık veya normal değer" olarak adlandırılmış olmasına rağmen normal kelimesinin farklı anlamları çağrıştırmasından dolayı bu terim karışıklığa yol açmıştır. Normal teriminin subjektif bir kavram olmasının yanı sıra bireyden bireye değişebilen normal değerlerden hangisinin normal olarak tanımlanması gerektiğini belirlemek çok zor, hatta neredeyse olanaksızdır (5). Normal terimini açıklamak için bazı tanımlamalar yapılmıştır. Bu tanımlamalar şu şekilde sıralanabilir:

1. Şahsın kendi normali: Kişinin sağlıklı döneminde elde edilmiş değer olup, optimum sağlık durumunu gösteren verilere dayanan değerler bu grubu oluşturur.
2. Cohort (eş grupları) normali: Hastanın grubunu temsil eden sağlıklı toplumdan elde edilmiş değerler.
3. Genel toplum normalleri: Hastanın geldiği toplumun tüm fertlerini temsil eden gruptan elde edilmiş normaller.
4. İstatistiksel anlamıyla normal dağılım ya da Gaussian dağılıma uyan veriler grubu (6). Burada dikkat edilmesi gereken husus, 'normal'in bu şekilde kullanımının biyolojik verilerin de Gaussian dağılımı gibi simetrik ve çan eğrisi şeklinde olduğu algısını oluşturabilmesidir. Bu yanılgıdan kurtulmak için Elveback ve arkadaşları tarafından normal sınırlar teriminin kullanılmaması tavsiye edilmiştir (7). Bu nedenle "normal dağılım" terimi yerine "Gaussian dağılımı" teriminin kullanılması daha uygun olacaktır.

Referans değeri, tanım olarak referans için seçilmiş bir bireyin kendine özgü fenotipinin klinik laboratuvarlarda gözlenmesi ya da ölçülmesi ile elde edilen değerdir (8,9). Referans aralığı ise, referans sayıların çizildiği bir popülasyon için değerlerin belirli bir yüzdesini (genellikle% 95'i) kapsadığı tahmin edilen bir üst ve bir alt referans sınırı arasındaki değer aralığı olarak tanımlanır. Çoğu analit için, alt ve üst referans limitlerinin, tahmini olarak %2.5 ve %97.5 ile sınırlandığı varsayılır. Bazı durumlarda, sadece bir üst referans sınırı vardır (%97.5) ve tıbbi öneme sahip olan sadece bu üst sınırdır (10).

NCCLS C28-A belgesinde güvenilir ve tutarlı referans değerlerinin üretilmesi ilkeleri ile ilgili olarak temel bir yaklaşım ve daha sistematik bir süreç önerilmektedir (10).

2.1.2. Referans Birey

Karşılaştırma için belirli kriterlerde seçilen birey olup, bu bireylerden oluşan topluluğa referans popülasyonu denir. Referans popülasyonun belirlenmesi aşaması, referans aralığın belirlenmesinde en önemli aşamadır. Referans popülasyon terimi, istatistiksel bir çalışmada genelde varsayılan ve ulaşılması çok zor ya da imkansız olan kitleyi ifade eder (11). Popülasyonu, kişinin sağlıklı olduğu dönemlerde kendisinden elde edilen test sonuçları oluşturabileceği gibi, sağlıklı bireylerin oluşturduğu popülasyon veya hastane popülasyonu da oluşturabilir. Bir grup çalışmada hastane

popülasyonunun kullanılmasına ayrıntılı olarak değinilmiş ve klinik laboratuvarların kendi hasta popülasyonlarını referans gurubu olarak almanın daha güvenilir olduğu tavsiye edilmiştir (12-14) .

Referans popülasyonundan belli kriterler kullanılarak seçilmiş bireylerden oluşturulan kitleye, örnek referans kitlesi denir. Bu bireyler doğrudan ve dolaylı örneklendirme yoluyla, 2 ana yöntemle seçilebilirler. NCCLS ve IFCC tarafından önerilen doğrudan örneklendirmede hasta seçimi, Tablo 1'de gösterilen dışlama kriterlerinin kullanıldığı bir yöntemdir (10,15).

Tablo 1. Dışlama Kriterleri

Alkol alımı	Kan donörü olma
Anormal kan basıncı	İlaç bağımlılığı
İlaç kullanımı, reçeteli	İlaç kullanımı, reçete gerektirmeyen
Çevresel faktörler	Genetik faktörler
Açlık ve tokluk durumu	Hastanede yatma
Yakın zamanda hastalık hikayesi	Yakın zamanda transfüzyon hikayesi
Gereksiz fazla vitamin alımı	Laktasyon
Sigara kullanımı	Yakın zamanda ameliyat hikayesi
Gebelik	Oral kontraseptif kullanımı
Obesite	

Bireylerin tanımlanmış kriterlere göre ana toplumdan seçilerek hesaplandığı direkt yöntemde, belirlenmiş kriterler C28-A3 standartlarına uygun hazırlanan anketler doldurulduktan sonra bireylerin analizlerinin yapıldığı yöntem biçimidir. Uygulamanın yönüne göre ise , seçim iki şekilde yapılabilir (15);

a. Test öncesi örneklem (Priori): Örneklem içinden, tanımlanmış kriterlerine uygun bireylerin direkt metotla seçilmesidir (16). Analiz yöntemi ile ilgili bilgiler çok sayıda ve çok iyi biliniyorsa tercih edilmesi gereken yöntem olup, ileriye dönük ayıklama yapılır (17,18).

b- Test sonrası örneklem (Posteriori): Çok sayıda bireyin sonuçlarını içeren iyi düzenlenmiş, eldeki tüm koşulları sağlayan bir veri tabanından tanımlanan kriterlere uygun bireylerin direkt yöntemle seçilmesidir (15, 16). Analiz yöntemi ayrıntılı

bilinmiyorsa bireylerden örnek alınıp, analiz yapıldıktan sonra, ayırma ve alt gruplara bölme işlemi yapılır (17,19). Eğer veri tabanı iyi düzenlenmemişse, kesin olmayan bilgilerle referans bireyin seçimi yapılamaz ve eğer böyle bir durum söz konusu ise indirekt örneklendirme yapmak ve istatistiksel analiz metodunu da buna göre seçmek daha doğru olur (9).

İndirekt (dolaylı) yöntem, bireyler dikkate alınmaksızın, laboratuvardan test istemi yapılmış kişilere ait analiz sonuçlarının kayıtlı bulunduğu veri tabanından belli kurallara uygun olarak test sonuçlarının seçimidir (20). Daha pratik bir yöntem olmakla birlikte toplanan veri kitlesinin istatistiksel analizi daha farklı işlemler (15) gerektirir. İndirekt örneklendirme yoluyla veri toplanmasında uyulması gereken noktalar (21):

1. Kullanılan örnek dağılım, referans popülasyonunun bir parçası olmalıdır. Bunun için de en uygun yöntem hasta verileri seçilirken hastane kayıtlarının kullanılmasıdır.

2. Örnek referans dağılımı ünimodal olmalıdır ancak dağılım yatık bir dağılım olabilir. Dağılımın içinde homojeniteyi bozacak gruplaşmalar olmamalıdır.

3. Moddan uzak bölgedeki birikmeler büyük olasılıkla hastalıkla ilişkili veriler olduğundan verilerin yoğunlaştığı bölge, dağılımın moduna uymalıdır.

4. Total dağılım ile örnek dağılımın modları birbirlerine yakın olmalıdır.

Herhangi bir veri seçimi yapılmadığıdan indirekt yöntem, direkt yöntemden daha kolay olsa da dağılımda bimodal görünüm ortaya çıkarsa, kesinlikle hasta tanısı ve bilgileri kullanılarak olası gruplaşmalar engellenmelidir. Referans değerler belirlenirken projenin amacına göre bu örneklem stratejilerinden biri, diğerlerine üstünlük sağlayabilir. Buna göre hangi metodun kullanılacağı, uygulama sonrası belirlenmelidir (20).

2.1.3. Referans Kitlesinin Gruplandırılması

Gaussian dağılımlara uyan ve modülasyona uğramayan verilerde gruplandırmaya gerek olmaz. Bununla birlikte biyolojik verilerde modülasyona yol açan faktörler çok fazla olduğundan genellikle bu veriler Gaussian dağılımlara uymayıp, sağa ya da sola yatık olurlar. NCCLS dokümanında belirtilen bu faktörler Tablo 2'de gösterilmiştir (10).

Tablo2. Referans Kitlenin Gruplaşmasına Etki Eden Faktörler

Yaş	Irk
Cinsiyet	Kan grubu
Biyoritm	Coğrafi yerleşim
Diyet	Açlık ve tokluk
Gebelik	Egzersiz
Örnek alım saati	Sigara kullanımı
Örnek alınırken ki postür	Menstrual siklus

2.1.4. Preanalitik – Analitik – Postanalitik Evre

a) Preanalitik evre: Örnekler toplanmadan önce bireylerin hazırlanması, laboratuvar koşullarının sağlanması gibi preanalitik faktörleri kapsayan tüm analiz öncesi sürecin standardizasyonu, biası minimalize ettiği hatta tamamen ortadan kaldırabildiği gibi bu etkenlerden dolayı oluşabilecek varyasyonu da engeller (22).

Preanalitik faktörler, tablo 3 ve tablo 4'te olduğı gibi biyolojik ve metodolojik olarak iki ana başlık altında toplanabilir (15,16,19,20);

Tablo 3. Preanalitik Biyolojik Faktörler

İnternal Faktörler	**Eksternal Faktörler**	
Yaş	Gebelik,	Fiziksel aktivite
Irk	Menstrüel siklus	Başka hastalıklarla etkileşim
Cinsiyet	İlaç etkileşimleri	Ateş, şok, travma, stres
Kişisel değişimler	Çevre şartları,	Sirkadiyen değişiklikler
	Transfüzyon ve infüzyon	Örnek alınırkenki vücut
	Mevsimsel değişimler	postürü
	Tütün kullanımı,	Şişmanlık, Diyet ve alınan
	Alkol kullanımı,	gıdaların etkisi,
	Seyahat	Hastaneye yatma ve
	Egzersiz	hareketsizlik

Tablo 4. Peanalitik Metodolojik Faktörler

Örnek alımı evresini etkileyen faktörler	**Örneğin Analize Hazırlık Aşamasındaki Faktörler**
Örnek alınmadan önceki dinlenme süresi	Örneğin taşınma şekli
Örneğin alındığı zaman	Örneğin etiketlenmesi
Örnek alındığı yer ve alınma şekli	Pıhtılaşma süresi
Ekipman	Serum / plazmanın ayrılması
Kullanılan malzemenin temizliği	Örneğin korunma ve saklanması
Kan alınan tüp ve kullanılan antikoagulan	Analize Hazırlık

Standardizasyon, kan örneklerinin alınmasında önemlidir. Bu nedenle dağılımların gruplaşmaya neden olmaması için her ölçümden önce preanalitik faktörlerin değerlendirilerek tüm aşamaların standardize edilmesi gerekir. Bu tip örneklerin nasıl alınması gerektiği NCCLS tarafından çeşitli prosedürlerle tanımlanmıştır (23,24). Bunun dışında acil hastalar için gerekirse ayrıca referans değerlerin oluşturulması da uygun bir yaklaşım olarak gösterilmektedir (23).

b) Analitik Evre: Referans değerlerin kullanılabilmesi için ekipmanın tanımlanması, kullanılan suyun kalitesi, reaktifler, ham verinin tipi, hesaplama yöntemleri, analiz yöntemi, kalite kontrol ve uygunluk kriterleri, gün içi ve günler arası değişkenler, kalibrasyon standartları gibi analitik performansı etkileyen tüm faktörler tanımlanmalıdır. Ayrıca eksternal kalite değerlendirme programları ile de doğruluk verileri değerlendirilmelidir (16,24).

c) Postanalitik Evre: Testin sonuçlanmasından klinisyene ulaşmasına kadar geçen evre olarak tanımlanır. Otomatize cihazlar ve laboratuvar informasyon sistemi bulunan laboratuvarlar için postanalitik evrede hata olasılığı oldukça düşüktür.

2.1.5. Referans Değerlerin İstatistiksel Analizi

Referans için alınan birey örneklerinin analizinden sonra veriler toplanarak, referans değerlerinin uygun gruplara ayrılması, her grubun dağılımının

değerlendirilmesi, aşırı uç değerlerinin belirlenmesi ve referans aralıklarının saptanmasını kapsayacak şekilde istatistiksel olarak incelenir (22).

a) Verilerin Toplanması: Hangi bireylerden oluşursa oluşsun elde edilen referans verilerinin, tıbbi geçerlilik için tanımlanmış uygun koşullarda elde edilen verilerden hesaplanması gerekir.

Hastaların laboratuvar sonuçları ile referans değerleri arasında doğru bir karşılaştırma için belli koşullar aranır. Bunlar:

1. Tüm referans birey grupları açık şekilde tanımlanmalı,
2. İlgili hasta, hastalığı dışında referans bireylerle her bakımdan yeterince benzerlik göstermeli,
3. Analiz edilecek numunelerin alınma ve işleme konulma şartları bilinmeli,
4. Karşılaştırılan her nicelik aynı türden olmalı,
5. Tüm laboratuvar sonuçları kalite kontrolü yapılmış uygun standart metotlar kullanılarak elde edilmelidir.

Ayrıca karar verme aşamasında ileri düzey teknikler uygulandığında bu genel gereksinimlere, hastalığın patogenezindeki evrelerin teşhisin amacı doğrultusunda iyice ayrılması ve kullanılan tüm laboratuvar testleri için klinik tanısal sensitivite ve spesifisite, prevalans ve yanlış sınıflandırmanın klinik maliyetinin bilinmesi gibi eklemeler de yapılabilir (15).

b) Referans Değerlerin Gruplara Ayrılması: Referans değerler tablo 5'teki gibi alt gruplara ayrılabilirler (24). Gruplara ayırmanın amacı; bireyler arasındaki varyasyonların en aza indirilmesidir. Sınıf içi varyasyon ne kadar az ise referans aralık o kadar dar ve duyarlı olur. Kural olarak, sınıflar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık varsa referans değerler alt gruplara ayrılmalıdır (16,25).

Tablo 5. Referans Gruplarını Ayırma Kriterleri

Yaş	Menstrüel döngü evresi
Cinsiyet	Gebelik evresi
Irk	Fiziksel durumlar
Genetik faktörler	Kronobiyolojik
Fizyolojik faktörler	Sosyoekonomik
Kan grupları (ABO)	Çevresel ve Diğer faktörler
Histokompatibilite antijenleri	

c) Referans Gruplardaki Veri Sayısının Önemi: Veri sayısı arttıkça kullanılacak metodun güvenirliliği artacağından, referans gruplar değerlendirilirken yeteri kadar verinin olmasına dikkat edilmelidir. Uç değerler ve veri sayısı, dağılımı etkileyen faktörlerdir. Özellikle uç değerler veri sayısı azlığında dominant hale geçip, dağılımı olumsuz yönde etkiler. Dağılımın iyi tanımlandığı Gaussian dağılımlarda kullanılan veri sayısı daha düşük olsa da laboratuvar verileri genelde bu dağılıma uymadığından düşük veri sayıları oldukça anormal sonuçlar verebilir (26).

NCCLS, referans sınırlarının saptanmasında kullanılan yöntemlerde; parametrik olmayan yöntemlerde %90, %95 ve %99 güven aralığı için sırasıyla 120, 153 ve 198 verinin yeterli olduğunu belirtmektedir (10). Veri sayısı 120'den küçükse modifiye non-parametrik yöntemler kullanılarak daha iyi sonuçlar alınabilir. Gaussian dağılım gösteren veriler için uygulanan parametrik yöntemlerde ise minimum 30 veri ile çalışma yapmanın yeterli olacağı bildirilmektedir (27). Veri sayısı arttıkça hem Gaussian dağılımına uygunluk artacaktır hem de aşırı uç değerler artsa dahi dağılımın daha iyi analiz edilebilecektir. Bu durum, uç değerlerin doğru bir şekilde atılması ile daha doğru bir referans aralık belirlenmesini sağlayacaktır (9).

Hastane verileri kullanılarak yapılan referans aralığı çalışmalarında ise veri sayısının ne olması gerektiği konusunda net bir görüş yoktur (28). Burada dikkat edilmesi gereken nokta, hastane verilerinin hasta popülasyonunu yansıtmasından dolayı aşırı uç değerlerin analizinin çok iyi yapılması gerekliliğidir.

d) Dağılımın İncelenmesi: Referans dağılımın histogramı çizilerek, aşağıdaki bazı hususlar da dikkate alınarak grafiksel olarak gözle değerlendirilmesi önerilmektedir (18,20,24).

1. Dağılım sınırlarından çok fazla sapan veriler, yanlış değerleri gösterebileceğinden bu aşırı uç değerler araştırılarak, nedenleri belirlenmeli ve hesaplama dışı bırakılmalıdır.

2. Dağılımın bimodal veya polimodal olması, birden fazla alt grubun bulunduğunu gösterir. Bu durumda ya referans bireylerinin seçimindeki kriterler yeniden değerlendirilmeli ya da yaş, cinsiyet ve diğer faktörlere göre gruplara ayırma gözden geçirilmelidir.

3. Dağılımda asimetri ve normalden farklı tepeleşmelerde diklik veya basıklık birlikte değerlendirilmelidir.

4. Görsel incelemenin diğer yararı da hesaplamalardan elde edilecek aralıklar hakkında bilgi vermesidir.

e) Aşırı Uçlarda Gözlenen Değerlerin (Sapan Değerler) Belirlenmesi: Dağılımlar değerlendirilirken gözlenen aşırı değerler doğru ayıklanmalıdır (16). İyi ayıklanmış verilerde dahi aşırı uç değerler bulunabilir. Referans kitlesinin dağılımında uç değerlerin bulunup çıkarılması için bazı metotlardan bir kaçı bahsedilecektir (9):

Dixon metodu: Veriler küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra, dağılımın alt ve üst noktalarındaki uç değerler Dixon formülü ile aranır (9). Bunu yaparken sondan üç değerin aynı formülle test edilmesi unutulmamalıdır (8,20). Dixon tarafından önerilen ve NCCLS standardında da yer alan D/R oranı 1/3'tür. Eğer D/R ≥1/3 ise, test edilen veri hesaba katılmaz. Formülde kullanılan D değeri, aşırı olduğu test edilen değerle, ona en yakın değer arasındaki fark ve R değeri ise gözlemler de dahil, test edilen tüm veriler arasındaki aralık değeridir (18).

Blok prosedürü: Ardışık çok sayıda uç değer bulunabilse de en son uç değer kendisinden önceki değere çok yakın olduğu zaman aşırı uç değerleri bloke edebilir. Bu durumda en yüksek veya en düşük iki değer arasındaki fark, 1/3 oranından daha fazla ise bu değere aşırı uç değer uygulaması yapılır ve bulunan en düşük farklı uç değerden sonra gelen tüm uç değerler atılır (8,9,27).

Grubbs T İstatistiği: Veriler küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra her bir alt ve üst veri için bir T değeri saptanır ve önceden belirlenmiş T istatistik tablolarına göre alt ve üst T değerlerinin derecesine bakılır. Kritik değerleri aştığı takdirde, veri uç değer olarak kabul edilir (8,9).

Boxplot Grafikleri: Veri setindeki değerlerin %25 ile %75 percentilin dışında kalan değerlerin atılması prensibine dayanan yöntemde veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır ve formülleri uygulanır (8,19).

(%75. percentil-%25.percentil)*1.5=X

Alt değer = %25. percentil – X, Üst değer = %75. percentil + X

Horn Metodu: En yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri Tukey yöntemdir (26). Box-Cox transformasyonu ile veri dağılımı düzenlenir (9). Dağılım merkezi 50% alınarak (IQR = Q3 - Q1) kestirim değerleri (Q1 - 1.5 * IQR ve Q3 + 1.5 * IQR) hesaplanarak uygulanır.

f) Referans Kitlesinin Dağılım Tipinin Değerlendirilmesi: Gaussian dağılımlarda parametrik, non-gaussian dağılımlarda non-parametrik yöntemler kullanıldığından dağılım tipinin belirlenmesi referans kitlesine uygulanacak referans aralığı belirleme yönteminin hangisi olacağı açısından önemlidir. Normal dağılıma uygunluğun belirlenmesi çeşitli istatistiksel yöntemleri kullanmayı gerektirir. Bu yöntemler bilgisayar programları tarafından desteklenip kolaylıkla uygulanabilir hale getirilmiştir. Referans aralığının belirlenmesinde en çok kullanılan normal dağılıma uygunluğun test edildiği yöntemler şunlardır:

Chi-Square (Ki-kare; X2) Uygunluk testi: Homojen olmadığından ve yetersiz sonuçlar verdiğinden kullanımı terk edilmiştir (19,29).

Kolmogorov-Simirnov (KS) Testi: Kolmogorov'un tek örnek için uyum iyiliği testi ile Simirnov tarafından iki bağımsız örnek için geliştirdiği uyum iyiliği testi, uygulamada benzerlikleri nedeniyle, K-S uyum iyiliği testleri olarak bilinir. X2 testinin uygulanabilmesi için beklenen frekansların 5'den büyük olması beklenirken, K-S testinde böyle bir şart aranmaz ve bilgi kaybı yaşanmaz (30). Dağılımın gruplandırılmasından etkilenmediğinden özellikle yaş ve cinsiyet gibi alt gruplar halinde tanımlanmış ise, K-S testini kullanmak daha uygun olur. Ayrıca dağılımın yatıklığı ve basıklığı yanında daha güvenilir ve kuvvetli bir analiz yöntemidir (29).

Shapiro-Wilk testi: Düşük veri sayılarında K-S testinden daha güvenli sonuçlar üretebilmektedir (9).

Katsayı tabanlı testler: IFCC, eğer transformasyon yapılıyorsa, dağılımdaki değişimin, yatıklık ve basıklık katsayısı şeklinde ifade edilen katsayı tabanlı testler ile takip edilmesini önermektedir (25). Dağılımın düzeltmesi için yapılan logaritmik transformasyon ile basıklıkta artış ortaya çıkabilir. Bunun tam tersi çok dik dağılımlar da görülebilir; yatıklığın ve basıklığın yönü katsayının işaretine bağlı olup, normal dağılımın yatıklık ve basıklık katsayısı sıfırdır.

g) Referans Sınırların Saptanması: Klinisyen yorum yaparken genellikle laboratuvar sonuçlarını, teste ait referans aralık değerleriyle karşılaştırır. Tolerans aralığı, öngörü aralığı ve yüzdelikler arasındaki aralık olmak üzere üç çeşit referans aralık önerilmektedir (24). Oldukça yaygın kullanılan yüzdelikler arasındaki aralık (referans dağılımın iki yüzdeliği ile belirlenen) hesaplanması en kolay olan ve IFCC

tarafından en çok önerilen yöntemdir. Referans aralığının değerleri %2,5 ve %97,5 düzeyleri arasında kalan %95'lik merkezi alandır (24).

Yüzdelikler arasındaki aralık, iki ana istatistiksel yöntemle belirlenir. Bunlar:

1. Parametrik yöntemler
2. Non-parametrik yöntemler

Bu iki yöntem de kendi içinde birçok modifiye yöntem içermektedir. Modifikasyonlar yöntemin gücünü artırır ve daha düşük veri sayılarında anlamlı sonuçlar üretir. Özellikle biyolojik veriler Gaussian forma uymadığından non-parametrik yöntemler tercih edilir. Ancak bu yöntemlerde daha yüksek verilere gerek vardır (18). Parametrik yöntemde yüzdelikler ve güven aralıkları hesaplanırken dağılımın belirli tipte olduğu varsayılır ve hesaplamalarda ortalama ve standart sapma (SD) gibi parametreler kullanılır. Referans dağılım non-Gaussian bir dağılım ise, verilerin logaritmik transformasyonu yapılır, transformasyondan sonra dağılımın Gaussian olması beklenir. Parametrik olmayan yöntemde dağılım için hiçbir varsayımda bulunulmaz ve hesaplamalarda dağılım parametreleri kullanılmaz. Yüzdelikler her iki uçtan gereken yüzdeden kesilir.

1.Parametrik yöntemler: Non-parametrik yönteme göre çok daha karmaşıktır ve veri sayısı yüksek olduğunda bilgisayar istatistik programları gerekir. Parametrik yöntemde yüzdeliklerin hesaplanmasında dağılımın Gaussian dağılım olduğu varsayılır. Bundan dolayı parametrik yöntemde, kritik aşama, verilerin dağılımının hipotetik Gaussian dağılımına göre uyum iyiliği testi ile değerlendirilmesi gerekliliğidir. Gaussian olasılık kâğıdında, Gaussian dağılımı temeline dayalı, lineer olmayan dik eksen vardır. Dağılım Gaussian ise eğri düz çizgi olmalıdır. Fakat düz çizgiden sapmaların görsel olarak değerlendirilmesi çok zordur, çünkü grafikteki dik uzaklıklar lineer değildir. Çarpıklık ve diklik katsayılarına dayalı test, K-S testi veya Anderson- Darling testi gibi uyum iyiliği testi yapan istatistik programları bulunmaktadır.

Referans dağılım, Gaussian dağılımından anlamlı olarak farklı değilse, 2.5 ve 97.5 yüzdelikler ortalamanın her iki tarafına iki SD eklenerek hesaplanır. Daha kesin hesaplamak için, 2.5 yüzdelik = Ortalama – 1.96 x SD, 97.5 yüzdelik = Ortalama + 1.96 x SD formülleri kullanılır.

Referans dağılım Gaussian değil ise, matematiksel transformasyon ile Gaussian dağılımına uyması sağlanabilmektedir. Özellikle sağa çarpık (pozitif çarpıklık) dağılımların, logaritmik transformasyonlarının daha çok Gaussian dağılıma uyum gösterdiği belirlenmiştir. Diğer durumlarda karekök transformasyonların daha çok uyum sağlamaktadır. Bu iki transformasyon ile başarılı olunamazsa başka transformasyonlar denenebilir (24). Gaussian dağılımlarda elde edilen güven aralıkları non-parametrik yöntemlerin güven aralıklarından daha dar çıkmaktadır. Bu, daha kesin bir yaklaşım sağlamaktadır (9, 19, 31).

2. Non-Parametrik Yöntemler: Non-Gaussian dağılımlarda tercih edilirler. Özellikle hastane kayıtlarının kullanıldığı veri setlerinde tercih edilirler. Ancak dikkat edilmesi gereken nokta her bir alt grup için gerekli veri sayısı en az 120 olmalıdır. Bu sayının altındaki veri setlerinde ise modifiye yöntemler kullanılır. Bunlardan en çok kullanılanı "non-parametrik yüzde tahmini yöntemi" dir. Bu yöntem alt ve üst değerleri kesin olarak bildirir. Bu nedenle modifiye yöntemlerin çoğu bu yöntemi baz almaktadır. Burada dağılımın % 95'lik kısmını kapsayan % 2,5 ile % 97,5'luk alana eşdeğer noktalar aranır. Bunun için veriler küçükten büyüğe doğru sıralandıktan sonra n ,veri sayısı olmak üzere, aşağıdaki formüller kullanılır:

Alt değer = 0.025 x (n+1)

Üst değer = 0.975 x (n+1)

Eğer n değeri küsuratlı rakam çıkarsa yuvarlama yapılır. Örneğin, 10.5 çıkan bir alt değer 11'e yuvarlanır. Böylece 11. sıradaki veri dağılımının alt noktası olarak tanımlanır, aynı şekilde üst nokta da belirlenir (8,25).

Wilks tarafından tanımlanan "non-parametrik tolerans aralığı yöntemi" (32) ve Bhattacharya yöntemleri (33) kullanılarak da referans aralık hesaplanabilir. Non-parametrik tolerans aralığı yönteminde veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır ve sıra numaralarına eşdeğer olan değerler veri sayısı ve güven aralığına göre tablolardan çıkartılır (34). Bhattacharya yönteminde ise, seçilmemiş birey verilerinin çoğunluğunun olduğu bölüm, sağlıkla ilişkili verilerden oluşmaktadır. Eğer hasta ve sağlıklı grupların verileri birbirinin içine çok fazla girmemişse, hastalıkla ilişkili veriler ile sağlıkla ilişkili veriler birbirinden matematiksel olarak ayrılabilirler. Sağlıkla ilişkili veriler, "gama fonksiyon" adı verilen işlemle, hastalıkla ilişkili verilerden ayrılmaktadır. Bu işlemde, analitler için elde edilen verilerin histogramları

çizilir. Histogramlardan yararlanılarak, logaritmik bazı hesaplamalar yardımıyla elde edilen noktalardan, doğrusal özellik gösteren aralıkta olanları sağlıkla ilişkili veriler olarak kabul edilir. Sağlıkla ilişkili verilerin aritmetik ortalamasının ±2 SD uzaklığındaki veriler, referans aralık alt ve üst sınırları olarak saptanır (35).

Laboratuvar verilerinden referans aralık saptanırken kullanılan diğer bir yöntem de, bireylerin "taburcu tanılarına" göre, referans aralığı saptanacak olan analitleri etkilemeyecek olan bireylerin verilerinin, referans aralık hesaplanmasında kullanılmasıdır (36,37). Daha sonra bu bireylerin verilerinden, IFCC'nin önerilerine göre gerekirse logaritmik transformasyonda yapılarak referans aralıklar saptanabildiği gibi (36) non-parametrik yöntem kullanılarak da referans aralıkları saptanabilir (37).

h) Veri Transformasyonu: Gaussian forma uymayan dağılımlarda parametrik yöntemler kullanılamasa da veri transformasyonu ile dağılım Gaussian forma yaklaştırılabilir. Bu yaklaştırma belli ölçüde bir hata payı içereceğinden transformasyon sonrası dağılımın tipi yeniden test edilmelidir. Yeni oluşan dağılımda, yatıklık ve basıklık katsayılarına bakılarak değerlendirme yapılmalıdır. Veri transformasyonu “logaritmik transformasyon”, “trigonometrik transformasyon” ve “karekök normalizasyonu” gibi metotlarla yapılabilir.

i) Referans Aralıklarının Transfer Edilebilirliği: Bir laboratuvarın test listesindeki her test için güvenilir referans aralığının belirtilmesi ana görevlerden olsa da her laboratuvarın hesaplama kapasitesi bulunmamaktadır. Bundan dolayı, başka bir laboratuvarda hesaplanmış olan referans değer kullanılabilmektedir. Ancak bu referans değerin kullanılabilmesi için aşağıdaki koşullar yerine getirilmelidir (24):

1. Popülasyonlar tanımlanmalı ve özellikleri birbirleriyle örtüşmelidir.

2. Her iki laboratuvar verileri de aralarında analitik bias bulunma durumu açısından kontrol edilmelidir.

3. Her iki laboratuvarın analitik performansı birbirleriyle uyumlu olmalıdır.

4. Preanalitik ve analitik evre her iki laboratuvarda standardize edilmelidir.

Sonuçlar, referans aralıklarıyla ve o test için kullanılan birimlerle birlikte verilmelidir. Eğer referans aralığı cinsiyet ve yaş gibi faktörlere göre ayrı ayrı saptanmış ise raporlar bu faktörlere göre gruplandırılarak sunulmalıdır.

j) Referans Aralıklarının Analitik Sistemler Arası Transferi: Bir analitik sistemde direkt yöntemle bulunan referans değerlerin, başka bir analitik sistemle elde edilen sonuçları için kullanılabilmesi amacıyla bir cross-check (çapraz kontrol) çalışması yapılabilir. Bu işlem CLSI'in EP9-A2 dokümanına göre gerçekleştirilir. Böyle bir veri transferi yöntem karşılaştırması ya da analitik sistem karşılaştırması kapsamında düşünülebilir. Bu amaçla, en az 40 örnek çalışılmalıdır. Fazla örnek seçimi ve örneklerin çift çalışılması güvenirliliği ve istenmeyen hataların ortadan kaldırılma şansını artırır (38,39). Çok merkezli çalışmalarda gerçekleştirilen cross-check çalışmasının detayları IFCC, "Referans Aralıkları ve Karar Sınırları Komitesi" tarafından yayınlanan yayında tarif edilmektedir (40).

2.2. PARATİROİD HORMON (PTH)

2.2.1.Paratiroid bezinin anatomisi

Paratiroid hormon, tiroid bezi kapsülünün üstünde veya yakınında, genellikle iki superior ve iki inferior olmak üzere toplam 4 adet olan (en az 2, en fazla 8 tane) paratiroid bezleri tarafından sentez ve sekrete edilir (41).

Paratiroid bezler küçük ve oval yapıda olup, sarımsı-kahverengi görünümdedir. Her bezin ebadı ortalama 6 mm olup, ağırlıkları 30 mg kadardır. Genellikle tiroid bezlerin arkasında olmakla birlikte boynun diğer bölümlerinde veya üst göğüs kısmında da olabilirler. Bezler, epitelyal orjinli şef ve oksifil hücreler ile doludur. Şef hücreler 2 alt gruba ayrılır. Daha açık noktalanmaların olduğu birinci grup inaktif veya dinlenme gurubu olarak kabul edilr. 2. grup sekretuvar granüllere sahip ve hormon yapımından sorumlu olan koyu lekeli gruptur. Oksifil hücreler ise asidik, granüllerle dolu ve bol mitokondriye sahip hücreler olmakla birlikte fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir (42).

2.2.2.Parathormonun Biyokimyası ve Fizyolojisi

Plazmadaki PTH düzeyi paratiroidlerin sentez ve sekresyonu ile metabolizması tarafından belirlenirken, vücuttan atılımı böbrek ve karaciğer tarafından gerçekleşir. PTH'nın, kemik ve böbrek üzerine etkisi direkt iken, bağırsaklar üzerine etkisi, fosfor (P) ve kalsiyum (Ca) üzerinden indirekttir (43).

2.2.3. Sentez ve Sekresyonu

Paratiroid hormon, 115 amino asidli preprohormon şeklinde üretilir (44). Hidrofobik Amino (N)- terminal uç, 25 amino asid içeren "pre" veya öncül sekans olup endoplazmik retikulum membranı boyunca PTH'nin sisterna içine taşınmasında rol oynar. Hem "pre" hem de 6 amino asitlik "pro" kısmı, golgi aparatında paketlenme işleminden önce ve intrasellüler işlemler boyunca enzimatik olarak parçalanır (44,45). Bu süreçler sonucunda moleküler ağırlığı 9425 dalton olan ve 84 amino asid içeren (1-84) PTH yani İ-PTH salgılanır ve sekretuvar glanüllerde hücre içinde sekrete edilmek üzere depolanır veya bozulur. Bu şekildeki biyolojik olarak aktif hormonun bir kısmı hücre içinde yıkıma uğrayarak N-terminal ve C terminal parçalara ayrılır. Ancak çoğunlukla İ-PTH daha az miktarda da N terminal ve C terminal parçalar sekrete edilebilmektedir. Proinsülinin aksine, proPTH ölçülebilir miktarda sekrete edilmez veya dolaşıma çıkmaz.

Klasik biyolojik aktivite, İ-PTH' nin ilk üçüncü veya N-terminal bölgesinde bulunur. Sentetik (1-34) PTH'nin PTH/PTH-ilişkili-protein (Parathyroid hormone-related protein, PTH/PTHrP) tip1 reseptörleriyle etkileşimi de en az İ-PTH kadar potenttir ve yine en az İ-PTH kadar böbrek ve kemikte kalsemik, fosfatürik ve diğer biyolojik yanıtların uyarılmasında etkilidir. 8 veya 18. pozisyondaki metyonin kalıntılarının oksidasyonu, biyolojik aktivitenin kaybına yol açar. PTH çok sayıda bazik amino asid içerir. Hidrofobiklik ve tür özgüllüğünden dolayı molekülün orta kısmı oldukça immünojeniktir (43).

Ekstrasellüler sıvı ve kan serbest Ca düzeyleri, PTH sentez, metabolizma ve sekresyonunun akut fizyolojik düzenleyicileridir (44,46). Plazma membran Ca kanallarının açılması ve intrasellüler depo Ca'un serbestleşmesiyle aktive olan serbest Ca, plazma membranında bulunan paratiroid hücrelerindeki kalsiyum duyarlı reseptörler (calcium sensing receptör, CaSr) tarafından algılanır (47). Ekstrasellüler serbest Ca miktarındaki artış, PTH sentez ve sekresyonunu inhibe ederken metabolizmasını hızlandırır. Aynı şekilde Ca miktarındaki azalma ters etki yaratır. Maksimum sekresyon ve supresyona sırasıyla orta düzey hipokalsemi ve orta düzey hiperkalsemide ulaşılır. Bu ilişkinin orta noktası (set-point) maksimum PTH sekresyonunun yarısındaki serbest kalsiyum düzeyidir. Set-noktaları, bireyden bireye farklılık göstermekle birlikte fizyolojik veya patolojik süreçlerle de değiştirilebilir.

1,25 $(OH)_2$ Vit D3, fosfat (P) ve magnezyum (Mg) da PTH sentez ve sekresyonuna etki eder (44-46). 1,25$(OH)_2$ Vit D3 paratiroid bezlerindeki D vitamini reseptörleri ile etkileşir, PTH gen transkripsiyonunu suprese ederek kronik olarak PTH sentezini ve sekresyonunu baskılar. Hiperfosfatemi ve hipofosfatemi PTH sentez ve sekresyonunu sırasıyla arttırır ve azaltır. Mg düzeylerindeki aşırı değişimler dışında, muhtemelen PTH sentez ve sekresyonunda önemli bir rolü yoktur. Alkolizm gibi şiddetli kronik hipomagnezemiler PTH sekresyonunu azaltırken, akut hipomagnezemi sekresyonu stimüle eder. Hipermagnezemi, Ca kadar etkili olmasa da CaSr üzerinden PTH sekresyonunu baskılar.

2.2.4. Biyolojik Etkileri

Parathormon, Ca ve P üzerinden kemik ve böbrekler üzerine direkt etki ederken; bağırsaklara 1,25$(OH)_2$Vit D3 üzerinden indirekt etki gösterir (44,48-50). PTH, hedef hücrelerin plazma membranında yer alan PTH/PTHrP reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. Bu etkileşim; siklik adenozin monofosfat (cAMP) nin üretimi ile kinazların aktivasyonu ve proteinlerin fosfatlanması, Ca ve hücre içi Ca girişinin artması ile fosfoinositid aktive enzim aktivasyonu, di-açil-gliserol ve transport sistemlerin üretimi ve lizozomal enzimlerin salgılanması ile fosfolipaz C aktivasyonunun uyarılması gibi intrasellüler olaylar kaskadı üzerinden gerçekleşir (44,50).

Böbreklerde PTH; (1) Ca ve P'nin intestinal absorpsiyonunu uyraran 1,25$(OH)_2$ Vit D3 üretimini 1α-hidroksilazı indükleyerek arttırır, (2) nefronun distal kıvrımlı tübülünde Ca reabsorpsiyonunu artırır, (3) P'nin proksimal tübül emilimini azaltır, (4) hiperparatiroid durumlarında hafif hiperkloremik metabolik asidozu destekleyen Na^+-H^+ antiporter aktivitesini inhibe eder.

Paratiroid hormonun, kemik üzerine etkisi, PTH düzeyine ve PTH'ye maruz kalma süresine bağlı olarak kemik rezorpsiyonu veya kemik oluşumunun uyarılması yönündedir. Yüksek PTH düzeylerine kronik maruz kalma, kemik rezorpsiyonunu artırır. PTH, kemiğe, doğrudan osteoblastların aktivite veya sayılarını, dolaylı olarak da osteoklastları değiştirerek etki eder. Kemik rezorpsiyonunda hızlı bir etki Ca homeostazının korunması için önemliyken, sistemik ihtiyaçlar ve iskelet homeostazı için gecikmiş etkiler önemlidir.

Paratiroid hormonun, kemik ve böbrek üzerine direkt etkileri ve 1,25$(OH)_2$ Vit D3 yoluyla bağırsak üzerine indirekt etkileri, serum ve idrardaki Ca ve P seviyelerinde değişikliklere neden olur. Serumda, toplam ve serbest kalsiyum artar, ancak fosfat miktarı azalır. İdrarda inorganik fosfat (Pi) ve cAMP düzeyleri artar. İdrar Ca'ı genellikle artar, çünkü daha büyük oranda filtrelenmiş Ca yükü, Ca'un tübüler reabsorbsiyonunu artırır. Hastalık yokluğunda, serum Ca miktarındaki artış, homeostaziyi koruyarak, bir negatif feed back (geri besleme) döngüsü ile PTH sekresyonunu azaltır (43).

2.2.5. Metabolizma ve Dolaşım Heterojenitesi

Paratiroid hormon, dolaşımda aktif olan intakt ve aktif olmayan parçacıklar halinde dolaşır. Bu heterojenite; (1) paratiroidler tarafından intakt hormon ve C-terminal parçacıklarının salgılanması (2) karaciğer ve böbreğin intakt horomonun C-terminal parçacıklarına periferik metabolizması (3) intakt hormon ve C-terminal parçacıklarının renal klirensinin sonucudur (44,51,52).

Paratiroidlerde, hem biyolojik olarak aktif intakt hormon hem de orta bölge/karboksil amino asitleri içeren aktif olmayan parçacıklar salgılanır. İ-PTH'nin salgılanması hipokalsemi ile artmaktadır. Hiperkalsemide ise C-terminal parçacıklarının salgılanması devam etmekle birlikte İ-PTH sekresyonu büyük ölçüde azalmış veya yoktur (44,51,53). Dolaşımdaki immunoraktif PTH, öncelikle "inaktif" C-terminal parçacıklarından ve ikincil olarak intakt hormondan oluşur. Dolaşımdaki C-terminal parçacıklarının tam uzunluğu belirsiz olmasına rağmen, (34-84) ve (36-84) amino asidler gibi molekülün orta ve karboksil bölgelerinden oluşan parçacıklar çok sık rapor edilmiştir. Bu parçacıklar N-terminal bölgesinden ve klasik PTH biyolojik aktivitesinden yoksundur ve inaktif bozunma ürünleri olarak kabul edilmiştir. Bununla birlikte, son raporlar kemik hücrelerinde C-terminal PTH reseptörlerini tanımlamıştır ve bu parçacıkların bu hücrelerin olgunlaşmasını ve biyolojik aktivitesini etkileyebileceği öne sürülmüştür. Biyolojik aktif İ-PTH, plazmadan böbrekler ve karaciğer tarafından alınarak C-terminal parçacıklarına hızlıca ayrıldığından yarılanma ömrü 5 dakikadan daha azdır ve böbrekler tarafından uzaklaştırılır. İnaktif parçacıklar ise glomerüler filtrasyon ile temizlenirler ve yarılanma ömürleri 1 dakikadan daha azdır. C-terminal parçacıkları glomerüler

filtrasyona uğrar ve yarı ömrü 1 saatten daha azdır. Böbrek fonksiyon bozukluğu olan bireylerde yarı ömürleri ve dolaşımdaki parçacıkları anlamlı olarak artmaktadır. Genel olarak, toplam immünoreaktif PTH'nin % 5 ila % 25'i intakt hormondur ve % 75-% 95'i C-terminali parçacıklarıdır (44,54-56).

2.2.6. Klinik Önemi

PTH'nin belirlenmesi, böbrek yetmezliğinde paratiroid fonksiyonunun değerlendirilmesinde, kemik ve mineral bozukluklarında paratiroid fonksiyonunun uyarılmasında, hiperkalsemi ve hipokalsemi ayırıcı tanısında yararlıdır (43).

2.2.7. PTH Ölçümü

İntakt parathormon ölçümü için artık non-kompetatif immun testler yaygın olarak kullanılmaktadır (57,58). İntakt hormonun düşük konsatrasyonları ve C-terminal parçacıkların yüksek düzeyleri kompetetif immun testler için büyük zorluğa neden olur (54,56).

Orta bölge ve C-terminal yöntemler; öncelikli olarak biyolojik aktif intakt hormondan çok daha yüksek düzeylerde bulunan C-terminal parçacıkları ölçerler ki serbest Ca ile regüle olur. Ölçülen düzey periferik metabolizma ve parçacıkların glomerüler filtrasyonuna bağlı olduğundan paratiroid fonksiyonları açısından zayıf bir belirteçtir (43). Böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda yorumlamak zordur. Sekonder hiperparatiroidisi (SHPT) olmayan diyaliz hastalarında üst limitin 30 katı kadar daha yüksek hatalı sonuçlar verebilir (59). Nonparatiroid hiperkalsemide baskılanmazlar ve sıklıkla hatalı hafif yüksektir (53).

N-terminal PTH'nin radyoimmünoassay (RIA) ile ölçümü, C-terminal parçacıklarını ölçen testlerin sınırlamalarının üstesinden gelmek için bir deneme olup bu kompetetif immün testler, normal veya hafif olarak yükselmiş düzeyleri olan hastalarda İ-PTH'yi ölçmek için gerekli duyarlılıktan yoksundur. İ-PTH için nonkompetetif yöntemlerin gelişmesini şunlar sağlamıştır:

a) İnsan PTH (hPTH) amino asid sekansının belirlenmesi, b) PTH'nin sekresyon, metabolizma, klirens ve dolaşımı ile ilgili daha fazla bilgiye sahip olunması, c) Antiserum ve antikor özgüllüğünün karakterizasyonu ve antikorların afinite

saflaştırılması için hPTH parçacığı, d) Analoglarının hPTH sentezi ile immünojen, kontrol ve kalibratör olarak kullanılması gibi faktörler (43).

a) İntakt PTH için Nonkompetetif Yöntemler

Nonkompetetif yöntem, iki bölgeli, sandviç, işaretli antikor veya immünometrik yöntemler olarak da bilinir. PTH'yi eş zamanlı olarak bağlayabilen bir katı faza immobilize edilmiş bir yakalama antikoru ile ölçülebilir bir madde veya ölçülebilir bir maddenin düzeyini değiştiren bir enzim ile işaretlenmiş bir sinyal veya raportör antikor olmak üzere iki antikor gerektirir. Kompetetif yöntemlerin aksine nonkompetetif yöntemlerde her iki antikor da tüm analitin ölçülmesini sağlamak amacıyla fazladan eklenir. Üçlü kompleks veya sandviç oluştuktan sonra, fazla işaretli antikor, komplekslerin miktar tayini öncesinde yıkanarak uzaklaştırılır. Nonkompetetif yöntemler artırılmış hassasiyet, özgüllük, tekrarlanabilirlik ve rahatlık sağlar (57,58).

İntakt parathormon için, yakalama antikoru çoğunlukla molekülün karboksil veya orta bölgesine (örneğin 39-84 amino asit dizisine (60,61), 44-68 dizisine (62), 44-84 veya 78-84 dizisine (63) ve N-terminal amino asit dizisine (1-34) (60-63)) karşı sinyal antikoruna karşı yönlendirilir. N-terminal amino asit dizisine (1-34 (62,64) 26-32 veya 1-38 (65)) karşı yakalama antikorları ve orta veya C-terminal amino asit dizisine (44-68 (66), 55-64 veya 53-68 (64,65)) karşı sinyal antikorları kullanılarak birkaç yöntem tersine çevrilmiştir. Bu nonkompetetif yöntemlerin temel özelliği, kullanılan antikorların sekans özelliklerine bağlı olmalarıdır. Burada tarif edilen yöntemler N-terminal amino sekansı olmayan klasik C-terminal parçacıklarını ölçmez (43).

Antikorlar, sekansa özgü antikorlar üretmek için afinite kromotografisi ile saflaştırılmış monoklonal veya poliklonal antikorlar olabilir. PTH'ye karşı yüksek afiniteli monoklonal antikorların üretilmesinin zorluğundan dolayı özellikle sinyal antikoru için, afinite ile arındırılmış poliklonal antikorlar en yaygın şekilde kullanılmaktadır (66-69).

b) N-Terminal-Kesim PTH ve 2. Nesil İ-PTH Yöntemleri

Son zamanlarda, N-terminal amino asitlerin sadece birkaçını içeren ve sıklıkla (1-84) PTH ve (7-84) PTH olarak adlandırılan N-terminal-kesim parçacıkları için

kanıtlar sunulmuştur. Terminal parçalar, hiperparatiroid hastalarından alınan plazma ekstraktlarının ve normal deneklerin yüksek performanslı sıvı kromatgrafisi (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) ile fraksiyonlanmasından sonra İ-PTH için birinci jenerasyon nonkompetetif yöntemler, immünolojik olarak tanımlanmıştır (70,71). N-terminali-kesilmiş PTH düzeyi, normal denekler ve kronik böbrek yetmezliği (KBY) olan hastalarda sırasıyla % 20 ve % 50 oranındadır. Ayrıca, N-terminal-kesilmiş PTH'nin nispi düzeyi hiperkalsemiyle artıp, hipokalsemi ile azalır. C-terminal parçacıkları gibi, N-terminali kesilmiş PTH, hem paratiroidlerin hem de intakt hormonun periferik metabolizmasının salgılanmasından kaynaklanır (72).

Birinci jenerasyon İ-PTH için geliştirilmiş nonkompetetif yöntemler, N-terminali-kesilmiş parçacıklar ile tahmin edilenden daha fazla çapraz reaksiyon verirler. Birinci jenerasyon yöntemlerde sentetik PTH (7-84) kullanıldığında % 40 ile % 160 arasında çapraz reaktivite göstermektedir (71,73). Bu bulgular, sentetik (7-84) PTH ile çapraz reaksiyona girmeyen N-terminal antikorları kullanılarak İ-PTH için birkaç ikinci jenerasyon yönteminin gelişimine neden olmuştur. N-terminali kesilmiş parçaları ile çapraz reaksiyon vermeyen bu ikinci nesil yöntemler, "biyo-sağlam PTH, (1-84) PTH, "bütün PTH" ya da "CAP (siklaz aktifleştirici PTH)" olarak adlandırılmıştır. "İkinci jenerasyon İ-PTH" denmesi tercih edilse de bu yöntemler hem intakt hormonu hem de N-terminali kesilmiş PTH'yi tanıyan birinci jenerasyon İ-PTH yöntemlerinden ayırmak için (1-84) PTH ifadesi kullanılmaktadır. Tabii bu terminoloji, bu immün testlerinin sadece biyolojik olarak aktif hormonu ölçtüğü anlamına gelmez (43). Ancak birinci jenerasyona göre N-terminali kesilmiş parçalarla daha az çapraz reaksiyon verdiğini ifade edebilir. Son yıllarda geliştirilen bir yöntemde, (1-4) PTH'ye karşı antikorlar kullanilmaktadır. Bu yöntem, (2 - 34) PTH'yi tanımada başarısızdır ve reaksiyon göstermesi için en N terminal amino asitlerin varlığını gerektirir (73).

Yapılan çalışmalar, N-terminali-kesilmiş PTH'nin biyolojik olarak aktif olabileceğini düşündürmektedir. N-terminali kesilmiş PTH'nin mevcut temsilcisi olarak kullanılan sentetik (7-84) PTH, düşük serum Ca düzeyine sahip, tiroparatiroidektomili hayvanlarda İ-PTH'nin kalsemik, fosfatemik ve fosfatürik etkilerini antagonize etmiş, PTH / PTHrP reseptöründen farklı bir C-terminali PTH reseptörü ile bağlanmıştır (74,75).

İntakt parathormon ölçümü N-terminali-kesilmiş PTH için birinci jenerasyon yöntemler, biyolojik intakt hormon düzeylerini daha yüksek saptayabilmektedir. Tahmin derecesi yöntem bağımlı olmakla birlikte, primer hiperparatiroidili veya son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda birinci jenerasyon İ-PTH yöntemleri, (1-84) PTH'den ortalama olarak % 50 daha yüksek çıkmaktadır (73).

Birinci jenerasyon İ-PTH yöntemlerinin biyolojik olarak aktif intakt hormon seviyesini doğru olarak ölçememesi, bu yöntemle saptanan intakt PTH'nin diyaliz hastalarında güvenilir bir kemik turnover göstergesi olarak kullanılamayacağını göstermektedir (76). PTH sıklıkla düşük, normal ve yüksek-turnoverlı kemik hastalığı olan hastaları ayırmakta başarısızdır. Dahası, hastaların İ-PTH'yi normal veya normale yakın bir şekilde baskılayacak şekilde tedavi edilmesi, sıklıkla adinamik kemik hastalığına yol açar.

Bir çalışmada, intakt hormon ve N-kesik parçacıklardan farklı bir PTH amino-terminal formu gösteren ikinci jenerasyon İ-PTH analizlerinin bile İ-PTH için spesifik olmayabileceği gösterilmiştir. Bu form, ikinci nesil İ-PTH yöntemiyle ölçülen İ-PTH'nin yaklaşık % 20'sini temsil etmiştir (81).

2.2.8. Örnek Gereksinimleri

Yönteme bağlı olmakla birlikte örneklerin seçiminde genellikle serum veya EDTA'lı plazma tercih edilir. Analizler hemen yapılmayacaksa, serum veya plazma dondurulmalıdır. Oda sıcaklığında birkaç saatten fazla veya 4 ˚C'de birkaç gün kaldığında PTH seviyelerinde düşme gözlemlenmiştir (77-81). EDTA'lı plazmanın muhtemelen proteolitik aktiviteyi azaltarak PTH'yıi stabilize ettiği bildirilmiştir (82-84).

2.2.9. Referans Aralık

PTH düzeyleri yorumlanırken eş zamanlı olarak hastanın kalsiyum düzeyleri dikkate alınmalıdır (85). Yönteme göre değişmekle birlikte referans aralıkları (43); 1. Jenerasyon İ-PTH: 10-65 pg/ml (1,1-6,8 pmol/l), 2. Jenerasyon, (1-84) PTH/ İ-PTH: 6-40 pg/ml (0,6-4,2 pmol/l) (43).

D vitamini yetersizliği ve hafif sekonder hiperparatiroidizm prevalansı nedeniyle PTH için referans gruptan belirlenen referans aralığın üst sınırı uygun

olmayabilir. D vitamini yetersizliği olan bireyleri dışlayarak bu yöntemler için daha düşük aralıklar oluşturulmuştur (86).

İntakt PTH düzeyleri yaşla birlikte değişir. Ayrıca hamilelik sırasında da düşük olabilir (87-89). Fetüslerde ve umbilikal kord kanında daha düşük olup, yenidoğan hipokalsemisine yanıt olarak yaşamın ilk birkaç gününde artmaktadır (90-93). Yetişkinlerdekine benzer değilse de çocuklar ve ergenlerde birbirine benzer olduğu bildirilmiştir (93). Sağlıklı yetişkinlerde, İ-PTH'nin dolaşımdaki düzeyleri yaşla birlikte artar (94, 95).

Paratiroid hormonun nokturnal artış ile karakterize edilen genel bir sirkadiyen ritm ile pulsatil bir tarzda salgılandığı bildirilmiştir (96-99). PTH'nin birden fazla kez ölçülmesi, epizodik sekresyon nedeniyle paratiroid durumunun yanlış yorumlanmasını önlemeye yardımcı olabilir (43).

2.2.10. PTH Sonuçlarının Yorumlanması

Paratiroid hormon, hiperkalseminin ayırıcı tanısında en önemli testtir. Primer hiperparatiroidili hastaların çoğunda PTH yüksektir (53,61,62,100). Maligniteye bağlı hiperkalsemi de dahil olmak üzere nonparatiroid hiperkalsemili hastaların çoğunda normalin altında veya referans aralığın alt yarısındadır (53,61,62). Stabil hiperkalsemisi olan hastalarda, referans aralığın üst yarısındaki PTH düzeyleri, primer hiperparatiroidizm (pHPT) düşündürmektedir. PTH sekresyonu azalan serum Ca düzeyi ile uyarılabildiğinden, PTH örnekleri mümkün olduğunca, hiperkalsemiye yönelik tedaviden önce alınmalıdır (101). Ektopik PTH üretimi son derece nadir göründüğü için (102), hiperkalsemiye eşlik eden hiperparatiroidizm maligniteyi düşündürür (103). Malignitede hiperkalsemi, genellikle kemik metastazları ve / veya PTHrP üretimi ile ilişkilidir. PTHrP, değerlendirilen PTH immünolojik testlerinden herhangi biriyle çapraz reaksiyona girmez. Yakın tarihli bir çalışmada, primer hiperparatiroidili 56 hasta örneğinden %96'sında (1-84) PTH düzeylerinde yükselme gözlenmişken, birinci jenerasyon İ-PTH için bu oranın % 73 olduğu gözlenmiştir. Buna göre pHPT tanısında (1-84) PTH'nın, daha hassas olduğu sonucuna ulaşılmıştır (104).

Paratiroid hormonun, intraoperatif olarak saptanması, paratiroidektominin durumunu değerlendirmek ve minimal invaziv paratiroid cerrahını kolaylaştırmak için

yararlıdır (105). PTH, insizyondan hemen önce ve hiperfonksiyonel paratiroid dokusunun rezeksiyondan 10 dakika sonra ölçülür. % 50 veya daha fazla bir düşüş genellikle tüm hiperfonksiyonel dokunun çıkarıldığını gösterir. Servikal ve mediastinal venlerden örneklenmiş preoperatif veya intraoperatif PTH, hiperfonksiyonel paratiroid dokusunun lokalizasyonu için de faydalı olabilir. Hiperfonksiyonlu dokunun çıkarılmasından sonra saptanan (1-84) PTH düzeyleri, birinci jenerasyon İ-PTH'den daha hızlı azaldığı gözlenmiştir (106).

Hipoparatiroidili hastaların çoğunda PTH düzeyleri subnormal veya düşüktür. Ancak bu düzeyler, hipokalsemisi olan hastalar için uygun olmayan düşüklüktedir. Hipoparatiroidi veya nonparatiroid hiperkalsemisi olan birçok hastada gözle görülür şekilde saptanan bu düşük düzeyler, yöntemlerin, nonspesifik serumun (ligand içermeyen matris) etkisinin ve/veya N-terminali kesilmiş PTH'nin ölçümünün yanlış olmasının bir sonucu olabilir (52). Sekonder hiperparatiroidizm tanısında PTH, kalsiyumdan daha duyarlı bir belirteçtir. SHPT'de,önce PTH düzeylerinde artış meydana gelirken, total veya serbest kalsiyum düzeylerinin anormal derecede düşüşü, PTH artışından sonra meydana gelir.

Son dönem böbrek hastalığı olan hastalarda, PTH ölçümü paratiroid fonksiyonunun değerlendirilmesinde, kemik döngüsünün hesaplanmasında ve yönetimin iyileştirilmesinde yardımcıdır. Bu hastalarda (1-84) PTH, birinci nesil İ-PTH'ye göre paratiroid durumunu, kemik döngüsünü ve kılavuz tedavisini daha doğru bir şekilde değerlendirmektedir (76,77). Bu nedenle birinci nesil İ-PTH için belirlenen terapötik hedeflerin, (normalin üst sınırının 2-4 katı) (1-84) PTH için de revize edilmesi gerekmektedir.

SHPT nedeniyle ileri derecede osteitis fibrosa gibi yüksek turnoverlı kemik hastalığı olan kişiler en yüksek PTH düzeylerine sahipken, osteomalazi de dahil olmak üzere düşük turnoverlı, adinamik kemik hastalığı olan kişiler, en düşük İ-PTH seviyelerine sahiptirler. Orta düzeyler ise, düşük turnoverlı adrenal (aplastik) hastalık ve osteitis fibrosada erken dönemde görülür. Çeşitli renal osteodistrofi formları arasında İ-PTH düzeylerinde önemli ölçüde örtüşme görülmüştür. Diyaliz hastalarında, 100-150 pg/ml'nin altında ve 250-300 pg/ml'nin üzerinde olan kesme noktaları ("karar seviyeleri"), düşük ve yüksek-devirli kemik hastalığı olan hastaları ayırdetmek için önerilmiştir. Paratiroidi baskılanmış rezonansla tedavi edilen

kişilerde, adrenal ve hiperparatiroid kemik hastalığını önlemek için birinci jenerasyon İ-PTH düzeyleri referans aralık üst sınırının 2-4 katı seviyesinde tutulmaya çalışılır. (107,108).

Serum kalsiyumu ve diyaliz membranının tipi de dahi olmak üzere çeşitli faktörler PTH sekresyonunu ve klirensini etkilediğinden paratiroid durumu genellikle prediyaliz örneklerinde PTH ölçülerek belirlenir (109,110). Serum kalsiyum düzeylerindeki değişikliklere akut paratiroid yanıtını belirlemek için prediyaliz ve postdializ örneklerinin karşılaştırılması önerilmektedir (111,112).

Yüksek düzeylerde C-terminal parçacıkları olan sekonder hiperparatiroidizmi olan diyaliz hastalarında, (non-kompetitive immün yöntemlerle ölçüm sonucunda elde edilen verilere bakarak) PTH'yi düşürmekten kaçınmak için birinci jenerasyon İ-PTH veya (1-84) PTH yöntemleri, yüksek düzeylerde C-terminal antikor içermelidir. İnterferansın olmaması için, PTH'nin en yüksek düzeylerine sahip diyaliz hastalarından alınan örnekler, paralel olarak seyreltilerek değerlendirilmelidir (113,114). Alternatif olarak, bu numunelere bilinen bir miktarda sağlam PTH eklenerek geri kazanım belirlenebilir.

PTH düzeyleri hipertiroidizm, hipotiroidizm ve lityum karbonat tedavisi ile değiştirilebilir. Hipertiroidi hastalarında, PTH triiyodotironin (T3) düzeyleri ile ters orantılıdır ve düşük düzeylerine rastlanır. Serum PTH, radyoaktif iyot tedavisi sonrası hipotiroidi olan hastalarda artmakta ve replasman tedavisi ile azalmaktadır (115-117). Bu değişikliklere serum kalsiyumu aracılık etmektedir. Kronik lityum karbonat tedavisinin, paratiroid bezi boyutunu ve dolaşımdaki PTH dolaşımını arttırdığı bildirilmiştir (118).

C-terminal parçacıklarını ölçen PTH yöntemleri için yaygın olmayan bir diğer kullanım da, şüpheli paratiroid kistlerinden gelen sıvının analizidir. Paratiroid kist sıvısının aktif intakt hormon değil, inaktif PTH parçacıkları içerdiği görülmektedir (119).

2.3. D VİTAMİNİ

Vitamin D, çoğunlukla 7-dehidrokolesterolün deride fotokimyasal şekilde üretilen yağda çözünür bir steroid prohormonudur. Biyolojik olarak vitamin D3 (Kolekalsiferol) ve vitamin D2 (Ergokalsiferol) önemlidir. Hem vitamin D3 hem de

Vitamin D2 suni bir kaynak olarak gıdadan absorbe edilebilirler ancak vitamin D2'nin sadece %10-%20'si beslenmeyle alınır. Vitamin D3 ve D2 vitamin eklerinde bulunabilir. Vitamin D, iki hidroksilasyon reaksiyonu ile aktif hormon 1,25-(OH)2 Vit D (Kalsitriol)'ye dönüştürülür. Karaciğerde meydana ilk hidroksilasyon reaksiyonu ile vitamin D, 25-OH Vit D3'e dönüştürülür. İkinci hidroksilasyon hem böbreklerde hem de vücudun diğer birçok hücrelerinde meydana gelmektedir. Burada 25-OH Vit D3, biyolojik aktif 1,25-(OH)2 Vit D3'e dönüştürülür. Hücrelerin çoğunda vitamin D reseptörü bulunmaktadır. İnsan genomunun yaklaşık %3'ü doğrudan veya dolayı olarak vitamin D'ye bağlı endokrin sistem tarafından ayarlanır (120). Vitamin D'nin temel depolanan şekli, 25-OH Vit D3'dir. Aktif 1,25-(OH)2 Vit D3 ile kıyaslandığında kanda 1000 kat kadar daha yüksek düzeyde bulunmaktadır. 25-OH Vit D3, 2 ila 3 haftalık bir yarı ömre sahipken 1,25-(OH)2 Vit D3 4 saatlik ömre sahiptir. Dolayısıyla, vitamin D statüsünün tespitinde tercih edilen analit 25-OH Vit D3'tür (121,122).

Epidemiyolojik araştırmalar, vitamin D'nin yetersizlik ve eksikliğinin oldukça yaygın olduğunu göstermiştir (123). Vitamin D statüsünün tespiti, önleyici ve terapötik müdahalelere ilişkin olanaklar sunmaktadır (124-127). Vitamin D eksikliği, ikincil hiperparatroidizm ve eksik kemik metabolizması ile sonuçlanan hastalıkların (raşitizm, osteoporoz, osteomalasi gibi) nedenidir (121,128,129). Kandaki düşük 25-OH Vit D3 düzeyleri (vitamin D yetersizliği) yaygın kanserler, otoimmün veya bulaşıcı hastalıklar veya kardiyovasküler sorunlar dahil olmak üzere birçok kronik hastalık için yüksek bir risk ile ilişkilendirilmektedir (120,121,125-130).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Prospektif bir çalışma olarak planlanan bu çalışma, Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarında 01 09 2017 – 01 03 2018 tarihleri arasında tamamlanmıştır. Çalışma kapsamına sadece sağlıklı gönüllüler alınmıştır. 24 07 2017 tarihli HNEAH-KAEK 2017/107(HNEAH-KAEK 2017/KK/108) karar no ile Haydarpaşa Numune Eğitim Araştırma Hastanesi Etik Kurulu'ndan etik kurul onayı (Bkz. EK 1) ve hastane yönetiminden çalışmaya dair izin (Bkz. EK 2) alınmıştır.

3.1. Çalışmaya Dahil Edilme Kriterleri

Normal beslenme alışkanlıkları olan (rejim yapmayan) 18-50 yaş arası aşağıdaki kabul kriterlerimiz baz alınarak saptanmış sağlıklı kadın ve erkek gönüllüler çalışmaya dahil edildi. Her katılımcıdan, kabul kriterlerimizin yazılı olduğu IFCC'nin standartlarına uygun olarak hazırlanmış anket formlarını (Bkz. EK3) cevaplaması istendi. Çalışmadaki tüm katılımcılara anket formları doldurtulduktan sonra gönüllü olur bilgilendirme formu (Bkz. EK4) okutularak, onay ve imzaları alındı. Katılımcıların kriterlerimizi karşılayıp karşılamadıklarını değerlendirmek amacıyla kan örnekleri alındı. Bu kan örneklerinde serum Ca, P, Mg, kreatinin, BUN ve 25-OH Vit D3 düzeyleri ölçüldü ve ayrıca eGFR değeri hesaplandı. Serum Ca, P, Mg, kreatinin ve BUN test sonuçları referans değerler içinde kalan katılımcılar ile eGFR değeri > 60 ml/dk/1.73 m^2 olanlar çalışmaya dahil edildi (131).

3.2. Çalışmadan dışlanma kriterleri

- Gebelik – Laktasyon (10)
- Menopoz(10)
- İlaç kullanımı(10)
- Son 6 ay içinde yaşanmış kırık öyküsü (132, 133)
- eGFR < 60 mL/dk/1.73 m^2 (131)
- Ca, P, Mg, kreatinin ve BUN değerlerinin referans aralığı dışında olması

3.3. Örnek sayısı

Referans sınırlarının saptanmasında NCCLS dökümanlarında parametrik olmayan yöntemlerde %90, %95 ve %99 güven aralıkları için sırasıyla 120, 153 ve 198 verinin yeterli olduğu bildirilmektedir (4). Bu çalışmaya NCCLS ve genel kriterlerimiz kapsamında 284 kadın ve 229 erkek olmak üzere toplam 513 sağlıklı gönüllü dahil edildi.

3.4. Preanalitik Evre

Sağlıklı gönüllülerden, 10-12 saatlik açlık sonrasında aydınlatılmış gönüllü onam formu imzalatıldıktan sonra hastanemiz kan alma bölümünde deneyimli hemşireler tarafından BD marka jelli ve vakumlu 5 ml'lik iki biyokimya tüpüne yaklaşık 9 ml kadar kan alındı. Tüpler 30 dakika (134,135) bekletildikten sonra numuneler, numune stabilitesi için soğutmalı santrifüj cihazında (136) 1500xg'de 10 dakika santrifüj edildi (137). Her katılımcıya ait serum örneği iki kısma ayrıldı. Serum örneklerinden biri çalışma zamanına kadar -80 ^{o}C'de saklandı. Diğer serum kısmı aynı gün Ca, Mg, P, kreatinin, BUN ve 25-OH Vit D3 testleri Abbott Architect 4100i biyokimya ve immunoassay cihazında çalışılması amacıyla ayrıldı.

3.5. Analitik evre

Katılımcılara ait serum örneklerinden Ca, P, Mg, BUN, kreatinin ve 25-OH Vit D3 düzeyleri modüler sisteme sahip Abbott marka Architect Ci 4100 model biyokimya ve immunoassay cihazında (Kaliforniya, ABD) çalışıldı. Kreatinin düzeyi ve katılımcının yaşını temel alan MDRD (Modification of Diet in Renal Diseases Study) formülü kullanılarak eGFR hesaplandı. Test ve anket formalarında elde edilen veriler değerlendirildikten sonra saptanan tüm referans bireylerin çalışma gününe kadar -80^{o}C'de saklanan serum örnekleri çalışma öncesinde oda sıcaklığına getirildi. Bu serumlar kullanılarak İ-PTH düzeyleri, Abbott marka Architect Ci 4100model biyokimya ve immunoassay cihazı ile Siemens Advia Centuar XP (Siemens Healthcare Diagnostics, Deerfield, IL) ve Roche Modular E170 (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN) analizörlerinde ölçüldü.

3.5.1 Çalışılan Parametrelerin Test Prensipleri

a) Kalsiyum: Kalsiyum renklendiricileri olarak o-kresolftalein komplekson ve Arsenazo III kullanılmaktadır. Bu çalışmada Architect 4100 cihazına aplikasyonu yapılan Ca test yöntemi Arsenazo-III yötemidir (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA). Arsenazo-III renklendiricisi bir asit solüsyonlu ortamda mavi-mor bileşeni oluşturmak üzere Ca ile reaksiyona girer. Ca miktarı ile orantılı şekilde oluşan renk 660 nm'de ölçülür.

b) Magnezyum: Enzimatik yöntemle çalıştığımız Mg test (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA) prensibi, serum örneğinde bulunan magnezyumun, izositrat dehidrojenaz tarafından katalizlenen bir reaksiyonda kofaktör olarak görev alması esasına dayanır. Bu reaksiyonda "nikotinamid adenin dinükleotid fosfat" (NADPH) oluşumuna bağlı olarak 340 nm dalga boyunda gözlenen absorbans artışı Mg miktarı ile direkt orantılıdır.

c) Fosfor: Çalışmada Fosfo-molibdat yöntemi kullanılmıştır. Bu yöntemde, Pi (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA) bir heteropoliasit kompleksi oluşturmak için amonyum molibdat ile reaksiyona girer. Ayrıca proteinsiz bir filtrat elde etmek için bir surfaktan kullanmaya ihtiyaç vardır. Oluşan heteropolisakkarit 340 nm'de absorbans verir ve bu absorbans serumdaki Pi düzeyi ile doğrudan orantılıdır. Burada dikkat edilmesi gereken nokta, örnek içindeki spesifik olmayan herhangi bir absorbansın düzeltilmesi için "örnek blank"lerinin çalıştırılması gerektiğidir.

d) Kreatinin: Kreatinin (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA) ölçüm yöntemimiz kinetik alkalen pikrat yöntemi olup, alkalen bir pH'de numunedeki kreatinin, bir kreatinin-pikrat kompleksi oluşturmak için pikrat ile reaksiyona vermesi esasına dayanır. Oluşan kompleksin 500 nm'deki absorbans oranı, numunedeki kreatinin miktarı ile doğru orantılıdır.

e) BUN: Çalışmada üreaz yöntemi kullanılmıştır. Üre nitrojen testi ilk olarak Talke ve Schubert tarafından açıklanan tamamen enzimatik bir prosedürün modifikasyonudur (138). Test (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA), reaksiyonun ilk hızının sınırlı bir süre için lineer olduğu kinetik bir test olarak gerçekleştirilir. Örnek içindeki üre, üreaz tarafından amonyak ve karbondioksite hidrolize edilir. Glutamat dehidrojenaz (GLD) ile katalize edilen ikinci bir reaksiyon,

indirgenmiş (redükte) "nikotinamid adenin dinükleotid"in (NADH) "nikotinamid adenin dinükleotid"e (NAD) eş zamanlı oksidasyonu ile birlikte amonyağı ve α-ketoglutaratı, glutamat ve suya dönüştürür. Mevcut her mol üre için iki mol NADH okside edilerek harcanır. 340 nm'deki absorbans düşüşünün başlangıç hızı örnekteki üre miktarı ile orantılıdır. Bulunan üre değeri 0,467 ile çarpılarak BUN hesaplanır.

f) Vit D: 25-OH Vit D3 tetkiki (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA), Chemiflex olarak adlandırılan esnek tetkik protokolleriyle CMIA teknolojisini kullanarak insan serumu ve plazmasında vitamin D'nin kantitatif tespitinde bir örnek ön hazırlığını içeren geciktirilmiş tek adımlı immünolojik tetkikdir.

Örnek ve ön işlem reaktifi birleştirilir. Birleştirilen örneğinin bir aliquotu (porsiyonu) reaksiyon karışımını oluşturmak için tetkik diluenti ve paramanyetik anti‑Vit D kaplı mikropartiküller ile birleştirilir. Örnekte mevcut Vit D, anti-Vit D kaplı mikropartiküllere tutunur. İnkübasyondan sonra biotinleşmiş Vit D anti-Biotin akridinium etiketli bir konjugat, reaksiyon karışımına eklenir ve anti-vitamin D kaplı mikropartiküllerin boş bağlanma bölgelerine tutunur. Yıkamadan sonra pre-trigger ve trigger çözeltileri reaksiyon karışımına ilave edilir. Elde edilen kemilüminesan reaksiyon relatif ışık üniteleri (RLUs) olarak ölçülür. Örnekteki vitamin D miktarı ve optik sistemler ile tespit edilen RLUs arasında dolaylı bir ilişki bulunmaktadır.

g) İ-PTH: Architect İ-PTH tetkiki (Architect-Aeroset-Abbott Diagnostics, IL, USA) insan serumu ve plazmasında bulunan İ-PTH'nın kantitatif tesbiti amaçlı bir CMIA teknolojisi ile Chemifleks olarak ifade edilen esnek tetkik protokoller kullanan iki adımlı (two steps) bir sandiviç immünolojik tetkikdir.

İlk adımda, örnek, tetkik diluenti ve anti-PTH kaplı paramanyetik mikropartiküller birleştirilir. Örnekte mevcut İ-PTH, anti-PTH kaplı mikropartiküllere tutunur. Yıkamadan sonra, ikinci adımda anti-PTH akridinium etiketli konjugatı reaksiyon karışımına eklenir. Diğer bir yıkamadan sonra pre-trigger ve trigger solüsyonları reaksiyon karışımına eklenir. Elde edilen kemilüminesan reaksiyon RLUs olarak ölçülür. Örnekteki PTH miktarı ile RLU arasında doğrudan bir ilişki bulunmaktadır. Tablo 6'da kullanılan kitlerin özellikleri verilmektedir.

Tablo 6. İ-PTH kit özelliklerinin karşılaştırılması

ÖZELLİK	ABBOTT	SIEMENS	ROCHE
Ölçüm yöntemi	CMIA	ICMA	ECLIA
Örnek Türü	Serum, plazma	Serum, plazma	K3 EDTA, Serum
Örnek Hacmi	150 µl	50 µl	500 µL
Ölçüm Aralığı	3.0-3000 pg/ml	4.6–2000 pg/mL	5.50-2300 pg/mL
Limit of Detection	< 3 pg/ml	3.2 pg/mL	3.50 pg/mL
İnterferans	Hg > 500 mg/dl Bilirubin > 20 mg/dl TG >5000 mg/dl Protein < 4 g/dl Protein >9,5 mg/dl	Hg>500 mg/dl Bilirubin>60 mg/dl TG>3275 mg/dl Protein < 6 g/dl Protein >12 mg/dl Biotin>1500 ng/ml	Hg>0.1 g/dL Bilirubin>65 mg/dl Lipid>1500mg/dl Biotin>50 ng/ml
Presizyon			
Düşük seviye %CV	6.4	≤ 8.0	2.0
Orta seviye %CV	3.3	≤ 6.0	1.2
Yüksek seviye%CV	3.0	≤ 8.0	1.1
Fonksiyonel sensitivite	< 5 pg/ml	-	6.0 pg/ml
Analitik Sensitivite	≤ 1 pg/ml	-	-
Spesifite	≤ 0.01 %	< % 0.1	≤ % 0.1
Referans Aralığı	15.0-68.3 pg/ml	Serum:18.5-88 pg/ml Plazma:18.4-80.1 pg/ml	15-65 pg/ml

*Architect İ-PTH, Cobas İ-PTH ve Siemens İ-PTH kit insertlerinden alınmıştır.

3.2.2. GFR Hesaplanması

$$eGFR = 186 \times ([Scr]^{-1.154}) \times ([Yaş]^{-0.203}) \times (0.742 \text{ kadın ise}) \times (1.21 \text{ zenci ise})$$

GFR: ml/dakika/1.73 m^2, Scr: Serum kreatinin düzeyi (mg/dl),

3.2.3. Kalibrasyon ve Kontrol

Çalışılan tüm parametreler için orijinal kalibratör ve kontroller kullanıldı

3.6. İstatistiksel Analiz

Tüm istatistiksel analizler için IBM SPSS statistics 25 software, MedCalc version 15 Software (Medcalc Company) ve InStat3 GraphPad Software kullanıldı. Grup sayısı iki olan bağımsız gruplarda, parametrik verilerin karşılaştırılması için Unpaired t test ve nonparametrik verilerin karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Grup sayısı ikiden fazla olan bağımsız gruplarda, parametrik verilerin karşılaştırılması için One-way ANOVA ve nonparametrik verilerin karşılaştırılması için Kruskal-Wallis testi kullanıldı.

Abbott İ-PTH düzeylerinin Siemens ve Roche marka İ-PTH düzeyleri ile ilişkisini saptayabilmek amacıyla nonparametrik verilerin analizinde Spearman korelasyon analizi kullanıldı. Abbott, Siemens ve Roche marka kullanılarak saptanan İ-PTH düzeylerinin, cinsiyete göre Korelasyon Matrix analizi yapıldı. Korelasyon matriks analizleri, verilerin Guassian dağılım gösterdiği kabulü ile Pearson r korelasyon analizi kullanılarak yapıldı. Serum Abbott İ-PTH düzeyleri ile yaş, Mg, Ca, P, GFR ve 25-OH Vit D3 düzeyleri arasındaki ilişkiyi incelemek için parametrik verilerde Pearson, nonparametrik verilerde Spearman korelasyon analizleri kullanıldı.

Bağımlı değişkeni tahmin edebilecek bağımsız değişkenlerin etki ve önceliğini belirleyen çoklu regresyon analiz modeli oluşturuldu. Burada yaş, Mg, Ca, P, GFR ve 25-OH Vit D3 gibi bir dizi bağımsız değişkenin, bağımlı değişken olarak düşünülen Abbott İ-PTH üzerine etkisini araştırmak için bu analiz uygulandı.

Örnek sayısı 120'nin altında olan verilerin analizinde ve örnek sayısı 120 ve üzerinde olan normal dağılım göstermeyen verilerin referans aralık tayininde non-parametrik yüzdelik yöntem (CLSI C28-A3) tekniği kullanıldı. Örnek sayısı 120'den az olan normal dağılım göstermeyen verilerin referans aralık tayininde Robust yöntem (CLSI C28-A3) tekniği kullanıldı. 25-OH Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olanlarda non-parametrik yüzdelik yöntemi (CLSI C28-A3) kullanılarak kadın ve erkekler için Abbott İ-PTH referans aralığı belirlendi.

3.7. Çıkar çatışması

Çalışmaya katılan yazar/yazarların ve çalışmaya katkı sunan kişilerin herhangi bir çıkar çatışması bulunmamaktadır.

4. BULGULAR

Sağlıklı popülasyonun 154'ünde 25-OH Vit D3 düzeyi 20 ng/mL'den küçük, 111'inde 25-OH Vit D3 düzeyi 20-30 ng/ml arasında ve 248'inde ise 25-OH Vit D3 düzeyi 30 ng/mL'den yüksek bulundu. Yaş, Mg, Ca, P, GFR ve 25-OH Vit D3 düzeylerinin (bağımsız değişkenler), Abbott İ-PTH düzeyleri (bağımlı değişken) üzerine etkisini tahmin etmek için kullanılan çoklu regresyon analiz verileri tablo 7'de verilmiştir. Tablodaki 7 bağımsız değişkenli model toplamda uygun gözükmektedir (t ratio=4.712, P<0.0001). Ayrıca bu modelin verilerine göre Abbott İ-PTH düzeyleri üzerine Ca ve 25-OH Vit D3düzeylerinin tek başlarına etkili oldukları gözlenmektedir. Buradan yola çıkılarak Abbott İ-PTH düzeyleri tahmin etmek için serum Cave 25-OH Vit D3 düzeylerinin kullanıldığı ve diğer bağımsız değişkenlerin çıkarıldığı 2 bağımsız değişkenli bir model (tablo 8) tahmin için daha uygun bulundu (t ratio=6.632, P<0.0001).(Tablo 8, Şekil 1).Ayrıca tüm sağlıklı referans popülasyonda İ-PTH düzeylerinin 25 OH Vit D3 düzeyleri ile orta derecede serum kalsiyum düzeyleri ile zayıf derecede ancak istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı.

Tablo 7. Abbott İ-PTH düzeyleri için kullanılan 7 değişkenli model

[İ-PTH] = 151.63-0.417*[Cins] + 0.179*[Yaş] + 4.422*[Mg] - 6.07*[Ca] - 3.809*[P] - 0.104*[GFR] - 0.779*[ViT D3]

R squared: 21.69%, Multiple R: 0.4657, F: 15.4813

Variable	Coefficient	SE	95% CI	t ratio	P value
constant	151.63	30.806	91.245 to 212.01	4.922	< 0.0001
Cinsiyet	-0.4167	2.284	-4.894 to 4.060	0.1824	0.8553
Yaş	0.1790	0.1247	-0.065 to 0.4235	1.435	0.1518
Mg	4.422	6.891	-9.083 to 17.928	0.6418	0.5213
Ca	-6.070	2.618	-11.201 to -0.939	2.319	**0.0208**
P	-3.809	2.121	-7.965 to 0.3478	1.796	0.0731
eGFR	-0.1035	0.07664	-0.254 to 0.0468	1.350	0.1777
25-OH Vit D3	-0.7792	0.06223	-0.9012 to -0.6572	12.522	**<0.0001**

R squared değeri, bu modelle açıklanabilen İ-PTH varyansının yüzdesidir.

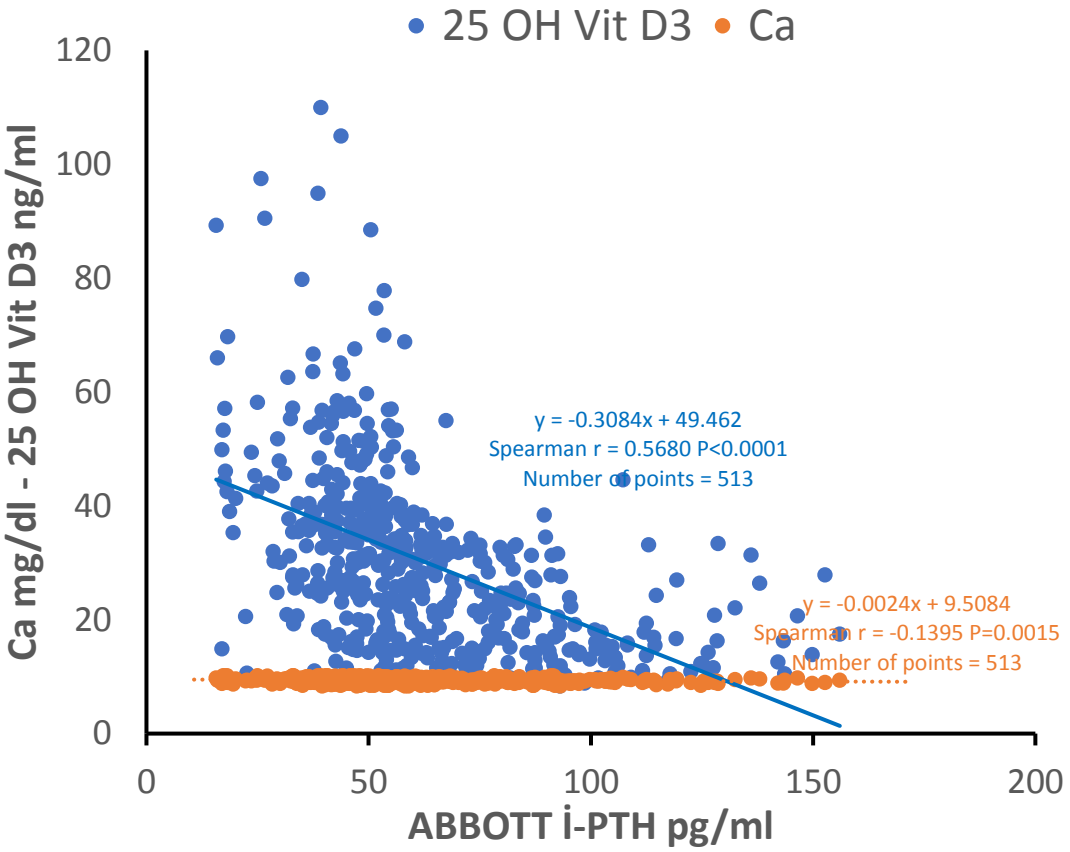
Tablo 8. Abbott İ-PTH düzeyleri için kullanılan 2 değişkenli model

[İ-PTH] = 143.65 - 6.116*[Ca] - 0.799*[Vit D3]

R squared: 26.1%, Multiple R: 0.5109, F: 90.08

Variable	Coefficient	SE	95% CI	t ratio	P value
constant	143.65	21.659	101.19 to 186.10	6.632	<0.0001
Ca	-6.116	2.320	-10.664 to -1.568	2.636	0.0087
25-OH Vit D3	-0.7994	0.0621	-0.9210 to -0.678	12.877	<0.0001

R squared değeri, bu modelle açıklanabilen İ-PTH varyansının yüzdesidir.



Şekil 1. Abbott İ-PTH düzeylerinin tahmini için kullanılan 2 bağımsız değişkenli model

Kullandığımız her 3 yöntemin de tekrarlanabilirliğini değerlendirmek için gün içi (within run) ve günler arası (between day) CV çalışmaları yapılmış olup, CV çalışmaları tablo 9'da verilmiştir. İmpresizyon (kesin olmama) için kabul edilebilir hata sınırı CLIA 88 kriterlerinde belirtilmemiştir. Ricos C ve ark.'nın 2014 yılında yaptığı çalışmanın sonucu olarak Westgard'ın sitesinde yer alan CV değeri %13'tür (139). Ayrıca The Royal College of Pathologists of Australasia (RCPA)'ya göre bu oran %25'tir ve buna göre her üç yöntemin de tekrarlanabilirliğinin kabul edilebilir sınırlarda olduğu doğrulanmıştır.

Tablo 9. Cihazların %CV değerleri

Marka	**Düzey (pg/ml)**	**Within run CV**	**Between day CV**
Abbott L1	14	6.7	7.2
Abbott L2	72	3.7	3.7
Abbott L3	262	3.2	3.5
Siemens L1	44	1.05	3.86
Siemens L2	241	0.93	2.13
Siemens L3	875	1.06	2.43
Roche L1	63	1.22	3.13
Roche L2	145	1.86	2.92
Roche L3	632	1.11	3.11

Tablo 10'daki korelasyon matriks sonuçları incelendiğinde hem cinsiyete göre hem de toplam olarak Abbott İ-PTH sonuçlarının Siemens ve Roche marka İ-PTH sonuçları ile yüksek korelasyon gösterdiği saptandı ($r > 0.95$, $P<0.0001$).

Abbott İ-PTH sonuçları Siemens ve Roche İ-PTH sonuçları ile karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak oldukça anlamlı fark saptanmıştır ($P<0.0001$) (Tablo 11). Abbott İ-PTH sonuçları hem Siemens hem de Roche İ-PTH sonuçları ile yüksek korelasyon göstermesine karşın (Spearman $r>0.95$, $P<0.0001$) (Şekil 2), her markanın da ortalama±SS (ortanca (Min-Mak) dağılımları) değerleri istatistiksel olarak birbirinden oldukça farklıydı ($P<0.0001$) (Tablo 11). Toplamda 513 olguda Abbott İ-PTH ve 25-OH Vit D3 birlikte değerlendirilirken, İ-PTH sadece 472 olguda 3 farklı marka ile çalışıldı. Sonuçlar tablo 11'de verilmiştir.

Tablo 10. Cinsiyete göre 3 farklı markanın İ-PTH Korelasyon Matrix sonuçları

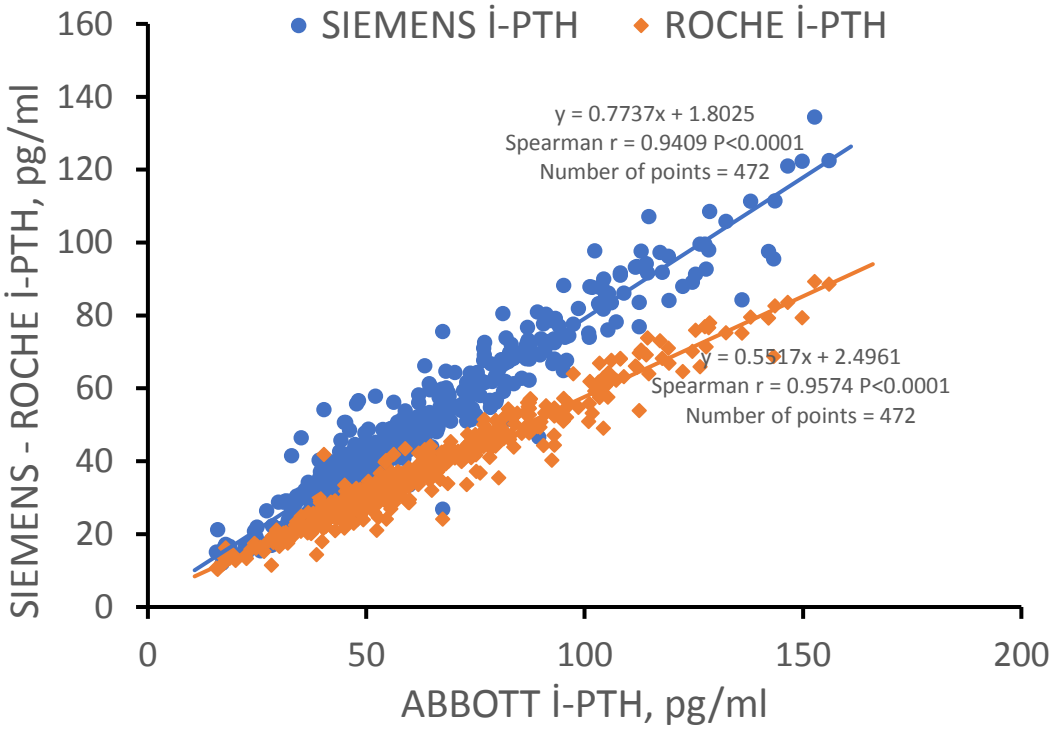
	R		
ERKEK:193	**A:**	**B:**	**C:**
A:İ-PTH ABBOTT	1.0000	0.9588	0.9788
B:İ-PTH SIEMENS	0.9588	1.0000	0.9663
C: İ-PTH ROCHE	0.9788	0.9663	1.0000
KADIN:279	**A:**	**B:**	**C:**
A:İ-PTH ABBOTT	1.0000	0.9657	0.9700
B:İ-PTH SIEMENS	0.9657	1.0000	0.9597
C: İ-PTH ROCHE	0.9700	0.9597	1.0000
TOPLAM: 472	**A:**	**B:**	**C:**
A:İ-PTH ABBOTT	1.0000	0.9657	0.700
B:İ-PTH SIEMENS	0.9657	1.0000	0.9597
C: İ-PTH ROCHE	0.9700	0.9597	1.0000

Korelasyon matriks sonuçları Guassian dağılım gösterdiği kabulü ile Pearson r korelasyon analizi kullanılarak yapılır.

Tablo 11. Üç farklı markanın serum İ-PTH düzeylerinin karşılaştırılması

SERUM	**İ-PTH, ng/ml**			[a] **P**	**Grupların Karşılaştırılması I-II, I-III, II-III**
	ABBOTT (I)	**SIEMENS (II)**	**ROCHE (III)**		
n	472	472	472		
E/K	193/279	193/279	193/279		
Ort±SS	62.7±26.0	50.3±20.9	37.1±14.8		
Ortn	56.2	44.7	33.6	<0.0001	<0.001, <0.001, <0.001
(Min-Mak)	15.7-156.0	12.0-122.5	10.7-88.6		

a P Değeri için Kruskal-Wallis Test (Nonparametric ANOVA) ile birlikte Post-hoc test (Dunn's Çoklu Karşılaştırma Testi) kullanıldı. ANOVA testi ile elde edilen P değiri <0.05 bulunursa, ikili gruplar arasındaki (I, II ve III) P değeri için çoklu karşılaştırma testleri uygulanır. E/K: Erkek/Kadın, Ort: Ortalama, SS: Standart Sapma, Ortn: Ortanca, Min-Mak: Minimum-Maksimum



Şekil 2. Abbott İ-PTH düzeyleri Siemens ve Roche İ-PTH düzeyleri ile yüksek korelasyon göstermektedir.

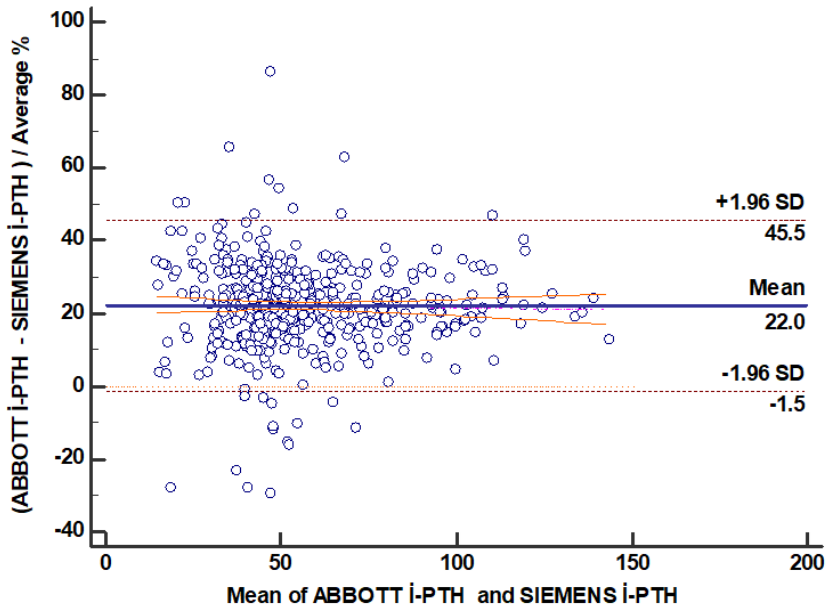
Abbott İ-PTH düzeylerinin Siemens ve Roche İ-PTH düzeyleri arasındaki uyum Bland-Altman uyum sınırları grafiği ile incelendiğinde, Abbott yönteminin diğer iki yöntemle oransal yanlılık gösteren bir ilişkisel uyum gösterdiği saptandı. Farkların ortalaması % 95 güven aralığında sıfırı kapsamamaktaydı. Bland-Altman grafiğinde bütün noktalar uyum sınırları içinde değildi (Şekil 3 ve 4). Ayrıca Abbott İ-PTH düzeyleri, Roche ve Siemens İ-PTH düzeylerinden %95 güven aralığında sırasıyla %69.4 - %31.7 ve %45.5 - %-1.5 daha yüksek saptandı.

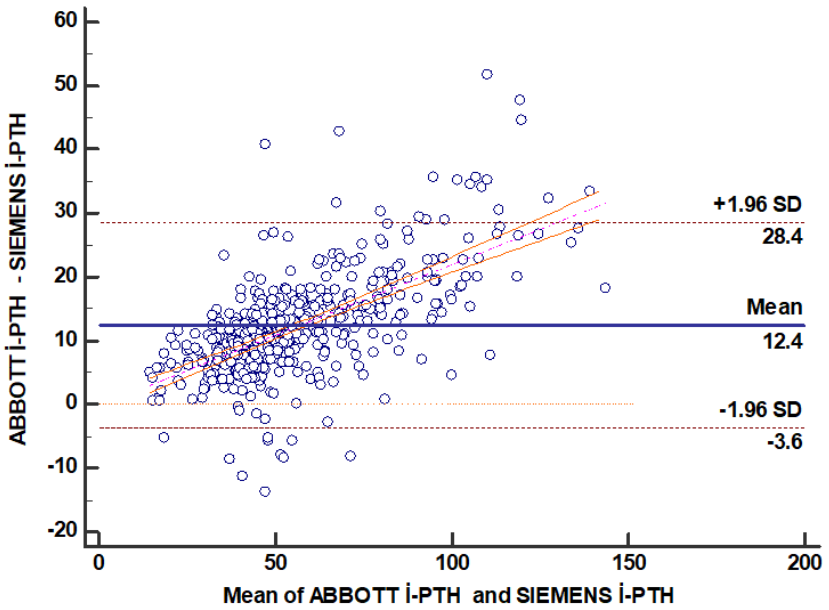
Referans birey seçmek amacıyla değerlendirmeye alınan tüm erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri, 25-OH Vit D3 düzeyleri ile logaritmik eğimli bir ilişki gösterdi (Şekil 5). Bu ilişki derecesini belirlemek için yapılan Spearman korelasyon analizinde, Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit D3 düzeyleri arasında kadınlarda daha yüksek olmak üzere orta dereceye yakın ters yönlü bir ilişki saptandı (sırasıyla Spearman r = -0.5001, 95% CI: -0.5939 to -0.3928 ve Spearman r = -0.6067, 95% CI: -0.6773 to -0.5251; P<0.0001). Benzer şekilde toplamda da tüm olguların Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit D3 düzeyleri arasında logaritmik eğimli bir

ilişki vardı (Spearman r = -0.5680, 95% CI: -0.6255 to -0.5044; P<0.0001) (Tablo 12, 13, 14) (Şekil 6). Ayrıca erkek olgularda Abbott İ-PTH ile serum P düzeyleri arasında düşük derecede ancak istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı (Spearman r= -0.1676, 95% CI: -0.2945 to -0.03491, P=0.0111). Ancak korelasyon katsayısı r, 0.20'den büyük olanlar için anlamlılık araştırıldığından bulunan -0.16'lık değerin rastlantısal olduğu düşünüldü.

Normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde ve örnek hacmi 120'nin altında olanlarda nonparametrik yüzde tahmini yöntemi excel programı kullanılarak dağılımın % 95'lik kısmını kapsayan % 2,5 ile % 97,5'luk alana eşdeğer noktalar basit hesaplama tekniğiyle hesaplandı. Değerler, şekil 7, 8, 9 ve 10'da gösterildiği gibidir.

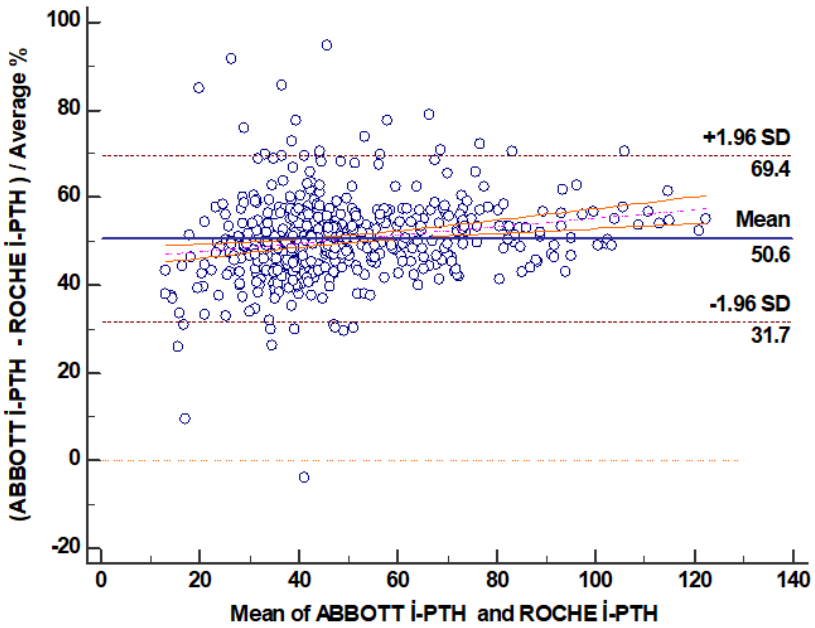
Şekil 8, 9 ve 10' da erkek kadın ve toplamda İ-PTH düzeylerinin aykırı değerlerle birlikte dağılımını gösterilmektedir. Bu şekillerde ortalama, ortanca, minimum ve maksimum değerler aykırı değer noktaları ile birlikte verilmiştir. 25-OH Vit D3 düzeyleri 20 ng/ml'den küçük olan olgular için İ-PTH alt ve üst limitleri 37,8 ve 143,3 pg/ml, 20 ng/mL ile 30 ng/ml arasında olanlar için 31,6 ile 138,0 pg/ml ve 25-OH Vit D3 düzeyi 30 ng/ml ve üzerinde olanlar için ise alt limit 17,8 pg/ml ve üst limit 89,8 pg/ml olarak hesaplandı. Yine 25-OH Vit D3 düzeyleri <20 ng/ml ve 20≥Vit D3 <30 ng/ml olan olguların Abbott İ-PTH düzeyleri, Vit D3 düzeyleri ≥ 30 ng/ml olan olgulardan belirgin şekilde daha yüksekti (P<0.001) (Şekil 7). Ayrıca 25-OH Vit D3 düzeyleri <20 ng/ml, 20≥Vit D3 <30 ng/ml ve ≥ 30 ng/ml olanların erkek ve kadın populasyunun Abbott İ-PTH ortalama değerleri arasında fark saptanmadı (sırasıyla Unpaired t test, erkek/kadın: 74.6±28.9/82.7±26.3 pg/ml, P = 0.0705; Unpaired t test, erkek/kadın: 67.3±25.6/63.6±24.2 pg/ml, P = 0.4367 ve Mann-Whitney Test, erkek/kadın: 49.6±17.2/50.7±17.1 pg/ml (ortanca: 48.3/50.5, min-maks: 15.7-136.0/16.0-128.6 pg/ml), P= 0.2737).

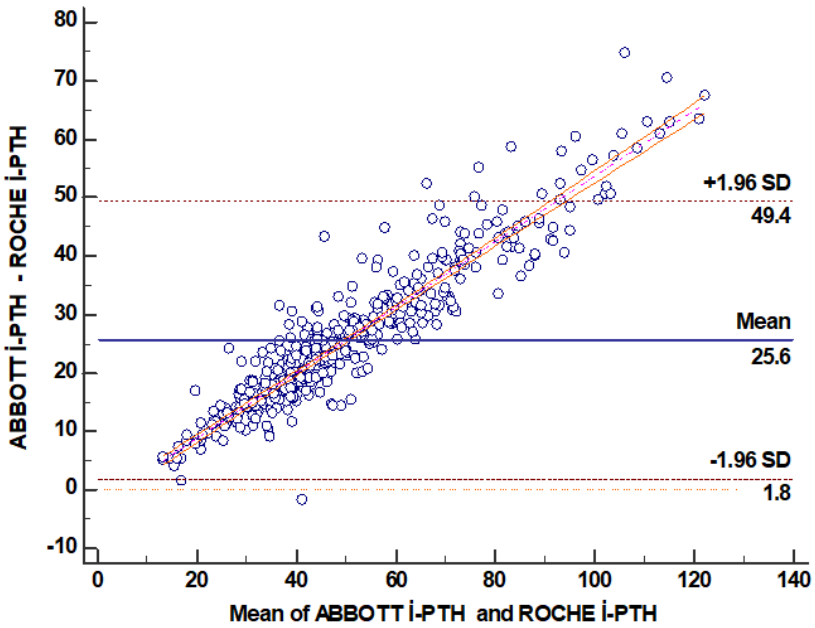




Method	Mean	Coefficient of Variation (%)	Regression Equation y = 0.1018 + 1.2442 x			
X (SIEMENS)	50.3152	5,00	Parameter	Coefficient	Std.Error	95%CI
Y (ABBOTT)	62.7048	5,00	Intercept	0.1018	0.9217	-1.7094 to 1.9129
Sample size	472		Slope	1.2442	0.01964	1.2056 to 1.2828
Variance ratio	0.6439					

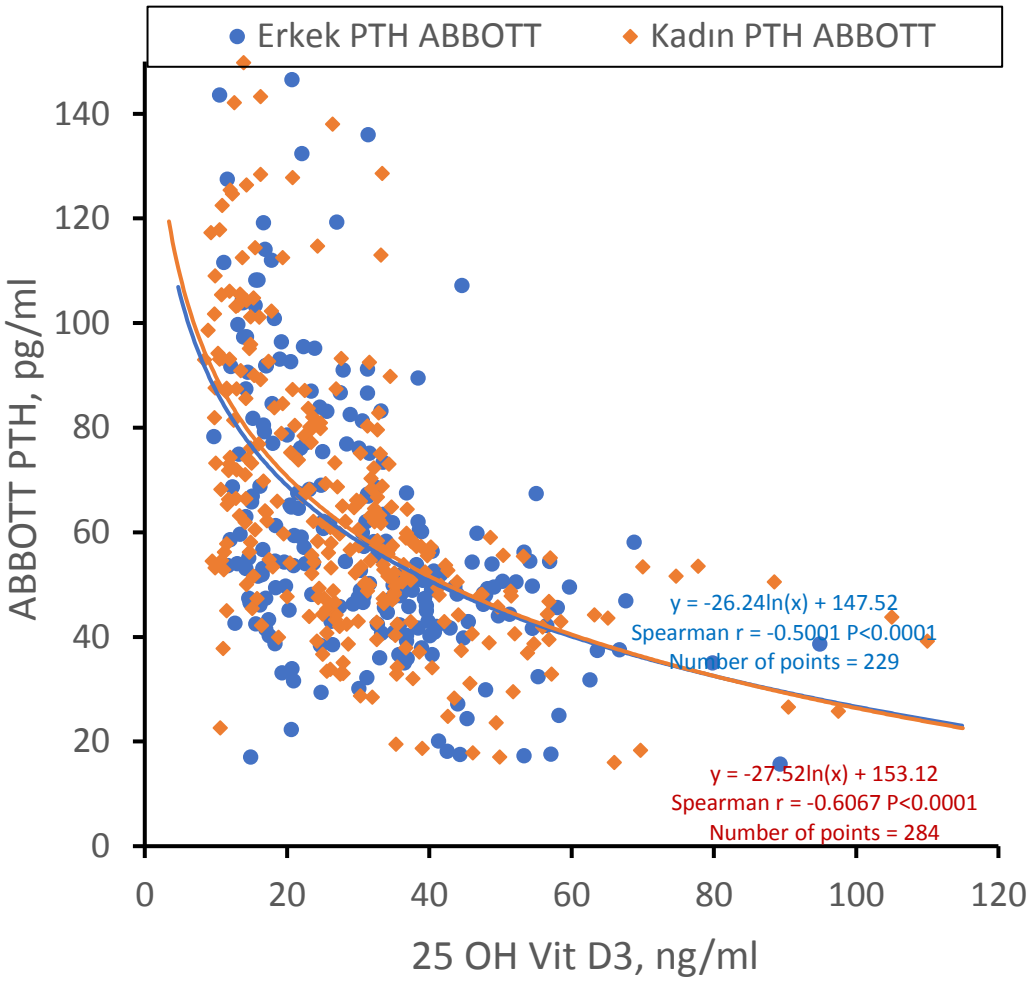
Şekil 3. Abbott ve Siemens İ-PTH Bland-Altman uyum sınırları grafiği ve Deming regresyon sonuçları tablosu. Abbott ve Siemens İ-PTH düzeyleri arasındaki farkların (oransal ve değersel) iki yöntemin ortalamalarına göre oluşturulan Bland-Altman uyum sınırları grafiğinde bütün noktalar uyum sınırları içinde değildir. Farkların ortalaması sıfırdan oldukça büyük olduğundan Abbott ve Roche İ-PTH arasında oransal bir yanlılık olduğu gözükmektedir. Ayrıca %95 güven aralığındaeğim 1 kapsamadığından bu iki yöntem arasında mutlak bir uyum yoktur. Ancak ilişkisel bir uyum olduğu gözükmektedir. Uyumu göstermede regresyon eğrisi a=0 ve b=1'e karşı test edilir. Yani iki yönteme ait değerler, saçılım grafiğinde eşitlik doğrusu (line of quality) üzerinde olmalıdır.



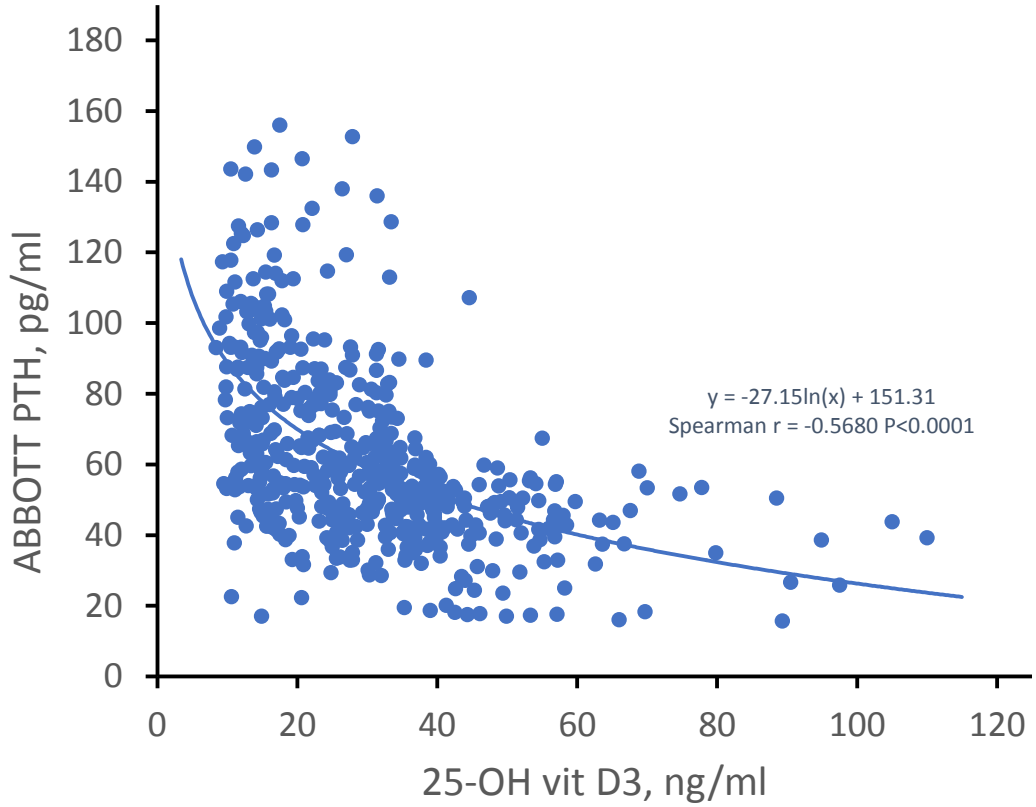


Method	Mean	Coefficient of Variation (%)	Regression Equation y = -4,2785 + 1,8168 x			
X (ROCHE)	37.0896	5,00	Parameter	Coefficient	Std.Error	95%CI
Y (ABBOTT)	62,7048	5,00	Intercept	-2.7980	0.7541	-4.2799 to -1.3161
Sample size	472		Slope	1,7661	0.02157	1.7237 to 1.8085
Variance ratio	0,3499					

Şekil 4. Abbott ve Roche İ-PTH Bland-Altman uyum sınırları grafiği ve Deming regresyon sonuçları tablosu. Abbott ve Siemens İ-PTH düzeyleri arasındaki farkların (oransal ve değersel) iki yöntemin ortalamalarına göre oluşturulan Bland-Altman uyum sınırları grafiğinde, bütün noktalar uyum sınırları içinde değildir. Farkların ortalaması sıfırdan oldukça büyük olduğundan Abbott ve Roche İ-PTH arasında oransal bir yanlılık olduğu gözükmektedir. Ayrıca %95 güven aralığında eğim 1 kapsamadığından bu iki yöntem arasında mutlak bir uyum yoktur. Ancak ilişkisel bir uyum olduğu gözükmektedir.



Şekil 5. Erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit-D3 düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren korelasyon grafiği.



Şekil 6. Toplamda tüm olguların (erkek + kadın) Abbott İ-PTH düzeyleri ve 25-OH Vit-D3 düzeyleri arasındaki ilişkiyi gösteren Spearman Korelasyon grafiği

Tablo 12. Tüm erkek olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix çalışması

n: 229	A:	B:	C:	D:	E:	F:	G:
A:Yaş	1.0000						
B:Mg	0.0101	-					
C:Ca	-0.1019	0.1869	-				
D:Fosfor	-0.1293	-0.0391	0.0183	-			
E:GFR	**-0.3975**	-0.1694	-0.1616	0.0193	-		
F: Vit D3	-0.0490	0.0104	0.0629	0.0702	0.0546	-	
G:Abbott İ-PTH	0.1192	0.0127	-0.1935	**-0.2136**	-0.1052	**-0.4696**	1.0000

Korelasyon matriks sonuçları Guassian dağılım gösterdiği kabulü ile Pearson r korelasyon analizi kullanılarak yapılır. Bulunan korelasyonlar verilerin parametrik veya nonparametrik oluşuna göre tekrar değerlendirilmelidir.

Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, BUN: Kan üre nitrojeni, GFR: Glomerüler filtrasyon hızı, Vit D: 25-OH Vit D3, İ-PTH: İntakt Paratiroid Hormon

Tablo 13. Tüm kadın olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix çalışması

n: 284	A:	B:	C:	D:	E:	F:	G:
A:Yaş	1.0000						
B:Mg	0.0988	-					
C:Ca	-0.0234	0.0556	-				
D:Fosfor	-0.0078	0.1447	0.1973	-			
E:GFR	**-0.5439**	-0.1180	-0.1688	0.0167	-		
F: Vit D3	0.0176	-0.1164	0.0784	0.1400	0.0272	-	
G:Abbott İ-PTH	0.0969	0.0841	-0.0692	**-0.0730**	-0.0921	**-0.5201**	1.0000

Korelasyon matriks sonuçları Guassian dağılım gösterdiği kabulü ile Pearson r korelasyon analizi kullanılarak yapılır. Bulunan korelasyonlar verilerin parametrik veya nonparametrik oluşuna göre tekrar değerlendirilmelidir.

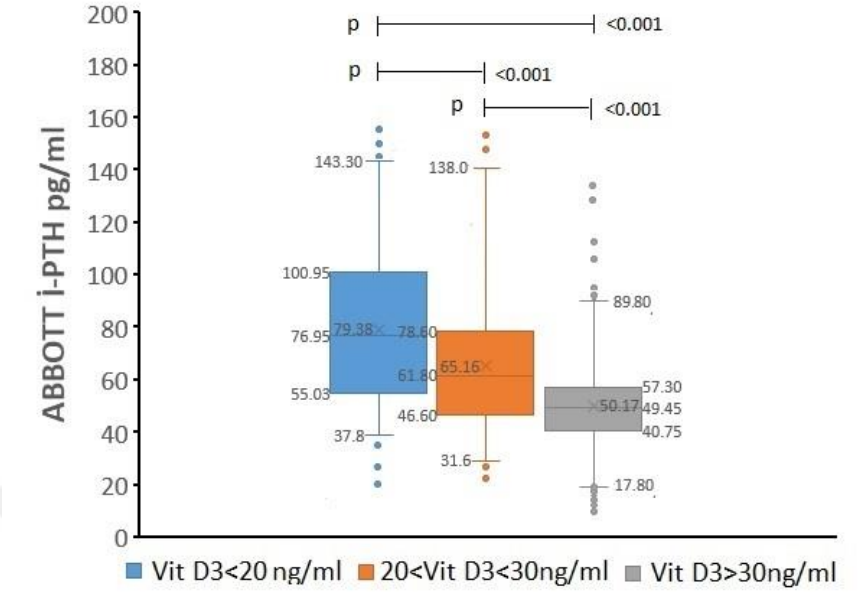
Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, GFR: Glomerüler filtrasyon hızı, Vit D: 25-OH Vit D3, İ-PTH: İntakt Paratiroid Hormon

Tablo 14. Tüm olgulardan elde edilen verilerin korelasyon matrix sonuçları

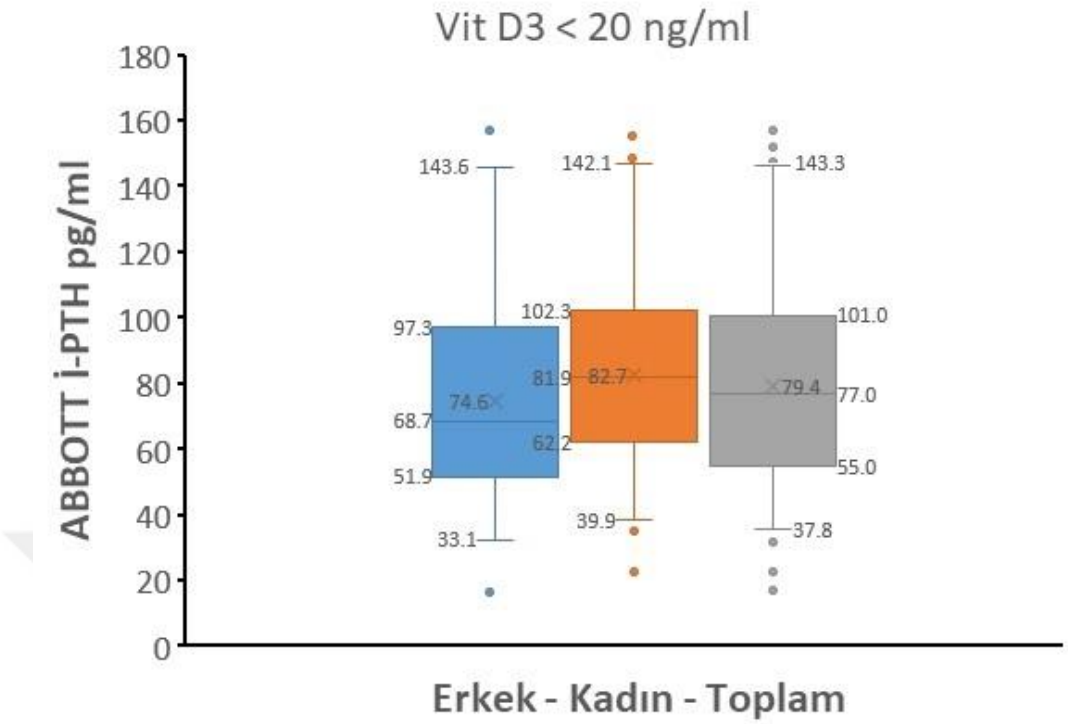
n: 513	A:	B:	C:	D:	E:	F:	G:	H:
A: Cinsiyet	1.0000							
B:Yaş	-0.0609	-						
C:Mg	0.1790	0.0435	-					
D:Ca	0.4071	-0.0797	0.11800	-				
E:Fosfor	**-0.1626**	-0.0456	0.0253	0.0367	-			
F:GFR	0.1824	-0.4730	-0.1069	-0.0735	-0.0123	-		
G: Vit D3	0.0562	-0.0147	-0.0482	**0.0882**	0.0992	0.0489	-	
H:Abbott İ-PTH	-0.0749	0.1110	0.0363	**-0.1441**	-0.1213	-0.1097	-0.5010	1.0000

Korelasyon matriks sonuçları Guassian dağılım gösterdiği kabulü ile Pearson r korelasyon analizi kullanılarak yapılır. Bulunan korelasyonlar verilerin parametrik veya nonparametrik oluşuna göre tekrar değerlendirilmelidir.

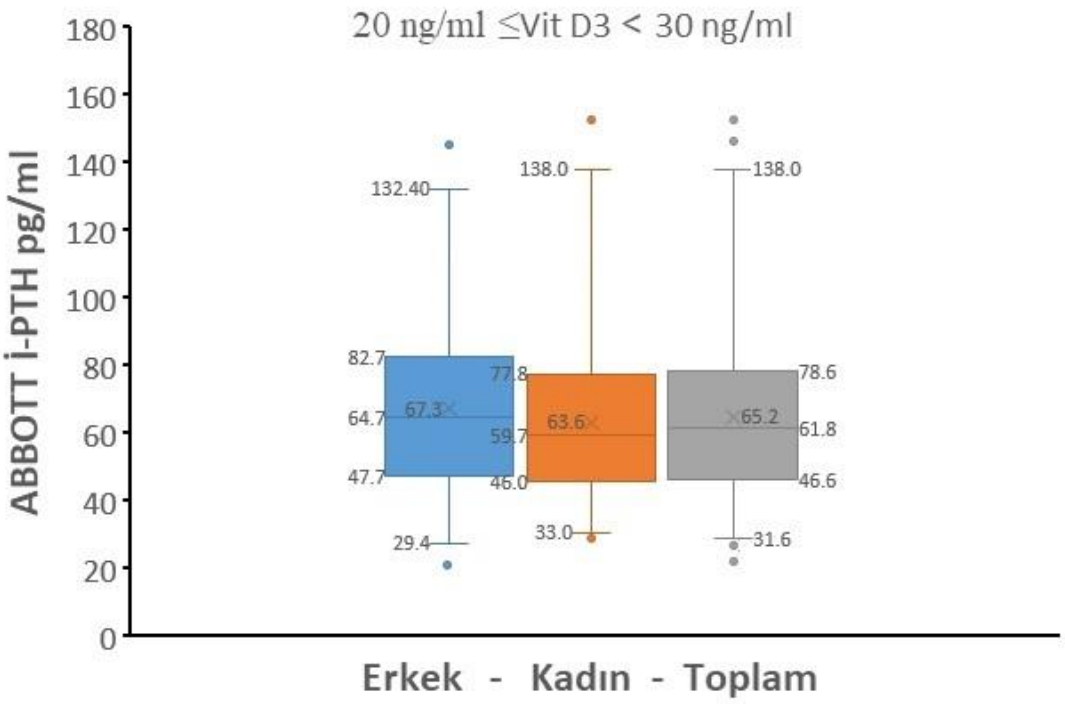
Mg: Magnezyum, Ca: Kalsiyum, GFR: Glomerüler filtrasyon hızı, Vit D: 25-OH Vit D3, İ-PTH: İntakt Paratiroid Hormon



Şekil 7. 25 OH Vit D3 düzeylerine göre Abbott İ-PTH düzeylerinin nonparametrik yöntem kullanılarak belirlenmiş referans aralıklar grafiği. Kruskal-Wallis Testi (nonparametric ANOVA) ile yapılan kıyaslamada, 25-OH Vit D3 düzeyleri ≥30 ng/ml olanların İ-PTH düzeyleri diğerlerine kıyasla daha düşük olduğu gözlenmektedir (P<0.0001).



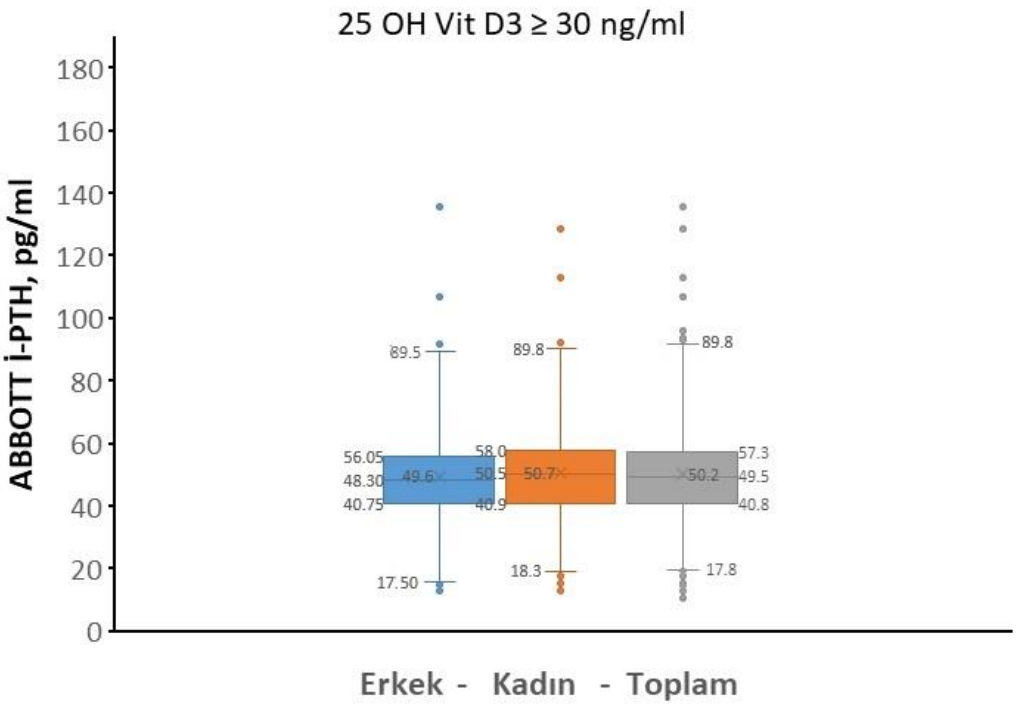
Şekil 8. 25-OH Vit D3 düzeyi 20 ng/ml altındaki erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik. Grafikte ortalama, ortanca, minimum, maksimum değerleri ile birlikte verilmiştir. Erkek ve kadın olguların İ-PTH düzeyleri arasında fark yoktu (Unpaired t test; P=0.705).



Şekil 9. 25-OH Vit D3 düzeyi ≥ ve < 30 ng/ml arasındaki erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik. Grafikte ortalama, ortanca, minimum, maksimum değerler ve üst limitlerdeki aykırı değer noktaları ile birlikte verilmiştir. Erkek ve kadın olguların İ-PTH düzeyleri arasında fark yoktu (Unpaired t test; P=0.4470).

Medcalc 15 software istatistik programı kullanılarak yapılan referans aralık belirleme çalışmasında, 25 OH Vit D3 düzeyi ≥ 30 ng/ml olan erkek ve kadın olgulara ait Abbott İ-PTH verilerin normal dağlım göstermediği saptandı (Şekil 11, 12 ve 13). CLSI'nın EP 28-A3c klinik laboratuvarda referans aralıkların tanımlanması, oluşturulması ve doğrulanması için önerdiği onaylanmış kılavuzuna göre nonparametrik yöntem kullanılarak yapılan analizde, % 90 güven aralığında Abbott İ-PTH testinin erkek popülasyon için alt limiti 17.50 (90%CI =15.70 to 24.40) pg/ml ve üst limiti 91.16 (81.30 to 136.00) pg/ml olarak saptandı (Şekil 11). Kadın olgularda Abbott İ-PTH testinin alt limiti 17.91 (90% CI = 16.00 to 23.60) ve üst limiti 91.89 (90% CI = 79.60 to 128.60) pg/ml idi (Şekil 12). Erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri arasında fark olmadığından erkek ve kadın olgulara ait veriler birlikte

değerlendirildi. Cinsiyet ayrımı olmaksızın Abbott İ-PTH testinin alt limiti 17.65 (90% CI = 16.00 to 20.10) ve üst limiti 90.89 (90% CI = 81.30 to 128.60) pg/ml olarak saptandı (Şekil 13).



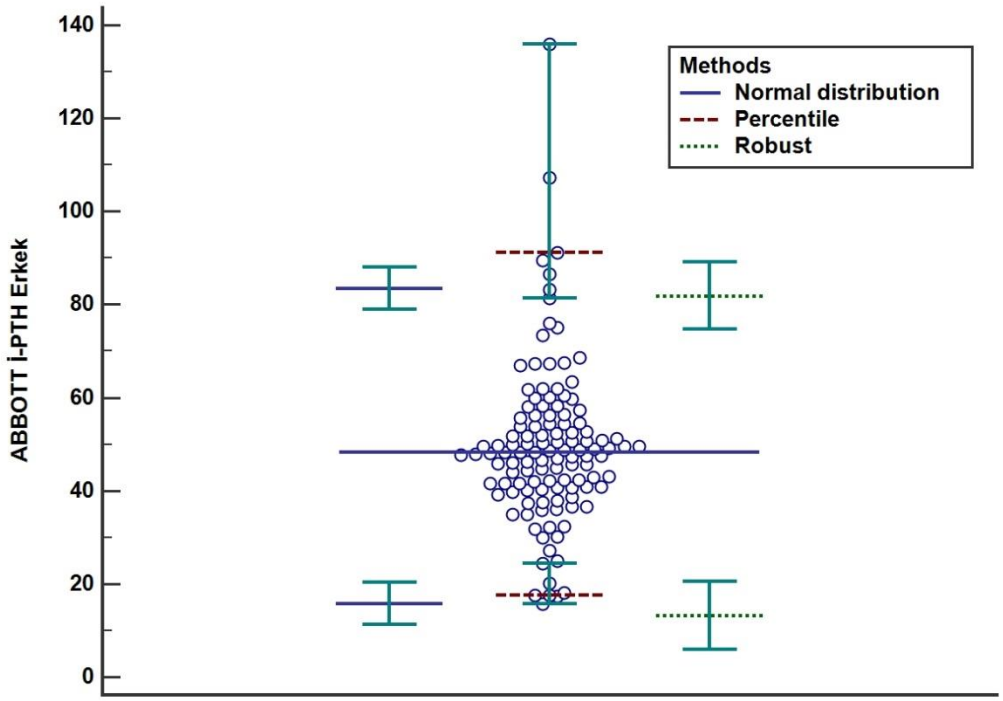
Şekil 10. 25 OH Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan erkek, kadın ve toplam tüm olguların Abbott İ-PTH düzeylerinin dağılımını gösteren grafik. Grafikte ortalama, ortanca, minimum, maksimum, referans alt-üst limitler ve alt üst limitlerdeki aykırı değer noktaları ile birlikte verilmiştir. Erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri arasında fark yoktu (Mann-Whitney Test; P=0.2737).

Medcalc 15 software istatistik programı kullanılarak yapılan referans aralık belirleme çalışmasında, 20 ng/ml ≥ 25 OH Vit D3 düzeyi < 30 ng/ml olan erkek ve kadın olgulara ait Abbott İ-PTH verilerin normal dağılım gösterdiği saptandı (Şekil 14 ve 15). CLSI EP 28-A3c klavuzunda klinik laboratuarda referans aralıkların belirlenmesinde örnek sayısı 120'nin altında olan gruplar için önerdiği Robust yöntem kullanılarak yapılan analizde, %90 güven aralığında Abbott İ-PTH testinin erkek popülasyon için alt limiti 12.019 (90%CI =-0.583 to 25.167) pg/ml ve üst limiti 117.16

(102.61 to 129.01) pg/ml olarak saptandı (Şekil 14). 20 ng/ml ≥25-OH Vit D3 düzeyi <30 ng/ml olan kadın olgularda Abbott İ-PTH için Robust test alt limiti 9.88 (90% CI = -2.101 to 22.272) ve üst limiti 118.717 (90% CI = 95.556 to 120.473) pg/ml idi (Şekil 15). Erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri arasında fark olmadığından (Unpaired t test P = 0.4367) erkek ve kadın olgulara ait veriler birlikte nonparametrikyüzdelik yöntemle değerlendirildiğinde ise Abbott İ-PTH testinin alt limiti 31.16 ve üst limiti 139.70 pg/ml olarak saptandı (Şekil 16).

Yine CLSI EP 28-A3c rehbere göre 25-OH Vit D3 düzeyi <20 ng/ml olan kadınların aksine erkek olgularda ve toplamda (erkek + kadın) Abbott İ-PTH verilerin normal dağılım göstermediği saptandı (Şekil 17, 18 ve 19). Erkek ve kadın olguların Robust test ile belirlenen referan aralıkları içi alt /üst limit değerleri sırasıyla 13.06-132.06 ve 29.21-134.25 pg/ml olarak belirlendi. Erkek ve kadın olguların Abbott İ-PTH düzeyleri arasında fark olmadığından (Unpaired t test P = 0.0705) erkek ve kadın olgulara ait veriler birlikte nonparametrik yüzdelik yöntemle değerlendirildiğinde ise Abbott İ-PTH testinin alt limiti 37.21 ve üst limiti 143.34 pg/ml olarak saptandı (Şekil 19). Bu limitler 25-OH Vit D3 düzeyi ≥30 olan olgulara kıyasla oldukça yüksekti (P<0.001) .25-OH Vit D3 düzeyi 20 ng/ml'den büyük olan referans popülasyonun Abbott İ-PTH referans aralığı 18.30 – 114,70 pg/ml olarak saptandı (şekil 20). 25-OH Vit D3 düzeylerinden bağımsız tüm sağlıklı referans popülasyonun Abbott İ-PTH referans aralığı 20.00 – 127.89 pg/ml olarak saptandı (Şekil 21).

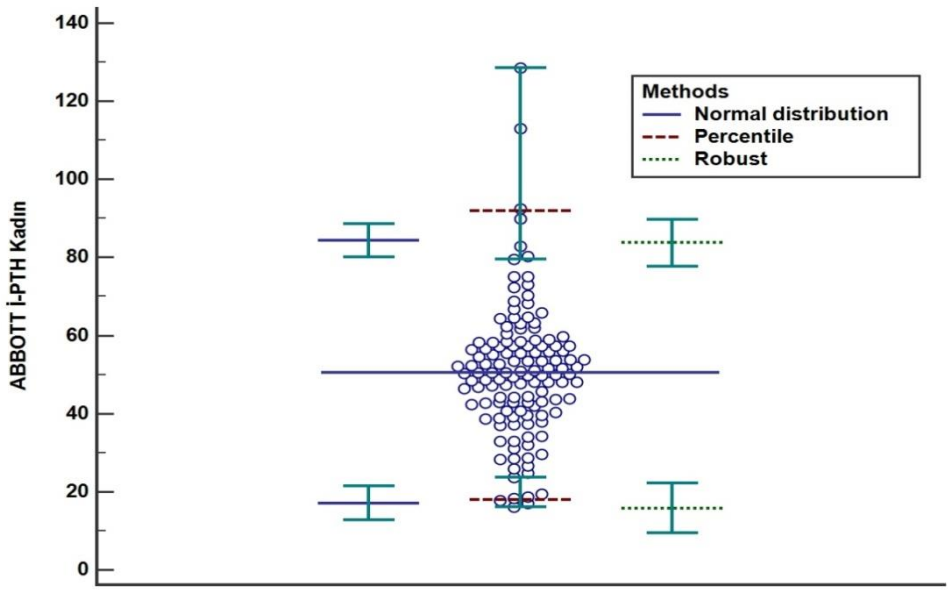
Ayrıca farklı yöntemler arasındaki ilişki belirlenmek için çalışma popülasyonunun 472'sinde Abbott yanı sıra Roche ve Siemens cihazlarında da ölçülen İ-PTH düzeyleri 25 OH Vit D3 düzeylerinden bağımsız olarak karşılaştırıldığında, non-parametrik yüzdelik yöntemiyle (Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3) belirlenen en geniş referans aralığının Abbott yöntemine ait olduğu saptandı (sırasıyla 23.4 – 128.4 pg/ml, 17.1 – 98.3 pg/ml ve 14.3 – 63.7 pg/ml) (Şekil 22).



Reference interval: ABBOTT_İ_PTH_pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	120
Lowest – Highest value	15.7000 - 136.0000
Mean - Median	49.6175 - 48.3000
Coefficient of Skewness	1.4667 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	5.5364 (P<0.0001)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.1303, reject Normality (P<0.0001)
Suspected outliersa,b	15.717.317.517.681.383.286.689.591.2107.2136
[a]Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	15.78 (11.2816 to 20.2858)
Upper limit (90% CI)	83.45 (78.9492 to 87.9534)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	17.50 (15.7000 to 24.4000)
Upper limit (90% CI)	91.16 (81.3000 to 136.0000)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	13.15 (5.9321 to 20.5512)
Upper limit (90% CI[a])	81.3 (74.7545 to 89.0997)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

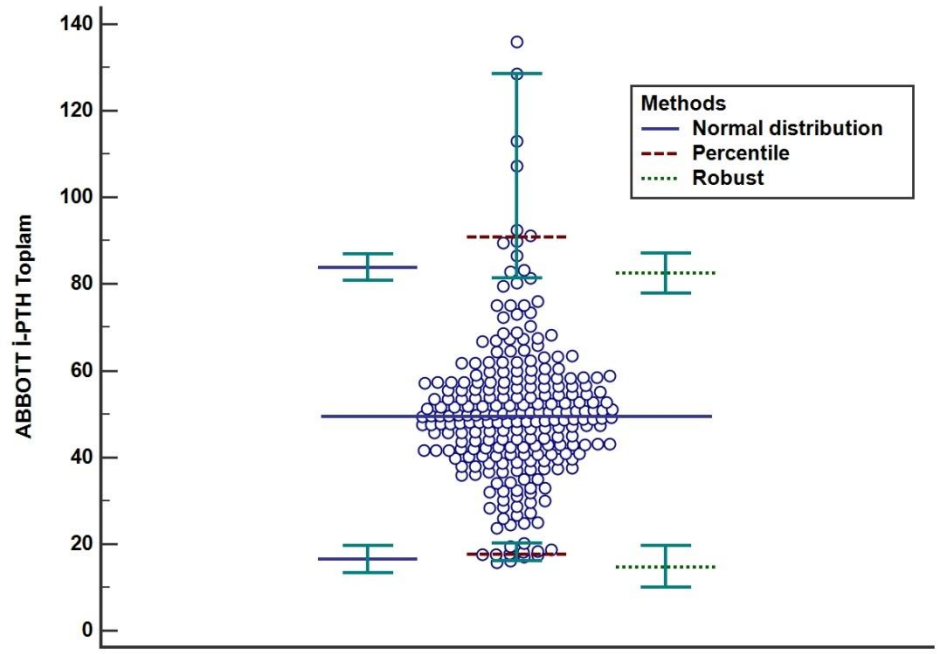
Şekil 11. Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan erkek olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	128
Lowest – Highest value	16.00 - 128.60
Mean – Median	50.696- 50.500
Coefficient of Skewness	1.0258 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	3.7972 (P<0.0001)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.1112, reject Normality (P=0.0005)
Suspected outliers[a,b]	89.8, 92.5, 112.97, 128.6
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	17.05(12.72 to 21.39)
Upper limit (90% CI)	84.34 (80.01 to 88.67)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	17.9125 (16.00 to 23.60)
Upper limit (90% CI)	91.89 (79.60 to 128.60)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	15.71 (9.35 to 22.25)
Upper limit (90% CI[a])	83.82 (77.69 to 89.61)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

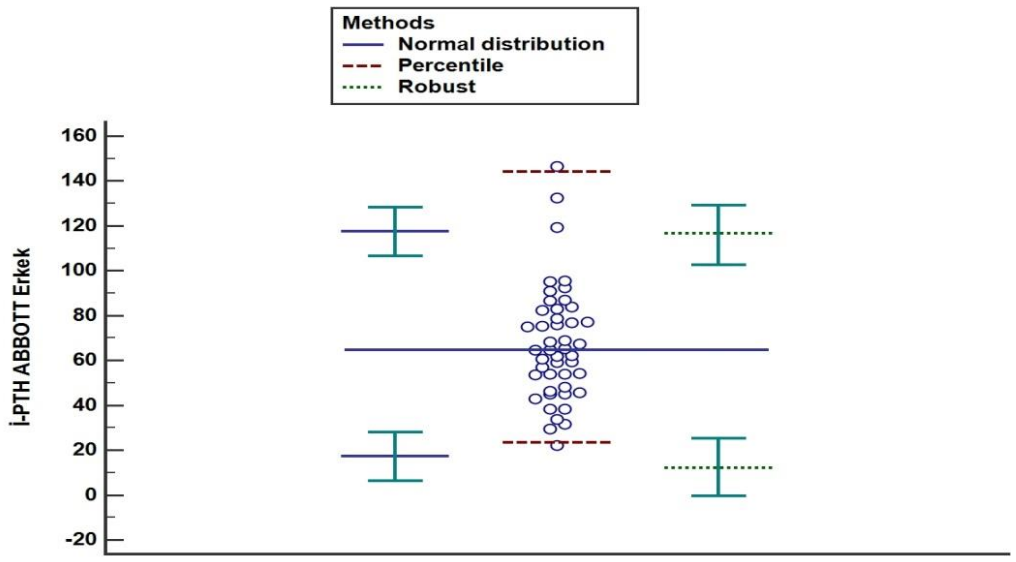
Şekil 12. Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan kadın olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	248
Lowest – Highest value	15.70- 136.00
Mean – Median	50.174- 49.450
Coefficient of Skewness	1.2309 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	4.4906 (P<0.0001)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.1105, reject Normality (P<0.0001)
Suspected outliers[a,b]	15.7, 82.8, 83.2, 86.6, 89.5, 89.8, 91.2,92.5, 107.2, 112.97, 128.6, 136
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	16.49(13.38 to 19.603)
Upper limit (90% CI)	83.86(80.75 to 86.97)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	17.65(16.00 to 20.10)
Upper limit (90% CI)	90.89(81.30 to 128.60)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	14.697 (9.951 to 19.671)
Upper limit (90% CI[a])	82.516(77.875 to 87.149)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

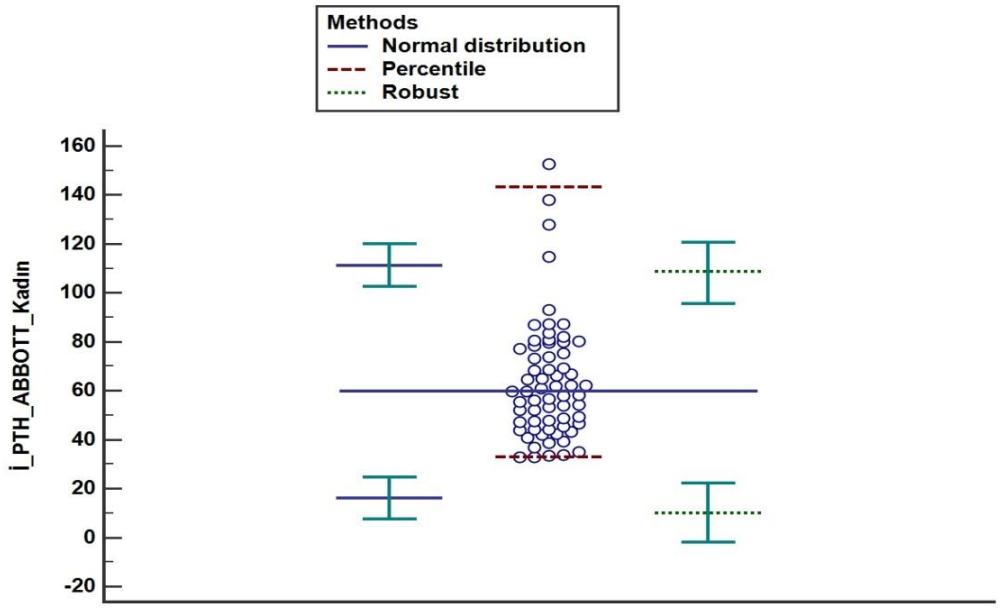
Şekil 13. Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan tüm olgularda (kadın-erkek) Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	46
Lowest – Highest value	22.30- 146.50
Mean - Median	67.35 – 64.70
Coefficient of Skewness	0.9205 (P=0.0125)
Coefficient of Kurtosis	1.4661 (P=0.0741)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0829, accept Normality (P>0.10)
Suspected outliers[a,b]	146.5
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	17.20(6.37 to 28.024)
Upper limit (90% CI)	117.495(106.67 to 128.32)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	23.543
Upper limit (90% CI)	144.033
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	12.019(-0.583 to 25.167)
Upper limit (90% CI[a])	116.595 (102.612 to 129.006)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

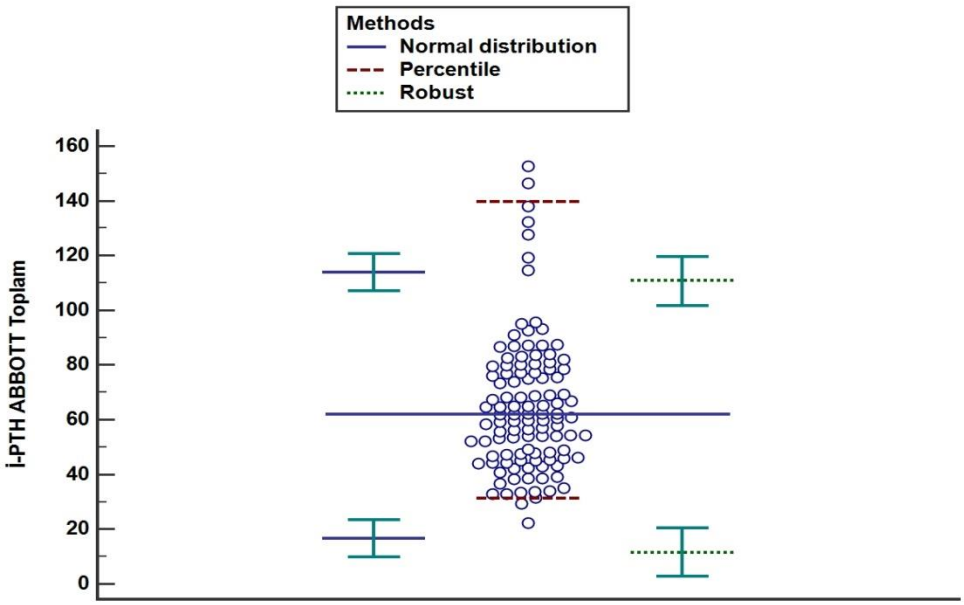
Şekil 14. 20 ≤ Vit D3 düzeyi < 30 ng/ml olan erkeklerde Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	65
Lowest – Highest value	32.90- 152.70
Mean - Median	63.61 – 59.70
Coefficient of Skewness	1.5113 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	3.1095 (P=0.0027)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.1094, accept Normality (P=0.0516)
Suspected outliers[a,b]	127.8138152.7
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	15.98 (7.352 to 24.615)
Upper limit (90% CI)	111.235 (102.604 to 119.866)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	32.965
Upper limit (90% CI)	143.145
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	9.884 (-2.101 to 22.272)
Upper limit (90% CI[a])	118.717 (95.556 to 120.473)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

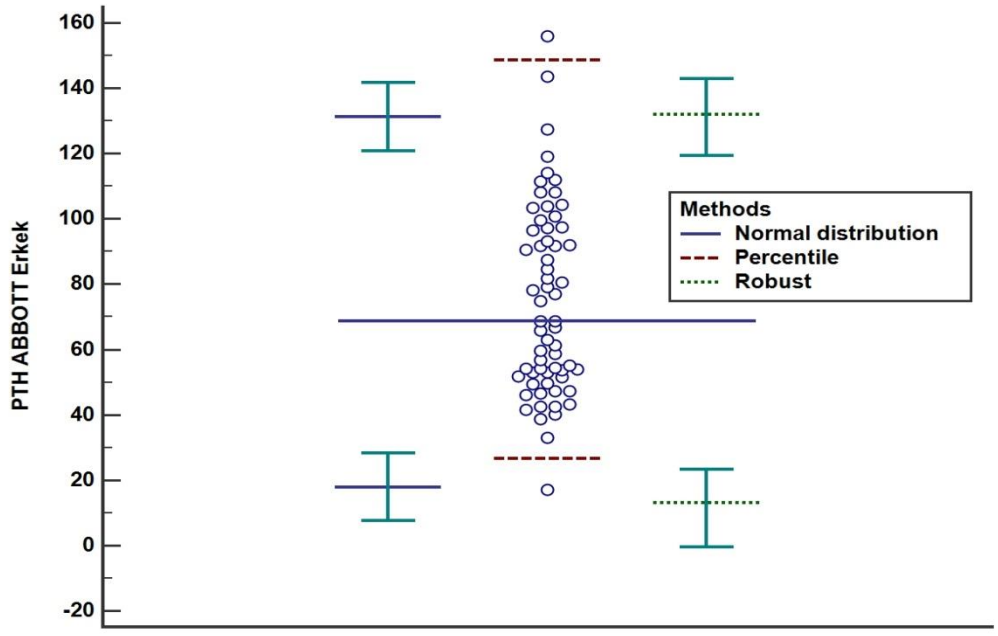
Şekil 15. 20≤ Vit D3 düzeyi <30 ng/ml olan kadınlarda Abbott İ-PTH referans aralık değeri.



Reference interval: ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	111
Lowest – Highest value	22.30- 152.70
Mean - Median	65.16 – 61.80
Coefficient of Skewness	1.2310 (P<0.0001)
Coefficient of Kurtosis	2.1210 (P=0.0036)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0913, reject Normality (P=0.0236)
Suspected outliers[a,b]	127.8132.4138146.5152.7
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	16.56(9.836 to 23.286)
Upper limit (90% CI)	113.75 (107.030 to 120.48)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	31.16
Upper limit (90% CI)	139.70
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	11.367(2.815 to 20.241)
Upper limit (90% CI[a])	110.86(101.71 to 119.624)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

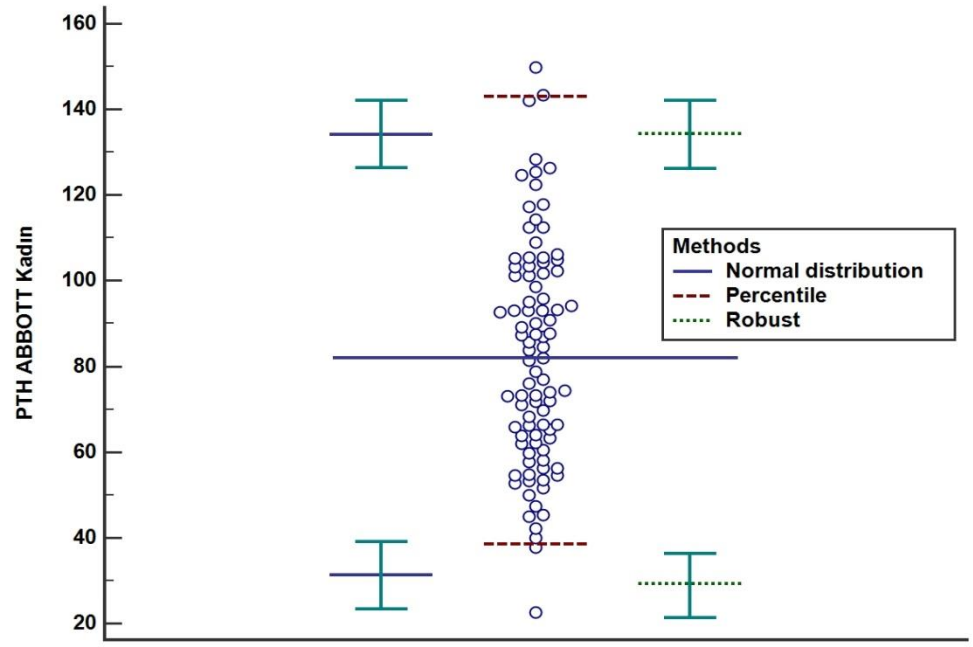
Şekil 16. 20≤ Vit D3 düzeyi <30 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	63
Lowest – Highest value	17.00- 156.00
Mean - Median	74.55 – 68.70
Coefficient of Skewness	0.5612 (P=0.0641)
Coefficient of Kurtosis	-0.1353 (P=0.9625)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.1305, reject Normality (P=0.0095)
Suspected outliers[a,b]	None
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	17.91(7.477 to 28.336)
Upper limit (90% CI)	131.198 (120.77 to 141.63)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	26.66
Upper limit (90% CI)	148.56
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	13.063(-0.5835 to 23.2864)
Upper limit (90% CI[a])	132.056(119.3170 to 142.8761)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

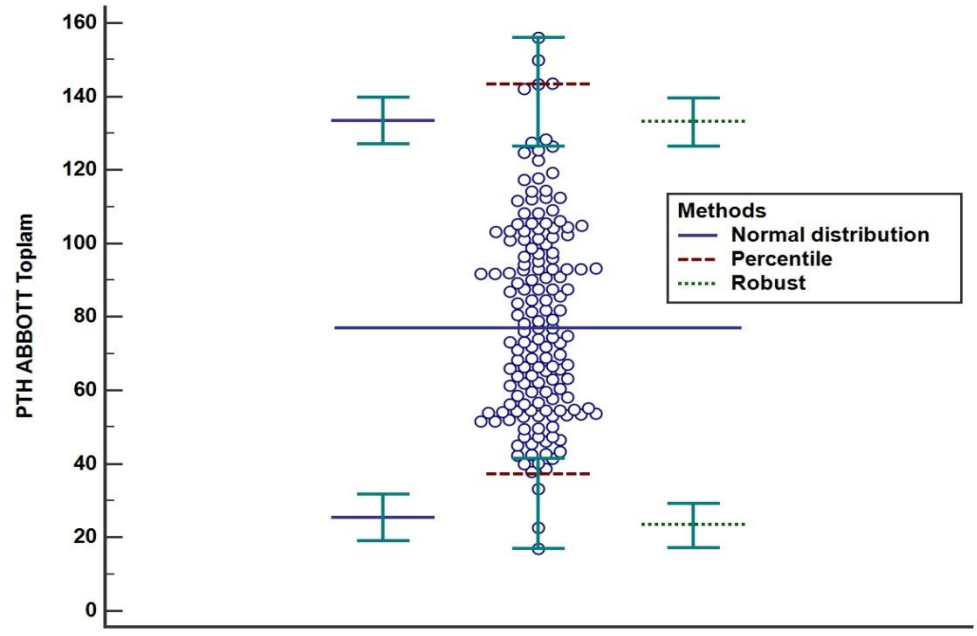
Şekil 17. Vit D3 düzeyi <20 ng/ml olan erkek olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	91
Lowest – Highest value	22.60- 149.80
Mean - Median	82.722 – 81.90
Coefficient of Skewness	0.2919 (P=0.2390)
Coefficient of Kurtosis	-0.3464 (P=0.5077)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0764, accept Normality (P>0.10)
Suspected outliers[a,b]	None
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	31.267(23.398 to 39.137)
Upper limit (90% CI)	134.177(126.308 to 142.047)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	38.4300
Upper limit (90% CI)	142.9400
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	29.205 (21.347 to 36.331)
Upper limit (90% CI[a])	134.25 (126.19 to 142.14)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

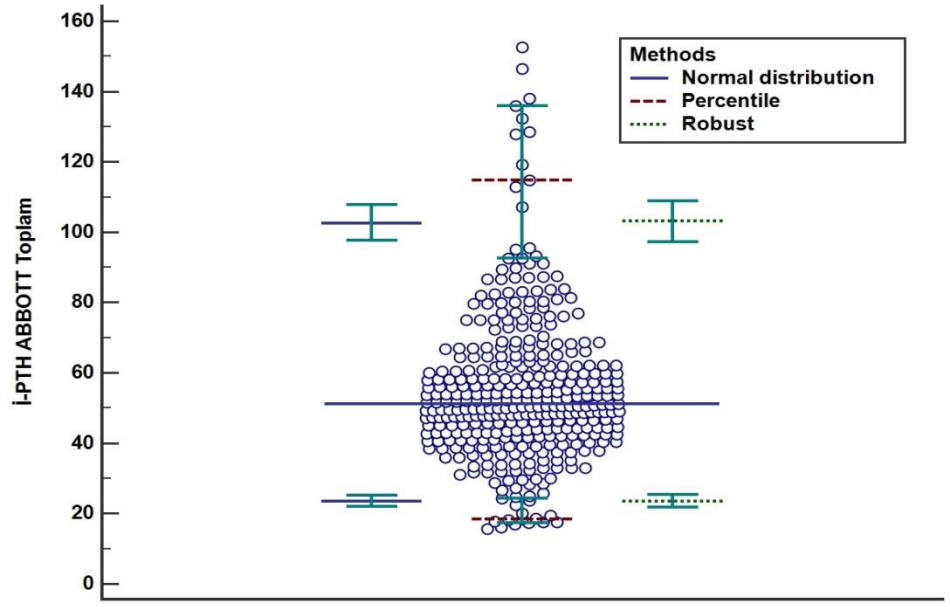
Şekil 18. Vit D3 düzeyi <20 ng/ml olan kadın olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	154
Lowest – Highest value	17.00 - 156.00
Mean - Median	79.38 – 76.95
Coefficient of Skewness	0.3622(P=0.0647)
Coefficient of Kurtosis	-0.3470(P=0.3488)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0772, reject Normality (P=0.0255)
Suspected outliers[a,b]	None
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	25.3420 (18.9986 to 31.6854)
Upper limit (90% CI)	133.4178 (127.0744 to 139.7612)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	37.21 (17.00 to 41.50)
Upper limit (90% CI)	143.34 (126.40 to 156.00)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	23.3732 (17.1408 to 29.1051)
Upper limit (90% CI[a])	133.1635 (126.3710 to 139.5441)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

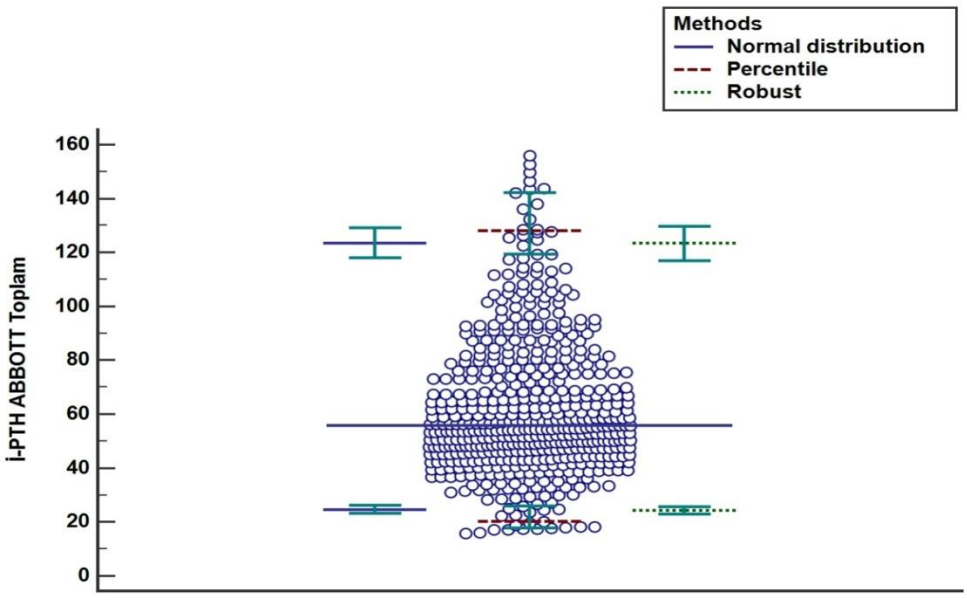
Şekil 19. Vit D3 düzeyi < 20 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değeri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	359
Lowest – Highest value	15.70- 152.70
Mean - Median	51.89– 51.20
Coefficient of Skewness	0.02457 (P=0.8470)
Coefficient of Kurtosis	1.2041 (P=0.0011)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0639, reject Normality (P=0.0012)
Suspected outliers[a,b]	15.7 16 17 17.3 17.5 17.6 17.8 18.1 18.3 18.7 19.5 20.1 22.3 107.2 112.97 114.7 119.3 127.8 128.6 132.4 136 138 146.5 152.7
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	23.56 (22.0572 to 25.1533)
Upper limit (90% CI)	102.60 (97.6790 to 107.7219)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	18.30 (17.30 to 24.40)
Upper limit (90% CI)	114.70 (92.60 to 136.00)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	23.50(21.87 to 25.35)
Upper limit (90% CI[a])	103.06(97.23 to 108.75)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

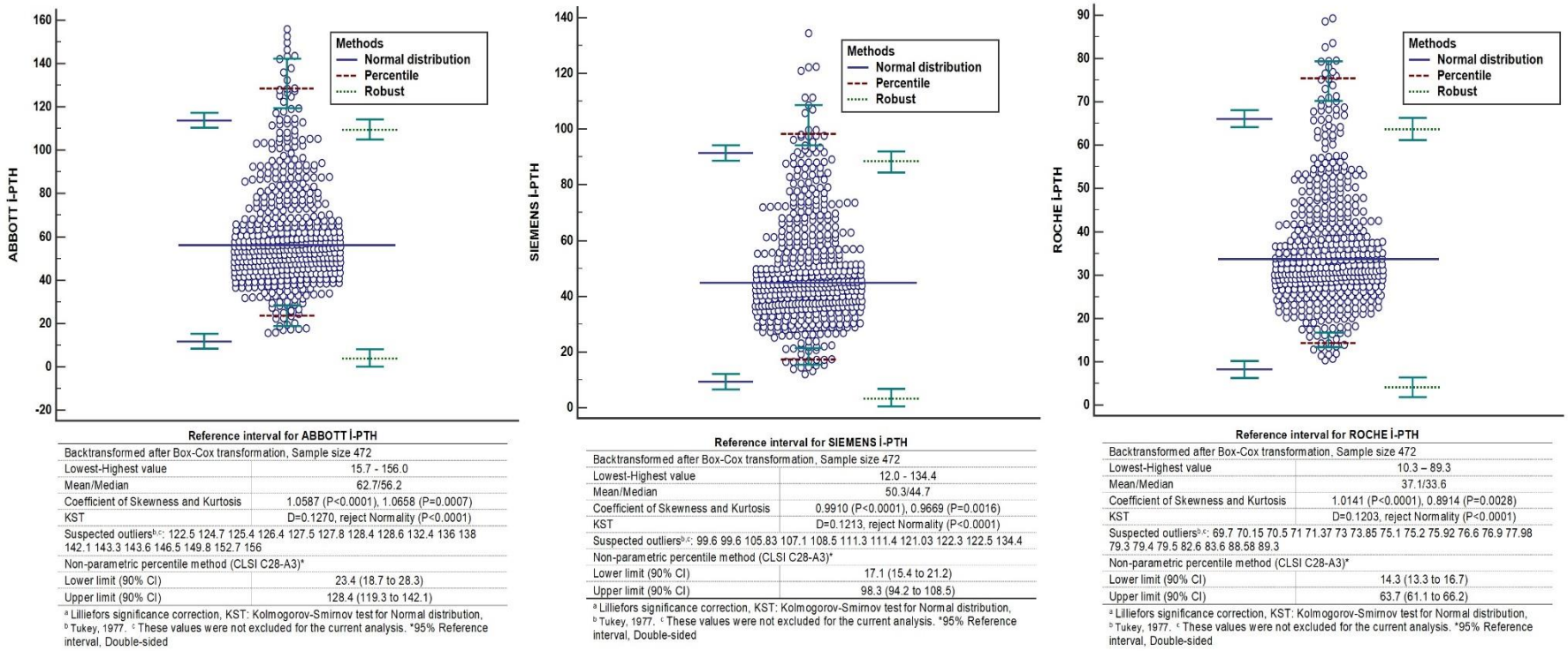
Şekil 20. Vit D3 düzeyi ≥20 ng/ml olan tüm olgularda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Reference interval:ABBOTT_İ_PTH pg/ml

Backtransformed after Box-Cox transformation.	
Sample size	513
Lowest – Highest value	15.70- 156.00
Mean - Median	58.08– 55.60
Coefficient of Skewness	0.001211 (P=0.9910)
Coefficient of Kurtosis	0.3342 (P=0.1426)
Kolmogorov-Smirnov test[a]	D=0.0600, reject Normality (P=0.0001)
Suspected outliers[a,b]	15.7 16 17 17 17.3 17.5 17.6 17.8 18.1 18.3 18.7 19.5 149.8 152.7 156
[a] Lilliefors significance correction,Tukey 1977, [b] These values were exluded fort he current analysis	
95% Reference interval, Double-sided	
A. Method based on Normal distribution	
Lower limit (90% CI)	24.49(23.065 to 25.992)
Upper limit (90% CI)	123.31(117.82 to 129.014)
B. Non-parametric percentile method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI)	20.00(17.6000 to 25.8000)
Upper limit (90% CI)	127.89 (119.2000 to 142.1000)
C. Robust method (CLSI C28-A3)	
Lower limit (90% CI[a])	24.09 (22.7084 to 25.5427)
Upper limit (90% CI[a])	123.34 (116.8913 to 129.5712)
[a] Bootstrap confidence interval (10000 iterations; random number seed: 978).	

Şekil 21. Tüm Vit D3 düzeyleri için olan tüm sağlıklı referans popülasyonda Abbott İ-PTH referans aralık değerleri.



Şekil 22. Vit D3 düzeyleri bağımsızolarak üç yöntemin referans aralıklarının karşılaştırılması. En geniş referans aralığının Abbott yöntemine ait olduğu görülmektedir.

5. TARTIŞMA

Tıbbi biyokimya laboratuvarlarında kullanılan referans aralık değerleri, tıbbi tanı ve tedavide karar verme sürecine katkıda bulunan ilgili testle ilişkili sağlıklı toplumdan elde edilen değer aralığıdır. Referans aralık, yalnızca sağlıklı bireyleri saptamak için değil, fizyolojik veya patofizyolojik belirli durumları tayin edebilmek için de kullanılır. Coğrafi koşullar, yaş, cinsiyet, etnisite gibi preanalitik faktörler, kullanılan analiz yöntemleri ve cihazlar gibi analitik şartlar, ürünlerin çeşitliliği ve laboratuvar uygulama farklılıkları gibi faktörler her laboratuvarın kendi referans aralıklarını oluşturmasını gerekli kılmaktadır. Buna rağmen çoğu laboratuvar, üretici firmanın belirlediği referans aralıkları kullanmaktadır. Üretici firmalar, ürünlerini dünyanın birçok farklı yerine pazarlamasına rağmen her ülke, bölge ya da laboratuvar için ayrı bir referans aralık belirlememektedir. Referans aralıklarının belirlendiği referans bireylerin etnik, genetik ve çevresel farklılıkları nedeniyle saptanan değerlerin farklı coğrafyalarda kullanılması uygun değildir (28). Özellikle bazı testler için bu durum daha da önem arz etmektedir. Referans aralık çalışması yaptığımız PTH için kullanılan ticari kitlerin ölçüm sonuçları arasında büyük farklılıklar olmasına karşın üreticilerin önerdiği referans aralıklar birbirine benzerdir (140). Bu durum, klinik laboratuvarların üretici firma tarafından belirlenen referans aralıklarının kullanımını engellemektedir. Farklı PTH ölçüm yöntemleri ile elde edilen PTH sonuçlarının KBH-MKB (Kronik böbrek hastalığı – mineral ve kemik bozuklukları) olan kişilerin takibi ve tedavisinde tanısal bir karmaşaya yol açabileceğinden PTH ölçümleri için uluslararası boyutta bir standardizasyonun sağlanması özellikle önem taşımaktadır (141). 2009 yılında Böbrek Hastalığı Kalite Girişimi Sonucu (The Kidney Disease Outcomes Quality Initiative, K/DOQI) tarafından yayınlanan klavuzda da yöntemler arasındaki farklılıklar göz önünde bulundurularak her sonucun kendi ölçüm yöntemi için belirlenmiş referans aralıklara göre değerlendirilmesi önerilmiştir (131). Yöntem farklılıklarının yanı sıra ırk, BMI, vitamin D düzeyi, GFR, yaş, serum Ca ve Mg düzeyi gibi parametreler de PTH düzeylerini etkilemektedir (142,143). Bu nedenle tüm faktörlerin göz önünde bulundurulduğu ve klinik ihtiyaca cevap verebilen bir PTH referans aralığı belirlenmelidir. Ayrıca ölçüm yöntemi aynı olsa da PTH'nin

ultradiyen, sirkadiyen ve mevsimsel değişkenliği de bireyler arası varyasyonu arttırmaktadır (144). Ölçüm yöntemleri arasında belirli bir standardizasyonun olmaması, yukarıda saydığımız birçok faktör, hasta takip ve tedavide PTH kullanımının etkinliğini azaltmaktadır (145-148). Bu nedenle PTH'ya benzer özelliklere sahip bir parametre için referans aralık belirlenecekse klinik ihtiyaçlar göz önünde bulundurularak referans aralık çalışması yapılmalıdır. Biz de kendi klinik kullanım ihtiyaçlarımıza göre PTH referans aralık çalışmasını bir referans popülasyon belirleyerek gerçekleştirdik.

Parathormon referans aralığının belirlenmesi için yürütülen çalışmanın ilk basamağında sağlıklı bir referans popülasyon elde etmek amacıyla çalışmaya dahil edilme ve dışlanma kriterleri belirlendi. PTH düzeylerine direkt veya indirekt olarak etki edebileceğinden gebelik, menopoz, kemik kırığı (132,133) gibi durumlar çalışmaya dahil edilmedi. 60 yaş üzeri bireyler, D vitamini etkilerinden ve böbrek fonksiyonlarından bağımsız olarak genç bireylere göre daha yüksek PTH düzeylerine sahip olduklarından (149), menopoz yaşının genellikle 45–55 (ortalama 50-51)yaş aralığında olmasından (150) ve osteoporoz riski de düşünülerek referans aralık çalışmasındaki üst yaş sınırı 50 olarak belirlendi.

Afrika kökenliler ve beyaz Amerikalı kadınlar arasında yapılan karşılaştırmalı bir çalışmada Afro-Amerikan kadınlarda daha düşük serum 25-OH Vit D3 ve daha yüksek serum İ-PTH saptanmıştır. Bu durum siyah kadınların daha düşük bir kemik turn-overlarına ve daha yüksek kemik dansitelerine sahip olmalarına bağlanmıştır (151). Ayrıca PTH'daki bu yüksekliğin bir diğer sebebi olarak, Afrika kökenli kadınların daha yüksek BMI'ya sahip olmaları gösterilmiştir. Birçok araştırmada obezite ile düşük 25-OH Vit D3 ve yüksek PTH ilişkisi bildirilmektedir (152-154). Bu çalışmada oluşturan referans popülasyonuna BMI değeri ≥30 kg/m2 olanlar (WHO'nun kabul ettiği obezite sınırı ≥ 30 kg/m2) çalışmaya dahil edilmedi. Bu sayede pre-obez durumdan kaynaklı nedenler hariç obezitenin, 25-OH Vit D3 düşüklüğü ve İ-PTH yüksekliğine olan etkisinin minimalize edildiğini düşünmekteyiz.

Aksini gösteren başka çalışmalar olmasına karşın birçok çalışmada, PTH'nin, EDTA'lı plazmada serumdan daha kararlı olduğu gösterilmiştir (82-84). Bizim yürüttüğümüz bu çalışmada ise Ca ve PTH analizleri aynı örnekle yapıldığından, çalışma için EDTA'lı örnekler tercih edilmedi. Ölçüm koşullarını standardize etmek

amacıyla referans popülasyonunu oluşturacak gönüllerden, 8-10 saatlik açlık sonrası kan vermeleri istendi. PTH'nin, nokturnal artış ile karakterize genel bir sirkadiyenritm ile salgılandığı bilindiğinden (96-99) kan alma işlemi sabah 08:00-10:00 saatleri arasında gerçekleştirildi. İ-PTH düzeylerini etkileyen bir diğer neden de kan alma saatidir. PTH'nin diurnal ritmi ile ilgili birçok çalışmada (99,155-157), PTH'de en çok sabahın erken saatlerinde (99,155,157) ve yaklaşık 10:00'da meydana gelen maksimum bir pik tanımlanmıştır.

Ca, P ve Mg için hastanemizin referans aralıkları sırasıyla8.4-10.2 mg/dl, 2.3-4.7 mg/dl ve 1.6 (18-20 yaş aralığı için 1.7) - 2.6 mg/dl'dir. Bu değerler referans popülasyonuna dahil edilme kriteri olarak seçilmiştir. Bu nedenle bu parametreler ile İ-PTH düzeyi arasında herhangi bir ilişki beklememiş olmamıza rağmen erkek olgularda Abbott İ-PTH ile serum P düzeyleri arasında düşük derecede ancak istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon saptandı (Spearman r= -0.1676, 95% CI: -0.2945 to -0.03491, P=0.0111). Yine Ca düzeyleri ile Abbott İ-PTH düzeyleri arasında da zayıf ama istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulundu. Ancak hem Ca hem P için r değeri 0.20'den küçük olduğu için bu ilişkinin rastlantısal olduğunu düşünmekteyiz.

25-OH VitD3 düzeyi 20 ng/ml'den düşük ise D vitamini eksikliği, 21 ile 29 ng/mL arasında ise D vitamini yetersizliği, 30 ng/ml'den yüksek ise yeterli düzey ve 150 ng/ml'den yüksek ise D vitamini intoksikasyonu olarak bildirilmektedir (158,159). Uzun zamandır D vitamini yetersizliğinin PTH sekresyonunda bir artışa yol açabileceği bilinmektedir (160). Ayrıca D vitamini yetersizliği (düşük serum 25-OH Vit D3 düzeyleri) genel popülasyonda oldukça sık görülmektedir (161). Hatta sağlıklı görünen kişilerde dahi eksikliği yaygındır. 25 OH Vit D3 ölçümlerinde, standardizasyon ve operatör değişkenliği konusunda da ciddi sorunlar olduğu belirtilmektedir (162). Bizim çalışmamızda da 25-OH Vit D3 ortalamasının, prospektüste belirtilenden farklı saptanması testin standardizasyonu ile ilgili sıkıntıların olabileceğinin bir göstergesidir. Bu standardizasyondaki problemler nedeniyle Uluslararası D vitamini Dış Kalite Değerlendirme Programı (International Vitamin D External Quality Assessment Scheme), farklı laboratuarlar arasında 25-OH Vit D3 analizlerini uyumlu hale getirme konusunda çaba sarf etmektedir (162). Öte yandan serum total 25-OH Vit D3 için normal aralıklar ile ilgili herhangi bir görüş birliği yoktur. ABD Tıp Enstitüsü, minimal 25-OH Vit D3 seviyesi olarak 52 nmol/l

(20.8 ng/ml), Endokrin Derneği ise minimum 78 nmol/l (31.2 ng/mL) düzeyini önermiştir (158,163,164). Bunun yanı sıra 25-OH Vit D3 ölçümü, laboratuvarlar arasındaki değişkenlikten fazla etkilenmektedir. Tek bir laboratuvar değeri gerçek değerden %20 sapma gösterebilir. Bu nedenle 35-40 ng/ml düzeyi terapötik hedef olarak önerilmektedir (165,166).

Yapılan çalışmalarda, düşük serum 25-OH Vit D3 düzeylerine sahip olguların referans popülasyona dahil edilmediğinde, serum PTH referans aralığının üst sınırının (ULN, upper normal limit) azaldığı görülmüştür (149,161). Ancak bazı çalışmalarda bu durum dikkate alınmayarak, farklı PTH ölçüm yöntemleri için serum PTH referans aralığı belirlenmiştir (167-169). Bizim çalışmamızda ise bu durum dikkate alındı. Çalışma sonucunda 25-OH Vit D3 düzeylerinin, serum PTH düzeyleri üzerine tek başına etkili olduğu görüldü. CMIA yöntemi ile üç farklı 25-OH Vit D3 düzeyinde, Abbott İ-PTH referans aralığının nasıl değiştiğini incelediğimizde; 25-OH Vit D3 düzeyleri <20 ng/ml, ≥ 20 ng/ml - < 30 ng/ml, ve ≥ 30 ng/ml olan olgular için İ-PTH referans aralıkları sırayla 37.21-143.34 pg/ml, 11.367-110.86 pg/ml ve 17.65-90.89 pg/ml olarak saptandı. Aynı cihaz ile Deckers ve ark. 55-65 yaş aralığında (398'i kadın toplam 738 sağlıklı gönüllüde) İ-PTH referans aralığını saptamaya çalışmışlardır. 25-OH Vit D3 düzeyi ≥20 ng/ml (50 nmol/l) olan olgular referans polpulasyon olarak seçildiğinde İ-PTH referans aralığını 25-105 pg/ml olarak saptamışlardır. Biz ise 25-OH Vit D3 düzeyi ≥20 ng/ml olan referans popülasyonu için daha geniş bir ABBOT İ-PTH referans aralığı (18.30 – 114.70 pg/ml) saptadık. Deckers ve ark. 25-OH Vit D3 düzeyinden bağımsız İ-PTH referans aralığını 26-114 pg/ml olarak saptamışlardır (170). Biz ise 25-OH Vit D3 düzeyinden bağımsız İ-PTH referans aralığını da daha geniş olarak (24.09 – 123.34 pg/ml) saptadık. Yine Deckers ve ark. benzer çalışmayı (18-65 yaş aralığında 633 sağlıklı gönüllü ile) Abbott cihazı ile yapmış ve 25-OH Vit D3 düzeyinden bağımsız olarak 20-101 pg/ml olarak belirledikleri İ-PTH referans aralığını, 25-OH Vit D3 ≥ 20 ng/ml olan populasyonda 19-89 pg/ml olarak bulmuşlardır (170). La'ulu ve Roberts, 252 sağlıklı gönüllüde Abbott cihazında serum PTH değerlerinin üst referans limitinin 88.5 pg/ml olduğunu ve 25-OH Vit D3 düzeyi 30 ng /ml'den daha büyük olan 133 gönüllüde daha düşük olarak 84.2 pg/ml olduğunu bulmuşlardır (171). Biz çalışmamızda ise 25-OH Vit D3'ün 30 ng/ml olduğu 248 gönüllüde İ-PTH üst sınırını 90.89 pg/ml olarak, daha yüksek bulduk.

Abbott cihazları dışında farklı cihazlar için de 25-OH Vit D3 düzeyine bağımlı ve bağımsız olarak İ-PTH referans aralık çalışmaları yapılmıştır (161,172,173). Bu çalışmalarda 25-OH Vit D3 düzeyi ile İ-PTH düzeyinin birbiriyle ters orantılı olarak değiştiği gösterilmiştir. Bu bulgu bizim çalışmamızla da uyumludur. Touvier M ve ark. 2014 yılında Roche Cobas cihazı (ECIA yöntemi) ile 25-OH Vit D3 düzeyinden bağımsız yaptıkları çalışmada, PTH için referans aralık değerini 14.3–50.8 pg/ml olarak bulmuşken, 25-OH Vit D3 ≥ 30 ng/ml (75nmol/l) olan olgular için bu değeri 13.3 – 45.3 pg/ml olarak bulmuşlardır (181). 2016 yılında Souberbielle ve ark. tarafından ICMA yöntemi ile LIAISON XL (DiaSorin, Stillwater, MN, USA) cihazı ile yaptıkları 25-OH Vit D3 düzeyi bağımsız bir çalışmada İ-PTH referans aralığını 10.1–37.9 pg/ml olarak, 25-OH Vit D3 ≥ 30 ng/ml olan olgularda ise 9.4 –28.9 pg/ml olarak saptamışlardır (169). Yine Souberbielle ve ark. LIAISON cihazı ile 25-OH Vit D3 düzeyi bağımsız İ-PTH referans aralık çalışması yapmış ve 3–80 pg/mL olarak belirledikleri İ-PTH referans aralığını 25-OH Vit D3 ≥ 20 ng/ml olduğunda 3–51 pg/mL olarak belirlemişlerdir (192). Li M ve ark. 2016 yılında Roche cihazı ile yaptıkları çalışmada 25-OH Vit D3 düzeyi bağımsız İ-PTH referans aralığını 8.8–70 pg/ml olarak ve 25-OH Vit D3 düzeyi ≥30 ng/ml olan grupta ise 7.5–60.7 pg/ml olarak belirlemişlerdir (173).

Serum 25-OH Vit D3 ve PTH düzeyleri arasındaki ters ilişkinin hangi düzeylerde nasıl değiştiği araştırılmış ve bu değişimin plato değerine hangi 25-OH Vit D3 düzeylerinde ulaştığı incelenmiştir. Bu bağlamda bazı çalışmalar PTH'nin maksimum supresyonunu elde etmek için 20 - 32 ng/ml (50-80 nmol/l) arasında bir serum 25-OH Vit D3 seviyesine ihtiyaç duyulduğunu, bazıları ise 12 - 20 ng/ml (30-50 nmol/l) arasındaki seviyeyi tanımladığını göstermiştir (174). Bir çalışmada ise serum PTH düzeyinin ergenlik dönemindeki Amerikalı beyaz kızlarda D vitamini düzeyi ile ters ilişkili olduğu ancak siyah ergen Amerikalı kızlarda ise bu ilişkinin olmadığı belirtilmiştir (175). Hill ve ark. tarafından yapılan yakın tarihli bir çalışmada, İrlandalı kızlarda 24 ng/ml ‘lik (60 nmol/l) bir 25-OH Vit D3 düzeylerinde PTH'de bir plato gözlenirken, erkeklerde PTH düzeylerinde hiçbir plato gözlenmediği gösterilmiştir (176). PTH seviyelerinin hangi 25-OHVit D3 seviyesinde stabil bir platoya ulaştığı ve bu değerin 25-OH Vit D3 için klinik karar eşiği olduğu ile ilgili bir çalışma Muhittin A. Serdar ve ark. tarafından 2017 yılında yapılmıştır. Bu çalışmaya

göre 25-OH Vit D3 düzeyi 75nmol/ml'ye ulaştığında PTH düzeyleri 25-OH Vit D3 düzeylerinden etkilenmediği belirtilmiştir (177). Holick MF ve ark. da serum 25 (OH) Vit D3 değerleri 78 nmol / l'den (31 ng / ml) daha yüksek olduğu sürece serum İ-PTH düzeyinin sabit bir düzlük seviyesinde tutulduğunu ancak serum 25-OHVit D3 değeri bunun seviyenin altına düştüğünde serum İ-PTH düzeyinin arttığını ileri sürmüşlerdir (178). 2011 yılında Endokrin Derneği tarafından yayınlanan klavuzda da, D vitamininin, kalsiyum, kemik ve kas metabolizması üzerindeki etkilerinin maksimuma çıkarılması için gerekli 25-OH Vit D3 düzeyinin>75 nmol/l olduğu belirtilmiştir (158). Biz de önceki birçok çalışmada sınır olarak kabul edilmiş 75 nmol/l'nin PTH referans aralık değerleri belirlenirken sınır değer olarak kullanılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Etnik köken ve cinsiyetin, PTH ve D vitamini arasındaki ilişkide belirleyici bir rol oynayabileceği bildirilmiştir. Çalışmalar arasında gözlenebilen farklılıkların da etnik köken ve cinsiyet kaynaklı olabileceği düşünülmektedir. Yine bu ilişkiyi etkileyebilecek diğer etkiler arasında yaşlanma, BMI, kalsiyum alımı ve emilim, cinsiyet steroid düzeyleri ve böbrek fonksiyonu gibi D vitamini ve / veya PTH seviyelerini etkileyen faktörler de yer alabilmektedir (176,179-182). Ayrıca serum PTH düzeyinde yaşla ilişkili artışın % 25 ile % 30 arasında olduğu bildirilmiştir. Bunun muhtemel nedeni, yaşla ilişkili kalsiyum emiliminde (203) ve böbrek fonksiyonlarındaki azalmaya bağlanmıştır (180). Ayrıca 25-OH Vit D3 düzeyini ölçmek için farklı analiz yöntemlerinin kullanılması da çalışmalar arasındaki tutarsızlıklara neden olabilir. 25-OH Vit D3 ölçümü için altın standart yöntem sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi (LC-MS/MS, tandem mass spectrometry) olup, bunun dışında kullanılan yöntemler LC-MS/MS ölçümünden daha düşük bir sonuç verirler (184).

Yakın bir geçmişte hem PTH hem de D vitamini düzeylerinin bozulmuş böbrek fonksiyonundan etkilendiği ve KBH ve metabolik sendrom olan kişilerde daha düşük 25-OH Vit D3 düzeylerinin daha sık görülebileceği bildirilmiştir (185,186). Böbrek fonksiyonu azaldığında, kanda P birikimi ve kan Ca^{+2} seviyelerinde azalma meydana gelebilmektedir. Böyle bir durumda PTH artarak kandaki Ca^{+2} düzeylerini normal tutmaktır. Düşük Ca^{+2} seviyelerine cevap olarak artan PTH, kalsiyum iyonunu kemiklerden dışarı çıkarır ve zamanla, daha fazla Ca^{+2} kemikleri terk eder. Sonunda

kemikler kırılgan hale dönüşür. Özetlenecek olursa hiperparatiroidizm, bozulmuş böbrek fonksiyonunun en erken belirtilerinden biridir (187).SHPT, KBH seyrinde erken gelişme gösteren ve glomerüler filtrasyon hızı bozulduğunda şiddetli bir artış gösteren sinsi bir hastalıktır. eGFR, MDRD veya CKDepi formülü ile değerlendirilir ve bazı hastalarda 60 ml/dk/1.73m$^{2'}$nin altındaki eGFR değerinin PTH düzeyini yükseltebileceği genellikle kabul edildiğinden (131) referans popülasyonuna eGFR≥ 60 mL/dk/1.73m^2 olan olgular dahil edildi. Ayrıca Brown ve ark. 2014 yılında yaptıkları çalışmada hiperaldosteronizimi olmayan bireylerde renin anjiotensin aldosteron sistemi (RAAS) bileşenleri ile PTH'ninregülasyonu arasında yeni bir pleiotropik ilişki bulmuşlardır (188). PTH'nin RAAS ile akut modülasyonun anjiotensin 2 ile düzenlendiği düşünülmüştür. Ancak uzun dönemde RAAS'ın PTH üzerine etkisi aldosteronun varlığını gerektirebileceği bildirilmiştir. Buna benzer şekilde yine Brown ve ark. 2015 yılında yaptıkları bir çalışmada yüksek serum aldosteron düzeylerinin yüksek serum PTH düzeyleri arasında bir ilişki bulunmuştur. Ayrıca RAAS inhibitörlerinin kullanımının düşük PTH düzeyleri ile de ilişkili olduğu saptanmıştır (189). RAAS, böbrek fonksiyonları ile yakın ilişki gösterdiği bilinmektedir. Çünkü renin-anjiyotensin sisteminin bir parçası olan anjiyotensin 1 böbrek tarafından salgılanan renin sistemi ile sentezlenir. Daha sonra anjiyotensin 1, akciğerde anjiotensin 2'ye dönüşerek kan basıncınındüzenlenmesindegörev almaktadır (190,191). Bizim yaptığımız referans aralık çalışmamızda PTH'nin yukarıda bildirilen renal fonksiyon kaynaklı etkilerinden arındırmak için GFR>60 ml/dk/1.73 m2 olan sağlıklı kişiler referans popülasyon olarak seçildi. Bundan dolayı RAAS sisteminin PTH düzeyleri üzerine olan etkileri gözlemlenmedi.

25-OH Vit D3 düzeyi kadınlarda daha düşük olduğu bildirilmesine rağmen (192), Arabi ve ark. 2010 yılında yaptıkları çalışmada, 25-OH Vit D3 ve PTH arasındaki negatif ilişkinin cinsiyeten bağımsız yaşla modüle edildiğini belirtmişlerdir (193).Ancak bizim yaptığımız çalışmada yaş ve İ-PTH arasında bir ilişki saptanmadı. Bunun muhtemel sebebi, referans popülasyon için yaşa bağlı etkiden daha az etkilenebilecek bir yaş aralığının seçilmiş olmasıdır.

Susan T. Haden ve ark. da 2000 yılında yaptıkları çalışmada cinsiyetin İ-PTH seviyeleri üzerindeki etkisinin belirgin olmadığını bulmuşlardır (194). Bizim çalışmamızda da 25-OH Vit D3'ün her üç düzeyi için de cinsiyetin, İ-PTH referans

düzeyleri üzerinde anlamlı bir etkiye neden olmadığı saptanmıştır. Bu bulgumuzun aksine bazı çalışmalarda erkeklerin kadınlara göre 25-OH Vit D3 düzeyinin daha yüksek ve PTH'nin daha düşük olduğunu gösterilmiştir (183,194).Bu bulgu yapılan diğer pek çok çalışma (196-198) ve bizim çalışmamızla da uyumlu değildir.

Abbott cihazında 25-OH Vit D3 düzeyi 30 ng/ml'nin üzerinde olan olgular için yapılan referans aralığı çalışmaları için Cavalier ve ark. yaşları 20 ila 79 arasında değişen 240 gönüllü için İ-PTH referans aralığını 16.3–64.7 pg/mL olarak belirlemişler. La'ulu ve ark. 2010 yılında yaş aralıkları 19-65 arasında değişen popülasyon üzerinde yaptıkları çalışmada ise bu aralığı 18.1-74.7 pg/ml olarak belirtmişlerdir. Bizim çalışmamızda ise 18-50 yaş aralığı için İ-PTH referans aralığı 17.65 - 90.89 idi. Aynı yöntemle çalışılan İ-PTH düzeylerinin farklı olmasının çeşitli nedenleri vardır. Bu çalışmaların bizimkinden farklı olmasının nedenleri, seçilen popülasyonun yaş aralığının bizimkinden farklı olması ve mevsimsel farklılıklarolabilir. La'ulu ve ark. da yaptıkları çalışmada serum değil EDTA'lı plazma kullanmışlardır. EDTA'lı plazma örneklerinde ölçülen İ-PTH düzeyinin serumda ölçülenden daha düşük bulunduğu (199-201)ve serumda ölçülen PTH düzeyleri ile EDTA'lı plazma örnekleri arasında % 20-25'e varan farklar bazı analizlerle bildirilmiştir(199,202).Muhtemelen EDTA nedenli bu durum, La'ulu ve ark. ile bizim çalışma sonuçlarımız arasındaki farkın bir diğer sebebi olabilir. Bunun teyidi için daha geniş kapsamlı EDTA'lı ve serum örneklerinin birlikte kıyaslandığı geniş kapsamlı bir çalışma yapılmalıdır.

La'ulu ve ark. 2010 yılında aynı popülasyonda 6 farklı immun yöntem ile İ-PTH'nin referans değerlerini incelemişlerdir. Tüm D vitamini düzeyleri içinAbbott, Siemens ve Roche cihazları için İ-PTH referans aralıklarını sırasıyla 18.1–88.5 pg/ml, 11.0–70.6 ve 17.3–73.5 olarak bulmuşlardır (171).Cavalier ve ark. ise aynı referans grubunda10 farklı cihazda İ-PTH referans aralık çalışması yapmışlardır. Abbott ve Roche cihazları için İ-PTH referans aralıklarını sırasıyla 16.3–64.7 pg/mL ve 13.7–50.2 pg/mL olarak bulmuşlardır. Çalışmamızda ise 3 farklı cihaz için İ-PTH referans aralık değerlerini Abbott, Siemens ve Roche cihazları için sırasıyla 23.43-128.44, 17.14-98.28 ve 14.31-75.33 olarak belirledik. Her iki çalışmaya benzer şekilde bizim de çalışmamız da Abbott İ-PTH sonuçları Roche İ-PTH düzeylerinden daha yüksek bulunmuştur. Ancak La'ulu ve ark. Siemens ve Roche cihazlarının İ-PTH referans

aralığının üst limitleri arasında belirgin bir fark bulmamışlardır. Ancak ortalamalar açısından bizim çalışmamızda her üç yöntem arasında fark varken onların çalışmalarında bu durum hakkında net bir bilgi verilmemiştir.Ayrıca çalışmamızda da üç farklı cihaz/yöntem kullanılarak elde edilen İ-PTH düzeyleri arasındaki ilişki türünü saptayabilmek amacıyla uyguladığımız Spearman korelasyon analizinde, korelasyonun %95'ten büyük olduğunu ancak ortalama ve ortancalar arasındaki farkın istatistiksel olarak oldukça büyük olduğunu saptadık. Farklı çalışmaların İ-PTH analizleri karşılaştırıldığında ortak olan bulgu, farklı yöntemlerle elde edilen İ-PTH düzeylerinin genellikle yüksek korelasyon bulunmasına rağmen, ortalamalar arasındaki farkın büyük olduğu ve bu nedenle mutlak uyumun olmadığıdır. Bu durum çeşitli ikinci kuşak PTH analizlerinin, (7–84) PTH ve diğer N-kesik parçacıklarla farklı çapraz reaksiyon (% 50-100) göstermesine bağlı olabilir (71,156). Cantor ve ark. tarafından PTH için farklı duyarlılıkta antikor kullanılarak yapılan yöntemsel karşılaştırmalarda faklı sonuçların elde edilmiştir(145).Her bir üretici tarafından üretilen antikorun PTH'a afinitesinin farklı olması, farklı PTH ölçümlerinin elde edilmesine neden olacaktır. Bu da yine sonuçlar arasında mutlak uyumun olmamasına neden olur. Yakın bir zamanda PTH ölçüm yöntemleri arasında % - 45' ten % 123'e varan bias kaynaklı bir farkın olduğu gösterilmiştir (146).Bir başka çalışmada ise ölçüm yöntemleri arasında 4.2 kata varan farklılıklar olduğu gösterilmiştir (147).Bu da yöntemler arasındaki mutlak uyumu saptayamamızı desteklemektedir.

Dolaşımda, İ-PTH olarak adlandırılan amino asit sekansı 1–84 olan PTH molekülü yanı sıra N-terminali kesilmiş PTH parçacıkları (202), C-terminal parçacıkları (203) ve son zamanlarda keşfedilen ve amino-PTH (N-PTH) olarak da adlandırılan bir PTH türü (81) çeşitli oranlarda bulunabilir. PTH test yöntemlerinin bu parçacıklara karşı hassasiyetinin farklı olması nedeniyle yöntemler arasıuyumsuzlukların diğer bir nedeni de, PTH'nintest standardizasyonun eksikliği ile ilgilidir (204). WHO 79/500, saflaştırılmış insan PTH ile 1981'de hazırlanmıştır (205).Ancak birçok PTH testibu standarda göre kalibre edilmemiştir. Aslında, PTH immüno analiz testleri genellikle çeşitli kökenlerin sentetik (1–84) PTH' sine karşı kalibre edilmektedir. Ancak halen sentetik PTH'den yapılmış uluslararası düzeyde bir standart mevcut değildir. Zaten böyle bir standart mevcut olsa bile belirli bir hacimde farklı seyrelticiler içinde seyreltilmiş belirli bir miktarda analitin ölçülen düzeyinin

üzerine (protein düzeyi, pH, iyonik bileşim…) etkisini ifade eden olası bir matriks etkisindendolayı yeniden kalibre edilmelidir. Ayrıcasentetik PTH'nin uzun saklama sürelerinde kararsızlığı nedeniyle de yeniden kalibrasyon gerekebilir. Yöntemler arası farklılığı gidermek için tüm PTH testleri aynı uluslararası standartlarla standardize edilse bile, özgül antikorlardan dolayı yine de her analiz yöntemi aynı serum İ-PTH düzeyini sağlayamaz (206,207).

Sağlıklı popülasyonlarda yapılan prospektif çalışmalara yönelik birçok meta-analizde, artmış PTH düzeylerinin yüksek kardiyovasküler risk (208) ve mortalite ile ilişkili olduğu bildirilmiştir (209). 2011 yılında yapılan bir çalışmada yüksek PTH düzeylerinin kardiyovasküler hastalıklar ve mortalite bakımından bağımsız bir risk faktörü olduğu gösterilmiştir (210). Aynı yıl yapılan başka bir çalışmada yine yüksek serum PTH düzeylerinin kararlı koroner kalp hastalarında bağımsız bir prognostik faktör olduğu bildirilmiştir (211). Bu durum PTH için referans aralık değerlerinin saptanması konusundaki gerekliliği haklı kılmaktadır.

Diğer tüm immünolojik testlerde olduğu gibi, PTH tayini de heterofilik antikor etkileşimlerine açıktır. Bu heterofilik antikor etkileşimi genelde pozitif yönde interferanslara neden olabilmektedir. Yani hayvan proteinlerine karşı hedeflenen immünoglobülinlerin serum veya plazmadaki diğer antikorlarla etkileşimlerinden dolayı, çalışılan parametrenin yanlış yüksek/düşük seviyelerine yol açabilmektedir. Bu interferansların, önemli tanısal hatalara yol açabileceği ve insan anti-keçi veya anti-fare antikorları olan hastaların PTH sonuçlarında büyük farklılıklar olabileceği gösterilmiştir (212-214). Muhtemelen bizim çalışmamızda değerlendirmeye aldığımız üç farklı yöntem, bu heterofilik etkileşimden farklı düzeylerde etkilenmiştir. Ancak bu etkinin düzeyi bu aşamada belirlemek mümkün değildir.

Çalışmamızın güçlü yönleri, popülasyona dayalı referans aralık çalışması yapılması, PTH konsantrasyonlarını etkileyen 25-OH Vit D3 düzeyine göre farklı referans aralıkları belirlenmesi ve cinsiyet, yaş, obezite, GFR, Mg, Ca ve P düzeylerinin tümünün dikkate alınmasıdır. Çalışmamızda bazı sınırlamalar olduğu da kabul edilmelidir. İlk olarak, bu çalışma sadece İstanbul'da ve özellikle kendi hastane popülasyonumuzda, 18-50 yaş aralığındaki gönüllüler ile yapılmıştır. Bu nedenle, diğer etnik gruplarda ve daha genç ve yaşlı yetişkinlerde aynı yönleri araştırmak için ek çalışmalara ihtiyaç vardır. İkinci olarak, örneklemin zamanlaması ve gönüllülerin

açlık/tokluk durumu PTH düzeylerini etkilediğinden PTH testi için preanalitik gereksinimler hakkında açık bir fikir birliği, bir uzman panel tarafından netleştirilmelidir. Son olarak, bu çalışmadaki 25-OH Vit D3 düzeyini saptamak için kullandığımız yöntem olan CMIA yöntemi referans yöntem olmayıp (altın standart LC-MS/MS) ileriki dönemde yapılacak çalışmalarda referans yöntem ile sonuçlar teyit edilebilir.

6. SONUÇLAR

PTH ölçümü kalsiyum / fosfor metabolizma bozukluklarının doğru teşhisi ve KBY'li hastaların bakımı içinrutin klinik uygulamada çok sık kullanılmasına rağmen PTH düzeyi için belirlenen referans değerler her laboratuvar için önemli ölçüde farklılık göstermektedir.

Yaptığımız çalışmada kendi popülasyonumuzda, klinik ihtiyaçlarımızı göz önnde bulundurarak Abbott İ-PTH referans aralığını belirledik. D vitamini parathormon düzeyini etkilediği için İ-PTH referans aralık çalışmasını farklı 25-OH Vit D düzeylerine göre de belirledik. Sonuçta İ-PTH referans aralılarının mutlaka 25-OH Vit D3 düzeyi göz önünde bulundurularak raporlanması gerektiği sonucuna ulaşıldı.

Referans aralık değerlerimizin farklı çıkmasına Ca ve Vit D düzeyleri dışında mevsimsel, bölgesel, ırksal ve yöntemsel farklılıkların sebep olduğunu düşünmekteyiz. Referans aralığını belirlemeye çalıştığımız Abbott İ-PTH düzeyleri ile Siemens ve Roche İ-PTH düzeyleri arasında yüksek korelasyonbulunmakla beraber ortalamalar arasında belirgin farklar gözlendi. Çalışmamızda kullandığımız yöntemler arasında mutlak uyum yoktu.

Yaptığımız çalışma her laboratuvarın kendi referans aralığını belirlemesi gerektiğini göstermiştir. Özellikle hali hazırda kullanılan referans aralığın ölçüldüğü yöntemle mutlak uyum göstermeyen testler için bu durum zorunludur. Ayrıca birey içi ve bireyler arası biyolojik varyasyonları yüksek olan PTH gibi testlerin sağlıklı kullanımı klinik ihtiyaca göre referans aralık belirlemekle mümkündür.

7. KAYNAKLAR

1. World Health Organization. The constitution of the WHO. WHO Chronicle 1947; 1: 29.

2. Tietz, W. Establishment and use of Reference Values. In Textbook of Clinical Chemistry. WB Saunders Company in Philadelphia. 2nd edition pp 454-485.

3. International Federation of Clinical Chemistry and International Committee for Standardization in Hematology: Approved Recommendation on the theory of reference values. Part 5 Statistical treatment of the calculated reference values. Determination of reference limits. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1987; 25:645-656.

4. NCCLS Document C 28-a Vol.17 No:18.

5. Murphy E. The normal and the perils of the sylleptic argument. Perspectives in Biology and Medicine, 1972, 15: 566-82.

6. Taga Y,Aslan D,Güner G, Kutay Z.F. Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve KaliteYönetimi. 124-137.

7. Elveback L, Guillier C, Keating F. Health normality and the ghost of Gauss. The Journal of the American Medical Association, 1970, 211: 69-75.

8. Balcı Y. Laboratuvar Hasta Verileri Kullanılarak Biyokimya Testlerinde Referans Aralıkları Belirlenmesi. Klinik Biyokimya Bölümü. İstanbul: Dr. Lütfi Kırdar Eğitim Ve Araştırma Hastanesi, 2006.

9. Toprakçı M. Hastane Laboratuvar Test Verileri Kullanılarak Klinik Testlerin Referans Aralıklarının Saptanması. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, İstanbul: Marmara Üniversitesi, 2000.

10. NCCLS Document C 28-a2 Vol.20 No:13.

11. International Federation of Clinical Chemistry and International Committee for Standardization in hematology: Approved Recommendation (1986) on the theory of reference values. Part I. The concept of reference values. J. Clin. Chem. Clin. Biochem. 1987; 25:337-342.

12. White, J.D. Clin. Chem. Akta. 1978; 84:353-360.

13. Solberg, H.E, Grasberck, R., Reference values. Adv. Clin. Chem. 1989; 27:1-79.

14. Solberg HE. Using A Hospitalized Population To Establish Reference İntervals: Pros and Cons. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1994, 40: 2205-206.

15. Horowitz G. Establishment and use of Reference Values. In: Carl A. Burtis , Edward R. Ashwood , David E. Bruns (eds). Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 5nd ed. New York, Elsevier Science 2012:95-118.

16. Enli Y. Denizli'de Yaşayan 18-40 Yaş Arası Bireylerde Farklı Yöntemlerle Referans Aralıkların Saptanması. Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı. Uzmanlık Tezi, Denizli: Pamukkale Üniversitesi, 2001.

17. İlçöl YÖ, Aslan D. Bursa İli'nde Sağlıklı Bireylerde Kan Biyokimyası Profili Referans Aralıklarının Saptanması. Turkish Journal of Biochemistry, 2004, 29: 183-192.

18. Aslan D. Referans Aralıkların Hesaplanması Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi Değerlendirilmesi ve Laboratuvara Uygulanması Kurs Kitabı. 1. Baskı. Ankara, Türk Biyokimya Derneği, 2000: 80-119.

19. Kalafat H. Klinik Biyokimya Testlerinin Mersin İli'ndeki Referans Aralıklarının Endirekt Yöntemle Belirlenmesi. Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı. Mersin: Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi 2008.

20. Kutay F. Laboratuvar Verilerinin İstatistiksel Değerlendirmesi. İçinde: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay F, (editörler) Tıbbi Laboratuvarlarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi Kitabı İstanbul, Palme Yayıncılık, 2004:53-70.

21. Kairisto V, Poola A. Software For İllustrative Presentation Of Basic Clinical Characteristics Of Laboratory Test, Graphroc For Windows. Scandinavian Journal Of Clinical And Laboratory İnvestigation, 1995, 222: 43-60.

22. Solberg HE. Establishment and use of refernce values. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics 4th ed. St. Louis: Saunders, 2006:425-448.

23. Statland B, Winkel P. Effects Of Preanalytical Factors On The İntraindividual Variation Of Analytes İn The Blood Of Healthy Subjects. Consideration Of The Subject And The Time Of Venipuncture. Clinical Laboratory Science, 1977, 8: 105-144.

24. Aslan D. Referans Değerlerin belirlenmesi ve Kullanılması. İçinde: Solberg H, (editor) Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. 5 Baskı. Ankara, Palme Yayıncılık, 2005: 251-261.

25. Solberg HE, Stamm D. IFCC recommendation: Expert Panel on Theory of Reference Values. Approved recommendation on the theory of reference values. Part1. The concept of reference values. Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry, 1987, 25:337-42.

26. Lot J, Mitchell L. Estimation Of Reference Ranges: How Many Subjects Are Needed? Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1992, 38: 648-650.

27. Ferré-Masferrer M, Fuentes-Arderiu X, Puchal-Ané R. Indirect Reference Limits Estimated From Patients' Results By Three Mathematical Procedures. Clinica Chimica Acta, 1999, 279: 97-105.

28. Laleli Y. Referans Kavramı, Ulusal Referans Politikası ve Hasta Verilerinin Kullanımı. Turkish Journal of Biochemistry, 2003, 28: 225-227.

29. Bircan H, Karagöz Y, Kasapoğlu Y. Ki-Kare ve Kolmogorov Smirnov Uygunluk Testlerinin Simulasyon İle Elde Edilen Veriler Üzerinde Karşılaştırılması. Cumhuriyet Üniv. İktisadi ve İdari Bilimler Dergisi, 2003, 4.

30. Remington RD. Statistical With Applications İn The Biological And Health Sciences. 1nd ed. New Jersey, Prentice Hall, 1970:418.

31. Linnet K. Two Stage Transformation Systems For Normaization Of Reference Distributions Evaluated. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1987, 33: 381-386.

32. Wilk S. Statistical Prediction With Special Reference To The Problem Of Tolerance Limits. The Annals of Mathematical Statistics, 1941, 13: 400. 52.

33. Bhattacharya CG. A simple method of resolution of a distribution into Gaussian components. Journal of Biometrics, 1967, 25(1): 115-135.

34. Somerville P. Tables For Obtaining Non-Parametric Tolerance Limits. The Annals of Mathematical Statistics, 1958, 29: 599.

35. Baadenhuijsen H, Smit J. Indirect Estimation Of Clinical Chemical Reference Intervals From Total Hospital Patient Data: Application Of A Modified Bhattacharya Procedure. Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry, 1985, 23: 829-839.

36. Kairisto V, Hanninen K, Leino A, Pulkki K, Peltola O, Nantö V, Pulkki L, Irjala K. Generation Of Reference Values For Cardiac Enzymes From Hospital Admission Laboratory Data. European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry, 1994, 32: 789-796.

37. Kouri T, Kairisto V, Virtanen A, Uusipaikka E, Rajamaki A, Finneman H, Juva K, Koivula T, Nantö V. Reference Intervals Developed From Data For Hospitalized Patients: Computerized Method Based On Combination Of Laboratory And Diagnostic Data. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 1994, 40: 2209-2215.

38. Serdar M, Sertoglu E, Uyanik M, Tapan S, Akin K, Bilgi C, Kurt I. Comparison of 8-hydroxy-2 ′-deoxyguanosine (8-OHdG) levels using mass spectrometer and urine albumin creatinine ratio as a predictor of development of diabetic nephropathy. Free Radical Research, 2012, 46: 1291-1295.

39. Ichihara K, Itoh Y, Lam CW, Poon PM, Kim JH, Kyono H, Chandrawening N, Muliaty D. Sources of variation of commonly measured serum analytes in 6 Asian cities and consideration of common reference intervals. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2008, 54: 356-65.

40. Ozarda Y, Ichihara K, Barth JH, Klee G. and on behalf of the CRIDL on Reference intervals and Decision Limits. IFCC, Protocol and standart operating procedures for common use in wordwide multicenter study on reference values. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 2013, 51 (5):1027-40.

41. Wolfe HJ. The anatomy of the parathyroids. In: DeGroot LJ, ed. Endocrinology,2nd ed, Vol. 2. Philadelphia: WB Saunders, 1989:844-847.

42. Kaplan, L: Pesce, A. Clinical Chemistry: Theory, Analysis, and Correlation, 2rd ed.; Mosby, Inc.: St. Louis, MO, USA, 1984; p. 807.

43. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics (4 th ed), Saunders Elsevier. USA 2006; 1920-1940.

44. Potts JT Jr, Bringhurst FR, Gardella T, Nussbaum SR, Segre GV, Kronenberg HM. Parathyroid hormone: physiology, chemistry, biosynthesis, secretion, metabolism and mode of action. In: DeGroot LJ, ed. Endocrinology,3rd ed, Vol.2. Philadelphia: WB Saunders, 1995: 920-66.

45. Murray TM, Rao LG, Divieti P. Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl- terminal ligands. Endocrine reviews 2005;26: 78-113.

46. Pocotte SL, Ehrenstein G, Fitzpatrick LA. Regulation of parathyroid hormone secretion. Endocr Rev 1991;12: 291-301.

47. Chattopadhyay N, Mithal A, Brown E. The calcium –sensing receptor: a window into the physiology and pathophysiology of mineral ion metabolism. Endocr Rev 1996;17:289-307.

48. Bringhurst FR. Calcium and phosphate distribution, turnover and metabolic actions. In:DeGroot LJ,ed. Endocrinology,3rd ed.Vol.2. Philaedelphia: WB Saunders, 1995:1015-43.

49. Neer RM. Calcium and inorganic phosphate homeostasis. In: DeGrott LJ,ed. Endocrinology, 2nd ed,Vol.2. Philadelphia : WB Saunders,1989:927-53.

50. Stewart AF, Broadus AE. Mineral metabolism. In: Felig P,Baxter JD, Broadus AE, Frohman LA,eds. Endocrinology and metabolism, 2nd ed. New York: Mcgraw-Hill Book Co, 1987:1317-453.

51. D'Amour P,Labelle F,Lacavalier L,Plourde V, Harvey D. Influence of serum calcium concentration on circulating molecular forms of PTH in three species. Am J Physiol 1986;251:E680-7.

52. Daugaard H,Egfjord M,Olgaard K. Influence of calcium on the metabolism of intact parathyroid hormone by isolated perfused rat kidney and liver. Endocrinology 1990;126:1813-20.

53. Endres DB1, Villanueva R, Sharp CF Jr, Singer FR. Immunochemiluminometric and immunoradiometric determinations of intact and total immunoreactive parathyrin: performance in the differential diagnosis of hypercalcemia and hypoparathyroidism. Clin Chem. 1991;37(2):162-8.

54. Segre GV, Potts JT Jr. Differential diagnosis of hypercalcemia. In:DeGroot LJ,ed. Endocrinology, 3rd ed,Vol.2. Philadelphia: WB Saunders,1995:1075-93.

55. Bringhurst FR,Stern AM,Yotts M, Mizrahi N, Segre GV,Potts JT Jr. Peripheral metabolism of PTH: fate of biologically active amino terminus invivo. Am J Physiol 1988;255:E886-93.

56. Endres DB, Villanueva R, Sharp CF, Singer FR. Measurement of parathyroid hormone. Endocrinol Metab Clin North Am 1989;18: 611-29.

57. Endres DB. Which parathyrin assay is really best for clinical use? Clin Chem 1991;37:1466-7.

58. Nussbaum SR. Immunometric assays of parathyrin in the diagnosis of hypercalcemic individuals. Clin Chem 1991;37: 142-3.

59. Andress DL,Endres DB,Maloney NA. Comprasion of parathyroid hormone assays with bone histomorphometry in renal osteodysropy. J Clin Endocrinol Metab 1986;63:1163-9.

60. Frolich M,Walma ST,Paulson C, Papapoulos SE. Immunorasiometric assay for intact human parathyroid hormone: charecteristics, clinical application and comparison with a radioimmunoassay. Ann Clin Biochem 1990;27: 69-72.

61. Nussbaum SR, Zahradrik RJ, Lavigne JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K,Kim LY. Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin, and its clinical utility in evaluating patients with hyprcalcemia. Clin Chem 1987;33: 1364-7.

62. Brown RC, Aston JP, Weeks I, Woodhead JS. Circulating intact parathyroid hormone measured with a two-site immunıchemiluminometric assay. J Clin Endocrinol Metab 1987;65: 407-14.

63. Logue FC, Perry B,Chapman RS, Milne I, James K, Beastall GH. A two-site immunoradiometric assay for PTH (1-84) using N and C terminal specific monoclonal antibodies. Ann Clin Biochem 1991;28: 160-6.

64. Bohler U, Bind E, Vogel G, Hitzler W,Flentje D, Schmidt-Gayk H. Two-site immunochemiluminometric assay of intact human parathyrin in serum with use of a tracer peptide purified by reversed-phase high-perfomance liquid chromatography. Clin Chem 1989;35: 215-22.

65. Blind E,Schmidt-Gayk H, Armbruster FP, Stadler A. Measurement of intact human parathyrin by an extracting two-site immunoradiometric assay. Clin Chem 1987;33: 1376-81.

66. Bouillon R, Coopmans W,Degroote DEH, Radoux D, Eliard PH. Immunoradiometric assay of parathyrin with polyclonal and monoclonal region-specific anti-bodies. Clin Chem 1990;36:271-6.

67. Brown RC, Aston JP,St John A,Woodhead JS. Comparison of poly- and monoclocal antibodies as labels in a two-site immunochmiluminometric assay for intact parathroid hormone. J Immunol Methods 1988;109:139-44.

68. Logue FC, Perry B, Biggart EM, Chapman RS, Beastall GH. Production and characterization of monoclonal antibodies to parathyroid hormone (1-34). J Immunol Methods 1991;137:159-66.

69. Nussbaum SR, Lin CS, Potts JT,Rosenthal AS,Roenblatt M. Development of monoclonal antibodies against parathyroid hormone:genetic control of the immune response to human PTH. Methods Enzymol 1985;109:625-38.

70. Brossard J-H, Cloutier M, Roy L, Lepage R, Gascon-Barre M, D'Amour P. Accumulation of a non-(1-84) molecular form of parathyroid hormone (PTH) detected by intact PTH assay in renal failure: importance in the interpretation of PTH values. J Clin Endocrinol Metab 1996;81: 3923-9.

71. Lepage R, Roy L, Brossard J-H, Rousseau L, Dorais C, Lazure C, et al. A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. Clin Chem 1998;44: 805-9.

72. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard J-H, Lepage R, Gao P, Cantor T,et al. Origin of parathyroid (PTH) fragments detected by intact-PTH assays. Eur J Endocrinology 2002;147:123-31

73. Gao P, Scheibel S, D'Amour PD, John MR, Rao SD, Schmidt-Gayk H, et al. Development of a novel immunoradimetric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. J Bone Miner Res 2001;16: 605-14.

74. Nguyen-Yamamoto L, Rousseau L, Brossard J-H, Lepage R, D'Amour P. Synthetic carboxylterminal fragments of PTH decreased ionized calcium concentration in rats by acting on a receptor different from the PTH/PTHrP receptor. Endocrinology 142:1386-92.

75. Slatopolsky E, Finch J, Clay P, Martin D, Sicard G, Singer G, et al. A novel mechanism for skeletal resistance in uremia. Kidney Int 2000;58: 753-61.

76. Malluche HH, Mawad H, Truba D, Monier-Faugere MC. Parathyroid hormone assays-evolution and revolutions in the care of dialysis patients. Clin Nephrol 2003;59:313-8.

77. D'Amour P,Brossard J-H, Rousseau L, Roy L, Gao P, Cantor T. Amino-terminal form of parathyroid hormone (PTH) with immunologic similarities to Hpth (1-84) is overproduced in primary and secondary hyperparathyroidism. Clin Chem 2003;49: 2037-2044.

78. Levin GE, Nisbet JA. Stability of parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone at room temperature. Ann Clin Biochem 1994;31: 497-500.

79. Newman DJ, Ashby JP. Clinical and laboratory evaluation of a two-site immunoradiometric assay for intact parathyroid hormone. Ann Clin Biochem 1988;25: 654-60.

80. Ratcliffe WA, Heath DA, Ryan M, Jones SR. Performance and diagnostic application of a two-site immunoradiometric assay for parathyrin in serum. Clin Chem 1989;35:1957-61.

81. Rude RK, Singer FR. Primary hyperparathyroidism. In: Conn RB, ed. Current diagnosis,(th ed. Philadelphia:WB Saunders, 1991:859-63.

82. Wood PJ. The measurement of parathyroid hormone. Ann Clin Biochem 1992;29:11-21.

83. Glendenning P, Laffer LLA, Weber HK, et al. Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. ClinChem 2002; 48: 766-7.

84. Teal TK, Reed M, Stevens PE, et al. Stability of parathyroidhormoneexvivo in haemodialysispatients. Ann Clin Biochem 2003; 40: 191-3.

85. English E, McFarlane I, Taylor KP, et al. The effect of potassium EDTA on the stability of parathyroid hormone in whole blood. AnnClinBiochem 2007; 44: 297-9.

86. Lepage R, Whittom S, Bertrand S, Bahsali G, D'Amour P. Superiority of dynamic over static reference intervals for intact, mid-molecule, and C-terminal parathyrin in evaluating calcemic disorders. Clin Chem 1992;38:2129-35.

87. Souberbiell JC, Cormier C, Kindermans C, Gao P, Cantor T, Forette F, Baulieu EE. Vitamin D redfining serum parathyroid hormone reference range in the elderly. J Clin Endocrinol Metab 2001;86:3086-90.

88. Davis OK, Hawkins DS, Rubin LP, Posillico JT, Brown EM, Schiff I. Serum parathyroid hormone in pregnant women determined by an immunoradiometric assay for intact PTH. J Clin Endocrinol Metab 1988;67:850-2.

89. Hosking DJ. Calcium homeostasis in pregnancy. Clin Endocrinol 1996;45:1-6.

90. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S, Cipolloni C. Intact parathyroid hormone levels during pregnancy in healthy term neonates and in hypocalcemic preterm infants. Acta Paediatr Scand 1991;80:36-41.

91. Papatoniou NE, Papapetrou PD, Antsaklis AJ, Kontoleon PE, Mesogitis SA, Aravantinos D. Circulating levels of immunoreactive parathyroid hormone-related protein and intact parathyroid hormone in human fetuses and newborns. Eur J Endocrinol 1996;134:437-42.

92. Rubin LP, Posillico JT, Anast CS, Brown EW. Circulating levels of biologically active immunoreactive intact parathyroid hormone in human newborns. Pediatr Res 1991;29:201-7

93. Saggese G, Baroncelli GI, Bertelloni S. Determination of intact parathyrin by immunoradiometric assay evaluated in normal children and in patients with various disorders of calcium metabolism. Clin Chem 1991;37:1999-2001

94. Endres DB, Morgan CH, Garry PJ, Omdahl JL. Agerelated changes in serum immunoreactive parathyroid hormone and its biological action in healthy men and women. J Clin Endocrinol Metab 1987;65:724-31.

95. Sherman SS, Hollis BW, Tobin JD. Vitamin D status and related parameters in a healthy population: the effects of age,sex and season. J Clin Endocrinoş Metab 1990;71:405-13.

96. Calvo MS, Eastell R, Offord KP, Bergstralh EJ, Burritt MF. Circadian variation in ionized calcium and intact parathyroid hormone: evidence for sex differences in calcium homeostasis. J Clin Endocrinol Metab 1991;72:69-76.

97. Harms H-M, Kaptaina U, Kulpmann WR, Brabant G, Hesch RD. Pulse amplitude and frequency modulation of parathyroid hormone in plasma. J Clin Endocrinol Metab 1989;69:843-51.

98. Kitamura N, Shigeno C, Shiomi K, Lee K, Ohta S, Sone T, et al. Episodic fluctuation in serum intact parathyroid hormone concentration in men. J Clin Endocrinol Metab 1990;70:252-63.

99. Logue FC, Fraser WD, O'reilly DStJ, Beastall GH. The circadian rhythm of intact parathyroid hormone (1-84) and nephrogenous cyclic adenosine monophosphate in normal men. J Endocrinol 1989;121:R1-3.

100. Endres DB. Hypercalcemia and parathyroid disorders. Curr Opin Rheumatol 1992;4:383-8.

101.Fraser WD, Logue FC, Gallacher SJ, O'Reilly DS, Beastall GH, Ralston SH et al. Direct and indirect assessment of the parathyroid response to pamidronate therapy in Paget's disease of bone and hypercalcemia of malignancy. Bone Miner 1991;12:113-21.

102. Nussbaum SR, Gaz RD, Arnold A. Hypercalcemia and ectopic secretion of parathyroid hormone by an ovarian carcinoma with rearrangement of the gene for parathyroid hormone. N Engl J Med 1990;323:1324-8.

103. Rude RK, Sharp CF Jr, Fredericks RS, Oldham SB, Elbaum N, Link J, et al. Urinary and nephrogenous adenosine-3'-5'-monophosphate in hypercalcemia of malignancy. J Clin Endocrinol Metab 1981;52:765-71.

104. Silverberg SJ, Gao P, Brown I, LoGerfo P, Cantor TL, Bilezikian JP. Clinical utility of an immunoradiometric assay for parathyroid hormone (1-84) in primary hyperparathyroidism. J Clin Endocrinol Metab 2003;88:4725-30.

105. Carter AB, Howanitz PJ. Intraoperative testing for parathyroid hormone: a comprehensive review of the use of the assay and the relevant literature. Arch Pathol Lab Med 2003;127:1424-42.

106. Yamashita H, Gao P, Noguchi S, Cantor T, Uchino S, Watanabe S, et al. Role of cyclase activating parathyroid hormone (1-84 PTH) measurements during parathyroid surgery: potential improvement of intraoperative PTH assay. Ann Surg 2002;236:105-11.

107. Nicoloff JT, Spencer CA. Clinical review 12: the use and misuse of the sensitive thyrotropin assays. J Clin Endocrinol Metab 1990;71:553-8.

108. Llach F, Hervas J, Cerezo S. The importance of dosing intravenosus calcitriol in dialysis patients with severe hyperparathyroidism. Am J Kidney Dis 1995;26:845-51.

109. Wang M, Hercz G, Sherrard DJ, Maloney NA, Segre GV,et al. Relationship btween intact 1-84 parathyroid hormone and bone histomorphometric parametres in dialysis patients without aluminum toxicity. Am J Kidney Dis 1995;26:836-44.

110. D'Amour P, Jobin J, Hamel L, L'Ecuyer N. iPTH values during hemodialysis: role of ionized calcium, dialysis membranes and iPTH assays. Kidney Int 1990;38:308-14.

111. Kudlac H, Fielding AM, Williams AJ. Effect of hemodialysis membrane type on parathyroid hormone removal. Miner Electrolyte Metab 1994;20:245-9.

112. Dilena BA, White GH. Assessing acute parathyroid responsiveness in hemodialysis patients by measuring intact parathyrin in pre- and post-dialysis serum. Clin Chem 1991;37:1216-20.

113. Pietila K, Morsky P, Pasternack A, Mustonen J, Koivula T. Intact parathyroid hormone, ionized calcium and calcium infusion test in the evaluation of hyperparathyroidism in chronic renal failure. Nephron 1987;47:284-9.

114. Blind E, Raue F, Reichel H. Validity of intact plasma parathyrin measurements in chronic renal failure as determined by two-site immunoradiometric assays with N- or C- terminal capture antibodies. Clin Chem 1992;38:2345-7.

115. Dilena BA, White GH. Interference with the measurement of intact parathyrin in serum from renal dialysis patients. Clin Chem 1989;35:1543-4.

116. Fraser WD, Logue FC, MacRitchie K, Wilson RM, Gray HW, Beastall GH,et al. Intact parathyroid hormone concentration and cyclic AMP metabolism in thyroid disease. Açta Endocrinol 1991;124:652-7.

117. McGowan DM, Vaswani A, Shperling I. Coexisting hyperparathyroidism with thyrotoxicosis. J Endocrinol Invest 1991;14:305-10.

119. Ross DS, Nussbaum SR. Reciprocal changes in parathyroid hormone and thyroid function after radioiodine treatment of hyperthyroidism. J Clin Endocrinol Metab 1989;68:1216-9.

120. Pilz S, Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. Nat. Rev. Cardiol. 2009;6:621-30.

121. Souberbielle JC, Evaluating vitamin D status. Implications for preventing and managing osteoporosis and other chronic diseases. Joint Bone Spine 2006;73:249-53.

122. Cavalier E, Vitamin D: current status and perspectives. Clin Chem Lab Med 2009;47(2):120-27.

123. Peterlik M, Vitamin D and calcium insufficiency-related chronic diseases: an emerging world-wide public health problem. Int. J. Environ. Res. Public Health 2009;6:2585-607.

124. Grant WB, Estimated benefit of increased vitamin D status in reducing the economic burden of disease in western Europe. Prog. Biophys. Mol. Biol. 2009;99:104-13.

125. Holick MF, Vitamin D deficiency. N. Engl. J. Med. 2007;357:266-81.

126. Autier P, Vitamin D supplementation and total mortality: A metaanalysis of randomized controlled trials. Arch Intern Med. 2007; 167(16):1730-7

127. Bischoff-Ferrari HA, Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. Am J Clin Nutr 2006;84:18-28.

128. Steingrimsdottir L, Relationship between serum parathyroid hormone Levels, vitamin D sufficiency, and calcium intake. JAMA 2005; 294(18):2336-41.

129. Grant WB, Current impediments to acceptance of the ultraviolet-Bvitamin D-cancer hypothesis. Anticancer Res. 2009;29:3597-604.

130. Pilz S, Low vitamin D levels predict stroke in patients referred to coronary angiography. Stroke 2008;9:2611-13.

131. KDIGO C-M (2009) Work Group KDIGO Clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone disorder (CKDMBD). Kidney Int 76(Suppl 113):S1–130.

132. Einhorn TA, Gerstenfeld LC. Fracture healing: mechanisms and interventions. Nat Rev Rheumatol. 2015 Jan; 11(1): 45–54.

133. Compston JE, Silver AC, Croucher I'1, Brown RC, Woodhead JS. Eleuatedserumintactparathyroidhormoelevels in elderly patients with hipfracture. Clin Endocrinal 1989; 3l:667-72.

134. CLSI. Procedures for the Handling and Processing of Blood Specimens for Common Laboratory Tests; Approved Guideline—Fourth Edition. CLSI document GP44-A4. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute: 2010.

135. Guyton AC. Human Physiology and Mechanisms of Disease. 4th ed. Philadelphia, PA: W.B. Saunders; 1987:220-221.

136. Bakan E. Tanıda Labaratuvar. 1. Baskı. İstanbul, Aktif Yayınevi, 2011: 139-174

137. Preanalytical Systems BD Life Sciences Product Catalogue This product catalog is valid from January 2018, in Belgium, The Netherlands & Luxembourg.
http://cms.bd.com/resource.aspx?IDX=34369

138. Talke H, Schubert GE. Klinische Wochenschrift 1965;43:174

139. Ricos C, Alvarez V, Cava F, Garcia-Lario JV, Hernandez A, Jimenez CV, Minchinela J, Perich C, Simon M (2014) Desirable specifications for total error, imprecision, and bias, derived from intra- and inter-individual biologic variation. http://www.westgard.com/biodatabase1.htm. Accessed May 2014.

140. Souberbielle JC, Cavalier E, Jean G. Interpretation of serum parathyroid hormone concentrations in dialysis patients: what do the KDIGO guidelines change for the clinical laboratory. Clinical chemistry and laboratory medicine: CCLM / FESCC 2010; 48: 769-74.

141. Souberbielle JC, Roth H, Fouque DP. Parathyroid hormone measurement in CKD. Kidney international 2010;77: 93-100.

142. Joly D, Drueke TB, Alberti C, et al. Variation in serum and plasma PTH levels in second-generation assays in hemodialysispatients: a cross-sectionalstudy. American journal of kidney diseases: the official journal of the National Kidney Foundation 2008; 51: 987-95.

143. Eastell R, Arnold A, Brandi ML, et al. Diagnosis of asymptomatic primary hyperparathyroidism: Proceedings of the Third International Workshop. J ClinEndocrinolMetab. 2009; 94:340–350

144. Schmitt CP, Homme M, Schaefer F: Structural organization and biological relevance of oscillatory parathyroid hormone secretion. Pediatr Nephrol20:346-351, 2005.

145. Cantor T, Yang Z, Caraiani N, et al. Lack of comparability of intact parathyroid hormone measurements among commercial assays for end-stage renal disease patients: implication for treatment decisions. Clinical chemistry 2006; 52: 1771-6.

146. Souberbielle JC, Boutten A, Carlier MC, et al. Inter-method variability in PTH measurement: implication for the care of CKD patients. Kidney international 2006;70:345-50.

147. Almond A, Ellis AR, Walker SW, et al. Current parathyroid hormone immuno assays do not adequately meettheneeds of patients with chronic kidney disease. AnnClinBiochem 2012;49: 63-7.

148. Eddington H, Hudson JE, Oliver RL, Fraser WD, Hutchison AJ, Kalra PA. Variability in parathyroid hormone assays confounds clinical practice in chronic kidney disease patients. Ann Clin Biochem 2014;51: 228-36.

149. Souberbielle JC, Massart C, Brailly-Tabard S, Cormier C, Cava-lier E, Delanaye P et al. Serum PTH reference values established by an automated third-generation assay in vitamin D-replete subjects with normal renal function: consequences of diagnosing primary hyperparathyroidism and the classification of dialysis patients. Eu J Endocrinol 2016;174:315–323.

150. Morse CA. Menopausetransition. In: Barry GW ed. Progress in themanagement of themenopause, TheParthenon Publishing Group New York, London, 1996: 50-57.

151. Aloia JF, Vaswani A, Yeh JK, Flastere. Risk forosteoporozis in blackwomen. Calcif Tissue Int. 1996;59(6): 415-23.

152. Andersen T, McNair P, Fogh-Andersen N, Nielsen TT, Hyldstrup L, Transbol I. Increased parathyroid hormone as a consequence of changed complex binding of plasma calcium in morbid obesity. Metabolism 1986;35:147–151.

153. Bell NH, Epstein S, Greene A, Shary J, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence for alteration of the vitamin D-endocrinesystem in obesesubjects. J ClinInvest 1985;76: 370–373.

154. Bell NH, Epstein S, Shary J, Greene V, Oexmann MJ, Shaw S. Evidence of a probable role for 25-hydroxyvitamin D in the regulation of human calcium metabolism. J Bone MinerRes 1988;3: 489–495.

155. Jubiz W, Canterbury JM, Reiss E, Tyler FH. Circadian rhythm in serum parathyroid hormone concentration in human subjects: correlation with serum calcium, phosphate, albumin, and growth hormone levels. J Clin Invest.1972;51:2040 –2046.

156. Nielsen HK, Laurberg P, Brixen K, Mosekilde L. Relations between diurnal variations in serum osteocalcin, cortisol, parathyroid hormone, and ionized calcium in normal individuals. Acta Endocrinol (Copenh). 1991;124:391–398

157. Fraser WD, Logue FC, Christie JP, Cameron DA, O'Reilly DS, Beastall GH. Alteration of the circadian rhythm in intact parathyroid hormone following a 96-hour fast. Clin Endocrinol (Oxf). 1994;40:523–528

158. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon CM, Hanley DA, Heaney RP, Murad H, Weaver CM. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:1911-30.

159. Wacker M, Holick MF. Vitamin D-Effects on Skeletal and Extra skeletal Health and the Need for Supplementation. Nutrients 2013;5: 111-48.

160. Björkman M, Sorva A, Tilvis R. Responses of parathyroid hormone to vitamin D supplementation: a systematic review of clinical trials. Arch Gerontol Geriatr 2009;48: 160–166.

161. Touvier M, Deschasaux M, Montourcy M, Sutton A, Charnuax N, Kess-Guyot E et al. Interpretation of plasma PTH concentrationsaccordingto 25OHD status, gender, age, weightstatus, andcalciumintake: importance of thereferencevalues. J ClinEndocrinolMetab 2014;99:1196–1203.

162. Carter GD, Carter R, Jones J, Berry J. How accurateareassaysfor 25-hydroxyvitamin D? Data fromthe International Vitamin D ExternalQualityAssessmentScheme. ClinChem 2004;50:2195–2197.

163. Ross AC, Taylor CL, Yaktine AL, Del Valle HB.Institute of Medicine (US) Committee to Review Dietary Reference Intakes for Vitamin D and Calcium; editors. Dietary reference intake for calcium and vitamin D. Washington DC: National Academies Press, 2011.

164. Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96:53–8.

165. Stechschulte, S. A.,Kirsner, R. S., &Federman, D. G.Vitamin D: bone and beyond, rationale and recommendations for supplementation. The American journal of medicine, 2009; 122(9), 793-802.

166. Binkley N.,Krueger, D., Gemar, D., &Drezner, M. K. Correlationamong 25-hydroxyvitamin D assays. TheJournal of Clinical Endocrinology&Metabolism.2008;93(5), 1804-1808.

167. Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K, Kim LY et al. Highlysensitivetwo-site immuno-radiometricassay of parathyrin, anditsclinical utility in evaluatingpatientswithhypercalcemia. ClinChem 1987; 33:1364–1367.

168. Blind E, Schmidt-Gayk H, Scharla S, Flentje D, Fischer S, Göhring U et al. Two-site assay of intact parathyroid hormone in the investigation of primary hyperparathyroidism and other disorders of calcium metabolism compared with a mid-region assay. J Clin Endocrinol Metab 1988;67: 353–360.

169. Gao P, Scheibel S, D'Amour P, John M, Rao S, Schmidt-Gayk H et al Development of a novel immunoradiometricassay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1–84: implication for improvement of accurate assessment of parathyroid function. J Bone Miner Res 2001;16:605–614.

170. Deckers M, de Jongh R, Lips P, Penninx B, Milaschi Y, Smit J et al. Prevalence of vitamin D deficiency and consequences for PTH reference values. Clin Chim Acta 2013;426: 41–45.

171. La'ulu S, Roberts W Performance characteristics of six intact parathyroid hormone assays. Am J ClinPathol2010;134:930–938.

172. Souberbielle JC, Fayol V, Sault C, Lawson-Body E, Kahan A,Cormier A. Assay-specific decision limits for two new automated parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D assays. Clin Chem 2005;51:395–400.

173. Li M, Lv F, Zhang Z, Deng W, Li Y, Deng Z et al. Establishment of a normal referencevalue of parathyroid hormone in a large healthy Chinese population and evaluation of its relationto bone turnoverand bone mineral density. Osteoporos Int 2016;27:1907–1916.

174. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. Osteoporos Int 2005;16:713–6.

175. Weaver CM, McCabe L, McCabe G, Braun M, Martin B, Dimeglio L. Vitamin D status and calcium metabolism in adolescent black and white girls on a range of controlled calcium intakes. J Clin Endocrinol Metab 2008;93:3907–14.

176. Hill TR, Cotter AA, Mitchell S, Boreham CA, Dubitzky W, Murray L, et al. Vitamin D status and parathyroid hormone relationship in adolescents and its association with bone health parameters: analysis of the Northern Ireland Young Heart Project. Osteoporos Int 2010;21:695–700.

177. Muhittin A. Serdar, Başar Batu Can, Meltem Kilercik, Zeynep A. Durer, Fehime Benli Aksungar, Mustafa Serteser et al. Analysıs Of Changes In Parathyroid Hormone And 25 (Oh) Vitamın D Levels With Respect to Age, Gender And Season: A Data Mining Study. J MedBiochem 2017;36: 73–83.

178. Holick MF, Siris ES, Binkley N, Beard MK, Khan A, Katzer JT, Petruschke RA, Chen E, de Papp AE. Prevalence of Vitamin D in adequacy among Postmenopausal North American Women Receiving Osteoporosis Therapy. J ClinEndocrinolMetab 2005; 90: 3215–24.

179. Adami S, Viapiana O, Gatti D, Idolazzi L, Rossini M. Relationship between serum parathyroid hormone, vitamin D sufficiency, age, and calcium intake. Bone 2008;42:267–70.

180. Quesada J, Coopmans W, Ruiz B, Aljama P, Jans I, Bouillon R. Influence of vitamin D on parathyroid functions in the elderly. J Clin Endocrinol Metab 1992;75:494–501.

181. Nordin B, Need A, Morris H, O'Loughlin P, Horowitz M. Effect of age on calcium absorption in postmenopausal women. Am J Clin Nutr 2004;80:998–1002.

182. Gunnarsson O, Indridason OS, Franzson L, Sigurdsson G. Factors associated with elevated or blunted PTH response in vitamin D insufficient adults. J Int Med 2008;265:488–95.

183. Atli T, Gullu S, Uysal AR, Erdogan G. The prevalence of Vitamin D deficiency and effects of ultraviolet light on Vitamin D levels in elderly Turkish population. Arch Gerontol Geriatr 2005;40:53–60.

184. Roth, H.J., Schmidt-Gayk, H., Weber, H. et al. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. Annals of Clinical Biochemistry. 2008;45, 153–159.

185. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrome at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. Diabetes. 2008;57: 298–305.

186. Wolf M, Shah A, Gutierrez O, Ankers E, Monroy M, Tamez H et al. Vitamin D levels and early mortality among incident hemodialysis patients. Kidney Int. 2007;72:1004–13.

187. Martinez I, Saracho R, Montenegro J, Llach F. Theimportance of dietarycalciumandphosphorus in thesecondaryhyperparathyroidism of patientswithearlyrenalfailure. Am J KidneyDis. 1997; 29:496–502.

188. Brown JM, Williams JS, Luther JM, Garg R, Garza AE, Pojoga LH et al. Human interventions to characterize novel relationships between the renin–angiotensin–aldosterone system and parathyroid hormone. Hypertension 2014; 63(2): 273–280.

189. Brown J, de Boer IH, Robinson-Cohen C, Siscovick DS, Kestenbaum B, Allison M, Vaidya A. Aldosterone, parathyroid hormone, and the use of renin-angiotensin-aldosterone system inhibitors: the multi-ethnic study of atherosclerosis. J Clin Endocrinol Metab. 2015;100(2):490-9.

190. Ecder T. Renin inhibition and the kidney. Turk Kardiyol Dern Ars. 2009;37 Suppl 7:28-31.

191. Atlas SA. The renin-angiotensin aldosterone system: pathophysiological role and pharmacologic inhibition. J Manag Care Pharm 2007;13(8 Suppl B):9-20.

192. Cinar N, Harmancı A, Yildiz BO, Bayraktar M. Vitamin D status and seasonal changes in plasma concentrationsof 25-hydroxyvitamin D in officeworkers in Ankara, Turkey. EuropeanJournal of InternalMedicine, 2013, 13: 990-4.

193. Arabi, A, Baddoura, R, El-Rassi, R, et al. Age but not gender modulates the relationship between PTH and vitamin D. Bone 2010;47, 408–412.

194. Haden, ST, Brown, EM, Hurwitz, S, et al. The effects of age and gender on parathyroid hormone dynamics. *Clin. Endocrinol.* 2000;50: 329–338.

195. Carnevale V, Modoni S, Pileri M, Di Giorgio A, Chiodini I, Minisola S, et al. Longitudinal evaluation of vitamin D status in healthy subjects from southern Italy: seasonal and gender differences. Osteoporos Int 2001;12: 1026–30.

196. Plotnikoff 1. Plotnikoff GA, Quigley JM. Prevalence of severe hypovitaminosis D in patients with persistent, nonspecific musculoskeletal pain. Mayo Clin Proc 2003;78: 1463–70.

197. Lamberg-Allardt CJ, Outila TA, Kärkkainen MU, Rita HJ, Valsta LM. Vitamin D deficiency and bone health in healthy adults in Finland: could this be a concern in other parts of Europe? J Bone Miner Res 2001;16: 2066–73.

198. Hagenau T, Vest R, Gissel TN, Poulsen CS, Erlandsen M, Mosekilde L, et al. Global vitamin D levels in relation to age, gender, skin pigmentation and latitude: an ecologic meta-regression analysis. Osteoporos Int 2009;20: 133–40.

199. P. Twoney, T. Whitlock, D. Pledger. Differences between serum and plasma for intact parathyroid hormone measurement in patients with chronic renal failure in routine clinical practice, J Clin Pathol, 58 (2005), pp. 1000-1001

200. Holmes DT, Levin A, Forer B, Rosenberg F. Preanalytical influences on DPC IMMULITE 2000 intact PTH assays of plasma and serum from dialysis patients. Clin Chem. 2005;51(5):915–917.

201. Glendenning P, Laffer L, Weber H, Musk A, Vasikaran S: Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. Clin Chem. 2002 May;48(5):766-7.

202. P. D'Amour, J.H. Brossard, L. Rousseau, et al.Structure of non-(1–84) PTH fragments secreted by parathyroid glands in primary and secondary hyperparathyroidismKidney Int, 68 (2005), pp. 998-1007.

203.P. D'Amour, J.H. BrossardCarboxyl-terminal parathyroid hormone fragments: role in parathyroid hormone Curr Opin Nephrol Hypertens. 2005;14(4):330-6.

204.P. D'Amour, J.H. Brossard, A. Räkel, et al. Evidence that the amino-terminal composition of non-(1–84) parathyroid hormone fragments starts before position 19, Clin Chem, 51 (2005), pp. 169-176

205. J.M. Zanelli, R.E. Gaines-Das**.** The first international reference preparation of human parathyroid hormone for immunoassay: characterization and calibration by international collaborative study**,**J Clin Endocrinol Metab. 1983;57: 462-469

206. W. Withold, A. Schallenberg, H. Reinauer. Performance characteristics of different immunoassays for determination of parathyrin (1–84) in humans plasma samples. Eur J Clin Chem Clin Biochem. 1995; 33: 307-313

207. G.K. Worth, S.D. Vasikaran, R. Retallack, *et al.*Major method-specific differences in the measurement of intact parathyroid hormone: studies in patients with and without chronic renal failure**,** Ann Clin Biochem, 41 (2004), pp. 149-154

208. van Ballegooijen A, Reinders I, Visser M, Brouwer I (2013) Parathyroid hormone and cardiovascular disease events: a systematic review and meta-analysis of prospective studies. Am Heart J 165:655–664.

209. Yang B, Lu C, Wu Q, Zhang J, Zhao H, Cao Y (2016) Parathyroid hormone, cardiovascular and all-cause mortality: a metaanalysis. Clin Chim Acta 455:154–160.

210. Grandi NC, Breitling LP, Hahmann H, Wüsten B, März W, Rothenbacher D, et al. Serum parathyroid hormone and risk of adverse outcomes in patients with stable coronary heart disease. Heart 2011;97:1215-21.

211. Anderson JL, Vanwoerkom RC, Horne BD, Bair TL, May HT, Lappé DL, et al. Parathyroid hormone, vitamin D, renal dysfunction, and cardiovascular disease: dependent or independent risk factors? Am Heart J 2011;162:331-339.

212. Cavalier E., Carlisi A., Chapelle J.P., Delanaye P. False positive PTH results: an easy strategy to test and detect analytical interferences in routine practice Clin Chim Acta 2008 ; 387: 150-152.

213. Cavalier E., Carlisi A., Chapelle J.P., Orfanos P., Uzan M., Falque V., and al. Human anti-mouse antibodies interferences in Elecsys PTH assay after OKT3 treatment Transplantation 2009; 87: 451-452.

214. Cavalier E., Delanaye P., Carlisi A., Chapelle J.P., Collette J. An unusual interference in parathormone assay caused by anti-goat IgG: a case report Clin Chem Lab Med 2009;47: 118.

8. ÖZGEÇMİŞ

I- Bireysel Bilgiler

Adı-Soyadı: Büşra EFEM TOY

Doğum yeri ve tarihi: Diyarbakır - 1984

Uyruğu: T.C.

Medeni durumu: Evli

Askerlik durumu: Muaf

İletişim adresi ve telefonu: befemtoy@gmail.com – 0532216 98 01

Yabancı dili: İngilizce

II- Eğitimi

2002-2008Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü/Isparta, 2000-2002 Özel Amid Lisesi/Diyarbakır, 1999-2000 Sakıp Sabancı Anadolu Lisesi/İstanbul, 1995-1999 Özel Amid Lisesi/Diyarbakır, 1990-1995 Mehmetcik İlkokulu/Diyarbakır

III- Ünvanları

2008-2014/ Kimyager, 2014-Halen/Asistan Doktor

IV- Mesleki Deneyimi:

4 yıl

V- Üye Olduğu Bilimsel Kuruluşlar

VI- Bilimsel İlgi Alanları

VII- Bilimsel Etkinlikleri

Aldığı burslar

Ödüller

Projeleri

Verdiği konferans ya da seminerler

Katıldığı paneller (panelist olarak)

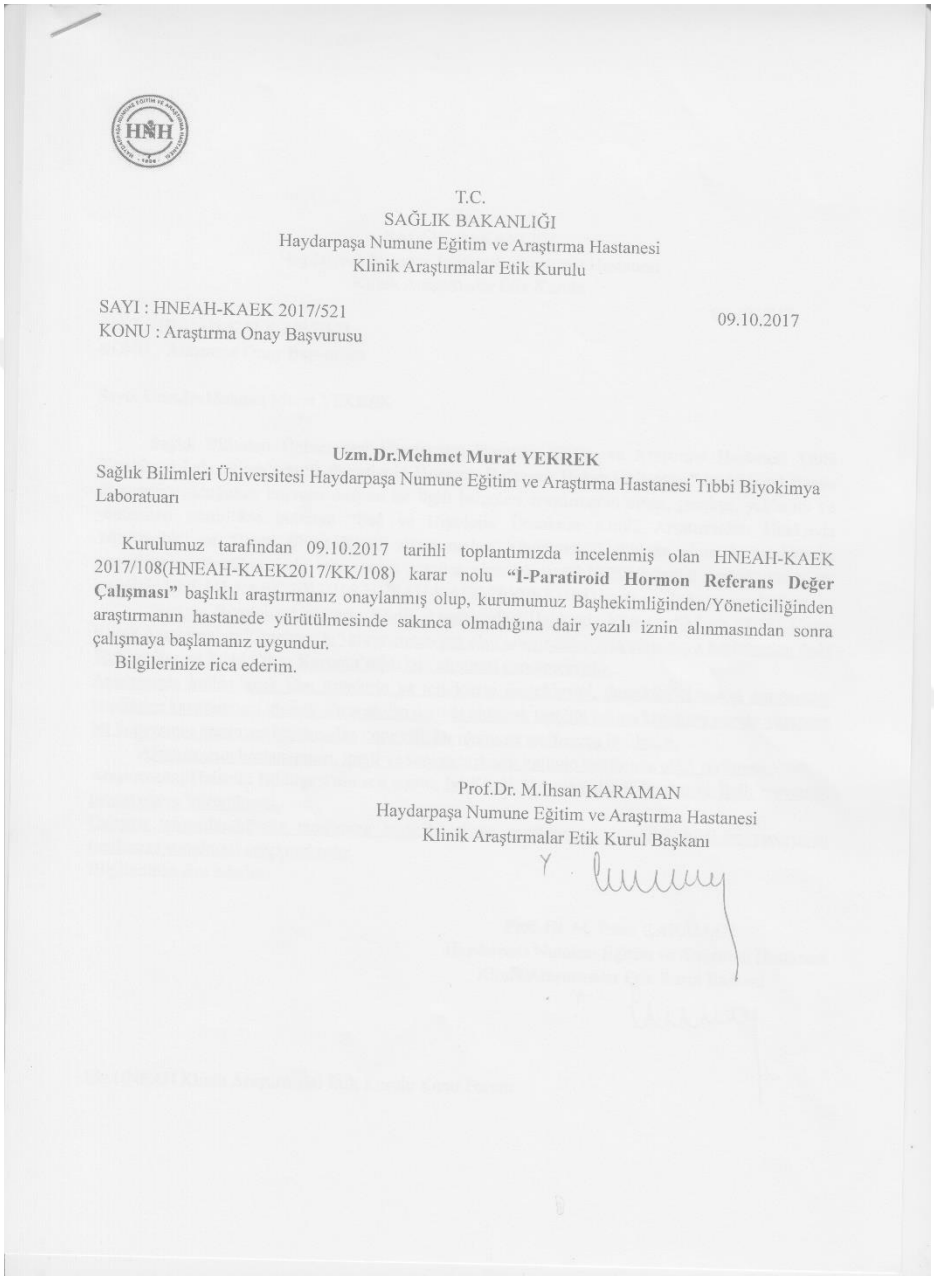
VIII- Diğer Bilgiler

Eğitim programı haricinde aldığı kurslar ve katıldığı eğitim seminerleri Organizasyonunda katkıda bulunduğu bilimsel toplantılar

Diğer üyelikleri: Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği

9. EKLER

EK-1. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim Ve Araştırma Hastanesi Etik Kurul Onay Belgesi



T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

SAYI : HNEAH-KAEK 2017/521
KONU : Araştırma Onay Başvurusu

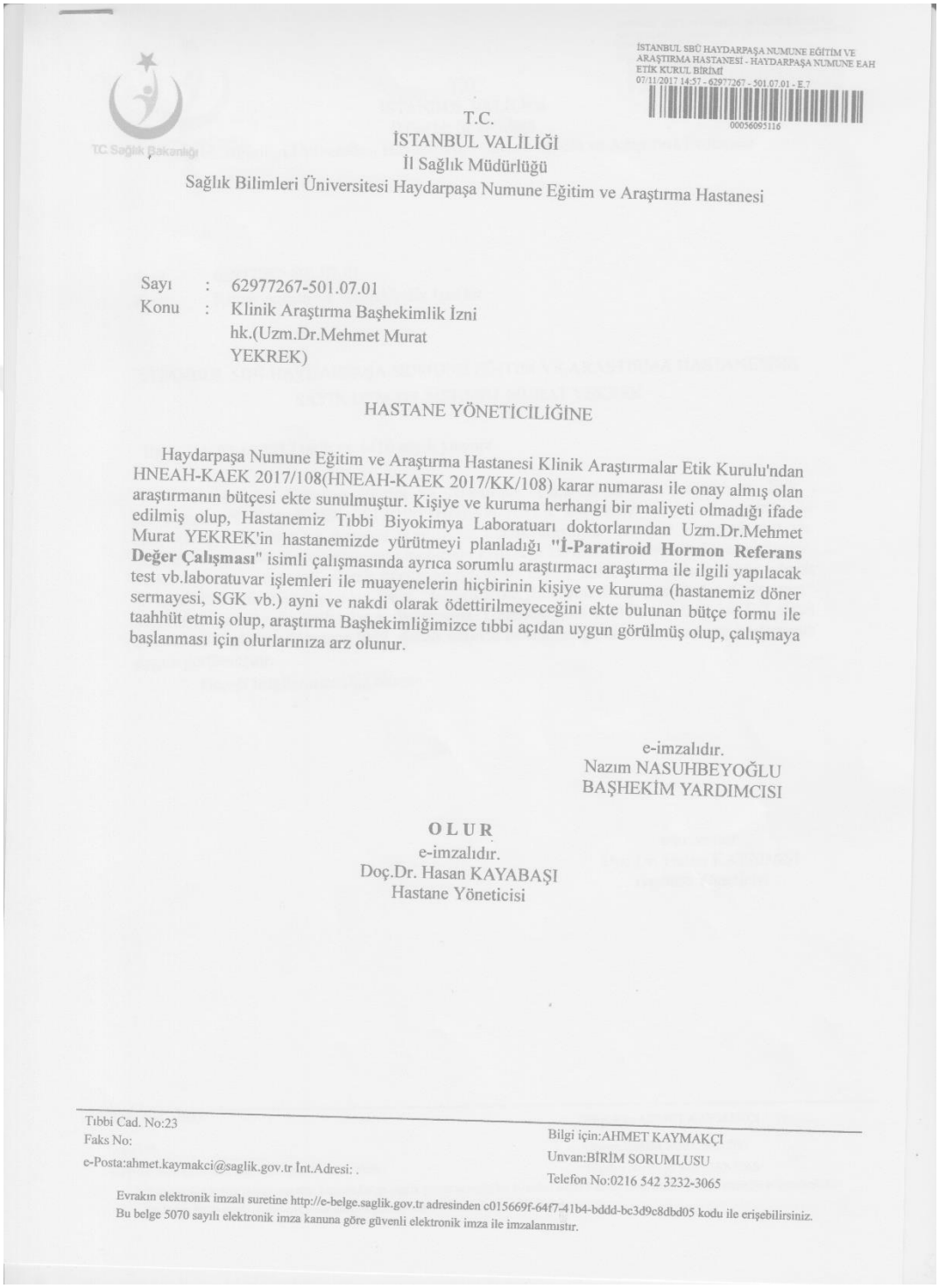
09.10.2017

Uzm.Dr.Mehmet Murat YEKREK
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuarı

Kurulumuz tarafından 09.10.2017 tarihli toplantımızda incelenmiş olan HNEAH-KAEK 2017/108(HNEAH-KAEK2017/KK/108) karar nolu **"İ-Paratiroid Hormon Referans Değer Çalışması"** başlıklı araştırmanız onaylanmış olup, kurumumuz Başhekimliğinden/Yöneticiliğinden araştırmanın hastanede yürütülmesinde sakınca olmadığına dair yazılı iznin alınmasından sonra çalışmaya başlamanız uygundur.
Bilgilerinize rica ederim.

Prof.Dr. M.İhsan KARAMAN
Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurul Başkanı

EK 2. Hastane Yönetimi Çalışma İzin Belgesi



İSTANBUL SBÜ HAYDARPAŞA NUMUNE EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ - HAYDARPAŞA NUMUNE EAH ETİK KURUL BİRİMİ
07/11/2017 14:57 - 62977267 - 501.07.01 - E 7
00056095116

T.C.
İSTANBUL VALİLİĞİ
İl Sağlık Müdürlüğü
Sağlık Bilimleri Üniversitesi Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Sayı : 62977267-501.07.01
Konu : Klinik Araştırma Başhekimlik İzni hk.(Uzm.Dr.Mehmet Murat YEKREK)

HASTANE YÖNETİCİLİĞİNE

Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan HNEAH-KAEK 2017/108(HNEAH-KAEK 2017/KK/108) karar numarası ile onay almış olan araştırmanın bütçesi ekte sunulmuştur. Kişiye ve kuruma herhangi bir maliyeti olmadığı ifade edilmiş olup, Hastanemiz Tıbbi Biyokimya Laboratuarı doktorlarından Uzm.Dr.Mehmet Murat YEKREK'in hastanemizde yürütmeyi planladığı **"İ-Paratiroid Hormon Referans Değer Çalışması"** isimli çalışmasında ayrıca sorumlu araştırmacı araştırma ile ilgili yapılacak test vb.laboratuvar işlemleri ile muayenelerin hiçbirinin kişiye ve kuruma (hastanemiz döner sermayesi, SGK vb.) ayni ve nakdi olarak ödettirilmeyeceğini ekte bulunan bütçe formu ile taahhüt etmiş olup, araştırma Başhekimliğimizce tıbbi açıdan uygun görülmüş olup, çalışmaya başlanması için olurlarınıza arz olunur.

e-imzalıdır.
Nazım NASUHBEYOĞLU
BAŞHEKİM YARDIMCISI

OLUR
e-imzalıdır.
Doç.Dr. Hasan KAYABAŞI
Hastane Yöneticisi

Tıbbi Cad. No:23
Faks No:
e-Posta:ahmet.kaymakci@saglik.gov.tr İnt.Adresi: .
Bilgi için:AHMET KAYMAKÇI
Unvan:BİRİM SORUMLUSU
Telefon No:0216 542 3232-3065

Evrakın elektronik imzalı suretine http://e-belge.saglik.gov.tr adresinden c015669f-64f7-41b4-bddd-bc3d9c8dbd05 kodu ile erişebilirsiniz.
Bu belge 5070 sayılı elektronik imza kanuna göre güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

EK 3. Referans Aralık Çalışması Anket Formu

REFERANS ARALIK ÇALIŞMASI ANKET FORMU

DAHİL EDİLME KRİTERLERİ

1. Kendinizi iyi hissediyor musunuz ? E ☐ H ☐
2. 18-50 yaş aralığında mısınız? E ☐ H ☐

DIŞLANMA KRİTERLERİ

1. Hamile misiniz? E ☐ H ☐
2. Emziriyor musunuz? E ☐ H ☐
3. İlaç kullanıyor musunuz? E ☐ H ☐
   Evet ise ne kullanıyorsunuz?
4. Son 6 ay içinde kemik kırığı oldu mu? E ☐ H ☐

KİMLİK BİLGİSİ

İsim (Adı,Soyadı) : ……

Yaş : ……

Cinsiyet Erkek ☐ Kadın ☐

Ağırlık : ……

Boy (cm) : ……

TIBBİ GEÇMİŞ

1. Her gün kullandığınız bir ilaç var mı? E ☐ H ☐
   Evet ise belirtiniz :
2. Özel bir diyet uyguluyor musunuz? E ☐ H ☐
   Evet ise ; ne tür?
3. Geçtiğimiz 4 hafta içinde rahatsızlandınız mı ? E ☐ H ☐
   Evet ise ; tanınız ve zamanı?
4. Yüksek tansiyonunuz var mı ? E ☐ H ☐
5. İnsülin ya da oral ilaçla tedavi edilen Şeker Hastalığınız var mı ? E ☐ H ☐
6. Mesleki olarak zararlı kimyasallara maruz kalıyor musunuz? E ☐ H ☐
7. Doktor kontrolünde misiniz? E ☐ H ☐
   Evet ise ; niçin?
8. Son 6 ay içinde hastaneye yattınız mı ? E ☐ H ☐
   Evet ise; ne zaman ve sebep?
9. Ailenizde kalıtımsal sağlık sorunları var mı ? E ☐ H ☐
   Evet ise; ne tür?
10. Herhangi bir nedenle önerilmiş diyet hapı, mide ilacı, antiasit yada alerji ilacı kullanıyor musunuz? E ☐ H ☐
    Evet ise; belirtiniz
11. Vitamin ilacı yada bitkisel takviye kullanıyor musunuz? E ☐ H ☐
    Evet ise; nedir?

KADINLAR İÇİN

1. Menstrüel düzeninizi nasıl tanımlarsınız? Düzenli ☐ Biraz düzensiz ☐ Düzensiz ☐
2. Hormon replasman tedavisi alıyor musunuz? E ☐ H ☐
3. Emzirme döneminde misiniz? E ☐ H ☐
4. Hamile misiniz? E ☐ H ☐

ALKOL

Alkol kullanıyor musunuz? E ☐ H ☐

Evet ise ;

1. Hangi sıklıkta ?
2. En son alkolü ne zaman aldınız ?

SİGARA

Sigara kullanıyor musunuz ? E ☐ H ☐

Evet ise;

1. Günde kaç tane sigara içiyorsunuz?
2. Kaç yıldır sigara içiyorsunuz?

EGZERSİZ

1. Düzenli egzersiz yapıyor musunuz? E ☐ H ☐
   Evet ise ; sporun cinsi:
2. Geçtiğimiz hafta içinde 30 dk veya daha uzun süreyle kalp atışınızın hızlandığı veya nefesinizin fazla zorlandığı fiziksel aktivitede bulundunuz mu ? E ☐ H ☐

EK 4. Gönüllü Onam Formu

"PARATİROİD HORMONUN REFERANS DEĞERİNİN BELİRLENMESİ"
KONULU ÇALIŞMA

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU (BGOF)

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ!!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız.

Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce

Çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve

Kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir

Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz.

Sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Paratiroid hormon ,(kısa adıyla PTH), parathormon olarak da bilinir ve paratiroid bezleri tarafından üretilir.

Asıl rolü kandaki kalsiyum seviyesini dengelemekle beraber, D vitamini, fosfor ve magnezyum metabolizması üzerine etkileri vardır.

Paratiroid hormon tetkiki, serum kalsiyum seviyeleri ile bağlantılı olarak paratiroid hastalıklarının farklı teşhislerinde bir yardımcı yöntem olarak kullanılabilir. PTH tespiti böbrek kaynaklı kemik harabiyetinin idaresinde diyaliz hastalarının takip edilmesi için önemlidir.

Bu çalışmanın amacı Paratiroid hormonun referans değerinin belirlenmesidir.

KATILMA KOŞULLARI NELERDİR?

Bu çalışmaya dahil edilebilmeniz için (18) yaş üstü, (50) yaş altı Kadın – Erkek sağlıklı olmanız ve okur-yazar olmanız gerekmektedir.

NELER UYGULANACAK VE NASIL BİR UYGULAMA YAPILACAK?

Yukarıda açıklanan katılma koşullarını sağlayan sağlıklı bireylerden 2 (iki) tüp kan alınacaktır.

KATILIMCI SAYISI NEDİR?

Araştırmada yer alacak hasta sayısı tahmini olarak (200) kişidir.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI YARAR NEDİR?

Bu çalışmada sizin için beklenen yarar ; paratiroid hormon ve metabolizmasını etkileyen parametrelerin (D vitamini , Kalsiyum , Fosfor, Magnezyum , Üre , Kreatinin gibi.) düzeyinin araştırılmasıdır.

ÇALIŞMAYA KATILMA İLE BEKLENEN OLASI RİSKLER NEDİR?

Bu çalışmada herhangi bir risk bulunmamaktadır.

ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIM?

Çalışma süresi boyunca sorumlu araştırıcıyı bilgilendirmek, araştırma hakkında ek bilgiler almak, çalışma ile ilgili ya da diğer rahatsızlıklarınız için As. Dr. Büşra EFEM TOY 'a (0.532.216 98 01) numaralı telefondan ulaşabilirsiniz.

ÇALIŞMA KAPSAMINDA GİDERLER KARŞILANACAK MIDIR?

Araştırma kapsamında yapılacak kan alma ve analiz işlemi için size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa herhangi bir masraf çıkartılmayacaktır.

ÇALIŞMAYI DESTEKLEYEN KURUM VAR MIDIR?

Çalışma Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesinde yapılacaktır ve tüm masraflar Abbott Laboratuvarları İthalat İhracat ve Ticaret Ltd. Şti. firması tarafından karşılanacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE HERHANGİ BİR ÖDEME YAPILACAK MIDIR?

Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMAYI KABUL ETMEM VEYA ARAŞTIRMADAN AYRILMAM DURUMUNDA NE YAPMAM GEREKİR?

Bu araştırmada yer almak tamamen sizin isteğinize bağlıdır.Araştırmada yer almayı reddedebilirsiniz.Araştırmanın sonuçları bilimsel amaçla kullanılacaktır.Çalışmadan çekilmeniz ya da araştırıcı tarafından çıkarılmanız durumunda sizinle ilgili veriler bilimsel amaçla kullanılmayacaktır.

KATILMAMA İLİŞKİN BİLGİLER KONUSUNDA GİZLİLİK SAĞLANABİLECEK MİDİR?

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir, ancak bu bilgiler gizli tutulacaktır, yazılı BGOF'un imzalanması ile söz konusu erişime izin vermiş olacaksınız.

Bilgiler kamuoyuna açıklanmayacak; araştırma sonuçlarının yayınlanması halinde dahi kimliğiniz gizli kalacak, araştırma konusuyla ilgili sizi etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde zamanında bilgilendirileceksiniz.

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI:

'PARATİROİD HORMONUN REFERANS DEĞERİNİN BELİRLENMESİ' KONULU ÇALIŞMA

Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren 4 (dört) sayfalık metni okudum ve aşağıda adı belirtilen hekimden sözlü olarak dinledim.

Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım.

Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Söz konusu araştırmaya,hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Bu koşullar altında bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.

Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN İMZASI

ADI SOYADI:
ADRESİ:
TELEFON:
TARİH:

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACI İMZA

ADI SOYADI:
TARİH:

GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK İMZA

ADI SOYADI:
GÖREVİ:
TARİH: