

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TAM OTOMATİK BAKIR ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ



DOKTORA TEZİ

Hifa Gülru ÇAĞLAR

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

HAZİRAN 2019

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

TAM OTOMATİK BAKIR ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ



DOKTORA TEZİ

**Hifa Gülru ÇAĞLAR
(150606223)**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

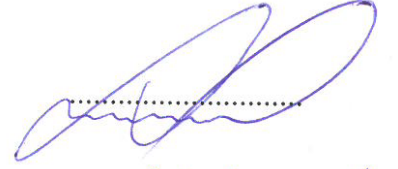
HAZİRAN 2019

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 150606223 numaralı Doktora Öğrencisi Hifa Gülru ÇAĞLAR, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "TAM OTOMATİK BAKIR ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi



Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi




Prof. Dr. İsmail MERAL
Bezmialem Vakıf Üniversitesi



Prof. Dr. Türkan YİĞİTBAŞI
Medipol Üniversitesi



Prof. Dr. Yıldız ATAMER
Beykent Üniversitesi



Teslim Tarihi : 17 Temmuz 2019
Savunma Tarihi : 25 Haziran 2019



Anneme,

ÖNSÖZ

İnsanlara faydalı olacak bir ürünle sonuçlanan bu projeyi tamamlamayı bize nasip ettiği için Allah'a şükürler olsun.

Aklımız bile ermeden önce ilim sevgisini bizlere aşıl原因an, gayretiyle her zaman bize örnek olan ve her konuda sevgisi ve desteğiyle ayaklarımızın yere sağlam basmasını sağlayan annem Dt. Şennur ÇAĞLAR'a bu ve bundan önceki ne çalışmam ve başarımlarım varsa hepsinde olan sonsuz özverisi ve emekleri için teşekkür ederim. Bilimin, bilhassa tıbbın, en güzel tefekkür ve insanlığa hizmet vesilesi olduğunu bizlere gösteren babam Dr. Necmettin ÇAĞLAR'a işimi kolaylaştıran tavsiyeleri için teşekkür ederim. Bilgisini ve görgüsünü bizlerle paylaşarak Tıbbi Biyokimya'yı en iyi kaynağından, kendisinden, öğrenmemize vesile olan, her zaman yeni fikirlere, öğrenmeye ve çalışmaya olan heyecanımla ufkumuzu genişleten ve akademideki en büyük desteğimiz Hocam Prof. Dr. Şahabettin SELEK'e tüm doktora öğrenimim boyunca gösterdiği sabır ve fedakarlıklardan dolayı teşekkür ederim.

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e bizlere çalışkanlığı ve gayretiyle örnek olduğu için, yaptığımız işleri yakından takip ederek katkılarını esirgemediği için teşekkür ederim.

Tezimizin her aşamasında bir elin parmakları gibi beraberce çalıştığımız, her türlü bilgiyi, yeni fikirleri ve gördükleri eksiklikleri dürüstçe paylaşan ve bu çalışmayı beraberce tamamladığımız Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ailesinden ekip arkadaşlarım Dr. Fatmanur KÖKTAŞOĞLU, Alime SARIKAYA, ve Metin DEMİREL'e ve araştırma laboratuvarımızın vazgeçilmez çalışanı Mustafa KARABONCUK'a emeklerinden dolayı teşekkür ederim.

Değerli arkadaşlarım Dr. Vildan Betül YENİGÜN, Dr. Ayşe Zehra GÜL, Pınar BURAK ve Şeyma CEYLAN'a bu süreçte eksik etmedikleri moral desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Çalışmanın büyük bölümünün gerçekleştiği Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nın vefakar, güler yüzlü, öğrenmeyi ve öğretmeyi seven, başta Sevgi KIRMIZI, Tağı POLAT, Derya DEVRAN ve Muammer DARÇIN olmak üzere, tüm çalışanlarına sabır ve desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Bu tez çalışması, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından 9.2017/9 numaralı BAP projesi ile desteklenmiştir. Üniversitemize desteklerinden dolayı teşekkür ederim.

Mayıs 2019

Hifa Gülru ÇAĞLAR
(Hekim)

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarımı ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Hifa Gülru ÇAĞLAR

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iv
BEYAN.....	v
İÇİNDEKİLER	vi
KISALTMALAR	ix
SEMBOLLER	x
TABLO LİSTESİ.....	xi
ŞEKİL LİSTESİ.....	xiii
ÖZET.....	xiv
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1 Elementlerin Sınıflandırılması	3
2.2 Bakır.....	4
2.2.1 İnsanda bakır metabolizması.....	5
2.2.2 Bakır metabolizması ile ilişkili hastalıklar.....	7
2.2.3 Bakır eksikliği ve klinik bulguları	8
2.2.4 Bakır fazlalığı ve klinik bulguları	9
2.2.5 Bakır ve nörodejeneratif hastalıklar	9
2.2.6 Bakır ve kanser.....	10
2.3 Klinik Laboratuvarda Bakır Ölçümü	10
2.3.1 Spektrofotometrik ölçüm	11
2.4 Klinik Laboratuvar Performans Değerlendirmeleri	12
2.4.1 Kesinlik ve doğruluk	12
2.4.2 Metot karşılaştırma	14
2.4.3 Tespit kabiliyeti.....	15
2.4.4 Doğrusallık.....	16
2.4.5 İç (İnternal) Kalite Kontrol	16
2.4.6 Dış (Eksternal) Kalite Kontrol	16
2.4.7 Toplam Analitik Hata.....	16
2.4.8 Altı Sigma Değerlendirmesi.....	17
2.4.9 Ölçüm Belirsizliği	18
2.4.10 Girişim (İnterferens)	18
2.4.11 Taşınma (Carryover)	19
2.4.12 Stabilitate değerlendirmeleri	19
2.4.13 Referans Aralığı	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	22
3.1 Gereçler	22
3.1.1 Kimyasallar	22
3.1.2 Cihazlar	24

3.2 Yöntemler.....	25
3.2.1 Standart çözeltiler	25
3.2.2 Serum havuzu.....	25
3.2.3 Kromojen ajanların dalga boyu spektrumu	25
3.2.4 Kromojen ajan ve bakır iyonlarının oluşturduğu yapının spektrumu	25
3.2.5 Farklı tampon ve pH değerlerinde bakır-kromojen kompleksinin spektrumu	26
3.2.6 Sürfaktan eklendiğinde oluşan bakır-kromojen kompleksinin spektrumu	26
3.2.7 Denatüran ve katalizörler eklendiğinde oluşan bakır-kromojen kompleksinin spektrumu.....	26
3.2.8 Uygunluğu belirlenen çalışma çözeltilerinin otomatize klinik kimya analizöründe uygulanması ve değerlendirilmesi	27
3.2.9 Yöntemin geçerli kılınması ve performans değerlendirmeleri	27
3.2.9.1 Kesinlik ve doğruluk.....	27
3.2.9.2 Kesinlik Değerlendirmesi.....	28
3.2.9.3 Hata (bias) değerlendirilmesi	28
3.2.9.4 Metot karşılaştırma.....	29
3.2.9.5 Analitik sensitivite (Tespit kabiliyeti).....	29
3.2.9.6 LoB, LoD ve LoQ hesaplaması.....	30
3.2.9.7 Doğrusallık (Linearite).....	31
3.2.9.8 İç (internal) Kalite Kontrol.....	31
3.2.9.9 Dış (Eksternal) Kalite Kontrol	31
3.2.9.10 Toplam Analitik Hata.....	32
3.2.9.11 Altı Sigma	32
3.2.9.12 Ölçüm belirsizliği (U_m)	32
3.2.9.13 Taşınma (Carryover)	32
3.2.9.14 Geri-kazanım (recovery)	33
3.2.9.15 Girişim (interferens).....	33
3.2.9.16 Raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süresi	34
3.2.9.17 Referans Aralığı	34
4. BULGULAR	35
4.1 5-Br PAPS.....	35
4.1.1 Manuel spektrofotometrede bakır ölçümü için uygun dalga boyunun standart çözeltiler kullanılarak belirlenmesi.....	35
4.1.2 Reaksiyonun optimum gerçekleştiği tampon ortamı ve pH aralığının belirlenmesi	37
4.1.3 İnterferense sebep olan maddelerin belirlenmesi.....	38
4.1.4 Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, interferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan surfaktanların ve konsantrasyonlarının belirlenmesi	39
4.2 3,5-DiBr-PAESA	40
4.2.1 3,5-DiBr-PAESA reaktifini ile manuel spektrofotometrede bakır ölçümü için en uygun dalga boyunun standart çözeltiler kullanılarak belirlenmesi	40
4.2.2 Reaksiyonun optimum gerçekleştiği tampon ortamı ve pH aralığının belirlenmesi	41
4.2.3 İnterferense sebep olan maddelerin belirlenmesi.....	42
4.2.4 Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan surfaktanların ve konsantrasyonlarının belirlenmesi	43

4.2.5	Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan katalizörlerin, proteinleri denatüre ederek bağlı bakırın serbest kalmasını sağlayacak ajanların ve kullanıma uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	45
4.2.6	Oto-analizör üzerinde kullanılacak reaktif ve numune miktarlarının, kalibratör ve internal kontrol değerlerinin belirlenmesi ve metodun standartlar üzerinde optimize edilmesi.....	46
4.3	Yöntemin Geçerli Kılınması ve Performans Değerlendirmeleri.....	49
4.3.1	Kesinlik ve Doğruluk.....	50
4.3.2	Metot Karşılaştırma.....	52
4.3.3	Tespit Kabiliyeti (Analitik Sensitivite).....	54
4.3.4	Doğrusallık (Linearite).....	56
4.3.5	İç (İnternal) Kalite Kontrol.....	57
4.3.6	Dış (eksternal) Kalite Kontrol.....	59
4.3.7	Toplam Analitik Hata.....	64
4.3.8	Altı Sigma Değerlendirmesi.....	65
4.3.9	Ölçüm Belirsizliği.....	65
4.3.10	Carryover.....	66
4.3.11	Geri-kazanım (Recovery).....	67
4.3.12	Girişim (İnterferens).....	68
4.3.13	Raf Ömrü.....	70
4.3.14	Cihaz üzerinde kullanım süresi.....	75
4.3.15	Referans Aralığı.....	83
5.	SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	84
5.1	Sonuçlar.....	84
5.2	Öneriler.....	85
	KAYNAKLAR.....	86
	EKLER.....	98
	ÖZGEÇMİŞ.....	103

KISALTMALAR

3,5-DiBr-PAESA	: 4-(3,5-Dibromo-2-piridilazo)-N-etil-N-(3-sulfopropil)anilin
A	: Absorbans
AAS	: Atomik absorpsiyon spektrometrisi
AH	: Alzheimer hastalığı
ALS	: Amyotrofik laterla skleroz
APP	: Amiloid prekürsör protein
ATOX1	: Antioksidan 1 bakır şaperonu
ATP	: Adenozin trifosfat
ATP7A	: Bakır taşıyıcı ATPaz alfa
ATP7B	: Bakır taşıyıcı ATPaz beta
CCS	: Süperoksit dismutaza bakır taşıyıcı şaperon
COX17	: Sitokrom c oksidaz bakır şaperonu
Ctr2	: Bakır taşıyıcı protein 2
CV	: Varyasyon katsayısı
DMT1	: Divalent metal taşıyıcı 1
GSH	: Glutasyon
HH	: Huntington hastalığı
ICP-MS	: Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer
LoB	: En düşük tespit limiti
LoD	: En düşük tayin limiti
LoQ	: En düşük raporlanabilir limit
MH	: Menkes hastalığı
OBS	: Oksipital boynuz sendromu
PH	: Parkinson hastalığı
R	: Korelasyon katsayısı
RL	: Referans limiti
SD	: Standart sapma
SE	: standart hata
SOD	: Süperoksit dismutaz
T	: Transmittans
TAH	: Toplam analitik hata
TEa	: Kabul edilebilir toplam hata
TV	: Hedef değer
U_m	: Ölçüm belirsizliği
V	: Varyans
WH	: Wilson hastalığı
Zincon	: 2-(2-(((2-Hidroksi-5-sulfofenil)diazenil)(fenil)metilen)hidrazinil) benzoik asit

SEMBOLLER

c	: Konsantrasyon
Co	: Kobalt
CoCl₂	: Kobalt (II) klorür
Cu	: Bakır
CuCl₂	: Bakır (II) klorür
CuSO₄	: Bakır (II) sülfat
dl	: Desilitre
E	: Molar absorpsiyon katsayısı
Fe	: Demir
FeSO₄	: Demir (II) sülfat
g	: Gram
HCl	: Hidroklorik asit
HNO₃	: Nitrik asit
H₂SO₄	: Sülfürik asit
M	: Molar
µg	: Mikrogram
µl	: Mikrolitre
µM	: Mikromolar
mM	: Milimolar
L	: Litre
ml	: Mililitre
l	: Işık yolu
Zn	: Çinko
ZnSO₄	: Çinko sülfat

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 : Memelilerde bulunan bazı önemli kuproenzimler	5
Tablo 2.2 : İnsan plazmasında bakır taşınmasını sağlayan yapılar.	6
Tablo 2.3 : Sigma değerlerinin karşılık geldikleri başarı ve hata oranları.	17
Tablo 4.1 : $pH=pK_a$ ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamlarıyla yapılan absorban ölçümleri.	37
Tablo 4.2 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan ölçümler.	38
Tablo 4.3 : Sürfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları	39
Tablo 4.4 : $pH=pK_a$ ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamlarıyla yapılan absorban ölçümleri.	42
Tablo 4.5 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla asetat tamponu içeren reaktif kullanılarak yapılan absorban ölçümleri.	43
Tablo 4.6 : Sürfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları.	44
Tablo 4.7 : Katalizör ve denatüran ajanlar eklendiğinde elde edilen sonuçlar.	45
Tablo 4.8 : İki farklı seviye kalite kontrol malzemesi kullanılarak gerçekleştirilen kesinlik ve doğruluk deneylerinden elde edilen veriler.	50
Tablo 4.9 : Düşük seviye kalite kontrol malzemesiyle yapılan kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi istatistik sonuçları.	51
Tablo 4.10 : Yüksek seviye kalite kontrol malzemesiyle yapılan kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi istatistik sonuçları.	51
Tablo 4.11 : Limit of Blank hesaplaması için yapılan ölçümlerin sonuçları.	54
Tablo 4.12 : Limit of Detection ve Quantitation hesaplaması için yapılan ölçümlerin sonuçları.	55
Tablo 4.13 : Doğrusallık tespiti için yapılan çalışma sonuçları.	56
Tablo 4.14 : İki farklı seviye iç kalite kontrol materyali ve sertifikalı referans materyal ile %TAH hesaplaması için yapılan tekrarlı ölçüm sonuçları.	64
Tablo 4.15 : Carryover çalışması sonuçları.	66
Tablo 4.16 : Geri-kazanım çalışması sonuçları.	67
Tablo 4.17 : İyonların girişim değerlendirmesi sonuçları.	68
Tablo 4.18 : Hemoliz, ikter ve lipemi interferens değerlendirmesi sonuçları.	69
Tablo 4.19 : 9 Kasım 2018 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.	70
Tablo 4.20 : 10 Aralık 2018 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.	71
Tablo 4.21 : 10 Ocak 2019 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.	72
Tablo 4.22 : 11 Şubat 2019 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.	73
Tablo 4.23 : 11 Nisan 2019 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.	74
Tablo 4.24 : 8 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	75

Tablo 4.25 : 11 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	76
Tablo 4.26 : 14 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	77
Tablo 4.27 : 18 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	78
Tablo 4.28 : 21 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	79
Tablo 4.29 : 25 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	80
Tablo 4.30 : 28 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	81
Tablo 4.31 : 1 Nisan 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.	82

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Hücrel bakır homeostazı [53].....	7
Şekil 2.2 : 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-N-Etil-N-(3-sulfopropil) anilin.....	11
Şekil 2.3 : 3,5-diBr-PAESA ve bakır kompleksinin renk değişimi.....	12
Şekil 4.1 : 40 µM CuSO4 içeren standart ve 200 µM 5-Br-PAPS içeren reaktif karışımının spektrum taraması.....	35
Şekil 4.2 : pH=pKa ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamında yapılan absorban ölçümlerinin karşılaştırması.....	37
Şekil 4.3 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan ölçümlerin karşılaştırması.....	38
Şekil 4.4 : Sürfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçlarının karşılaştırması.....	39
Şekil 4.5 : 40 µM 3,5-DiBr-PAESA çalışma reaktifinin spektrum taraması.....	40
Şekil 4.6 : 40 µM CuSO4 içeren standart ve 40 µM 3,5-DiBr-PAESA içeren reaktif karışımının spektrum taraması.....	41
Şekil 4.7 : pH=pKa ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamında yapılan absorban ölçümlerinin karşılaştırması.....	42
Şekil 4.8 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan absorban ölçümlerinin karşılaştırması.....	43
Şekil 4.9 : 40 µM CuSO4 içeren standart kullanılarak değişen glukoz ve sodyum sülfat konsantrasyonlarının elde edilen absorban etkisi.....	46
Şekil 4.10 : 0-40 µM CuSO4 içeren standart çözeltilerle oto-analizör üzerinde yapılan deney sonuçlarının karşılaştırması.....	48
Şekil 4.11 : Serum havuzu (110 µg/dl) kullanılarak oto-analizör üzerinde yapılan ölçümün grafiği.....	48
Şekil 4.12 : AAS ve kolorimetrik yöntemle yapılan ölçümlerin dağılımı (µg/dl).....	52
Şekil 4.13 : Sonuçların Bland-Altman Dağılım grafiği.....	53
Şekil 4.14 : Linearite grafiği.....	56
Şekil 4.15 : Düşük seviye (32 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=3.2).....	57
Şekil 4.16 : Orta seviye (127 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=12.7).....	57
Şekil 4.17 : Yüksek seviye (318 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=31.8).....	58
Şekil 4.18 : RIQAS Bakır Ölçümü Dış Kalite Kontrol değerlendirmesi Mayıs 2019 sonucu, genel görünümü.....	59
Şekil 4.19 : Mayıs 2019 dış kalite kontrol değerlendirmesi SD, ortalama, %CV, Um, SDPA değerleri.....	61
Şekil 4.20 : Standart sapma ve hedef skordan sapma grafikleri.....	62
Şekil 4.21 : %Sapma zamana göre ve konsantrasyona göre dağılım grafiği.....	63
Şekil 4.22 : Referans aralık belirleme çalışması sonucu.....	83

TAM OTOMATİK BAKIR ÖLÇÜM KİTİNİN GELİŞTİRİLMESİ

ÖZET

Klinik kimya hastalıkların tanı ve tedavisinde uygulanan tetkiklerle ilgilenir. Tıp alanında uygulanan laboratuvar testlerinin temelini otomatize analizörler oluşturmasına rağmen bir çok analitin tayini hala otomatize sistemlere uyumlu hale getirilememiştir. Bakır tayininde otomatize bir teknik olmayan atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) yaygın olarak kullanılmaktadır. AAS her laboratuvarda sürekli uygulanan, kolay ulaşılabilir bir teknik değildir ve yapılacak ölçümler için örneklerin dış laboratuvarlara gönderilmesi gerekmektedir. Örneklerin dış laboratuvarlara gönderilmesiyle tetkikin sonucunun doktora ulaşması gecikmekte ve tetkik maliyetleri artmaktadır.

Eser elementlerin pratik yöntemlerle ölçülebilmesi ve miktarlarında gerçekleşen değişimlerin takip edilebilmesi önemlidir. Bu elementler, çok önemli fizyolojik olaylarda görev alan enzimlerin yapı ve fonksiyonunda görevlidir. Bakır, demir metabolizması, hücre solunum, serbest radikallerin etkisiz hale getirilmesi, bağ doku elemanlarının, nörotransmitter maddelerin sentezi ve sinir sisteminde sinyal iletimi başta olmak üzere bir çok metabolik yolakta anahtar rolü oynayan enzimlerin yapısında bulunur. Bakır metabolizmasındaki bozukluklar, eksikliğinde ve fazlalığında ciddi klinik bulguların görüldüğü bir çok hastalığa sebep olur.

Bu çalışmada, AAS'ye ve piyasada kullanılan fakat verimli olmayan otomatize yöntemlere alternatif olarak doğru sonuçlar veren, raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süresi uzun otomatize bir kolorimetrik bakır ölçüm kiti geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin klinik kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi hedeflenmiştir.

Amaca yönelik olarak manuel ve otomatize spektrofotometri teknikleri kullanılarak reaktifler geliştirilmiş ve bu reaktiflerin klinik kullanıma uygunluğunun değerlendirmesi için performans ve stabilite değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.

Geliştirilen yöntemin %CV değeri 2'nin altında, hata değeri -1 ile 1 arasındadır. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında AAS ile 0.96 oranında korelasyon gözlemlenmiştir. Yapılan regresyon analizi sonucu elde edilen r^2 değeri 0.95'tir. LoB 0.178 µg/dl, LoD 0.607 µg/dl, LoQ 3.207 µg/dl, toplam analitik hata 1.89, sigma 3.62, ölçüm belirsizliği 2.87, genişletilmiş ölçüm belirsizliği 5.74 olarak tespit edilmiştir. Yöntem 4-1000 µg/dl aralığında doğrusaldır. Carry-over gözlemlenmemiştir. Çinko, magnezyum, kobalt ve demir iyonları ölçümlerde interferense sebep olmamaktadır. Raf ömrü en az 6 ay, cihaz üzerinde kullanım süresi en az 30 gün olarak tespit edilmiştir. Referans aralığı 91-185 µg/dl olarak belirlenmiştir. Kesinlik, doğruluk, yöntem karşılaştırması, tespit kabiliyeti, doğrusallık, carry-over, girişim, raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirilen yöntemin klinik kullanıma uygun olduğu, altın standart yöntemle korele sonuçlar verdiği ve benzer kitlerden daha üstün performans sergilediği gözlemlenmiştir. Ülkemiz şartlarında üretimi mümkün dünya standartlarında performans sergileyen yeni bir ölçüm yöntemi geliştirilmiştir.

Anahtar kelimeler: bakır, oto-analizör, kolorimetri, performans değerlendirmeleri

FULLY-AUTOMATED COPPER MEASUREMENT KIT DEVELOPMENT

SUMMARY

Clinical chemistry deals with laboratory tests performed for diagnosis and treatment follow-up of diseases. Laboratory tests performed in medicine are heavily based on automated analyzers, however, analysis of many analytes have not yet been adapted to automated systems. For analysis of copper in biological fluids, AAS, a non-automated and not easily available technique is widely used. AAS is a technique that is not easy-to-perform and readily available in most hospital's routine clinical chemistry laboratory. Therefore, samples are transported to outside laboratories for copper measurement. This transport increases the costs and causes a delay in report of results to the requesting physician.

Quick and easy analysis and follow-up of levels of trace elements is important. These elements carry very important roles in function and structure of key enzymes in important metabolic pathways. Copper plays key roles in many metabolic events such as iron metabolism, cellular respiration, free radical detoxification, synthesis of connective tissue elements and neurotransmitters, and neuronal signaling. Disorders of copper metabolism result in diseases with devastating clinical findings in case of deficiency and accumulation of copper.

In this study, development and performance evaluations of a new reliable and stable automated clinical chemistry method for copper measurement was aimed as an alternative to AAS and unstable and unreliable colorimetric techniques.

Automated spectrophotometry techniques were used for this purpose. New reagents were developed and the performance of the new technique was analyzed for suitability in clinical use. CV% was lower than 2, bias was between -1 and 1. 0.96 correlation was observed with AAS. R^2 was 0.95 on regression analysis. LoB 0.178 $\mu\text{g/dl}$, LoD 0.607 $\mu\text{g/dl}$, LoQ 3.207 $\mu\text{g/dl}$ were observed. Total analytical error was 1.89, sigma was 3.62, combined measurement uncertainty was 2.87 while expanded measurement uncertainty was 5.74. The method is linear between 4-1000 $\mu\text{g/dl}$. No carry-over effect was observed. No interference with zinc, magnesium, cobalt and iron ions were observed. Shelf-life is at least 6 months, and on-board stability was at least 25 days. Reference interval is 91-185 $\mu\text{g/dl}$. The method is suitable for clinical use.

A new method with performance suitable for global standards and producible in Turkey is developed.

Keywords: copper, automated analyzers, colorimetry, performance evaluation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Sağlık alanında yapılan uygulamaların tamamına yakını mutlaka laboratuvar tetkikleriyle desteklenmektedir. Dolayısıyla, bu tetkiklerin gerçekleştirilmesi ve sonuçların raporlanmasıyla ilgilenen Klinik Biyokimya bilimi hastalıkların tanısı ve tedavi takibinde önemli bir yere sahiptir. Yapılan tetkikler esnasında çok çeşitli cihazlar ve yöntemlerden faydalanılır. 1970'lerde başlayan klinik kimya analizörlerinin otomatize hale getirilmesi, ön işlemlerin ve insan eliyle yapılan uygulamaların mümkün olduğunca ortadan kaldırılmasına yönelik çalışmalarla dünyanın her yerindeki laboratuvarlarda kolayca ve güvenilir şekilde uygulanabilecek otomatize sistemlere uyumlu tekniklerin geliştirilmesi Klinik Biyokimya alanında önemli bir yere ulaşmıştır [1]. Tıp alanında uygulanan laboratuvar testlerinin temelini otomatize analizörler oluştursa da bir çok analitin tayini hala otomatize sistemlere uyumlu hale getirilememiştir.

Klinik kimya analizörlerinde ağırlıklı olarak spektrofotometrik ölçüm yöntemlerinden faydalanılır. Bakır tayininde kolorimetrik otomatize metotların stabil ve güvenilir olmaması sebebiyle daha çok altın standart yöntem olarak tanımlanan otomatize bir teknik olmayan atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) kullanılmaktadır [2, 3]. AAS her laboratuvarında sürekli uygulanan, kolay ulaşılabilir bir teknik değildir ve yapılacak ölçümler için örneklerin sıklıkla dış laboratuvarlara gönderilmesi gerekmektedir. Örneklerin dış laboratuvarlara gönderilmesiyle maliyet ve iş yükü artmakta, aynı zamanda da sonuçların tetkiki isteyen doktora iletme süresi uzamaktadır. Son yıllarda, oksidatif stres ve eser elementlerin rolüyle ilgili çalışmaların artmasıyla hastalıkların etiyolojisinde bakırın, özellikle nöro-dejeneratif hastalıklar başta olmak üzere, bir çok hastalıkta önemli bir rol oynadığı ortaya koyulmuştur [4, 5]. Eser elementlerin pratik yöntemlerle ölçülebilmesi ve miktarlarında gerçekleşen değişimlerin takip edilebilmesi bu sebeplerle önemlidir.

Çalışmamızda, AAS'ye ve piyasada kullanılan fakat verimli olmayan otomatize yöntemlere alternatif olarak doğru sonuçlar veren, raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süresi uzun otomatize klinik kimya analizörleri ile uygulanacak bir bakır ölçüm kiti

geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin klinik kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi hedeflenmiştir. Belirlenen amaç doğrultusunda, bakır iyonlarının spektrofotometrik olarak ölçümünü mümkün kılan kromojen moleküllerin en yüksek sinyalleri vereceği reaksiyon ortamının belirlenmesi amacıyla çalışmalar yapılmıştır. Reaksiyon ortamının elemanları olarak tampon bileşenleri, surfaktanlar, denatüran ve katalizörler değerlendirilmiştir. Elde edilen reaktifle performans ve stabilite değerlendirmeleri gerçekleştirilmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

Klinik biyokimya sağlıkta ve hastalıkta biyokimyasal mekanizmaların, tanı, ayırıcı tanı ve prognoz tayinindeki testlerin seçimi, tekniği, analiz sonuçlarının yorumlanması ve klinisyenlerin konsültasyonunu da içeren, tıbbı özgün bir laboratuvar bilimidir [6]. Klinik biyokimya laboratuvarlarında, biyolojik materyallerde, hastalıkların tanısı, ayırıcı tanısı, şiddetinin belirlenmesi, sağaltımının izlenmesi, bulgu vermeyen bir hastalığın ortaya çıkarılması amacıyla laboratuvar analizleri yapılır. Bu analizler yapılırken çözelti içerisinde aranan maddenin ölçümünü mümkün kılan kimyasal maddeler içeren karışımlar kullanılır ve bu karışımlara kit adı verilir.

Hastalıkların tanısı, ayırıcı tanısı ve takibinde yapılan biyokimyasal testlerin sayısı ve niteliği her geçen gün artmakta, biyokimyasal analizler manuel metotlarla değil, büyük oranda ileri teknolojilerin kullanıldığı otomatize analizörler olarak adlandırılan çeşitli cihazlar ve otomasyon sistemleri kullanılarak yapılmaktadır. Vücut sıvılarında bakır ölçümü için yaygın olarak kullanılan atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) pratik ve kolay ulaşılr olmaktan uzaktır. Bakır eksikliği ve toksisitesi önemli klinik bulguları olan bir durumdur. Bu nedenle, hastaların bakır düzeylerinin pratik ve kolayca ulaşılabilen bir yöntemle takip edilebilmesi önemlidir. Her hastanenin rutin biyokimya laboratuvarında bulunan otomatize analizörlerde bakır ölçümünün yapılabilmesi bu sebeple önem taşımaktadır.

2.1 Elementlerin Sınıflandırılması

İnsan vücudunda bulunan elementler vücutta buldukları ve günlük diyetle alınması gereken miktarlara göre makro elementler ve mikro (eser) elementler olarak ikiye ayrılır. Makro elementler insanda en az 5 gram bulunan elementler olarak tanımlanırken, 5 gramdan az bulunanlar eser elementler olarak adlandırılırlar [7].

Eser elementler, vücut sıvılarında $\mu\text{g/l}$, dokularda $\mu\text{g/g}$ düzeylerinde bulunur. Bu elementler; demir, iyot, kobalt, çinko, mangan, krom, molibden, vanadyum, brom, flor, kadmiyum, kurşun, strontiyum, lityum ve kalay olarak sıralanabilir [6].

Diyetle alımı kısıtlandığında organizmanın normal işleyişinin bozulmasına ve sağlık üzerinde çeşitli etkiler gözlenmesine sebep olan elementler esansiyel elementler olarak adlandırılır. Bu elementlerin eksikliğinin sebep olduğu bulgular genelde elementin yapısında ve fonksiyonunda görevli olduğu bilinen enzimlerin gerçekleştirdiği reaksiyonun aksamasından kaynaklanır [8]. Esansiyel eser elementler demir, çinko, bakır, kobalt, iyot, molibden ve selenyumdur [9].

Demir metabolizması, anti-oksidan savunma, nöropeptitlerin sentezi ve bağışıklık sistem fonksiyonları gibi çok önemli metabolik olaylarda görevli çeşitli enzimlerin çalışmasında vazgeçilmez görevleri olan bakır önemli bir esansiyel elementtir [10]. Bakırın metabolizmadaki esansiyel rolü ilk olarak 1920'lerde yapılan hayvan deneyleriyle ortaya koyulmuştur [11].

2.2 Bakır

Bakır, tüm canlı organizmaların işleyişinin sürdürülebilmesinde çok önemli görevleri olan enzimlerin yapı ve fonksiyonlarında yer alan bir esansiyel eser elementtir. Bakırın redoks aktif bir element oluşu elektron transfer reaksiyonlarında önemli bir rol oynamasına sebep olur. Bir çok enzim görevini gerçekleştirebilmek için bakırın, Cu^+ ve Cu^{2+} formları arasında yapabildiği redoks geçişten faydalanır [12]. Serüloplazmin, sitokrom c oksidaz, lizil oksidaz, tirozinaz, dopamin hidroksilaz ve süperoksit dismutaz bakırın yapısında ve fonksiyonunda görevli olduğu enzimler arasından en önemlileridir [13, 14]. İnsanda görevli önemli bakır proteinlerinin bazıları Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Hücrel bakır taşıyıcılarındaki mutasyonların sebep olduğu hastalıklarla ilgili yapılan çalışmalarla insan metabolizmasında bakırın rolü daha da iyi anlaşılmıştır [15]. X kromozomuna bağlı Menkes hastalığı ATP bağımlı bir bakır taşıyıcısı olan ATP7A geninde gerçekleşen mutasyon sonucu görülür. Bu mutasyonu taşıyan çocuklarda bakır eksikliği, hipotermi, nöronal dejenerasyon, gelişim ve zeka geriliği, saç, deri ve bağ doku anomalileri, kemik yapısının sağlam olmayışı, aort ve diğer büyük arterlerin yapısındaki elastik liflerin yırtılmalara ve parçalanmaya meyilli oluşu gibi vasküler anomaliler kendisini gösterir ve bu çocuklar genellikle dört yaşına gelmeden ölürlere [16, 17].

Tablo 2.1 : Memelilerde bulunan bazı önemli kuproenzimler

Enzim İsmi	Bulunduğu yer	Görevi	Kaynak
Serüloplazmin	Plazma	Ferröz iyonlarının (Fe^{2+}) ferrik iyonlarına (Fe^{3+}) oksidasyonu	[15, 18, 19]
Cu/Zn süperoksit dismutaz	Sitoplazma ve mitokondri	Serbest radikallerin detoksifikasyonu	[20-23]
Tirozinaz	Melanositler	Melanin pigmenti sentezi	[18, 24]
Sitokrom oksidaz	Mitokondri iç membranı	Elektron transport sistemi	[17, 25-27]
Dopamin-beta-hidroksilaz	Sinir uçları	Nörotransmitter sentezi	[28-30]

Enzimatik fonksiyonların gerçekleştirilmesinde önemli olan bakırın redoks aktivitesi aynı zamanda bakırın potansiyel olarak toksik özellik göstermesine de sebep olur. Bakır, serbest radikal oluşumuna ve dolayısıyla DNA, lipit, protein ve diğer biyomoleküllerin hasar görmesine sebep olabilir [31, 32]. Bu sebeplerden dolayı bakır serbest olarak bulunamaz, her zaman çeşitli yapılarla kompleks halindedir [33, 34]. Bakır toksisitesinin sonuçları ATP7B mutasyonundan kaynaklanan Wilson hastalığının keşfedilmesi ve mekanizmasının anlaşılmasıyla ortaya koyulmuştur [5, 35].

İnsan vücudunda 1.4–2.1 mg/kg düzeylerinde bakır bulunur [10]. Gıdalarla alınan bakır, enterositler tarafından başlıca duodenumda emilir [36, 37]. Günlük bakır ihtiyacı yetişkinlerde 0.70 mg/gün, çocuklarda 0.26–0.68 mg düzeyindedir [38]. Enterositler tarafından emilen bakırın kullanılması ve düzenlenmesinde birincil olarak rol oynayan organ karaciğerdir. Karaciğer, bakırın vücuttaki miktarını, serum ve dokulardaki bakır dağılımını ve fazla bakırın vücuttan uzaklaştırılmasını kontrol eder [39].

2.2.1 İnsanda bakır metabolizması

İnsan vücudunda bakır çoğunlukla proteinlere bağlı olarak bulunur ve serbest bakır miktarının hücre başına 1 atom düşecek kadar az olduğu bildirilmektedir [34]. Dolaşımda bulunan bakır plazma proteinleri tarafından taşınır. Plazmadaki bakır taşıyıcı proteinler serüloplazmin, albumin ve transkupreindir. Serüloplazmin bakırın

%70 kadarını taşıırken, kalan %30'un çoğunluğu albumin tarafından olmak üzere plazma proteinleri tarafından taşınır (Tablo 2.2) [40].

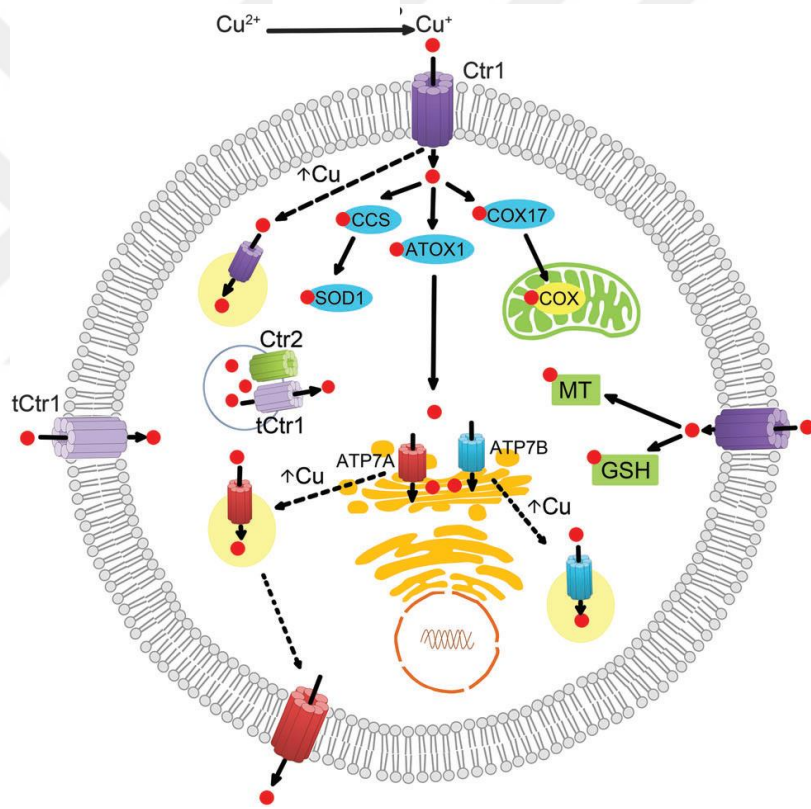
Tablo 2.2 : İnsan plazmasında bakır taşınmasını sağlayan yapılar.

Plazma proteini	Taşıdığı bakır oranı
Serüloplazmin	%65-70
Albümin	%12-18
Transkuprein	%9
Aminoasit ve küçük peptitler	%7
Diğer	%3

Memeli hücreleri tarafından bakırın hücre içine nasıl alındığı henüz tam aydınlatılamamıştır. Plazma proteinleri tarafından taşınan Cu^{2+} plazma membranında bulunan taşıyıcılara iletilmekte ve redüktaz görevi olan enzimler tarafından Cu^{1+} 'e dönüştürülerek hücre içerisine alındığı öngörülmektedir [41]. Metaloredüktazlar ailesinden Steap 3 ve 4 proteinlerinin özellikle hepatosit ve embriyonik fibroblast hücrelerinde bakırın redüksiyonunu gerçekleştirdiği gözlemlenmiştir [41, 42]. Bakırın hücre içine alınması esnasında görev yapan birincil protein hCtr1 olarak tanımlanmıştır, fakat böbrek, karaciğer ve meme dokusu hücrelerinde farklı bakır taşıyıcı proteinlerin varlığı da tespit edilmiştir [43, 44]. Divalent metal transporter 1 (DMT1) ve Ctr2 bakır taşıyıcı olarak görev yaptığı gösterilen diğer proteinlerdir [26, 28, 45].

Hücre içerisine alınan bakır, metal şaperon proteinler olan ATOX1 ve CCS'ye bağlanır ve hücre içinde kullanılacakları yerlere gönderilmek üzere veziküllere yüklenir [46]. Son dönemde yapılan çalışmalarda, Ctr1 ile şaperonların direk bir ilişkisinin bulunmadığı glutatyonun (GSH) hücre içine bakır girişinden sonra bakırın ilk kabul eden molekül olduğunu destekleyen bulgular elde edilmiştir [47]. Yapılan *in vitro* çalışmalarla elde edilen sonuçlar, glutatyondan şaperonlara bakır aktarımını öngören bir model öne sürmektedir [27, 29]. CCS bakır/çinko süperoksit dismutaz enzimine bakır aktarımını, COX17 ise sitokrom c oksidazın yapısındaki bakırın enzimle birleşmesini sağlayan şaperonlardır [48]. ATOX1 bakır ATPazlar olarak adlandırılan

ATP7A ve ATP7B'ye bakır aktarımında birincil rol oynamaktadır [30]. Bu ATPazlar bakırın safraya atılması ve fazla bakırın hücre dışına gönderilmesinde görevlidir [49]. Bakır ATPazları bakırın taşınması ve fizyolojik görevlerini yerine getirmesinde kritik bir öneme sahiptir [23]. Bu iki taşıyıcı protein bakırın kuproenzimlerin yapısındaki yerini alması için sekretuvar yolağa gönderilmesi ve fazla bakırın hücreden uzaklaştırılması olarak ikili görevi sayesinde organizmanın bakır homeostazında rol oynar [50]. ATP7A peptidilglisin alfa-amidating monooksijenaz (PAM), tirozinaz, ekstraselüler SOD3, dopamin beta-hidroksilaz ve lizil oksidaz gibi enzimlere bakır aktarımını sağlar [24, 51]. ATP7B ise apo-serüloplazmine bakır aktarılmasında rol oynar (Şekil 2.1) [52].



Şekil 2.1 : Hüresel bakır homeostazı [53]

2.2.2 Bakır metabolizması ile ilişkili hastalıklar

ATP7B mutasyonu sonucu görülen ve bakır toksititesi bulguları ile ortaya çıkan Wilson hastalığı ve ATP7A mutasyonu sonucu bakır eksikliği semptomları sergileyen Menkes Hastalığı bakır metabolizmasıyla ilgili bozuklukların en belirgin örnekleridir [54]. Wilson hastalığında bakır atılımının sağlanamaması sonucu dokularda bakır

birikimi, Menkes hastalığında bakır eksikliği dolayısıyla organların işleyişinde bozukluklar gözlemlenir [55].

Alzheimer, Parkinson, amiyotrofik lateral skleroz (ALS), prion hastalıkları gibi çeşitli proteinlerin yapısının bozulması ve dokularda depolanması ile nörodejenerasyona sebep olan hastalıklarda da bakır toksisitesinin rolünün olduğu özellikle son yıllarda yapılan çalışmalarda gösterilmektedir [18, 56-59].

2.2.3 Bakır eksikliği ve klinik bulguları

Diyetle alınan günlük bakır miktarı 0.6-1.6 mg düzeyindedir [60]. Çeşitli hastalıklar sebebiyle gözlemlenen malnutrisyon haricinde insanda diyete bağlı bakır eksikliği nadir olarak görülür [61]. Diyetle aşırı çinko alımı, gastrik ameliyatlar ve malabsorpsiyon bakır eksikliğine sebep olan durumlar olarak sıralanabilir. Çinkonun diyetle fazla alınması durumunda metalotiyoineinlere fazlaca bağlanarak bakırın emilimine engel olduğu rapor edilmiştir [62].

Menkes Hastalığı (MH), X'e bağlı kalıtım gösteren resesif bir hastalıktır. ATP7A geninde gerçekleşen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar ve bakır eksikliğinin en ciddi klinik bulguları bu hastalıkta görülür [16, 55, 63]. Hastalığın semptomları doğumdan sonraki ilk aylarda görülmeye başlar ve ciddi vakalarda çoğunlukla erken çocukluk döneminde ölümle sonuçlanır. ATP7A protein fonksiyonunun azalması veya tamamen kaybı, intestinal bakır emiliminin bozulması sonucu enterositlerde bakır birikimi ve sistemik bakır eksikliğine sebep olur [64]. Bakır-bağımlı önemli enzimlerin görevini yerine getirememesi sonucu çok çeşitli klinik bulgular gözlemlenir. Sinir sisteminin gelişmemesi, nöbetler, bağ doku ve vasküler sistem anomalileri, saç ve deri anomalileri, gelişme geriliği genellikle görülen bulgulardır [65]. Erken tanı ve tedavi hastalığın seyrinde önemlidir, fakat hastalığın ileri formlarında bakır replasmanı ile tedavi sağlanamayabilir [66].

Oksipital Boynuz Sendromu (OBS), ATP7A gen mutasyonu sonucu görülen daha hafif belirtilerle ortaya çıkan bir hastalıktır [67, 68]. Klinik bulguların MH kadar ciddi olmayışı, ATP7A'nın fonksiyonunun tamamen kaybolmadığını gösterse de ciddi bağ doku bozuklukları lizil oksidaz aktivitesinin ileri düzeyde etkilendiğine işaret etmektedir [64].

ATP7A mutasyonu sonucu gözlemlenen bir diğer klinik fenotip distal herediter motor nöropati semptomlarıyla tanımlanmaktadır [69]. Başlangıcı çok küçük yaşlardan

60'lı yaşlara kadar görülebilirken, bakır metabolizmasında çok ciddi problemler gözlenmez. ATP7A'nın daha çok motor sinir hücrelerinde anormal fonksiyon göstermesiyle genelde distal motor kas zayıflığı sonucu el ve ayak deformiteleri ve fonksiyon kaybı görülür [70].

2.2.4 Bakır fazlalığı ve klinik bulguları

Wilson Hastalığı (WH) otozomal resesif kalıtım gösterir ve ATP7B geninde gerçekleşen mutasyonlar sonucu ortaya çıkar [71]. Esas olarak karaciğer ve beyinde bakır birikimine bağlı bulgular görülür [72]. ATP7B fonksiyon kaybı sonucu safraya bakır atılımı bozulur ve karaciğerde oluşan bakır birikimi, apoptotik hücre ölümü, karaciğer hasarı, plazmada ve serebrospinal sıvıda bakır miktarının artması ile sonuçlanır [73, 74]. Böylece safra yoluyla uzaklaştırılmayan fazla bakır karaciğer, beyin, kornea ve böbrek gibi çeşitli dokularda birikerek fonksiyon kaybına sebep olur [75-77]. WH tedavisinde güncel yaklaşımlar fazla bakırın şelatör ajanlar aracılığıyla vücuttan uzaklaştırılması ve enterositlerden bakır emiliminin azaltılması için çinko takviyesi verilmesini içerir [62, 73, 78, 79]. Şelatörler aracılığıyla bakır seviyeleri normal düzeylere indirildikten sonra, çinko tedavisiyle hastalığın seyri takip edilmektedir [80, 81].

2.2.5 Bakır ve nörodejeneratif hastalıklar

Sinir sisteminde genel metabolik görevlerinin yanı sıra, nörotransmitter sentezi ve sinyal iletiminde bakırın özel görevleri de bulunur [82]. MH ve WH' de görülen nörolojik semptomlar bakır eksikliği ya da birikiminin sinir sistemini nasıl etkileyebileceğini en iyi gösteren ileri derece örneklerdir [83, 84]. Alzheimer (AH), Parkinson (PH) ve Huntington (HH) gibi çeşitli nörodejeneratif hastalıklarda bakır homeostazında bazı değişiklikler görüldüğü bildirilmiştir [85-87].

Ekstraselüler senil plaklar ve intraselüler nöro-fibril yumakları AH'nin önde gelen patolojik bulgularıdır [88, 89]. Senil plakların yapısını Amiloid beta proteini oluşturur ve bu proteinin üretimi, öncülü amiloid prekürsör protein (APP) tarafından katalizlenen reaksiyonla gerçekleşir [90]. APP, Amiloid beta ve senil plakların yapısında bakır konsantrasyonunun arttığı daha önce yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [91]. Aynı zamanda bakır konsantrasyonundaki artışın amiloid beta birikimine katkıda bulunduğu *in vitro* çalışmalarla da ortaya koyulmuştur [92]. Bu bulgular senil plaklarda amiloid beta birikiminin bakırdan etkilendiğini destekleyen

bulgulardır [93]. Senil plaklarda görülen bakır birikimine rağmen çevre doku ve hücrelerde bakır eksikliği görülür [94]. Anormal dağılım dolayısıyla beyinde metabolik olayların gerçekleşmesi için ihtiyaç duyulan bakırın kullanılamaz hale geldiği ve nörodejenerasyonu tetiklediği öngörülmektedir [95]. Bu bulgulara rağmen, bakır metabolizması ile AH ilişkisi henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

Parkinson hastalığının tanımlayıcı patolojik bulguları substantia nigra da nöromelanin içeren dopaminerjik nöronların kaybı ve alfa-sinüklein birikimi sonucu görülen Lewy cisimcikleridir [96]. Dinlenme tremoru, bradikinezi, rijidite, kognitif ve psikiyatrik problemlerle tarif edilen Parkinsonizm bulguları nörolojik WH’de sıkça görülür [84, 97]. Bakırın alfa-sinüklein birikimi ve bağlanması artırdığı ve substantia nigra da bulunan nöronlar tarafından kullanılacak bakır miktarını azalttığı yakın dönemde yapılan çalışmalarla gösterilmiştir [98]. Bakır homeostazında değişiklikler gerçekleştiği hayvan ve insan çalışmalarıyla gösterilmiş olmasına rağmen PH’de bakır metabolizmasının rolü henüz tam olarak aydınlatılamamıştır [99].

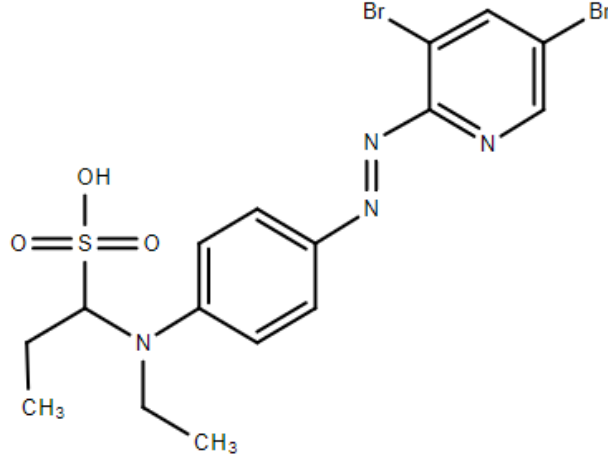
2.2.6 Bakır ve kanser

Hayvan ve insan üzerinde yapılan çalışmalar bakır düzeyleriyle çeşitli kanserler arasında ilişki olduğunu göstermiştir [100, 101]. Lenfoma, larinks, serviks, mide ve akciğer kanserleri gibi çok sayıda kanserde serum bakır düzeylerinde artış olduğu gözlemlenmiştir. Kolorektal ve meme kanserlerinde serum bakır düzeylerindeki artışın kanserin aşaması ve gidişatıyla korelasyon gösterdiğini raporlayan çalışmalar mevcuttur [102]. Çeşitli malignitelerde bakır düzeylerinin değişmesi anti-kanser tedavide bakır düzeylerinin hedeflenebileceğini akla getirmiştir ve şelatör ajanlar kullanılarak anti-anjiyojenik anti-kanser terapisi uygulanan çalışmalar yapılmaya devam etmektedir [103, 104].

2.3 Klinik Laboratuvarda Bakır Ölçümü

Klinik Biyokimya laboratuvarlarında biyolojik örneklerdeki bakır konsantrasyonunun ölçümü genellikle atomik absorpsiyon spektrometrisi (AAS) ile yapılmaktadır. AAS otomatize bir teknik olmaması ve her laboratuvarda kolayca uygulanamaması sebebiyle pratiklikten uzak ve maliyeti artıran bir yöntemdir [3]. AAS’ye alternatif olarak kromojen 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-N-Etil-N-(3-sulfopropil) anilin (3,5-di-Br-PAESA) molekülünü kullanarak kolorimetrik bakır ölçümü yapmak mümkündür

[105]. 3,5-diBr-PAESA asidik ortamda bakır iyonlarıyla spesifik reaksiyona girerek 520-580 nm aralığında absorbands veren bir kompleks oluşturur (Şekil 2.2).



Şekil 2.2 : 4-(3,5-dibromo-2-piridilazo)-N-Etil-N-(3-sulfopropil) anilin

2.3.1 Spektrofotometrik ölçüm

Spektroskopi, moleküllere yansıtılan enerji ile maddenin etkileşimi esasına dayanarak ölçüm yapan tekniklerin genel adıdır. Uygulanan enerji ile uyarılan atomlarda daha üst enerji içeren bir seviyeye geçiş olur. Miktarını ölçmek istediğimiz maddeyi analiz ederken, uyarılarak yüksek enerji seviyesine çıkan atomların düşük enerji seviyesine dönüş sırasında yaydığı enerji ölçülür.

Absorpsiyon spektrometrisinde en çok kullanılan iki terim transmittans ve absorbands terimleridir. Transmittans, ölçüm yapılan ortam tarafından geçirilen ışın miktarı olarak tanımlanır ve yüzde olarak ifade edilir. Geçen ışık miktarının (I), gönderilen ışık miktarına (I_0) oranlanmasıyla hesaplanır (Denklem 2.1).

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.1)$$

Absorbans, örnek tarafından tutulan ışık miktarıdır ve denklem 2.2'deki formülle hesaplanır.

$$A = -\log_{10} T \quad (2.2)$$

Lambert-Beer kanununa göre bir çözeltiliden geçen ışık miktarı, ışığın çözelti içinde katettiği yol ve çözelti konsantrasyonu ile logaritmik olarak ters orantılı, emilen ışık

miktarı ise doğru orantılıdır. Konsantrasyon arttıkça absorbans artar, transmittans azalır (Denklemler 2.3).

$$A = E \times c \times l \quad (2.3)$$

Klinik kimya analizörü üzerinde yapılan bakır ölçümü 3,5-diBr-PAESA'nın kırmızı renginin bakır ile kompleks oluşturduğunda mora dönüşümü esnasında 572 nm dalgaboyunda ortaya çıkan absorbans değişiminin ölçülmesi ile gerçekleştirilmektedir (Şekil 2.3).



Şekil 2.3 : 3,5-diBr-PAESA ve bakır kompleksinin renk değişimi

2.4 Klinik Laboratuvar Performans Değerlendirmeleri

Yeni geliştirilen ve klinik laboratuvarlarda kullanılacak her yöntem, klinik laboratuvarlarda kullanıma uygunluğun değerlendirilmesi için kesinlik ve doğruluk, metod karşılaştırma, tespit kabiliyeti (analitik sensitivite), doğrusallık (linearite), iç ve dış kalite kontrol, toplam analitik hata, sigma, ölçüm belirsizliği, interferensler, carryover, referans aralık, raf ömrü ve cihaz üzerinde stabilite açısından değerlendirilmelidir [106].

2.4.1 Kesinlik ve doğruluk

Kesinlik belli şartlar altında tekrarlanan ölçümlerin birbirine ne kadar yakın olduğunun tanımlanmasıdır. Hata (bias) yapılan ölçümün sonucu ile ölçülen maddenin bilinen gerçek miktarı arasındaki fark olarak tanımlanır. Kesinlik ve doğruluk

değerlendirmeleri için kalite kontrol malzemeleri kullanılır. 7 gün üst üste aynı kalite kontrol malzemeleriyle tek seferde 5 ölçüm yapılarak elde edilen verilerle ölçümüçi ve ölçümler arası CV, standart sapma, ortalama ve bias hesaplanır [107].

Kabul edilebilir bias ve kesinlik değerlerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılabilir [108]. Bu yöntemler, klinik sonuçların nasıl etkilendiğini gösteren analitik performans çalışmaları, analitin biyolojik varyasyonu göz önünde bulundurularak yapılan hesaplamalar ve ölçüm tekniğinin en yüksek performansına dayalı hesaplamalar olarak sıralanabilir. Biyolojik varyasyon çalışmaları henüz tamamlanmamıştır ve bakır biyolojik varyasyonu henüz belirlenmemiş analitler arasındadır [109, 110]. Ancak referans aralık kullanılarak yapılan deneysel biyolojik varyasyon hesaplamalarının kullanımı mümkündür. Deneysel biyolojik varyasyon hesaplamalarında denklemler 2.4, 2.5 ve 2.6 kullanılır [111].

$$CV_A = (CV_E^* - 0.25)^{0.5} \quad (2.4)$$

CV_E^* referans limitlerinin ($RL_{düşük}$, $RL_{yüksek}$) aşağıdaki denklemde belirtildiği gibi logaritmik hesaplamasıyla elde edilir.

$$CV_E^* = (\exp S_{E,ln}^2 - 1)^{0.5} \quad (2.5)$$

$$S_{E,ln} = \frac{\ln RL_{yüksek} - \ln RL_{düşük}}{3.92} \quad (2.6)$$

Kesinlik değerlendirmeleri için öncelikle tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapılır. Varyans analizi sonucu elde edilen n_0 (her bir ölçümde elde edilen ortalama sonuç sayısı), \bar{x} (sonuçların tamamının ortalaması), MS_1 (gruplar arası karşılaştırmanın mean square değeri), MS_2 (grup içi karşılaştırmanın mean square değeri), V_i (ölçüm içi varyans), V_a (ölçümler arası varyans) değerleri kullanılarak değişim katsayıları hesaplanır. Kesinliğin üç alt başlığı olarak ölçüm içi değişim katsayısı CV (%CV_i), ölçümler arası CV (%CV_a) ve laboratuvar içi CV (%CV_i) (CV) hesaplamalarında denklemler 2.7, 2.8 ve 2.9 kullanılır [107].

$$\%CV_i = \frac{\sqrt{MS_2}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.7)$$

$$\%CV_a = \frac{\left(\frac{MS_1 - MS_2}{n_0}\right)^{0.5}}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.8)$$

$$\%CV_l = \frac{(V_i+V_a)}{\bar{x}} \times 100 \quad (2.9)$$

Doğruluk değerlendirmesi için hata hesaplaması yapılır. Sertifikalı referans materyal için belirtilen hedef değerler (TV) kullanılır. Deneyler sonucu elde edilen veriler kullanılarak \bar{x} (sonuçların tamamının ortalaması) ve $SE_{\bar{x}}$ (ortalamanın standart hatası) hesaplanır [107].

Hata hesaplaması için denklem 2.10 kullanılır.

$$Hata = \bar{x} - TV \quad (2.10)$$

Ortalamanın standart hatası hesaplaması için denklem 2.11 kullanılır.

$$SE_{\bar{x}} = \frac{S_l}{(df_{\bar{x}}+1)^{0.5}} \quad (2.11)$$

$$S_l = (V_i+V_a)^{0.5}, V_i = MS_2 \text{ ve } Va = \frac{(MS_1-MS_2)}{n_0}$$

2.4.2 Metot karşılaştırma

Laboratuvarda uygulanacak yeni bir yöntemin eski yöntemin yerini alıp alamayacağını belirlemek için referans yöntem olarak tanımlanan metotla karşılaştırması yapılır. En az 40 örnek iki metotla da değerlendirilir ve elde edilen verilerle korelasyon ve regresyon analizleri yapılır, dağılım ve fark-ortalama grafikleri değerlendirilir [112, 113].

Referans yöntemle yeni yöntemin arasındaki hata (bias) değerlendirmesi için Bland-Altman grafiğinden faydalanılır [114]. Bu grafik değerlendirilirken 3 farklı sonuçla karşılaştırılabilir. İlki %95 güven aralığında sistematik hata görülmediği ve iki metodun birbirinin yerine güvenle kullanılabileceği anlamına gelir. Bu durumda ölçümlerin en az %95i belirlenen kabul edilebilir hata aralığının içerisinde. İkinci durumda sistematik hata mevcuttur ve ölçümlerin %95i kabul edilebilir hata aralığında olduğu için ölçüm yöntemleri birbirinin yerine kullanılabilir. Burada önemli olan sistematik hatanın klinik kararları etkileyip etkilemediğinin değerlendirilmesidir. Üçüncü durumda ölçüm sonuçları kabul edilebilir hata değerlerini aşar ve yöntemler birbirlerinin yerine kullanılabilir değildir [114, 115].

2.4.3 Tespit kabiliyeti

Tespit kabiliyeti düşük analit konsantrasyonlarında yöntemin performansının değerlendirilmesini mümkün kılan kriterleri içerir. Geliştirilen yöntemin analiti tanıyabilme kabiliyetinin değerlendirmesi için Limit of blank (LoB), Limit of detection (LoD) ve Limit of Quantitation (LoQ) hesaplanır [116-118]. LoB hesaplanırken, içerisinde analit bulunmayan çözelti ile tekrarlı ölçümler yapılır ve kör numunede tespit edilen analit miktarı tespit kabiliyeti limiti (LoB) olarak hesaplanır (Denklem 2.12).

$$LoB = ortalama_{kör} + 1.645(SD_{kör}) \quad (2.12)$$

LoD, LoB'den ayırt edilebilen analit konsantrasyonu olarak tanımlanır. LoD hesaplamasında LoB seviyesinin 5 katı oranında analit içeren standart çözelti düşük konsantrasyonlu örnek olarak kullanılır. 3 gün üstü üste tek seferde 20 tekrarlı olarak ölçüm yapılır ve denklemler 2.13 ve 2.14 kullanılarak hesaplanır [116-118].

$$LoD = LoB + c_p \times SD \quad (2.13)$$

$$c_p = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{4(L-j)}} \quad (2.14)$$

SD= düşük konsantrasyonlu standardın ölçümlerin sonucu elde edilen verinin standart sapması

L=toplam ölçüm sayısı

j= ölçümler esnasında kullanılan düşük konsantrasyonlu örnek sayısı

c_p = düzeltme faktörü

LoQ, kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır [119]. “Fonksiyonel sensitivite” CV=%20 elde edilebilen analit konsantrasyonudur. LoD değerinde analit içeren standartlar kullanılarak üç gün üst üste tek seferde 20 defa olmak üzere toplamda altmış ölçüm yapılır. Standart sapma (SD), değişim katsayısı (CV) ve ortalama hesaplanır, denklem 2.15 kullanılarak LoQ hesaplanır [116].

$$LoQ = LoD + 10SD \quad (2.15)$$

2.4.4 Doğrusallık

Geliştirilen yöntemin analit konsantrasyonu ile ilişkili olarak verdiği sonuçların orantılı olması linearite olarak adlandırılır ve raporlanabilir aralık tespitinde kısıtlayıcı olarak rol oynar. Yöntemin doğrusal olduğu aralığa göre kalibrasyon materyalinin konsantrasyonu belirlenir [120, 121]. Aynı zamanda yöntemle ilgili gelişebilecek problemlerin erken tespit edilmesi ve çözülmesinde de önemlidir [122].

2.4.5 İç (İnternal) Kalite Kontrol

İç kalite kontrol, laboratuvarında yapılan tüm analizlerin ve sonuçların sürekli olarak değerlendirilmesi, günden güne performansın tutarlılığının takip edilmesini içeren kalite kontrol uygulamalarından oluşur [123]. İçerdiği analit miktarı bilinen farklı konsantrasyonlardaki çözeltilerle her gün belirli aralıklarla ölçümler yapılır. Sonuçlar kullanılarak standart sapma ve varyans katsayısı hesaplanarak, Levey-Jennings grafiklerinin çizilmesiyle takip edilir ve değerlendirilir [124].

2.4.6 Dış (Eksternal) Kalite Kontrol

Dünya Sağlık Örgütü, dış kalite kontrolü laboratuvarında uygulanan testlerin ve çıkan sonuçların objektif olarak dışarıdan bir kurum tarafından değerlendirilmesini içeren kontrol uygulamaları olarak tanımlar [125]. Dış kalite kontrol uygulamalarını uygulayan çok çeşitli dış kurumlar mevcuttur. Klinik laboratuvarlar genellikle bu kurumlar tarafından uygulanan eksternal kalite kontrol programlarına kayıtlıdır. Bu kurumlardan gönderilen içerdiği analit miktarı bilinmeyen çözeltilerin ölçümünden elde edilen sonuçların programa kayıtlı tüm laboratuvarlardan toplanması ile elde edilen veriler kullanılarak standart sapma, varyans katsayısı, yüzde sapma, ölçüm belirsizliği gibi parametreler hesaplanır ve düzenli aralıklarla sonuçlar takip edilir [126]. Dış kalite kontrol başka laboratuvarlarla ve başka yöntemlerle karşılaştırma imkanı sunması açısından önemlidir [127].

2.4.7 Toplam Analitik Hata

Toplam analitik hata (TAH) hesaplaması ayrı ayrı değerlendirilen kesinlik ve doğruluk ölçümlerinin birleştirilmesiyle iki önemli performans kriterini de içeren tek bir değer elde edilmesi prensibine dayanır [128]. Kesinlik değerlendirmesi sonucu elde edilen %CV ve doğruluk değerlendirmesi sonucu elde edilen %bias değerleri hesaplamada kullanılır [125]. Bir test sonucuna yansıyan rastlantısal ve sistematik hatanın

toplamıdır. Verilen sonuçların güvenilirliği için izin verilebilir toplam analitik hata sınırlarını aşmamalıdır [110].

2.4.8 Altı Sigma Değerlendirmesi

Sigma değerlendirmeleri endüstride çok yaygın olarak kullanılan hata yapma olasılığını ölçen bir değerlendirme şeklidir [129]. Milyon fırsatta yanlış olasılığı olarak tanımlanır (Tablo 2.3). Laboratuvara uyarlandığında yanlış pozitif ve yanlış negatifler gibi hata olarak tanımlanan sonuçların ortaya çıkması ihtimalini değerlendirir. Endüstrinin bir çok alanında çok uzun yıllardır kullanılan bir üretimi iyileştirme tekniği olmasına rağmen, laboratuvar tıbbına uyarlanması ancak 2000li yıllarda gündeme gelmiştir [130]. Son dönemde, özellikle laboratuvarında kabul edilebilir hata limitlerinin belirlenmesiyle ilgili çalışmaların yoğunlaşmasıyla klinik biyokimya laboratuvarlarında mutlaka hesaplanması ve takip edilmesi tavsiye edilmektedir [131].

Tablo 2.3 : Sigma değerlerinin karşılık geldikleri başarı ve hata oranları.

Başarı oranı (%)	Milyon fırsatta yanlış olasılığı	Sigma
30.9	690 000	1
69.2	308 000	2
99.3	66 800	3
99.4	6 210	4
99.98	320	5
99.99	3.4	6

Sigma hesaplaması yapılırken toplam analitik hatada olduğu gibi internal kontrollerin toplam %CV değerinden ve eksternal kontrolün %bias değerinden faydalanılır. Denklem 2.16'daki hesaplamayla belirlenir.

$$\sigma = \frac{\%TEa - \%Bias}{\%CV} \quad (2.16)$$

%TEa: kabul edilebilir toplam hata

%bias: eksternal kontrolün sapma miktarı

%CV: internal kontrol değerlendirmelerinin varyasyon katsayısı

2.4.9 Ölçüm Belirsizliği

Yapılan ölçümü bütünüyle değerlendirerek elde edilen sonucun ne derece gerçekten çözültü içerisindeki analite ait olduğunu ifade eden aralığa ölçüm belirsizliği denir [132]. Test, reaktiflerin üretiminden sonucun değerlendirilmesine kadar bütün basamaklarıyla değerlendirilir. Ölçüm belirsizliği hesaplamalarında iki farklı yaklaşım söz konusudur. “Aşağıdan yukarıya” yaklaşımda test üzerinde belirsizlik oluşturabilecek her bir faktör taker taker tespit edilerek her birinin belirsizliğe katkısı tek tek hesaplanır. “Yukarıdan aşağıya” yaklaşımda metod performans verileri kullanılır [133].

Her bir belirsizlik kaynağının tek tek tespit edilerek çalışılabilmesinin mümkün olduğu durumlarda aşağıdan yukarı yaklaşımı kullanmak daha doğru olabilir. Fakat çoğunlukla bu yaklaşımla yapılan hesaplamalarda ölçüm belirsizliğinin gerçek değerinin altında tespit edildiği, bazı etkenlerin atıldığı ve hesaplama dahil edilmediği görülmüştür. Bu sebeple, metod geçerli kılma ve performans değerlendirme verilerinin kullanımı tercih edilebilir. Bu yöntemle tüm belirsizlik etkenleri hesaplama daha doğru dahil edilir. İç ve dış kalite kontrol, metod karşılaştırma, metod validasyonu gibi çalışmalarla elde edilen veriler yukarıdan aşağıya doğru yaklaşımda kullanılır [134].

Ölçüm belirsizliği, standart sapma değeri olarak ifade edildiğinde standart belirsizlik olarak adlandırılır. Tüm etkenler hesaba eklendiğinde ortaya çıkan ölçüm belirsizliği değerine birleştirilmiş ölçüm belirsizliği denir. Ölçülen analit konsantrasyonunun daha geniş bir güven aralığında ifade edilmesi için elde edilen birleştirilmiş ölçüm belirsizliği k katsayısı ile çarpılır. %95 güven düzeyi için $k=2$ 'dir [111].

2.4.10 Girişim (İnterferens)

Ölçüm esnasında süreç veya ortamda bulunan maddelerden kaynaklı yanlış sonuç elde edilmesi interferens olarak tanımlanır. İnterferensler, endojen ve eksojen olarak ikiye ayrılır [135]. Endojen interferensler hasta örneğinde bulunan maddelerden kaynaklı olarak gözlemlenirken, eksojen interferensler hasta örneği dışındaki etkenlerden kaynaklanır [136].

Hemoliz, ikter, lipemi gibi biyolojik etkenlerin yanı sıra kullanılan tüpün içeriği, hastanın kullandığı ilaçlar ve cihaz kaynaklı interferensler de yeni yöntem

geliştirilmesi esnasında tespit edilir ve bu interferenslerle başa çıkmak için gerekli önlemler belirlenir [137].

2.4.11 Taşınma (Carryover)

Carryover, bir örnekteki içeriğin tetkik esnasında başka bir örneğe veya reaktife aktarılıp aktarılmadığının tespiti olarak tanımlanır [138]. Carryover tespitinde genel olarak kullanılan iki farklı protokol tanımlanmıştır. Bunlar standart ve kısa protokoller olarak adlandırılır. Kısa protokolde, en yüksek konsantrasyonlu kalibratörün ardından kör numunesi çalışılır. Körden ölçülen absorbans değeri carry-over olarak kabul edilir. LoQ değerinin %20'sinden düşük absorbans alınması carry-over gözlemlenmemesi olarak değerlendirilir. Carryover görülen testlerde klinik kararı nasıl etkilediğinin değerlendirilmesi yapılmalıdır [139].

Carryover interferensleri, reaktifler ve örneklerin cihazdan tam olarak temizlenememesi ve başka reaktif ve örneklere taşınarak ölçümlerde interferense sebep olması olarak tanımlanır [140]. Reaktiflerin birbirine ve örneğe olan etkisi peşpeşe farklı testlerin tekrarlı olarak çalışılması ve sonuçlar üzerinde ne gibi etkilerinin olduğunun değerlendirilmesiyle tespit edilir [141].

2.4.12 Stabilite değerlendirmeleri

Laboratuvarında kullanılacak yöntemlerin raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süreleri özellikle önem arz etmektedir. Cihaz üzerine koyulan bir kitin çalışma esnasında sergilediği performansın takip edilmesi ve performansın değişiklik göstermemesi verilen hasta sonuçlarının sağlıklı olması açısından önemlidir. Raf ömrü ve cihaz üzerinde stabilitenin değerlendirilmesi için belirli aralıklarla aynı reaktif ve kalibrasyon, kontrol malzemeleriyle tekrarlı ölçümler yapılır. Elde edilen verilerle kesinlik ve doğruluk değerlendirmeleri tekrar edilir [142].

2.4.13 Referans Aralığı

Referans aralığı, testi isteyen klinisyenleri laboratuvar tarafından hastalık olmadığı kabul edilen sonuç aralığı konusunda bilgilendirmek amacıyla raporlanır. Bu aralığın belirlenmesi için uygulanan en yaygın yöntem, laboratuvar testinin sonucunu etkileyecek hastalığı bulunmayan bir referans popülasyonun sonuç dağılımının merkezde kalan %95'inin tespit edilmesi şeklindedir [143].

Referans aralık belirleme çalışmalarında tavsiye edilen yöntem “direk yöntem” olarak adlandırılan, referans popülasyonun tespit edilip seçildiği ve bu gruptan alınan örneklerin analiz edilmesiyle elde edilen sonuçların değerlendirildiği yöntemdir [144]. Alternatif olarak sıklıkla uygulanan “indirekt yöntem”de ise rutin maksatlı testler sonucu laboratuvarında biriken sonuçlar kullanılarak referans aralık belirleme çalışmasında kullanılır [145].

Direk yöntem uygulanırken belli bir referans popülasyon tanımlanır. Popülasyonun özelliklerini gösteren bireylerden alınan örneklerle belirlenen analitlerin ölçümü gerçekleştirilir. Direk yaklaşım *a priori* ve *a posteriori* olmak üzere ikiye ayrılır. *A priori* yaklaşımda deneklerin seçimi örnek toplamadan önce, *a posteriori* yaklaşımda örnekler toplandıktan sonra gerçekleştirilir [146]. İndirek yaklaşımda daha önce çalışılıp raporlanmış hasta sonuçları kullanılarak referans aralık belirlenir [144].

Direk yaklaşım önceden planlanmış bir çok basamağın izlenmesiyle elde edilen örneklerin analizi ve bu sonuçların değerlendirilmesiyle gerçekleştirilir. İzlenecek basamakların en temelleri referans popülasyonun tanımlanması, popülasyon özelliklerini taşıyan bireylerin belirlenmesi ve bu bireylerden bilgilendirilmiş onam alınması, örnek toplanması, istatistik değerlendirme olarak sıralanabilir. Çok basamaktan oluşan bu yöntemin uygulanması hem karmaşık hem de maliyetlidir [147].

İndirek yöntemde, direk yöntemin aksine, laboratuvar testleri esnasında elde edilmiş ve zaten ulaşılabilir olan veriler kullanılır. Dolayısıyla direk yöntemde gözlemlenen yüksek maliyet ve zaman gerekliliği bu yaklaşımda yoktur [148]. Bu test sonuçları rutin analizden elde edildiği için aynı zamanda pre-analitik ve analitik şartlardan kaynaklanan değişkenlikler de referans aralığa yansımış olur [149]. Popülasyon özellikleri, pre-analitik ve analitik etkenler gibi test sürecinin farklı yönlerini içerdiği ve uygulaması daha kolay ve maliyetsiz olduğu için indirek yöntem sıklıkla tercih edilir [150].

Çalışmaya dahil edilecek bireyler belirlenirken göz önünde bulundurulması gereken bir çok faktör vardır. Bireylerin ayaktan tedavi edilen hasta grubundan seçilmesi daha uygundur. Denek sayısı belirlenirken mümkün olduğunca yüksek sayıda olması tercih edilir [151]. Referans popülasyon belirlenirken analit konsantrasyonunu etkileyen hastalıklar, yaş, cinsiyet, menstrüel döngü, gebelik, menopoz gibi bir çok faktör göz önünde bulundurulur [148]. Özellikle ölçümü yapılan analitin örnekteki

konsantrasyonunu değiştirdiği bilinen hastalıkları taşıyan bireyler çalışma dışında tutulmalıdır. Elde edilen sonuçların dağılım-sıklık grafiği çizilerek merkezin çevresinde %95'lik dilimde kalan aralık referans aralık olarak kabul edilir [152].



3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyleer Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda 16.10.2017-12.05.2019 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışma, 16.08.2017 tarihli 5136 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi ve 15.08.2017 tarihli 15/228 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir.

3.1 Gereçler

3.1.1 Kimyasallar

Çalışmada kullanılan 3,5-DiBr-PAESA (Europa Bioproducts, Cambridgeshire, İngiltere) hariç tüm kimyasal maddeler Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen, Almanya) üretici firmasından temin edildi. Kullanılan tüm kimyasal maddeler aşağıda listelenmiştir.

Kromojenler

1. 2-(2-(((2-Hidroksi-5-sulfofenil)diazenil)(fenil)metilen)hidrazinil) benzoik asit (Zincon)
2. 2-(5-Bromo-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-sulfopropil)amino]fenol disodium dihidrat tuzu (5-Br-PAPS)
3. 4-(3,5-Dibromo-2-piridilazo)-N-etil-N-(3-sulfopropil)anilin (3,5-DiBr-PAESA)

Tampon bileşenleri

1. Sodyum asetat ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$)
2. Asetik asit ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$)
3. Sodyum sitrat ($\text{HOC}(\text{COONa})(\text{CH}_2\text{COONa})_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
4. Sitrik asit ($\text{HOC}(\text{COOH})(\text{CH}_2\text{COOH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$)

5. Tris baz ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3$)
6. Tris HCl ($\text{NH}_2\text{C}(\text{CH}_2\text{OH})_3 \cdot \text{HCl}$)
7. Borik asit (H_3BO_3)
8. Disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4)
9. Sodyum dihidrojen fosfat (NaH_2PO_4)
10. Hidroksilamin HCl ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$)
11. 4-(2-Hidroksietil)piperazin-1-etansulfonik asit, N-(2-Hidroksietil)piperazin-N'-(2- etansulfonik asit) (HEPES)
12. 3-(Sikloheksilamino)-1-propansulfonik asit (CAPS)
13. 3-(Sikloheksilamino)-2-hidroksi-1-propansulfonik asit (CAPSO)

Standartların hazırlanmasında kullanılan tuzlar

1. Çinko elementi için ZnSO_4
2. Demir elementi için FeSO_4
3. Magnezyum elementi için MgSO_4
4. Kobalt elementi için CoCl_2
5. Bakır elementi için CuSO_4 ve CuCl_2

Surfaktanlar

1. Triton-X 100
2. Etilen glikol
3. Bovin serum albümini
4. Gliserol
5. Adogen 464
6. Empigen BB deterjan
7. Merpol A
8. Metiltrioktil amonyum bromür
9. Liquinox fosfatsız deterjan
10. Sodyum dodesil sülfat (SDS)
11. Tetrametil amonyum klorür
12. Noniyonik surfaktan karışımı
13. Anyonik surfaktan karışımı
14. Brij 35
15. Benzetonyum klorür
16. Alkanol XC

17. Dodesil trimetil amonyum klorür
18. DMMAPS
19. Sodyum 1-dekan sulfonat
20. Tween-20
21. Brij93
22. Brij 58
23. Polietilen glikol
24. Alkanol XC
25. Kloramin T
26. Sodyum lauril sülfat

Denatüranlar ve katalizörler

1. Ditiyotritol
2. Merkaptoetanol
3. Tiyoüre
4. Askorbik asit
5. Sodyum dodesil sülfat
6. Sodyum sülfat
7. Glukoz
8. Borik asit
9. Sodyum tetraborat
10. Sodyum disülfid
11. Dimetil formamid

Koruyucular

1. ProClin 350
2. ProClin 900
3. Sodyum Azid
4. Benzidamin HCl

3.1.2 Cihazlar

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı'nda bulunan manuel spektrofotometre (Schimadzu UV-1800 240V, Japonya), pH-metre (Milwaukee, Mi 151, Rocky Mount, ABD), tartı (DAIHAN Biomedical, SC210, Güney Kore), karıştırıcılar, cam, metal ve sarf malzemeler (ISOLAB Laborgeraete GmbH, Wertheim, Almanya); Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda bulunan Abbott Architect c8000 ve c16000i (Illinois, ABD) otomatize klinik kimya analizörleri kullanıldı. Spektrum taramalarında kuvarz küvet (ISOLAB Laborgeraete GmbH, Wertheim, Almanya) kullanıldı.

3.2 Yöntemler

Kullanılan tüm cam malzemeler (ISOLAB Laborgeraete GmbH, Wertheim, Almanya) %1 nitrik asit ve deiyonize su ile yıkandı. İstatistik analizler için Microsoft Excel Analysis Toolpak uzantısı ve SPSS 22 (IBM Corporation, ABD) kullanıldı.

3.2.1 Standart çözeltiler

2.5, 5, 10, 20, 40 ve 80 μM CuSO_4 , ZnSO_4 , FeSO_4 , FeCl_3 , MnSO_4 , ve CoCl_2 deiyonize su içerisinde çözülerek çalışmada kullanılacak standart çözeltiler hazırlandı. Standartların raf ömrünü uzatmak için farklı derişimlerde HCl, HNO_3 ve H_2SO_4 içeren standartlarla da çalışma yapıldı.

3.2.2 Serum havuzu

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi ve Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izniyle hastane rutin biyokimya laboratuvarına gelen ve istenen testler çalışılıp sonucu verildikten sonra atılacak serum örnekleri kullanıldı. Kuru tüplere alınan serum örneklerinden poliklinik hastaları olan ve eser element değerlerini etkileyecek hastalıkları olmayan en az 50 bireyin serumları seçildi ve eşit miktarlarda karıştırıldı. Geri-kazanım (recovery) çalışmalarında kullanılmak üzere hazırlanan serum havuzuna 2.5, 5, 10, 20 μM CuSO_4 eklenerek serum ortamının ölçüme olan etkisinin değerlendirilmesinde kullanıldı.

3.2.3 Kromojen ajanların dalga boyu spektrumu

100-200 μM kromojen (5-Br-PAPS, Zincon, 3,5-DiBr-PAESA) deiyonize su içerisinde çözüldü. Manuel spektrofotometre ile 280-760 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapıldı.

3.2.4 Kromojen ajan ve bakır iyonlarının oluşturduğu yapının spektrumu

100 μM kromojen kimyasal ve 40 μM CuSO_4 ayrı ayrı deiyonize su içerisinde çözüldü.

Kromojen içeren çözeltilerden 1000 µl ve standart çözeltilerden 100 µl ölçüm küvetine eklenerek karıştırıldı. Manuel spektrofotometre (marka, model vs.) ile 280-760 nm dalga boyları arasında absorbanans spektrumu taraması yapıldı.

3.2.5 Farklı tampon ve pH değerlerinde bakır-kromojen kompleksinin spektrumu

Farklı tampon bileşenleri ile pH 4 ile 10 arasında değişen farklı derişimlerde tampon çözeltileri hazırlandı. Her bir tampon çözelti içerisinde 100 µM kromojen çözülerek çalışma reaktifi hazırlandı. pH değeri ve tampon bileşenleri ile serumun etkileşiminin değerlendirilmesi için serum havuzu kullanıldı. Her bir çalışma reaktifinden 1000 µl, standart çözeltilerden ve serum havuzundan 100 µl spektrofotometre küvetine eklendi ve 280-760 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapıldı. Hazırlanan çalışma çözeltisi ile serumun karışımında bulanıklık oluşması ve bakır-kromojen kompleksinin verdiği absorbanans değerlerine göre değerlendirme yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak çalışmaya en uygun tampon bileşenleri ve pH değerleri belirlendi.

3.2.6 Sürfaktan eklendiğinde oluşan bakır-kromojen kompleksinin spektrumu

Çalışmaya uygun olduğu belirlenen tampon bileşenleri ile belirlenen pH aralıklarında hazırlanan çalışma çözeltilerine uygun surfaktanlar eklendi. Standart çözelti ve serumdan 100 µl, çalışma çözeltisinden 1000 µl spektrofotometre küvetinde karıştırıldı ve 280-760 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak çalışmaya en uygun tampon bileşenleri, pH değerleri ve surfaktanlar belirlendi. Hazırlanan çalışma çözeltisi ile serumun karışımında bulanıklık oluşması ve bakır-kromojen kompleksinin verdiği absorbanans değerlerinin karşılaştırmasına göre değerlendirme yapıldı.

3.2.7 Denatüran ve katalizörler eklendiğinde oluşan bakır-kromojen kompleksinin spektrumu

Çalışmaya uygun olduğu belirlenen tampon bileşenleri ile belirlenen pH aralıklarında hazırlanan çalışma çözeltilerine uygun denatüran ve katalizör ajanlar ayrı ayrı eklendi. Standart çözelti ve serumdan 100 µl, çalışma çözeltisinden 1000 µl spektrofotometre küvetinde karıştırıldı ve 280-760 nm dalga boyu aralığında spektrum taraması yapıldı. Hazırlanan çalışma çözeltisi ile serumun karışımında bulanıklık olması ve bakır-kromojen kompleksinin verdiği absorbanans değerlerinin karşılaştırmasına göre

değerlendirme yapıldı. Elde edilen sonuçlar karşılaştırılarak çalışmaya en uygun tampon bileşenleri, pH değerleri, surfaktanlar, denatüranlar ve katalizörler belirlendi.

3.2.8 Uygunluğu belirlenen çalışma çözeltilerinin otomatize klinik kimya analizöründe uygulanması ve değerlendirilmesi

Çalışmaya uygun olduğu belirlenen kromojen ajan, tampon bileşenleri, surfaktanlar, denatüranlar ve katalizörler farklı konsantrasyon, farklı pH değerleri ve farklı dilüsyon oranları uygulanarak değerlendirildi. Uygulama çalışmalarında 2.5, 5, 10, 20, 40 µM CuSO₄, ZnSO₄ ve FeSO₄ içeren standart çözeltiler ve serum havuzu kullanıldı. Çalışma çözeltileri orantılı absorbans artışı, bulanıklığa işaret eden bulguların olup olmaması, reaksiyon grafiklerinin şekli ve çinko ve demir iyonlarının interferensi açısından değerlendirildi. Orantılı absorbans artışı gösteren, serum havuzu ile bulanıklık bulgusu vermeyen, çinko ve demir iyonlarıyla interferensin gözlemlenmediği ve reaksiyon grafikleri beklendiği gibi gözlemlenen çalışma reaktifleriyle yöntemi geçerli kılma, performans değerlendirme ve stabilite çalışmalarına devam edildi.

3.2.9 Yöntemin geçerli kılınması ve performans değerlendirmeleri

Klinik kimya analizörü üzerinde çalışması uygun olduğu belirlenen çalışma reaktifleri kesinlik ve doğruluk, metot karşılaştırma, tespit kabiliyeti (analitik sensitivite), doğrusallık (linearite), toplam analitik hata, altı sigma, iç ve dış kalite kontroller, ölçüm belirsizliği, geri-kazanım (recovery), girişim (interferens), raf ömrü ve cihaz üzerinde stabilitesi ve referans aralığı açısından değerlendirildi.

3.2.9.1 Kesinlik ve doğruluk

Kesinlik ve hata hesaplamaları tek bir çalışma ile elde edilen veriler kullanılarak yapıldı. Bakır konsantrasyonları bilinen kalite kontrol standartları (Biorad ve Roche) kullanıldı. En az iki farklı seviyede bakır içeren kalite kontrol standartları birbirini takip eden 7 gün boyunca, her gün tek seferde 5 defa tekrarlı ölçüm yapılarak çalışıldı [107]. Elde edilen veriler kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi için kullanıldı.

Kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi için elde edilen verilerle ortalama, standart sapma, tekrarlanabilirlik (ölçüm içi ve ölçümler arası değişim katsayısı-%CV) ve hata (bias) değerleri hesaplandı.

Kabul edilebilir kesinlikten sapmanın hesaplanması için referans aralıkları kullanılarak uygulanan deneysel biyolojik varyasyon yöntemi kullanıldı [111]. Kabul edilebilir kesinlikten sapmanın (imprecision, CV_A) hesaplanması için aşağıdaki denklemlerle ifade edilen hesaplama basamakları izlendi.

$$CV_A = (CV_E^* - 0.25)^{0.5} \quad (3.1)$$

CV_E^* referans limitlerinin ($RL_{düşük}$, $RL_{yüksek}$) aşağıdaki denklemde belirtildiği gibi logaritmik hesaplamasıyla elde edilir.

$$CV_E^* = (\exp S_{E,ln}^2 - 1)^{0.5} \quad (3.2)$$

$$S_{E,ln} = \frac{\ln RL_{yüksek} - \ln RL_{düşük}}{3.92} \quad (3.3)$$

3.2.9.2 Kesinlik Değerlendirmesi

Microsoft-Excel “Analysis Toolpak” eklentisi kullanılarak tek yönlü varyans analizi (ANOVA) yapıldı. Varyans analizi sonucu elde edilen n_0 (her bir ölçümde elde edilen ortalama sonuç sayısı), \bar{x} (sonuçların tamamının ortalaması), MS_1 (gruplar arası karşılaştırmanın mean square değeri), MS_2 (grup içi karşılaştırmanın mean square değeri), V_i (ölçüm içi varyans), V_a (ölçümler arası varyans) değerleri kullanılarak değişim katsayısı (CV) hesaplamaları yapıldı. Kesinliğin üç alt başlığı olarak ölçüm içi CV ($\%CV_i$), ölçümler arası CV ($\%CV_a$) ve laboratuvar içi CV ($\%CV_l$) aşağıdaki denklemler 3.4-6 kullanılarak hesaplandı [107].

$$\%CV_i = \frac{\sqrt{MS_2}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.4)$$

$$\%CV_a = \frac{\left(\frac{MS_1 - MS_2}{n_0}\right)^{0.5}}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.5)$$

$$\%CV_l = \frac{(V_i + V_a)}{\bar{x}} \times 100 \quad (3.6)$$

3.2.9.3 Hata (bias) değerlendirme

Doğruluk değerlendirme için hata hesaplaması yapıldı. Kalite kontrol malzemelerinde belirtilen hedef değerler (TV) kullanıldı. Deneysel sonucu elde edilen veriler kullanılarak \bar{x} (sonuçların tamamının ortalaması) ve $SE_{\bar{x}}$ (ortalamanın standart

hatası) hesaplandı [107]. Hata hesaplaması için denklem 3.7 ortalamasının standart hatası hesaplaması için denklem 3.8 kullanıldı.

$$Hata = \bar{x} - TV \quad (3.7)$$

$$SE_{\bar{x}} = \frac{S_l}{(df_{\bar{x}}+1)^{0.5}} \quad (3.8)$$

$$S_l = (V_i + V_a)^{0.5}, V_i = MS_2 \text{ ve } V_a = \frac{(MS_1 - MS_2)}{n_0}$$

3.2.9.4 Metot karşılaştırma

Çalışmamızda 185 serum örneği kullanılarak atomik absorpsiyon spektrometrisi ve yeni geliştirilen otomatize metotla ölçüm yapıldı. Elde edilen verilerin dağılımının incelenmesi için dağılım ve ortalama-fark grafikleri (Bland-Altman) kullanıldı [115]. Referans yöntem olarak atomik absorpsiyon spektrometrisi kullanıldı. X ekseninde referans yöntem, Y ekseninde yeni geliştirilen yöntemin sonuçları değerlendirildi. Dağılım grafiğinde ölçüm sonuçlarının referans aralığının tamamında dağılım göstermesi göz önünde bulunduruldu.

İstatistik değerlendirmeleri Microsoft Excel Analysis Toolpak uzantısı kullanılarak gerçekleştirildi. Yöntemlerin karşılaştırılması için Pearson korelasyon ve regresyon analizleri yapıldı.

Korelasyon katsayısı (r) hesaplamasında denklem 3.9 kullanıldı.

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2} \sqrt{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y})^2}} \quad (3.9)$$

x_i : referans metotla yapılan ölçümün sonucu

y_i : yeni metotla yapılan ölçümün sonucu

\bar{x} ve \bar{y} : her bir yöntemle yapılan ölçümlerin tamamının ortalaması

3.2.9.5 Analitik sensitivite (Tespit kabiliyeti)

Analitik sensitivite terimi düşük analit konsantrasyonunda ölçüm yönteminin kesinlik performansını değerlendirmek için kullanılan testleri tanımlar. Testler “Limit of the Blank“ (LoB), “Limit of Detection” (LoD), “Limit of Quantitation” (LoQ) olarak sıralanır. Testlerin tamamı ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonunu tanımlamak için kullanılır [116].

3.2.9.6 LoB, LoD ve LoQ hesaplaması

Analit içermeyen örnek ile tekrarlı ölçümler yapılarak, ölçüm yönteminin kör numuneden ayırt edebildiği analit konsantrasyonunun hesaplanmasına LoB denir. Çalışmamızda LoB hesaplaması için kör numune ile 3 gün üst üste tek seferde 20şer ölçüm gerçekleştirildi. Elde edilen verilerden ortalama ve standart sapma hesaplandı. LoB hesaplaması için aşağıdaki formül kullanıldı [116].

$$LoB = ortalama_{kör} + 1.645(SD_{kör}) \quad (3.10)$$

LoD hesaplamasında LoB seviyesinin 5 katı oranında analit içeren standart çözelti düşük konsantrasyonlu örnek olarak kullanıldı. 3 gün üstü üste tek seferde 20 tekrarlı olarak ölçüm yapıldı ve aşağıda belirtilen basamaklar izlenerek hesaplandı [116-118].

$$LoD = LoB + c_p \times SD \quad (3.11)$$

$$c_p = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{4(L-j)}} \quad (3.12)$$

SD= düşük konsantrasyonlu standardın ölçümlerin sonucu elde edilen verinin standart sapması

L=toplam ölçüm sayısı

j= ölçümler esnasında kullanılan düşük konsantrasyonlu örnek sayısı

c_p = düzeltme faktörü

LoQ, kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla ölçülebilen en düşük analit konsantrasyonu olarak tanımlanır [119]. “Fonksiyonel sensitivite” CV=%20 elde edilebilen analit konsantrasyonudur. Çalışmamızda LoD değerinde analit içeren standartlar kullanılarak üç gün üst üste tek seferde yirmişer defa olmak üzere toplamda altmış ölçüm yapıldı. Standart sapma (SD), değişim katsayısı (CV) ve ortalama hesaplandı [116].

$$LoQ = LoD + 10SD \quad (3.13)$$

3.2.9.7 Doğrusallık (Linearite)

Düşük ve yüksek konsantrasyonlu iki örnek karıştırılarak orantılı olarak artan konsantrasyonlarda standart çözeltiler elde edildi. 11 adet standart çözelti ile üçer defa yapılan ölçümlerden elde edilen sonuçlar kullanıldı. Sonuçlar y-eksenine, konsantrasyon değerleri x-eksenine yerleştirildi. Polinomial regresyon analizi ile linearite değerlendirildi [153].

3.2.9.8 İç (internal) Kalite Kontrol

Üç farklı seviyede analit içeren kalite kontrol materyali olarak düşük seviye 32 µg/dl, orta seviye 127 µg/dl ve yüksek seviye 317 µg/dl bakır içeren çözeltiler kullanıldı. Stabilitate çalışmaları için her gün iç kalite kontrol ölçümleri gerçekleştirildi. Yapılan tekrarlı ölçümlerin sonuçlarıyla standart sapma grafiği oluşturuldu [154]. Sonuçlarla Levey-Jennings grafiği oluşturuldu ve günlük olarak takip edildi. ±1 standart sapma değeri %10 olarak hesaplandı. Hedef değer ±2 standart sapma dışına çıkan sonuçlar kabul edilebilir aralığın dışında kalan sonuçlar olarak değerlendirildi [155].

3.2.9.9 Dış (Eksternal) Kalite Kontrol

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hastanesi Rutin Biyokimya Laboratuvarı Randox (İngiltere) firması tarafından uygulanan RIQAS aylık Klinik Kimya Eksternal Kalite Değerlendirmesi programına kayıtlıdır. Bu program dahilinde her ay laboratuvara gönderilen liyofilize insan serumu örnekleriyle programa dahil analitlerin ölçümü yapılmaktadır. Sonuçlar 234173/K laboratuvar referans numarası ile Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi Hastanesi Rutin Biyokimya Laboratuvarı adına kaydedilmekte ve değerlendirilmektedir. Bakır ölçümü için tez çalışmasının erken dönemlerinden program dahilinde bakır ölçümü yapan laboratuvarlar arasına kaydolunmuş ve başka laboratuvarlarla ve AAS, ICP-MS ve diğer kolorimetrik yöntemlerle kit performansı karşılaştırılmıştır. Laboratuvarımız ilk aylarda kolorimetrik yöntemler grubunda, daha sonra sonuçların genel olarak AAS ile çok uyumlu olduğunun gözlemlenmesi üzerine son altı ayda AAS ile ölçüm yapan laboratuvarlar grubunda değerlendirilmiştir.

3.2.9.10 Toplam Analitik Hata

Sertifikalı referans materyal ile 30 tekrarlı ölçüm yapıldı ve elde edilen sonuçlar kullanıldı. Denklem 3.14'e göre %bias hesaplandı.

$$\%Bias = \frac{Hedef\ de\ ger - Laboratuvarın\ sonucu}{Hedef\ de\ ger} \times 100 \quad (3.14)$$

İki farklı seviye bakır iç kalite kontrol materyali ile 30 gün üst üste yapılan ölçüm sonuçları kullanıldı. İki seviye için ayrı ayrı %CV değerler, hesaplandı. Total Varyasyon katsayısı (%CV) hesabı Denklem 3.15'e göre gerçekleştirildi.

$$Total\ \%CV = \sqrt{(Düzey\ 1\ \%CV)^2 + (Düzey\ 2\ \%CV)^2} \quad (3.15)$$

Hesaplanan %Bias ve Total %CV değerleriyle Denklem 3.15'teki %TAH hesaplaması yapıldı. Ricos vd. tarafından yayınlanan biyolojik varyasyon veritabanındaki bakır konsantrasyonu için kabul edilebilir toplam hata oranı olan %7.47 değeri kullanılarak değerlendirme yapıldı. %TAH denklem 3.16'e göre hesaplandı.

$$\%TAH = \%Bias + 1.65 \times Total\ \%CV \quad (3.16)$$

3.2.9.11 Altı Sigma

Toplam analitik hata hesaplamasında kullanılan %bias, %CV ve Ricos vd. tarafından belirlenen izin verilen toplam hata değeri (TE_a) 7.47 kullanılarak denklem 3.17'deki gibi hesaplandı.

$$\sigma = \frac{\%TEa - \%bias}{\%CV} \quad (3.17)$$

3.2.9.12 Ölçüm belirsizliği (U_m)

Toplam analitik hata hesaplamasında kullanılan %bias ve %CV değerleri kullanılarak ölçüm belirsizliği hesaplandı. Genişletilmiş ölçüm belirsizliği, %95 güven aralığı için $k=2$ alınarak hesaplandı. Ölçüm belirsizliği hesaplamasında denklem 3.18 kullanıldı.

$$U_m = \sqrt{\%CV^2 + \%bias^2} \quad (3.18)$$

3.2.9.13 Taşınma (Carryover)

Çalışmamızda kısa protokol uygulandı [156]. En yüksek konsantrasyonlu kalibratörün ardından kör numunesi çalışıldı. Körden ölçülen absorbans değeri carry-over olarak

kabul edildi. LoQ değerinin %20sinden dk absorbands alınması carry-over gözlemlenmemesi olarak değerlendirildi.

Diğer reaktiflerin yeni yöntem üzerinde carry-over interferensine sebep olup olmadığının değerlendirmesi için Gama Glutamil Transferaz (GGT), Demir Bağlama Kapasitesi (UIBC), Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, Albumin, Kreatinin, Demir, inko, LDL, HDL, Amilaz, Magnezyum, Fosfor, re, Alkale Fosfataz, Trigliserid, Glukoz, Kolesterol, Total Protein, Kalsiyum ve Kreatin Kinaz (ABBOTT, Illinois, ABD) testleri ile peşpeş e çalışılarak tekrarlı ölçümler sonucu elde edilen veriler değerlendirildi [157].

3.2.9.14 Geri-kazanım (recovery)

Serum havuzu ile ölçüm yapılarak havuzdaki bakır konsantrasyonu belirlendi. Serum havuzuna farklı seviyelerde bakır iyonu içeren standart zltilerden ekleme yapıldı. Son eklenen bakır konsantrasyonu 2.5, 5, 10 ve 20 µM olan serum zltileriyle beş tekrarlı ölçüm yapıldı. Her seviye için elde edilen sonuçların ortalaması alındı. Başlangıçta bakır eklenmeden yapılan ölçümün sonucu göz önünde bulundurularak eklenen bakırın ne kadarının tespit edilebildiği hesaplandı. %95-105 arası geri-kazanım kabul edilebilir olarak değerlendirildi.

3.2.9.15 Girişim (interferens)

Çinko, demir, magnezyum ve kobalt interferensi değerlendirmeleri için hazırlanan serum havuzuna orantılı olarak artan seviyelerde çinko, demir, kobalt ve magnezyum içeren standart zltilerden ekleme yapıldı. Elde edilen serum havuzlarıyla tek seferde beşer defa olacak şekilde bakır ölçümü yapıldı. Sonuçların ortalama ve standart sapma değerleri değerlendirildi. Hemoliz, bilirubin ve lipeminin sonuçlarda interferense sebep olup olmadığının anlaşılması için yüksek bilirubinli, lipemik ve hemolizli serumlardan ayrı ayrı serum havuzları hazırlandı. Elde edilen serum havuzlarıyla tek seferde beşer defa olacak şekilde bakır ölçümü yapıldı.

rnek tüpünün içeriğinden kaynaklı interferenslerin değerlendirilmesi için jelli, jelsiz serum toplama tüpleri ve eser element tüpleri (BD Vacutainer, ABD) karşılaştırıldı.

3.2.9.16 Raf ömrü ve cihaz üzerinde kullanım süresi

Klinik kimya analizöründe çalışması uygun olduğu gözlemlenen çalışma reaktifleri, kalibratörler ve kontroller $\pm 4^{\circ}\text{C}$ 'de ve oda sıcaklığında 3 farklı lot olacak şekilde depolandı. Depolanan kitler ayda bir defa kesinlik, doğruluk, doğrusallık ve kör absorbansı açısından değerlendirildi. Elde edilen veriler raf ömrünün belirlenmesinde kullanıldı. Kesinlik ve doğruluk değerlendirmeleri için tek seviye kalite kontrol malzemesi ayda bir defa tek seferde 20 ölçüm yapıldı. Hesaplamalarda denklemler 3.1-3.8 kullanıldı.

Cihaz üzerinde kullanım süresinin belirlenmesi için cihaza üç farklı lot olarak hazırlanan çalışma reaktifleri yerleştirildi. Her gün tek seferde 20 ölçüm yapılarak elde edilen verilerle hata, inter-lot ve intra-lot CV değerleri hesaplandı. Hesaplamalarda denklemler 3.1-3.8 kullanıldı.

3.2.9.17 Referans Aralığı

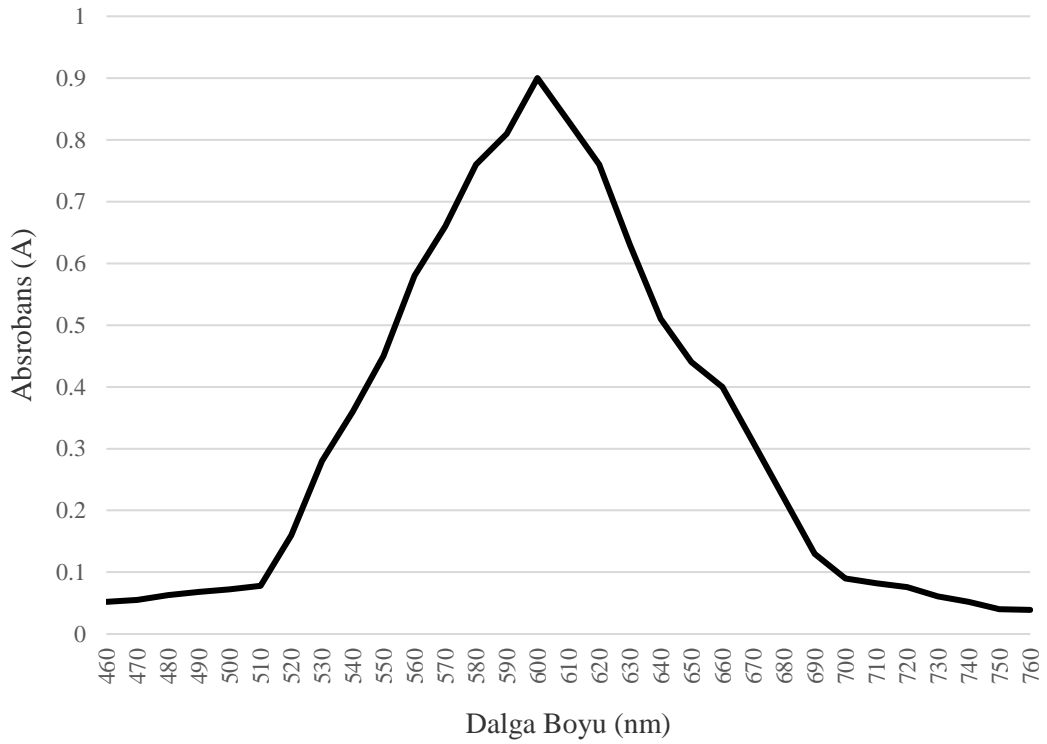
Referans aralık belirleme çalışması için indirekt yöntem kullanıldı [158]. 01.01.2019-12.05.2019 tarihleri arasında rutin biyokimya laboratuvarında test edilip raporlanan bakır ölçüm sonuçları kullanıldı. Çalışma grubuna 18-65 yaş arası polikliniğe başvuran kadın ve erkek bireyler dahil edildi. Wilson, Menkes, Alzheimer, Parkinson, Huntington gibi nörodejeneratif hastalıklar, kanserler, gebeler çalışma dışı bırakıldı. 485 erkek, 518 kadın bireyin bakır ölçüm sonucu hesaplamaya dahil edildi. Ortalama ve standart sapma (SD) hesaplandı. Ortalama-2SD alt referans limit, Ortalama+2SD üst referans limit olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 5-Br PAPS

4.1.1 Manuel spektrofotometrede bakır ölçümü için uygun dalga boyunun standart çözeltiler kullanılarak belirlenmesi

Çalışmalara çözelti içerisindeki bakırla bir araya geldiğinde renkli kompleks oluşturduğu literatürde belirtilen ve ön çalışmalarla da belirlenmiş olan 2.2-(5-Bromo-2-piridilazo)-5-[N-propil-N-(3-sulfoprop,1)amino]fenol disodium dihidrat tuzu (5-Br-PAPS) ile başlandı.



Şekil 4.1 : 40 µM CuSO₄ içeren standart ve 200 µM 5-Br-PAPS içeren reaktif karışımının spektrum taraması.

200 μM 5-Br-PAPS deiyonize suda $\text{öz}{\ddot{u}}$ lerek hazırlanan  alışma reaktifi kullanıldı. 40 μM CuSO_4 içeren deiyonize su ile hazırlanmış standart kullanıldı. Spektrofotometre k{uvetine 1000 μl reaktif ve 100 μl standart  ozelti pipetlenerek karıştırıldı. 5 dakikalık ink{ubasyon s{uresinden sonra 280-760 nm arasındaki dalga boylarında spektrum taraması yapıldı. Bakır-5-Br-PAPS kompleksinin en y{uksek absorbans verdiği dalgaboyu 604 nm olarak tespit edildi (şekil 4.1).

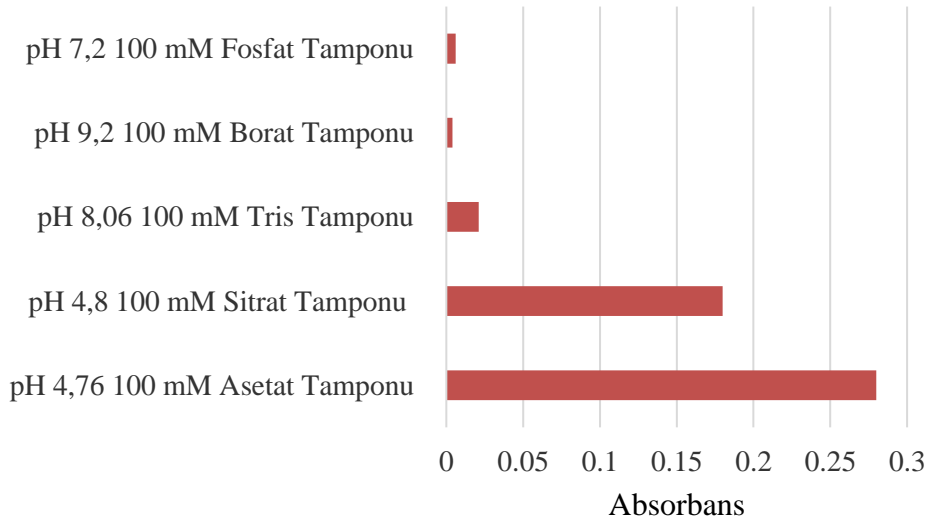


4.1.2 Reaksiyonun optimum gerçekleştiği tampon ortamı ve pH aralığının belirlenmesi

pKa değerleri 4,7 ile 9,2 arasında değişen çeşitli tamponlar belirlendi. Reaksiyon gerçekleşirken ortamın en iyi tamponlanabileceği pH değeri tamponun pKa değerine eşit olduğu için 100 mM konsantrasyon ve $pH=pKa$ olan tamponlar hazırlandı. Her bir tamponun içerisinde 200 μM 5-Br-PAPS çözüldü. 40 μM $CuSO_4$ içeren standartlar kullanılarak 1000 μl reaktif ve 100 μl standart çözelti pipetlendi ve spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda ölçüm yapıldı. En yüksek absorbands değerleri asetat tamponu içeren reaktif ortamında gözlemlendi (Tablo 4.1, Şekil 4.2).

Tablo 4.1 : $pH=pKa$ ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamlarıyla yapılan absorbands ölçümleri.

Tamponlar	Absorbans
pH 4,76 100 mM Asetat Tamponu	0,28
pH 4,8 100 mM Sitrat Tamponu	0,18
pH 8,06 100 mM Tris Tamponu	0,021
pH 9,2 100 mM Borat Tamponu	0,004
pH 7,2 100 mM Fosfat Tamponu	0,006



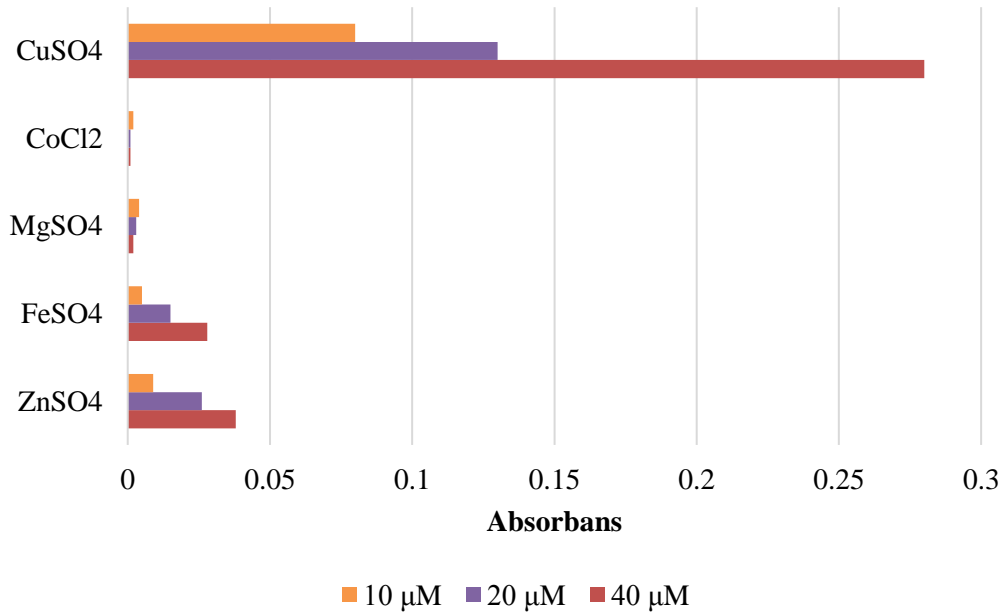
Şekil 4.2 : $pH=pKa$ ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamında yapılan absorbands ölçümlerinin karşılaştırması.

4.1.3 İnterferense sebep olan maddelerin belirlenmesi

İnterferense sebep olabileceği literatürde belirtilen iyonları (Zn^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , Co^{++}) içeren tuzlar ($ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $CoCl_2$) ve $CuSO_4$ kullanılarak 40, 20 ve 10 μM standartlar deiyonize su ile hazırlandı (2). 100 mM pH=pKa asetat tamponu içerisinde 200 μM 5-Br-PAPS çözülerek hazırlanan reaktif kullanıldı. 1000 μl reaktif ve 100 μl standart çözelti pipetlendi ve spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda absorban ölçümü yapıldı. Demir ve çinko iyonlarının düşük derecede orantılı interferense sebep olduğu tespit edildi (Tablo 4.2, Şekil 4.3).

Tablo 4.2 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan ölçümler.

Tuzlar	Absorbans		
	40 μM	20 μM	10 μM
$ZnSO_4$	0,038	0,026	0,009
$FeSO_4$	0,028	0,015	0,005
$MgSO_4$	0,002	0,003	0,004
$CoCl_2$	0,001	0,001	0,002
$CuSO_4$	0,28	0,13	0,08



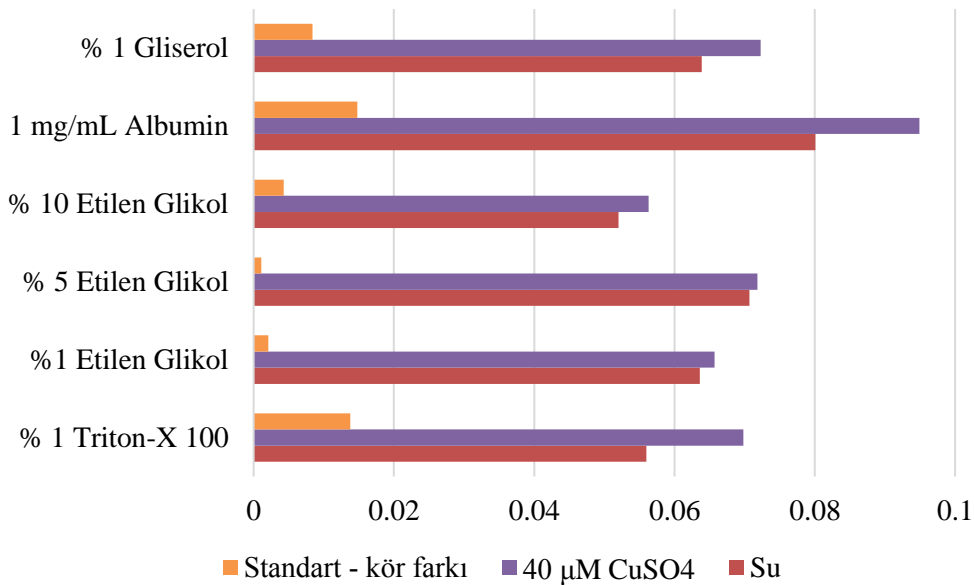
Şekil 4.3 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan ölçümlerin karşılaştırması.

4.1.4 Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, interferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan surfaktanların ve konsantrasyonlarının belirlenmesi

100 mM pH=pKa asetat tamponu içerisinde 200 μ M 5-Br-PAPS çözülerek hazırlanan reaktif kullanıldı. Reaktif içerisine %1 Triton-x 100, %1 etilen glikol, %5 etilen glikol, %10 etilen glikol, 1 mg/ml albümin, %1 gliserol ayrı ayrı eklendi. 1000 μ l reaktif ve 100 μ l standart çözelti pipetlendi ve spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapıldı. Albümin ve Triton-X 100'ün absorbans değerlerini arttırdığı gözlemlendi.

Tablo 4.3 : Surfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları

Surfaktan	Absorbans		
	Su	40 μ M CuSO ₄	Standart - kör farkı
% 1 Triton-X 100	0,056	0,0698	0,0138
% 1 Etilen Glikol	0,0636	0,0657	0,0021
% 5 Etilen Glikol	0,0707	0,0718	0,0011
% 10 Etilen Glikol	0,052	0,0563	0,0043
1 mg/mL Albumin	0,0801	0,0949	0,0148
% 1 Gliserol	0,0639	0,0723	0,0084



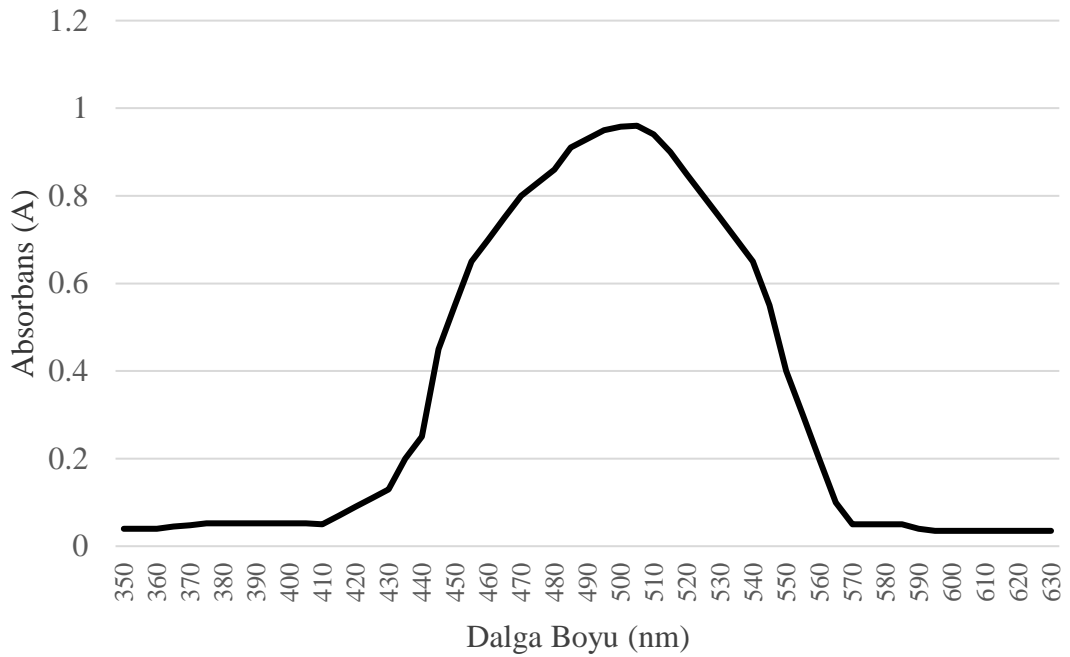
Şekil 4.4 : Surfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçlarının karşılaştırması.

4.2 3,5-DiBr-PAESA

4.2.1 3,5-DiBr-PAESA reaktifi ile manuel spektrofotometrede bakır ölçümü

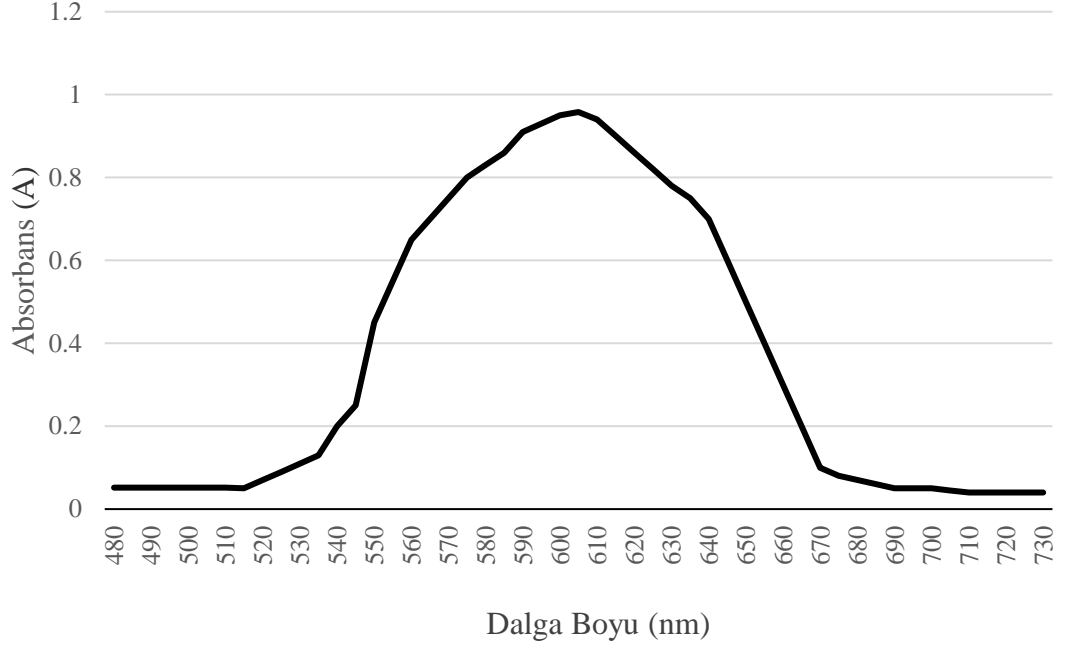
için en uygun dalga boyunun standart çözeltiler kullanılarak belirlenmesi

Çözelti içerisindeki bakırla bir araya geldiğinde renkli kompleks oluşturduğu literatürde belirtilen ve ön çalışmalarla da belirlenmiş olan 4-(3,5-Dibromo-2-piridilazo)-N-etil-N-sulfopropilanilin (3,5-DiBr-PAESA) ile çalışıldı. 4mM 3,5-DiBr-PAESA deiyonize suda çözülerek reaktif hazırlandı. $pH=pK_a$ 100 mM asetat tamponuyla 100 kat dilüsyon yapıldı. Çözelti içerisindeki son 3,5-DiBr-PAESA konsantrasyonu 40 μ M olacak şekilde çalışma reaktifi elde edildi. Çalışma reaktifi ile 280-760 nm dalga boyları arasında spektrum taraması yapıldı. 3,5-DiBr-PAESA'nın kendi spektrumu 400-580 nm arası, tepe noktası 502 nm olarak tespit edildi (Şekil 4.5). 40 μ M $CuSO_4$ içeren deiyonize su ile hazırlanmış standart çözelti kullanıldı.



Şekil 4.5 : 40 μ M 3,5-DiBr-PAESA çalışma reaktifinin spektrum taraması.

Spektrofotometre küvetine 1000 μ l reaktif ve 100 μ l standart çözelti pipetlenerek karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 480-760 nm arasındaki dalga boylarında spektrum taraması yapıldı. Bakır-3,5-DiBr-PAESA kompleksinin en yüksek absorbans verdiği dalga boyu 604 nm olarak tespit edildi (Şekil 4.6).



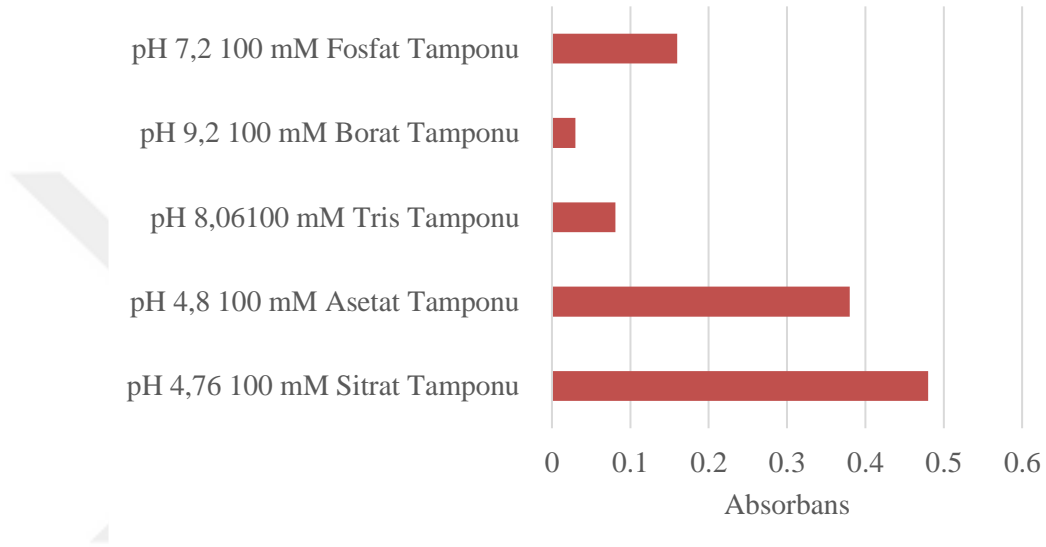
Şekil 4.6 : 40 µM CuSO₄ içeren standart ve 40 µM 3,5-DiBr-PAESA içeren reaktif karışımının spektrum taraması.

4.2.2 Reaksiyonun optimum gerçekleştiği tampon ortamı ve pH aralığının belirlenmesi

pKa değerleri 4,7 ile 9,2 arasında değişen çeşitli tamponlar belirlendi. Reaksiyon gerçekleşirken ortamın en iyi tamponlanabileceği pH değeri tamponun pKa değerine eşit olduğu için 100 mM konsantrasyon ve pH=pKa olan tamponlar hazırlandı. Her bir tamponun içerisinde 100 µM 3,5-DiBr-PAESA çözüldü. 40 µM CuSO₄ içeren standartlar kullanılarak 1000 µl reaktif ve 100 µl standart çözelti pipetlendi ve spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı ölçüm yapıldı. En yüksek absorbans değerleri asetat tamponu ve sitrat tamponu içeren reaktif ortamlarında gözlemlendi (Tablo 4.4, Şekil 4.7). Aynı zamanda 350-630 nm dalgaboyu aralığında yapılan spektrum taramalarıyla, tampon ortamı ve pH değişimlerinin molekülün spektrumunu değiştirmediği tespit edildi.

Tablo 4.4 : pH=pKa ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamlarıyla yapılan absorbans ölçümleri.

Tamponlar	Absorbans
pH 4,76 100 mM Sitrat Tamponu	0,48
pH 4,8 100 mM Asetat Tamponu	0,38
pH 8,06100 mM Tris Tamponu	0,081
pH 9,2 100 mM Borat Tamponu	0,03
pH 7,2 100 mM Fosfat Tamponu	0,16



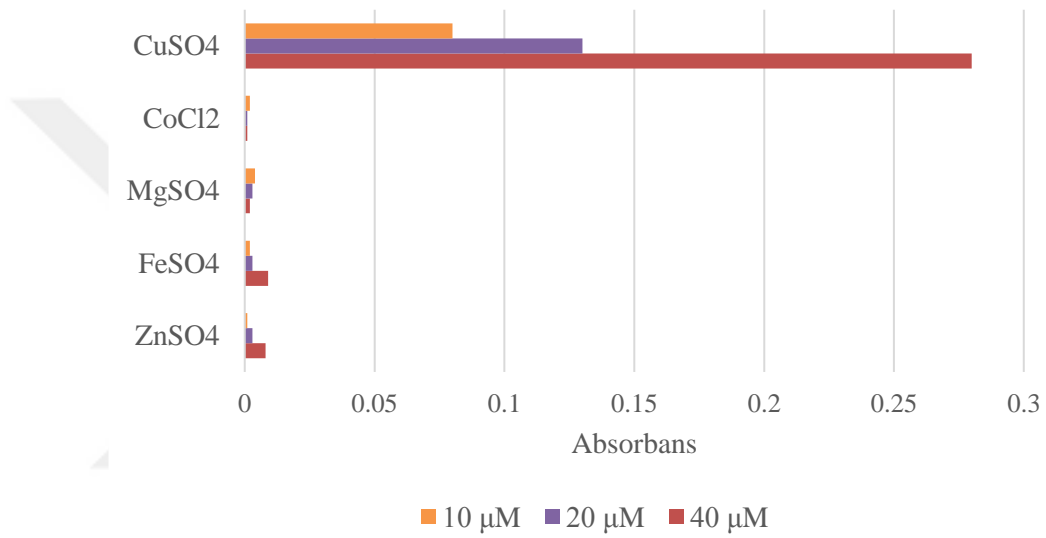
Şekil 4.7 : pH=pKa ve 100 mM konsantrasyonda hazırlanan tampon ortamında yapılan absorbans ölçümlerinin karşılaştırması.

4.2.3 İnterferense sebep olan maddelerin belirlenmesi

İnterferense sebep olabileceği literatürde belirtilen iyonları (Zn^{++} , Fe^{++} , Mg^{++} , Co^{++}) içeren tuzlar ($ZnSO_4$, $FeSO_4$, $MgSO_4$, $CoCl_2$) ve $CuSO_4$ kullanılarak 40, 20 ve 10 μM standartlar deiyonize su ile hazırlandı. 100 mM pH=pKa sitrat tamponu içerisinde 100 μM 5-DiBr-PAESA çözülerek hazırlanan reaktif kullanıldı. 1000 μl reaktif ve 100 μl standart çözelti pipetlendi ve spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı absorbans ölçümü yapıldı. Asetat tamponu kullanıldığında demir iyonlarının düşük derecede orantılı interferense sebep olduğu tespit edildi. Demir iyonlarının interferense sebep olması üzerine demiri bağlama özelliği olan sitrat tamponu kullanılarak devam edilmesine karar verildi. 100 mM pH=pKa sitrat tamponu ile yapılan çalışmalarda demir interferensinin ortadan kalktığı gözlemlendi (Tablo 4.5, Şekil 4.8).

Tablo 4.5 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla asetat tamponu içeren reaktif kullanılarak yapılan absorbands ölçümleri.

Tuzlar	Absorbans		
	40 μM	20 μM	10 μM
ZnSO ₄	0,008	0,003	0,001
FeSO ₄	0,009	0,003	0,002
MgSO ₄	0,002	0,003	0,004
CoCl ₂	0,001	0,001	0,002
CuSO ₄	0,28	0,13	0,08



Şekil 4.8 : İnterferense sebep olabileceği tahmin edilen iyonlar ile hazırlanan standartlarla yapılan absorbands ölçümlerinin karşılaştırması.

4.2.4 Reaksiyon gücü ve absorbands değerini artıran, intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan surfaktanların ve konsantrasyonlarının belirlenmesi

100 mM pH=pKa sitrat tamponu içerisinde 100 μM 3,5-DiBr-PAESA çözülerek hazırlanan çalışma reaktifi kullanıldı. Reaktif içerisine surfaktanlar %1 oranında eklendi. 1000 μl reaktif ve 100 μl 40 μM CuSO₄ standart çözelti spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı absorbands ölçümü yapıldı. Standartla yapılan deneyler, 100 μL serum havuzuyla da tekrarlandı. Surfaktanlar standart çözelti ve serumla elde edilen absorbands değerleri, eklendiğinde reaktifte bulanıklık oluşturması ve reaktif

serumla birleştirdiğinde gözle görülebilir ya da spektrofotometreyle tespit edilebilir bulanıklık oluşturup oluşturmamasına göre değerlendirildi (Tablo 4.6).

Tablo 4.6 : Sürfaktanlar kullanılarak yapılan ölçüm sonuçları.

Sürfaktan	40 µM CuSO4	Serum Havuzu	Bulanıklık	Serumla Bulanıklık
Adogen 464	0	0	Var	Var
Empigen	0	0	Var	Var
Merpel A	0	0	Var	Var
Metiltrioktil amonyum bromür	0	0	Var	Var
Liquinox	0	0	Var	Var
Sodyum dodesil sülfat	0,262	0,126	Yok	Var
Tetrametil amonyum klorür	0,217	0,002	Yok	Var
Albumin	0,125	0,015	Yok	Var
Noniyonik süर्फaktan karışımı	0,227	0,031	Yok	Yok
Anyonik süर्फaktan karışımı	0,23	0,006	Yok	Yok
Üre	0,118	0,004	Yok	Yok
Brij 35	0,006	0	Yok	Yok
Benzetonyum klorür	0	0	Yok	Var
Alkanol XC	0	0	Var	Var
Dodesil trimetil amonyum klorür	0	0	Yok	Yok
DMMAPS	0	0	Yok	Yok
Sodyum 1-dekan sulfonat	0	0	Var	Var
Triton-X 100	0,02	0	Yok	Var
Tween 20	0,085	0,042	Yok	Yok

Elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, sodyum dodesil sülfat, noniyonik süर्फaktan karışımı, anyonik süर्फaktan karışımı, üre, tween 20 ve tetrametil amonyum klorür ile otoanalizör üzerinde yapılacak çalışmalarda devam edilmesine karar verildi. Denenen diğer kimyasalların, reaksiyonun yetersiz olması, reaktifle ya da serumla birleştiğinde çökelti ve bulanıklık oluşturması sebebiyle kullanıma uygun olmadığı gözlemlendi.

4.2.5 Reaksiyon gücü ve absorbans değerini artıran, intereferenslerin ortadan kalkmasını sağlayan katalizörlerin, proteinleri denatüre ederek bağlı bakırın serbest kalmasını sağlayacak ajanların ve kullanıma uygun konsantrasyonlarının belirlenmesi

100 mM pH=pKa sitrat tamponu içerisinde 100 µM 3,5-DiBr-PAESA çözülerek hazırlanan reaktif kullanıldı. Reaktif içerisine aşağıdaki katalizör ve denatüran ajanlar eklendi (Tablo 4.7). 1000 µl reaktif ve 100 µl 40 µM CuSO₄ standart çözelti spektrofotometre küveti içerisinde karıştırıldı. 5 dakikalık inkübasyon süresinden sonra 604 nm dalga boyunda reaktif körüne karşı absorbans ölçümü yapıldı. Standartla yapılan deneyler, 100 µl serum havuzuyla da tekrarlandı. Katalizör ve denatüranlar standart çözelti ve serumla elde edilen absorbans değerleri, eklendiğinde reaktifte bulanıklık oluşturması ve reaktif serumla birleştirdiğinde gözle görülebilir ya da spektrofotometreyle tespit edilebilir bulanıklık oluşturup oluşturumamasına göre değerlendirildi (Tablo 4.7).

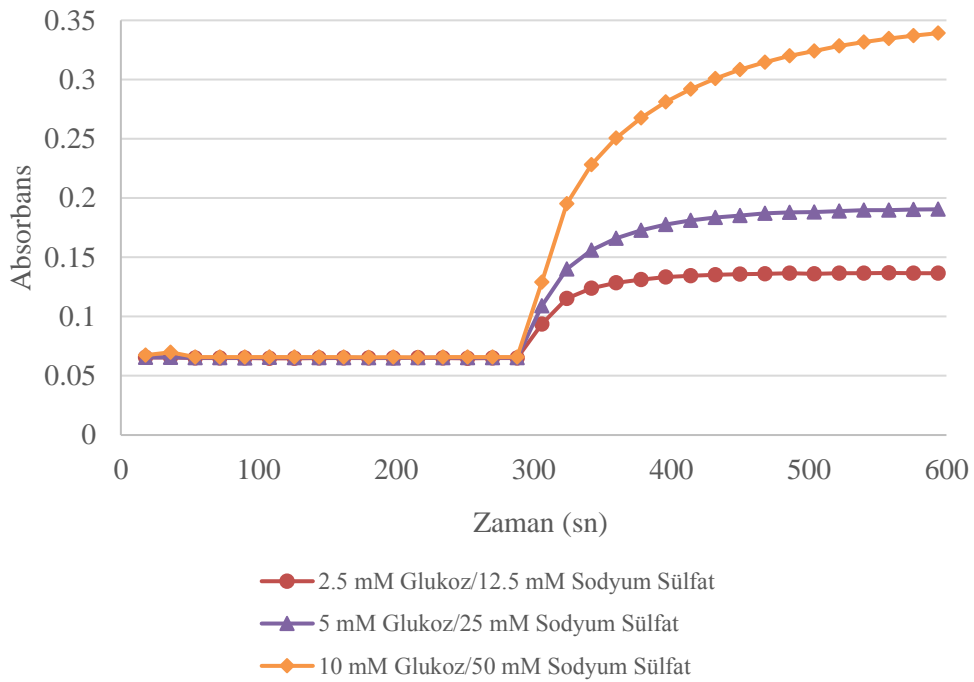
Tablo 4.7 : Katalizör ve denatüran ajanlar eklendiğinde elde edilen sonuçlar.

Redüktan	40 µM CuSO ₄	Serum Havuzu	Bulanıklık	Serumla Bulanıklık
20 mM ditiyotritol	0	0	Var	Var
5 M üre	0	0	Var	Var
20 mM merkaptotanol	0	0	Var	Var
20 mM tiyoüre	0	0	Var	Var
15 mM askorbik asit	0,217	0,061	Yok	Yok
10 mM sodyum dodesil sülfat	0,286	0,129	Yok	Var
50 mM sodyum sülfat	0,207	0,002	Yok	Var
10 mM glukoz	0,165	0,025	Yok	Yok
10 mM borik asit	0,006	0	Yok	Yok
15 mM sodyum tetraborat	0,085	0,042	Yok	Yok
10 mM sodyum disülfid	0,118	0,004	Yok	Yok
%1 dimetil formamid	0	0	Yok	Yok

Elde edilen veriler göz önünde bulundurularak, askorbik asit, sodyum dodesil sülfat, sodyum sülfat ve glukoz ile otoanalizör üzerinde yapılacak çalışmalarda devam edilmesine karar verildi. Denenen diğer kimyasalların, reaksiyonun yetersiz olması, reaktifle ya da serumla birleştirdiğinde çökelti ve bulanıklık oluşturması sebebiyle kullanıma uygun olmadığı gözlemlendi.

4.2.6 Oto-analizör üzerinde kullanılacak reaktif ve numune miktarlarının, kalibratör ve internal kontrol değerlerinin belirlenmesi ve metodun standartlar üzerinde optimize edilmesi

400 mM pH=pKa sitrat tamponu içerisinde 120 μ M 3,5-DiBr-PAESA çözülerek hazırlanan reaktif kullanıldı. Sodyum sitratın bakırı bağlayarak absorbands düşmesine ve negatif interferense sebep olduğunun görülmesi üzerine, tampon içeriğinde sodyum sitrat yerine disodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) kullanıldı. İyonik gücü artırmak için glukoz ve sodyum sülfat eklendi (Şekil 4.9). Bu artışla beraber daha stabil ve diskriminatif bir reaksiyon elde edildi. Redüktan ajan olarak askorbik asit eklenmesiyle reaksiyonun daha güçlü olduğu gözlemlendi. Serum ve reaktifin bir araya gelmesi sonucu oto-analizör üzerinde tespit edilen gözle görülmeyen düzeyde türbidite problemi sodyum dodesil sülfat (SDS) ve tween 20 kullanılarak çözüldü.



Şekil 4.9 : 40 μ M CuSO_4 içeren standart kullanılarak değişen glukoz ve sodyum sülfat konsantrasyonlarının elde edilen absorbandsa etkisi.

Kit iki reaktifli olarak hazırlandı ve kromojen ajan 3,5-DiBr-PAESA ikinci reaktif (R2) içerisine koyuldu. 0-40 μ M CuSO_4 , içecek şekilde deiyonize su kullanılarak hazırlanan standartlar üzerinde kitin çalışması optimize edildi. 160 μ l R1, 25 μ l R2 ve 17 μ l numune miktarlarının en uygun oranlar olduğu gözlemlendi (Şekil 4.9 ve 4.10). Kitin son formülü ve uygulaması aşağıda listelenmiştir.

R1:

100 mM sitrik asit

100 mM NaH₂PO₄

10 mM glukoz

50 mM Na₂SO₄

12.5 mM askorbik asit

5 mM SDS

% 1 tween-20

R2:

100 mM sitrik asit

100 mM NaH₂PO₄

% 1 tween-20

100 µM 3,5-DiBr-PAESA

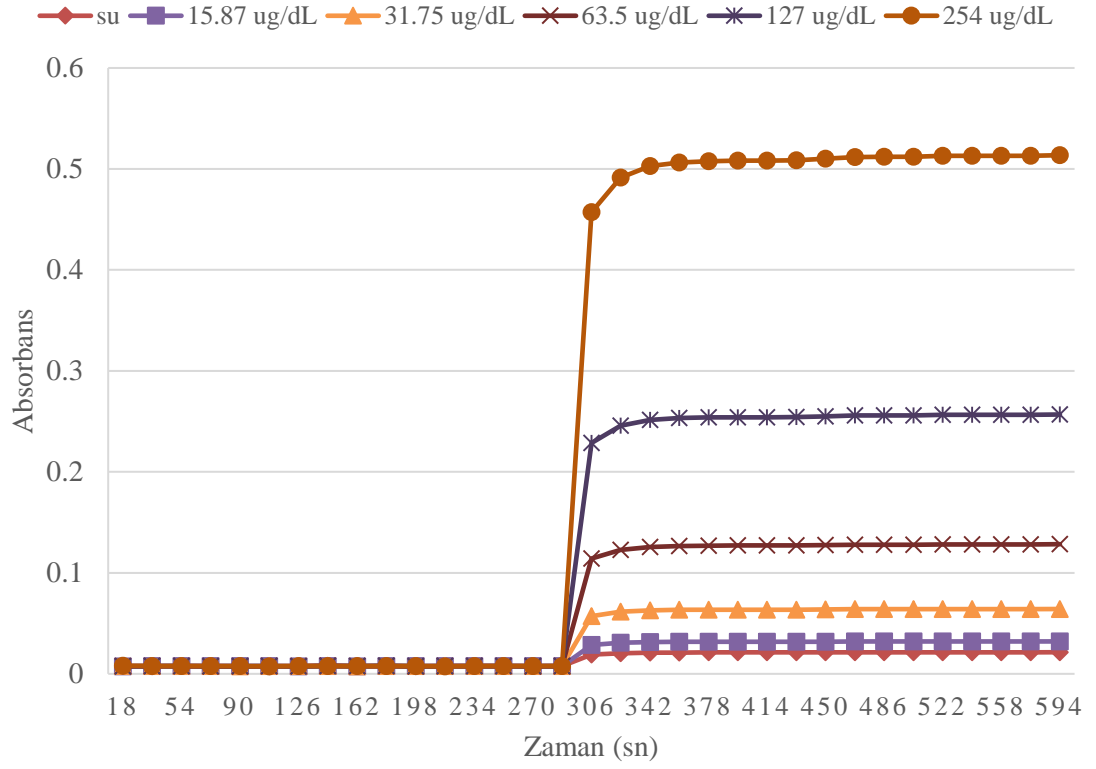
Uygulama:

Kalibratör: 80 µM CuSO₄

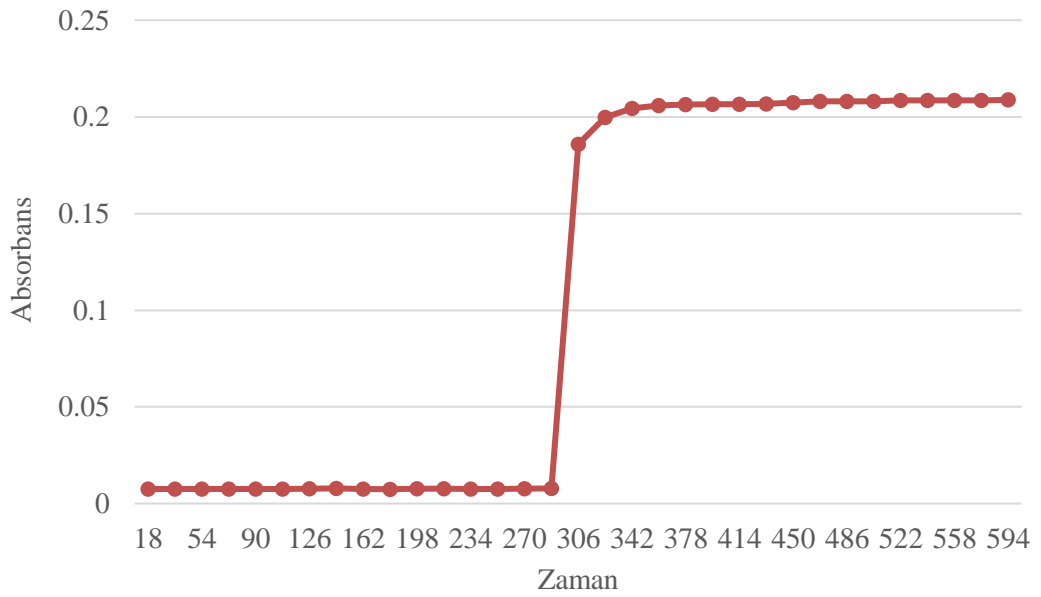
R1: 160 µl

R2: 25 µl

Örnek: 17 µl



Şekil 4.10 : 0-40 μM CuSO_4 içeren standart çözeltilerle oto-analizör üzerinde yapılan deney sonuçlarının karşılaştırması.



Şekil 4.11 : Serum havuzu (110 $\mu\text{g}/\text{dl}$) kullanılarak oto-analizör üzerinde yapılan ölçümün grafiği.

Kromofor ajan olan ve bakırla reaksiyona girdiği literatürde belirtilen 2-(2-((2-Hidroksi-5-sulfofenil)diazenil)(fenil)metilen)hidrazinil) benzoik asit (Zincon) ile yapılan çalışmalar sonucunda hedeflenen amaç için uygun olmadığı gözlemlenmiştir. 5-Br-PAPS ile yapılan çalışmalar molekülün planlanan kit için kullanımının uygun olduğunu göstermiştir. Fakat çalışılan pH değerlerinde interferenslerin ortadan kaldırılması mümkün olmamıştır. Bakırla spesifik bir reaksiyona girerek renkli kompleks oluşturduğu bilinen başka bir ajan olan 4-(3,5-Dibromo-2-piridilazo)-N-etil-N-(3-sulfopropil)anilin (3,5-DiBr-PAESA) ile aynı basamaklardan oluşan çalışmalar yapılmıştır. 3,5- DiBr-PAESA'nın üç kimyasal arasından hedeflenen amaç için en uygun olanı olduğu tespit edilmiştir. Standart çözeltilerle yapılan çalışmalar sonucu diskriminatif sonuçlar elde edilebildiği, çinko ve demir interferensinin olmadığı görülmüştür. Bu sebeplerden dolayı, klinik kimya analizörü çalışmaları ve serum standardizasyonu 3,5- DiBr-PAESA içeren reaktifle yapılmıştır. Elde edilen sonuçlar göz önünde bulundurularak uygun surfaktan ve katalizörler, uygun kit konsantrasyonları denenerek kitin klinik kimya analizörüne aplikasyonu yapılmıştır. Bakır içeren standartlar ile optimize edilen aplikasyon serum örnekleri üzerinde standardize edilerek rutin kullanıma uygun hale getirilmiştir. Performans ve stabilite değerlendirmeleri standardize edilen reaktifle yapılmıştır.

4.3 Yöntemin Geçerli Kılınması ve Performans Değerlendirmeleri

Klinik kimya analizörü üzerinde çalışılması uygun olduğu belirlenen çalışma reaktifleri kesinlik ve doğruluk, metot karşılaştırma, tespit kabiliyeti (analitik sensitivite), doğrusallık (linearite), iç ve dış kalite controller, toplam analitik hata, ölçüm belirsizliği, altı sigma, geri-kazanım (recovery), girişim (interferens), raf ömrü ve cihaz üzerinde stabilitesi ve referans aralığı açısından değerlendirildi.

4.3.1 Kesinlik ve Doğruluk

Gün	1	2	3	4	5	6	7							
Konsantrasyon ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,7	182,1	41,7	182,1	41,7	182,1	41,7	182,1	41,7	182,1	41,7	182,1	41,7	182,1
Ölçüm 1 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,8	181,9	41,6	181,8	41,5	181,9	41,9	181,8	41,4	182	42,2	184,1	41,9	182,6
Ölçüm 2 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,9	182,5	41,7	181,9	41,6	182,3	41,6	182,5	41,8	183,4	41,8	183,4	41,2	180,8
Ölçüm 3 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,6	182,3	41,8	182,3	41,8	181,8	41,7	182,3	41,9	182,8	42,1	181,7	42,1	180,9
Ölçüm 4 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,4	180,6	42,1	181	41,6	182,3	41,8	181	41,8	181,6	41,6	183,1	42,1	183,4
Ölçüm 5 ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,8	181,7	42,1	183,4	41,7	180,8	42,1	181,7	42,1	181,7	41,7	182,3	41,9	183,1
Ortalama ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	41,7	181,8	41,9	182,1	41,6	181,8	41,8	181,9	41,8	182,3	41,9	182,9	41,8	182,2
Rölatif deviasyon	0,384	0,297	0,478	0,341	0,240	0,242	0,383	0,264	0,526	0,329	0,525	0,536	0,813	0,582
SD	0,200	0,742	0,230	0,876	0,114	0,614	0,192	0,586	0,255	0,775	0,259	0,939	0,371	1,230
CV	0,480	0,408	0,550	0,481	0,274	0,338	0,460	0,322	0,610	0,425	0,618	0,513	0,888	0,675

Tablo 4.8 : İki farklı seviye kalite kontrol malzemesi kullanılarak gerçekleştirilen kesinlik ve doğruluk deneylerinden elde edilen veriler.

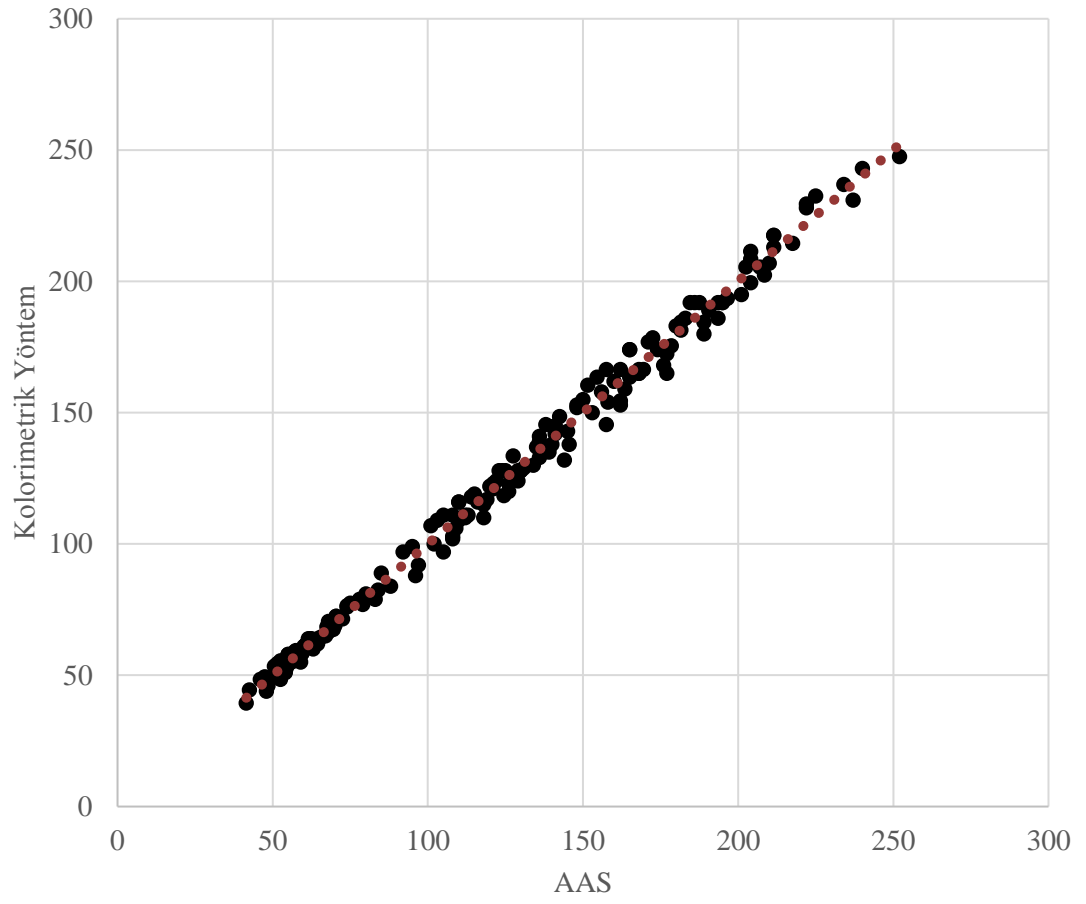
Tablo 4.9 : Düşük seviye kalite kontrol malzemesiyle yapılan kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi istatistik sonuçları.

N	35	
Gün	7	
n_0	5	
Aralık	41,4-42,2	
Kesinlik		
	Ölçüm içi	Ölçümler arası
Varyans	0,059	0,0038
Standart sapma	1,65	0,23
%CV	0,58	0,23
Hata		
Hedef değer	41,70	
Ortalama	41,79	
Aralık	41,4-42,2	
Standart hata	0,042	

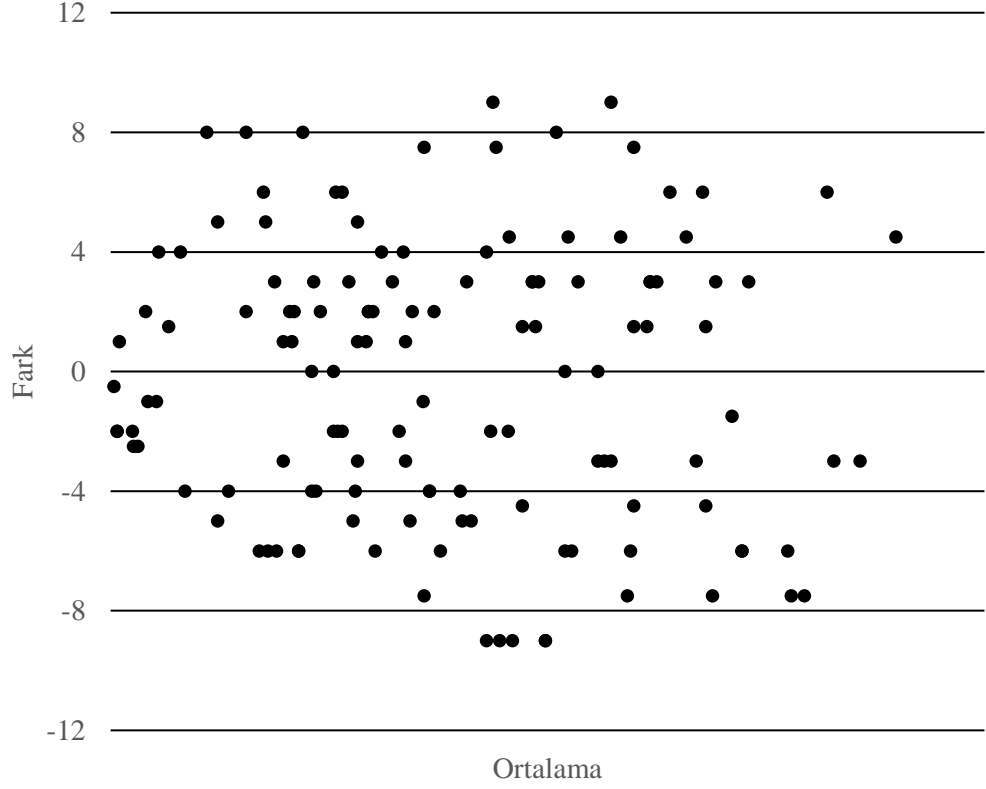
Tablo 4.10 : Yüksek seviye kalite kontrol malzemesiyle yapılan kesinlik ve doğruluk değerlendirmesi istatistik sonuçları.

N	35	
Gün	7	
n_0	5	
Aralık	180,6-184,1	
Kesinlik		
	Ölçüm içi	Ölçümler arası
Varyans	0,71	0,77
Standart sapma	4,67	20,12
%CV	0,46	0,059
Hata		
Hedef değer	182,1	
Ortalama	182,13	
Aralık	180,6-184,1	
Standart hata	1,04	

4.3.2 Metot Karşılaştırma



Şekil 4.12 : AAS ve kolorimetrik yöntemle yapılan ölçümlerin dağılımı ($\mu\text{g/dl}$).



Şekil 4.13 : Sonuçların Bland-Altman Dağılım grafiği.

Korelasyon katsayısı 0.9785, regresyon analizi sonucu elde edilen r^2 değeri 0.9647 olarak hesaplanmıştır. Fark-ortalama dağılım grafiğinde sonuçların tamamına yakını ± 2 SD değerinin içindedir.

4.3.3 Tespit Kabiliyeti (Analitik Sensitivite)

Tablo 4.11 : Limit of Blank hesaplaması için yapılan ölçümlerin sonuçları.

Gün	1	2	3
Ölçüm ($\mu\text{g}/\text{dl}$)			
1	0	0	0.1
2	0.1	0.2	0.1
3	0.1	0.1	0
4	0	0	0
5	0.1	0.1	0
6	0.2	0	0.1
7	0.1	0.2	0
8	0	0	0.1
9	0.1	0.1	0.1
10	0.2	0	0
11	0.2	0.1	0
12	0.1	0.2	0.1
13	0	0	0.1
14	0	0.1	0
15	0.2	0.1	0
16	0.1	0	0
17	0	0.1	0.1
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0.1	0.1	0
Ortalama	0.063333333		
Standart sapma	0.069774071		

$$LoB = ortalama_{k\ddot{o}r} + 1.645(SD_{k\ddot{o}r}) = 0,178 \mu\text{g}/\text{dl}$$

Tablo 4.12 : Limit of Detection ve Quantitation hesaplaması için yapılan ölçümlerin sonuçları.

Gün	1	2	3
Ölçüm (µg/dl)			
1	0.25	0.26	0.23
2	0.6	0.52	0.54
3	0.72	0.7	0.75
4	0.96	1.02	0.95
5	0.25	0.27	0.25
6	0.52	0.51	0.47
7	0.73	0.74	0.76
8	0.97	0.95	0.96
9	0.26	0.27	0.25
10	0.53	0.52	0.58
11	0.77	0.74	0.78
12	0.98	0.97	0.94
13	0.23	0.26	0.27
14	0.56	0.57	0.55
15	0.76	0.72	0.73
16	0.25	0.78	0.5
17	0.56	0.98	0.99
18	0.73	0.27	0.28
19	1	0.57	0.5
20	0.24	0.72	0.75
Ortalama	0.604		
Standart sapma	0.259864371		
%CV	0,8		

$$c_p = \frac{1.645}{1 - \frac{1}{4(L-j)}} = 1.652$$

$$\text{LoD} = \text{LoB} + c_p \times \text{SD} = 0,18 + 1,652 \times 0,26 = 0,607 \text{ µg/dl}$$

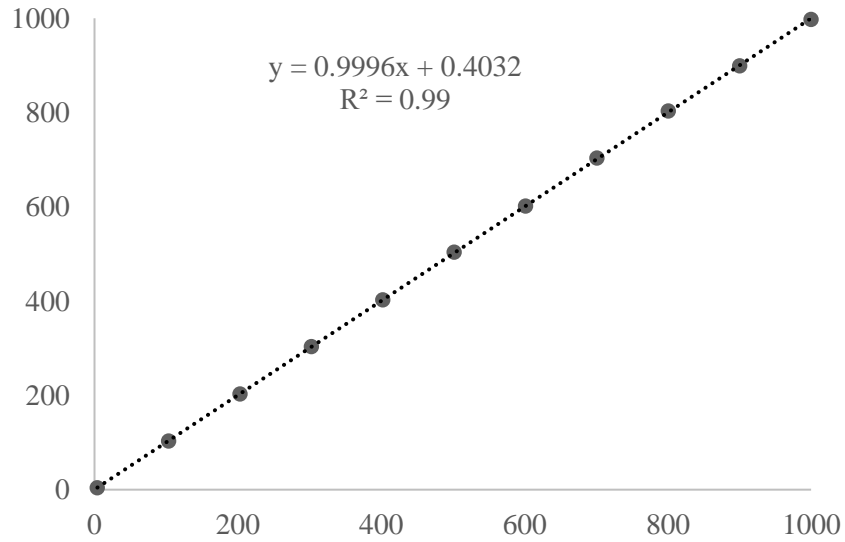
$$\text{LoQ} = \text{LoD} + 10\text{SD} = 3,207 \text{ µg/dl}$$

4.3.4 Doğrusallık (Linearite)

Doğrusallık değerlendirilmesi için yapılan çalışmaların sonucunda yöntemin 4-1000 µg/dl aralığındaki bakır konsantrasyonlarında doğrusal olduğu gözlemlenmiştir.

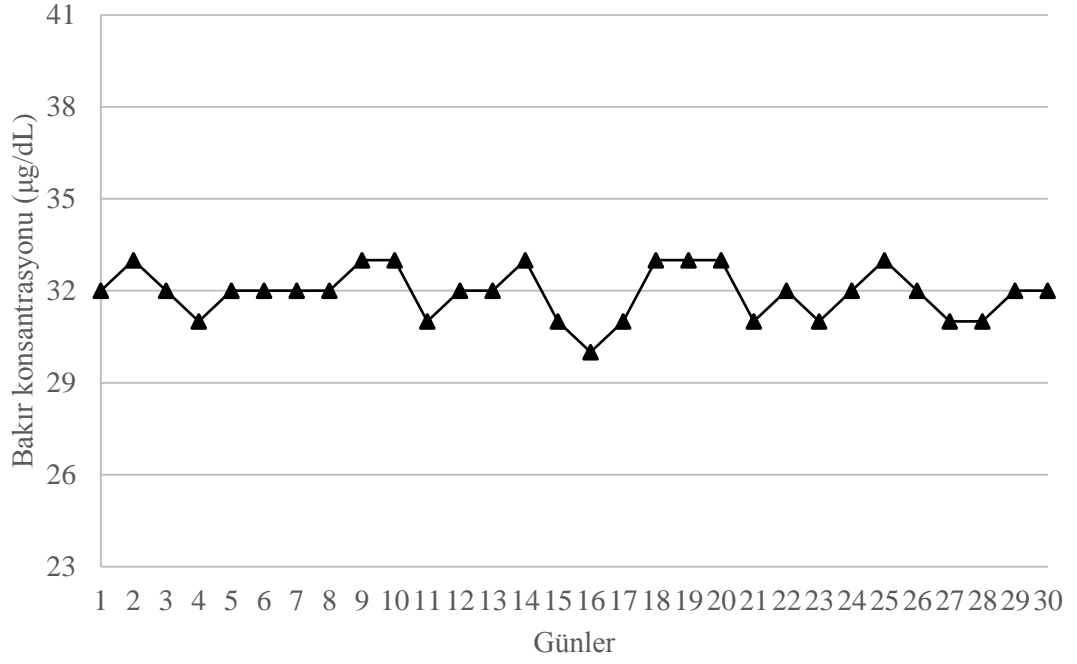
Tablo 4.13 : Doğrusallık tespiti için yapılan çalışma sonuçları.

Dilüsyon Oranı	Konsantrasyon (µg/dl)			
	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Mean
Düşük	4	3.8	3.6	4.2
1	103.6	103.7	102.9	103.2
2	203.2	202.9	202.6	203.5
3	302.8	303.1	303.2	303.4
4	402.4	401.8	402.1	403.5
5	502	503.4	505.4	502.3
6	601.6	600.3	601.4	602.5
7	701.2	700.5	703.6	705.6
8	800.8	802.3	805.6	802.3
9	900.4	896.4	902.4	898.6
Yüksek	1000	996.5	1000.4	995.4
Regresyon eşitliği	$y=0.9996x+0.4032$ $r=1$			

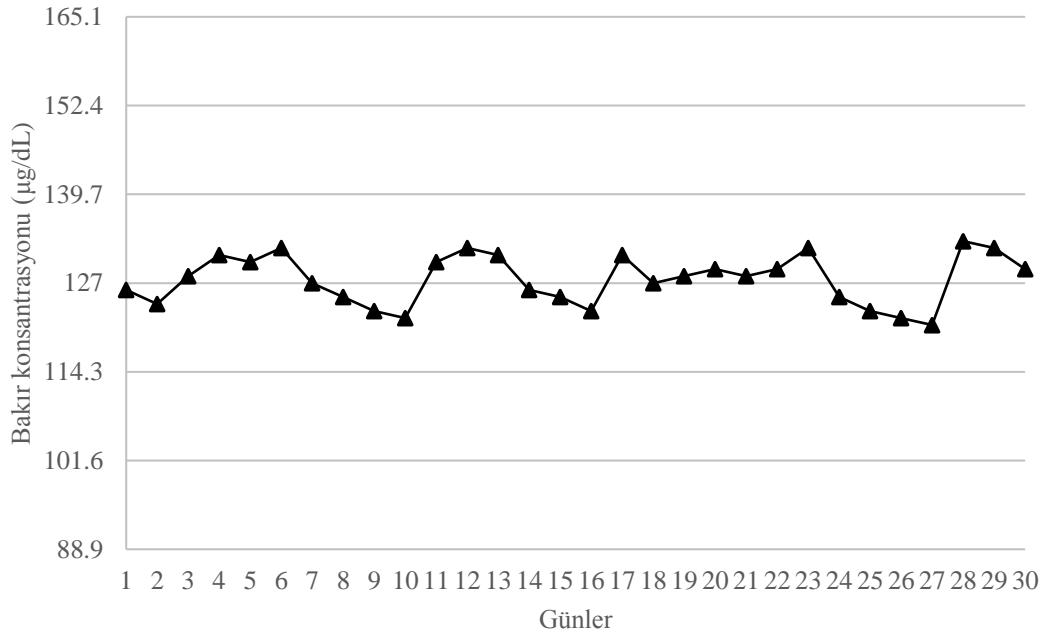


Şekil 4.14 : Linearite grafiği.

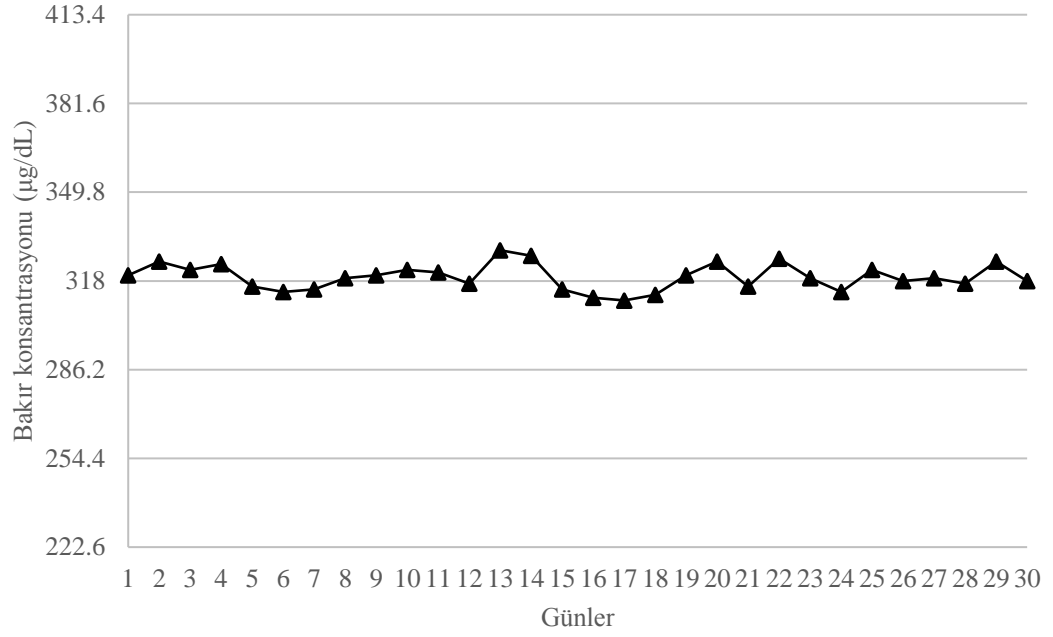
4.3.5 İç (İnternal) Kalite Kontrol



Şekil 4.15 : Düşük seviye (32 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=3.2).



Şekil 4.16 : Orta seviye (127 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=12.7).

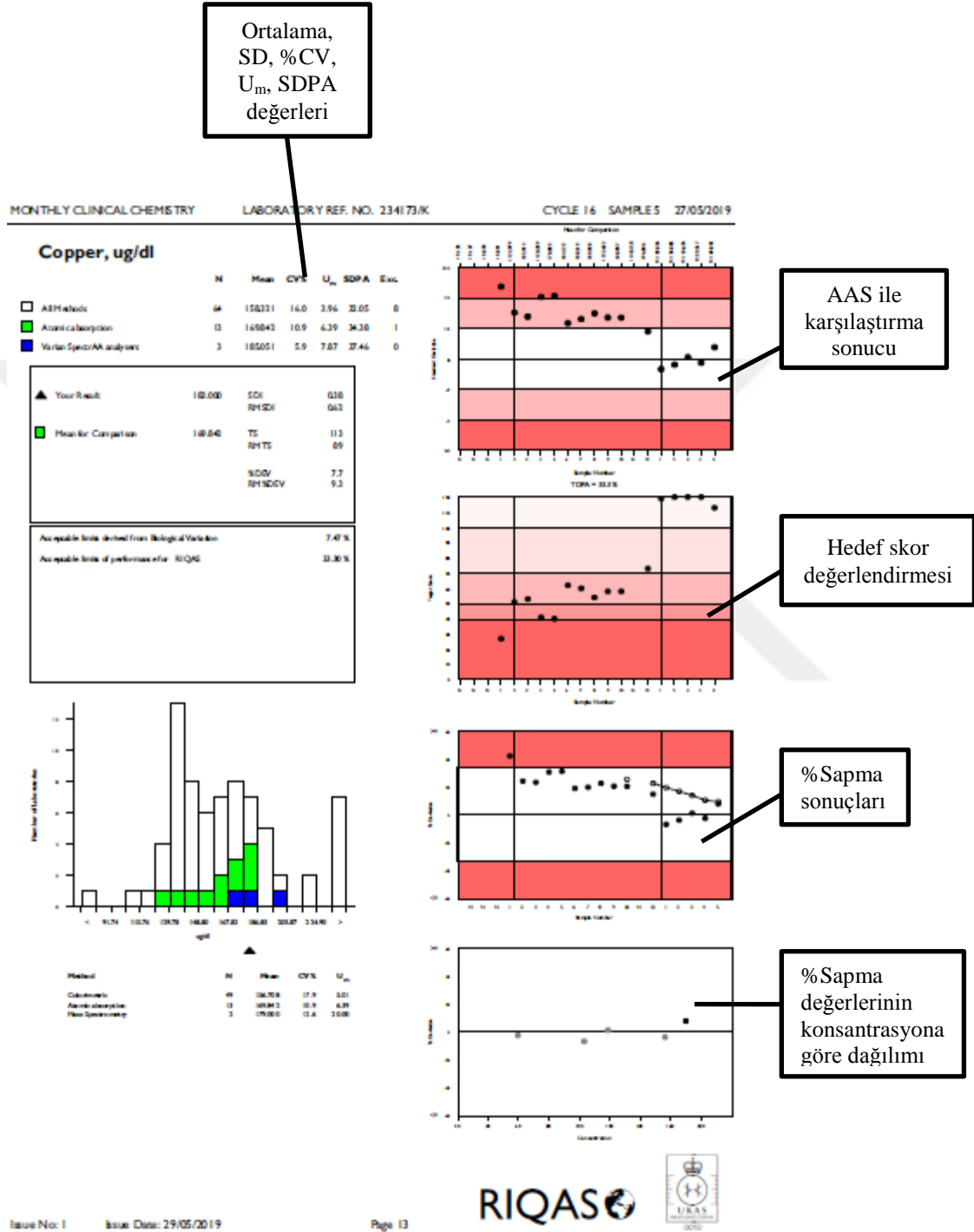


Şekil 4.17 : Yüksek seviye (318 µg/dl) bakır içeren iç kalite kontrol materyalinin 30 günlük ölçüm sonuçları (Standart sapma=31.8).

Şekil 4.15-17'de verilen 30 günlük düşük, orta ve yüksek seviye iç kalite kontrol sonuçları bu süre zarfında kit performansında sapma olmadığını göstermektedir. Üç seviyenin de ölçümlerinde kabul edilebilir aralık olan $\pm 2SD$ değerlerinin dışına çıkan hiç bir ölçüm gözlemlenmemiştir.

4.3.6 Dış (eksternal) Kalite Kontrol

Şekil 4.18’de aylık bakır RIQAS dış kalite kontrol değerlendirmesinin 2019 yılı Mayıs ayı sonuçları genel görünümü bulunmaktadır.



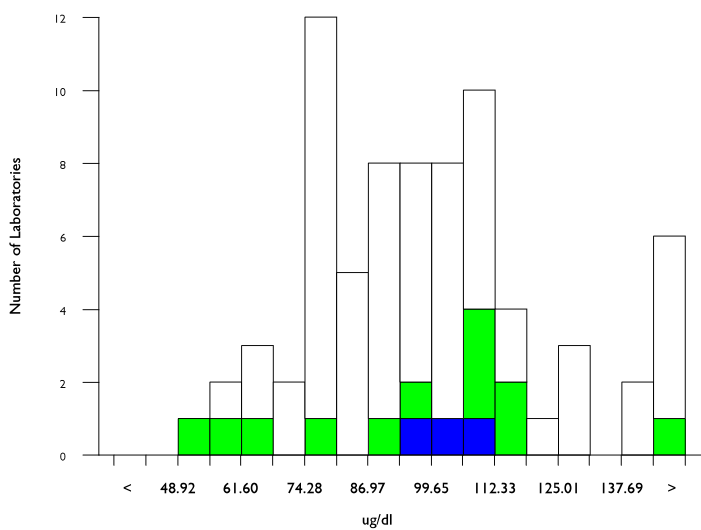
Şekil 4.18 : RIQAS Bakır Ölçümü Dış Kalite Kontrol değerlendirmesi Mayıs 2019 sonucu, genel görünümü.

Copper, ug/dl

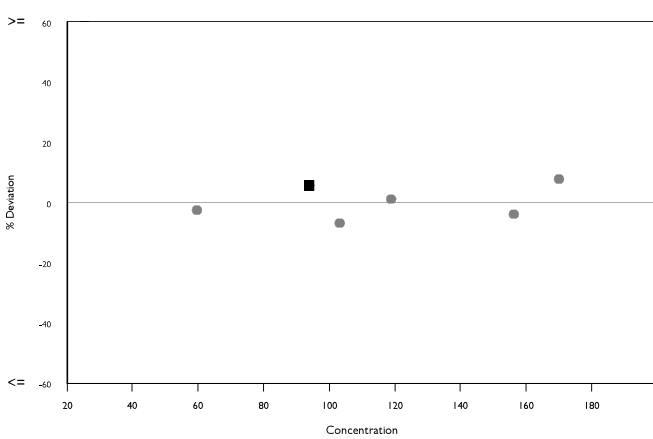
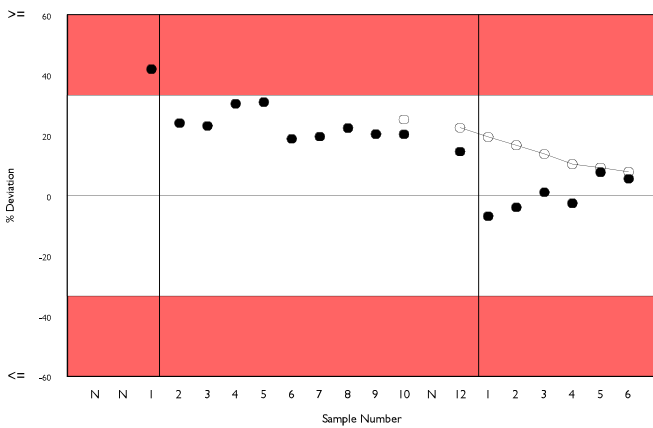
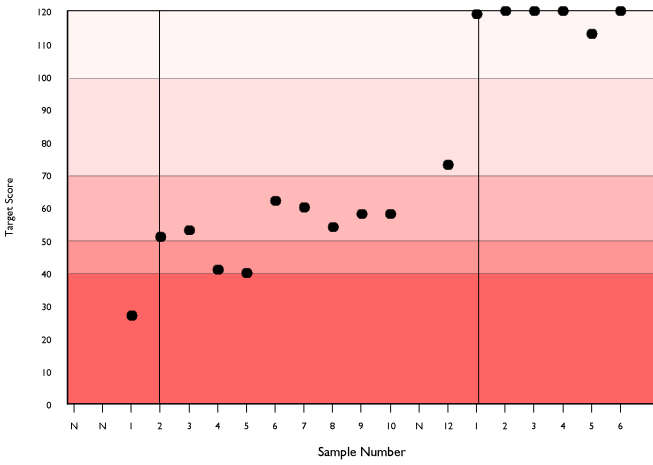
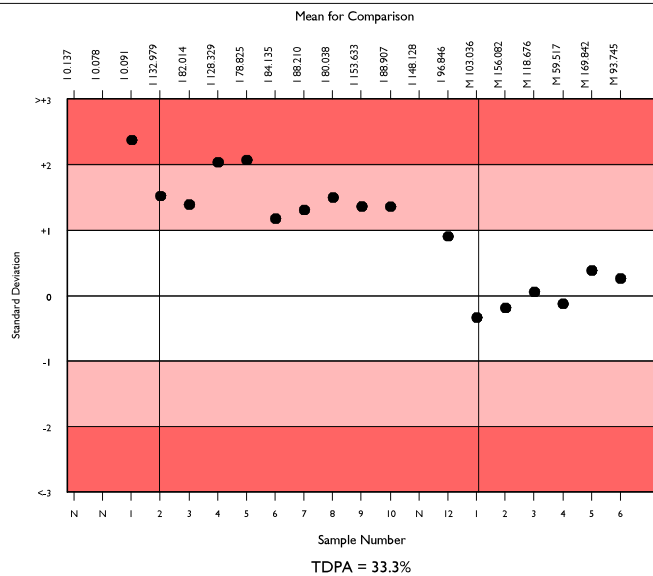
	N	Mean	CV%	U _m	SDPA	Exc.
All Methods	66	93.311	18.1	2.60	18.89	9
Atomic absorption	14	93.745	22.1	6.93	20.20a	1
Varian SpectrAA analysers	3	102.793	5.7	4.20	20.81	0

▲ Your Result	99.000	SDI	0.26
		RMSDI	0.52
■ Mean for Comparison	93.745	TS	120
		RMTS	95
		%DEV	5.6
		RM%DEV	7.9

Acceptable limits derived from Biological Variation	7.47%
Acceptable limits of performance for RIQAS	33.30%



Method	N	Mean	CV%	U _m
Colorimetric	51	92.161	18.4	2.97
Atomic absorption	14	93.745	22.1	6.93
Mass Spectrometry	2	99.950	2.9	2.56

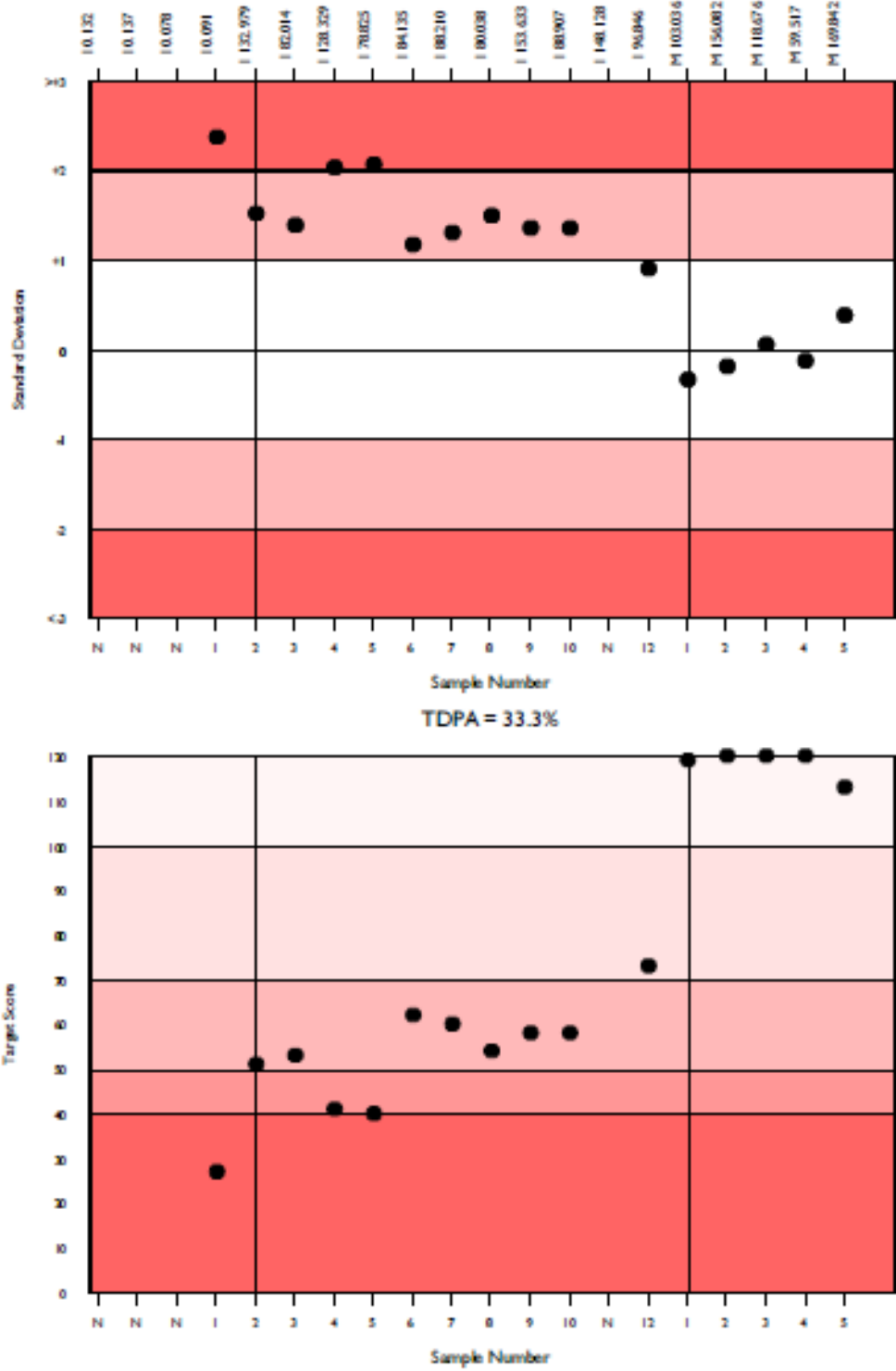


	N	Mean	CV%	U _m	SDPA	Exc.
□ All Methods	64	158.321	16.0	3.96	32.05	8
■ Atomic absorption	13	169.842	10.9	6.39	34.38	1
■ Varian SpectrAA analysers	3	185.051	5.9	7.87	37.46	0

▲ Your Result	183.000	SDI	0.38
		RMSDI	0.62
■ Mean for Comparison	169.842	TS	113
		RMTS	89
		%DEV	7.7
		RM%DEV	9.3
Acceptable limits derived from Biological Variation			7.47%
Acceptable limits of performance for RIQAS			33.30%

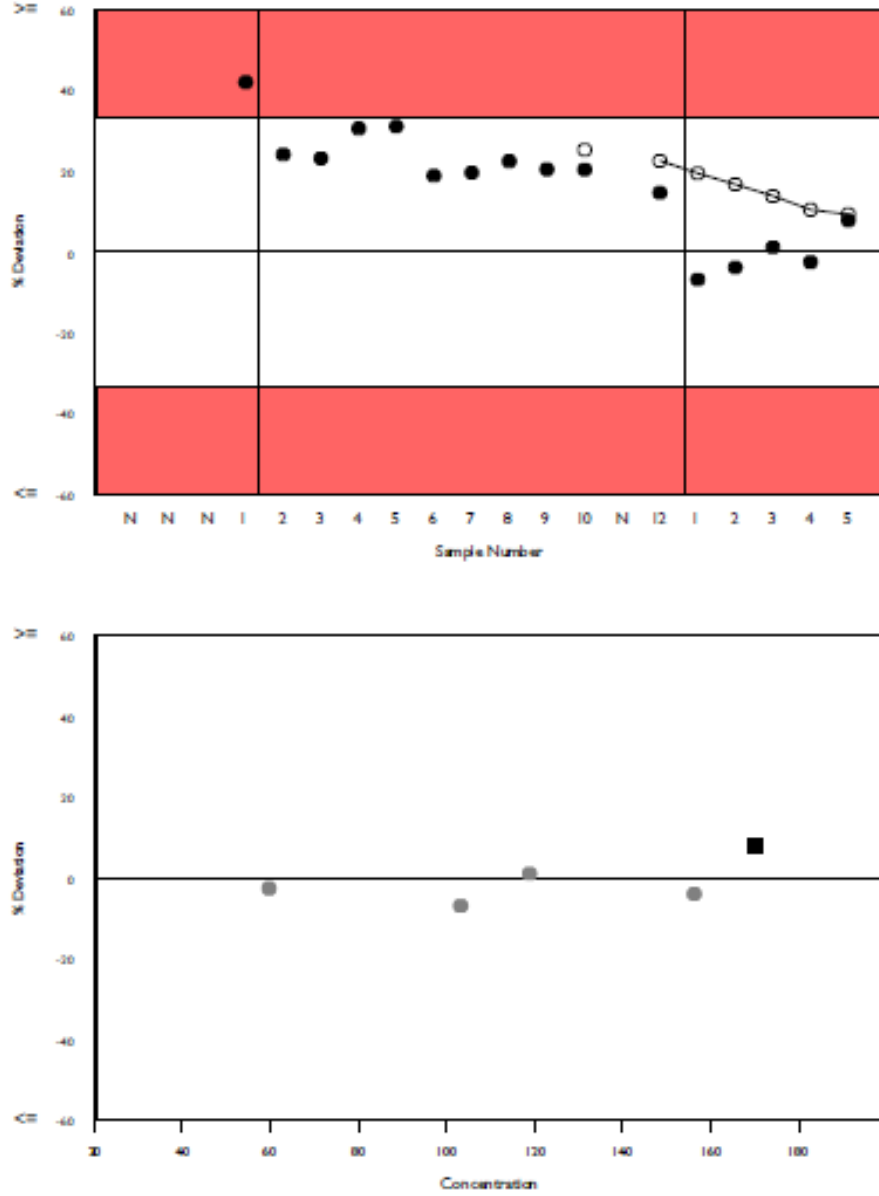
Şekil 4.19 : Mayıs 2019 dış kalite kontrol değerlendirmesi SD, ortalama, %CV, U_m, SDPA değerleri.

Geliştirilen yeni yöntemle yapılan son 6 aylık dış kalite kontrol sonuçları, AAS grubuyla karşılaştırılarak ortalama, standart sapma (SDI), %CV, %sapma, ölçüm belirsizliği (U_m) hesaplamaları yapılmıştır. Yeni yöntemin AAS ile karşılaştırıldığında hem zmana göre, hem de tek bir sonuca göre uyumlu sonuçlar vermektedir.



Şekil 4.20 : Standart sapma ve hedef skordan sapma grafikleri.

Şekil 4.20’de üstte zamana göre sonuçların standart sapma içerisinde dağılım grafiği ve altta hedef skora göre dağılım grafiği görülmektedir. Ölçüm sonucu değerleri son 6 ayda (AAS ile karşılaştırıldığında) $\pm 1SD$ değerlerinin dışına çıkmamıştır. En iyi sonucun 120 olması beklenen TDPA hesaplamasında son altı aylık sonuçların 120’ye yakın seyrettiği görülmektedir.



Şekil 4.21 : %Sapma zamana göre ve konsantrasyona göre dağılım grafiği.

Şekil 4.21 %sapma değerinin zaman (üstte) ve konsantrasyona (altta) göre dağılımını göstermektedir. %Sapma, laboratuvar tarafından yapılan ölçümün karşılaştırıldığı ortalamadan ne kadar saptığını ifade eder. Sonuç sıfıra ne kadar yakınsa ölçüm o kadar sağlıklıdır. Son 6 aylık ölçümlerde bakır ölçümü için kabul edilebilir sapma olan %7.47'den uzak sonuçlar elde edildiği gözlemlenmiştir.

Dış kalite kontrol sonuçları bir bütün olarak değerlendirildiğinde yeni geliştirilen yöntemin programa kayıtlı diğer 49 kolorimetrik ölçüm yöntemine kıyasla altın standart metot olan AAS ile daha yakın sonuçlar verdiği, performansın zamana ve konsantrasyona göre değerlendirildiğinde tutarlı olduğu görülmektedir. Bu sebeple son 6 aylık ölçümler kolorimetri grubuna değil AAS grubuna kaydedilmiştir.

4.3.7 Toplam Analitik Hata

Tablo 4.14 : İki farklı seviye iç kalite kontrol materyali ve sertifikalı referans materyal ile %TAH hesaplaması için yapılan tekrarlı ölçüm sonuçları.

Gün	Düşük seviye	Yüksek seviye	SRM
1	32	320	97
2	32	325	98
3	32	322	96
4	31	324	97
5	32	316	98
6	32	314	97
7	32	315	97
8	32	319	99
9	33	320	97
10	33	322	97
11	31	321	96
12	32	317	96
13	32	329	97
14	33	327	98
15	32	315	96
16	33	312	98
17	31	311	97
18	32	313	98
19	33	320	96
20	33	325	98
21	31	316	100
22	32	326	98
23	31	319	96
24	32	314	97
25	33	322	98
26	32	318	97
27	31	319	96
28	31	317	98
29	32	325	96
30	32	318	99
Ortalama	32.03	319.36	97.26
SD	0.69	4.61	1.099
%CV	2.17	1.44	1.13
		Fark	0.028
		%Bias	1.23

$$\%TAH = \%Bias + 1.65 \times Total \%CV = 1.89 < TAH_a = 7.47$$

4.3.8 Altı Sigma Değerlendirmesi

Toplam analitik hata hesaplamalarında da kullanılan sertifikalı referans materyalden elde edilen bias ve internal kontrol değerlendirmelerinden elde edilen %CV değeri kullanıldı. Yöntemin sigma değeri 3.5 olarak hesaplandı.

4.3.9 Ölçüm Belirsizliği

%CV değeri 2.6, %bias değeri 1.23 olarak hesaplandı. k sabiti 2 olarak dahil edildi.

$$U_m = \sqrt{\%CV^2 + \%bias^2} = 2.87 \times k = 5.74$$



4.3.10 Carryover

En yüksek seviyeli kalibratör (508 µg/dl) çalışıldıktan sonra kör (deiyonize su) çalışıldı. Deney 20 defa tekrarlandı. Ortalama ve standart sapma hesaplandı. LoQ değerinin altında kaldığı için yeni geliştirilen yöntemin diğer örnek ve kitlere carryover etkisi olmadığı kabul edildi. Reaktif carry-over etkisi için değerlendirilen parametreler arasında sadece protein ölçümünde %2 oranında interferens tespit edildi. Özel kuvvet ve pipet yıkama komutu verilerek sorun çözüldü.

Tablo 4.15 : Carryover çalışması sonuçları.

Ölçüm	508 µg/dl	Kör
1	502	3
2	503	7
3	501	5
4	504	2
5	508	1
6	509	0
7	510	9
8	507	7
9	506	5
10	503	6
11	509	2
12	511	3
13	507	1
14	508	0
15	509	1
16	509	2
17	507	0
18	508	4
19	511	3
20	512	1
Ortalama	507.2	3.1
Standart sapma	3.13	2.63

4.3.11 Geri-kazanım (Recovery)

Tablo 4.16 : Geri-kazanım çalışması sonuçları.

Eklenen Bakır Konsantrasyonu	Ölçüm		Ölçüm		Ölçüm		Ölçüm		Total Bakır	Ortalama	Ortalama Recovery
	1	Recovery	2	Recovery	3	Recovery	4	Recovery			
0 µg/dl	85	98.38	87	100.69	84.6	97.92	89	103.01	86.4	86.4	100.00
32 µg/dl	114.8	96.96	116	97.97	112.8	95.27	118	99.66	118.4	115.4	97.47
64 µg/dl	148.3	98.60	152	101.06	149.7	99.53	146.2	97.21	150.4	149.05	99.10
128 µg/dl	215.6	100.56	214	99.81	216.2	100.84	218.9	102.10	214.4	216.175	100.83
256 µg/dl	345	100.76	348.2	101.69	346	101.05	344.1	100.50	342.4	345.825	101.00

4.3.12 Girişim (İnterferens)

Tablo 4.17 : İyonların girişim değerlendirme sonuçları.

İnterferent	Eklenen Konsantrasyon	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Ölçüm 4	Ölçüm 5	Ortalama	
Çinko (µg/dl)	0	0	162	162	162	163	163	162
	1	50	163	162	162	162	162	162
	2	100	163	163	163	163	164	163
	3	150	163	163	163	163	163	163
	4	200	163	163	164	163	164	163
	5	250	163	163	164	163	163	163
Demir (µg/dl)	0	0	162	163	162	162	162	162
	1	44	162	162	162	163	162	162
	2	88	163	162	163	163	163	163
	3	132	162	162	162	162	163	162
	4	176	163	163	162	162	163	163
	5	220	162	163	163	163	163	163
Kobalt (µg/dl)	0	0	162	162	162	162	162	162
	1	24	163	163	162	163	162	163
	2	48	162	163	162	162	162	162
	3	72	162	162	162	163	163	162
	4	96	162	162	163	162	163	162
	5	120	162	162	163	162	162	162
Magnezyum (µg/dl)	0	0	162	162	162	163	163	162
	1	10	162	162	162	163	162	162
	2	20	163	163	163	162	163	163
	3	30	162	162	162	162	163	162
	4	40	162	162	163	163	162	162
	5	50	163	163	163	163	162	163

Tablo 4.18 : Hemoliz, ikter ve lipemi interferens değerlendirmesi sonuçları.

İnterferent	Örnek	Konsantrasyon	Ölçüm 1	Ölçüm 2	Ölçüm 3	Ölçüm 4	Ölçüm 5	Ortalama
Hemoglobin (g/dl)	1	15	162	162	162	163	163	162
	2	30	185	170	175	182	190	180
Bilirubin (mg/dl)	1	1.5	162	164	162	164	163	164
	2	3	160	162	165	163	162	161
Kolesterol (mg/dl)	1	250	160	162	162	166	164	165
	2	500	162	162	162	163	162	162



4.3.13 Raf Ömrü

Tablo 4.19 : 9 Kasım 2018 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²												
Doğrusallık	1	4.1	105.6	204.5	299.9	401.6	505.3	612.6	715.6	820.7	925.8	1012	0.9998												
	2	3.8	104.7	206.5	308.4	415.6	508.6	608.9	704.9	818.4	918.7	1022	0.9994												
	3	3.7	106.9	208.7	311.4	399.8	511.3	606.4	711.6	798.6	914.7	1035	0.9999												
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dl																									
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																			Ort	CV	Hata		
Kesinlik ve doğruluk	1	80	80	81	84	82	80	78	80	80	80	81	84	78	79	80	81	81	83	80	76	80	80.6	2.4	-0.4
	2	81	80	80	86	80	80	80	80	78	79	80	82	80	84	80	78	81	80	80	82	76	80.7	2.6	-0.3
	3	80	82	80	85	82	80	80	80	80	80	81	82	78	80	80	81	82	83	81	80	75	81	2.3	0
Lotlar arası kesinlik	1																				80.62				
	2																				80.69				
	3																				80.95	CV: 0.17%			
Körün absorbansı	1																				0.0869				
	2																				0.0919				
	3																				0.0958				

Tablo 4.20 : 10 Aralık 2018 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²												
Doğrusallık	1	3.9	103.5	203.6	302.9	402.6	505	602	700.6	812	916	1030	0.9996												
	2	3.9	102.5	204.6	301.9	400.6	503	601.3	703.6	809	926	1090	0.9964												
	3	3.8	103.9	202.6	300.4	403	506	603.6	710	803	915	1020	0.9998												
Kesinlik için kullanılan referans materyal : 81 µg/dl																									
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																			Ort	CV	Hata		
Kesinlik ve doğruluk	1	80	80	80	80	80	80	81	84	80	80	80	80	80	82	82	80	80	80	80	80	80	80.51	0.7	-0.5
	2	81	82	80	80	80	80	80	80	83	82	81	81	80	80	80	81	82	80	80	82	81.11	1.1	0.1	
	3	81	82	81	81	80	80	80	80	80	81	80	80	80	80	80	84	80	80	80	80	80	80.87	1.2	0.9
Lotlar arası kesinlik	1																				80.51				
	2																				81.11				
	3																				80.87	CV: 0.17%			
Körün absorbansı	1																				0.0925				
	2																				0.0965				
	3																				0.0934				

Tablo 4.21 : 10 Ocak 2019 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	4.1	104.5	204.7	300.9	403.8	506.7	603.4	701.9	823.1	906	1020.6	0.9997											
	2	3.8	101.8	203.6	300.6	405.6	507.6	611.3	709.6	798	916.8	1060.3	0.9984											
	3	4.6	102.8	205.7	308.9	403	506.2	603.6	710	803	915.3	1020.8	0.9998											
Kesinlik için kullanılan referans materyal : 81 µg/dL																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																				Ort	CV	Hata
Kesinlik ve doğruluk	1	81	80	80	85	81	80	78	82	80	80	84	79	80	80	82	80	82	80	76	80	80.82	2.3	-0.2
	2	80	82	80	80	84	85	82	81	78	80	80	82	80	80	82	80	82	82	78	81	81.3	2	1.3
	3	81	78	77	80	80	82	80	80	80	80	77	76	81	80	78	79	81	80	80	80	79.88	1.9	0.1
Lotlar arası kesinlik	1																					80.82		
	2																					81.3		
	3																					79.88		CV: 0.89%
Körün absorbansı	1																					0.0896		
	2																					0.0928		
	3																					0.0906		

Tablo 4.22 : 11 Şubat 2019 raf ömrü değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	4.1	104.8	206.4	298.6	403.5	497.3	609.6	704.5	809.8	906.7	962.5	0.9986											
	2	3.8	104.7	207.8	298.5	406.9	504.9	607.9	700.6	811.4	908.9	971.7	0.999											
	3	3.7	106.9	204.6	306.9	398.9	507.6	603.7	701.9	801.6	891.3	993.4	0.9999											
Kesinlik için kullanılan referans materyal : 81 µg/dl																								
Ölçüm sonuçları (µg/dl)												Ort	CV	Hata										
Kesinlik ve doğruluk	1	80	80	80	82	82	80	80	81	80	80	82	79	79	80	81	78	79	80	78	80	80.67	1.4	-0.3
	2	81	80	80	81	80	80	80	79	80	80	81	80	82	80	79	79	80	80	79	80	80.55	1	-0.5
	3	80	81	80	79	81	80	80	80	81	81	80	80	76	80	80	80	80	81	80	80	82	80.59	1.6
Lotlar arası kesinlik	1												80.67											
	2												80.55											
	3												80.59	CV: 0.06%										
Körün absorbansı	1												0.0876											
	2												0.0919											
	3												0.0963											

Tablo 4.23 : 11 Nisan 2019 raf ömrü değerlendirmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	4.6	100	202	290.5	400.3	510.9	583.6	703.6	816	893	990.3	0.9992											
	2	3.9	102.6	198.2	310.4	409.3	508.6	612.6	715.3	810.6	906.3	1030	0.9997											
	3	4.1	102.8	210.6	296.3	396.4	492.9	606.4	704.5	810.4	915	1036	0.9992											
Kesinlik için kullanılan referans materyal : 81 µg/dl																								
Ölçüm sonuçları (µg/dl)												Ort	CV	Hata										
Kesinlik ve doğruluk	1	80	81	80	86	81	80	78	80	80	82	84	79	78	80	80	80	82	80	76	80	80.71	2.1	-0.3
	2	82	80	81	80	80	83	76	77	75	80	80	83	80	80	81	80	82	81	79	80	80.42	2.1	-0.6
	3	80	80	81	82	80	79	77	75	80	80	86	79	77	84	81	80	80	80	80	80	80.39	2.3	-0.6
Lotlar arası kesinlik	1												80.71											
	2												80.42											
	3												80.39	CV: 0.17%										
Körün absorbansı	1												0.0876											
	2												0.0919											
	3												0.0963											

4.3.14 Cihaz üzerinde kullanım süresi

Tablo 4.24 : 8 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	4.2	102.8	203.7	301.3	402.6	500.8	600.4	698.2	794.3	897.3	986.1	0.9999											
	2	3.8	101.8	202.1	301.9	401.8	500.9	587.3	702.5	789.3	896.5	995.6	0.9998											
	3	4.3	102.8	203.6	301.4	400.9	503.4	604.6	700.8	800.4	876.3	992.3	0.9996											
Kesinlik için kullanılan referans materyal : 81 µg/dl																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)											Ort	CV	Hata									
Kesinlik ve doğruluk	1	81	80	80	81	79	80	77	80	81	83	83	80	78	80	80	78	81	80	78	81	80.4	1.9	-0.6
	2	82	80	80	82	78	80	80	79	80	80	82	80	82	80	77	80	80	80	82	80	80.58	1.5	-0.4
	3	80	81	80	80	82	80	81	79	80	83	82	80	80	80	80	78	82	80	80	81	80.9	1.4	-0.1
Lotlar arası kesinlik	1												80.4											
	2												80.58											
	3												80.9	CV: 0.25%										
Körün absorbansı	1												0.0925											
	2												0.0965											
	3												0.0934											

Tablo 4.25 : 11 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	3.9	103.6	202.8	303.4	405	503	603.1	696.5	792	894	985	0.9999											
	2	4.2	102.8	202.8	303.5	400.8	501	591.5	695.4	801	902	990	0.9999											
	3	3.6	100.8	202.8	300.5	402.4	501	605.2	703.5	796	882	996	0.9997											
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dL																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																				Ort	CV	Hata
Kesinlik ve doğruluk	1	79	80	81	80	81	80	79	80	80	80	81	79	80	80	80	80	81	78	80	80.39	0.9	-0.6	
	2	80	80	82	82	81	80	81	80	80	80	80	78	80	80	80	80	80	78	81	80.67	1.1	-0.4	
	3	81	80	80	80	80	79	80	80	80	81	80	80	82	81	78	80	80	78	80	78	80.37	1.1	-0.1
Lotlar arası kesinlik	1																					80.39		
	2																					80.67		
	3																					80.37	CV: 0.16%	
Körün absorbanı	1																					0.0896		
	2																					0.0928		
	3																					0.0906		

Tablo 4.26 : 14 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	5.1	102.4	201.8	303.6	405.6	498.4	589.4	696.3	800.1	896.6	1000	0.9999											
	2	3.8	102.3	199.6	305.7	408.1	501.7	600.4	705.4	798.1	905.5	997.3	0.9999											
	3	4.5	103.9	205.8	298.4	397.4	497.6	602.3	701.9	796.7	900.7	986.5	0.9999											
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dl																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																			Ort	CV	Hata	
Kesinlik ve doğruluk	1	80	80	80	82	81	80	84	80	82	80	84	86	82	80	80	81	83	80	79	80	81.65	2.1	0.6
	2	81	81	80	86	80	80	82	80	82	80	81	80	83	80	82	81	80	80	78	76	81.055	2.4	0.05
	3	82	82	80	85	81	81	81	80	81	80	80	81	86	80	80	80	82	80	76	75	81.065	3	0.06
Lotlar arası kesinlik	1																				81.65			
	2																				81.055			
	3																				81.065	CV: 0.34%		
Körün absorbansı	1																				0.0781			
	2																				0.0926			
	3																				0.0933			

Tablo 4.27 : 18 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	3.4	104.8	205.6	298.7	400.6	502.6	610.5	700.4	798.5	898.6	996.3	0.9999											
	2	3.2	103.9	206.2	301.9	401.7	501.4	603.2	703.6	800.6	891.4	1005.6	0.9999											
	3	4.3	104.2	207.4	303.6	400.4	505.3	599.3	708.9	796.3	892.3	1015.3	0.9996											
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dl																								
Ölçüm sonuçları (µg/dl)												Ort	CV	Hata										
Kesinlik ve doğruluk	1	84	82	81	80	81	78	81	77	80	80	79	80	79	81	80	80	82	82	77	80	80.62	2	-0.4
	2	86	80	80	80	80	80	80	80	78	78	80	78	80	80	80	80	81	80	78	80	80.69	2	-0.3
	3	85	82	80	81	80	79	80	80	80	77	80	79	80	80	81	80	80	82	81	78	80.95	1.9	-0.1
Lotlar arası kesinlik	1												80.62											
	2												80.69											
	3												80.95											
Körün absorbansı	1												0.0788											
	2												0.0924											
	3												0.0936											

Tablo 4.28 : 21 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	3.5	103.5	202.4	299.6	404.3	498.5	609.6	697.6	789.6	894.5	973.6	0.9995											
	2	3.4	103.8	205.6	304.2	400.5	505	598.6	695.8	793.6	895.3	963.5	0.9994											
	3	3.7	105.6	202.8	300.4	399.6	498.6	599.4	698.3	791.2	890.6	985.6	0.9999											
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dl																								
Ölçüm sonuçları (µg/dl)												Ort	CV	Hata										
Kesinlik ve doğruluk	1	80	82	80	82	80	82	80	80	81	82	80	79	79	80	80	81	80	81	76	78	80.59	1.8	-0.4
	2	80	79	80	83	78	81	80	80	81	80	80	78	84	80	79	82	80	82	82	79	80.815	1.8	-0.2
	3	83	81	80	84	80	81	80	80	80	80	80	81	80	80	78	78	81	80	78	80	75	80.335	2.1
Lotlar arası kesinlik	1												80.59											
	2												80.815											
	3												80.335											
Körün absorbanı	1												0.0784											
	2												0.0923											
	3												0.0933											

Tablo 4.29 : 25 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirilmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	4.2	103.5	202.8	298.5	400.6	504.6	586.3	703.6	796.5	896.3	993.7	0.9998											
	2	3.6	103.8	203.5	306.5	398.5	502.3	596.3	698.3	795.3	886.4	990.7	0.9999											
	3	4.5	105.4	206.4	301.8	399.4	507.4	589.6	699.4	794.2	889.4	1002.3	0.9998											
Kesinlik için kullanılan referans materyal: 81 µg/dl																								
Ölçüm sonuçları (µg/dl)												Ort	CV	Hata										
Kesinlik ve doğruluk	1	80	78	79	81	80	84	78	81	79	80	79	79	81	80	83	80	81	80	78	80	80.55	1.9	-0.5
	2	81	79	80	78	82	80	79	82	80	80	81	80	82	81	82	78	82	80	79	75	80.47	2	-0.5
	3	80	80	81	80	81	81	80	78	78	78	80	78	80	82	78	79	80	80	76	80	80.07	1.8	-1
Lotlar arası kesinlik	1												80.55											
	2												80.47											
	3												80.07											
Körün absorbanı	1												0.0896											
	2												0.0928											
	3												0.0906											

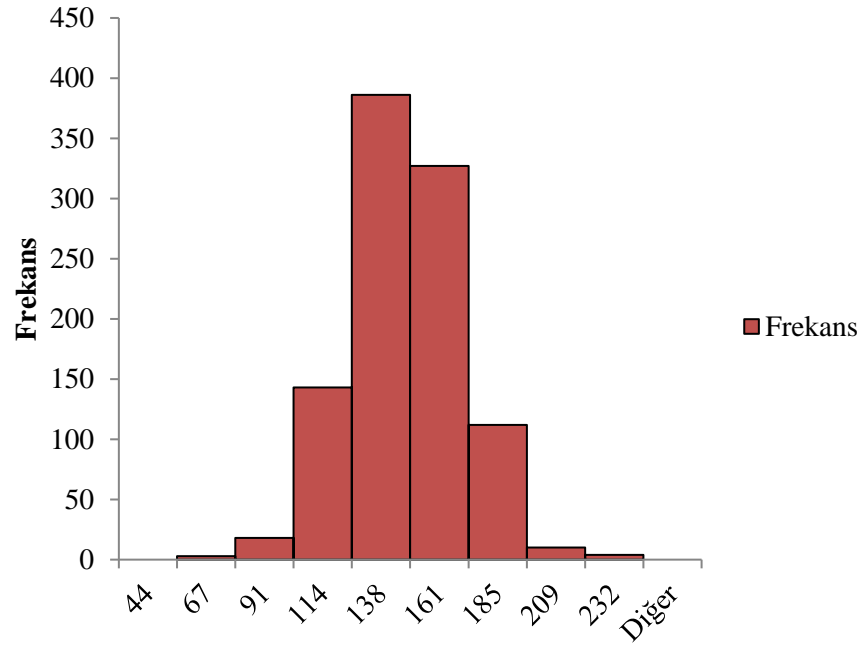
Tablo 4.30 : 28 Mart 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirmesi sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	3.6	102.8	200.8	299.6	401.5	498.5	600.4	698.4	786.5	895.6	981.4	0.9998											
	2	3.8	101.9	202.1	294.6	400.8	499.5	602.4	689.3	796.3	897.4	985.3	0.9998											
	3	4.2	103.4	201.8	300.8	399.6	492.1	598.6	700.4	798.4	899.4	990.6	0.9999											
Reference material for precision: 81 µg/dl																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																			Ort	CV	Hata	
Kesinlik ve doğruluk	1	78	77	81	78	80	84	80	79	81	80	82	79	78	80	78	80	81	80	80	78	80.22	1.9	-0.4
	2	81	80	80	79	80	82	80	78	80	80	81	80	79	80	78	77	80	78	81	79	80.09	1.5	-0.2
	3	80	78	80	84	81	80	81	78	81	81	80	81	80	78	81	81	79	79	80	78	80.51	1.7	-0.7
Lotlar arası kesinlik	1																				80.22			
	2																				80.09			
	3																				80.51	CV: 0.22%		
Körün absorbansı	1																				0.0896			
	2																				0.0928			
	3																				0.0906			

Tablo 4.31 : 1 Nisan 2019 cihaz üzerinde kullanım süresi değerlendirme sonuçları.

Kriter	Lot	Düşük 4µg/dl	9:1	8:2	7:3	6:4	5:5	4:6	3:7	2:8	1:9	Yüksek 1000µg/dl	r ²											
Doğrusallık	1	3.5	102.8	202.9	298.6	400.5	501.7	599.4	694.5	789.4	889.6	996.3	0.9999											
	2	4.2	103.6	207.8	299.4	405.8	502.3	598.6	698.3	795.6	895.4	981.3	0.9998											
	3	3.6	105.6	200.9	305.6	398.3	498.6	597.4	699.7	792.3	900.2	975.6	0.9997											
Reference material for precision: 81 µg/dl																								
		Ölçüm sonuçları (µg/dl)																			Ort	CV	Hata	
Kesinlik ve doğruluk	1	81	79	82	78	80	81	81	79	78	81	81	78	79	80	81	78	80	81	79	80	80.3	1.5	-0.7
	2	78	79	81	79	80	78	80	80	77	80	81	80	84	80	78	80	81	81	79	81	80.3	1.7	-0.7
	3	80	80	80	81	80	79	78	81	76	80	80	82	82	81	79	80	80	80	78	86	80.57	2.3	-0.4
Lotlar arası kesinlik	1																				80.3			
	2																				80.3			
	3																				80.57	CV: 0.15%		
Körün absorbansı	1																				0.0887			
	2																				0.0919			
	3																				0.0916			

4.3.15 Referans Aralığı



Şekil 4.22 : Referans aralık belirleme çalışması sonucu.

Çalışmaya dahil edilen 1003 bakır ölçüm sonucu ile yapılan değerlendirmede ortalama 137.9, standart sapma 23.5 olarak hesaplandı. $\pm 2SD$ referans aralığı kabul edilerek referans aralığı 91-185 $\mu\text{g/dl}$ olarak hesaplandı.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1 Sonuçlar

Klinik laboratuvarlarda serum örneklerinde bakır konsantrasyonu ölçümü için otomatize klinik kimya kiti geliştirilmesi ve geliştirilen yöntemin performans değerlendirmeleri ve klinik kullanıma uygunluğunun değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçlara uygun seçilen üç kromojen ajandan 3,5-DiBr-PAESA'nın hedeflenen sonuçların elde edilmesi için en uygunu olduğu gözlemlenmiştir [105, 159]. Serum ve kromojen içeren reaktifin birleşimiyle meydana gelen reaksiyonun gücünü artırmak amacıyla reaksiyon ortamına surfaktan, katalizör ve redüktan moleküller eklenmiştir. Kullanılan tüm kimyasalların uygun konsantrasyonları belirlenmiş, klinik kimya analizörüne uygulaması yapılmıştır. Ortaya çıkan yöntem klinik kullanıma uygunluğu açısından değerlendirilmiştir.

Geliştirilen yöntemin %CV değeri 2'nin altında, hata değeri -1 ile 1 arasındadır. Yöntem karşılaştırma çalışmalarında AAS ile 0.9785 oranında korelasyon gözlemlenmiştir. Yapılan regresyon analizi sonucu elde edilen r^2 değeri 0.9647'tir. LoB 0.178 µg/dl, LoD 0.607 µg/dl, LoQ 3.207 µg/dl olarak tespit edilmiştir. Yöntem 4-1000 µg/dl aralığında doğrusaldır. Carry-over gözlemlenmemiştir. Çinko, magnezyum, kobalt ve demir iyonları ölçümlerde girişime sebep olmamaktadır. Raf ömrü en az 6 ay, cihaz üzerinde kullanım süresi en az 25 gün olarak tespit edilmiştir. Yöntem hemolizden %1 oranında, lipemi ve ikterden hiç etkilenmemektedir. Gama Glutamil Transferaz (GGT), Demir Bağlama Kapasitesi (UIBC), Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, Albumin, Kreatinin, Demir, Çinko, LDL, HDL, Amilaz, Magnezyum, Fosfor, Üre, Alkalen Fosfataz, Trigliserid, Glukoz, Kolesterol, Kalsiyum ve Kreatin Kinaz reaktiflerinden carry-over yoluyla interferens olmadığı tespit edilmiştir. Total Protein reaktifi kullanılarak yapılan ölçümden sonra aynı küvette bakır ölçümü yapıldığında %2 oranında interferens olduğu tespit edilmiştir. Sorun yıkama çözeltisi değiştirilerek ve protein ölçümünden sonra özel yıkama komutu verilerek çözülmüştür. Kesinlik, doğruluk, yöntem karşılaştırması, tespit kabiliyeti,

doğrusallık, carry-over, girişim, raf ömrü, cihaz üzerinde kullanım süresi ve referans aralığı değerlendirilen yöntemin klinik kullanıma uygun olduğu gözlemlenmiştir [107, 115, 117].

Geliştirilen yeni reaktif kiti dünya genelinde otomatize sistemlere uyumlu ölçüm kitleri ile performans açısından karşılaştırıldığında özellikle stabilitesi olmak üzere daha üstündür. Ülkemizde üretimi ve tüm dünyaya pazarlanması mümkün pratik, maliyetleri düşüren, hızlı sonuç verilebilmesini sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir.

Çalışmanın kısıtlılıkları olarak tek bir laboratuvarda çalışılmış olması ve farklı hastalık, yaş ve cinsiyet gruplarında yöntemin değerlendirilmiş olmaması göz önünde bulundurulmalıdır.

5.2 Öneriler

Metabolizma ve hastalıkların gelişiminde farklı mekanizmalarla önemli roller oynadığı bilinen eser elementlerin incelenmesinde ve klinik uygulamalarda bakır ölçümünün kolay ve çabuk ulaşılabilir olmasını sağlayan bir yöntem geliştirilmiştir. Yöntem kullanılarak farklı hastalıklarda bakır konsantrasyonu değerlendirmeleri, yaş ve cinsiyetle gerçekleşen bakır konsantrasyonu değişiklikleri, farklı laboratuvar parametreleriyle oranlanarak bakır konsantrasyon değişiminin öneminin belirlenmesi içerikli çalışmalar yapılmalıdır.

Günde ortalama 20, ayda ortalama 500 test bakır çalışıldığında hastanemiz şartlarında (bakır için birim test dış laboratuvar fiyatı Haziran 2019 itibariyle 16 TL) aylık ortalama 8 bin TL yılda 96 bin TL bakır ölçümü için masraf yapıldığı bilinmektedir. Yeni geliştirdiğimiz yöntemle hastane bu masraftan kurtarılmıştır. Tek bir test ve tek bir hastane için yapılan bu maliyet hesaplamasıyla bile elde edilen kâr küçümsenemeyecek düzeydedir. Bu yöntem aynı zamanda ülkemiz şartlarında üretilip tüm dünyaya ihraç edilebilecek bir potansiyel üründür. Dolayısıyla, bu ve benzeri çalışmalar yaygınlaşmalı ve bir çok hastanede bir çok test için ülkemiz sınırlarında üretilen yöntemlerin kullanımının önü açılmalıdır.

KAYNAKLAR

- [1] **Gherson, P. L., Howard; Pelavin, Milton; Vlastelica, Dan.** (2000). *Automated Instrumentation, Clinical Chemistry*. Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology.
- [2] **Meret, S. ve Henkin, R. I.** (1971). Simultaneous Direct Estimation by Atomic Absorption Spectrophotometry of Copper and Zinc in Serum, Urine, and Cerebrospinal Fluid. *Ann Clin Biochem*, 17(5), 369-373.
- [3] **Beckett, J. M., Hartley, T. F. ve Ball, M. J.** (2009). Evaluation of the Randox colorimetric serum copper and zinc assays against atomic absorption spectroscopy. *Ann Clin Biochem*, 46(Pt 4), 322-326.
- [4] **Melo, A. M., Rute M.F., Diego M., de Oliveira; Martins, D. deCerqueira; Ramon, S. El-Bacha.** (2011). Oxidative Stress in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms and Therapeutic Perspectives %J Oxidative Medicine and Cellular Longevity. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2011, 14.
- [5] **Strausak, D., Mercer, J. F. B., Dieter, H. H., Stremmel, W. ve Multhaup, G.** (2001). Copper in disorders with neurological symptoms: Alzheimer's, Menkes, and Wilson diseases. *Brain Research Bulletin*, 55(2), 175-185.
- [6] **Carl A Burtis, E. R. A., David E Bruns.** (2006). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. St. Louis, MO: Elsevier.
- [7] **Linder, M. C. ve Hazegh-Azam, M.** (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 63(5), 797S-811S.
- [8] **Fierke, C. A., Huang, C. ve McCall, K. A.** (2000). Function and Mechanism of Zinc Metalloenzymes. *The Journal of Nutrition*, 130(5), 1437S-1446S.
- [9] **Alfthan, G., Xu, G.-L., Tan, W.-H., Aro, A., Wu, J., Yang, Y.-X., ve ark.** (2000). Selenium supplementation of children in a selenium-deficient area in China. *Journal of Biological Chemistry*, 73(2), 113-125.
- [10] **Uriu-Adams, J. Y. ve Keen, C. L.** (2005). Copper, oxidative stress, and human health. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 268-298.
- [11] **Hart, E. B., Steenbock, H., Elvehjem, C. A. ve Waddell, J.** (1925). Iron in nutrition: i. Nutritional anemia on whole milk diets and the utilization of inorganic iron in hemoglobin building. *Journal of Biological Chemistry*, 65(1), 67-80.
- [12] **Harris, E. D.** (2003). Basic and Clinical Aspects of Copper. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 40(5), 547-586.

- [13] **Turnlund, J. R., Keyes, W. R., Peiffer, G. L. ve Scott, K. C.** (1998). Copper absorption, excretion, and retention by young men consuming low dietary copper determined by using the stable isotope ^{65}Cu . *Am J Clin Nutr*, 67(6), 1219-1225.
- [14] **Saari, J. T. ve Dahlen, G. M.** (1999). Early and advanced glycation end-products are increased in dietary copper deficiency. *The Journal of nutritional biochemistry*, 10(4), 210-214.
- [15] **Arredondo, M. ve Nunez, M. T.** (2005). Iron and copper metabolism. *Mol Aspects Med*, 26(4-5), 313-327.
- [16] **Shim, H. ve Harris, Z. L.** (2003). Genetic defects in copper metabolism. *J Nutr*, 133(5 Suppl 1), 1527s-1531s.
- [17] **Araya, M., Koletzko, B. ve Uauy, R.** (2003). Copper deficiency and excess in infancy: developing a research agenda. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 37(4), 422-429.
- [18] **Yonekawa, M., Okabe, T., Asamoto, Y. ve Ohta, M.** (1999). A case of hereditary ceruloplasmin deficiency with iron deposition in the brain associated with chorea, dementia, diabetes mellitus and retinal pigmentation: administration of fresh-frozen human plasma. *European Neurology*, 42(3), 157-162.
- [19] **Loef, M. ve Walach, H.** (2012). Copper and iron in Alzheimer's disease: a systematic review and its dietary implications. *Br J Nutr*, 107(1), 7-19.
- [20] **Skalnaya, M. G., Skalny, A. V. ve Tinkov, A. A.** (2017). Serum copper, zinc, and iron levels, and markers of carbohydrate metabolism in postmenopausal women with prediabetes and type 2 diabetes mellitus. *J Trace Elem Med Biol*, 43, 46-51.
- [21] **Brewer, G. J. ve Kaur, S.** (2013). Zinc deficiency and zinc therapy efficacy with reduction of serum free copper in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2013, 586365.
- [22] **Kumar, V., Kalita, J., Bora, H. K. ve Misra, U. K.** (2016). Relationship of antioxidant and oxidative stress markers in different organs following copper toxicity in a rat model. *Toxicol Appl Pharmacol*, 293, 37-43.
- [23] **Brose, J., La Fontaine, S., Wedd, A. G. ve Xiao, Z.** (2014). Redox sulfur chemistry of the copper chaperone Atox1 is regulated by the enzyme glutaredoxin 1, the reduction potential of the glutathione couple GSSG/2GSH and the availability of Cu(I). *Metallomics*, 6(4), 793-808.
- [24] **Setty, S. R., Tenza, D., Sviderskaya, E. V., Bennett, D. C., Raposo, G. ve Marks, M. S.** (2008). Cell-specific ATP7A transport sustains copper-dependent tyrosinase activity in melanosomes. *Nature*, 454(7208), 1142-1146.
- [25] **Besold, A. N., Culbertson, E. M. ve Culotta, V. C.** (2016). The Yin and Yang of copper during infection. *J Biol Inorg Chem*, 21(2), 137-144.
- [26] **Arredondo, M., Mendiburo, M. J., Flores, S., Singleton, S. T. ve Garrick, M. D.** (2014). Mouse divalent metal transporter 1 is a copper transporter in HEK293 cells. *Biometals*, 27(1), 115-123.

- [27] **Banci, L., Bertini, I., Ciofi-Baffoni, S., Kozyreva, T., Zovo, K. ve Palumaa, P.** (2010). Affinity gradients drive copper to cellular destinations. *Nature*, 465(7298), 645-648.
- [28] **Blair, B. G., Larson, C. A., Safaei, R. ve Howell, S. B.** (2009). Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of Cisplatin and Carboplatin. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(13), 4312-4321.
- [29] **Maryon, E. B., Molloy, S. A. ve Kaplan, J. H.** (2013). Cellular glutathione plays a key role in copper uptake mediated by human copper transporter 1. *American journal of physiology Cell physiology*, 304(8), C768-779.
- [30] **Hatori, Y. ve Lutsenko, S.** (2013). An expanding range of functions for the copper chaperone/antioxidant protein Atox1. *Antioxid Redox Signal*, 19(9), 945-957.
- [31] **Festa, R. A. ve Thiele, D. J.** (2012). Copper at the front line of the host-pathogen battle. *PLoS pathogens*, 8(9), e1002887.
- [32] **Yoshida, Y., Furuta, S. ve Niki, E.** (1993). Effects of metal chelating agents on the oxidation of lipids induced by copper and iron. *Biochimica et biophysica acta*, 1210(1), 81-88.
- [33] **Davis, A. V. ve O'Halloran, T. V.** (2008). A place for thioether chemistry in cellular copper ion recognition and trafficking. *Nature chemical biology*, 4(3), 148-151.
- [34] **Rae, T. D., Schmidt, P. J., Pufahl, R. A., Culotta, V. C. ve O'Halloran, T. V.** (1999). Undetectable intracellular free copper: the requirement of a copper chaperone for superoxide dismutase. *Science*, 284(5415), 805-808.
- [35] **Wilson, S. A. K.** (1912). Progressive Lenticular Degeneration: A Familial Nervous Disease Associated With Cirrhosis Of The Liver1. *Brain*, 34(4), 295-507.
- [36] **Pettersson, R. ve Rasmussen, F.** (1999). *Daily Intake of Copper from Drinking Water among Young Children in Sweden*. 441-446 s.
- [37] **Vancampen, D. R. ve Mitchell, E. A.** (1965). Absorption of cu-64, zn-65, mo-99, and fe-59 from ligated segments of the rat gastrointestinal tract. *J Nutr*, 86, 120-124.
- [38] **King, J. C., Brown, K. H., Gibson, R. S., Krebs, N. F., Lowe, N. M., Siekmann, J. H., ve ark.** (2016). Biomarkers of Nutrition for Development (BOND)-Zinc Review. *The Journal of nutrition*, 146(4), 858S-885S.
- [39] **Angelova, M., Asenova, S., Nedkova, V. ve Koleva-Kolarova, R.** (2011). Copper in the human organism. *Trakia J Sci*, 9, 88-98.
- [40] **Maria Linder, M. H. A.** (1996). Copper biochemistry and molecular biology. *American Journal of Clinical Nutrition*, 63.

- [41] Wang, Y., Hodgkinson, V., Zhu, S., Weisman, G. A. ve Petris, M. J. (2011). Advances in the understanding of mammalian copper transporters. *Advances in nutrition (Bethesda, Md)*, 2(2), 129-137.
- [42] Lutsenko, S. (2010). Human copper homeostasis: a network of interconnected pathways. *Current opinion in chemical biology*, 14(2), 211-217.
- [43] Pope, C. R., Flores, A. G., Kaplan, J. H. ve Unger, V. M. (2012). Structure and function of copper uptake transporters. *Current topics in membranes*, 69, 97-112.
- [44] Hasan, N. M. ve Lutsenko, S. (2012). Regulation of copper transporters in human cells. *Current topics in membranes*, 69, 137-161.
- [45] Arredondo, M., Munoz, P., Mura, C. V. ve Nunez, M. T. (2003). DMT1, a physiologically relevant apical Cu¹⁺ transporter of intestinal cells. *American journal of physiology Cell physiology*, 284(6), C1525-1530.
- [46] Xiao, Z. ve Wedd, A. G. (2002). A C-terminal domain of the membrane copper pump Ctr1 exchanges copper(i) with the copper chaperone Atx1. *Chemical Communications*, (6), 588-589.
- [47] Xiao, Z., Brose, J., Schimo, S., Ackland, S. M., La Fontaine, S. ve Wedd, A. G. (2011). Unification of the copper(I) binding affinities of the metallo-chaperones Atx1, Atox1, and related proteins: detection probes and affinity standards. *The Journal of biological chemistry*, 286(13), 11047-11055.
- [48] Palumaa, P. (2013). Copper chaperones. The concept of conformational control in the metabolism of copper. *FEBS Lett*, 587(13), 1902-1910.
- [49] Lutsenko, S., Barnes, N. L., Bartee, M. Y. ve Dmitriev, O. Y. (2007). Function and regulation of human copper-transporting ATPases. *Physiol Rev*, 87(3), 1011-1046.
- [50] White, C., Kambe, T., Fulcher, Y. G., Sachdev, S. W., Bush, A. I., Fritsche, K., ve ark. (2009). Copper transport into the secretory pathway is regulated by oxygen in macrophages. *Journal of cell science*, 122(Pt 9), 1315-1321.
- [51] Ozumi, K., Sudhakar, V., Kim, H. W., Chen, G.-F., Kohno, T., Finney, L., ve ark. (2012). Role of copper transport protein antioxidant 1 in angiotensin II-induced hypertension: a key regulator of extracellular superoxide dismutase. *Hypertension*, 60(2), 476-486.
- [52] Fatemi, N. ve Sarkar, B. (2002). Molecular mechanism of copper transport in Wilson disease. *Environ Health Perspect*, 110 Suppl 5(Suppl 5), 695-698.
- [53] Denoyer, D., Masaldan, S., La Fontaine, S. ve Cater, M. A. (2015). Targeting copper in cancer therapy: 'Copper That Cancer'. *Metallomics*, 7(11), 1459-1476.
- [54] Roelofsen, H., Wolters, H., Van Luyn, M. J., Miura, N., Kuipers, F. ve Vonk, R. J. (2000). Copper-induced apical trafficking of ATP7B in polarized hepatoma cells provides a mechanism for biliary copper excretion. *Gastroenterology*, 119(3), 782-793.

- [55] **Moller, L. B., Tumer, Z., Lund, C., Petersen, C., Cole, T., Hanusch, R., ve ark.** (2000). Similar splice-site mutations of the ATP7A gene lead to different phenotypes: classical Menkes disease or occipital horn syndrome. *American journal of human genetics*, 66(4), 1211-1220.
- [56] **Curtain, C. C., Ali, F., Volitakis, I., Cherny, R. A., Norton, R. S., Beyreuther, K., ve ark.** (2001). Alzheimer's disease amyloid-beta binds copper and zinc to generate an allosterically ordered membrane-penetrating structure containing superoxide dismutase-like subunits. *The Journal of biological chemistry*, 276(23), 20466-20473.
- [57] **Borchardt, T., Camakaris, J., Cappai, R., Masters, C. L., Beyreuther, K. ve Multhaup, G.** (1999). Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J*, 344 Pt 2(Pt 2), 461-467.
- [58] **Kruger, R., Muller, T. ve Riess, O.** (2000). Involvement of alpha-synuclein in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders. *Journal of neural transmission (Vienna, Austria : 1996)*, 107(1), 31-40.
- [59] **Sensi, S. L., Granzotto, A., Siotto, M. ve Squitti, R.** (2018). Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease. *Trends Pharmacol Sci*, 39(12), 1049-1063.
- [60] **Linder, M. C., Wooten, L., Cerveza, P., Cotton, S., Shulze, R. ve Lomeli, N.** (1998). Copper transport. *Am J Clin Nutr*, 67(5 Suppl), 965s-971s.
- [61] **Kumar, N.** (2006). Copper deficiency myelopathy (human swayback). *Mayo Clinic proceedings*, 81(10), 1371-1384.
- [62] **Roberts, E. A. ve Schilsky, M. L.** (2008). Diagnosis and treatment of Wilson disease: an update. *Hepatology (Baltimore, Md)*, 47(6), 2089-2111.
- [63] **Kaler, S. G.** (2013). Inborn errors of copper metabolism. *Handb Clin Neurol*, 113, 1745-1754.
- [64] **Kaler, S. G.** (2011). ATP7A-related copper transport diseases-emerging concepts and future trends. *Nature reviews Neurology*, 7(1), 15-29.
- [65] **Telianidis, J., Hung, Y. H., Materia, S. ve Fontaine, S. L.** (2013). Role of the P-Type ATPases, ATP7A and ATP7B in brain copper homeostasis. *Front Aging Neurosci*, 5, 44.
- [66] **Kaler, S. G., Holmes, C. S., Goldstein, D. S., Tang, J., Godwin, S. C., Donsante, A., ve ark.** (2008). Neonatal diagnosis and treatment of Menkes disease. *The New England journal of medicine*, 358(6), 605-614.
- [67] **Kaler, S. G., Gallo, L. K., Proud, V. K., Percy, A. K., Mark, Y., Segal, N. A., ve ark.** (1994). Occipital horn syndrome and a mild Menkes phenotype associated with splice site mutations at the MNK locus. *Nature genetics*, 8(2), 195-202.
- [68] **Tumer, Z.** (2013). An overview and update of ATP7A mutations leading to Menkes disease and occipital horn syndrome. *Human mutation*, 34(3), 417-429.

- [69] **Yi, L., Donsante, A., Kennerson, M. L., Mercer, J. F., Garbern, J. Y. ve Kaler, S. G.** (2012). Altered intracellular localization and valosin-containing protein (p97 VCP) interaction underlie ATP7A-related distal motor neuropathy. *Human molecular genetics*, 21(8), 1794-1807.
- [70] **Yi, L. ve Kaler, S. G.** (2015). Direct interactions of adaptor protein complexes 1 and 2 with the copper transporter ATP7A mediate its anterograde and retrograde trafficking. *Human molecular genetics*, 24(9), 2411-2425.
- [71] **Gitlin, J. D.** (2003). Wilson disease. *Gastroenterology*, 125(6), 1868-1877.
- [72] **Bachmann, H., Lossner, J., Kuhn, H. J., Biesold, D., Siegemund, R., Kunath, B., ve ark.** (1989). Long-term care and management of Wilson's disease in the GDR. *European neurology*, 29(6), 301-305.
- [73] **Brewer, G. J., Hill, G. M., Dick, R. D., Nostrant, T. T., Sams, J. S., Wells, J. J., ve ark.** (1987). Treatment of Wilson's disease with zinc: III. Prevention of reaccumulation of hepatic copper. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 109(5), 526-531.
- [74] **Purchase, R.** (2013). The Link between Copper and Wilson's Disease. *Science Progress*, 96(3), 213-223.
- [75] **Bandmann, O., Weiss, K. H. ve Kaler, S. G.** (2015). Wilson's disease and other neurological copper disorders. *The Lancet Neurology*, 14(1), 103-113.
- [76] **Lutsenko, S.** (2014). Modifying factors and phenotypic diversity in Wilson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1315, 56-63.
- [77] **Capone, K. ve Azzam, R. K.** (2018). Wilson's Disease: A Review for the General Pediatrician. *Pediatric annals*, 47(11), e440-e444.
- [78] **Mercer, J. F.** (2001). The molecular basis of copper-transport diseases. *Trends in molecular medicine*, 7(2), 64-69.
- [79] **Dubois, R. S., Rodgerson, D. O. ve Hambidge, K. M.** (1990). Treatment of Wilson's disease with triethylene tetramine hydrochloride (Trientine). *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 10(1), 77-81.
- [80] **EASL Clinical Practice Guidelines.** (2012). Wilson's disease. *Journal of hepatology*, 56(3), 671-685.
- [81] **Roberts, E. A.** (2018). Update on the Diagnosis and Management of Wilson Disease. *Current gastroenterology reports*, 20(12), 56.
- [82] **Lutsenko, S., Bhattacharjee, A. ve Hubbard, A. L.** (2010). Copper handling machinery of the brain. *Metallomics*, 2(9), 596-608.
- [83] **Kodama, H.** (1993). Recent developments in Menkes disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 16(4), 791-799.
- [84] **Lorincz, M. T.** (2010). Neurologic Wilson's disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1184, 173-187.

- [85] **Gaggelli, E., Kozlowski, H., Valensin, D. ve Valensin, G.** (2006). Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev*, 106(6), 1995-2044.
- [86] **Dringen, R., Scheiber, I. F. ve Mercer, J. F.** (2013). Copper metabolism of astrocytes. *Front Aging Neurosci*, 5, 9.
- [87] **Scheiber, I. F., Mercer, J. F., Dringen, R.** (1998) *Copper in Brain and Neurodegeneration*. Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry.
- [88] **Pooler, A. M., Phillips, E. C., Lau, D. H., Noble, W. ve Hanger, D. P.** (2013). Physiological release of endogenous tau is stimulated by neuronal activity. *EMBO reports*, 14(4), 389-394.
- [89] **Nalivaeva, N. N. ve Turner, A. J.** (2013). The amyloid precursor protein: a biochemical enigma in brain development, function and disease. *FEBS Lett*, 587(13), 2046-2054.
- [90] **Tougu, V., Tiiman, A. ve Palumaa, P.** (2011). Interactions of Zn(II) and Cu(II) ions with Alzheimer's amyloid-beta peptide. Metal ion binding, contribution to fibrillization and toxicity. *Metallomics*, 3(3), 250-261.
- [91] **Atwood, C. S., Scarpa, R. C., Huang, X., Moir, R. D., Jones, W. D., Fairlie, D. P., ve ark.** (2000). Characterization of copper interactions with alzheimer amyloid beta peptides: identification of an attomolar-affinity copper binding site on amyloid beta1-42. *Journal of neurochemistry*, 75(3), 1219-1233.
- [92] **Faller, P., Hureau, C. ve Berthoumieu, O.** (2013). Role of Metal Ions in the Self-assembly of the Alzheimer's Amyloid- β Peptide. *Inorganic Chemistry*, 52(21), 12193-12206.
- [93] **Kenche, V. B. ve Barnham, K. J.** (2011). Alzheimer's disease & metals: therapeutic opportunities. *British journal of pharmacology*, 163(2), 211-219.
- [94] **Kaden, D., Bush, A. I., Danzeisen, R., Bayer, T. A. ve Multhaup, G.** (2011). Disturbed copper bioavailability in Alzheimer's disease. *Int J Alzheimers Dis*, 2011, 345614.
- [95] **Roberts, B. R., Ryan, T. M., Bush, A. I., Masters, C. L. ve Duce, J. A.** (2012). The role of metallobiology and amyloid-beta peptides in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 120 Suppl 1, 149-166.
- [96] **Bendor, J. T., Logan, T. P. ve Edwards, R. H.** (2013). The function of alpha-synuclein. *Neuron*, 79(6), 1044-1066.
- [97] **Ferrer, I., Gomez, A., Carmona, M., Huesa, G., Porta, S., Riera-Codina, M., ve ark.** (2011). Neuronal hemoglobin is reduced in Alzheimer's disease, argyrophilic grain disease, Parkinson's disease, and dementia with Lewy bodies. *J Alzheimers Dis*, 23(3), 537-550.
- [98] **Davies, K. M., Bohic, S., Carmona, A., Ortega, R., Cottam, V., Hare, D. J., ve ark.** (2014). Copper pathology in vulnerable brain regions in Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 35(4), 858-866.

- [99] **Davies, P., Wang, X., Sarell, C. J., Drewett, A., Marken, F., Viles, J. H., ve ark.** (2011). The synucleins are a family of redox-active copper binding proteins. *Biochemistry*, 50(1), 37-47.
- [100] **Kuo, H. W., Chen, S. F., Wu, C. C., Chen, D. R. ve Lee, J. H.** (2002). Serum and tissue trace elements in patients with breast cancer in Taiwan. *Biol Trace Elem Res*, 89(1), 1-11.
- [101] **Gupte, A. ve Mumper, R. J.** (2009). Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. *Cancer treatment reviews*, 35(1), 32-46.
- [102] **Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Eckschlager, T., Provaznik, I. ve Kizek, R.** (2014). Serum and tissue zinc in epithelial malignancies: a meta-analysis. *PloS one*, 9(6), e99790-e99790.
- [103] **Wachsberger, P., Burd, R. ve Dicker, A. P.** (2003). Tumor Response to Ionizing Radiation Combined with Antiangiogenesis or Vascular Targeting Agents. *Clinical Cancer Research*, 9(6), 1957.
- [104] **Crowe, A., Jackaman, C., Beddoes, K. M., Ricciardo, B. ve Nelson, D. J.** (2013). Rapid copper acquisition by developing murine mesothelioma: decreasing bioavailable copper slows tumor growth, normalizes vessels and promotes T cell infiltration. *PLoS One*, 8(8), e73684.
- [105] **Abe, A., Yamashita, S. ve Noma, A.** (1989). Sensitive, direct colorimetric assay for copper in serum. *Clin Chem*, 35(4), 552-554.
- [106] **Pum, J.** (2019). A practical guide to validation and verification of analytical methods in the clinical laboratory. *Advances in Clinical Chemistry*.ss. 215-281.
- [107] **CLSI.** 2014. User Verification of Precision and Estimation of Bias; Approved Guideline. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- [108] **Lacher, D. A., Hughes, J. P. ve Carroll, M. D.** (2005). Estimate of Biological Variation of Laboratory Analytes Based on the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Clinical Chemistry*, 51(2), 450.
- [109] **Bartlett William, A., Braga, F., Carobene, A., Coşkun, A., Prusa, R., Fernandez-Calle, P.** (2015). A checklist for critical appraisal of studies of biological variation. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*.879.
- [110] **Aarsand, A. K., Roraas, T., Fernandez-Calle, P., Ricos, C., Diaz-Garzon, J., Jonker, N., ve ark.** (2018). The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem*, 64(3), 501-514.
- [111] **Haeckel, R., Wosniok, W., Gurr, E. ve Peil, B.** (2015). Permissible limits for uncertainty of measurement in laboratory medicine. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*1161.
- [112] **Bland, J. M. ve Altman, D. G.** (1999). Measuring agreement in method comparison studies. *Stat Methods Med Res*, 8(2), 135-160.

- [113] **Martin Bland, J. ve Altman, D.** (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 327(8476), 307-310.
- [114] **Krouwer, J. S.** (2008). Why Bland-Altman plots should use X, not (Y+X)/2 when X is a reference method. *Statistics in medicine*, 27(5), 778-780.
- [115] **CLSI.** (2013). Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; s.
- [116] **Armbruster, D. A. ve Pry, T.** (2008). Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *The Clinical biochemist Reviews*, 29 Suppl 1(Suppl 1), S49-S52.
- [117] **CLSI.** (2012). Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures: Approved Guideline. In: CLSI, editör. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; s.
- [118] **Sadler, W. A.** (2016). Using the variance function to estimate limit of blank, limit of detection and their confidence intervals. *Ann Clin Biochem*, 53(Pt 1), 141-149.
- [119] **FDA.** (2000). Analytical procedures and methods validation: chemistry, manufacturing, and controls. *Fed Regist*, 65, 776-777.
- [120] **Kroll, M. H. ve Emancipator, K.** (1993). A theoretical evaluation of linearity. *Clin Chem*, 39(3), 405-413.
- [121] **Krouwer, J. S. ve Schlain, B.** (1993). A method to quantify deviations from assay linearity. *Clin Chem*, 39(8), 1689-1693.
- [122] **Kroll, M. H., Emancipator, K., Floering, D. ve Tholen, D.** (1999). An algorithm for finding the linear region in a nonlinear data set. *Computers in Biology and Medicine*, 29(5), 289-301.
- [123] **Lock, R. J.** (2006). My approach to internal quality control in a clinical immunology laboratory. *Journal of Clinical Pathology*, 59(7), 681.
- [124] **Kinns, H., Pitkin, S., Housley, D. ve Freedman, D. B.** (2013). Internal quality control: best practice. *Journal of Clinical Pathology*, 66(12), 1027.
- [125] **Albetkova, A. B. R., Berger, A., Cognat, S., Collins, C., Dubois, P., Estran, P., Fine, G., Granade, S., Howard, S., Howerton, D., Kojima, K., Liu, X., McGeary, J., Martin, R., Menna, S., Noble, M., Pierson, A., Pollock, A., Rayfield, M., Ridderhof, J., Rosner, E., Zwetyenga, J.** (2011) Laboratory quality management system: handbook. France: WHO.
- [126] **CLSI.** (2006). *Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions, approved guideline*. 4 ed. Wayne, PA.
- [127] **ISO 9000:2015** (2015) Quality management systems—Fundamentals and vocabulary. Geneva: International Organization for Standardization.

- [128] **Aarsand Aasne, K., Røraas, T., Bartlett William, A., Coşkun, A., Carobene, A., Fernandez-Calle, P., ve ark.** (2018). Harmonization initiatives in the generation, reporting and application of biological variation data. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*1629.
- [129] **Kumar, B. V. ve Mohan, T.** (2018). Sigma metrics as a tool for evaluating the performance of internal quality control in a clinical chemistry laboratory. *J Lab Physicians*, 10(2), 194-199.
- [130] **Nevalainen, D., Berte, L., Kraft, C., Leigh, E., Picaso, L. ve Morgan, T.** (2000). Evaluating Laboratory Performance on Quality Indicators With the Six Sigma Scale. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 124(4), 516-519.
- [131] **Westgard, S., Bayat, H. ve Westgard, J. O.** (2018). Analytical Sigma metrics: A review of Six Sigma implementation tools for medical laboratories. *Biochimica medica*, 28(2), 020502-020502.
- [132] **Jiménez-Chacón, J. ve Alvarez-Prieto, M.** (2009). An approach to detection capabilities estimation of analytical procedures based on measurement uncertainty. *Accreditation and Quality Assurance*, 15(1), 19-28.
- [133] **Williams, S. L.** (2012) *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Eurachem.
- [134] **ISO 21748:2017.** (2017) Guidance for the use of repeatability, reproducibility and trueness estimates in measurement uncertainty evaluation. Geneva: ISO.
- [135] **Dimeski, G.** (2008). Interference testing. *The Clinical biochemist Reviews*, 29 Suppl 1(Suppl 1), S43-S48.
- [136] **Cornes, M. P.** (2016). Exogenous sample contamination. Sources and interference. *Clin Biochem*, 49(18), 1340-1345.
- [137] **Farrell, C. J. ve Carter, A. C.** (2016). Serum indices: managing assay interference. *Ann Clin Biochem*, 53(Pt 5), 527-538.
- [138] **Cleophas, T. J.** (1993). Interaction in cardiovascular crossover studies: the standard and the clinical analysis. *Angiology*, 44(4), 271-277.
- [139] **Haeckel, R.** (1988). Recommendations for definition and determination of carry-over effects. *The Journal of automatic chemistry*, 10(4), 181-183.
- [140] **Armbruster, D. A. ve Alexander, D. B.** (2006). Sample to sample carryover: a source of analytical laboratory error and its relevance to integrated clinical chemistry/immunoassay systems. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 373(1-2), 37-43.
- [141] **Keller, T. ve Brinkmann, T.** (2014). Proposed guidance for carryover studies, based on elementary equivalence testing techniques. *Clinical laboratory*, 60(7), 1153-1161.
- [142] **Dalenberg, D. A., Schryver, P. G. ve Klee, G. G.** (2013). Analytical performance specifications: relating laboratory performance to quality required for intended clinical use. *Clin Lab Med*, 33(1), 55-73.

- [143] **Miller, W. G., Horowitz, G. L., Ceriotti, F., Fleming, J. K., Greenberg, N., Katayev, A., ve ark.** (2016). Reference Intervals: Strengths, Weaknesses, and Challenges. *Clinical Chemistry*, 62(7), 916.
- [144] **CLSI.** (2010). CLSI document C28-A3C. How to define and determine reference intervals in the clinical laboratory: approved guideline – Second edition. Wayne, PA, USA: CLSI; s.
- [145] **Solberg, H. E.** (1994). Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clin Chem*, 40(12), 2205-2206.
- [146] **Adeli, K., Raizman, J. E., Chen, Y., Higgins, V., Nieuwesteeg, M., Abdelhaleem, M., ve ark.** (2015). Complex biological profile of hematologic markers across pediatric, adult, and geriatric ages: establishment of robust pediatric and adult reference intervals on the basis of the Canadian Health Measures Survey. *Clin Chem*, 61(8), 1075-1086.
- [147] **Solberg, H. E. ve Stamm, D.** (1991). IFCC recommendation — theory of reference values. Part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Clinica Chimica Acta*, 202(1), S5-S11.
- [148] **Ritchie, R. F. ve Palomaki, G.** (2004). Selecting clinically relevant populations for reference intervals. *Clin Chem Lab Med*, 42(7), 702-709.
- [149] **Horn, P. S., Pesce, A. J. ve Copeland, B. E.** (1998). A robust approach to reference interval estimation and evaluation. *Clin Chem*, 44(3), 622-631.
- [150] **Sikaris, K. A.** (2014). Physiology and its importance for reference intervals. *The Clinical biochemist Reviews*, 35(1), 3-14.
- [151] **Ichihara, K. ve Boyd, J. C.** (2010). An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. *Clin Chem Lab Med*, 48(11), 1537-1551.
- [152] **Ozarda, Y., Ichihara, K., Barth, J. H. ve Klee, G.** (2013). Protocol and standard operating procedures for common use in a worldwide multicenter study on reference values. *Clin Chem Lab Med*, 51(5), 1027-1040.
- [153] **Kroll, M. H., Præstgaard, J., Michaliszyn, E. ve Styer, P. E.** (2000). Evaluation of the Extent of Nonlinearity in Reportable Range Studies. *124(9)*, 1331-1338.
- [154] **Westgard, J. O.** (2003). Internal quality control: planning and implementation strategies. *Annals of Clinical Biochemistry*, 40(6), 593-611.
- [155] **Housley, D., Kearney, E., English, E., Smith, N., Teal, T., Mazurkiewicz, J., ve ark.** (2008). Audit of internal quality control practice and processes in the south-east of England and suggested regional standards. *Annals of Clinical Biochemistry*, 45(2), 135-139.

- [156] **European Medicines Agency Committee for Medicinal Products for Human Use** (2011). *Guideline on bioanalytical method validation*. European Medicines Agency.
- [157] **Zeng, W., Musson, D. G., Fisher, A. L. ve Wang, A. Q.** (2006). A new approach for evaluating carryover and its influence on quantitation in high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry assay. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 20(4), 635-640.
- [158] **Jones, G. R. D., Haeckel, R., Loh, T. P., Sikaris, K., Streichert, T., Katayev, A., ve ark.** (2018). Indirect methods for reference interval determination - review and recommendations. *Clin Chem Lab Med*, 57(1), 20-29.
- [159] **Ohshita, K., Wada, H. ve Nakagawa, G.** (1985). Synthesis of bidentate pyridylazo and thiazolylazo reagents and the spectrophotometric determination of copper in a flow-injection system. *Analytica Chimica Acta*, 176, 41-50.

EKLER

Ek A. Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu Onayı.....	99
Ek B. Kurum İzni.....	102



Ek A

Evrak Tarih ve Sayısı: 21/08/2017-14992



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu



Sayı : 54022451-050.05.04-
Konu : Etik Kurul Kararı

Sayın Doç.Dr. Şahbettin SELEK

15.08.2017 tarihinde yapılan Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu toplantısında "Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi" başlıklı başvurunuz değerlendirilmiş olup karar yazısı ektedir.
Bilgilerinize.

e-imzalıdır

Doç.Dr. Binnur TEMEL
Başkan V.

Ek: Karar Yazısı (2 sayfa)

21/08/2017 Sek.

Elif Gamze ASLAN

Mevcut Elektronik İmzalar

BİNNUR TEMEL (Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu - Başkan V.) 21/08/2017 15:07

Adres: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih /
İstanbul
Telefon: 0 (212) 523 22 88 Faks: 0 (212) 533 23 26
e-Posta: info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ: www.bezmialem.edu.tr

Bilgi için: Elif Gamze ASLAN
Unvanı: Sekreter

Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42)
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi
-----------------------	---

15.08.2017

ETİK KURULU BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Adnan Menderes Bulvarı Vatan caddesi 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 - 1028
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	egaslan@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Şahabettin SELEK			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	-	-	Gerekli Değil <input type="checkbox"/> Var <input checked="" type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-	-	Gerekli Değil <input type="checkbox"/> Var <input checked="" type="checkbox"/>
KARAR BİLGİLERİ	Karar No:15/228	Tarih: 15.08.2017		
	Yürütücülüğünü Doç. Dr. Şahabettin SELEK 'in yaptığı "Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kitinin Geliştirilmesi" Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından değerlendirilmiş ve etik açıdan uygun bulunmuştur.			

Sayfa 1 / 2

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. İsmail MERAL



BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42)
KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kiti nin Geliştirilmesi
-----------------------	--

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU	
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
Başkanın Unvanı / Adı / Soyadı:	Prof. Dr. İsmail MERAL

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
			E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. İsmail MERAL	Fizyoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ömer SOYSAL	Göğüs Cerrahisi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Nuran YILDIRIM	Tıp Tarihi ve Etik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Türkinaz AŞTI	Hemşirelik Bölümü	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Fahri AKBAŞ	Tıbbi Biyoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Binnur AYDOĞAN TEMEL	Eczacılık	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Tolga SAKA	Spor Hekimliği	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	KATILMADI
Doç. Dr. Aclan ÖZDER	Aile Hekimliği	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Yrd. Doç. Dr. Nur BÜYÜKPINARBAŞILI	Tıbbi Patoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Öğr. Gör. Dr. Mehmet Onur KAYA	Biyoistatistik ve Tıp Bilişimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Av. Mustafa Fırat ALKAYA	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Eda BAYRAKTAR	Sivil Üye	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. İsmail MERAL

Sayfa 2 / 2

Ek B

Evrak Tarih ve Sayısı: 16/08/2017-5136



T.C.
BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi

Sayı : 97706721-900-
Konu : Etik Kurul

İLGİLİ MAKAMA

İlgi : Arş. Gör. Dr. Hifa Gülrü ÇAĞLAR'ın, 14.08.2017 tarihli dilekçesi.

Arş. Gör. Dr. Hifa Gülrü ÇAĞLAR'ın ilgi dilekçesi gereğince, doktora tez çalışması olarak belirlenen, "Tam Otomatik Bakır Ölçüm Kitinin Değiştirilmesi" isimli çalışmayı Hastanemiz rutin biyokimya laboratuvarına gelen hasta kanları kullanılarak yapma istemi Etik Kurul onayı ile beraber başvurması halinde Tıbbi Direktörlüğümüzce uygun bulunmuştur. Gereğini bilgilerinize arz ve rica ederim.

e-İmzalıdır

Prof.Dr. Fadlullah AKSOY
Hastane Tıbbi Direktörü

Mevcut Elektronik İmzalar

MEHMED FADLULLAH AKSOY (Sağlık Uygulama ve Araştırma Merkezi - Hastane Tıbbi Direktörü) 16/08/2017 08:50
Evrak Doğrulamak için: <https://e-bys.bezmialem.edu.tr/en/Vision/Doğrula/8VE081>

Adres: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) Fatih /
İstanbul
Telefon: 0 (212) 453 17 00 - 4949 Faks: 0 (212) 453 18 79
e-Posta: info@bezmialem.edu.tr Elektronik Ağ: www.bezmialemhastanesi.com

Bilgi için: Esmâ ARAÇ
Unvanı: Evrak Sorumlusu



Bu belge 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. Maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Hifa Gülru ÇAĞLAR
Doğum Tarihi ve Yeri : 06.01.1989 - Fatih
E-posta : hifagc@gmail.com

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2013, Bükreş Carol Davila Üniversitesi, Tıp Fakültesi

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2015- halen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Görevlisi

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Çaglar H. G., Koktasoglu F., Sarikaya A., Demirel M., Gul A. Z. Selek S.,** 2019. New Copper Assay for Automated Clinical Chemistry Analyzers. *EUROMEDLAB*, May 18-23, 2019, Barcelona, Spain.