



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HEMODİYALİZ HASTALARINDA SERUM KEMİK BELİRTEÇLERİNİN BİYOLOJİK VARYASYONU VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERİ

Dr. Nevin YILMAZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK

ADANA-2018



T.C
ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

HEMODİYALİZ HASTALARINDA SERUM KEMİK BELİRTEÇLERİNİN BİYOLOJİK VARYASYONU VE REFERANS DEĞİŞİM DEĞERİ

Dr. Nevin YILMAZ

UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Özlem GÖRÜROĞLU ÖZTÜRK

Bu çalışma Çukurova Üniversitesi Rektörlüğü Araştırma Fonu TTU-2017-9113 numaralı proje olarak desteklenmiştir.

ADANA-2018

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince hoşgörüsü ve saygınlığı ile örnek aldığım, bilgisi ve tecrübesi ile desteğini hiçbir zaman esirgemeyen, tez çalışmalarım sırasında büyük katkı ve özveri gösteren, danışman hocam sayın Doç. Dr. Özlem Görüroğlu ÖZTÜRK'e teşekkür ederim.

Eğitimime büyük katkı sağlayan ve her türlü konuda yardımcı olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Abdullah Tuli'ye ve değerli hocalarım Prof. Dr. Nurten Dikmen ve Prof. Dr. Akif Çürük'e ve ayrıca asistanlığa başladığım ilk günden itibaren her türlü konuda desteğini hissettiğim ve güvendiğim; bilginin ve öğrenmenin sonu olmadığını bizlere aşıl原因an Prof. Dr. Tamer İnal'a ilgi ve desteklerinden dolayı çok teşekkür ederim.

Tezimin planlanması ve yürütülmesi sırasında yaptıkları değerli katkılardan dolayı Dahiliye Nefroloji Bilim Dalından Prof. Dr. Saime Paydaş'a ve örneklerimin toplanmasında yardımcı olan Uz. Dr. Engin Onan'a, istatistiksel analiz kısmında yardımcı olan Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu ve Arş. Gör. Püren Yücel'e teşekkür ederim.

Gerek iş, gerekse manevi konularda hep yanımda olan, birlikte çalışmaktan büyük keyif ve onur duyduğum asistan arkadaşlarıma ve bütün Anabilim Dalı çalışanlarına, ayrıca merkez laboratuvarı çalışanlarına çok teşekkür ederim.

Son olarak bugünlere gelmemde karşılıksız sevgi ve destekleriyle hep yanımda olan aileme, özellikle canım anneme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Nevin YILMAZ

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

TEŞEKKÜR.....	i
İÇİNDEKİLER.....	ii
TABLO LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vii
ÖZET.....	x
ABSTRACT.....	xi
1. GİRİŞ.....	12
2. GENEL BİLGİLER.....	15
2.1. Test Sonuçlarında Varyasyonlar.....	15
2.1.1. Preanalitik Varyasyon.....	15
2.1.2. Analitik Varyasyon.....	16
2.1.3. Biyolojik Varyasyon.....	18
2.1.3.1. Tanım.....	18
2.1.3.2. Biyolojik Varyasyon Çeşitleri.....	18
2.1.3.2.1. Yaşam Boyu Biyolojik Varyasyon.....	18
2.1.3.2.2. Döngüsel Varyasyon.....	18
2.1.3.2.3. Rastgele Varyasyon.....	19
2.1.3.3. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Çalışma Prosedürleri.....	20
2.1.3.3.1. Bireylerin Seçilmesi ve Dışlama Kriterlerinin Uygulanması.....	20
2.1.3.3.2. Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Analizi.....	22
2.1.3.3.3. İstatistiksel Analiz.....	23
2.1.3.4. Biyolojik Varyasyonun Laboratuvarlarda Kullanım Alanları.....	25
2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği.....	33
2.2.1. Tanım.....	33
2.2.2. Tanı ve Evreleme.....	34
2.2.3. Epidemiyoloji ve Prevelans.....	35

2.2.4. Etiyoloji	35
2.2.5. Patofizyoloji.....	36
2.2.6. Tedavi	37
2.2.7. KBY Sistemik Etkileri	38
2.2.7.1. Renal Osteodistrofi:	38
2.2.7.1.1. Yüksek Döngülü Kemik Hastalığı (SHPT)	39
2.2.7.1.2. Düşük Döngülü Kemik Hastalığı.....	41
2.2.7.1.3. Mikst Tip Kemik Hastalığı	42
2.2.7.2. ROD Tanı ve Takibinde Biyokimyasal Kemik Belirteçleri.....	43
2.2.7.2.1. Alkalen Fosfataz	44
2.2.7.2.2. Asit Fosfataz	45
2.2.7.2.3. Osteokalsin.....	45
2.2.7.2.4. C-Telopeptit Çapraz Bağ Yıkım Ürünleri	46
2.2.7.2.5. Kalsiyum ve Fosfat	46
3. GEREÇ ve YÖNTEM	48
3.1. Çalışma Grubu	48
3.2. Örneklerin Toplanması	48
3.3. Araç ve Gereçler	49
3.4. Biyokimyasal Analiz.....	49
3.4.1. Alkalen Fosfataz Tayini.....	49
3.4.2. Asit Fosfataz Tayini.....	50
3.4.3. Osteokalsin Tayini	51
3.4.4. β -CrossLaps (CTX) Tayini	52
3.4.5. Kalsiyum Tayini	53
3.4.6. Fosfor Tayini.....	53
3.4.7. ParathormonTayini	54
3.4.8. 25 (OH) Vitamin D Tayini.....	55
3.5. İstatiksel Analiz	56
3.5.1. Uç Değerlerin Atılması.....	56
3.5.2. CV_I ve CV_G 'nin Hesaplanması.....	57
3.5.3. CV_A 'nın Hesaplanması	57
3.5.4. RCV 'nin Hesaplanması	58

3.5.5. II'nin Hesaplanması	58
3.5.6. Analitik Kalite Özelliklerinin Hesaplanması	58
3.5.7. Homeostatik Ayar Noktasının Hesaplanması	58
4. BULGULAR	60
5. TARTIŞMA	67
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
KAYNAKLAR	83
EKLER	96
EK-1. Etik kurul onay formu	96
EK-2. Cochran testi için kritik değerler tablosu.	97
EK-3. Kikare (X^2) Dağılım tablosu.	98
ÖZGEÇMİŞ	99

TABLO LİSTESİ

<u>Tablo No</u>	<u>Sayfa No</u>
Tablo 1. Farklı CV_A/CV_I oranları için çeşitli örnek, birey ve tekrar sayılarından oluşan farklı çalışma modellerinde CV_I 'nin belirlenme gücü.....	22
Tablo 2. BV için analitik kalite hedefleri.	28
Tablo 3. Böbrek fonksiyon testleri için kullanılan parametrelerden bazıları için biyolojik varyasyon bileşenleri.....	32
Tablo 4. İdrar kalsiyum ve kreatinine ait biyolojik varyasyon bileşenleri.	33
Tablo 5. Glomerüler filtrasyon hızına göre kronik böbrek yetmezliği sınıflaması.	34
Tablo 6. SDBY nedenleri.	36
Tablo 7. KBY'nin sistemik etkileri.	38
Tablo 8. Kemik döngüsünün belirleyicileri.....	44
Tablo 9. Dışlama öncesi ve sonrası birey sayıları ve analitlerin $mean \pm SD$ değerleri.	60
Tablo 10. ALP tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	62
Tablo 11. ACP tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve % 95 GA alt ve üst sınırları.	63
Tablo 12. Osteokalsin tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	63
Tablo 13. CTX tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	63
Tablo 14. Ca^{+2} tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	64
Tablo 15. P tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	64
Tablo 16. PTH tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	64
Tablo 17. 25-OH-Vit D tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.	65
Tablo 18. Kadın, erkek bireyler ve tüm grup için hesaplanmış RCV ve II değerleri.	65
Tablo 19. Test performansı açısından analitik kalite özellikleri.	66
Tablo 20. Westgard'ın BV veritabanında sağlıklı bireylerden derlenen BV verileri ile bizim verilerimizin karşılaştırılması.	66

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa No</u>
Şekil 1.	Test sonucunu etkileyen varyasyon kaynakları.....	15
Şekil 2.	Bias (sistemik hata) ve impresizyon (rastgele hata) ilişkisi.	16
Şekil 3.	Sabit sistemik hata, orantılı sistemik hata ve rastgele hata ilişkisi.	17
Şekil 4.	Biyolojik varyasyon çalışmalarında ANOVA modeli ile CV_I ve CV_G 'nin belirlenmesi.	25
Şekil 5.	%95'lik merkezi alanı gösteren örnek histogram.....	28
Şekil 6.	Yüksek döngülü, düşük döngülü, ve mikst tip kemik mineral bozuklukları. ⁹	43
Şekil 7.	ALP (A), ACP (B), OC (C), CTX (D), Ca^{+2} (E), P (F), PTH (G), D vitamini (H) düzeylerinin uç değerler atıldıktan sonra kalan bireylerdeki dağılımları.	62

SİMGELER ve KISALTMALAR

ACP	: Asit Fosfataz
ANOVA	: Varyans analizi
ALP	: Alkalen Fosfataz
B	: Analitik hata, Bias
bALP	: Kemik Spesifik Alkalen Fosfataz
BV	: Biyolojik varyasyon
Ca⁺²	: Kalsiyum
CTX	: β -CrossLaps
CKD-MBD	: Kronik Böbrek Hastalığı-Mineral ve Kemik Bozukluğu
CLIA	: Clinical Laboratory Improvement Amendments
CV	: Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation)
CV_A	: Analitik varyasyon (Analytical Variation)
CV_B	: Biyolojik Varyasyon
CV_G	: Bireyler arası biyolojik varyasyon (Between-Subject Variation)
CV_I	: Birey içi biyolojik varyasyon (Within-Subject Variation)
CV_T	: Toplam Varyasyon Katsayısı
CV_{TI}	: Birey-İçİ Total Varyasyon
D	: Homeostatik ayar noktasına yakınlık
D/R	: Dixon/Reed
DM	: Diyabetes Mellitus
EFLM	: Avrupa Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (European Federation of Laboratory Medicine)
FGF-23	: Fibroblast büyüme faktörü 23
GA	: Güven aralığı (Confidence Intervals)
GFR	: Glomerüler Filtrasyon Hızı
HPLC	: Yüksek Performanslı Likid Kromatografi (High Performance Liquid Chromatography)
HT	: Hipertansiyon
HL	: Hiperlipidemi
I	: Analitik belirsizlik (Impresizyon)

I_{MAX}	: Maksimum Impresizyon
II	: Bireysellik İndeksi (Index of Individuality)
IFCC	: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine)
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Örgütü (International Organization for Standardization)
IUPAC	: International Union of Pure and Applied Chemistry
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
KDIGO	: Kidney Disease Improving Global Outcome
KDOQI	: Kidney Disease Outcomes Quality Initiative
KKH	: Koroner Kalp Hastalığı
LBYS	: Laboratuvar Bilgi Yönetim Sistemi
LoD	: Limit of Detection
OC	: Osteokalsin
P	: Fosfat
PTH	: Paratiroid Hormon
RAAS	: Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi
RA	: Referans Aralığı
RCV	: Referans değişim değeri (Reference Change Value)
RiliBÄK	: Guideline of the German Federal Medical Council
ROD	: Renal Osteodistrofi
SEQC	: İspanyol Klinik Kimya Derneği Analitik Kalite Komisyonu
SDBY	: Son Dönem Böbrek Yetmezliği
SHPT	: Sekonder Hiperparatiroidizm
SD	: Standart Sapma (Standard Deviation, σ)
STARD	: Stohl Advanced Research and Development
TE	: Total Allowable Error (Toplam İzin Verilen Hata)
TGF-β	: Transforme edici büyüme faktörü-beta
TND	: Türk Nefroloji Derneği
USRDS	: United States Renal Data System
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü

Zp

: İstatistiksel olasılık değeri



ÖZET

Hemodiyaliz Hastalarında Serum Kemik Belirteçlerinin Biyolojik Varyasyonu ve Referans Değişim Değeri

Amaç: Biyolojik varyasyon (BV), vücuttaki homeostatik süreçlerle düzenlenen bileşenlerdeki varyasyonu tanımlar. Sağlıklı bireylerde analitlerin BV'si ile ilgili kapsamlı bir literatür bulunmaktadır. Bununla birlikte, kronik böbrek yetmezliği gibi süregelen patolojik durumu olan hastalarda, analitlerin BV'si sağlıklı bireyler ile aynı olmayabilir. Bu çalışma ile hemodiyalize giren hastalarda serum kemik belirteçlerinin birey içi BV (CV_I), bireyler arası BV (CV_G), bireysellik indeksi (II) ve referans değişim değerlerinin (RCV) hesaplanması amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: 30 stabil hemodiyaliz hastasının (15 kadın ve 15 erkek) her birinden bir hafta arayla toplam beş serum örneği alınmıştır. Bu hastaların serum Alkalen Fosfataz (ALP), Asit Fosfataz (ACP), Osteokalsin (OC), β -CrossLaps (CTX), Kalsiyum (Ca⁺²), Fosfat (P), Paratiroid hormon (PTH) ve D vitamini düzeyleri analiz edilmiştir. Varyasyonları hesaplamak için ANOVA testleri kullanılmıştır.

Bulgular: ALP, ACP, OC, CTX, Ca⁺², P, PTH ve D vitamini için CV_I sırasıyla %10,9, %5,6, %15,1, %1, %0,6, %1,1, %45,7, %2,4 olarak bulunmuştur. ALP, OC ve D vitamini için II < 0,6 olarak hesaplanmıştır. Yüksek bireysellik gösterdiği tespit edilen bu analitlerin RCV'si sırasıyla %32, %45, %10 olarak hesaplanmıştır. ACP, CTX, Ca⁺², P ve PTH için RCV sırasıyla %20, %3, %1,8, %3,2 ve %127 olarak hesaplanmıştır. Bu analitlerin II > 0,6 olarak bulunmuştur.

Sonuç: Hemodiyaliz hastalarının renal osteodistrofi durumlarının öngörülebilmesi için RCV kavramının kullanılması, laboratuvar raporlamalarında optimizasyon sağlayarak klinik karar için değerli bir araç olabilir.

Anahtar Sözcükler: Biyolojik Varyasyon, Referans Değişim Değeri, Bireysellik İndeksi, Analitik Kalite Spesifikasyonu, Serum Kemik Belirteçleri, Hemodiyaliz.

ABSTRACT

Biological Variation And Reference Change Value Of Serum Bone Markers In Hemodialysis Patients

Aim: Biological variation (BV) describes the variation in constituents regulated by homeostatic processes in the body. There is an extensive literature concerning BV of analytes which has been reported in healthy subjects. However, in the patients with ongoing pathological conditions such as chronic renal failure, the BV of analytes may not be the same as healthy subjects. The aim of this study was to calculate; within-subject BV (CV_I), between-subject BV (CV_G), index of individuality (II) and reference change values (RCV) of serum bone markers in hemodialysis patients.

Materials and Methods: Totally five serum specimens were obtained from each 30 stabil hemodialysis patients (15 female and 15 male) in an interval of one week period. Serum Alkaline Phosphatase (ALP), Acid Phosphatase (ACP), Osteocalcin (OC), β -CrossLaps (CTX), Calcium (Ca^{+2}), Phosphat (P), Parathyroid hormone (PTH) and Vitamin D levels of these patients were analyzed. ANOVA tests were used to calculate the variations.

Results: The CV_I of ALP, ACP, OC, CTX, Ca^{+2} , P, PTH and Vitamin D were found 10,9%, 5,6%, 15,1%, 1%, 0,6%, 1,1%, 45,7% and 2,4% respectively. The II of ALP, OC and vitamin D were found $< 0,6$. RCV were calculated as 32%, 45% and 10%, respectively for those analytes which were showed high individuality. RCV of ACP, CTX, Ca^{+2} , P and PTH were calculated 20%, 3%, 1,8%, 3,2% and 127%, respectively. II of all these analytes were found $> 0,6$.

Conclusion: Using RCV concept for predicting the renal osteodystrophy status of hemodialysis patients represents an optimization of laboratory reporting and could be a valuable tool for clinical decision.

Keywords: Biological Variation, Reference Change Value, Analytical Quality Specifications, Serum Bone Markers, Hemodialysis.

1. GİRİŞ

Klinik laboratuvarlarda elde edilen test sonuçları preanalitik, analitik ve biyolojik olmak üzere üç önemli varyasyondan etkilenmektedir. Biyolojik varyasyon (BV), vücut sıvı bileşenlerinin normal homeostaz etrafında fizyolojik dalgalanması olup birey içi (CV_I) ve bireyler arası (CV_G) olmak üzere 2 temel bileşeni vardır.¹ Test sonuçlarının doğru değerlendirilmesinde önemli bir faktör olan biyolojik varyasyonun klinik laboratuvarlarda pek çok kullanım alanı vardır. Preanalitik süreçte BV; uygun örnekleme aralığına karar verilmesi, analize en uygun örneğin seçimi ve örnek stabilitesinin tanımlanması için temel sağlamaktadır. Analitik süreçte BV kaynaklı hedefler, laboratuvar performansının değerlendirilmesi ve iç kalite kontrol prosedürlerinin tasarlanması için gerekmektedir. Postanalitik süreçte ise bireydeki seri ölçüm sonuçlarının CV_I değerlerinden elde edilen referans değişim değeri (RCV) ile yorumlanması veya elde edilen sonucun eski sonuçlar ile karşılaştırılması (delta check) için kullanılmaktadır.^{2,3}

Sağlıklı bireylerde BV için hazırlanmış bilgi bankasında 300'den fazla analitin verilerine ulaşmak mümkündür. Fakat sağlıklı popülasyondan elde edilen bu verilerin kullanılması, kronik böbrek yetmezliği (KBY) gibi süregelen klinik durumlarının varlığında uygun olmayabilir.²

KBY, tüm dünyada, izlemi ve tedavisi hem hasta, hem de hekimler açısından zor ve yüksek tedavi maliyeti olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda KBY hasta sayısının arttığı ortaya konmuştur. Dünyada her yıl 1 milyon kişiden, yaklaşık 150-200 kişide KBY ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde yapılan değerlendirmelerde hemodiyaliz tedavisi uygulanan toplam hasta sayısının 55.890 olduğu bildirilmiştir.⁴

KBY'de böbrek kendine düşen metabolik ürünlerin uzaklaştırılması yanında total vücut suyunu dengeleyememekte, plazma osmolalitesini, asit-baz dengesini ve diğer fonksiyonlarını gerçekleştirmekte yetersiz kalmaktadır. Bu nedenlerle ortaya çıkan patolojik süreç, organizmada biyokimyasal ve metabolik bozukluklara neden olmaktadır. Bu bozuklukların sık rastlanılanlarından biri de kemik dokuda meydana gelen renal osteodistrofidir (ROD).⁵

ROD, KBY hastalarında yaşam kalitesini düşüren, morbidite ve mortaliteyi arttıran önemli komplikasyonlardandır. KBY'nin erken evrelerinde başlar ve hemodiyaliz gibi renal replasman tedavileri sırasında da farklı şekillerde devam eder. Hemodiyaliz tedavisinin son dönem renal yetmezlikli hastalarda yaşam süresini uzatarak ROD'un görülme sıklığını arttırdığı düşünülmektedir.⁶ Diyaliz hastalarında mineral metabolizmasında oluşan bozukluklar iskelet sistemini ve damarsal yapıları etkileyerek hem kemikte hem de kalp ve damar sisteminde yapısal bozukluklara neden olurlar. Kemikteki patolojik değişiklikler kalsiyum (Ca^{+2}), fosfat (P), paratiroid hormon (PTH) ve D Vitamini ile ilişkilidir.⁷

ROD'da kemikteki patolojik değişiklikleri değerlendirmede altın standart yöntem kemik biyopsisidir. Ancak prosedürün invazif karakteri göz önünde bulundurularak, sadece klinik-biyokimyasal perspektiften yeterince açık olmayan durumlarda (örn., yüksek PTH değerlerine ve düşük alkalin fosfataz (ALP) konsantrasyonuna sahip olan hastalarda) tavsiye edilmiştir.⁸

ROD klinik semptomları, KBY'nin oldukça geç bir aşamasında ortaya çıkar. Bazı çalışmalar klinik semptomların hastaların en az %10'unda bulunduğunu ve vakaların %35-90'ında histomorfolojik değişikliklerin olduğunu bildirmiştir. Uygun tedaviyi zamanında uygulamak ve daha ciddi sonuçları önlemek için ROD'un klinik semptomlar ortaya çıkmadan teşhis edilebilmesi önemlidir. Bu nedenle ROD'un erken dönemde belirlenmesinde biyokimyasal belirteçlerin düzeyini izlemek önemlidir. Uzun süreli takip ve kemik döngüsünün izlenmesi nedeniyle birtakım kemik belirteçlerinin sık analizi, büyük miktarda veri üretir. Biyokimyasal belirteçlerin doğru yorumlanabilmesi ve seri sonuçlarda meydana gelen değişimlerin önemini değerlendirmek için, biyolojik varyasyon verilerine başvurulmalıdır.⁹

Daha önce sağlıklı bireyler dışında pek çok kronik hastalıkta BV hesaplamaları yapılmış olup sonuçlar westgardın bilgi bankasında yer almaktadır. Buna karşın hemodiyalize giren hasta grubunda kemik belirteçlerinin birçoğu için BV ile ilgili hali hazırda yapılmış çalışma ve veri bilgisi bulunmamaktadır.¹⁰ Bu da çalışmamızı, hemodiyaliz hastalarında söz konusu parametreler için biyolojik varyasyon yönünden değerlendiren ilk çalışma olmasından dolayı önemli kılmaktadır. Bu çalışma ile sağlık sistemleri genelinde güvenli, doğru ve etkili biyolojik varyasyon verilerinin oluşmasına katkı sağlanmak ve ilgili boşluğu doldurmak amaçlanmaktadır. Bu amaçla

çalışmamızda hemodiyaliz hastalarında kemik belirteçlerinin CV_I , CV_G ve RCV değerlerinin, bireysellik indekslerinin (II) ve analitik kalite hedeflerinin (analitik belirsizlik, bias, toplam hata) belirlenmesi sağlanacaktır. Westgard'ın sayfasında henüz yayınlanmamış olan bu veriler, literatüre ve veri tabanına katkı açısından sunulacaktır.

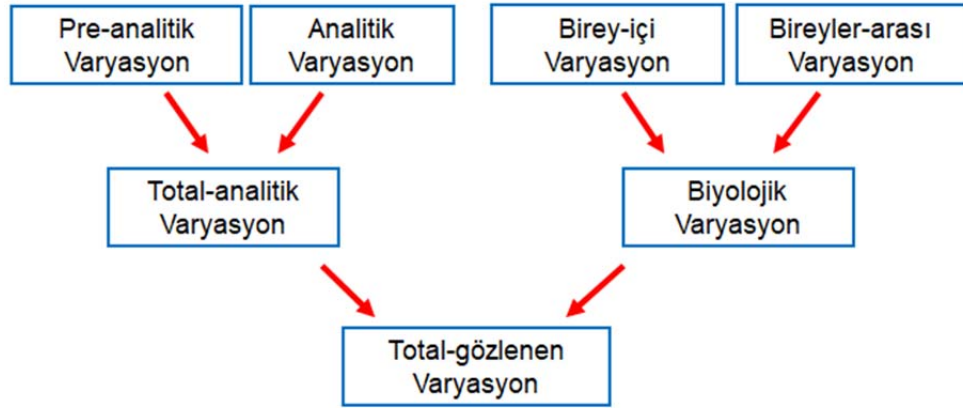


2. GENEL BİLGİLER

Klinik laboratuvarlarda ölçüm işlemleri ile binlerce sonuç elde edilir. Bu sonuçlar; grup taraması, hastalık tanısı, tedavi ve derecelendirmesi ile prognozun belirlenmesi gibi amaçlar için kullanılmaktadır. İstatistiksel veriler tıbbi kararların yaklaşık %70'inin laboratuvar sonuçlarına dayanılarak verildiğini göstermektedir. Bu nedenlerden dolayı, karar vermeye yarayan test sonuç değerleri kritik önem taşır.¹¹ Klinik laboratuvarlarda elde edilen test sonuçları kesin değerler olmayıp belli oranlarda değişebilen varyasyonlara sahiptir. Test sonuçları yorumlanırken tüm bu varyasyon kaynakları göz önünde bulundurulmalıdır.

2.1. Test Sonuçlarında Varyasyonlar

Laboratuvar sonucunun toplam varyasyonu, preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ve biyolojik varyasyon olmak üzere üç bileşenden oluşur (Şekil-1).¹¹



Şekil 1. Test sonucunu etkileyen varyasyon kaynakları.¹¹

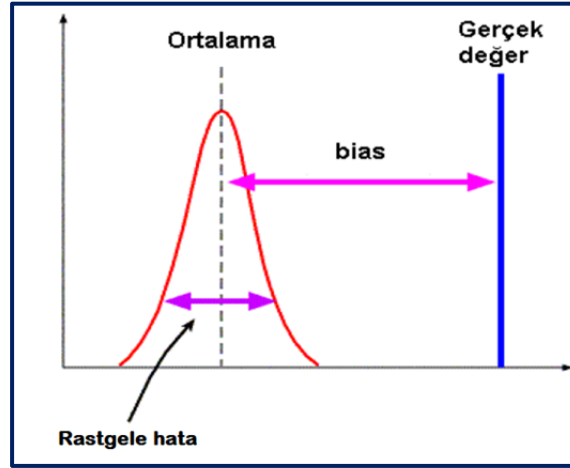
2.1.1. Preanalitik Varyasyon

Test isteminden, numunenin analizinin başladığı ana kadar olan tüm değişkenler pre-analitik varyasyonları oluşturur.¹² Preanalitik varyasyonlara neden olan değişkenleri kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler şeklinde iki grup altında toplayabiliriz. Yaş, cinsiyet, ırk gibi değişkenler kontrol edilemeyen faktörler iken sigara-alkol kullanımı, ilaç kullanımı, diyet, egzersiz, gebelik, seyahat, örneğin alımı,

taşınması ve işlenmesi gibi değişkenler kontrol edilebilen faktörlerdir.¹³ Analizlerle doğru ve güvenilir bir test sonucunun elde edilmesi için pre-analitik faktörlerin yakından sıkı bir şekilde kontrol edilmesi önem taşımaktadır. Preanalitik varyasyonların izlenmesi ve kontrolü oldukça zordur, çünkü işlemlerin çoğu geleneksel laboratuvar alanı dışında olmaktadır. Bununla birlikte standart laboratuvar prosedürleri ve kılavuzlar takip edilirse preanalitik varyasyon kaynakları azaltılabilmektedir.¹³

2.1.2. Analitik Varyasyon

Analitik varyasyon (CV_A) numunenin cihaza girmesiyle başlayan ve analizi sırasında meydana gelen varyasyonlardır. CV_A , ölçüm hataları açısından analitik performans ile ilişkilidir. Analitik yöntemlerle doğru ölçüm yapılabilmesi için tüm analitik özellikler kontrol edilmelidir. Kaliteli laboratuvar uygulaması ve en uygun analitik yöntemin seçilmesiyle bu değişken azaltılabilir, ancak her analitik yöntem veya ölçüm tekniği değişken bazı içsel hata kaynaklarına sahip olduğundan tamamen elimine edilemez. Geleneksel olarak, analitik varyasyon rastgele ve sistematik olmak üzere iki türden oluşur ve bunlar sırasıyla; analitik belirsizlik (Impresizyon, I) ve analitik hata (Bias, B) olarak adlandırılır¹⁴ (Şekil-2).¹⁵



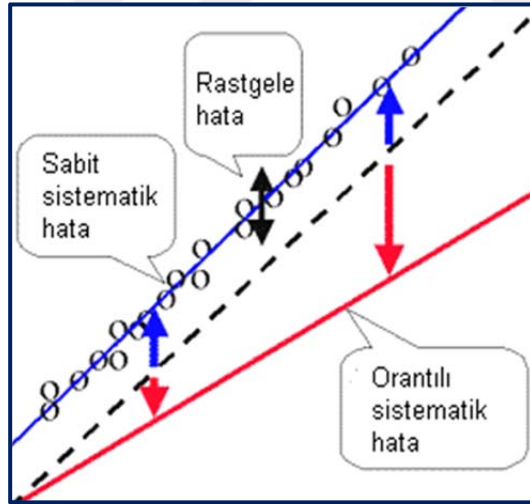
Şekil 2. Bias (sistemik hata) ve impresizyon (rastgele hata) ilişkisi.¹⁵

Impresizyon: Aynı koşullar altında bir örneğin tekrarlayan ölçüm sonuçları arasındaki uyumsuzluk olarak tanımlanır ve rastgele hatayı gösterir. Bu hatanın, sonuç dağılımı simetrik ve çan şeklinde olan normal dağılım içerisinde, ortalama bir değere denk gelmesi beklenmektedir (Şekil-2). Bu dağılımın genişliği standart sapma (standart

deviation, SD) olarak hesaplanır. Standart sapmayı ortalamaya göre kullanmak istersek, varyasyon katsayısı (Coefficient of Variance, CV) = (SD/ortalama) x 100 olarak hesaplanabilir. Uygulamada belirsizlik, SD veya CV'nin hesaplanmasıyla belirlenmektedir.¹⁵

Belirsizlik, tüm analitik yöntemlerin doğasında bulunmaktadır. Yöntemin dikkatli seçilmesiyle küçültülebilir ancak asla sıfırlanamaz. Rastgele varyasyonlar; cihaz, çevre (ısı ve elektiriksel değişimler), kit ve operatör kaynaklı olabilirler.¹³

Bias: Ölçüm sonuçlarından beklenen değer ile ölçülen niceliğin gerçek değeri arasındaki fark olarak tanımlar ve sistematik hatayı gösterir. Bu doğruluk ölçütü sonuçların referans laboratuvarlardan oluşan bir grup tarafından belirlenen konsensüs değerleri veya referans yöntem değerleri ile karşılaştırılmasıyla hesaplanır (Şekil-2).¹⁵ Sonuçların hepsi gerçek değerlerden daha yüksek veya daha düşük olabilir. Dolayısıyla sistematik hata, değerlendirilen analitik yöntem için pozitif veya negatif değerde olabilir. Sistematik hata her zaman sabit bir değerde değildir. Analit düzeyinden etkilenmeyen sabit sistematik hatanın aksine orantılı sistematik hata, analit düzeyinin %'si olarak değişim gösterir (Şekil-3).¹⁶



Şekil 3. Sabit sistematik hata, orantılı sistematik hata ve rastgele hata ilişkisi.¹⁶

Tanı ve tarama amaçlı test sonuçları kullanıldığında, bias önemli bir sorundur. Bununla birlikte, laboratuvarında süreklilik gösteren bias, klinik izlem durumunda bir sorun olmayacaktır. Ancak Bias'daki değişimler, enstrümantasyonda veya yöntemde büyük değişiklik yapılırsa ve böyle bir değişimden önce ve sonra bir bireyin örnekleri

karşılaştırılırsa, zaman içinde görülen sonuç değişkenine katkıda bulunabilir. Bu yüzden stratejimiz, analitik sonuçları rapor etmeden önce CV_A 'nın önemli bir kaynağı olan Bias'ı en aza indirmek olmalıdır. Sistematik varyasyonlar; kit, kalibratör, sarf malzeme, cihaz veya operatör kaynaklı olabilirler.^{17,18}

2.1.3. Biyolojik Varyasyon

2.1.3.1. Tanım

Biyolojik varyasyon (BV), vücutta homeostatik süreçlerle düzenlenen bileşenlerde oluşan varyasyonu tanımlamaktadır. Ölçüm sonuçlarının güvenilirliği açısından bireyde gözlemi yapılan analit değerlerinde zaman içinde meydana gelen değişikliklerin, biyolojik kaynaklı varyasyonlarla ayırımlarının yapılması ve değerlendirmelere dahil edilmesi önemlidir.¹¹

2.1.3.2. Biyolojik Varyasyon Çeşitleri

Laboratuvar tıbbında incelenen vücut sıvısı bileşenlerinin BV'si, yaşam boyu varyasyon, döngüsel varyasyon ve rastgele varyasyon olmak üzere üç şekilde sınıflandırılabilir.^{19,20}

2.1.3.2.1. Yaşam Boyu Biyolojik Varyasyon

Bir kişinin yaşamı boyunca meydana gelen biyolojik varyasyon, büyüme, yaşlanma, gebelik, menopoz ve diğer normal şartların fizyolojik değişiklikleri ile ilgilidir. Birçok analit düzeyi, yaşlanma sürecinde yer alan doğal biyolojik faktörlerden dolayı bireylerin yaşamı boyunca değişebilir. Bu değişiklikler fizyolojik olarak yenidoğan, çocukluk, ergenlik, erişkinlik veya yaşlılık dönemi gibi yaşam döngüsü içindeki kritik noktalarda daha fazla oluşabilmektedir.²⁰ Bu nedenle, referans değerler genellikle yaşlara göre alt gruplara ayrılır. Literatürde analitlerin yaşla ilişkili olarak değişimlerine ait pek çok veri mevcuttur. Tüm bu veriler asıl önemli olan biyolojik yaş tahmin etmenin zorluğundan dolayı kronolojik yaşa göre oluşturulmuştur.¹⁹

2.1.3.2.2. Döngüsel Varyasyon

Döngüsel varyasyon, dolaşıma salınan hücresel kökenli çeşitli hormonların

günlük ya da aylık değişimine bağlı olduğu gibi aydınlık-karanlık veya mevsimsel değişiklikler gibi dış etmenler aracılığıyla da ortaya çıkabilmektedir.^{18,19} Günlük değişimler vücut sıvılarındaki maddelerin çoğunda görülür. Gün içinde olan bu değişimler için; günün saatindeki değişimlerin ötesinde uyku/uyanıklık, gün ışığı/karanlık, gıda alımı, fiziksel aktivite, stres, duruş değişikliği gibi faktörlere bağlı olduğundan günlük ritim yerine sirkadyen ritim tabiri kullanılır.²¹ Aylık döngüler kadınlarda hayatlarının üreme aşamasında görülmektedir. Kadın cinsiyet hormonları ve diğer bazı hormonların plazma düzeyleri menstrasyon döngüsünden etkilenir.²² Mevsimsel döngüler büyük oranda sıcaklıkta gözlenen değişime bağlıdır, bu nedenle değerlendirmek güçtür. Analit konsantrasyonlarındaki değişim yaz aylarında kışa oranla daha fazladır. Bu değişim büyük oranda mevsimle birlikte fiziksel aktivite ve beslenmedeki değişikliğe bağlıdır.¹¹

Döngüsel ritim gösteren analitlere ait örneklerin klinik amaca uygun bir zamanda toplanması önerilmektedir. Bu dönemlere ait öngörülebilir referans değerlerin bilinmesi laboratuvar verilerinin yorumlanması açısından önem taşımaktadır. Ancak döngü boyunca tüm olası örnek toplama zamanları için referans değerlerin üretilmesi mümkün değildir. Bu nedenle bir bireyden farklı zamanlarda alınan örneklerle döngüsel ritimler belirlenebilmekte ve seri ölçüm sonuçları arasındaki farkın değerlendirilmesine katkı sağlamaktadır. Beklenen bir ritim veya döngünün bulunmaması, hastalığın varlığı hakkında önemli ipuçları vermektedir.¹¹

2.1.3.2.3. Rastgele Varyasyon

Biyolojik bir sıvı içindeki bir bileşen konsantrasyonu (örn., serum sodyum konsantrasyonu) bireydeki dinamik bir kontrolün sonucu olarak devamlı değişmektedir. Bu kontrol, organizma için optimal olan analit konsantrasyonunu, yani "homeostatik ayar noktasını" koruyan mekanizmalara bağlıdır ve genellikle gaussian bir dağılıma sahiptir. Analit konsantrasyonunun homeostatik denge noktası etrafında izlenen rastgele dalgalanması birey-içi biyolojik varyasyon (CV_I) olarak tanımlanır. Bireylerin denge noktaları birbirlerinden farklı olabilir, bu farklılıktan kaynaklanan varyasyon ise bireyler-arası biyolojik varyasyon (CV_G) olarak tanımlanır. CV_I bireye dayalı referans değerler, CV_G popülasyona dayalı ve kesitsel referans değerler için önem taşımaktadır.^{17,19}

2.1.3.3. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Belirlenmesi ve Çalışma Prosedürleri

Güvenilir BV modeli anlayışı, laboratuvar testlerinin en iyi şekilde kullanımının sağlanmasında ve uygun klinik stratejilerin geliştirilmesinde büyük önem taşımaktadır.¹¹ 1956'da Williams yapmış olduğu çalışmalarda analitlerin bireysel farklılık özelliğini ortaya koymuş, sağlıklı bir bireye ait ölçüm sonuçlarının normal kabul edilen referans aralıkları içinde her zaman bulunamayacağını ve bireylerin tekrarlayan örnek çalışmalarında bazı biyokimyasal verilerde beklenmedik varyasyonların olduğunu kaydetmiştir.²³ 1960 yılında Schneider, kesitsel dağılım örneklerinde ayrı varyans bileşenleri olarak CV_A , CV_I ve CV_G 'yi açıkça göstermiştir.²⁴ BV bileşenlerini tahmin etmenin yolu Fraser ve Harris tarafından tam olarak tanımlanmıştır. BV bileşenleri için kapsamlı bir veri tabanı oluşturulması, 1997 yılında, İspanyol Klinik Kimya Derneği Analitik Kalite Komisyonu (SEQC) tarafından başlatılmıştır. Ricos ve arkadaşlarından oluşan bu komisyon BV ile ilgili yayınlardan konu ile alakalı verileri derlemiş ve her iki yılda bir güncellenen bir veri tabanı oluşturmuştur. 2014 yılına kadar toplamda 8 kez güncellenen ve yaklaşık 358 analitin BV verilerinden oluşan bu kapsamlı veri tabanı, birçok klinik laboratuvar için yararlı bir referans görevi görmüştür.^{10,18} Daha sonraki yıllarda da BV çalışmaları devam etmiş, sadece sağlıklı kişilerde değil hastalık durumunda da BV çalışmaları yapılmıştır.²⁵

Biyolojik varyasyon ile ilgili verilerin üretilmesi, yeterli düzeyde analitik ve istatistiksel deneyim gerektirmektedir. Deneysel olarak, preanalitik faktörlerin kontrol altına alınması, titiz bir deney protokolü ile analitik varyasyonun en aza indirilmesi ve CV_I ve CV_G 'nin sağlam bir istatistiksel yöntemle elde edilmesi gerekmektedir.¹¹

Biyolojik varyasyon çalışmalarında en önemli unsur, bir bireyde zamana ait değişimlerin sayısal olarak hesaplandığı CV_I 'dir. Böyle bir hesaplama için bir grup referans bireyden uygun zaman ve aralıklarla elde edilen örneklerin ölçümü gerekir. Bu tür bir çalışma tamamlandığı ve ayrı ayrı varyasyon bileşenleri elde edildiği zaman, tüm grubun da değerlendirilmesi yapılarak analite özgü kesitsel değişiklikler (CV_G) saptanabilmektedir.²⁶

2.1.3.3.1. Bireylerin Seçilmesi ve Dışlama Kriterlerinin Uygulanması

BV bileşenlerinin sağlıklı popülasyondan oluşturulması durumunda, sağlıklı

olmayan bireyler, uygun beslenme ya da alışılmadık yaşam biçimleri olanlar, ilaç (kontraseptifler ve reçetesiz ilaçlar dahil), alkol (410g etanol/gün) ve diğer keyif verici maddeleri kullananlar dışlanır. Hastalıkta BV bileşenlerinin belirlenmesi için de dışlama kriterleri belirlenmelidir. Ancak, bireyler yaşam şekilleri hakkında tam olarak açık olmadıklarından bu dışlama kriterlerinden tam anlamıyla emin olmak zordur.¹⁹

Daha önceki çalışmalarda, analitlerin CV_I'sının farklı yaş gruplarında herhangi bir farklılık göstermediği belirtilmiş olsa da daha yeni çalışmalar, CV_I ve yaş arasında yakın bir korelasyonun mevcut olabileceğini göstermiştir. BV çalışmalarında belirli yaş aralıkları için (örn., çocuklar) analitlerin klinik kullanımı amaçlanmadığı sürece genellikle 20 ila 50 yaş arasındaki yetişkinlerin kullanılması önerilir.^{27,28} Test sonuçlarının yorumlanmasında cinsiyet, sıklıkla önemli bir faktör olduğundan dolayı, hem erkek hem de kadınların biyolojik varyasyon çalışmalarına dahil edilmesi tercih edilmektedir. Ayrıca ırk, oturduğu coğrafi konum gibi kişisel farklılıkların da birey seçiminde göz önünde bulundurulması gerekmektedir.¹¹

BV çalışmaları yapılırken örnekleme aralığı teknik açıdan bir günden az olamaz, ancak bu kısıtlama dışında aralığın uzunluğu isteğe bağlıdır.¹⁸ Örnekler hergün, haftada bir veya ayda bir alınabilir. İdeal olarak en az 10 birey ve 5 örnek ile çalışılması önerilmektedir.²⁹ İstatistiksel açıdan, daha fazla veri varsa, güven aralıkları daha dar olacaktır. Bununla birlikte birey sayısı ne kadar fazlaysa, örnekleri toplamak, bunları uygun bir şekilde ele almak ve analizleri doğru koşullar altında yapmak da zorlaşacaktır. Fraser ve Harris, uygulanan istatistiksel yöntemlere bağlı olarak varyasyon bileşenlerinin kısa dönemde küçük bir gruptan toplanan nispeten az sayıda numune ile elde edilebileceğini öne sürmüşlerdir.^{30,31}

On bin veri oluşturularak yapılan bir simülasyon çalışmasında tekrar sayıları, numune sayısı ve/veya birey sayısındaki değişikliklerin BV ölçümlerinin güvenilirliklerine etkisi incelenmiştir³² (Tablo-1).³³ Birey sayısı, tekrar ve örnek sayısı arttıkça testin gücünün arttığı, arzu edilen güce ulaşıldıktan sonra her birindeki sayıların artırılmasının güce olumlu yansımaları olmadığı görülmektedir. Örneğin, CV_A/CV_I oranı 1 olmak üzere 10 bireyden 2 örnek alınarak elde edilen güç tekrar sayısı 4'e çıkarıldığında artmaktadır. Benzer şekilde aynı sayıda bireyle aynı gücü elde etmek için tekrar sayısı artırılmadan birey sayısı artırılabilir. Bununla beraber 10 birey için örnek sayısını 8'den 10'a çıkarmak ya da 4 örnekle tekrar sayısını 3'den 4'e çıkarmak testin

gücünü etkilemeyecektir.³³

Tablo 1. Farklı CV_A/CV_I oranları için çeşitli örnek, birey ve tekrar sayılarından oluşan farklı çalışma modellerinde CV_I 'nin belirlenme gücü.³³

Analitik varyasyon / Birey içi biyolojik varyasyon (CV_A/CV_I) oranı													
Bireyler	Örnekler	1			1.5			2			3		
		Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	Tekrarlar	
		2	3	4	2	3	4	2	3	4	2	3	4
10	2	0.65	0.87	0.95	0.32	0.55	0.70	0.19	0.33	0.46	0.11	0.15	0.20
	4	0.94	1.00	1.00	0.59	0.87	0.97	0.33	0.60	0.79	0.15	0.26	0.38
	6	0.99	1.00	1.00	0.76	0.97	1.00	0.44	0.76	0.92	0.18	0.34	0.51
	8	1.00	1.00	1.00	0.86	0.99	1.00	0.54	0.87	0.97	0.22	0.41	0.62
	10	1.00	1.00	1.00	0.92	1.00	1.00	0.63	0.93	0.99	0.25	0.49	0.71
15	2	0.80	0.96	0.99	0.43	0.69	0.84	0.24	0.41	0.58	0.12	0.19	0.26
	4	0.99	1.00	1.00	0.74	0.96	0.99	0.42	0.74	0.90	0.18	0.32	0.49
	6	1.00	1.00	1.00	0.89	1.00	1.00	0.57	0.89	0.98	0.23	0.45	0.65
	8	1.00	1.00	1.00	0.96	1.00	1.00	0.69	0.96	1.00	0.29	0.55	0.76
	10	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.78	0.98	1.00	0.32	0.63	0.84
20	2	0.88	0.98	1.00	0.51	0.79	0.91	0.28	0.51	0.67	0.14	0.22	0.31
	4	1.00	1.00	1.00	0.83	0.99	1.00	0.52	0.83	0.95	0.22	0.39	0.58
	6	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00	0.68	0.96	1.00	0.28	0.53	0.75
	8	1.00	1.00	1.00	0.99	1.00	1.00	0.79	0.99	1.00	0.34	0.65	0.85
	10	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	0.88	1.00	1.00	0.39	0.74	0.92

2.1.3.3.2. Örneklerin Toplanması, Saklanması ve Analizi

BV tahminlerinin güvenilirliğini sağlamak için, preanalitik faktörlerin çok iyi kontrol edilmesi gerekir. Örnekleme öncesi bireyler 3 gün boyunca yorucu bir egzersiz yapmamalı ve önceki gece aşırı yemekten/içmekten kaçınmalıdır. İdeal olarak en az 10 saat aç olmalıdır.³⁴ Kan alma şartları tam olarak tanımlanmalı ve tüm bireylere uygulanmalıdır. Örnek alma işlemi aynı flebotomist tarafından, günün aynı saatinde (genellikle sabahın erken saatlerinde) ve aynı turnike süresi ile, kişi en az 30 dakika dinlendirildikten sonra yapılmalıdır. Bu aynı koşullar sağlıklı olmayan bireylere de uygulanabilir ancak ek olarak hastalık durumunun stabil olması şartını gerektirmektedir.^{35,36}

Ölçüm değerinin serumda belirlenmesi durumunda, antikoagülan içermeyen ve jel seperatörü olmayan aynı lot numarasına sahip toplama tüpleri kullanılmalıdır. Antikoagülan veya jel seperatörü içeren tüplerin kullanımı, preanalitik bir değişim kaynağı oluşturabilir. Aynı sıcaklık ve süre koşullarında örnekler laboratuvara transfer

edilmelidir. Kan örnekleri, toplandıktan sonra 1 saat içinde aynı hız ve sıcaklıkta, aynı süre boyunca santrifüj edilmelidir. İdeal olarak örnekler, alikotlanarak stabil kalacakları koşullarda analiz edilinceye kadar saklanır. Örneklerin birçoğu -20 °C’de dondurularak saklanabilir.³⁷

Analitik tutarsızlığı en aza indirmek örneklerin analizi, aynı sistemde, aynı kişi tarafından, yeterli duyarlılık ve özgülleşme sahip analitik yöntemlerle gerçekleştirilmelidir. Reaktif ve kalibratörler aynı lot numaralı tercih edilmelidir.¹⁷

Toplanan örnekleri analiz etmek için iki protokol uygulanmaktadır. İlki ve çalışmalarda en sık kullanılanı Cotlove ve ark. tarafından uygulanandır.³⁸ Örnekler belirlenen zaman aralıklarında alınır ve işlenmiş ve dondurulmuş olarak analiz edileceği zamana kadar saklanır. Örneklerin analizi tek bir zaman periyodunda tekrarlı olarak gerçekleştirilir. Eş zamanlı olarak kalite kontrol örneklerinin de tekrarlı analizi gerçekleştirilir. Avantajı CV_A ’yı en aza düşürmek, dezavantajı ise çalışılan kişi ve örnek sayısını sınırlaması ve analitlerin depolama koşullarında stabil olması gerekliliğidir. İkinci protokol Costongs ve ark.’nın uyguladığıdır.³⁹ Cotlove ve ark. olduğu gibi toplama işlemi yapılır. Örneklerin toplama gününde tekrarlı analizi yapılır. CV_A ’yı değerlendirmek için kalite kontrol örnekleri veya hasta örnekleri ile çift çalışma gerçekleştirilir. Avantajı stabil olmayan örnekler için kullanışlı olmasıdır. Dezavantajı toplam varyans ile CV_I ’nin karıştırılabileceğidir.

2.1.3.3.3. İstatistiksel Analiz

a. Uç Değerlerin Belirlenmesi ve Dışlanması

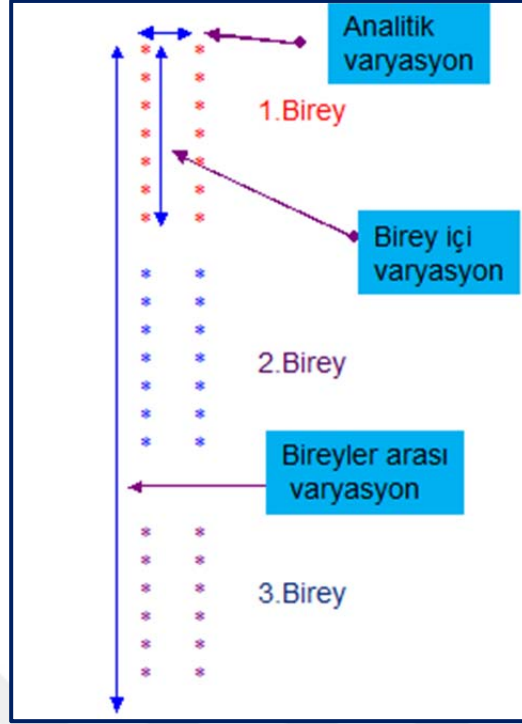
Tüm numuneler ölçüldükten sonra sonuçların net ve düzenli bir şekilde tablolaştırılması ve analize başlamadan önce sonuçların dikkatle kontrol edilmesi gerekir. Özellikle, tüm konsantrasyonların analitik yöntemin tespit sınırının (Limit of Detection, LoD) üzerinde olduğundan emin olmak önemlidir. Daha sonra, uç değerlerin tanımlanması ve verilerin dağılımı ile ilerlemek mümkündür.

Uç değerlerin tanımlanmasının önemi, analitik bir hatadan veya numune değişiminden kaynaklanabilecek tek bir anormal sonucun bile varyasyon bileşenleri tahminini önemli ölçüde etkileyebileceği gerçeğiyle ilgilidir. Uç değerleri tanımlamak için en sık kullanılan yöntem Dixon tarafından önerilen D/R metodudur. “D değeri” aşırı uç olup olmadığı test edilen değerle ona en yakın değer arasındaki farkın mutlak

değeri, R değeri ise test edilen gözlemler de dahil tüm verilerin en az ve en çok değeri arasındaki fark aralığı olarak tanımlanmaktadır. Bu tanımlara göre D/R oranı 1/3'den fazlaysa, test edilen değer uç değer olarak kabul edilerek hesap dışı bırakılmaktadır.⁴¹ Tekrarlayan ölçüm sonuçları arasında Cochran testi ile uç değerler belirlenebilir. Cochran testinde en büyük varyansın, varyans toplamına oranı incelenir ve istatistiksel tablolardaki uygun kritik değerlerle karşılaştırılır. Bu test, her varyansın eşit sayıda gözlem üzerine kurulduğunu ve test edilen varyanslardan yalnızca birinin olağandışı büyüklükte olduğunu varsaymaktadır. Uygulama açısından uç değerlerin tespitinde kullanılan bu testler, dağılımın normal olduğunu varsaymaktadır.^{41,42}

b. Varyasyon Analizleri

Uç değerlerin çıkarılmasından sonra normal dağılım gösteren veriler üzerinden analizler, ANOVA kullanılarak gerçekleştirilir.^{11,19} ANOVA, grup ortalamaları ve buna göre değişen varyasyonları (CV_I ve CV_G gibi) analiz için kullanılan istatistiksel modeller koleksiyonudur. ANOVA ile bir değişkenin gözlemlenen toplam varyansı, farklı varyasyon bileşenlerine ayrılır.⁴³ Bununla birlikte "ANOVA" ile birkaç grubun ortalamasının birbirine eşit olup olmadığını değerlendirmek için bir çıkartımsal istatistik uygulanır ve bu değerlendirme iki grup için yapılan t-test uygulamasını çoklu gruplar için genelleştirir (Şekil-4).⁴⁴



Şekil 4. Biyolojik varyasyon çalışmalarında ANOVA modeli ile CV_I ve CV_G 'nin belirlenmesi.⁴⁴

2.1.3.4. Biyolojik Varyasyonun Laboratuvarlarda Kullanım Alanları

Biyolojik varyasyon verileri, hem laboratuvarda hem de klinik uygulamada birçok kararın temelini oluşturan laboratuvar test sonuçlarının yorumlanmasında bir köşe taşıdır. Günlük laboratuvar uygulamasında BV, epidemiyolojik araştırmalarda yararlı olmanın yanı sıra sekiz ana uygulamaya sahiptir²⁹ :

a. Analitik Performans için Hedeflenen Kalite Değerlerinin Belirlenmesi

Analitik performans özelliklerini tanımlamak, ölçüm hatasının sonuç üzerinde bir etkisi olup olmadığından emin olmak için önemlidir.⁴⁵ Yeterli analitik performansı sağlayabilmemiz için önce tam olarak ne düzeyde bir kaliteye ihtiyacımız olduğunu bilmeliyiz. 1999 yılında Stockholm'da Dünya Sağlık Örgütü (WHO), International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) ve International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) tarafından "klinik laboratuvarlarda kalite spesifikasyonlarını" belirlemek için uluslararası bir konferans organize edilmiştir. Bu konferansta analitik kalite spesifikasyonları için bir "strateji hiyerarşisi" belirlenerek fikir birliği beyanı ile yayınlanmıştır.⁴⁶ 2014 yılında Milano'da bunu takiben yapılan konferansta Stockholm konsensüsünü gözden geçirilmiş ve klinik laboratuvarlarda

kalite spesifikasyonları sadeleştirilerek güncellenmiştir.⁴⁷

Analitik performans özelliklerini tanımlamak için önerilen yaklaşımlar; analitik performansın klinik sonuçlara etkisini değerlendiren çalışmalar ile biyolojik varyasyona dayalı ölçümlerdir.⁴⁸ Analitik performansın klinik etkisini değerlendiren deneysel çalışmalardan elde edilen analitik kalite spesifikasyonları uygulamada zordur. Bu nedenle; biyolojik varyasyona göre analitik kalite hedefleri, çoğu parametre için laboratuvarların uygulayabileceği en üst hiyerarşik model olarak gözükmemektedir.⁴⁹

Fraser ve ark. biyolojik varyasyona göre analitik performans özelliklerini tanımlamada kullanılan özel formüller önermiştir. Bazı sınırlamaları olsa bile, Fraser'in tanımladığı bu model laboratuvar tıbbında analitik hedeflerin tanımlanması için kullanılan en yaygın yaklaşım olmaya devam etmektedir.^{50,51} Bu yaklaşımda; tüm varyasyonlar rastgeledir ve bu nedenle normal dağılım gösterdiği kabul edilmektedir. Gözlenen normal (gaussian) veri dağılımında bu varyasyonlar istatistiksel olarak SD ya da CV ($CV = (SD/ortalama) \times 100$) olarak hesaplanır. Veri grubunun toplam varyasyonuna katkıda bulunan bu çoklu varyasyon kaynakları arasındaki matematiksel ilişki varyanslardaki sapmalarla ifade edilmektedir. Bir laboratuvardaki toplam varyasyon (SD_T), preanalitik ve postanalitik varyasyonlar ihmal edilerek analitik varyasyon (SD_A) ve biyolojik varyasyon (SD_B) olarak tanımlandığında aşağıdaki formülle hesaplanabilmektedir:

$$SD_T = (SD_A^2 + SD_B^2)^{1/2}$$

Varyasyon katsayısı (CV); Standart sapmanın (SD) ortalamaya göre % değişimine eşit olduğundan SD yerine kullanılabilir.

$$CV_T = (CV_A^2 + CV_B^2)^{1/2}$$

Uygulamada, tek bir sayısal test sonucunun içinde kaldığı aralık için CV_T dağılımını hesaplamada, genellikle uygun olan z skoru olarak bilinen kapsama faktörü ile çarpılır. Z skoru değerlerin %95'ini kapsayan standart sapma sayısı ve dağılıma eşittir.⁵² $P < 0,05$ ise:

$$CV_T = 1.96 [CV_A^2 + CV_B^2]^{1/2}$$

Burada I değeri CV_A , CV_I değeri de CV_B olarak kabul edilerek toplam varyans hesaplanabilir. CV_I değeri coğrafya, zaman ve topluma göre sabit olduğundan, toplam varyasyonun azaltılmasında analitik belirsizlik oldukça önemli bir değişken olarak değerlendirilmelidir.^{53,54} Artan belirsizlik dağılımın genişlemesine neden olup, bu artış doğrusal değildir ve belirsizlik arttıkça etki daha büyük olmaktadır. Bununla beraber I'nın dağılıma etkisi, tam olarak arzu edilen performans karakteristikleri için, 1977'deki Aspen konferansından kabul edilen standarda göre, CV_I değerinin yarısına eşit ya da daha az olmalıdır. Bu kaliteye ulaşırsa, total varyasyon BV'den sadece %10 kadar yüksek olacaktır.¹⁷ Gowans, Bias için $0,25 [(CV_I)^2 + (CV_G)^2]^{1/2}$ den az olduğunda yanlış pozitiflik ve yanlış negatifliğin azalacağını belirtmiştir. Ricos ve arkadaşları her iki kriterin birleşimine dayalı tek bir ölçüm oluşturmak amacıyla, toplam hata (TE) için bir limit önermiştir. Bu ifadeleri özetleyen formüller şöyledir^{55,56} :

$$\text{Maksimum Impresizyon } (I_{MAX}) = 0,5XCV_I$$

$$\text{Maksimum Bias } (B_{MAX}) = 0,25 [(CV_I)^2 + (CV_G)^2]^{1/2}$$

$$\text{Toplam hata } (TE_{MAX}) = B_{MAX} + (1,65X I_{MAX})$$

Ayrıca, Fraser ve arkadaşları analitlerin düşük veya yüksek biyolojik varyasyon ile test edilmesi durumunda kullanılabilen, kesinlik ve bias için farklı kesirlere dayanan asgari ve optimum kalite seviyelerini önermişlerdir. Kuvvetli homeostatik düzenlemeye ve dolayısıyla çok düşük BV değerlerine sahip analitler (sodyum, klorür, albümin gibi) için, BV'nin daha büyük bir kesimine dayanan asgari kalite özelliklerinin kullanılabilceği kabul edilmiştir. Yüksek BV değerlerine sahip zayıf şekilde düzenlenmiş analitler (örneğin idrar analitleri, trigliseridler, birkaç enzim vb.) için sözü edilenlerden daha küçük fraksiyonlardan türetilen optimum kalite özellikleri kullanılabilir (Tablo-2).⁵⁰

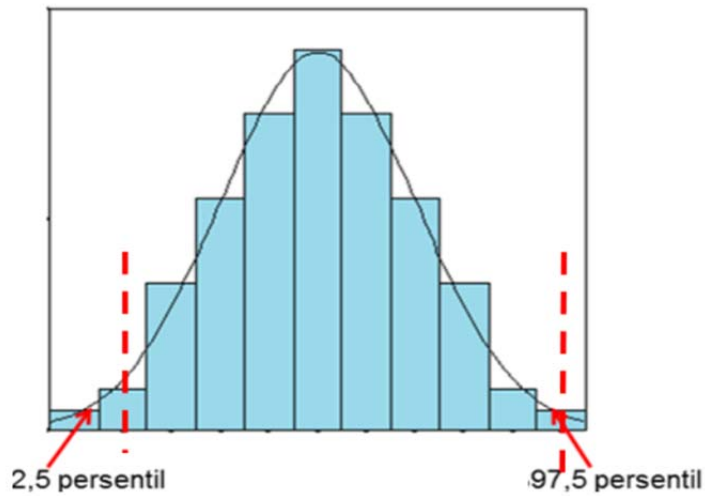
Tablo 2. BV için analitik kalite hedefleri.⁵⁰

	Optimum	Desirable	Minimum
BV katsayılarına göre	$I(\%) < 0,25 \times CV_1$	$I(\%) < 0,5 \times CV_1$	$I(\%) < 0,75 \times CV_1$
	$B(\%) < 0,125 \times (CVI^2 + CVG^2)^{1/2}$	$B(\%) < 0,25 \times (CVI^2 + CVG^2)^{1/2}$	$B(\%) < 0,375 \times (CVI^2 + CVG^2)^{1/2}$

b. Popülasyona Dayalı Referans Değerlerin Kullanılabilirliğinin Değerlendirilmesi

Laboratuvarlar test sonuçlarını yorumlarken, gözlem değerlerinin normal kabul edilen değerlerden farklı olup olmadığını, varsa farkın ne kadar anlamlı olduğunu, sonuç – klinik uyumunu, farklı test sonuçlarının birbirleriyle ilişkisini ve aynı bireyin aynı analit için, yeni elde edilen test sonucunun eski verileriyle ilişkisini değerlendirmektedir.

Referans aralık (RA), bir bireyin daha önceki verilerine ulaşamadığı durumlarda test sonuçlarının yorumlanmasının temelini oluşturmaktadır.¹⁵ Laboratuvar sonuçlarıyla birlikte verilen RA genellikle sağlıklı bir popülasyon temelinde %95 aralığındaki referans dağılımından türetilir (Şekil-5).⁵⁷ Bazı durumlarda, bazı analitler için, referans aralıkları, ulusal veya uluslararası konsensüs tarafından belirlenen tıbbi karar sınırları ile değiştirilir (örn. total kolesterol, glikozile hemoglobin). Tıbbi karar sınırları klinisyen tarafından özel bir hastalığı ya da bu hastalığa bağlı oluşan istenmeyen durumları gösteren bir eşğin altında ve üstünde değerler olarak kullanılır.⁵⁸



Şekil 5. %95'lik merkezi alanı gösteren örnek histogram.⁵⁷

BV ile ilgili yayınlanmış verilere ait değerlendirmelerde analitlerin bireysellik özelliğine dikkat çekilmiştir.⁵⁹ Bireyselliğin kantitatif ölçümü Eugene Harris tarafından bireysellik indeksi (II) olarak tanımlanmıştır ve aşağıdaki şekilde formülize edilmiştir.⁶⁰

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

Bu formül sıklıkla $CV_I > CV_A$ olduğunda CV_A ihmal edilerek CV_I / CV_G 'ye dönüşmektedir.¹⁹ Formülde $CV_I < CV_G$ olduğu zaman, hastalığın tespit edilebilmesi için, RCV popülasyona dayalı RA'dan daha duyarlıdır. RCV kullanımı için birey-içi varyasyonun ne kadar düşük olması gerektiği II ile hesaplanabilir.

Bireysellik konusundaki öncü çalışmaları sırasında Harris, $II > 1,4$ olduğunda analitin düşük bireysellik gösterdiğini belirtmiştir. Bu durumda tek bir bireydeki değerlerin dağılımı popülayona dayalı RA dağılımının çoğunu kapsayacaktır ve klinik değerlendirme için popülasyona dayalı RA kullanımı yararlı olacaktır. Aksine, $II < 0,6$ olduğunda ölçülen analit yüksek bireysellik göstermektedir ve herhangi bir bireydeki değerlerin dağılımı popülasyona dayalı RA'nın küçük bir bölümünde olacaktır. Dolayısıyla popülasyona dayalı referans değerlerinin kullanımı uygun olmamaktadır. Eğer II 1,4 ile 0,6 arasına düşerse popülasyona dayalı RA kullanılabilir ancak değişikliklerin $>1,4$ olduğu ölçüde tespit edilemeyeceği bilinmelidir.^{61,62}

Bireysellik indeksi, RA'ların klinik yararlılığının değerlendirilmesinde objektif bir kriter olarak sunulmasının yanı sıra yüksek bireyselliği olan gruplar için RA verilerini alt gruplara göre tabakalandırmanın uygunluğu konusunda da bilgi verir.⁶³ Bir analit için grup içinde II düşükse ($< 0,6$), alt grup için yüksekse ($> 1,4$) cinsiyet, ırk gibi alt gruplara ayırmak CV_G 'yi düşürerek indeksin artmasını, dolayısıyla popülasyona dayalı RA'nın yararlılığını artıracaktır.^{19,64}

c. Ardışık Sonuçlar Arasındaki Değişikliklerin Öneminin Değerlendirilmesi

Bazı analitler aynı bireyde tekrar tekrar ölçüldüğünde popülasyondan elde edilen referans sınırların tamamını kapsayacak bir dağılım göstermeyebilir. Bunun sebebi analitlerin bireyselliklerinin farklı olmasıdır.⁶⁵ Laboratuvar tıbbında analiz edilen analitlerin çoğunda yüksek bireysellik görülür, çünkü çalışılan birçok analit için $CV_I < CV_G$ 'dir.⁶⁶ Sonuçların RA ile karşılaştırılmasının önerilmediği yüksek bireysellik

gösteren analitler ($II < 0,6$) için, RCV uygulaması ile test sonuçlarının değişikliklerinin izlenmesi daha iyi bir yorumlama stratejisidir.⁶⁷

Harris ve Yasaka tarafından 1983'de tanıtılan ve kritik fark olarak da adlandırılan RCV terimi aynı bireyden alınan iki seri sonuç arasında farkın istatistiksel olarak anlamlı olması için aşılması gereken minimum farkı ifade eder. Bu fark, her bir sonuçla ilişkili varyasyonları aşmalıdır.⁶⁸

RCV'nin hesaplanması için preanalitik, analitik ve biyolojik varyasyon bilgisi gerekmektedir. Preanalitik sürecin iyi yönetilmesi ve çalışma prosedürlerini en iyi şekilde uygulanması ile preanalitik faktörler küçültülmüş olur ve formülde ihmal edilir. Böylelikle RCV hesaplaması CV_A , CV_I ve seçilen anlamlılık olasılığına (Z_p) bağlı olmaktadır. Yüzde olarak ifade edilen RCV'nin hesaplanması için önerilen standart denklem aşağıdaki gibidir.¹⁰

$$\%RCV = Z_p \times 2^{1/2} (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

Formüldeki Z_p , arzulanan olasılık için standart sapma sayısıdır. BV verileri geliştirilip uygulanırken en sık kullanılan değerler $p < 0,05$ için 1,96 ve $p < 0,01$ için 2,58'dir. Geniş Z_p değerlerinin kullanılması, istatistiksel fonksiyonun gücünü ve hesaplanan RCV'yi arttırarak, anlamlı değişikliklerin saptanabilirliğini arttırmaktadır. $2^{1/2}$ ise iki ölçümün hesaba dahil edildiğini ifade eden sabit değerdir.⁶⁸

Laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan bir kısım analitin ölçümünde sabit CV_A değerleri gözleendiği ve bazı patolojiler dışında klinik durumların çoğunda elde edilen CV_I verilerinin, sağlıklı birey verileriyle benzerlik gösterdiği bildirilmektedir. Bununla birlikte bazı patolojik süreçlere ait sonuçların değerlendirilmesinde daha önce sağlıklı bireyler için düşük sınırlarda belirlenmiş olan RCV'nin kullanılması, yanlış pozitif sonuç olasılığında artış gözlenmesine neden olabilmektedir.²⁵

RCV'yi tahmin etmek için kullanılan klasik formül, hem CV_A hem de CV_I için normal dağılımı varsayar. Bununla birlikte, klinik açıdan önemli miktarda sayının çarpık bir dağılıma sahip olduğu gözlenmiştir. Bu durumda RCV, ilk kez Fok- kema ve arkadaşları tarafından yanlış pozitif yada yanlış negatiflik oranını azaltmak üzere formüle edilen denklemlerle, lognormal bir yaklaşım kullanılarak hesaplanmalıdır. Bu yaklaşımda, log-dönüşümlü olmayan verilerin toplam varyasyonu (CV_T), lognormal

dağılımın standart sapmasını (σ) tahmin etmek için kullanılır⁶⁹:

$$\sigma = 5 [\ln (CV_T^2 + 1)]^{1/2}$$

Lognormal RCV için aşağıdaki gibi üst anlamlı (RCV_{pos}) ve alt anlamlı (RCV_{neg}) asimetrik sınırlar belirlenir:

$$RCV_{pos} = [\exp (1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

$$RCV_{neg} = [\exp (-1,96 \times 2^{1/2} \times \sigma) - 1] \times 100$$

Yakın zamanda yapılan bir derlemede, Roraas ve arkadaşları, verilerin dağılımına bakılmaksızın RCV'yi hesaplamak için logaritmik yöntemin kullanılmasını önermektedir.⁷⁰

d. Bir Bireyin Homeostatik Ayar Noktasını Belirlemek İçin Gerekli Örnek Sayısının Belirlenmesi

Prensipte, analitin yüksek CV_A ve CV_I gösterdiği durumlarda, her birey için ölçülen numune sayısı ne kadar fazlaysa, homeostatik ayar noktasının tahmini o kadar doğru olacaktır. Bir bireyin homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli örnek sayısının (n) belirlenmesi için aşağıdaki formül kullanılmaktadır¹⁹:

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

(n =örnek sayısı, D =Homeostatik ayar noktasına % yakınlık)

Örneğin kolesterol için %95 olasılıkla gerçek değer %10'unu elde etmek isteniyorsa CV_A %3, CV_I %6 iken,

$$n = Z^* [CV_A^2 + CV_I^2]^{1/2} / D)^2 = (1.96 [3^2 + 6^2]^{1/2} / 10)^2 = 2$$

Bu durumda kolesterol için çift örnekle çalışmak uygun gözükmektedir.⁷¹

e. Belirli Bir Bileşeni Analiz Etmek İçin En Uygun Örneğin Belirlenmesi

Belirli bir bileşeni analiz etmek için hangi örnek türünün (Plazma, serum, 24 saatlik idrar, sabah ilk idrar) optimal olduğu, biyolojik varyasyon hesaplamaları ile belirlenebilir. Düşük CV_1 'ya sahip örnekler en iyi örneklerdir. Örneğin serum kreatininin CV_1 'sı %5,3'tür ve 24 saatlik idrar CV_1 'sı %16'dır. Böylelikle böbrek yetmezliği takibi için serum kreatinin tercih edilir. Pek çok analitin ölçümü için fizyolojik regülasyonunun idrara göre daha güçlü olmasından dolayı serum veya plazma tercih edilmektedir.²⁹

f. Belirli Bir Klinik Amaç İçin En Uygun Testin Seçilmesi

Birçok test arasından en uygun testin seçimine BV ölçümleri ile karar verilebilir. Tanı için sonuçların popülasyona dayalı RA ya da eşik değeri ile karşılaştırılması daha kullanışlı iken izlem durumunda RCV daha kullanışlıdır. Tablo-3'de böbrek fonksiyon bozukluğunu değerlendirmek için kullanılan birkaç test için II ve RCV değerleri görülmektedir. Testlerden serum üre tayini tanı için en duyarlıdır. Çünkü yüksek II'ne sahiptir. Serum sistatin C ise sağlık durumundaki değişiklikleri belirlemede düşük RCV'ye sahip olduğundan en duyarlıdır.²⁹

Tablo 3. Böbrek fonksiyon testleri için kullanılan parametrelerden bazıları için biyolojik varyasyon bileşenleri.²⁹

Analit	II	(%) RCV
Serum kreatinin	0,37	14,69
Serum sistatin C	0,35	12,72
İdrar kreatinin, output	0,47	30,47
Serum üre	0,67	34,07

g. Sonuç Raporlarını Verirken Her Bir Analit İçin En Uygun Bilgi Verici Birimin Seçilmesi

Raporlanmış sonuçlar için en bilgi verici birim, CV_1 'sı en düşük olandır. İdrar bileşenlerinin bir çoğu için sonuçlar konsantrasyon, output ya da kreatininle oranlanarak ifade edilir. Tablo-4'de görüldüğü gibi idrarda kalsiyum ve kreatinin için 24 saatlik idrar en düşük CV_1 'ya sahiptir ve output olarak kullanıldığında en iyisidir. Bu durum

genel olarak tüm idrar analitlerinde geçerlidir.⁴²

Tablo 4. İdrar kalsiyum ve kreatinine ait biyolojik varyasyon bileşenleri.⁴²

	İdrar kalsiyum	İdrar kreatininin
	(%) CV ₁	(%) CV ₁
Sabah ilk idrar	44	31
24 saatlik idrar	28	24
Rastgele	39	36
24 saatlik output	27	11

h. Laboratuvarlarda Yeni Prosedürlerin Onaylanması

ISO 15189 veya ISO 9001'e göre kalite yönetiminde yeni prosedürlerin laboratuvarlarda uygulanması, onaylanması özel bir gerekliliktir. Bu uygulamaların biyolojik varyasyon verileri göz önünde bulundurularak gerçekleştirilmesi önerilmektedir.⁷²⁻⁷⁴

2.2. Kronik Böbrek Yetmezliği

2.2.1. Tanım

Kronik böbrek yetmezliği, nefronların progresif ve geri dönüşümsüz kaybı ile karakterize olup, nefron fonksiyonlarında azalma ile seyreden ve sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği (SDBY) ile sonuçlanan patofizyolojik bir süreçtir.⁷⁵

Kronik böbrek yetmezliğinin progresyonu ile birlikte, glomerüler filtrasyon hızı (GFR) tedricen azalmakta, böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bir bozulma hali oluşmaktadır. Fonksiyon kaybının oranına göre de klinik ve laboratuvar bulguları ortaya çıkmaktadır. Böbrek yetersizliği olan bir olguda; üç aydan uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular (iştahsızlık, bulantı, kusma, kaşıntı, ensefalopati, perikardit, plörit, nöropati ve üremik akciğer), ROD belirti ve bulguları, anemi, hiperfosfatemi, hiperkalemi, hipokalsemi, proteinüri, idrar sedimentinde geniş silendirler ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbrekler (< 8,5 cm), kronik hastalık göstergeleridir.⁷⁵

2.2.2. Tanı ve Evreleme

Klinik açıdan KBY, asemptomatik böbrek fonksiyonu azalmasından üremik sendroma kadar uzanan değişen bir spektrum gösterir. Aslında böbrek yetersizliğinin evreleri birbiri içine girmiş olup kesin sınırlarla ayrılması mümkün değildir. Ancak, fonksiyonel değişiklik derecesine göre evreleme klinik ve tedavi planlanması açısından faydalıdır.⁷⁶ Böbreklerin fonksiyonel kapasitelerinin belirlenmesi için kullanılan spesifik kriter GFR'dir. GFR, böbrekte bir dakikada oluşan filtrat, yani süzülen kan miktarıdır ve ölçülmesinde en sık kullanılan yöntem kreatinin klirensidir. Normal koşullar altında sağlıklı bireylerde GFR 125 ml/dk/1,73 m²'dir. KBY, GFR'ye göre beş evrede sınıflandırılmaktadır (Tablo-5).⁷⁷

Tablo 5. Glomerüler filtrasyon hızına göre kronik böbrek yetmezliği sınıflaması.⁷⁷

Evre	Tanım	GFR (mL/dk/1.73 m ²)
1	Böbrek hasarı göstergeleri (Normal veya artmış GFR ile birlikte)	> 90
2	Hafif derecede KBY	60-89
3	Orta derecede KBY	30-59
4	Ağır derecede KBY	15-29
5	Son dönem böbrek yetmezliği	< 15

Kronik böbrek yetmezliğinin erken evresinde sadece böbreğin fonksiyonel rezervinde azalma vardır, klinik belirti ve bulgu yoktur. Orta evrede, yani böbrek yetersizliğinde azotemi oluşur ve bu dönemde bazı klinik belirtiler ortaya çıkabilirse de çoğunlukla hastalar asemptomatiktir. İleri evreye ulaşmış böbrek yetmezliğinde GFR 30 ml/dk'nın altına düşmüştür. Böbreğin ekskresyon, biyosentez ve regülasyon fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması klinik belirti ve bulguların ortaya çıkmasına neden olur. Son dönem böbrek yetmezliğinde (SDBY), böbrek fonksiyonlarının ileri derecede kaybı sonucunda giderek artan azotemi ve kompleks multiorgan bozukluğundan kaynaklanan belirti ve bulgular ortaya çıkar. Terminal dönemde ortaya çıkan bu klinik durum üremi olarak tanımlanır.⁷⁸

Hastaların erken evrede tespiti için, kan basıncı ölçümü (sistemik hipertansiyonun tespiti), biyokimyasal ölçümlere (serum üre ve kreatinin) veya idrar analizine (hematüri ve/veya proteinüri) başvurmak gerekir. Ultrasonografi de KDOQI

tarafından faydalı ve invaziv olmayan bir tarama işlemi olarak önerilmektedir.⁷⁹

2.2.3. Epidemiyoloji ve Prevelans

Tüm dünyada KBY insidansı ve prevalansı hızla artmaktadır. Bununla birlikte hastaların çoğu son döneme gelene kadar asemptomatik seyrettiği için, KBY'nin toplum içindeki gerçek insidansı ve prevalansının doğruluğundan emin olmak güçtür. KBY ve SDBY hastalarının sayısı hakkında dünyanın bazı bölgelerinde veri toplayan çeşitli kayıt kuruluşları vardır. Bu veriler Amerika Birleşik Devletleri'nde United States Renal Data System (USRDS) tarafından toplanmaktadır. USRDS kayıtlarına göre Amerika'da her yıl 1 milyon kişiden, yaklaşık 350-400 kişide KBY ortaya çıkmaktadır.⁸⁰

Türkiye'de bu veriler Türk Nefroloji Derneği (TND) tarafından toplanmaktadır. Ülkemizde yılda ortalama 15000 hastaya son dönem böbrek hastalığı tanısı konmaktadır ve milyon nüfus başına 390 SDBY hastasının bulunduğu belirlenmiştir. TC Sağlık Bakanlığı ve Türk Nefroloji Derneği 2015 ortak raporuna göre 56.951 hemodiyaliz hastası, 3909 periton diyaliz hastası ve 12800 böbrek nakil hastası vardır. Türkiye'de 2015 yılında renal replasman tedavisi gerektiren son dönem kronik böbrek yetmezliği nokta prevalansı milyon nüfus başına 918 (pmp) olarak saptanmıştır. Bu prevalans 2010 yılında 853 pmp idi, ülkemizde renal replasman tedavisi gerektiren son dönem kronik böbrek yetmezliği sıklığı ve buna bağlı komplikasyonlar son yıllarda hızla artmaktadır.⁸¹

2.2.4. Etiyoloji

KBY nedenleri çok çeşitlidir. Bu nedenlerin sıklığı ülkeden ülkeye, ırk ve cinsiyete bağlı olarak değişmektedir. İleri yaş (> 60), siyah ırk, sigara kullanımı, ağır metallere maruziyet ve düşük sosyoekonomik durum KBY gelişiminde rol oynayan sosyodemografik faktörlerdir.⁸² KBY gelişiminde en sık rastlanan etiyolojik neden geçmişte glomerulonefrit iken, günümüzde altta yatan etiyolojiler diyabetik ve hipertansif nefropatilerdir. Bu etiyolojik değişimde glomerulonefritlerin daha efektif tedavisi, korunması ile diyabetik ve hipertansif hastaların yaşam sürelerinin uzaması etkili olmuştur. Bununla birlikte ilerlemiş KBY hastalarının önemli bir kısmında etiyolojik neden bulunamaz. TND kayıtlarına göre 2015 yılı sonunda hemodiyalize başlayan hastalarda etyolojik dağılım Tablo-6'da gösterilmiştir.⁸¹

Tablo 6. SDBY nedenleri⁸¹

Hastalık	Sayı	%
Diabetes mellitus	1804	34,61
Hipertansiyon	1405	26,96
Glomerulonefrit	309	5,93
Polikistik böbrek hastalıkları	238	4,57
Amiloidoz	98	1,88
Tübülointerstisyel nefrit	94	1,8
Obstrüktif nefropati	87	1,67
Renal vasküler hastalık	52	1,0
Diğer	426	8,17
Etiyolojisi bilinmeyen	699	13,41

2.2.5. Patofizyoloji

Böbreğin fonksiyonel nefron kitlesinin azalması durumunda, homeostazın sürdürülebilmesi için sağlam kalan nefronlarda hiperfiltrasyon ve hipertrofiye neden olan adaptif değişiklikler meydana gelir. Sonuçta bu adaptif değişiklikler glomerullerin tedrici olarak skleroza gitmesinde rol oynar. Bununla beraber, hiperfiltrasyon tek başına patolojik glomerüloskleroza ve interstisyel fibrozisi başlatmaya yeterli değildir. Hiperfosfatemi, hiperlipidemi, proteinüri, nörojenik faktörler ve sistemik hipertansiyon da böbrek hasarının ilerlemesine neden olur. KBY’de hipertansiyon oluşumundaki temel faktör, sempatik sinir sistemini aktive eden Renin Anjiyotensin Aldosteron Sistemi (RAAS) aktifleşmesi ve nitrik oksid düzeylerindeki artıştır.⁸³ İntrarenal RAAS aktifleşmesi hem başlangıçtaki adaptif hiperfiltrasyona hem de ardından gelişen maladaptif hipertrofi ve skleroza katkıda bulunur. RAAS aktivasyonunun uzun süreli bu maladaptif etkileri, kısmen transforming growth factor beta (TGF- β) gibi büyüme faktörleri ile oluşturulur.⁸⁴ Sağlam kalan nefronların fonksiyonel stabilitesini progresif olarak olumsuz etkileyen bu patolojik süreç, renal hasara yol açan etmen inaktif hale gelse bile devam eder ve irreversibl renal hasara neden olur. Sonuç olarak, bu kısır döngü sonucunda SDBY gelişir.⁸³

2.2.6. Tedavi

Kronik böbrek yetmezliğinin erken evrelerinde uygulanan diyet ve medikal tedavi gibi konservatif tedaviler SDBY evresine gelmiş olan KBY hastalarında yetersiz kalmakta, bu nedenle renal replasman tedavileri uygulanmaktadır. Türkiye’de 2014 yıl sonu itibariyle 71.318 hastanın renal replasman tedavisi aldığı tespit edilmiştir. SDBY hastalarına uygulanan renal replasman tipleri arasında hemodiyaliz (%78,4) en sık kullanılan tedavi yöntemi olup, bunu transplantasyon (%15,6) ve periton diyalizi (%6,0) takip etmektedir.⁸⁵

Hemodiyaliz: Hemodiyaliz, bir pompa aracılığıyla vücut dışına alınan kanın yarı geçirgen bir membrandan geçirilerek, sıvı ve elektrolitlerin, iki yönlü gerçekleşen difüzyon ve ultrafiltrasyon yoluyla istenilen düzeyde yer değiştirmesi sonrası hastaya geri verilmesi işlemidir.⁷⁵ KBY hastalarında GFR’nin 15 ml/dak/1,73 m²’nin altına düşmesi veya üremik belirti ve bulguların ortaya çıkması durumunda, hemodiyaliz tedavisi uygulanır.⁸⁶

Hemodiyaliz ile kanın şekilli elemanları ve büyük moleküllü yapılar haricinde, birikmiş olan zararlı toksinler ile serum düzeyleri artan elektrolitler etkili bir şekilde vücuttan uzaklaştırılmaktadır. Böylece, üremik komplikasyonlar önlenmesi ve SDBY’ye bağlı sistemik komplikasyonların yavaşlatılması sağlanmaktadır.⁷⁵

2.2.7. KBY Sistemik Etkileri

KBY’de GFR’de azalma ile paralel olarak meydana gelen üremi tüm organ ve sistemlerin fonksiyonlarında bozukluğa yol açar. KBY’nin sistemik etkileri Tablo-7’de gösterilmiştir.⁵

Tablo 7. KBY’nin sistemik etkileri.⁵

SİSTEM	BELİRTİ ve BULGULAR
Sıvı-elektrolit bozuklukları	Hipovolemi,hipervolemi, hipernatremi, hiponatremi, hipokalsemi, hiperpotasemi, hipopotasemi, hiperfosfatemi, metabolik asidoz, hipermağnezemi
Sinir Sistemi	Stupor, koma, konuşma bozuklukları, uyku bozuklukları, konvülsiyon, polinöropati, baş ağrısı, irritabilite, konsantrasyon bozuklukları, huzursuz bacak (restless leg) sendromu
Gastrointestinal Sistem	Hiçkırık, parotit, gastrit, stomatit, pankreatit, ülser, bulantı, kusma, gastrointestinal kanama
Kardiyovasküler Sistem	Konjestif kalp yetmezliği, pulmoner ödem, hipertansiyon, sol ventrikül hipertrofisi, aterosklerotik koroner, periferik vasküler hastalık ve perikardit
Hematoloji İmmünoloji	Normokrom normositer anemi, eritrosit fragilitesinde artma, kanama, lenfopeni, infeksiyonlara yatkınlık, kanser,
Pulmoner Sistem	Plevral sıvı, üremik akciğer, pulmoner ödem
Cilt	Kaşınıtı, gecikmiş yara iyileşmesi, solukluk, tırnak atrofisi, hiperpigmentasyon, üremik döküntü, ülserasyon, nekroz
Metabolik-Endokrin Sistem	Glukoz intoleransı, hiperlipidemi, hiperparatiroidi, büyüme geriliği, hipogonadizm, impotans, libido azalması, hiperürisemi, malnütrisyon, hiperprolaktinemi
Kemik	Üremik kemik hastalığı, artrit

2.2.7.1. Renal Osteodistrofi:

KBY hastalarında kemik-mineral metabolizması bozuklukları, sık görülen komplikasyonlardan biri olup, böbrek fonksiyon bozukluğu arttıkça şiddetlenir.⁸⁷ 2006'dan bu yana kronik böbrek hastalığı-mineral ve kemik bozukluğu (CKD-MBD), histolojik lezyonları tam anlamıyla tanımlamak için ROD olarak adlandırılmaktadır.⁸⁸ ROD, kalsiyum, fosfat, paratiroid hormon ve D vitamini metabolizması anormallikleri; kemik döngüsünde, mineralizasyonda, hacimde, doğrusal büyümede ve güçte anormallikler veya vasküler ve diğer yumuşak doku kalsifikasyonlarından biri veya birkaçıyla seyreden sistemik bir hastalıktır.⁸⁹

Kemik, hücrelerden ve organik (%35) ve inorganik (%65) moleküller içeren hücre dışı bir matriksten oluşan dinamik bir dokudur. Organik matriks, ağırlıklı olarak tip I kollajen (%90) ile osteokalsin (OC), glikoproteinler ve proteoglikanlar gibi küçük miktarlarda kollajen olmayan proteinlerden oluşur. Organik matriksin mineralizasyonunu sağlayan kalsiyum-fosfat hidroksiapatit kristalleridir. Kemik yeniden modellenmesinde osteoklastlar, osteoblastlar ve osteositler olmak üzere üç ana tip kemik hücresi görev alır. Osteoblastlar yeni kemik matriksini oluşturur ve mineralize eder. Osteoklastlar kemik rezorpsiyonundan sorumludur. Osteositler ise esas olarak mekanosensörler olarak davranırlar.⁹⁰

İskelet büyümesi için gerekli olan kemik yeniden modellemesi döngüsel bir süreçtir. Kemik döngüsü, bir osteoklastik rezorpsiyon fazının ardından meydana gelen bir formasyon fazından oluşur. Tipik bir döngüde, rezorpsiyon fazı yaklaşık 7–10 gün sürer ve formasyon 2-3 aya kadar sürer. Sağlıklı genç erişkin iskeletinde kemik döngüsü dengededir ve net kemik kaybı olmaz. Kemik döngüsü ROD'da mekanik stres, sistemik hormonlar ve lokal faktörlerin (sitokinler ve büyüme faktörleri gibi) de etkisiyle değişir.⁹¹ Çeşitli mineralizasyon ve devir bozukluğu kombinasyonları ile ROD; yüksek döngülü kemik hastalığı, düşük döngülü kemik hastalığı ve her iki gruptan özellikler gösteren mikst tip olmak üzere üç ana grupta incelenebilir (Şekil-6).⁹²

2.2.7.1.1. Yüksek Döngülü Kemik Hastalığı (SHPT)

SHPT terimi, paratiroid bezlerinin dış faktörler nedeniyle uyarılarak hiperplastik veya adenomatöz (nodüler) değişikliğe uğramasını ve PTH üretimini arttırmalarını ifade eder.⁹³ KBY hastalarında görülen SHPT, PTH'nin kalıcı yüksekliğine bağlı olarak osteoklastların sayıca artması sonucu kemik rezorpsiyonunda artma ve kemik iliğinde fibrosis ile karakterize bir hastalıktır. PTH, kemik dokuda bulunan Ca^{+2} ve P'nin çözünmesini sağlayarak, serum Ca^{+2} düzeylerini normal değerlere yakın tutmaya çalışır. Plazma Ca^{+2} düzeylerini normal seviyede tutabilmek uğruna kemik bütünlüğü feda edilerek kemikte bulunan Ca^{+2} deposu kullanıma sunulur. Osteitis fibrosa olarak da adlandırılan SHPT'de artmış kemik döngüsü nedeniyle kemik mineralizasyonda ve rezorpsiyonunda artış görülür. Sonuç olarak bu durum kırık riskinde artmaya neden olur.⁹⁴

SHPT gelişmesinde; hipokalsemi, hiperfosfatemi, düşük 1,25(OH)₂D₃ (kalsitriol) konsantrasyonu, PTH sekresyonunun artması, PTH metabolizmasındaki bozukluk, PTH'ye karşı iskelet direncinin artması gibi değişik faktörler rol oynar.⁹⁵

a. Fosfat Retansiyonu

Bricker, ilk olarak 1972 yılında üremik hastalarda "Trade-off" hipotezini ortaya koyarak SHPT gelişmesinde hiperfosfateminin önemine dikkatleri çekmiştir. KBY'de fonksiyonel nefron sayısındaki azalma ile birlikte filtre olan P atılımı azalır ve P retansiyonu olur. Serum P konsantrasyonunda ortaya çıkan artışla osteositler ve osteoblastlar tarafından sentezlenen Fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23), kalsitriol üretimindeki azalmaya ve P atılımında bir artışa yol açar.⁹⁶ Ayrıca yüksek hücre P yükü, böbrek tübülü hücresinde doğrudan 1-alfa hidrosilaz enzimini inhibe eder ve kalsitriol seviyeleri azalır. Tüm bu faktörler, artmış PTH üretimi için ivme olan hipokalsemi gelişimine katkıda bulunur. Sonuç olarak, paratiroid aktivitesindeki artış, fosfatürik etkiyle hiperfosfatemiye düzeltmeye çalışır.^{97,98} Bununla birlikte; P retansiyonunun serum Ca⁺²'dan bağımsız olarak PTH salınımını değiştirdiği gösterilmiştir. KBY'de hiperfosfatemi; metastatik kalsifikasyonda, periferik vasküler yetersizlikte, kaşıntıda ve SHPT'nin kötüleşmesinde anahtar rol oynamaktadır.⁹⁹

b. D-vitamini Metabolizmasındaki Değişiklikler

Kronik böbrek yetmezliği düşük kalsitriol düzeyleri ve D vitamini direnci ile karakterizedir.¹⁰⁰ Böbrek yetmezliğinin erken evrelerinde serum kalsitriol seviyeleri normaldir. KBY'de, GFR 50 ml/dk'nın altına düşünce kalsitriol yapılamaz. Azalmış güneşe maruziyet, KBY'ye bağlı kolekalsiferolün bozulmuş deri sentezi, hastalığın ileri evrelerinde görülen hiperpigmentasyon ve diyet sınırlamaları D vitamini eksikliğini derinleştirmektedir.^{101,102} KBY hastalarında artan FGF-23 seviyeleri, kalsitriolün renal üretimini inhibe eder.¹⁰³

Bunlara ek olarak üreminin D vitamininin intestinal emilimini engellemesi ve proteinürik hastalarda D vitamini bağlayıcı globülinin böbrekten kaybı gibi faktörler klinik durumu ağırlaştırmaktadır. Ca⁺², P barsaktan emilemez. PTH'nin iskelet üzerindeki kalsemik etkisi azalır, kollajen sentezi değişir, myopatiler oluşur ve PTH sekresyonunun feed-back mekanizması bozulur.^{104,105}

c. Ca^{+2} ve PTH arasındaki Feed-back Mekanizmasının Değişmesi

Serum PTH düzeylerini ayarlayan en önemli faktör, iyonize Ca^{+2} düzeyidir. Hipokalsemi halinde PTH salınımı artmakta, hiperkalsemi ise azalmaktadır. Yapılan çalışmalar, üremik hastalardan elde edilen paratiroid hücrelerinden PTH salınımını baskılamak için daha yüksek konsantrasyonda Ca^{+2} 'nin gerekli olduğunu göstermiştir. KBY hastalarında Ca^{+2} duyarlı reseptörlerdeki bozuklukların feed-back mekanizmasını bozarak SHPT'ye neden olabileceği düşünülmüştür.¹⁰⁶

d. İskelet Sisteminin PTH Etkisine Direnci

Kemiklerin PTH etkisine olan direnci, D vitamini metabolizması bozukluğu, hiperfosfatemi ve üremik toksinler nedeniyle olur. Düzenli hemodiyaliz tedavisi ile kemiklerin PTH'ye karşı duyarlılığının artması, PTH direncinde üremik toksinlerin rolünü vurgulamaktadır.¹⁰⁷

e. Böbreklerde PTH Yıkımının Azalması:

KBY'de PTH'nin karboksil-terminal uçlarının plazma düzeyleri daha fazla artmakla beraber diğer parçalar ve intakt PTH molekülünde de artışlar saptanmaktadır. Bu da göstermektedir ki üremide, SHPT patogenezinde PTH sekresyonunun artışı yanında metabolik klirensinin azalması da önemli rol oynamaktadır.¹⁰⁷

2.2.7.1.2. Düşük Döngülü Kemik Hastalığı:

Kemik yenilenme döngüsünün yavaşlamış olduğu, kemik yenilenme hızını gösteren laboratuvar ve diğer parametrelerin düşük kemik yenilenme hızı ile uyumlu olarak değişime uğradığı klinik bir tablodur. Osteomalazi ve dinamik kemik hastalığı olarak 2 grupta incelenebilir.¹⁰⁸

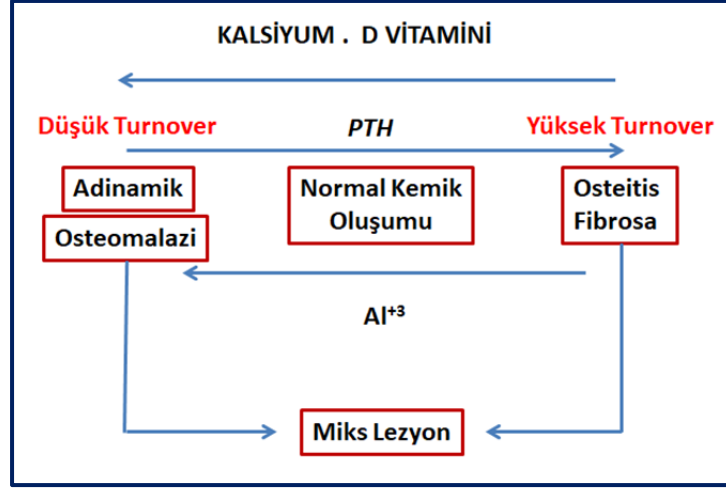
Osteomalazi: İskelet mineralizasyon hızındaki azalmaya bağlı olarak mineralize olmamış aşırı osteoidin birikimi sonucu oluşur. Bu hastalarda osteoid volüm ve genişliğinin artması ile birlikte osteoblastik ve osteoklastik aktivitenin azaldığı veya olmadığı görülür. Hemodiyaliz hastalarında diyalizatın alüminyum ile kontaminasyonu ve fosfat bağlayıcı olarak alüminyum bazlı preparatların kullanımı sonucu kemik mineralizasyonu bozulmaktadır. Osteomalazinin bir diğer nedeni ise D vitamini eksikliği ya da etkilerine direnç gelişmesidir. Metabolik asidoz da hem osteoblastları

hem de osteoklastları inhibe ettiğinden osteomalazi ile ilişkili bulunmaktadır.⁸⁰ Bu hastalarda serum Ca^{+2} düzeyleri sıklıkla artmıştır. Serum P düzeyleri fosfat bağlayıcı ajanların kullanımına bağlı olarak değişir. PTH düzeyleri çok düşüktür ya da tespit edilemeyecek seviyededir. İyileşmeyen kırıklar karakteristiktir.^{5,88}

Adinamik kemik hastalığı: Osteoid birikimi olmadan hem osteoblastik hem de osteoklastik hücre aktivitesinde azalma ve düşük kemik döngüsüyle karakterize renal osteodistrofi şeklindedir. Adinamik kemik hastalığı, diyaliz hastalarında en sık görülen kemik bozukluğudur. Özellikle diyabetik diyaliz hasta popülasyonunda sıklığı artmıştır. Serum Ca^{+2} ve P düzeyleri genellikle artmıştır.^{79,109} Adinamik kemik hastalığının altta yatan patofizyolojisi hem karmaşık hem de çok faktörlüdür. Temel olarak bu hastalarda PTH reseptörüne karşı iskelet direnci gelişir ya da PTH'nin aşırı baskılanması sonucu düşük PTH düzeyleri görülür.¹¹⁰ PTH'yi baskılayan faktörler arasında en önde gelenleri yüksek kalsiyum içeren diyalizat, kalsiyum içeren fosfat bağlayıcılar, ekzojen kalsiyum alımı ve D vitamini preparatlarıdır. Artmış eritropoetin kullanımı, yüksek serum magnezyum düzeyleri, hiperglisemi, PTH'nin özellikle periton diyalizi sırasında diyalize olarak aşırı kaybı, artan yaş ve diyabetin varlığı adinamik kemik hastalığı açısından muhtemel risk faktörleridir.^{111,112}

2.2.7.1.3. Mikst Tip Kemik Hastalığı

Bu tablo, yüksek döngülü kemik hastalığının nedeni olan hiperparatiroidizm ile düşük döngülü kemik hastalıkları, adinamik kemik hastalığı ve osteomalazi arasındaki geçiş durumu olarak tanımlanır. Hangi hastalık baskınsa onun özellikleri belirgindir. Renal osteodistrofinin miks lezyonu; hiperparatiroidizm ile birlikte defektif mineralizasyon ile karakterizedir. Bazı hastalarda persistan hipokalsemi ve hipofosfatemi bulunurken bir kısım hastada ise D vitamini yetmezliği veya tüm bu bozuklukların karışımı da bulunabilmektedir. Renal osteodistrofinin miks lezyonu, osteitis fibrosa gelişmiş kronik böbrek hastalarında alüminyum ilişkili kemik hastalığının da başladığını da gösterebilir. Mikst kemik hastalığı, ROD'lu hastaların yaklaşık %7'sini oluşturur ve ROD'un diğer tiplerine göre nadir görülür.¹¹²



Şekil 6: Yüksek döngülü, düşük döngülü, ve mikst tip kemik mineral bozuklukları.⁹²

2.2.7.2. ROD Tanı ve Takibinde Biyokimyasal Kemik Belirteçleri:

ROD'un tanısı, tedavisi ve izlenmesi için kemik metabolizmasının çok yönlü değerlendirilmesi gereklidir. ROD'da kemikteki patolojik değişiklikleri değerlendirmede altın standart yöntem kemik biyopsisidir. Ayrıca kemik metabolizmasının değerlendirilmesinde radioizotop kinetik çalışmalar da oldukça değerlidir. Bununla birlikte, bu girişimler zaman alıcı olup, rutin klinik kullanım için uygun değildir. Bu nedenle, kemik metabolizmasına ait bozuklukların saptanmasında osteoblast yada osteoklastların salgıladıkları enzim aktivitelerinin ve dolaşıma salınan kemik matriksi elemanlarının serum veya idrarda ölçülmesi ve bu biyokimyasal kemik belirteçlerinin doğru yorumlanması önem taşımaktadır.¹¹⁴ Tablo 8'de kemik döngüsünün belirleyicileri gösterilmiştir.¹¹⁵ Bu belirteçler, non-invaziv, daha ucuz, tekrarlanması kolay, doğru uygulandığında ve yorumlandığında kemik hastalıklarının değerlendirilmesinde önemli bir yardımcı araçtır.¹¹⁶

Tablo 8. Kemik döngüsünün belirleyicileri.¹¹⁵

	Yapım	Yıkım
Kan	Total ve kemik spesifik ALP Osteokalsin Prokollajen Tip 1 karboksi ve amino terminal propeptitleri (PICP, PINP) Diğer kollajen olmayan kemik proteinleri	Tartarat dirençli asit fosfataz (TRACP) Kollajen çapraz bağlan : serbest piridinolin ve deoksipiridinolin (PYD, DPD) Tip 1 kollajen karboksi- terminal telopeptid (ICTP) Tip 1 kollajen N ve C-telopeptid yıkım ürünleri (NTX, CTX) Kemik sialoproteini Katepsinler (Katepsin K, Katepsin L)
İdrar		Kollajen çapraz bağları (cross-link): Piridinolin ve deoksipiridinolin Tip 1 kollajen N ve C-telopeptid yıkım ürünleri (NTX, CTX) Kalsiyum ve Hidroksiprolin (Ca ⁺² , HYP) Hidroksilizin glikozidleri Osteoklastik asit fosfataz

2.2.7.2.1. Alkalen Fosfataz

Alkalen fosfataz alkali pH'de (pH: 8-10) organik ve inorganik fosfat esterlerinin hidrolizini katalizleyen membrana bağlı bir enzimdir. Enzim aktivitesi için çinko ve magnezyum gereklidir. Kalsiyum ve inorganik fosfat ise aktiviteyi inhibe eder. Dolaşımda ALP'nin dört izoenzimi vardır: bağırsak, plasenta, germ hücreleri ve doku spesifik olmayan form. Doku spesifik olmayan ALP geni, ALP'nin böbrek, karaciğer ve kemik izoformlarını kodlar. Bu izoformlar aynı gen lokusundan köken aldıkları halde posttranslasyonel sializasyon ve glikozilasyonları farklıdır.¹¹⁶ Çocukluk ve ergenlik döneminde, kemik izoformu baskındır, oysa sağlıklı erişkinlerde, karaciğer ve kemik izoformları toplam ALP'nin %95'ine katkıda bulunur ve neredeyse eşit oranlarda bulunur.^{90,117}

Normal karaciğer fonksiyonu olan hastalarda ALP kemik formasyonu için iyi bir belirteçdir. Ama karaciğer hastalıklarında durum değişebilmektedir. Bu durumda kemik spesifik izoenzimin ölçümü total ALP ölçümüne tercih edilmelidir. Kemik spesifik ALP (bALP), osteoblast membranında lokalize bir enzimdir ve osteoblastlardan salınarak dolaşıma katılır. Serumda bALP aktivitesi mineralizasyon ve kemik yapımının göstergesidir. ALP aktivitesi yaş, cinsiyet, menopoz ve ergenlik dönemlerinden etkilenir¹¹⁸. Paget hastalığı, hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, osteomalazi, renal

osteodistrofi, rikets, osteolitik metastazlar ve hepatobilier hastalıklarda ALP aktivitesi artmıştır. Konjenital eksikliğinde otozomal dominant hipofosfatazya gelişir.¹¹⁹

2.2.7.2.2. Asit Fosfataz

Asit fosfataz lizozomal kaynaklı heterojen bir enzimdir. Asit fosfataz aktivitesi; prostat, kemik, dalak, trombosit, eritrosit ve makrofaj gibi birçok dokuda ve hücrede bulunur. ACP'nin tartarat diençli formu (TRACP), aktive edilmiş makrofajlar ve osteoklastlar tarafından üretilir ve daha sonra dolaşıma salınır.^{120,121}

Osteomalazi, Paget hastalığı, hipertiroidizm, multiple myelom ve kemik metastatik hastalıklarında ACP seviyesi belirgin olarak yükselir. Böbrek fonksiyonlarından, hastanın açlık durumundan etkilenmemesi, minimal diurnal varyasyon göstermesi ve serum veya plazmadan ölçülebilir olması bu parametrenin avantajları olarak değerlendirilmektedir. Bu avantajlara rağmen, diğer kemik yıkım parametreleri ile karşılaştırıldığında klinik performansı düşüktür.¹²²

2.2.7.2.3. Osteokalsin

Osteokalsin, kemik matriksinin en bol bulunan nonkollajenöz proteindir. 49 aminoasitten oluşur ve yapısında, K vitaminine bağımlı post-translasyonel karboksilasyon ile gamma-karboksiglutamata (gla) dönüştürülen üç glutamik asit kalıntısı içerir.¹²³ Karboksilasyon süreci OC'nin hidroksiapatit ile bağlanmasına izin veren ve kemik matriksinde mineralizasyona neden olan konformasyonel bir değişikliğe yol açar.

OC sentezi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün kontrolü altında sadece osteoblastlar ve odontoblastlar tarafından gerçekleşir. Sentezlenen molekülün %10-25'i dolaşıma verilir. Dolaşıma katılan miktar kemik yapımını yansıtır. Dolaşımdaki OC kısa ömürlüdür (yarı ömrü 5 dk) ve hızla parçalara ayrılır. Böylece, dolaşan OC, bozulmamış OC, büyük (1–43) N-terminal/orta bölge fragmanları ve küçük (20-40) orta C-terminal fragmanları içerir. Daha küçük OC fragmanlarının kemik rezorpsiyonu türevleri olduğu düşünülmektedir. Kemik yapımının göstergesi olarak OC'nin sensitivite ve spesifitesi oldukça yüksektir.¹²⁴

OC düzeyleri, kemik yapımının arttığı hiperparatiroidizm, hipertiroidizm, yüksek döngülü osteoporoz, paget hastalığı, kemik metastazları ve ROD'da artar.

Bununla birlikte, hipoparatiroidi, hipotiroidi, cushing sendromu, multiple myelom, malign hiperkalsemi, bifosfonat, kalsitonin, glukokortikoid ve östrojen replasman tedavisi ile serum düzeyi düşer.¹¹⁷

2.2.7.2.4. C-Telopeptit Çapraz Bağ Yıkım Ürünleri

Organik kemik matriksinin %90'ından fazlası, kemik içinde sentezlenen tip I kolajenden oluşur. Kemiğin osteoklastik bozulması sürecinde, Tip I kollagenin karboksi ve amino telopeptidlerinden dağılan bazı ürünler dolaşıma salınır ve idrarla atılır. Özellikle ilgili kolajen tip I fragmanları karboksiterminal telopeptidlerdir (CTX). Karboksiterminal telopeptidlerde bulunan α - aspartik asit kemik yaşlandıkça aspartik asidin β -formuna dönüşür. Bu nedenle CTX'in α (α -CTX) ve β (β -CTX) olmak üzere iki formu vardır.¹²⁵

Kemik rezorpsiyon aktivitesinin artmasıyla orantılı olarak CTX düzeyi artar. İdrar ölçümleri 24 saatlik idrar ya da kreatinine göre düzeltilerek sabah spot idrarda yapılır.¹²⁶ Bununla birlikte CTX, klinik pratikte en sık serumda analiz edilir. Serum CTX düzeyi sirkadiyen varyasyondan yüksek seviyede etkilenir.¹²⁷ Sabaha karşı en yüksek, öğleden sonraları en düşük düzeylerdeydir. Ayrıca serum CTX düzeyi diyetten etkilenir, Bu yüzden kan örnekleri sabah açlıkta alınmalıdır.¹²⁸

2.2.7.2.5. Kalsiyum ve Fosfat

Kalsiyum, kemikte hidroksiapatit ve daha az olarak da amorf kalsiyum fosfat halinde bulunur. Tüm vücut kalsiyumunun yaklaşık %99'u kemikte depolanır. Dolaşımdaki iyonize kalsiyum düzeyi PTH ve D vitamini tarafından düzenlenir. Gıdalarla alınan kalsiyumun önemli bir kısmı barsaklardan D vitamini etkisiyle emilir. Günde yaklaşık 1 gr kalsiyum feçesle, 150-300 mg kalsiyum idrarla atılır. 24 saatlik idrarda kalsiyum atılımı ve sabah ilk idrardaki kalsiyum/kreatinin oranı kemik rezorpsiyonunun önemli biyokimyasal belirleyicilerindedir. İdrar kalsiyum/kreatinin oranı normalde 0,1 olup; 0,2 olduğunda hiperkalsiüriden söz edilir.¹²⁹

Fosfat, kemiğin en sık bulunan bir diğer elemanıdır. Besinlerde bol bulunan fosfat PTH'nin kontrolü altındadır ve PTH aktivitesi arttığı zaman rezorpsiyonun hızlanması sonucu dokudan kalsiyum ve fosfat açığa çıkar, idrarla fosfat atılımı artar.¹³⁰

Daha önce de bahsedildiği gibi ROD, KBY'nin önemli bir komplikasyonu

olmasına rağmen, hastalığın erken evrelerinde az tanınmakta ve yetersiz teşhis edilmektedir. Bu nedenle kemik kaybı ve kırık riskinin önceden tahmin edilmesi ve antirezorptif tedavi gibi spesifik tedavilerin etkinliğinin değerlendirilmesinde kemik döngüsü belirteçlerinden faydalanmak önemlidir.¹³¹ Ancak klinik riski öngörmeyi güçlendirmek için kemik belirteçleri ile ilgili değişkenler göz önünde bulundurulmalıdır.¹³²



3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1. Çalışma Grubu

Hemodiyaliz hastalarında serum kemik belirteçleri BV ve RCV değerinin hesaplanması için prospektif olarak tasarlanan bu çalışma Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'nun 14 Nisan 2017 tarihli, 2017/5 nolu kararı ile onaylanmıştır. Balcalı Hastanesi'nde böbrek yetmezliği nedeniyle haftada 3 kez hemodiyalize giren 20-50 yaş aralığında 15'i kadın, 15'i erkek en az 3 aydır stabil seyreden 30 diyaliz hastası gönüllü olarak çalışmaya dahil edilmiştir. Çalışmaya dahil edilen her hasta için çalışma ile ilgili sözel olarak bilgilendirilerek yazılı onam formları alınmıştır. Preanalitik değişkenleri standardize etmek için normalde sadece Çarşamba ve Perşembe günleri diyaliz edilen hastalar seçilmiştir. Hemodiyaliz reçetesi çalışma boyunca değişmemiş ve tüm hastalar halihazırda en az 3 yıl süreyle hemodiyaliz tedavisi almıştır. Çalışma boyunca bireylerde stabilite biyokimyasal testler ve fizik muane ile doğrulanmıştır.

Hastaların yaş, cinsiyet, boy, ağırlık gibi demografik özellikleri, son dönem böbrek yetmezliğine neden olan primer hastalıkları, hemodiyaliz süreleri ve kadın hastalarda menopoz durumu kaydedilmiştir. Komorbiditeleri (HT, DM, KKH, HL) olup olmadığı, son dönem böbrek yetmezliği tanısı konulduktan paratiroidektomi yapıp yapılmadığı hasta kayıtlarından ve hastanın kendisi sorgulanarak kaydedilmiştir. Herhangi bir malignite durumu olan, kemik mineral metabolizmasını etkileyen ilaç kullanan (antikonvulzanlar, gonadotropin salgılayıcı hormon analogları, östrojen preparatları, glukokortikoidler, siklosporin, kalsiyum ve D vitamini içeren preparatlar...), tedavi uyumsuzluğu, terminal hastalığı, anlamlı kognitif bozukluk olduğu bilinen ve 18 yaşından küçük hastalar çalışmaya dahil edilmemiştir.

3.2. Örneklerin Toplanması

Biyolojik varyasyon hesaplamaları için gönüllülerden Çarşamba ve Perşembe günleri 5 hafta boyunca 1'er haftalık periyotlarla diyaliz seanslarından önce örnekler toplanmıştır. Diürenal varyasyonun etkisini en aza indirmek için bireylerin kan alma zamanı standardize edilmiştir. Kan örnekleri sabah 8:00-10:00 saatleri arasında diyalize giren hastaların vasküler erişiminden (fistül) 10-12 saat açlık sonrası toplanmıştır. Numuneler, bir turnikenin kullanımı da dahil standart venepunktur ve flebotomi

prosedürleri kullanılarak toplanmıştır. Tüm kanlar aynı lot numaralı, vakumlu, antikoagülansız 1 adet kuru tüpe (Becton Dickinson: BD) toplamda 5 ml alınmıştır. Alınan kan örnekleri 1 saat içinde santrifüj edilip (3000 g'de 10 dakika) ayrılan serumlar uygun kodlamalar yapılarak -80 °C'de saklanmıştır.

3.3. Araç ve Gereçler

1. Santrifüj, “NF 1200R Soğutmalı santrifüj” (Türkiye)
2. Karıştırıcı (vorteks), “FRL 39839001 SIEMENS” (Almanya)
3. Derin dondurucu (-80 °C), “MDF-U3086S Sanyo” (Japonya)
4. Buzdolabı, “Uğur” (Türkiye)
5. Otoanalizör “Thermo Scientitie Dionex Ultimate 300” (Almanya)
6. Otoanalizör “Beckman Coulter DxC 800” (ABD)
7. Otoanalizör “Beckman Coulter Dxi 800” (ABD)
8. Otoanalizör “Roche-Hitachi Cobas E 411” (Almanya)
9. BD Vacutainer SST™ II Advance jel separatörlü tüpler (ABD)
10. Otomatik pipetler ve pipet uçları

3.4. Biyokimyasal Analiz

Analizden önce, numuneler oda ısısında bekletilerek çözünmesi sağlanmıştır. Tamamı çözüldüğünde ve oda ısısına geldiğinde tüm örnekler hafif ters çevirme ile karıştırılarak çalışmaya hazır hale getirilmiştir. Tüm analitlerin ölçümleri için, ardışık 2 gün boyunca serumlar rastgele sırayla çalışılmıştır. Analitlerin ölçümü; tek bir analizör tarafından, aynı cihaz, aynı reaktif, kontrol ve kalibratör grubu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analitik belirsizliğin, iç kalite kontrol protokolümüze göre kabul edilebilir sınırlar içinde kalmasını garantilemek için her çalışmanın içinde kontrol serumu da çalışılarak analitlerin düzeyleri belirlenmiştir. Ayrıca, çalışma süresi boyunca tüm analitlere dış kalite kontrol programı (Bio-Rad Programı, CA) uygulanmıştır.

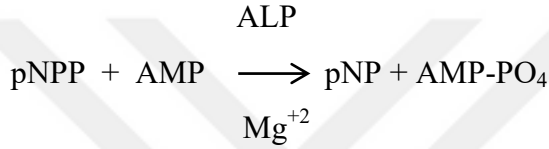
3.4.1. Alkalen Fosfataz Tayini

Örnekler, Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Beckman Coulter kitleri (CA) ile ile kolorimetrik yöntem ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde 5-1500 U/L (0,1-25,0 µkat/L) enzim aktivite

aralığında testin doğrusal olduğu bildirilmiştir. Yöntemin referans aralığı 17 yaş üstü yetişkinler için: 30-120 U/L olarak bildirilmiştir.¹³³

Test Prensipleri

Alkalin fosfataz aktivitesi, pH 10,4'de fosfat akseptörü olarak 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) kullanılarak magnezyum ve çinko iyonlarının mevcudiyetinde, p-nitro-fenilfosfatın (pNPP) p-nitrofenole (pNP) dönüşme oranını ölçmek suretiyle belirlenmektedir. pNP oluşumuna bağlı absorpsiyon değişim oranı 410/480 nm'de bikromatik olarak ölçülür ve değişim numunedeki ALP aktivitesi ile doğru orantılıdır.



Testteki Reaktif Bileşimi

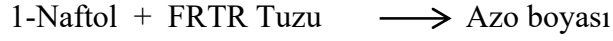
1) 2-Amino-2-Metil-1-Propanol (AMP) pH 10,4	0,35 mol/L
2) p-Nitrofenilfosfat	16 mmol/L
3) HEDTA	2 mmol/L
4) Çinko Sülfat	1 mmol/L
5) Magnezyum Asetat	2 mmol/L

3.4.2. Asit Fosfataz Tayini

Örnekler, Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Beckman Coulter kitleri (CA) ile kolorimetrik yöntem ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde; total ACP için 0-100 U/L (0-1,67 µkat/L) enzim aktivite aralığında, testin doğrusal olduğu bildirilmiştir. Yetişkinler için referans aralıkları; 37°C-Toplam ACP; Erkek ≤ 6,6 Pentanediol Aktivasyonu U/L (0,11 µkat/L), Kadın ≤ 6,5 Pentanediol Aktivasyonu U/L (0,11 µkat/L) olarak bildirilmiştir.¹³⁰

Test Prensipleri

Hillmann reaksiyonu;



Testteki Reaktif Bileşimi

1) Sitrat tamponu (pH 4,8)	140 mmol/L
2) 1-Naftil Fosfat	11 mmol/L
3) Fast red TR tuzu	0,6 mmol/L
4) Pentandiol	210 mmol/L

3.4.3. Osteokalsin Tayini

Örnekler, Roche-Hitachi Cobas E 411 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Roche kitleri ile elektrokemilüminesans immünassay yöntemi ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde testin ölçüm aralığı 0,500-300 ng/mL olarak bildirilmiştir. Testin referans aralığı ise premenopozal > 20 yaş kadınlarda 11-43 ng/mL, postmenopozal kadınlarda 15-46 ng/mL; erkeklerde 18-30 yaş 24-70 ng/mL, 30-50 yaş için 14-42 ng/mL olarak bildirilmiştir.

Test Prensipleri

Serumda osteokalsin stabilitesi çok düşük olduğu için, reaktif osteokalsinin N-terminal middle fragman (N-MID) parçasını ve N terminal parçasını tanıyan 2 monoklonal antikor içermektedir. Serumdaki N-MID osteokalsinler; biyotinlenmiş N-MID osteokalsine spesifik monoklonal bir antikor ve rutenyumla işaretli N-MID osteokalsine spesifik monoklonal bir antikorla sandwich oluşturarak tepkime verir. Ortama streptavidin kaplı mikropartiküllerin katılmasıyla, kompleks, biyotin-streptavidin etkileşimi yoluyla solid faza bağlanır. Tepkime karışımı ölçüm hücrelerine aspire edilir ve burada mikropartiküller manyetik olarak elektrod yüzeyine tutunurlar. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra elektroda voltaj uygulanmasıyla kemilüminesans emisyon indüklenir ve bu emisyon ölçülerek kalibrasyon grafiğinden değerlendirilir.

Testteki Reaktif Bileşimi

1) Streptavidin kaplı mikropartiküller	0,72 mg/MI
2) Anti-N-MID Osteokalsin Ab~biotin	1.5 mg/L
3) Anti-N-MID Osteokalsin Ab~Ru	1.3 mg/L
4) Fosfat tamponu, pH 6,0	100 mmol/L

3.4.4. β -CrossLaps (CTX) Tayini

Örnekler, Roche-Hitachi Cobas ϵ 411 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Roche kitleri ile elektrokemilüminesans immünassay yöntemi ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde testin ölçüm aralığı 0,010-6,00 ng/mL olarak bildirilmiştir. Testin beklenen değerleri ise 30-50 yaş erkeklerde $0,300 \pm 0,142$ (Ort \pm SD) ng/mL, premenopozal kadınlarda $0,299 \pm 0,137$ (Ort \pm SD) ng/mL, postmenopozal kadınlarda $0,556 \pm 0,226$ (Ort \pm SD) ng/mL olarak bildirilmiştir.

Test prensibi

Elecsys β -CrossLaps/serum testi, izomerize oktapeptid β -8AA (EKAHD- β -GGR) içeren tüm tip I kollajen bozunma fragmanlarını ölçer. Serumdaki β -8AA oktapeptidler (β -CTX); biotinlenmiş monoklonal anti- β -CrossLaps antikoru ve rutenyumla işaretli β -CrossLaps'a spesifik monoklonal bir antikoruyla sandwich oluşturarak tepkime verir. Ortama streptavidin kaplı mikropartiküllerin katılmasıyla kompleks, biyotin-streptavidin etkileşimi yoluyla solid faza bağlanır. Tepkime karışımı ölçüm hücrelerine aspire edilir ve burada mikropartiküller manyetik olarak elektrod yüzeyine tutunurlar. Bağlanmamış maddelerin uzaklaştırılmasından sonra elektroda voltaj uygulanmasıyla kemilüminesans emisyon indüklenir ve bu emisyon ölçülerek kalibrasyon grafiğinden değerlendirilir.

Testteki Reaktif Bileşimi

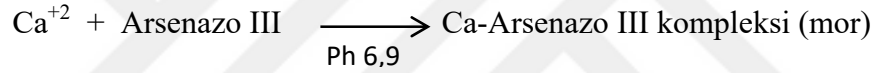
1) Streptavidin kaplı mikropartiküller	0,72 mg/MI
2) Anti- β -CrossLaps-Ab~biotin	2,5 mg/L
3) Anti- β -CrossLaps-Ab~Ru	2,4 mg/L
4) Fosfat tampon, pH 7,2	100 mmol/L

3.4.5. Kalsiyum Tayini

Örnekler, Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Beckman Coulter kitleri (CA) ile ile fotometrik yöntem ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde 1-5 mmol/L (4-20 mg/dL) konsantrasyon aralığında testin doğrusal olduğu bildirilmiştir. Yetişkinler için referans aralığı; 2,20-2,65 mmol/L (8,8-10,6 mg/dL) olarak bildirilmiştir.

Test Prensipleri

Kalsiyum iyonları (Ca^{+2}) ile Arsenazo III (2,2'-[1,8-Dihidroksi-3,6-disülfoaftilen-2,7-bisazo]-bisbenzenarsonik asit) yoğun mor renkli bir kompleks oluşturacak şekilde reaksiyona girer. Oluşan Ca-Arsenazo III kompleksinin absorbanansı 660/700 nm'de bikromatik olarak ölçülmektedir. Absorbans'da ortaya çıkan artış numunedeki kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Testteki Reaktif Bileşimi

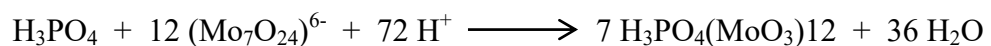
- 1) İmidazol (pH 6,9)
- 2) Arsenazo III % 0,1 – 0,2

3.4.6. Fosfor Tayini

Örnekler, Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Beckman Coulter kitleri (CA) ile ile kolorimetrik yöntem ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde 0,32-6,40 mmol/L (1-20 mg/dL) konsantrasyon aralığında testin doğrusal olduğu bildirilmiştir. Yetişkinler için referans aralığı; 0,81-1,45 mmol/L (2,5-4,5 mg/dL) olarak bildirilmiştir.¹³⁴

Test Prensipleri

İnorganik fosfor, molibdatla reaksiyona girerek bir heteropoliasit kompleksi oluşturur. 340/380 nm'deki absorbanans, numunedeki inorganik fosfor konsantrasyonu ile doğru orantılıdır.



Testteki Reaktif Bileşimi

1) Sülfürik asit	200 mmol/L
2) Amonyumheptamolibdat	0,35 mmol/L
3) Glisin	50 mmol/L

3.4.7. Parathormon Tayini

Örnekler, Beckman Coulter UniCel DxI 800 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen Beckman Coulter kitleri (CA) ile kemilüminesans immunoassay yöntemi ile analiz edilmiştir. Üretici firma tarafından sunulan verilerde; testin ölçüm aralığı 1-3500 pg/mL (0,1-371 pmol/L), yetişkinler için referans aralığı; 12-88 pg/mL (1,3-9,3 pmol/L) olarak bildirilmiştir.

Test Prensipleri

Access Intact PTH testi, iki bölgeli enzimatik (sandviç) bir testtir. Reaksiyon kabına, Alkalin fosfataz ile konjuge edilmiş monoklonal anti-PTH antikoru, protein içeren TRIS tamponlu salin, keçi poliklonal anti-PTH antikoruyla kaplı paramanyetik partiküller ve örnek ilave edilir. Reaksiyon kabındaki inkübasyonun ardından, katı faza bağlanan malzemeler manyetik bir alanda tutulurken, bağlanmamış materyaller yıkanır. Daha sonra, kemilüminesans substrat Lumi-Phos * 530 kaba eklenir ve reaksiyonun oluşturduğu ışık bir luminometre kullanılarak ölçülür. Işık üretimi, örnekteki PTH konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Örnekteki analit miktarı, kalibrasyon grafiğinden hesaplanır.

Testteki Reaktif Bileşimi

- 1) Keçi anti-PTH antikoru ile kaplanmış paramanyetik partiküller
- 2) TRIS tamponlu salin içinde sığır serum albümini (BSA)
- 3) Blok ACE içeren TRIS tamponlu salin
- 4) ACES tamponlu salin içinde fare monoklonal anti-PTH alkalın fosfataz konjugatı

3.4.8. 25 (OH) Vitamin D Ölçümü

Örnekler, Thermo Scientie Dionex Ultimate 300 otoanalizöründe kullanılmak üzere üretilen D vitamini kiti ile UHPLC (Ultra Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi) yöntemi ile analiz edilmiştir. UHPLC yöntemiyle 25 (OH) Vitamin D tayini yapabilmek için örnekler bir ön işlemden geçirilmiştir. Bu yüzden çökeltme basamağı ekstraksiyonla kombine edilmiştir. Kit prospektüsünde yer alan prosedüre uygun olarak 400 µl serum örneği, 500 µl Precipitant P ve 400 µl Internal Standart ile karıştırılarak 30 sn. vortekslenmiştir. Ardından 5 dakika 10000 x g'de santrifüj edilmiştir. Santrifüjlemeden sonra oluşan süpernatantın üst fazının 5 µl'si UHPLC sistemine enjekte edilmiştir. Kolon sonrası elde edilen kromatogramlar UV dedektörle 264 nm dalga boyunda saptanmıştır. Sonuçlar internal standart metodu ile pik alanları ya da yükseklikleri integrasyonu ile hesaplanmış ve serum kalibratörüne teslim edilerek belirlenmiştir. UHPLC pompasında akış hızı: 0,75 ml/dak ve analitik kolon sıcaklığı: 40 °C olarak ayarlanmıştır. Hem Vitamin D₂, hem de Vitamin D₃'ün 500 µg/L'ye kadar yapılan linearite çalışmasında bu aralıkta lineer olduğu gözlenmiştir. Yönteme göre > 30 µg/L'lik 25(OH) vitamin D konsantrasyonları ile yeterli D vitamini desteği sağlanacağı bildirilmiştir.¹³⁵

Test Prensipleri

UHPLC; herhangi bir karışımda bulunan bir veya daha fazla analitin, hareketli sıvı bir faz ile sabit bir faz arasında değişik hızlarda hareket etmesi prensibine dayanan bir ayırıştırma tekniğidir. Taşıyıcı olan sıvı faz, pompalar aracılığıyla yüksek basınçla kolona gönderilir. Kolon özelliklerine göre sabit faz ile etkileşime giren analit ve karışım içeriği, kolon içerisinde değişik hızlarda ilerler. Ayrılan analit kolon çıkışında uygun bir dedektörle tespit edilerek miktar tayini yapılır

Testteki Reaktif Bileşimi

- 1) Asetonitril (Internal Standart)
- 2) P Precipitant
- 3) Mobil Faz
- 4) Test solüsyonu (Lyophil)

3.5. İstatiksel Analiz

Excel (versiyon 14.0, Microsoft Office Professional Plus 2010) ve SPSS (versiyon 20.0, SPSS Inc, Chicago, Illinois, ABD) programları, istatistiksel analizler yapmak ve grafik üretmek için kullanılmıştır.¹³⁶ Cochran testi ve D / R metodu ile uç değerlerin atılmasından sonra tüm grup ve her iki cinsiyete ait veriler CV-ANOVA kullanılarak analiz edilmiştir.⁴⁰⁻⁴² Cinsiyetler arası CV_I ve CV_G tahminleri arasındaki farklar, Burdick ve Graybill tarafından açıklandığı gibi hesaplanan %95 güven aralıkları örtüşmesi göz önüne alınarak değerlendirilmiştir.¹³⁷ Cinsiyetler arası ortalama konsantrasyonlar arasındaki farklar Student t-testi kullanılarak incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar sağlıklı bireylerin yayınlanan verileri ile karşılaştırılmıştır.

3.5.1. Uç Değerlerin Atılması

Hastaların sonuçlarıyla hesaplamalar yapmadan önce, her birey için ortalama ve absölü sınırların temel alındığı dağılım grafikleri SPSS'de çizilmiştir. Bu şekilde hem varyans, hem de ortalama açısından aşırı uçlar olup olmadığı görsel olarak değerlendirilmiştir. Tekrarlayan ölçüm sonuçları arasında aşırı uç değerlerin atılmasında Cochran testi ve D / R metodu kullanılmıştır.⁴⁰⁻⁴²

Her bir kişiye ait tekrarlayan ölçümlerle elde edilen sonuç varyansının, diğer bireylerden elde edilen sonuç varyanslarından anlamlı farklılık gösterip göstermediği Cochran C testi ile kritik değer tablosu kullanılarak değerlendirilmiştir.

$$C_j = \frac{S_j^2}{\sum_{i=1}^N S_i^2}$$

[C_j]: J veri serisi istatistiği; S_j: J veri serisinin standart sapması; N: Veri serisi içinde kalan data serileri
S_i: Data serisi i'nin standart sapması]

Hesaplanan C değeri, C kritik tablo değeri (Ek-2) ile karşılaştırılmış ($C_{hesap} < C_{kritik}$) ve varyansların homojenliğini değerlendirmek için;

“ H₀: Varyanslar homojendir, $C_{hesap} < C_{kritik}$ (p = 0,05)

H₁: Varyanslar homojen değildir, $C_{hesap} > C_{kritik}$ (p < 0,05)”

hipotezleri kurulmuştur.

3.5.2. CV_I ve CV_G'nin Hesaplanması

Tüm grup ve her iki cinsiyete ait CV_I ve CV_G değerleri Fraser ve Harris'e göre hesaplanmıştır.^{30,31} Her bir bireyin 5 farklı zamanda elde edilen verileri kullanılarak elde edilen ortalama ve standart sapma değerlerinden tek tek CV_{TI} (birey-içi total varyasyon) hesaplanmış ve CV_I hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

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

Çalışmaya katılan tüm bireylerin tüm verileri kullanılarak elde edilen ortalama ve standart sapma değerlerinden tüm sonuçlar arası varyasyon (CV_T) hesaplanmış ve CV_G hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

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

Elde edilen değerlerin %95 GA alt ve üst sınırlarını hesaplamak için aşağıdaki formül kullanılmıştır.

$$\frac{(n-1)s^2}{x^2_{sağ}} < \sigma^2 < \frac{(n-1)s^2}{x^2_{sol}}$$

Kikare (X²) dağılım tablosundan (Ek-3) birey sayısına uygun olarak 0,975 ve 0,025'e denk düşen değerler alınmış ve formülde yerine (x²_{sağ}, x²_{sol}) konularak hesaplamalar yapılmıştır. Formülde 's' değeri olarak her bir analiz için tüm grup ve cinsiyetlere göre ayrı ayrı hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri alınmıştır.

3.5.3. CV_A'nın Hesaplanması

Her bir analiz için CV_A retrospektif olarak iç kalite kontrol verilerinden CV_A = SD / Mean formülü kullanılarak hesaplanmıştır. Kontrol materyalleri verilerine ait ortalamalardan çalışılan 30 hastada bulunan konsantrasyon değerlerinin ortalamasına en yakın olan kontrol konsantrasyonu kullanılmıştır.

3.5.4. RCV'nin Hesaplanması

RCV, aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

$$RCV = Z_p \times 2^{1/2} \times (CV_I^2 + CV_A^2)^{1/2}$$

$2^{1/2}$ çift yönlü değişim olasılığını ifade eder ve Z_p , iki yönlü değişimde istatistiksel anlamlılık düzeyine karşılık gelen standart sapmayı gösterir. $Z_p = 1,96$ %95 olasılık ile ($p < 0,05$) anlamlı bir değişiklik için kullanılmaktadır.

3.5.5. II'nin Hesaplanması

Sonuçların değerlendirilmesinde referans aralıklarının kullanımının yararlı olup olmadığının incelenmesi için II hesaplanmıştır. Hesaplamalarda aşağıdaki formül kullanılmıştır;

$$II = CV_I / CV_G$$

3.5.6. Analitik Kalite Özelliklerinin Hesaplanması

Biyolojik varyasyon değerleri kullanılarak analitik kalite gereksinimleri için istenen % I, % Bias ve % TE değerleri hesaplanmıştır. Analitik kalite özelliklerinin hesaplanması için aşağıdaki formüller kullanılmıştır:

$$I_{MAX} = 0,5 \times CV_I$$

$$B_{MAX} = 0,25 \times (CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$$

$$TE_{MAX} = \% Bias_{MAX} + 1,65 \times \% I_{MAX}$$

3.5.7. Homeostatik Ayar Noktasının Hesaplanması

Bireyin homeostatik ayar noktasını %95 güven altında kestirmek için gerekli olan örnek sayısı %10 ve %20 limitler içinde hesaplanmıştır¹⁹. Hesaplamada aşağıdaki formül kullanılmıştır.

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

(n=örnek sayısı, D=Homeostatik ayar noktasına % yakınlık, Z = 1,96 ise %95 olasılık ile ($p < 0,05$) anlamlı bir değişiklik için kullanılmaktadır).



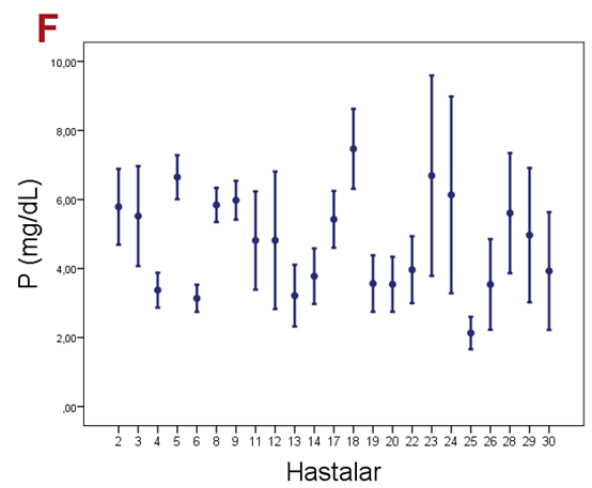
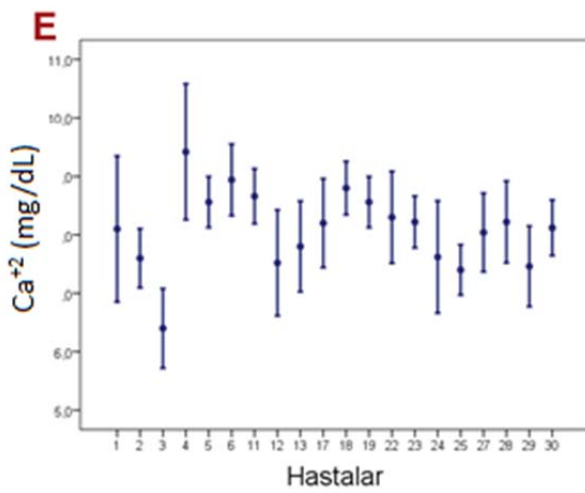
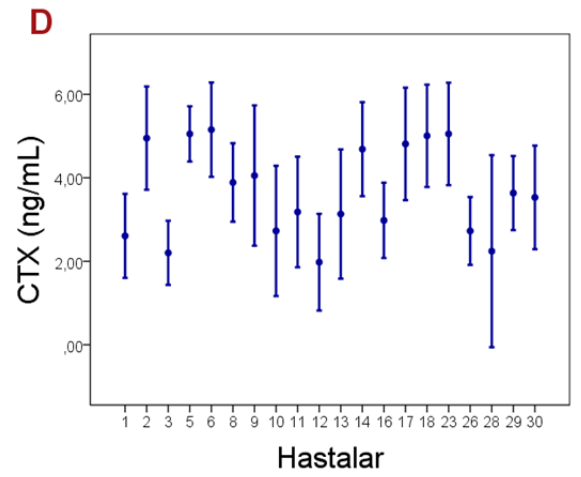
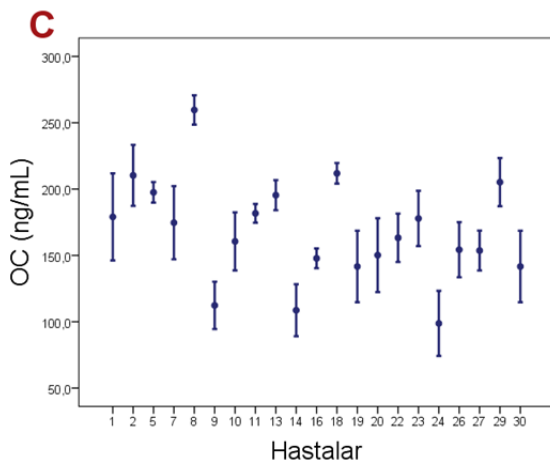
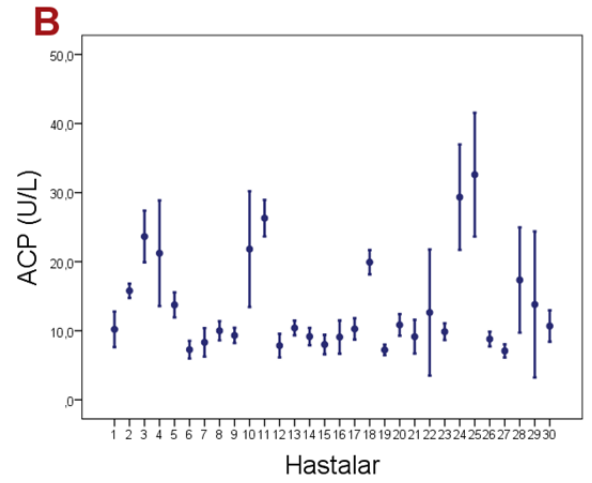
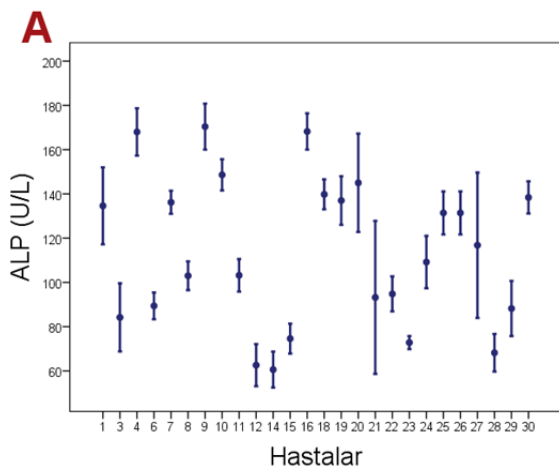
4. BULGULAR

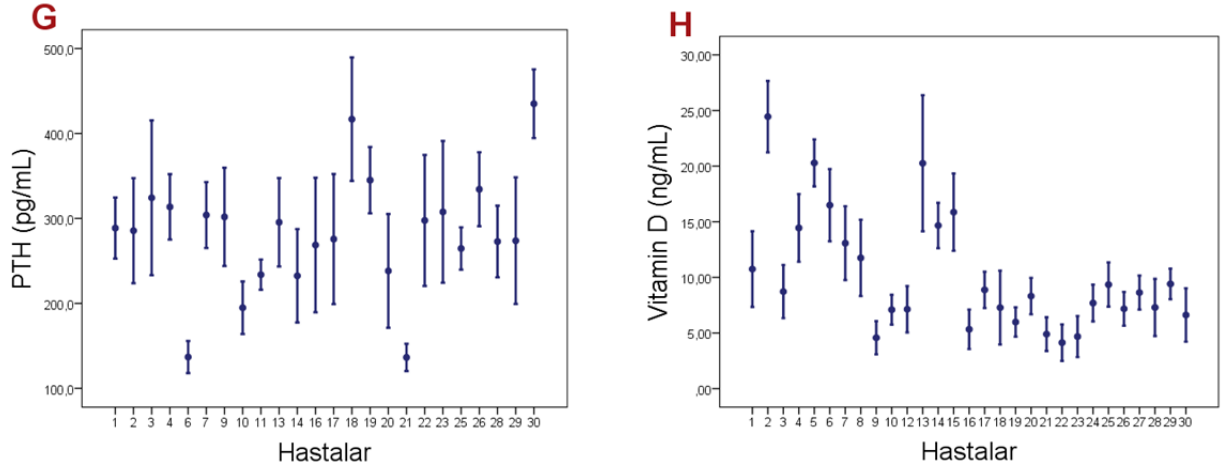
Prospektif olarak tasarlanan çalışmamızda, hemodiyaliz hastalarında 5 hafta boyunca kemik biyobelirteçlerin düzeyleri izlenmiştir. Çalışmaya 20-50 yaş aralığında 15 kadın, 15 erkek birey dahil edilmiştir. Çalışmaya katılan her birey için ortalama ve absöü sınırların temel alındığı dağılım grafikleri SSPS’de çizilerek hem varyans hem de ortalama açısından aşırı uç değerler olup olmadığı görsel olarak değerlendirilmiştir. D/R kuralına göre aşırı uç bulunan örnekler belirlenmiştir. Ayrıca varyans açısından aşırı olan dağılımlar Cochran testi ile analiz edilmiştir. %95 anlamlılık düzeyinde her analit için kadın ve erkeklerde ayrı ayrı hesaplanan C_{hesap} değerleri ile her birey için hesaplanan C_{hesap} değerleri, hedef C_{tablo} değerleri (Ek-2) ile karşılaştırılarak aşırı uç değerler çalışma dışı bırakılmıştır. Uç değerler atıldıktan sonra kalan kadın, erkek ve toplam birey sayısı üzerinden her birinde $C_{hesap} < C_{tablo}$ bulunması nedeniyle H_0 hipotezine göre varyansların homojen olduğu kabul edilmiştir. Tablo-9’da yapılan analizler, dışlama öncesi ve sonrası birey sayıları ve her bir analit için Mean±SD değeri gösterilmektedir.

Tablo 9. Dışlama öncesi ve sonrası birey sayıları ve analitlerin mean±SD değerleri.

Analit	İlk birey sayısı	Son birey sayısı	Mean±SD
ALP (U/L)	30	25	114,22±34,72
ACP (U/L)	30	30	13,71±9,44
Osteokalsin (ng/mL)	30	20	167,9±40,46
CTX (ng/mL)	30	20	3,68±1,41
Ca ⁺² (mg/dL)	30	20	8,09±0,87
P (mg/dL)	30	23	4,78±1,7
PTH (pg/mL)	30	24	282,45±79,24
25-OH-Vit D (ng/mL)	30	29	10,71±6,63

Uç değeri atıldıktan sonra kalan bireylerde analit düzeylerinin dağılım grafikleri aşağıda görülmektedir (Şekil-7).





Şekil 7. ALP (A), ACP (B), OC (C), CTX (D), Ca^{+2} (E), P (F), PTH (G), D vitamini (H) düzeylerinin uç değerler atıldıktan sonra kalan bireylerdeki dağılımları.

Homojen dağılım gösteren veriler üzerinden CV-ANOVA kullanılarak tüm grup ve cinsiyetler için ayrı ayrı hesaplanmış CV_I ve CV_G değerleri bulunmuştur. Elde edilen CV_I ve CV_G değerlerinin %95 GA alt ve üst sınırlarını belirlemek için tüm grup ve cinsiyetler göre χ^2 tablosundan (Ek-3) 0,975 ve 0,025'inci değerler alınarak formülde yerine konulmuştur. Hesaplanan değerler ve %95 GA alt ve üst sınırları aşağıdaki tablolarda görülmektedir (Tablo 10-17).

Tablo 10. ALP tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

ALP	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	10,9	13,49	6,15	33,32	28,07	37,75
% 95 GA Alt Sınır	6,69	7,23	3	20,31	15,04	18,43
% 95 GA Üst Sınır	21,24	33,55	18,94	64,49	69,82	116,28

Tablo 11. ACP tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

ACP	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	5,57	5,29	6,16	6,06	7,78	3,12
% 95 GA Alt Sınır	3,53	2,83	3,3	3,85	4,17	1,67
% 95 GA Üst Sınır	10,07	13,15	15,3	10,96	19,35	7,75

Tablo 12. Osteokalsin tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

Osteokalsin	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	15,06	15,6	15,43	37,34	40,87	30,86
% 95 GA Alt Sınır	8,71	7,41	7,3	21,59	19,34	14,6
% 95 GA Üst Sınır	32,14	52,24	51,46	79,66	136,22	102,86

Tablo 13. CTX tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

CTX	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	1	1,07	0,9	0,95	0,99	0,36
% 95 GA Alt Sınır	0,58	0,55	0,37	0,55	0,5	0,15
% 95 GA Üst Sınır	2,12	2,93	4,42	2,03	2,69	1,75

Tablo 14. Ca^{+2} tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

Ca^{+2}	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	0,57	0,73	0,48	0,6	0,55	0,45
% 95 GA Alt Sınır	0,33	0,32	0,24	0,34	0,24	0,22
% 95 GA Üst Sınır	1,22	3,02	1,39	1,27	2,3	1,31

Tablo 15. P tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

P	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	1,13	1,18	1,13	1,25	1,09	1,32
% 95 GA Alt Sınır	0,68	0,56	0,58	0,74	0,52	0,68
% 95 GA Üst Sınır	2,26	3,96	3,08	2,5	3,65	3,6

Tablo 16. PTH tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

PTH	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	45,74	48,15	45,37	64,5	44,62	77,6
%95 GA Alt Sınır	27,63	24,16	22,77	40,63	22,39	38,94
%95 GA Üst Sınır	90,69	138,63	130,67	126,84	128,48	223,46

Tablo 17. 25-OH-Vit D tüm grup ve her iki cinsiyet için hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri ve %95 GA alt ve üst sınırları.

25-OH-Vit D	CV_I			CV_G		
	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek
Hesaplanan	2,42	0,9	4	5,9	3,89	6,37
% 95 GA Alt Sınır	1,54	0,48	2,15	3,81	2,08	3,41
% 95 GA Üst Sınır	4,38	2,25	9,96	10,09	9,66	15,84

Cinsiyetler için ayrı ayrı hesaplanan BV verileri kullanılarak, tüm grup ve kadın ve erkek bireyler için hesaplanmış RCV ve II değerleri aşağıda tabloda görülmektedir (Tablo- 18). RCV hesaplamalarında denklemde bulunan CV_A için internal kalite kontrol çalışmalarından elde edilen CV_A değerleri kullanılmıştır.

Tablo 18. Kadın, erkek bireyler ve tüm grup için hesaplanmış RCV ve II değerleri.

	RCV (%95 olasılık ile)			II		
	Kadın	Erkek	Tüm Grup	Kadın	Erkek	Tüm Grup
ALP	39,25	18,85	31,46	0,48	0,16	0,33
ACP	19,43	21,3	20,03	0,9	1,9	0,91
Osteokalsin	47,03	46,43	45,48	0,38	0,5	0,4
CTX	3,1	2,67	2,88	1,09	2,5	1,04
Ca	2,2	1,57	1,8	1,3	1,05	0,96
P	3,34	3,19	3,18	1,08	0,8	0,9
PTH	134,32	126,7	127,7	1,07	0,58	0,7
25-OH-Vit D	11,06	13,23	9,85	0,2	0,6	0,4

Kemik belirteçlerin test performansı açısından analitik kalite özellikleri tablolarda görülmektedir (Tablo-19).

Tablo 19. Test performansı açısından analitik kalite özellikleri

	% I _{max}	% B _{max}	% TE _{max}
ALP	5,48	8,77	17,82
ACP	2,79	2,05	6,66
Osteokalsin	7,53	10,06	22,5
CTX	0,5	0,34	1,17
Ca	0,3	0,21	0,68
P	0,56	0,42	1,35
PTH	22,87	19,76	57,5
25-OH-Vit D	1,21	1,52	3,52

Tablo 20’de Westgard’ın BV veritabanında ACP, ALP, Ca, P, CTX, OC için sağlıklı bireylerden derlenen BV verilerinin, bizim verilerimizin karşılaştırması yer almaktadır. Veritabanında D vitaminine ait veri bilgisi bulunmamaktadır.

Tablo 20. Westgard’ın BV veritabanında sağlıklı bireylerden derlenen BV verileri ile bizim verilerimizin karşılaştırılması.

Analit	Sağlıklı Bireyler						Hemodiyalize giren KBY Hastaları				
	Yayın Sayısı	CV _I	CV _G	(%)I	(%)B	(%)TE	CV _I	CV _G	(%)I	(%)B	(%)TE
Alkalin fosfataz	22	6,45	26,1	3,23	6,72	12,04	10,9	33,32	5,48	8,77	17,82
Asit fosfataz	2	8,9	8,0	4,5	3,0	10,3	5,57	6,06	2,79	2,05	6,66
Osteokalsin	5	6,35	30,9	3,18	7,89	13,13	15,06	37,34	7,53	10,06	22,5
CTX	5	10,85	30,6	5,43	8,12	15,45	1	0,95	0,5	0,34	1,17
Kalsiyum	24	2,1	2,5	1,05	0,82	2,55	0,63	0,66	0,3	0,21	0,69
Fosfat	17	8,15	10,8	4,08	3,38	10,11	1,13	1,25	0,56	0,42	1,35
PTH	2	25,6	33,6	12,82	10,68	31,81	45,74	64,5	22,87	19,76	57,5
25-OH-Vit D	-	-	-	-	-	-	2,42	5,9	1,21	1,52	3,52

5. TARTIŞMA

Klinik laboratuvarlarda test sonuçlarının yorumlanması için çeşitli yaklaşımlar kullanılır. Bunlardan en yaygın kullanılanı popülasyona dayalı referans aralığıdır. Bununla birlikte BV bileşenleri hakkındaki sayısal veriler, laboratuvar tıbbının ilgilendiği çoğu analitin bireysellik özelliğine dikkat çekmektedir. Sonuçların RA ile karşılaştırılmasının önerilmediği yüksek bireysellik gösteren analitler için, test sonuçlarındaki değişikliklerinin izlenmesinde RCV'nin en uygun araç olduğu öne sürülmüştür.^{138,139}

RCV'nin hesaplanmasında kullanılan CV_I , pek çok analit için benzer bir değer olarak tanımlanmış olup, analitik belirsizliğin aksine tekraren hesaplama gerektirmemektedir. Bu nedenle birçok analit için sağlıklı popülasyondan elde edilen BV verileri kullanılarak RCV hesaplanabilir.¹ Bununla birlikte, sağlıklı popülasyondan elde edilen bu veriler, KBY gibi süregelen klinik durumları olan hastalarla aynı olmayabilir. Hasta bireylerde, altta yatan patoloji, ayar noktasını ve daha da önemlisi, bu homeostatik ayar noktası etrafındaki varyasyonu değiştirebilir. Bu durumda, seri sonuçların yorumlanmasında söz konusu hastalığa sahip bireylerden tahmin edilen CV_I değeri ile elde edilen RCV'nin kullanılması daha uygun olabilir. KBY'de görülen kemik belirteçleri serum konsantrasyonlarındaki değişiklikler çeşitli nedenlere (hemodiyaliz, ilaçlar gibi) sekonder olabilir. Bununla birlikte, böbrek fonksiyonlarıyla ilgili problemlerle ilişkili olma ihtimali daha yüksektir. Bu nedenle, bu çalışma, hemodiyalize giren hastalarda ROD ile ilgili potansiyel subklinik değişiklikleri saptamak için BV verilerine ve RCV kavramına dayanan objektif analitik göstergeleri değerlendirmek ve kemik belirteçlerindeki varyasyonların önemini açıklığa kavuşturmak için tasarlanmıştır. Bu amaçla çalışmamızda, kemik mineral metabolizmasını yansıtan analitlerden bazıları için (ALP, ACP, OC, CTX, Ca^{+2} , P, PTH, 25-OH-Vit D) CV_I , CV_G , II ve RCV değerleri hesaplanmıştır.¹⁴⁰⁻¹⁴⁴

Prospektif olarak tasarlanan çalışmamızda, birer haftalık kan toplama aralığıyla (toplamda 5 hafta) orta vadeli BV değerlendirmesi yapılmıştır. Genel olarak hastalarda belirgin olarak artmış PTH, ACP, Osteokalsin, CTX, P ve normal üst sınırını aşan ALP konsantrasyonları tespit edilmiştir. Bununla birlikte ortalama D Vitamini ve Ca^{+2} konsantrasyonları düşük olarak bulunmuştur. Genel olarak verilerimiz popülasyonda

beklenen yüksek kemik-döngülü sekonder hiperparatiroidizm oranları ile tutarlı görünmektedir.^{145,146} Diyaliz hastalarında görülen ROD sıklığı doğrulanmıştır, ancak kemik biyopsisi verilerinin yokluğunda bu durumdan emin olmak zordur. Kemik döngüsünü değerlendirmek için altın standart kemik biyopsisidir. Bununla birlikte, kemik döngüsünü izlemek için bu biyopsileri tekrarlamak oldukça zahmetlidir.¹⁴⁷ Bu nedenle, morbidite ve yaşam kalitesinde önemli bir bozulmaya yol açan mineral-kemik metabolizması bozukluğunun yönetiminde, daha iyi bir sonuca yol açacağını umduğumuz bir tedavi planı oluşturmak için ROD tanı ve değerlendirmesinde daha rasyonel bir yaklaşımın olması gereklidir. Bu nedenle ROD'un laboratuvar bulgularına dayalı olarak, ilk semptomların ortaya çıkmasından önce teşhis edilebileceği düşünüldüğünde, uygun tedaviyi zamanında uygulamak ve daha ciddi sonuçları önlemek için BV belirlenmesi ve biyokimyasal parametrelerin izleminde RCV modelinin kullanılması önerilmektedir. 2017 KDIGO kılavuzlarında da potansiyel CKD-MBD tedavilerinin izleminde, biyobelirteçlerin seri değerlendirilmelerine ve dolayısıyla varyasyonlara, tek bir sonuçtan daha fazla önem verilmesi gerektiği belirtilmektedir.¹⁴⁸

Sardiwal S ve ark. ROD'un erken tespit edilmesini amaçlayan çalışmalarında 22 stabil hemodiyaliz hastasında ve 12 sağlıklı gönüllüde 6 haftalık bir süre boyunca haftada iki kez alınan serum örneklerinde bALP düzeyini ölçmüşlerdir. Hemodiyaliz hastalarında bALP için CV_I değerini, sağlıklı bireylere göre anlamlı olarak daha yüksek bulmuşlardır.¹⁴⁹ Bizim çalışmamızda ALP için, sağlıklı kontrol grubu bulunmamaktadır ancak daha önceden sağlıklı bireylerde yapılmış çalışmalarla kıyaslandığında Sardiwal S. ve ark. ile benzer şekilde daha yüksek CV_I değeri elde edilmiştir (bizim çalışmamız CV_I: %10,9, sağlıklı grup CV_I: %6,45).^{141,150-152}

Sardiwal S ve ark. yapmış oldukları çalışmada hemodiyaliz hastalarında, bALP ve PTH için CV_I değerlerini sırasıyla %12,5 ve %25,6 olarak bulmuşlardır.¹⁹ Bizim çalışmamızda ALP ve PTH için CV_I değerleri sırasıyla %11 ve %46 olarak bulunmuştur. Sardiwal S ve ark.'nın yapmış oldukları çalışmada; hemodiyaliz hastalarında %10 oranında kemik ALP'nin homeostatik ayar noktasını tahmin etmek için 7 örnek gerekiyken, bizim çalışmamızda gerekli örnek sayısının tespiti için $n=(Z*[CV_A^2+CV_I^2]^{1/2}/D)^2$ formülünü kullandığımızda homeostatik ayar noktasını %10 içinde tahmin etmek için en az 5 örnek gerektiği bulunmuştur.¹⁴⁹ Bu sayı çalışmada

toplanan örnek sayısı ile uyumlu gözükmektedir. Çalışmaya dahil edilen kişi sayısı, örnek sayısı ve tekrar sayısı, BV tahminlerinin güvenilirlik ve güven aralıkları (GA) üzerinde etkili olup, bu değişkenlerin etkisi CV_A/CV_I oranına göre değişmektedir.³² Genel olarak bu oran ne kadar düşükse, GA'ları o kadar dardır.

Sardiwal S ve ark. yapmış oldukları çalışmada ALP için RCV değerini %95 olasılık ile %36; PTH için %72 olarak bulmuşlardır.¹⁴⁹ Bizim çalışmamızda ALP için %95 olasılık ile RCV %32 olarak bulunmuştur ve bununla birlikte hesaplanan $II < 0,6$ olduğundan ardışık test sonuçlarının izleminde referans aralığı yerine RCV'nin kullanılmasının daha yararlı olacağı düşünülmüştür. Çalışmamızda PTH için RCV %95 olasılık ile %127 olarak bulunmuştur. Serumda PTH'un zayıf-orta derecede bireysellik gösterdiği ($II:0,7$) için test sonuçlarının değerlendirilmesinde PTH için hesaplanan yüksek RCV değerinin kullanılmasından ziyade topluma dayalı RA'nın kullanılmasının daha uygun olduğu düşünülmüştür.¹⁴⁹ PTH için hesaplanan yüksek RCV oranının yüksek CV_I değeri ile ilişkili olduğu, bu duruma da ROD ile ilişkili olarak hastalarda PTH metabolizmasının değişmesinin neden olduğu düşünülmüştür. Fletcher ve ark. şiddetli hiperparatiroidili diyaliz hastalarında ortalama 780 ng/L ortalama PTH konsantrasyonları gözlemlemiştir.¹⁵³ Bizim çalışmamızda ortalama PTH konsantrasyonu 282 ng/L olarak bulunmuştur. Bu durum hemodiyaliz hastalarının %70'inde gözlenen sekonder hiperparatiroidizm ile tutarlılık göstermektedir.¹⁴⁵ Önceden, KBY olan hastalarda PTH'nin 150 ile 300 ng/L aralığında tutulmasını önerilmekteydi. Ancak bunun başarılması oldukça zor olduğundan, Böbrek Hastalığı Küresel Sonuçların İyileştirilmesi (KDIGO) tarafından yayınlanan kılavuzlarda, daha geniş bir PTH konsantrasyon aralığının (yaklaşık 150 ila 675 ng/L) tolere edilebileceği bildirilmiştir.⁸⁸

PTH ile karşılaştırıldığında ALP'nin daha düşük biyolojik varyasyonu, CKD-MBD'nin izlenmesi ve tedavisinde bu parametrenin potansiyel olarak önemli bir avantajını temsil etmektedir. Böylece sonuçlara ve konsantrasyonlardaki değişikliklere daha fazla güvenilebilir. Daha önce yapılmış çalışmalarda, bALP'nin CKD'li hastalarda kemik remodelinginin en hassas ve spesifik belirteci olduğu bildirilmiştir.¹⁵⁴ CKD-MBD'nin yanısıra diğer bazı kemik metabolizmasını etkileyen hastalıklarda da ALP'nin iyi bir belirteç olduğu gösterilmiştir. Alvarez L ve ark. Paget'in kemik hastalığı olan hastalarda kemik döngüsü belirteçlerinin biyolojik varyasyonun değerlendirmek için

yapmış oldukları çalışmada, bizim çalışmamıza benzer şekilde ALP'nin Paget hastalarında, sağlıklı deneklere göre (sağlıklı CV_I: %4,5, hasta CV_I: %12,4) daha fazla biyolojik varyasyon gösterdiklerini bulmuşlardır.¹⁴¹

Wleland GEH. yapmış olduğu çalışmada sağlıklı bireylerde ve KBY hastalarında ALP biyolojik varyasyonunu değerlendirmiş ve sağlıklı ve hasta grupta CV_I değerlerini benzer bulmuştur. Bizim çalışmamızda ALP için hesaplanan CV_I değeri; Wleland GEH'nin hesaplamış olduğu (CV_I: %7) ve sağlıklı popülasyon için hesaplanmış (CV_I: %6,4) değerlerden daha büyüktür. Wleland GEH. çalışmasında ALP analizini kinetik olarak Enzim Analizör 5086 (Eppendorf Hamburg, F.R.G.) ile gerçekleştirmiş ve analitik varyasyonu %1-6 arasında değişen aralıklarda bulmuştur. Bizim çalışmamızda ALP Beckman Coulter DXC 800 otoanalizöründe kolorimetrik yöntem ile analiz edilmiştir ve analitik varyasyon %2,9 olarak bulunmuştur. Çalışmalar arasındaki karşılaştırılabilirlik her ne kadar sıkı analitik protokoller uygulansa da farklı teknolojiler arasındaki uyum eksikliğinden dolayı mümkün gözükmemektedir.^{10,155}

Wleland GEH. yapmış olduğu çalışmada Ca⁺² için CV_I değerini, KBY hastalarında normal gruptan iki kat daha büyük bulmuştur (hasta CV_I: %2,8, sağlıklı: %1,4).¹⁵⁵ Çalışmamızda genel olarak hastalarının ortalama Ca⁺² konsantrasyonu normal sınırın altında seyretmiştir. Hesaplanan CV_I değerleri sağlıklı gruplarda yapılan çalışmalarla kıyaslandığında daha düşük olarak bulunmuştur (sağlıklı CV_I: %1,9, bizim çalışma CV_I: %0,57).¹⁰ Bununla birlikte, normal kalsiyum konsantrasyonu (altı hasta) ve hipokalsemi (oniki hasta) ya da hiperkalsemi (iki hasta) olan hastalar ayrı olarak kabul edilirse, KBY'li normokalsemik hastalar için CV_I değeri benzer bulunmuştur. Hem hipo hem de hiperkalsemi durumunda birey-içi BV'de gözlenen bu değişimin, Ca⁺² konsantrasyonunun normal homeostatik ayar noktasından sapması ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. KBY'de serum Ca⁺² konsantrasyonu için daha düşük bir ayar noktası olduğu ve bu yeni ayar noktası etrafındaki rastgele biyolojik dalgalanmaların, normal durumdan daha düşük olduğu düşünülmüştür.¹⁵⁵ Çalışmamızda Ca⁺² için %95 olasılık ile RCV %2 olarak bulunmuştur. Bununla birlikte elde edilen II'nin 0,96 olması, bu moleküle ait belirlenen RA değerlerinin kullanımının daha yararlı olacağını düşündürmüştür. Kadın ve erkek bireylerin sırasıyla 1,3 ve 1,05 olarak bulunan II değerleri tüm grup için hesaplanan bireysellik indeksi (0,96) ile uyum göstermiştir.

Cailum G ve ark. KBY olan 9 hastanın herbirinden yaklaşık 2'şer saat arayla elde edilen ortalama 13 örnekte Ca^{+2} için kısa dönem birey-içi biyolojik varyasyonu hesaplamışlardır. Ortalama birey-içi BV'leri (CV_I : %6,4), sağlıklı bireylerle benzer bulmuşlardır. Sonuç olarak kısa vadede, anormal veya normal biyokimyasal sonuçlara neden olan ancak yeni bir homeostatik kararlı durumun elde edildiği tüm hastalıklarda plazma analitlerinin birey-içi BV'sinin, sağlıklı bireylerde bulunanla benzer olduğu hipotezini ortaya koymuşlardır.¹⁵⁶

Laboratuvarlarda kullanılan çok sayıda analit için yayınlanan CV_I değerleri, farklı zaman aralıklarıyla planlanan çalışmalardan elde edilmiş değerlerin ortalamasıdır. Bazı analitler için belirlenmiş zaman aralıkları ve elde edilen CV_I değerleri arasında direkt ilişki saptanamamasına rağmen, uzun zaman aralıklarıyla CV_I 'da artma gözlenmiştir. CV_I daha kısa zaman aralıklarıyla elde edildiğinde bu analitler için hesaplanan RCV'nin yalancı pozitif sonuçlar doğurması olasıdır. Dolayısıyla belirlenen zaman aralıkları için yalancı pozitif sonuçları ayırt edecek ve aynı zamanda yalancı negatif sonuçlara engel olacak bir dengeye ulaşılması gerekmektedir.^{18,157}

Çalışmamızda Ca^{+2} ile benzer şekilde ortalama D vitamini konsantrasyonu da normal sınırın altında bulunmuştur. D vitamininin CV_I değerine göre oldukça geniş CV_G değerine sahip olduğu, bu nedenle yüksek bireysellik gösterdiği belirlenmiştir (CV_I : %2,4, CV_G : %5,9, II:0,4). RCV %95 olasılık ile %10 olarak bulunmuştur. Bu haliyle D vitamini için popülasyona dayalı RA'nın kullanılmasından ziyade RCV'nin kullanılmasının daha doğru olacağı sonucuna varılmıştır. Çalışmaya Sinakalset veya aktif D vitamini tedavisi alan hastalar dahil edilmemiştir. Benzer bir tasarıma sahip olan ancak sinakalset veya aktif D vitamini alan hastalara odaklanan bir çalışma ilgi çekecektir. Bununla birlikte çalışmamızda D vitamini ile ilgili bir diğer kısıtlılık; D vitamininin mevsimlere göre değişen biyolojik karakteri nedeniyle hesaplanan BV verilerinden tam olarak emin olunamamasıdır.

Alvarez L ve ark. Paget'in kemik hastalığı olan hastalarda, kemik oluşumu belirteçlerinin sağlıklı deneklere göre daha fazla birey-içi biyolojik varyasyon gösterdiklerini, oysa, rezorpsiyon belirteçlerindeki birey-içi biyolojik varyasyonun her iki grupta da benzer olduklarını göstermişlerdir. Ayrıca serum kemik yıkım belirteçlerinin idrar belirteçlerinden daha düşük biyolojik değişkenlik gösterdiğini belirtmişlerdir.^{141,158} Paget'in kemik hastalığı olan bireylerde kemik oluşumu

belirteçlerinin daha fazla biyolojik varyasyon göstermesinde osteoblastik işlev bozukluğu rol oynayabilir.¹⁵⁸ Bizim çalışmamızda ek olarak rezorpsiyon belirteçleri de oldukça farklılık göstermektedir. Bu durum KBY hastalarında sekonder hiperparatiroidiye bağlı olarak osteoklastik yıkımın artmasına bağlı olabilir.

Kemik kollajen oluşumu ve bozunması ile salınımı gerçekleşen serum peptitlerinin tahlili, potansiyel olarak, ROD dahil olmak üzere farklı kemik hastalıkları türlerinde kemik dönüşümü oranının dolaylı bir tahminini sağlayabilir.¹⁵⁹ Çalışmamızda, kemik oluşumu için K vitaminine bağımlı gamma-karboksiglutamik asit içeren bir kemik proteini olan Osteokalsin ve kemik rezorpsiyonunun bir belirteci olarak serum CTX düzeylerindeki BV değerlendirilmiştir. Çalışmamızda Osteokalsin için CV_I : %14, CV_G : %37, II:0,4 ve RCV %95 olasılık ile %45 olarak bulunmuştur. Elde edilen II < 0,6 olduğundan hasta izlenmesi için RCV'nin daha yararlı olduğu sonucuna varılmıştır. Çalışmamızda serum CTX için CV_I : %1 CV_G : %0,9 ve RCV %95 olasılık ile %2,88 olarak bulunmuştur. Elde edilen indeks değeri 1,04 olarak bulunmuş ve zayıf-orta düzeyde bireysellik gösterdiği ve bu haliyle topluma dayalı RA'nın kullanılabilceği, ancak değişikliklerin > 1,4 olduğu ölçüde tespit edilmeyeceği sonucuna varılmıştır. Klinik laboratuvarlarda CTX için RA, cinsiyetlere göre alt gruplara ayrılarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda, kadın ve erkek bireylerde ayrı ayrı hesaplamalar yapıldığında kadınlarda bireysellik indeksinin 1,09, erkeklerde 2,5 bulunması nedeniyle cinsiyetlere göre alt gruplar oluşturulmasının RA'nın yararlılığını arttırdığı doğrulanmıştır.¹⁶⁰

Düşük II'ne sahip çoğu analitin belirgin bireysellik özelliği taşıması nedeniyle, BV temelinde RA değerlerinin oluşturulmasında tabakalandırma yaklaşımına yer verilmesi gerekliliği vurgulanmaktadır. Bu yaklaşımın bilimsel temeli ise II sayısal değerini arttırmak ve bu yolla popülasyona dayalı RA kullanımını yaygınlaştırmaktır. CV_A hesaba katılmadığında en sade haliyle CV_I/CV_G olarak belirtilen II'nin sayısal değerini arttırmak için tek yol, CV_G 'nin azaltılmasıdır ki bu da ancak tabakalandırma uygulamalarıyla mümkün olabilmektedir.¹⁹

BV bilgisi, bir bireyin homeostatik ayar noktasını belirlemek için gerekli örnek sayısının belirlenmesini sağlar. Bu önemlidir, çünkü test sonuçları genellikle tek bir örnek temelinde değerlendirilir. CTX için tek bir numunenin tek bir ölçümünün sonucu, homeostatik ayar noktasını %10 içinde (hesaplanan CV_A ile) tahmin etmek için

yeterlidir. Bununla birlikte Osteokalsin için, hedef aralığın %20'ye genişletilmesi, homeostatik ayar noktalarının tahminlerini elde etmek için gerekli olan 10 ölçüm yerine 2 ölçümü yeterli kılmıştır.

Alvarez L ve ark. Paget'in kemik hastalığı olan hastalarda serum CTX'in birey-içi BV'sini sağlıklı deneklere göre daha fazla bulurken (hasta CV_I: %12,4; sağlıklı CV_I: %9,3) bireyler arası BV'sini, hasta bireylerde sağlıklı gruba göre daha düşük bulmuşlardır (hasta CV_G: %23,6, sağlıklı CV_G: %38,9). Sağlıklı bireylerden derlenen veri bankasında CTX için CV_I: %10,85, CV_G: %30,6 olarak belirtilmiştir.¹⁰ Bizim çalışmamızda CV_I ile CV_G değerleri benzer bulunmuş olup diğer çalışmalara göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Biyolojik varyasyon ile ilgili farklı sonuçlar, popülasyon karakteri ve çalışma süreleri arasındaki uyumsuzluğa bağlı olabilir. Ek olarak, telopeptidlerin renal metabolizmalarının bozulması bu belirteçlerin değişkenliğine katkıda bulunabilir.¹⁶¹ CTX ve Osteokalsinin renal klirens gösterdiği bilinmektedir ve bu nedenle genellikle böbrek yetmezliğinde artar.¹⁶² Alvarez L ve ark. hemodiyaliz serum kemik belirteçleri üzerindeki etkisini değerlendirmek için yapmış oldukları çalışmada, CTX konsantrasyonunun hemodiyaliz seansı sonunda anlamlı bir düşüş gösterdiğini tespit etmişlerdir.¹⁴¹

Kemik rezorpsiyonu anlamlı sirkadiyen varyasyon gösterir ve CTX sirkadiyen varyasyondaki en yüksek değişkenliği gösterir.¹⁶³ CTX konsantrasyonları sabahın erken saatlerinde en fazla, öğleden sonra en azdır.¹⁶⁴ Öte yandan kemik rezorpsiyon seviyelerinin postprandial olarak azaldığı bilinmektedir. Bu nedenle ölçümün tutarlılığını arttırmak için, örneklerin tipik olarak açlıkta ve de sabah saatlerinde alınması tercih edilmiştir.²⁶ Egzersizin kemik belirteçleri konsantrasyonlarında akut değişikliklere neden olduğu gözlemlenmiştir, bu nedenle, örneklerin alınmasından 48 saat önce egzersizden kaçınılması önerilmiştir.³⁴ Yaş ve cinsiyet gibi demografik değişkenler de test sonuçlarını etkiler. 20'li ve 30'lu yaşlarda kemik belirteçleri erkeklerde genellikle kadınlardan daha yüksek bazal konsantrasyon gösterir.^{165,166} Bununla birlikte, 50 yaşından sonra, kadınlar büyük olasılıkla menopoz geçişi ile ilişkili olarak, başlangıçtaki resorpsiyon düzeylerinde daha hızlı bir artış gösterdikçe bu tersine döner.¹⁶⁷ Ayrıca yaşlı diyaliz popülasyonunda kemik-mineral metabolizması; diyet, fiziksel aktivitenin azalması ve hormon düzenleyicilerine azalan kemik tepkisi gibi nedenlerle genç hastalardan farklı olabilir.^{168,169}

Çalışmamızda mineral-kemik metabolizması kontrolünün en önemli parametresi olan fosforun, tüm hasta gruplarında, kemik hastalığı komplikasyonları ve kemik deformiteleri olasılığını gösteren artmış değerlere sahip olduğu gözlenmiştir. Fosfor için hesaplanan CV_I : %1,13, CV_G : %1,25 olarak bulunmuştur. Sağlıklı bireylerde yapılan çalışmalarda CV_I : %8,15, CV_G : %10,8 olarak bildirilmiştir.¹⁰ Sağlıklı bireylerle karşılaştırıldığında çalışmamızda P için elde edilen daha düşük CV_I değerleri, aykırı olarak tespit edilen 10 olgunun dışlanmasıyla açıklanabilir. Bununla birlikte KBY'de serum P için daha yüksek bir ayar noktası olduğu, ancak bu yeni ayar noktası etrafındaki rastgele biyolojik dalgalanmaların, normal durumdakinden daha küçük olduğu şeklinde yorumlanabilir. P için RCV %95 olasılık ile %3 olarak hesaplanmıştır. Elde edilen II, 0,9 olarak bulunmuştur. Bu bulgular bize P düzeyindeki değişimi yorumlamak için mevcut kit ile ölçümlerimizde topluma dayalı RA'nın kullanılabilceğini göstermiştir. Kadın ve erkeklerde II sırasıyla 1,08 ve 0,8 olarak bulunmuştur. Burdan yola çıkarak cinsiyetlere göre tabakalandırma yapılmasının gerekmediği sonucuna varılmıştır. Kadın ve erkekler arasında CV_I arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Bununla birlikte bizim çalışmamızdan farklı olarak David ve ark. serumda fosfatın erkeklerde kadınlara göre anlamlı derecede ($p < 0,01$) yüksek CV_I gösterdiğini bulunmuşlardır. Ancak söz konusu çalışma sağlıklı bireylerden elde edilen verilerle hesaplanmıştır.¹⁷⁰ Çalışma popülasyonu ve yöntemlerinin farklılıklar göstermesi nedeniyle bu veriler istatistiksel karşılaştırma için uygun görünmemektedir.

Çalışmamızda rezorbsiyon aktivitesi ile korele olarak artan bir enzim olan ACP için CV_I değeri %5,6 olarak bulunmuş olup bu da %95 olasılık ile %20'lik bir RCV'ye yol açmaktadır. RCV'nin hesaplanması için CV_I yanında CV_A da önemli olmaktadır. Carobena A ve ark. yapmış oldukları çalışmada, kreatinin ölçümü için farklı analitik yöntemler kullanarak RCV değerini hesaplamışlardır. CV_I (%95 GA) değerlerini enzimatik [%4,4 (4,2-4,7)] ve Jaffe [%4,7 (4,4-4,9)] yöntemleri için benzer olarak bulmuşlardır¹⁷¹. Bununla birlikte Jaffe yöntemi için hesaplanan analitik varyasyon enzimatik yöntemle göre anlamlı olarak yüksek bulunduğundan (sırasıyla Jaffe ve enzimatik yöntemleri için %4,4 ve %1,1) RCV değerleri her iki yöntem için farklılık göstermiştir. Bu tür farklılıklar; ardışık sonuçlar farklı analitik sistemlerden iletilirse, pratikteki seri sonuçların klinik yorumlanmasını bozabilir. Daha yüksek CV_A değerleri toplam varyasyonu genişletir. Bu durumda RCV; analitik varyasyonlarının RCV'ye

katkısının daha az olduğu Fokkema ve ark.'nın tarif ettiği gibi formülle log-normal yaklaşım kullanarak hesaplanabilir. Log-normal dönüşümlü RCV'lerin özellikle üst limit değerleri Fraser'ın RCV modeline göre daha yüksek olduğundan yanlış pozitiflik oranları daha düşüktür. Örneğin RCV hesabına katılan toplam varyasyon %10 olduğu zaman log-normal model güven aralığından kaynaklanan %2,5 yanlış pozitiflik verirken, Fraser modeli %4 yanlış pozitiflik vermektedir. Toplam varyasyon %40'a çıktığı zaman log-normal modelde yanlış pozitiflik oranı değişmezken Fraser modelinde %11'e kadar çıkmaktadır.^{172,173} Ancak bu yaklaşımın hem CV_I , hem de CV_A 'yı içeren log-normale dönüştürülmemiş verilere göre bir takım dezavantajları olup RCV üzerine analitik belirsizliğin etkisini göstermeyi zorlaştırmaktadır. Bizim çalışmamızda veriler normal dağılım gösterdiğinden RCV'yi log-normal olarak hesaplama gereği kalmamıştır.

ALP ve ACP dışında cinsiyetler arası alt gruplar arasında CV_I 'nin %95 güven aralıkları örtüşmüştür. ALP için kadınlarda, ACP için erkeklerde CV_I değeri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur.¹⁷⁴ Sadece CTX için kadın ve erkek CV_G değerleri arasında anlamlı fark bulunmuştur (CV_G , K: %0,99, E: %0,36). Bu farklılığın, kadınlarda fizyolojik nedenlerle ortaya çıkan hormonal dalgalanmalar nedeniyle analit özelliklerini etkilemesinden kaynaklanmış olabileceği düşünülmüştür. Sonuç olarak, verilerimiz kemik parametrelerinin hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri için, çoğu durumda cinsiyetler arası tabakalandırmanın gerekmediğine işaret etmektedir. Bununla birlikte, kadınlarda yaşlanmaya bağlı olarak erkeklere oranla kemik yıkımının daha da artmasının bir sonucu olarak ileri yaş bireylerde BV cinsiyete göre farklılık gösterebilir. Ayrıca homeostatik mekanizmaların yaşlanma süreci boyunca azaldığı düşünüldüğünde, ileri yaş bireyler için bu tabakalandırmanın gerekip gerekmediği araştırılabilir.¹⁷⁵

Elde ettiğimiz bulgular, böbrek fonksiyon bozukluğu olan hastalarda, analitlerin bir kısmının yüksek derecede bireyselliğe sahip olduğunu göstermektedir. Bu nedenle, söz konusu analitler için, hastalık süreçlerinin ciddiyetini değiştirecek en iyi rehber, test sonuçlarının o hastadan alınan analizlerin sonuçlarıyla karşılaştırılması olacaktır. Hangi belirteç kullanılırsa kullanılsın, klinisyenlerin CKD-MBD'nin yönetiminde tek ölçüme güvenemeyeceği açıktır, bunun yerine hasta sonuçlarındaki eğilimler için seri sonuçlar değerlendirilmelidir. RCV, sonuçların değerlendirilmesinde yararlı bir araç olarak

önerilmekte ve kritik farkın dikkate alınarak yalancı pozitif sonuçların azaltılması hedeflenmektedir. Bununla birlikte süregelen patolojik durumlarda birey-içi biyolojik varyasyonda gözlenen değişikliğe bağlı olarak RCV de değişmektedir. Bu gibi durumlarda, hastalığa özgü RCV'lerin kullanılması, hastanın durumunu izlemek için sağlıklı bireylerden elde edilen referans aralıklarını veya RCV'yi kullanmaktan daha değerli olabilir. Hemodiyaliz hastalarında klinik durumu öngören RCV, laboratuvar raporlamasının optimizasyonunu temsil eder ve klinik karar için değerli bir araç olabilir.^{175,176}

Teşhis süreçlerinin karmaşıklığı arttıkça, laboratuvar uzmanları ve klinisyen arasındaki işbirliği, daha da gerekli hale gelmektedir. RCV modelinin kullanılması, takip edilen hemodiyaliz hastaları için değerli olmakla birlikte, laboratuvar için ekstra maliyet veya hastanın rahatsızlığını içermez. Sadece tanıyı, hastanın önceki sonuçlarını ve şimdiki değerleri ilişkilendirmek için güvenilir bir algoritmanın programlanabildiği bir laboratuvar bilgi yönetim sistemi (LBYS) gerektirir.^{2,177} Analitlerin atanmış yüzdeleri (RCV'ler) aşıldığında, eşzamanlı olarak klinisyene hastanın klinik durumunun olumsuz yönde değişebileceğini bildirmek için LBYS tarafından bir uyarı mesajı oluşturulabilir. Laboratuvarlar bu modeli laboratuvar raporlarının yorumlanmasını iyileştirmek için rutin bir uygulama olarak kullanabilirler.¹⁷⁸

RCV'nin hasta sonuç raporlarında gösterilmesi ile daha hassas bir takip süreci ile daha isabetli kararlar alınması mümkün olacaktır. Ayrıca klinik karar destek sistemlerinin kullanılması ile test sonuçları LBYS'de yer alan RCV'ye göre otomatik olarak onaylanarak, laboratuvar uzmanlarının sonuç değerlendirme ile ilgili iş yükü de azaltılabilir.⁵⁴ Bugdaycı ve ark. oral isotretinoinin yan etkilerini izlemek için biyokimyasal testleri RCV'ye göre yorumladıkları çalışmalarında, RCV'nin popülasyona dayalı referans aralığının yanında rapor edilmesinin, ardışık test sonuçlarındaki farklılıkların yorumlanmasında laboratuvarın analitik varyasyonu ile beraber bireyin biyolojik varyasyonunu da değerlendirme sürecine dahil edeceğinden objektif bir kriter olarak fayda sağlayacağını bildirmişlerdir.¹⁷⁹

Bütün bunlara ek olarak BV verileri en uygun hasta bakımı için gerekli analitik performans standartlarının belirlenmesi için de kullanılmaktadır.^{73,180} Analitik kalite performansının BV'ye göre değerlendirilmesi, imprecisyon, bias ve toplam hata için minimum, desirable (istenen) ve optimum olmak üzere 3 farklı kalite spesifikasyonu

opsiyonu sunmaktadır. BV minimum spesifikasyonu en geniş sınırlara sahip olduğundan laboratuvarlar tarafından gerçekleştirilmesi en kolay olan hedef olarak bilinmektedir. Öte yandan BV istenen spesifikasyonu genel olarak her laboratuvarın gerçekleştirmeyi hedeflediği bir spesifikasyondur. BV optimum spesifikasyonu ise en dar sınırlara sahip ve gerçekleştirilmesi en zor olandır.

BV ile TE değerlendirmelerine ek olarak her bir spesifikasyon için tanımlanmış ayrı ayrı izin verilebilir CV ve bias değerleri bulunması test sonucunda oluşabilecek hatanın kaynağıyla (rastgele ve/veya sistematik) ilgili bilgi sahibi olmamız konusunda oldukça önemlidir. Biyolojik varyasyon bileşenlerinin temel alındığı bu yöntem Milan Konsensus'unda ikinci sırada yer alarak belki de çoğu parametre için ulaşılabilecek en yüksek analitik kalite seviyesi olarak bildirilmektedir. Çoğu ölçütünün BV modeli kullanılarak tahsis edilen analitik kalite hedeflerine sahip olması önerilmiştir.^{48,181} Öte yandan, BV'ye dayalı bu üç aşamalı model ile, var olan metodoloji ve teknoloji kullanılarak bazı testlerde genel kalite spesifikasyonlarının karşılanması oldukça zordur. Bu testler için sürekli değişen laboratuvar kaynakları ve güncel yaklaşımlar (state of the art) göz önünde bulundurulduğunda daha geniş analitik kalite hedef kriterlerinin uygulanması (CLIA, RiliBÄK vs.) daha gerçekçi bir yaklaşım olabilir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz BV verileri (CV_I ve CV_G) kullanılarak test performansı için istenen analitik kalite özellikleri hesaplanmış ve istenen % TE limitleri ACP, ALP, Ca^{+2} , P, CTX, Osteokalsin, PTH için sırasıyla %6,6, %17,8, %0,75, %1,35 %1,17, %22,5, %57,5 olarak bulunmuştur. Westgardın veri bankasında Fraser'ın westgard formülü ile hesaplanan biyolojik varyasyona dayalı istenen % TE limitleri ise ACP, ALP, Ca^{+2} , P, CTX, Osteokalsin, PTH için sırasıyla %10,3 %12,04 %2,55, %10,11, %15,45, %13,13, %31,81 olarak bildirilmiştir.¹⁰ ACP ve D vitamini dışında diğer tüm analitler için İKK verilerinden retrospektif olarak hesapladığımız izin verilebilir analitik doğruluk, Fraser ve ark.'nın önerileri doğrultusunda istenen analitik kalite spesifikasyonlarını karşılamaktadır ve bu durum söz konusu parametreler için laboratuvarımızda kullanılan analitik prosedürün uygunluğunu göstermektedir⁶⁰. Bizim çalışmamızda ACP, CTX, Ca^{+2} , ve P için elde edilen CV_I ve CV_A verileri kullanılarak hesaplanan analitik kalite hedefleri on-line veritabanında bildirilenlerden daha düşük bulunmuştur.¹⁰ Çalışmamızda tüm iç ve dış kalite kontrol parametreleri çalışma periyodu boyunca kabul edilebilir aralıklarda izlenmiş ve belirgin bir sapma

görülmemiştir.

Analitlerin çoğu için BV verileri hesaplanmış, bazıları 2014 BV veritabanında derlenmiştir.¹⁰ Veri tabanında yer alan hali hazırda ulaşılabilmesi olanağını sağlamış BV bilgisi, analitik kalite spesifikasyonlarını belirlenmesini mümkün kılar. Ancak son zamanlarda, bu veri tabanında sunulan verilerin geçerliliği ile ilgili endişeler ortaya çıkmıştır.^{182,183} Aynı analit için bağımsız çalışmalardan elde edilen BV verileri önemli ölçüde farklılık göstermektedir. Bu varyasyonun bir kısmı muhtemelen veri toplamada kullanılan farklı zaman aralıklarıyla açıklanabilir. Bununla birlikte; popülasyonların karakterizasyonu, kullanılan analitik yöntemler ve uygulanan istatistiksel yaklaşımlardaki uyumsuzluk ve standart olmayan terminolojinin kullanımı da BV veri kalitesinde heterojenliğe neden olmaktadır.^{184,185} Bu nedenle 2014 yılından sonra veritabanındaki güncelleme durdurulmuş ve BV verilerinin oluşturulması, raporlanması ve uygulanması konusunda daha standart bir uygulama sunmak için bir dizi girişim başlatılmıştır.¹⁷

Perich ve ark. verilerin veri tabanına dahil edilmesi için uygulanan ölçütler ile ilgili kapsamlı bir açıklama getirmişlerdir. Bunlar: çalışmaların sadece BV bileşenlerini tahmin etmek için özel olarak tasarlanmış olması, $CV_A/0,5xCV_I \leq 2$ olarak tanımlanan bir performans endeks skorunun elde edilmesi ve kullanılan istatistiksel modelin tipinin aşağıdaki sıraya göre puanlanması 1) ANOVA, 2) Fraser ve Harris tarafından tanımlanan model, 3) belirsiz modeller.¹⁸⁶

Avrupa Laboratuvar Tıbbi Federasyonunun (EFLM) Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu, 2015 yılında, popülasyon grupları ve sağlık sistemleri genelinde BV verilerinin doğru ve etkin kullanımını sağlamak için gerekli temel unsurları tanımlayan biyolojik varyasyon veri raporlama kontrol listesini yayınlamıştır.¹⁸⁷ Kontrol listesi, bu alandaki yayınların kalitesini yükseltmeyi amaçlayan Tanısal Doğruluk Kılavuzu Raporlama Standartları (STARD) ile aynı yapıya dayanır ve (1) başlık / özet / anahtar kelimeler, (2) giriş, (3) yöntemler, (4) veri analizi, (5) sonuçlar ve (6) tartışma dahil olmak üzere altı ana unsur tanımlar.^{188,189} Bu şekilde kontrol listesi yüksek kaliteli BV yayınlarının oluşturulması için gelecekteki çalışmaların tasarımı, sunulması ve raporlanmasında ayrıntılı bir kılavuz sunmaktadır. Kontrol listesine uygunluk, güven aralıkları gibi destekleyici unsurlara yer verildiğini ve uç değerlerin dışlanması ve varyans homojenliği testi gibi temel istatistiksel analizlerin rapor edildiğini

göstermektedir.¹⁸⁷ Çalışmamızda sıkı bir analitik protokol uygulayarak, söz konusu kriterlere uyumlu bir istatistiksel yaklaşım ile kemik parametrelerinin BV'leri tanımlanmıştır.

Yayınlanmış literatürde BV bileşenlerinin tanımlanması için kullanılan çok çeşitli terim ve semboller vardır. Yakın zamanda yapılan bir çalışmada, 13 en üst sıradaki klinik kimya dergileri incelenmiş ve bireyler ile ilgili bileşenler için 68 terim ve 25 sembol, birey grupları ile ilgili bileşenler için 47 terim ve 18 sembol tanımlanmıştır.⁵⁰ BV verilerinin raporlanması için kullanılan terminolojinin standart hale getirilmesine açık bir ihtiyaç vardır. EFLM çalışma grubu, Simundic ve ark. tarafından tanımlanan terimleri ve sembolleri desteklemektedir.^{190,191} Bizim çalışmamızda da Simundic ve ark. tarafından önerilen terim ve semboller kullanılmıştır.

Yakın zamanda yayınlanmış BV verilerinin eleştirel değerlendirilmesi ve meta-analizi için EFLM tarafından oluşturulan bir çalışma grubu tarafından kritik bir kontrol listesi (BIVAC) oluşturulmuştur. Kontrol listesi, BV tahminlerinin kalitesi ve doğruluğu üzerine etki edebilecek tüm temel unsurları ele almaktadır. Ana odakları, çalışma tasarımı, ölçüm prosedürü ve CV₁ tahminlerine ilişkin verilerin istatistiksel analizi oluşturmaktadır. BIVAC, A, B, C veya D puanları verilebilecek 14 kalite maddesinden (QI) oluşmaktadır. Bu yaklaşımla, söz konusu ölçütler için BV yayınları BIVAC kriterleri açısından değerlendirilmektedir. Veri tabanında sunulacak olan ortak veriler, dahil etme kriterlerini yerine getiren çalışmalardan elde edilen tahminlerin medyanını temsil etmektedir. Meta-analiz ile sadece BIVAC A, B veya C notu alan çalışmaların uygun olduğu düşünülmektedir.¹⁹² Yakın gelecekte güncel global verilerin EFLM web sitesinde bulunan yeni bir BV veri tabanında yayınlanması amaçlanmaktadır. Bu amaçla, EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu tarafından Avrupa Biyolojik Varyasyon Çalışması (EuBIVAS) başlatılmıştır; Bu, ortak sıkı bir protokol kullanarak örnekleri toplayan altı Avrupa ülkesinde yürütülen çok merkezli bir çalışmadır.¹⁹³ Bu çalışmanın sonucu olarak, farklı popülasyonlar ve örnekleme aralıkları için ayrı BV verileri sunulacaktır. Tüm bu girişimler ve çalışmalar sonucunda, BV veritabanının kalitesi ve kullanılabilirliğinin daha da artması ve daha sağlam referans verilere ulaşılması hedeflenmektedir.¹⁸³ Doğru ve etkili klinik uygulamaların güvenli bir şekilde sağlanabilmesi için yüksek kaliteli biyolojik varyasyon verisi üretilmesi açısından bu standartlara uygun daha çok çalışmaya ihtiyaç vardır.

Yüksek kaliteli çalışmalardan elde edilen güvenilir BV verilerine duyulan ihtiyaca cevap veren bu girişimlerin yanı sıra çalışmaların yetersizliği (örn., çocuklarda verilerin azlığı) ve tıbbi laboratuvarlarda sıklıkla incelenen bazı analitlerle ilgili verilerin olmaması da BV verilerinin laboratuvarlarda etkin kullanımı açısından sorun teşkil etmektedir.^{64,194} Mevcut verilerde zayıf ya da hiç bilgi bulunmayan analitler için BV verilerinin kullanılabilirliğini arttırmak amacıyla, laboratuvar işletim sistemlerinden hastaların seri sonuçlarını kullanarak CV_I ve CV_G 'yi tahmin etmek için standart bir yöntemin geliştirilmesi bu sorunun çözümüne yönelik önemli bir girişim olabilir. Bu yaklaşım Cembrowski ve ark. tarafından gösterilmiştir. Dokuz analit üzerinde çalışmış ve bu zaman diliminde veritabanında bulunanlarla benzer CV_I ve CV_G değerleri elde etmişlerdir.¹⁹⁵

BV verisi oluşturmak için geçerli bir grup oluşturmak ve bugünün ortamında bilgilendirilmiş onam almak, çoğu laboratuvar için maliyetli, zaman açısından yoğun ve neredeyse imkansız bir görevdir. Farklı yaş grupları (örn., pediatrik hastalar ve geriatric hastalar), nadir örnek tipleri (örneğin, beyin-omurilik sıvısı ve aspirasyonları), zamanlanmış ve seri örneklerin toplanması, dışlama testleri BV'lerin oluşturulmasındaki zorluklardır. Bununla birlikte bir çalışmada BV hesaplanması için sağlıklı popülasyonun tanımlanması, başlangıç problemi haline gelir. Çünkü sağlık, evrensel bir tanımdan yoksun, göreceli bir durumdur.¹⁹⁶ Gerçekte, her zaman belirli bir seçim protokolü ile seçilen sağlıklı tanımı yeterli değildir. Seçilmiş bazı kişilerin aslında subklinik hastalığa sahip olabileceği gerçeğinin de bir sonucu olarak sağlıklı tanımında belirsizlikler olacaktır. Bu zorlukların ışığında, çoğu laboratuvar kendi BV'lerini oluşturmamaya karar verir. Bu kısıtlılıklarla birlikte BV bileşenlerine ilişkin veriler, analitik kalite spesifikasyonlarının belirlenmesi, seri sonuçlardaki değişiklikleri değerlendirmek için RCV'nin oluşturulması ve popülasyona dayalı referans değerlerinin kullanımının değerlendirilmesi dahil olmak üzere laboratuvar tıbbında birçok kullanıma sahiptir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Genel olarak; hemodiyaliz hastalarında, analitlerin ortalama konsantrasyonları referans değerlerinden beklenen yönde sapma göstermiştir. Hastalarda ortalama PTH, ALP, ACP, Osteokalsin, CTX ve P düzeyi normal üst sınırı aşan konsantrasyonlarda belirlenmiştir. Bununla birlikte ortalama D Vitamini ve Ca^{+2} düzeylerinin referans sınırlara göre düşük seyrettiği gözlenmiştir.
2. PTH, ALP ve Osteokalsin için hesaplanan CV_I değerlerinin sağlıklı bireylerden derlenen verilere göre istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek olduğu saptanmıştır. Bu bulgular, kemik döngüsünün biyokimyasal belirteçlerinin biyolojik varyasyonlarının, KBY olan hastalarla, sağlıklı bireylerde aynı davranışa sahip olmadığı fikrini desteklemektedir. Bu nedenle, sağlıklı bireylerden elde edilen değerlere dayanan iki ardışık gözlem arasındaki değişimin, KBY hastalık aktivitesindeki bir değişikliği yansıtmayacağı düşünülmüştür.
3. Kemik parametrelerinin hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri için, çoğu durumda cinsiyetler arası tabakalandırmanın gerekmediği tespit edilmiştir.
4. ACP, CTX, PTH, Ca^{+2} , P için $0,6 < II$ olarak belirlenmiş ve sözkonusu analitler için popülasyona dayalı RA'nın kullanılabilirliği düşünülmüştür.
5. Popülasyona dayalı RA'nın yararlılığı için CTX dışında cinsiyetler arası tabakalandırmanın gerekmediği tespit edilmiştir.
6. ALP, Vitamin D ve Osteokalsin'in yüksek bireysellik gösterdiği saptanmış ve ardışık test sonuçlarındaki farklılıkları değerlendirmek için referans aralığı yerine RCV'nin kullanılmasının klinik açıdan daha yararlı olacağı düşünülmüştür.
7. Bireyselliği yüksek olan analitler için hesaplanan RCV'lerin hasta sonuç raporlarında gösterilmesi renal osteodistrofinin değerlendirilmesinde objektif bir kriter olarak fayda sağlayabilir. Ayrıca gereksiz test tekrarlarının azaltılması ile laboratuvarın maliyet-etkin kullanımı için de yararlı olabilir.
8. Hesaplanan RCV'ler LBYS'ye entegre edilerek, test sonuçlarının otomatik olarak onaylanabilmesi için oluşturulan algoritmalarda kullanılabilir. Bu durum laboratuvar uzmanlarının sonuç değerlendirme ile ilgili iş yükünü azaltabilir.

9. Hemodiyaliz hastalarında renal osteodistrofiyi öngörmeye RCV kullanımının yararlılığını değerlendirmek için analitlerin atanmış yüzdeleri (elde edilen RCV'ler) aşıldığında, LBYS tarafından bir uyarı mesajının oluşturulduğu, klinisyenlerden geri bildirimlerin alındığı, prospektif bir çalışma tasarlanabilir.
10. Hemodiyaliz hastalarında kemik belirteçlerinin BV'sini değerlendirmek için sağlıklı kontrol grubunu da içeren daha kapsamlı bir çalışma tasarlanabilir. Bununla birlikte, kemik belirteçlerinin serumdaki BV'sinin yanısıra idrardaki BV'si araştırılabilir. Ayrıca sabah saatlerinde diyalize giren hastalar ile öğleden sonra diyalize giren hastalar arasında kemik belirteçlerinin BV'sinde farklılık gözlenip gözlenmediği değerlendirilebilir.



KAYNAKLAR

1. **Siest G.** Study of reference values and biological variation: a necessity and a model for Pretentive Medicine Centers. *Clin Chem Lab Med* **2004**; 42(7):810-6.
2. **Ozturk OG.** Using biological variation data for reference change values in clinical laboratories. *Biochem Anal Biochem* **2012**; 1:106.
3. **Queralto JM.** Intraindividual reference values. *Clin Chem Lab Med* **2004**; 42(7):765-77.
4. **SeyAhi N, Ateş K, Süleymanlar G.** Türkiye’de Renal Replasman Tedavilerinin Güncel Durumu: Türk Nefroloji Derneği Kayıt Sistemi 2014 Yılı Özet Raporu. *Turk Neph Dial Transpl* **2016**; 25 (2):135-141.
5. **Bargman M, Skorecki K.** Chronic Kidney Disease. In: Fauci S, Kasper L, Braunwald E, Hauser K, Longo B, Jameson F, Eds. Harrison’s Principles of Internal Medicine. 17th Ed. New York: Mv Graw Hill, **2008**: 1761-71.
6. **Dilek KM, Güllülü M, Dinç H, Dalkılıç E, Savaş G, Yurtkuran M.** Kronik Hemodiyaliz Olgularında Renal Osteodistrofi Sıklığı. *Türk nefroloji ve transplantasyon dergisi* **1995**; 44- 49.
7. **G. London D, Coyne, K. Hruska, H.H. Malluche, K.J. Martin.** The new kidney disease: improving global outcomes (KDIGO) guidelines – expert clinical focus on bone and vascular calcification. *Clin Nephrol.* **2010**; 74(6):423–432.
8. **Coric A, Resic H, Spasovski G, Leparo O, Ajanovic S et al.** Influence of Hemodialysis Treatment on Biochemical Markers of Bone Disease. *BANTAO Journal* **2017**; 15(1):16-19.
9. **Cavalier E, Delanaye P, Moranne O.** Variability of new bone mineral metabolism markers in patients treated with maintenance hemodialysis: implications for clinical decision making. *Am J Kidney Dis.* **2013**; 61:847–848.
10. **Minchinela J, Ricós C, Perich C, et al.** Biologic Variation Database, the 2014 Update.Erişim: (<http://www.westgard.com/biodatabase-2014-update.htm>) 2014. Erişim tarihi:25.09.2018.
11. **Fraser CG.** Biological variation: From principles to practice, Washington, DC: AACC Press, **2001**.11
12. **Güner G, Tuncel P, Örmen M.** Preanalitik evrede kalite yönetimi. In: Taga Y, Aslan D, Güner G, Kutay ZF, Eds. Tıbbi Laboratuvarda Standardizasyon ve Kalite Yönetimi. Ankara: Türk Biyokimya Derneği Yayınları, **2000**: 139-49.
13. **Young DS, Bermes WE.** Preanalytical variables and biological variation. In: Burtis AC, Ashwood RE, Burns AD, Eds. Tietz textbook of Clinical Chemistry and molecular diagnostics. Fourth ed. Missouri: Elsevier Saunders, **2006**: 449-523.
14. **Braga F, Panteghini M.** Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine, *Crit Rev Clin Lab Sci.* **2016**; 53(5):313–25.
15. **Burtis CA, Ashwood ER** Kalite Yönetimi. In: Aslan, Eds. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5.baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2005**: 285-97.

16. **Burtis CA, Ashwood ER.** Yöntemlerin değerlendirilmesi-İstatistiksel Tekniklere Giriş. In: **Aslan D** Eds. İçinde: Burtis CA, Ashwood ER. Tietz klinik kimyada temel ilkeler. 5. Baskı, Ankara: Palme Yayıncılık, **2005**: 234-49.
17. **Fraser CG, Harris EK.** Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci.* **1989**; 27(5):409-37.
18. **Ricos C, Alvarez V, Cava F, et al.** Current databases on biological variation: Pros, cons and progress. *Scand J Clin Lab Invest* **1999**; 59:491-500.
19. **Fraser CG.** Inherent biological variation and reference values. *Clin Chem Lab Med.* **2004**; 42(7):758-64
20. **Pineda-Tenor D, Laserna-Mendieta EJ, Timón-Zapata J, RodelgoJiménez L, Ramos-Corral L, et al.** Biological variation and reference change value of common chemistry and haematologic laboratory analytes in the elderly population. *Clin Chem Lab Med.* **2013**; 51(4):851-62.
21. **Winkel P, Statland BE, Bokelund H.** The effects of time of venipuncture on variation of serum constituents. *Am J Clin Pathol* **1975**; 64:433-47.
22. **Yen SCC, Vela P, Ramkin J, Littel AS.** Hormonal relationship during the menstrual cycle. *JAMA* **1970**; 211(9):1513-1517.
23. **Williams RJ.** Biochemical individuality. Austin, Texas and London University of Texas Press, **1956**.
24. **Schneider AJ.** Some thoughts on normal, or standard, values in clinical medicine. *Pediatrics* **1960**; 26: 973-84.
25. **Ricos C, Iglesias N, Garcia-Lario JV, et al.** Within-subject biological variation in disease: collated data and clinical consequences. *Ann Clin Biochem* **2007**; 44(4):343- 52.
26. **Cox DR, Solomon PJ.** Components of variance. Boca Raton, FL: Chapman and Hall/CRC, **2003**.
27. **Fraser C, Cummings ST, Wilkinson SP, et al.** Biological variability of 26 clinical chemistry analytes in elderly people. *Clin Chem* **1989**; 35:783-6.
28. **Carobene A, Graziani MS, Lo Cascio C, et al.** Age dependence of within-subject biological variation of nine common clinical chemistry analytes. *Clin Chem Lab Med* **2012**; 50:841-4.
29. **Ricós C, Perich C, Minchinela J, et al.** Application of biological variation - a review. *Biochimica Medica* **2009**; 19(3):250-9.
30. **Fraser CG.** Improved monitoring of differences in serial laboratory results. *Clin Chem* **2011**; 57(12): 1635-7.
31. **Harris EK, Yasaka T.** On the calculation of a 'reference change' for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* **1983**; 29: 25-30.
32. **Roraas T, Peterson PH, Sandberg S.** Confidence Intervals and Power Calculations for Within-Person Biological Variation: Effect of Analytical Imprecision Number of Replicates, Number of Samples, and Number of Individuals. *Clinical Chemistry* **2012**; 58(9): 1306- 13.

33. **Özmen SÜ.** Sağlıklı Bireylerde CK-MB, Troponin I ve Miyogloblin Düzeylerinin Biyolojik Varyasyonlarının Saptanması. Uzmanlık Tezi, Uludağ Üniversitesi, Bursa, **2015**.
34. **Gombos Csa' sza' r G, Bajsz V, Sio' E, Steinhausz To'th V, Schmidt B, Szekeres L, et al.** The direct effect of specific training and walking on bone metabolic markers in young adults with peak bone mass. *Acta Physiol Hung* **2014**; 101:205–15.
35. **Biosca C, Ricós C, Jiménez CV, Lauzurica R, Galimany R.** Model for establishing biological variation in non-healthy: renal posttransplantation. *Clin Chem* **1997**; 43:2206-8.
36. **Biosca C, Ricós C, Jiménez CV, Lauzurica R, Galimany R.** Are equally spaced collections necessary to assess biological variation? Evidence from renal transplant recipients. *Clin Chim Acta* **2000**; 301:79-85.
37. **Braga F, Panteghini M.** Biologic variability of C-reactive protein: is the available information reliable? *Clin Chim Acta* **2012**; 413: 1179–83.
38. **Cotlove E, Harris EK, Williams GZ.** Biological and analytic components of variation in long term studies of serum constituents in normal subjects. 3. Physiological and medical implications. *Clin Chem* **1970**; 16(12):1028-32.
39. **Costongs G, Janson PCW, BAS BM.** Short-Term and Long-Term Intra- Individual Variations and Critical Differences of Clinical Chemical Laborator Parametres. *Clin Chem Clin Biochem* **1985**; 23:7-16.
40. **Dixon WJ.** Processing data for outliers. *Biometrics* **1953**; 9:74–89.
41. **Cochran WG.** Human genetics. *Hum Genet* **1941**; 11:47–52.
42. **Snedecor GW, Cochran WG.** Statistical methods, 8th Ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press, **1989**.
43. **Røraas T, Støve B, Petersen PH, Sandberg S.** Biological variation: the effect of different distributions on estimated within-person variation and reference change values. *Clin Chem* **2016**; 62:725–36.
44. **Anscombe FJ.** The Validity of Comparative Experiments. *Journal of the Royal Statistical Society. Series A (General)* **1955**; 111(3):181-211.
45. **Braga F, Panteghini M.** Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: responsibilities and strategies. *Clin Chim Acta* **2014**; 432:55–61.
46. **Fraser CG, Kallner A, Kenny D, et al.** Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine. *Scand J Clin Lab Invest* **1999**; 59:475–585.
47. **Panteghini M, Sandberg S.** Defining analytical performance specifications 15 years after the Stockholm conference. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53:829–32.
48. **Sandberg S, Fraser C, Horvath AR, et al.** Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53:833–5.
49. **Klee GG.** Establishment of outcome-related analytic performance goals. *Clin Chem* **2010**; 56:714–22.

50. **Fraser CG, Hyltoft Peterson P, Libeer JC, Ricos C.** Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* **1997**; 34:8-12.
51. **Oosterhuis WP.** Gross overestimation of total allowable error based on biological variation. *Clin Chem* **2011**; 57:1334-6.
52. **Skendzell LP, Barnett RN, Platt R.** Medically useful criteria for analytic performance of laboratory tests. *Am J Clin Pathol* **1985**; 83:200-5.
53. **Lacher DA, Hughes JP, Carroll MD.** Estimate of biological variation of laboratory analytes based on the third national health and nutrition examination survey. *Clin Chem.* **2005**; 51(2):450-2.
54. **Fraser CG, Hyltoft Petersen P.** The importance of imprecision. *Ann Clin Biochem* **1991**; 28:207-11.
55. **Gowans EMS, Hyltoft Petersen P, Blaabjerg O, et al.** Analytical goals for the acceptance of reference intervals for laboratories throughout a geographical area. *Scand J Clin Lab Invest* **1988**; 48:757-64.
56. **Rico´s C, Baadenhuijsen H, Libeer JC, et al.** Currently used criteria for evaluating performance in EQA in European countries and a proposal for harmonization. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **1996**; 34:159-65
57. **Ozarda Y.** Reference intervals: current status, recent developments and future considerations. *Biochemia Medica* **2016**; 26(1):5-16.
58. **Sikaris KA.** Physiology and its importance for reference intervals. *Clin Biochem Rev.* **2014**; 35(1):3-14.
59. **Harris EK.** Some theory of reference values. II. Comparison of some statistical models of intraindividual variation in blood constituents. *Clin Chem* **1976**; 22:1343-50.
60. **Harris EK.** Statistical aspects of reference values in clinical pathology. *Prog Clin Pathol* **1981**; 8:45-66. 69
61. **Fraser CG.** Making better use of differences in serial laboratory results. *Ann Clin Biochem* **2012**; 49:1-3.
62. **Fraser CG.** Reference change values. *Clin Chem Lab Med* **2012**; 50:807-12.
63. **Horowitz GL, Altaie S, Boyd JC, et al.** Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline – 3th Ed. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, **2008**.
64. **Soldberg HE.** Subject-based reference values. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*,**1995**; 222:7-10.
65. **Siest G.** Study of reference values and biological variation: a necessity and a model for Pretentive Medicine Centers. *Clin Chem Lab Med* **2004**; 42(7):810-6.
66. **Ricos C, Alvarez V, Perich C, et al.** Rationale for using data on biological variation. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53:863-70.
67. **Cerioti F, Hinzmann R, Panteghini M.** Reference intervals: the way forward. *Ann Clin Biochem* **2009**; 46:8-17.

68. **Harris EK, Yasaka T.** On the calculation of a “reference change” for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* **1983**; 29:25–30.
69. **Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FA, et al.** Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem* **2006**; 52:1602–3.
70. **Roraas T, Stove B, Hyltoft Petersen P, et al.** Biological variation: the effect of different distributions on estimated within-person variation and reference change values. *Clin Chem* **2016**;62:725–36.
71. **Fraser CG.** Test result variation and the quality of evidence-based clinical guidelines. *Clinica Chimica Acta* **2004**;346:19-24.
72. **Fraser CG, Hyltoft Petersen P, Ricós C, Haeckel R.** Quality specifications. In: Haeckel R, Eds. Evaluation methods in laboratory medicine. VCH, Weinheim, **1993**.
73. **Fraser CG.** Data on biological variation: essential prerequisites for introducing new procedures. *Clin Chem* **1994**; 40:1671-3.
74. **Petersen P, Ricós C, Stöckl D, et al.** Proposed guidelines for the internal quality control of analytical results in the medical laboratory. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* **1996**; 34:983-99.
75. **Braunwald E, Fauci A, Kasper D, Hauser S, Longo D.** Kronik böbrek yetmezliği. In: Sağlık Y, Eds. Harrison İç Hastalıkları Prensipleri. Ankara: Nobel Tıp Kitapevleri, **2004**: 1551-1591.
76. **Moe S, Drüeke T, Cunningham J, Goodman W, Martin K, Olgaard K, Ott S, Sprague S, Lameire N, Eknoyan G; Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO).** Definition, evaluation, and classification of renal osteodystrophy: a position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcomes (KDIGO). *Kidney Int.* **2006**; 69(11):1945-53.
77. **Levey AS, Eckardt KU, Tsuchimoto Y, et al.** Definition and classification of chronic kidney disease: A position statement from Kidney Disease: Improving Global Outcome (KDIGO). *Kidney Int* **2005**; 67:2089-2100.
78. **Gürler İ, Serhat Ü, Kadir B, Sema A, Gültekin S.** Kronik Böbrek Yetmezliği. In: Emel A, Gültekin S, Eds. İliç’in Temel İç Hastalıkları. Ankara: Güneş Kitabevi, **1996**: 769-777.
79. **Scott G, Daniel W.** National Kidney Foundation’s Primer on Kidney Diseases. 6th Ed. **2013**; 276-287
80. **US Renal Data System 2016 Annual Data Report: Epidemiology of Kidney Disease in the United States.** *Am J Kidney Dis.* **2017**; 69 (3 Suppl 1):A7-A8.
81. **Süleymanlar G, Ateş K, Seyahi N; Türk Nefroloji Derneği.** Türkiye 2015 Ulusal Nefroloji, Diyaliz ve Transplantasyon Kayıt Raporu. Türk Nefroloji Derneği Yayınları. Erişim: <http://www.nefroloji.org.tr/registry/2015.pdf>. 2016. ErişimTarihi: 20.11.2018.
82. **Locatelli F, Del Vecchio L, Andrulli S, Marai P, Tentori F.** The role of underlying nephropathy in the progression of renal disease. *Kidney Int Suppl.* **2000**; 75:S49-55.
83. **Fauci AS, Braunwald E, Isselbacher KJ, Wilson JD, Martin JB, Kasper DL, Hauser SL, Longo DL.** Chronic renal failure. In: Lazarus JM, Brenner BM, Eds. Harrison’s Principles of Internal Medicine. 14th Ed.USA:McGraw-Hill Medical Books, **1998**: 1513-1520.

84. **Stein A, Wild J.** *Kidney Failure Explained*, 2th Ed. London: Class Publishing, **2002**.
85. **Tekin A, Cengiz U, Gültekin S.** Kronik Böbrek Yetmezliği. In: Ahmet UY, Tekin A, Eds. *Nefroloji El Kitabı*, 4th Ed. İstanbul:Nobel Tıp Kitapevleri, **2007**: 283- 304.
86. **Farrington K, Greenwood R, Ahmad S.** Hemodialysis: Mechanisms, outcome, and adequacy. In: Johnson RJ, Feehally J, Eds. *Comprehensive Clinical Nephrology*. Spain: Mosby, **2003**: 975–990.
87. **Slatopolsky E.** Renal osteodystrophy. In: Wyngaarden JB, Simith LH, Bennett JC, Eds. *Cecil Textbook of Medicine*. Philadelphia:Saunders Company, **1992**:1423-1426.
88. **KDIGO clinical practice guideline for the diagnosis, evaluation, prevention, and treatment of chronic kidney disease-mineral and bone disorder (CKD-MBD).** *Kidney Int Suppl* **2009**; 113: S1–S130
89. **Miller P. D.** Chronic kidney disease and osteoporosis: evaluation and management. *Bonekey Rep.* **2014**; 3:542.
90. **Mac Way F, Lessard M, Lafage-Proust MH.** Pathophysiology of chronic kidney disease-mineral and bone disorder. *Joint Bone Spine* **2012**; 79: 544–549. **Fraser CG, Harris EK.** Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* **1989**; 27:409–37.
91. **Endres DB, Villanueva R, Sharp CF Jr, et all.** Measurement of parathyroid hormone. *Endocrinol Metab Clin North Am* **1989**; 18:611-629.
92. **Malluche HH, Mawad HW, Monier-Faugere MC.** Renal osteodystrophy in the first decade of the new millennium: analysis of 630 bone biopsies in black and white patients. *J Bone Miner Res* **2011**; 26:1368–1376.
93. **Boran M, Doruk E, Gönenç F, Çetin S.** Hemodiyaliz hastalarında yüksek doz 1,25 (OH)₂ kolekalsiferol uygulaması ve kullanılan değişik membranların serum Paratiroid Hormon (PTH) Düzeyi Üzerine Etkisi. *Türk nefroloji Derneği Transplantasyon dergisi.* **1995**; 2:91-96.
94. **Sista S. K., Arum S. M.** Management of adynamic bone disease in chronic kidney disease: A brief review. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology* **2016**; 32–35
95. **Değerli Ü.** Tiroid hastalıkları. Genel Cerrahi, 6. baskı. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi. **1998**: 217-226.
96. **Ketteler M, Petermann AT.** Phosphate and FGF 23 in early CKD: on how to tackle an invisible foe. *Nephrol Dial Transplant* **2011**; 26:2430-2432.
97. **Felsenfeld A, Silver J.** Pathophysiology and clinical manifestations of renal osteodystrophy. In: Olgaard K, Eds. *Clinical guide to bone and mineral metabolism in CKD*. New York, NY: National Kidney Foundation, **2006**: 31-41.
98. **Hörl WH.** The clinical consequences of secondary hyperparathyroidism: focus on clinical outcomes. *Nephrol Dial Transplant* **2004**; 5:2-8.
99. **B. Jordi, C. Mario.** Mineral and bone disorders in chronic kidney disease and end-stage renal disease patients: new insights into vitamin D receptor activation. *Kidney International Supplements* **2011**; 1(4):122–129.

100. **Dusso A, Gonzalez EA, Martin KJ.** Vitamin D in chronic kidney disease. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **2011**; 25:647–655
101. **Del Valle E, Negri AL, Aguirre C, Fradinger E, Zanchetta JR.** Prevalence of 25(OH) vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease stage 5 patients on hemodialysis. *Hemodial Int* **2007**; 11:315–321.
102. **Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ.** Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease. A single center observational study. *Am J Nephrol* **2004**; 24:503–510.
103. **Pimentel A, Torres PU, Zillikens MC, Bover J, Solal MC.** Fractures in patients with CKD—diagnosis, treatment, and prevention: a review by members of the European Calcified Tissue Society and the European Renal Association of Nephrology Dialysis and Transplantation. *Kidney International* **2017**; 92:1343–1355.
104. **Camilleet G, Van Cromphaut S, Daci E, Maes C, Boullion R.** Disorders of Ca hemostasis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism* **2003**; 17:529–546.
105. **Mihai R, Farndon JR.** Parathyroid disease and calcium metabolism. *Br J Anaesth* **2000**; 85:29–43.
106. **Guyton A, Eds. Hall J.** In: Gökhan N, Çavuşoğlu H, Eds. Paratiroid Hormonu. Textbook of Medikal Physiology, 7th Ed, İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, **1989**: 1364–1368.
107. **Souberbielle JC, Friedlander G, Comier C.** Practical Consideration in PTH testing. *Clinical Chimica Acta* **2006**; 366:81-89.
108. **Sprague SM.** Renal bone disease. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes* **2010**; 17:535-9.
109. **Ferreira A, Frazão JM, Monier-Faugere MC, Gil C, Galvao J, et al.** Effects of sevelamer hydrochloride and calcium carbonate on renal osteodystrophy in hemodialysis patients. *J Am Soc Nephrol* **2008**; 19(2):405.
110. **Wang Y, Bishop NM, Taatjes DJ, Narisawa S, Millan JL, Palmer BM.** Sex- dependent, zinc-induced de-phosphorylation of phospholamban by tissue non-specific alkaline phosphatase in the cardiac sarcomere. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2014**; 307(6):H933-8.
111. **Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, Maloney NA, Greenwood C, Manuel A, Saiphoo C, Fenton SS, Segre G.** The spectrum of bone disease in end-stage renal failure-- an evolving disorder. *Kidney Int* **1993**; 43(2):436-42
112. **Sista S. K., Arum S. M.** Management of adynamic bone disease in chronic kidney disease: A brief review. *Journal of Clinical & Translational Endocrinology* **2016**; 32–35.
113. **Özkan B.** Çocuk ve Adolesanlarda Endokrin Testler. In: Yordam N, Alikışıfoğlu A, Bideci A, Eds. Pediatrik Kemik döngüsü parametrelerinin değerlendirilmesi. İstanbul: Endokrinoloji ve Oksoloji Derneği Yayınları II, **2006**: 269-288.
114. **Silvent J, Nassif N, Helary C, Azais T, Sire JY.** Guille MMG. Collagen osteoid-like model allows kinetic gene expression studies of non-collagenous proteins in relation with mineral development to understand bone biomineralization. *PLoS One* **2013**; 8:e57344.
115. **Sepici V.** Osteoporoz, Tanı ve Takibinde Laboratuar Yöntemleri. İstanbul **1998**; 104-118

116. **Hlaing T. T., Compston J. E.** Biochemical markers of bone turnover – uses and limitations. *Annals of Clinical Biochemistry* **2014**; 51(2):189–202.
117. **Coeverden SCCM, Netelenbos JC, de Ridder CM, Roos JC, Popp-Snijders C, Delemarre-van de Waal HA.** Bone metabolism markers and bone mass in healthy pubertal boys and girls. *Clin Endocrinol* **2002**; 57:107– 16.
118. **Seibel MJ.** Biochemical markers of bone turnover: part I: biochemistry and variability. *Clin Biochem Rev* **2005**; 26:97–122.
119. **Sharp CA, Linder C, Magnusson P.** Analysis of human bone alkaline phosphatase isoforms: comparison of isoelectric focusing and ion-exchange high-performance liquid chromatography. *Clin Chim Acta* **2007**; 379:105–112.
120. **Alatalo SL, Halleen JM, Hentunen TA, Monkkinen J, Vaananen HK.** Rapid screening method for osteoclast differentiation in vitro that measures tartrate-resistant acid phosphatase 5b activity secreted into the culture medium. *Clin Chem* **2000**; 46:1751–4.
121. **Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Vaananen HK.** Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res* **2000**; 15:1337–45.
122. **Igarashi Y, Lee MY, Matsuzaki S.** Acid phosphatases as markers of bone metabolism. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **2002**; 781:345–58.
123. **Epstein S.** Serum and urinary markers of bone remodeling: assessment of bone turnover. *Endocr Rev* **1988**; 9:438–448.
124. **Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, et al.** Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* **1999**; 14:792– 801.
125. **Herrmann M, Seibel MJ, Seibel M.** The amino- and carboxyterminal cross-linked telopeptides of collagen type I, NTX-I and CTX-I: a comparative review. *Clin Chim Acta* **2008**; 393:57–75.
126. **Lumachi F, Santeufemia DA, Del Conte A, Mazza F, Tozzoli R, Chiara GB, S. M. Basso.** Carboxy-terminal telopeptide (CTX) and amino-terminal propeptide (PINP) of type I collagen as markers of bone metastases in patients with non-small cell lung cancer. *Anticancer Res* **2013**; 33:2593-6.
127. **Christgau S.** Circadian variation in serum crosslaps concentration is reduced in fasting individuals. *Clin Chem* **2000**; 46:431.
128. **Clowes JA, Hannon RA, Yap TS, Hoyle NR, Blumsohn A, Eastell R.** Effect of feeding on bone turnover markers and its impact on biological variability of measurements. *Bone* **2002**; 30:886 – 90.
129. **Thomas L.** Calcium (Ca). In: Thomas L, ed. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: THBooks Verlagsgesellschaft, **1998**: 231-241
130. **Thomas L.** Säure Phosphatase (SP). In: Thomas L, ed. Labor und Diagnose 6 Auflage:TH-Books Verlagsgesellschaft mbH Frankfurt/Main, **2005**: 118-120.
131. **Takahashi M, Kawana K and Nagano A.** Biological variability of biochemical markers of bone turnover in healthy women. *Endocr Res* **2002**; 28:257–264.

132. **Glover SJ, Garnero P, Naylor K, Rogers A, Eastell R.** Establishing a reference range for bone turnover markers in young, healthy women. *Bone* **2008**; 42:623–30.
133. **Thomas L.** Alkaline phosphatase (ALP). In: Thomas L, Eds. Clinical laboratory diagnostics. Use and assessment of clinical laboratory results. Frankfurt/Main: THBooks Verlagsgesellschaft, **1998**: 36-46.
134. **Endres DB, Rude RK.** Mineral and Bone Metabolism. In Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood, David E. Bruns. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Philadelphia: Elsevier Saunders, **2006**; 1891-1965.
135. **Cavalier, P. Delanaye, J. Chapelle, J. Souberbielle.** Vitamin D: Current Status and Perspectives. *Clin Chem Lab Med* **2009**; 47(2):120-127.
136. SPSS Inc. SPSS for Windows. Version 20.0, Chicago: SPSS Inc. **2015**.
137. **Burdick RK, Graybill F.** Confidence intervals on variance components, 1st ed. New York: Marcel Dekker, Inc., **1992**.
138. **Hyltoft Petersen P, Fraser CG, Sandberg S, Goldschmidt H.** The index of individuality is often misinterpreted quantity characteristic. *Clin Chem Lab Med* **1999**; 37:655–661.
139. **Ricos C, Cava F, Garcia-Lario JV, et al.** The reference change value: A proposal to interpret laboratory reports in serial testing based on biological variation. *Scand J Clin Lab Invest* **2004**; 64:175–184.
140. **Biosca C, Ricos C, Lauzurica R, Petersen PH.** Biological variation at long-term renal post-transplantation. *Clinica Chimica Acta* **2006**; 368:188–191.
141. **Alvarez L, Ricos C, Peris P, et al.** Components of biological variation of biochemical markers of bone turnover in Paget's bone disease. *Bone* **2000**; 26:571–576.
142. **Bruins S, Fokkema MR, Romer JW, et al.** High intraindividual variation of brain natriuretic peptide (BNP) and amino-terminal proBNP in patients with stable chronic heart failure. *Clin Chem* **2004**; 50:2052–2058.
143. **Sambasivan AS, Lepage N, Filler G.** Cystatin C inpatient variability in children with chronic kidney disease is less than in serum creatinine. *Clin Chem* **2005**; 51:2215–2216.
144. **Burdick RK, Graybill F.** Confidence intervals on variance components. 1th Ed., New York: Marcel Dekker, **1992**.
145. **Danese MD, Kim J, Doan QV et al.** PTH and the risks for hip, vertebral, and pelvic fractures among patients on dialysis. *Am J Kidney Dis* **2006**; 47:149–156.
146. **Kalpajian MA, Mehrotra R.** Vascular calcification and disordered mineral metabolism in dialysis patients. *Semin Dial* **2007**; 20:139–143.
147. **Torres PU, Bover J, Mazzaferro S, de Vernejoul MC, Cohen-Solal M.** When, how, and why a bone biopsy should be performed in patients with chronic kidney disease. *Semin Nephrol* **2014**; 34:612–625.

148. **Ketteler M, Block GA, Evenepoel P, Fukagawa M, Herzog CA et al.** Executive summary of the 2017 KDIGO Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD) Guideline Update: what's changed and why it matters. *Kidney Int.* **2017**; 92(1):26-36.
149. **Sardiwal S, Gardham C, Coleman AE, Stevens PE, Michael P.** Bone-specific alkaline phosphatase concentrations are less variable than those of parathyroid hormone in stable hemodialysis patients. *Kidney International* **2012**; 82,100–105.
150. **Panteghini M, Pagani F.** Biological variation in bone-derived biochemical markers in serum. *Scand J Clin Lab Invest* **1995**; 55:609–616.
151. **Scariano JK, Garry PJ, Montoya GD et al.** Critical differences in the serial measurement of three biochemical markers of bone turnover in the sera of pre- and postmenopausal women. *Clin Biochem* **2001**; 34:639–644.
152. **Hannon R, Blumsohn A, Naylor K et al.** Response of biochemical markers of bone turnover to hormone replacement therapy: impact of biological variability. *J Bone Miner Res* **1998**; 13:1124–1133.
153. **Fletcher S, Jones RG, Rayner HC et al.** Assessment of renal osteodystrophy in dialysis patients: use of bone alkaline phosphatase, bone mineral density and parathyroid ultrasound in comparison with bone histology. *Nephron* **1997**; 75:412–419.
154. **Ureña P, De Vernejoul MC.** Circulating biochemical markers of bone remodeling in uremic patients. *Kidney Int* **1999**; 55:2141–56.
155. **Wleland GE Hötzel.** Intra-Individual Variation of Some Analytes in Serum of Patients with Chronic Renal Failure. *Clin Chem* **1987**; 33/5:670-673.
156. **Cailum G. Fraser and Philip Williams.** Short-Term Biological Variation of Plasma Analytes in Renal Disease. *Clin Chem* **1983**; 29/3:508-510.
157. **Omar F, van der Watt GF, Pillay TS.** Reference change values: how useful are they? *J Clin Pathol* **2008**; 61(4):426-7.
158. **Meunier P.** Bone histomorphometry and skeletal distribution of Paget's disease of bone. *Sem Arthritis Rheum* **1994**; 23:219–221.
159. **Ionova D, Dukova P, Zlatarska S.** Noninvasive circulating bone markers (CBM) of ROD. Abstract book of XXV ISN Congress, Buenos Aires, **1999**.
160. **Grzegorzewska A, Mlot M.** Serum markers of bone turnover in dialyzed patients separated according to age. *Intern Urol and Nephrol* **2006**; 2:311-316.
161. **Colwell, A. and Eastell, R.** The renal clearance of free and conjugated pyridinium cross-links of collagen. *J Bone Miner Res* **1996**; 11:1976–1980.
162. **Woitge HW, Pecherstorfer M, Li Y, Keck AV, Horn E, Ziegler R, et al.** Novel serum markers of bone resorption: clinical assessment and comparison with established urinary indices. *J Bone Miner Res* **1999**; 14:792–801.
163. **Szulc P, Delmas PD.** Biochemical markers of bone turnover: potential use in the investigation and management of postmenopausal osteoporosis. *Osteoporos Int* **2008**; 19:1683–704.

164. **Qvist P, Christgau S, Pedersen BJ, Schlemmer A, Christiansen C.** Circadian variation in the serum concentration of C-terminal telopeptide of type I collagen (serum CTX): effects of gender, age, menopausal status, posture, daylight, serum cortisol, and fasting. *Bone* **2002**; 31:57–61.
165. **Tsai KS, Pan WH, Hsu SH, Cheng WC, Chen CK, Chieng PU, et al.** Sexual differences in bone markers and bone mineral density of normal Chinese. *Calcif Tissue Int* **1996**; 59:454–60.
166. **Midtby M, Magnus JH, Joakimsen RM.** The Tromsø Study: a population-based study on the variation in bone formation markers with age, gender, anthropometry and season in both men and women. *Osteoporos Int* **2001**; 12:835–43.
167. **Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD.** Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* **1996**; 11:337–49.
168. **Horst RL, Goff JP, Reinhardt TA.** Advancing age results in reduction of intestinal and bone 1,25-dihydroxyvitamin D receptor. *Endocrinology* **1990**; 126:1053–1057.
169. **Zhou S, Bueno EM, Kim SW et al.** Effects of age on parathyroid hormone signaling in human marrow stromal cells. *Aging cell* **2011**; 10:780–788.
170. **Lacher DA, Hughes JP, Carroll MD.** Estimate of biological variation of laboratory analytes based on the third national health and nutrition examination survey. *Clin Chem* **2005**; 51(2):450–2.
171. **Carobene A, Marino I, Coşkun A, Serteser M, Unsal I, Guerra E at all.** The EuBIVAS Project: Within- and Between-Subject Biological Variation Data for Serum Creatinine Using Enzymatic and Alkaline Picrate Methods and Implications for Monitoring. *Clin Chem* **2017**; 63(9):1527-1536.
172. **Lund F, Petersen PH, Fraser CG, Sölétormos G.** Calculation of limits for significant bidirectional changes in two or more serial results of a biomarker based on a computer simulation model. *Ann Clin Biochem.* **2015**; 52(Pt 4):434-40.
173. **Lund F, Petersen PH, Fraser CG, Sölétormos G.** Calculation of limits for significant unidirectional changes in two or more serial results of a biomarker based on a computer simulation model. *Ann Clin Biochem.* **2015**; 52(Pt 2):237-44.
174. **Weber E.** Grundriss der biologischen Statistik. Jena: VEB Gustav Fischer Verlag, **1981**.
175. **Fraser CG, Cummings ST, Wilkinson SP, Neville RG, Knox JDE, HO O.** Biological Variability of 26 Clinical Chemistry Analytes in Elderly People. *Clin Chem* **1989**; 35(5): 783-786.
176. **Aarsand A, Roraas T, Sverre S.** Biological variation- reliable data is essential. *Clin Chem. Lab Med* **2015**; 53:153–4.
177. **Fraser CG.** Reference change values. *Clin Chem Lab Med* **2011**; 50:807–812.
178. **Özata M, Aslan Ş.** Klinik Karar Destek Sistemleri ve Örnek Uygulamalar. *Kocatepe Tıp Dergisi* **2004**; 5:11-17.
179. **Bugdayci G, Polat M, Oguzman H, Cinpolat HY.** Interpretation of Biochemical Tests Using the Reference Change Value in Monitoring Adverse Effects of Oral Isotretinoin in 102 Ethnic Turkish Patients. *Lab Med* **2016**; 47(3):213–219.

180. **Fraser CG, Petersen PH.** Analytical performance characteristics should be judged against objective quality specifications. *Clin Chem* **1999**; 45:321–323.
181. **Cerioti F, Fernandez-Calle P, Klee GG, Nordin G, Sandberg S, Streichert T, et al.** Criteria for assigning laboratory measurands to models for analytical performance specifications defined in the 1st EFLM strategic conference. *Clin Chem Lab Med* **2017**; 55:189–94.
182. **Aarsand A, Roraas T, Sverre S.** Biological variation- reliable data is essential. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53(2):153–4.
183. **Carobene A.** Reliability of a biological variation data available in an online data- base: need for improvement. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53:801–7.
184. **Miller WG, Bruns DE, Hortin GL, Sandberg S, Aakre KM, McQueen MJ, et al.** Current issues in measurement and reporting of urinary albumin excretion. *Clin Chem* **2009**; 55:24–38.
185. **Carobene A, Braga F, Roraas T, Sandberg S, Bartlett WA.** A systematic review of data on biological variation for alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and gamma-glutamyl transferase. *Clin Chem Lab Med* **2013**; 51:1997–2007.
186. **Perich C, Minchinela J, Ricos C, Calle PF, Alvarez V, Domenech MV, et al.** Biological variation database: structure and criteria used for generation and update. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53(2):299-305.
187. **Bartlett WA, Braga F, Carobene A, et al.** A checklist for critical appraisal of studies on biological variation. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53:879–85.
188. **Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, et al.** STARD 2015: an updated list of essential items for reporting diagnostic accuracy studies. *BMJ* **2015**; 351: h5527.
189. **Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwiq LM, et al.** Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. Standards for Reporting of Diagnostic Accuracy. *Clin Chem* **2003**; 49(1):1–6.
190. **Simundic A, Kackov S, Miler M, Fraser CG, Petersen PH.** Terms and symbols used on studies of biological variation: the need for harmonisation. *Clin Chem* **2015**; 61:438–9.
191. **Plebani M, Padoan A, Lippi G.** Biological variation: back to basics. *Clin Chem Lab Med* **2015**; 53(2):155–156
192. **Aarsand AK, Roraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Diaz-Garzon J, Jonker N, et al.** The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: a standard for evaluating studies on biological variation. *Clin Chem* **2018**; 64:501–14.
193. **Carobene A, Strollo M, Jonker N, Barla G, Bartlett WA, Sandberg S, et al.** Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* **2016**; 54:1599–608.
194. **Bailey D, Bevilacqua V, Colantonio DA, Pasic MD, Perumal N, Chan M, et al.** Pediatric within-day biological variation and quality specifications for 38 biochemical markers in the CALIPER cohort. *Clin Chem* **2014**; 60:518–29.

195. **Cembrowski GS, Tran DV, Higgins TN.** The use of serial patient blood gas, electrolyte and glucose results to derive biological variation: a new tool to assess the acceptability of intensive care unit testing. *Clin Chem Lab Med* **2010**; 48:1447–54.
196. **Clinical and Laboratory Standards Institute. Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory; Approved Guideline.** 3th Ed. CLSI document C28-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; **2008**



EKLER

EK-1. Etik kurul onay formu

T.C. ÇUKUROVA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Toplantı Sayısı	Tarih
63	14 Nisan 2017

KARAR NO 5- Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, Nefroloji Bilim Dalı'nın, Biyoistatistik Anabilim Dalı'nın bilimsel işbirliğiyle, Doç. Dr. Özlem Görüröğlü Öztürk yönetiminde, Prof. Dr. Saime Paydaş'ın, Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu'nun katkılarıyla, Araş. Gör. Dr. Nevin Ünler tarafından yürütülmesi öngörülen, "Hemodiyaliz Hastalarında Serum Kemik Belirteçlerinin Biyolojik Varyasyonu ve Referans Değişim Değeri" başlıklı tıpta uzmanlık tez projesi araştırma etiği yönünden değerlendirildi. Toplantıya katılan üyelerin oybirliğiyle uygun olduğuna karar verildi. Projede yardımcı araştırmacı olarak yer alan etik kurul üyesi Prof. Dr. Gülşah Seydaoğlu oylamaya katılmadı.

BAŞKAN	Doç Dr Selim Kadioğlu Tıp Tarihi ve Etik Anabilim Dalı	
ÜYELER	Prof Dr Davut Alptekin Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı	
	Prof Dr Dinçer Yıldızdaş Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	
	Prof Dr Mehmet Kanadaşı Kardiyoloji Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Prof Dr Gülşah Seydaoğlu Biyoistatistik Anabilim Dalı	Oylamaya katılmadı
	Prof Dr Gürhan Sakman Genel Cerrahi Anabilim Dalı	
	Doç Dr Suat Gezer Göğüs Cerrahisi Anabilim Dalı	Toplantıya Katılmadı
	Av. Zehra Bulut Hukukçu Üye	
	Dr Neşe Kayrın Kurum Dışı Üye	Toplantıya Katılmadı

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası, Balcalı 01330 Adana
Telefon: 0322 338 60 60 dahili 3465, Faks: 0322 338 67 22

EK-2. Cochran testi için kritik değerler tablosu.

0,05 anlamlılık düzeyi için kritik değerler														
<i>Df</i>	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	17	37	145	∞
2	.9985	.9750	.9392	.9057	.8772	.8534	.8332	.8159	.8010	.7880	.7341	.6602	.5813	.5000
3	.9669	.8709	.7977	.7457	.7071	.6771	.6530	.6333	.6167	.6025	.5466	.4748	.4031	.3333
4	.9065	.7679	.6841	.6287	.5895	.5598	.5365	.5175	.5017	.4884	.4366	.3720	.3093	.2500
5	.8412	.6838	.5981	.5441	.5065	.4783	.4564	.4387	.4241	.4118	.3645	.3066	.2513	.2000
6	.7808	.6161	.5321	.4803	.4447	.4184	.3980	.3817	.3682	.3568	.3135	.2612	.2119	.1667
7	.7271	.5612	.4800	.4307	.3974	.3726	.3535	.3384	.3259	.3154	.2756	.2278	.1833	.1429
8	.6798	.5157	.4377	.3910	.3595	.3362	.3185	.3043	.2926	.2862	.2462	.2022	.1616	.1250
9	.6385	.4775	.4027	.3584	.3286	.3067	.2901	.2768	.2659	.2568	.2226	.1820	.1446	.1111
10	.6020	.4450	.3733	.3311	.3029	.2823	.2666	.2541	.2439	.2353	.2032	.1655	.1308	.1000
12	.5410	.3924	.3264	.2880	.2624	.2439	.2299	.2187	.2098	.2020	.1737	.1403	.1100	.0833
15	.4709	.3346	.2758	.2419	.2195	.2034	.1911	.1815	.1736	.1671	.1429	.1144	.0889	.0667
20	.3894	.2705	.2205	.1921	.1735	.1602	.1501	.1422	.1357	.1303	.1108	.0879	.0675	.0500
24	.3434	.2354	.1907	.1656	.1493	.1374	.1286	.1216	.1160	.1113	.0942	.0743	.0567	.0417
30	.2929	.1980	.1593	.1377	.1237	.1137	.1061	.1002	.0958	.0921	.0771	.0604	.0457	.0333
40	.2370	.1576	.1259	.1082	.0968	.0887	.0827	.0780	.0745	.0713	.0595	.0462	.0347	.0250
60	.1737	.1131	.0895	.0765	.0682	.0623	.0583	.0552	.0520	.0497	.0411	.0316	.0234	.0167
120	.0998	.0632	.0495	.0419	.0371	.0337	.0312	.0292	.0279	.0266	.0218	.0165	.0120	.0083
∞	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000	.0000

EK-3. Kikare (χ^2) Dağılım tablosu.

Df										
	0.995	0.99	0.975	0.95	0.9	0.1	0.05	0.025	0.01	0.05
1	-	-	-	-	0.02	2.71	3.84	5.02	6.64	7.88
2	0.01	0.02	0.05	0.10	0.21	4.61	5.99	7.38	9.21	10.60
3	0.07	0.12	0.22	0.35	0.58	6.25	7.82	9.35	11.35	12.84
4	0.21	0.30	0.48	0.71	1.06	7.78	9.49	11.14	13.28	14.86
5	0.41	0.55	0.83	1.15	1.61	9.24	11.07	12.83	15.09	16.75
6	0.68	0.87	1.24	1.64	2.20	10.65	12.59	14.45	16.81	18.55
7	0.99	1.24	1.69	2.17	2.83	12.02	14.07	16.01	18.48	20.28
8	1.34	1.65	2.18	2.73	3.49	13.36	15.51	17.54	20.09	21.96
9	1.74	2.09	2.70	3.33	4.17	14.68	16.92	19.02	21.67	23.59
10	2.16	2.56	3.25	3.94	4.87	15.99	18.31	20.48	23.21	25.19
11	2.60	3.05	3.82	4.58	5.58	17.28	19.58	21.92	24.73	26.76
12	3.07	3.57	4.40	5.23	6.30	18.55	21.03	23.34	26.22	28.30
13	3.57	4.11	5.01	5.89	7.04	19.81	22.36	24.74	27.69	29.82
14	4.08	4.66	5.63	6.57	7.79	21.06	23.69	26.12	29.14	31.32
15	4.60	5.23	6.26	7.26	8.55	22.31	25.00	27.49	30.58	32.80
16	5.14	5.81	6.91	7.96	9.31	23.54	26.30	28.85	32.00	34.27
17	5.70	6.41	7.56	8.67	10.09	24.77	27.59	30.19	33.41	35.72
18	6.27	7.02	8.23	9.39	10.87	25.99	28.87	31.53	34.81	37.16
19	6.84	7.63	8.91	10.12	11.65	27.20	30.14	32.85	36.19	38.58
20	7.43	8.26	9.56	10.85	12.44	28.41	31.41	34.17	37.57	40.00
21	8.03	8.90	10.28	11.59	13.24	29.62	32.67	35.48	38.93	41.40
22	8.64	9.54	10.98	12.34	14.04	30.81	33.92	36.78	40.29	42.80
23	9.26	10.20	11.69	13.09	14.85	32.01	35.17	38.08	41.64	44.18
24	9.89	10.86	12.40	13.85	15.66	33.20	36.42	39.36	42.98	45.56
25	10.52	11.52	13.12	14.61	16.47	34.38	37.65	40.65	44.31	46.93
26	11.16	12.20	13.84	15.38	17.29	35.56	38.89	41.92	45.64	48.29
27	11.81	12.88	14.57	16.15	18.11	36.74	40.11	43.19	46.96	49.65
28	12.46	13.57	15.31	16.93	18.94	37.92	41.34	44.46	48.28	50.99
29	13.12	14.26	16.05	17.71	19.77	39.09	42.56	45.72	49.59	52.34
30	13.79	14.95	16.79	18.49	20.60	40.26	43.77	46.98	50.89	53.67
40	20.71	22.16	24.43	26.51	29.05	51.81	55.76	59.34	63.69	66.77
50	27.99	29.71	32.36	34.76	37.69	63.17	67.51	71.42	76.15	79.49
60	35.53	37.49	40.48	43.19	46.46	74.40	79.08	83.30	88.38	91.95
70	45.28	45.44	48.76	51.74	55.33	85.53	90.53	95.02	100.43	104.22
80	51.17	53.54	57.15	60.39	64.28	96.58	101.88	106.63	112.33	116.32
90	59.20	61.75	65.65	69.13	73.29	107.57	113.15	118.14	124.12	128.30
100	67.33	70.07	74.22	77.93	82.36	118.50	124.34	129.56	135.81	140.17

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Nevin Yılmaz
Doğum Tarih ve Yeri : 20.05.1985, Kozan/ADANA
Medeni Durumu : Bekar
Adres : Kışla Mh. 4525 Sk. DG16 B Blk. K:6 No: 13
Sarıçam/ADANA
Telefon : 05536369291
E. posta : yilmaznevin2016@gmail.com
Mezun Olduğu Tıp Fakültesi : Kahramanmaraş Sütçü İmam Üniversitesi
Tıp Fakültesi, 2011
Görev Yerleri : Karakoyunlu Toplum Sağlığı Merkezi, Iğdır Devlet
Hastanesi, Özel Marash Life Hospital Hastanesi,
ÇÜTF Tıbbi Biyokimya AD
Dernek Üyelikleri : Türk Biyokimya Derneği
Türk Klinik Biyokimya Derneği
Yabancı Dil : İngilizce