



T. C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**11-DEOKSİKORTİZOL ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY  
VE SIVI KROMATOĞRAFI-TANDEM KÜTLE  
SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Hatice BARAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

**Konya, 2014**

T. C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

**11-DEOKSİKORTİZOL ÖLÇÜMÜNDE İMMUNOASSAY  
VE SIVI KROMATOĞRAFI-TANDEM KÜTLE  
SPEKTROMETRE (LC-MS/MS) METODLARININ  
KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Hatice BARAN**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**Tez Danışmanı**

**Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından 13102023 proje numarası ile desteklenmiştir.

**Konya, 2014**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı' na

Hatice BARAN tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Biyokimya Anabilim Dalında Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği / oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: “Prof. Dr. Ali ÜNLÜ” İmza  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

Üye: “Prof. Dr. İ. Özkan ALATAŞ” İmza  
Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

Üye: “Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK” İmza  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

Üye: “Doç. Dr. Hümevra YERLİKAYA” İmza  
Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Tıbbi  
Biyokimya

Üye: “Yrd. Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE” İmza  
Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Mezuniyet Sonrası Eğitim Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca; yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Fakülte Yönetim Kurulu ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

İmza  
PROF.DR. OKTAY SARI

Dekan



## **ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Bölümü Anabilim Dalı Başkanı ve tez danışmanım Prof. Dr. Ali ÜNLÜ hocama eğitim sürecimdeki katkıları, bize sunduğu fırsatlar, tecrübelerini paylaştığı ve tez dönemindeki yardımları için teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK, Yrd. Doç. Dr. Esmâ Menevşe ve Yrd. Doç. Dr. Hüsâmettin Vatansev eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Laboratuvarımızda birlikte çalıştığım tüm mesai arkadaşlarıma her zaman yanımda oldukları için teşekkür ederim.

Yrd. Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstermeleri için teşekkür ederim.

Asistanlığım döneminde hep yanımda olduğu ve tez dönemindeki yardımları için Arş. Gör. Fatmagül GÜN'e teşekkür ederim.

Her zaman yanımda olan ailemede teşekkürü borç bilirim.

Arş. Gör. Dr. Hatice BARAN

## İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR.....	i
KISALTMALAR.....	v
1. GİRİŞ ve AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2. 1. Adrenal Korteks.....	3
2. 1. 1. Adrenal Korteks Anatomik Yapısı .....	3
2. 1. 2. Adrenal Korteks Hormonları ve Sentezi .....	3
2. 1. 2. 1. Mineralokortikoidler .....	5
2. 1. 2. 2. Glukokortikoidler.....	7
2. 1. 2. 3. Adrenal Androjenler .....	10
2. 1. 3. Adrenal Steroidlerin Metabolizması .....	12
2. 2. 11-Deoksikortizol .....	12
2. 2. 1. 11-Deoksikortizolün Dolaşımı .....	15
2. 2. 2. 11-Deoksikortizolün Metabolizması.....	16
2. 2. 3. 11-Deoksikortizol Ölçümü .....	17
2. 2. 4. Serum veya Plazma 11-Deoksikortizol Ölçümünün Klinik Kullanımı .....	18
2. 2. 4. 1. Metirapon Testi .....	18
2. 2. 4. 2. Konjenital Adrenal Hiperplazi.....	20
2. 3. Metot Validasyonu ve Doğrulanması .....	25
2. 3. 1. Doğruluk (Accuracy) .....	27
2. 3. 2. Kesinlik (Precision) .....	29
2. 3. 3. Analitik Sensitivite (Analitik duyarlılık).....	30
2. 3. 4. Analitik spesifiklik (analitik özgüllük) .....	30
2. 3. 6. Tayin Limiti .....	31
2. 3. 7. Recovery (Geri Elde).....	31
2. 3. 8. İnterferans.....	32
2. 3. 9. Taşıma (Carryover) .....	32
2. 3. 10. Matriks Etkisi .....	32
2. 3. 11. Yöntem Karşılaştırma .....	34
2. 3. 12. Referans Aralığı Doğrulama.....	34
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	35
3. 1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler .....	35
3. 1. 1. Kullanılan Cihazlar .....	35

3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler.....	35
3. 2. 11-Deoksikortizol LC-MS/MS Ölçümü.....	36
3. 2. 1. 11-Deoksikortizol Ölçümü için LC-MS/MS Cihazında Metot Geliştirme .....	36
3. 2. 2. 11-Deoksikortizol Standart Hazırlanışı .....	38
3. 2. 3. 11-Deoksikortizol- <b>D5</b> İnternal Standart Hazırlanışı.....	39
3. 2. 4. Mobil Faz Hazırlanışı.....	40
3. 2. 5. LC-MS/MS Yönteminde Precursor ve Product İyon Seçimi.....	40
3. 2. 5. 1. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri .....	43
3. 2. 5. 2. LC-MS/MS Yönteminde Örnek Hazırlama Prosedürü.....	46
3. 2. 5. 3. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması.....	47
3. 3. 11-Deoksikortizol ELISA Ölçümü .....	47
3. 3. 1. 11-Deoksikortizol ELISA Kiti Test Prensipleri .....	47
3. 3. 2. 11-Deoksikortizol ELISA Kitindeki Reaktiflerin Hazırlanması.....	48
3. 3. 3. 11-Deoksikortizol ELISA Kitindeki Standartları Hazırlama.....	48
3. 3. 4. 11-Deoksikortizol ELISA Kiti Çalışma Prosedürü.....	49
3. 4. 11-Deoksikortizol RIA Ölçümü.....	49
3. 4. 1. 11-Deoksikortizol RIA Kiti Test Prensipleri .....	49
3. 4. 2. 11-Deoksikortizol RIA Kiti Çalışma Prosedürü.....	50
3. 5. İstatistiksel Analiz.....	50
4. BULGULAR.....	51
4. 1. Metot Validasyon Parametreleri.....	51
4. 1. 1. Doğrusallık (Linearite) Çalışması .....	51
4. 1. 2. Tayin Limitlerini Belirleme Çalışması.....	53
4. 1. 3. Kesinlik (Tekrarlanabilirlik) Çalışması .....	54
4. 1. 3. 1. Çalışma İçi Kesinlik Çalışması.....	55
4. 1. 3. 2. Çalışmalar Arası Gün İçi Kesinlik Çalışması.....	58
4. 1. 3. 3. Günler Arası Kesinlik Çalışması.....	61
4. 1. 4. Recovery (Geri Elde) Çalışması.....	65
4. 1. 5. Matriks Etkisi Çalışması .....	66
4. 1. 6. Carryover (Taşıma) Çalışması .....	68
4. 1. 7. İnterferans Çalışması.....	70
4. 1. 8. Numune Stabilitesi Çalışması .....	73
4. 1. 9. Don-Çöz Çalışması .....	74
4. 1. 10. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması .....	75

4. 1. 10. 1. LC-MS/MS ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması .....	76
4. 1. 10. 3. LC-MS/MS ve RIA Yöntemlerinin Karşılaştırılması.....	80
4. 1. 11. Referans Aralığı Doğrulama Çalışması.....	82
<b>5. TARTIŞMA</b> .....	<b>83</b>
<b>6. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	<b>90</b>
7. KAYNAKLAR .....	91
8. ÖZET .....	97
9. SUMMARY .....	98
10. ÖZGEÇMİŞ .....	99



## **KISALTMALAR**

**CV:** Coefficient of Variation

**%R:** Yüzde Recovery

**µL:** Mikrolitre

**µg/dL:** Mikrogram/desilitre

**µg/L:** Mikrogram/Litre

**11-DOC:** 11-Deoksikortikosteron

**17-KGS:** 17-Ketojenik Steroidler

**17-OHCS:**17-Hidroksikortikosteroidler

**17-OHP:** 17-Alfa-Hidroksiprogesteron

**3-beta-HSD:** 3-beta-Hidroksisteroid Dehidrogenaz

**ACTH:** Adrenokortikotropik Hormon

**ADH:** Antidiüretik Hormon

**AR:** Androjen Reseptörü

**BSA-PBS:** Bovine Serum Albumin-Phosphate Buffered Saline

**CAD:** Collision Gas

**CBG:** Kortikosteroid Bağlayıcı Globülin

**CE:** Collision Energy

**CLIP:** Corticotropin-Like Intermediate Peptid

**CLSI:** Clinical and Laboratory Standards Institute

**COX-2:** Siklo-Oksijenaz 2

**CRH:** Kortikotropin Salgılatıcı Hormon

**CUR:** Curtain Gas

**CXP:** Collision Cell Exit Potential

**CYP21:** 21-Alfa-Hidroksilaz

**DAX-1:** X kromozom gen 1

**DHEA:** Dehidroepiandrosteron

**DHEA-S:** Dehidroepiandrosteron Sülfat

**DP:** Declustering Potential

**E2:** Ösradıol

**ELISA:** Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

**EP:** Entrance Potential

**ESI:** Elektrosprey İyonizasyon

**FDA:** Food and Drug Administration

**FSH:** Folikül Uyarıcı Hormon

**g:** Gram

**GR:** Glukokortikoid Reseptörü

**GS 1:** Ion Source Gas1

**GS 2:** Ion Source Gas2

**HAMA:** Human Anti-Mouse Antibody

**HDL:** Yüksek Dansiteli Lipoprotein

**HPLC:** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

**HRP:** Horseradish Peroksidaz

**HSD11B2:** 11-Beta-Hidroksisteroiddehidrojenaz 2

**HSL:** Hormona Duyarlı Lipaz

**IS:** Ionspray Voltage

**iNOS:** İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentaz

**JP:** Joining Peptide

**KAH:** Konjenital Adrenal Hiperplazi

**Kb:** Kilobaz

**LC-MS/MS:** Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometresi

**LDL:** Düşük Dansiteli Lipoprotein

**LH:** Luteinize edici Hormon

**LOB:** Limit of Blank

**LOD:** Limit of Detection

**LOQ:** Limit of Quantitation

**m/z:** Kütle/yük

**MC2R:** Melanokortin-2 Reseptörü

**mg/kg:** miligram/kilogram

**MR:** Mineralokortikoid Reseptörü

**MRM:** Multiple Reaction Monitoring

**MSH:** Melanosit-Stimulan Hormon

**NFkappaB:** Nuclear Factor kappaB

**N-POC:** Pro-opiocortin

**PAM:** Peptidylglycine Alpha-amidating Mono-oxygenase

**PC1/3:** Subtilisin-like Proprotein Convertase

**PC1:** Prohormone Convertase-1

**PC2:** Prohormone Convertase-2

**pg/ml:** Pikogram/mililitre

**POMC:** Pro-opiomelanokortin

**Q:** Quadrupole

**RIA:** Radyoimmünoassay

**SD:** Standart Deviation

**SF-1:** Steroidogenetik Faktör-1

**SHBG:** Seks Hormonu Bağlayıcı Globülin

**StAR:** Steroidojenik Akut Regülatör Protein

**TEa:** Toplam İzin Verilen Hata

**TEM:** Temperature

**THF:** Tetrahidrokortizol

**THS:** Tetrahidrodeoksikortizol

**VLDL:** Çok Düşük Dansiteli lipoprotein

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

11-deoksikortizol, adrenal bezde kortizol sentezi sırasında kortizolden hemen önceki basamakta yer almaktadır. 11-deoksikortizol, adrenal bezde endoplazmik retikulumda 17-alfa-hidroksiprogesteronun (17-OHP), 21-alfa-hidroksilazı (CYP21) ile oluşmaktadır. Oluşan 11-deoksikortizol mitokondriye göç etmektedir. Mitokondride 11-deoksikortizol CYP11B1'in 11-beta-hidroksilaz aktivitesiyle kortizole dönüştürülmektedir.

11-deoksikortizol ölçümünde sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS), radyoimmünoassay (RIA) ve enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yöntemleri kullanılmaktadır. Rutin kullanımda RIA ağırlıklı metodların kullanıldığı gözlenirken son yıllarda gelişen teknoloji ile kütle spektrometrik analizlerinde kullanılabildiğini görmekteyiz.

Serum veya plazma 11-deoksikortizol ölçümleri konjenital adrenal hiperplazinin ikinci en sık formu olan 11-beta-hidroksilaz eksikliğini tespit etmek için ya da metirapon testinin parçası olarak kullanılmaktadır.

Metot validasyonu ile analitik hatalar saptanır, tanımlanır ve değerlendirilir. Rastgele hatalar, sistematik sabit hatalar ve sistematik orantılı hataların tespiti için deneyler yapılır. Rastgele hatalar için ön çalışma olarak çalışma içi ardışık ölçüm, kapsamlı çalışma olarak çalışmalar arası tekrarlı ölçümler yapılmaktadır. Sistematik sabit hatalar için ön çalışma olarak interferans çalışmaları, sistematik orantılı hatalar için ön çalışma olarak geri kazanım çalışmaları yapılmaktadır. Sistematik sabit ve orantılı hatalar için kapsamlı çalışma olarak yöntem karşılaştırma çalışmaları yapılmaktadır.

11-beta-hidroksilaz eksikliğinde saptanabilen 17-OHP düzeyindeki orta seviyeli artış 11-beta-hidroksilaz eksikliğinin atlanmasına neden olabilmektedir (Peter ve ark 1999). 11-deoksikortizol ve 11-deoksikortikosteron (11-DOC) seviyeleri ölçülmemişse 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı konabilmektedir (Honour ve ark 1983). 11-beta-hidroksilaz eksikliği olan vakaların yenidoğan döneminde tanı alması için ve yanlışlıkla 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı almaması için 11-deoksikortizol ölçümü önemlidir. Kütle spektrofotometrik 11-deoksikortizol ölçümleri referans yöntem olarak kabul edilmektedir. LC-MS/MS ile analizin

yapılması hassasiyeti arttırması yanında 11-deoksikortizol yanısıra 17-OHP ve kortizol düzeylerinin de tek ölçümde saptama imkanı verecektir. Günümüzdeki rutin uygulamada ise her bir parametre ayrı olarak immünassay ağırlıklı metodlar ile ölçülmektedir. Her bir analitin kendi ölçüm belirsizliği tüm steroidler değerlendirildiğinde yüksek olabilmektedir.

Bu çalışmada LC-MS/MS yöntemi ile 11-deoksikortizol testi için metod geliştirme çalışması yapılmıştır. LC-MS/MS yönteminin ELISA ve RIA gibi immünassay yöntemleriyle kıyaslaması yapılmıştır.

## **2. GENEL BİLGİLER**

### **2. 1. Adrenal Korteks**

#### **2. 1. 1. Adrenal Korteks Anatomik Yapısı**

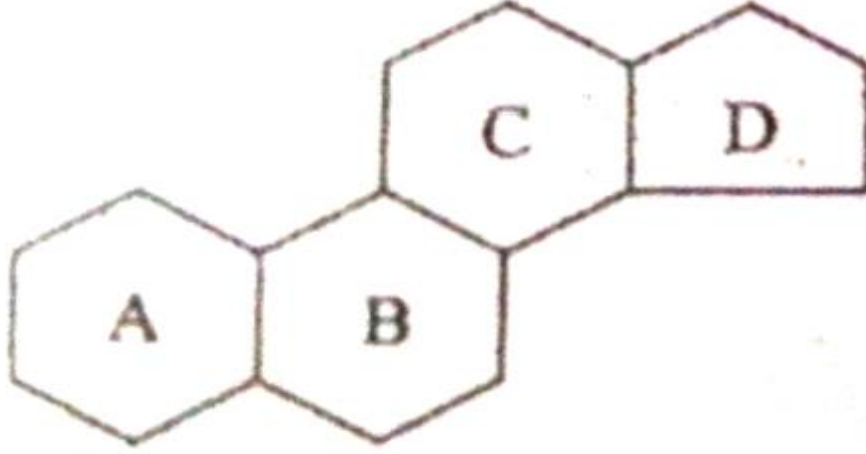
Adrenal bezler, her bir böbreğin üst ucunda bulunduğundan böbrek üstü bezleri olarak da adlandırılırlar. Retroperitoneal yerleşim gösterirler ve fibröz bir kapsülle çevrilidirler. Adrenal bezler piramit şeklindedir ve ortalama 2-3 cm genişliğinde, 4-6 cm uzunluğunda, 1 cm kalınlığındadırlar. Adrenal bezleri besleyen başlıca arterler, inferior frenik arter, renal arterler ve aorttur. Organa gelen arterler kapsülün altında arteriyel bir pleksus oluşturur ve sonra korteks ve medüllaya giren, her bezde tek bir santral vene drene olan sinüzoidal sisteme girer. Sağ adrenal ven direkt olarak sağ inferior vena kavanın posterior yüzüne dar bir açıyla direne olurken sol adrenal ven sol renal vane direne olur.

X kromozom gen 1 (DAX-1) üzerindeki, steroidogenetik faktör-1 (SF-1) ve dosage-sensitive sex reversal-adrenal hypoplasia congenita (AHC) adrenal korteks gelişiminde iki önemli transkripsiyon faktörleridir. SF-1, DAX-1'i düzenler.

Histolojik olarak, erişkin adrenal korteks 3 zondan oluşur. En dışta zona glomeruloza, ortada zona fasikülata, en içte zona retikularis yer alır. Zona fasikülata olgun adrenal korteksin %75'ini, zona glomeruloza %10-15'ini, zona retikularis %5-10'unu oluşturur [Bertholf ve ark 2012]. Yetişkin adrenal bezlerin her biri 4-6 gramdır [Bertholf ve ark 2012].

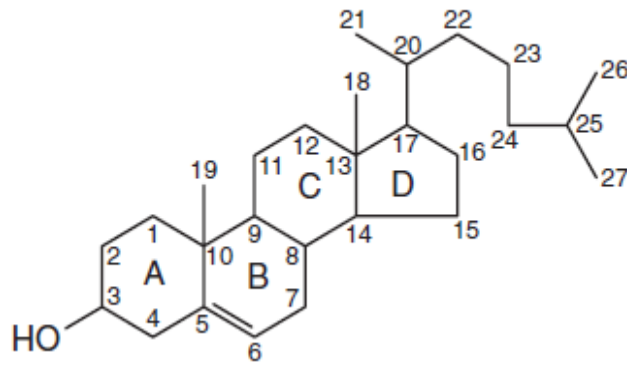
#### **2. 1. 2. Adrenal Korteks Hormonları ve Sentezi**

Adrenal korteks tarafından üretilen belli başlı hormonlar; mineralokortikoidler, glukokortikoidler ve adrenal androjenlerdir. Bu hormonların öncül maddesi kolesteroldür. Steroidlerin iskeletini, siklopentanoperhidrofenantren halkası oluşturur (Şekil 2. 1.). Bu yapıyı, üç tane 6 karbonlu sikloheksan halkasının (A,B ve C) oluşturduğu fenantren halkaya 1 tane 5 karbonlu siklopentan halkanın (D) bağlanması oluşturur.  $C_{17}$ 'ye bağlı 8-10 karbonlu bir yan zincir ve  $C_3$ 'e bağlı bir hidroksil grubuna sahip steroidler steroller olarak sınıflandırılır. Kolesterol hayvan dokularındaki başlıca steroldür.



**Şekil 2. 1.** Siklopentanoperhidrofenantren halkası Bu halkayı, üç tane 6 karbonlu sikloheksan halkasının (A,B ve C) oluşturduğu fenantren halkaya 1 tane 5 karbonlu siklopentan halkanın (D) bağlanması oluşturur. ([194.27.141.99/dosya-depo/ders.../arzu.../ADRENAL%20KORTEKS.ppt](#) Erişim Tarihi 2014).

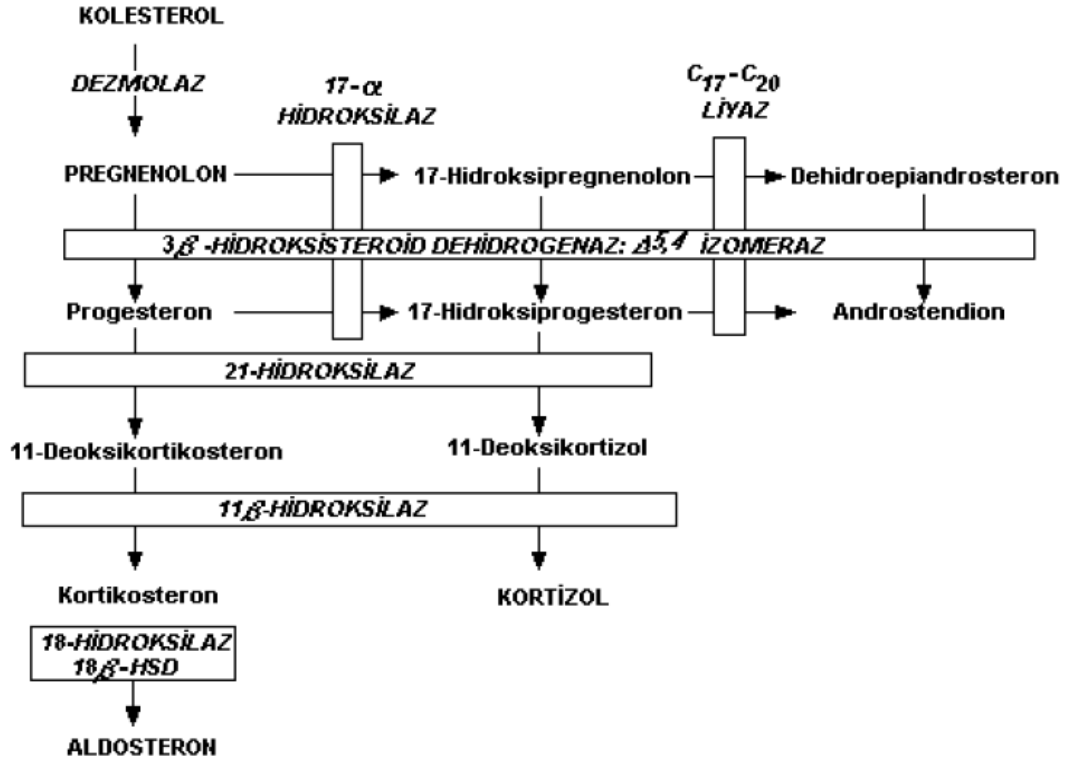
Kolesterol, 5 ve 6 karbonu arasında bir çift bağ ve 17. pozisyonunda bir sekiz karbonlu alifatik yan grup ihtiva eder (Şekil 2. 2.). Kolesterol, tüm insan steroid hormonların öncül maddesidir.



**Şekil 2. 2.** Kolesterol yapısı. Kimyasal adı; 10,13-dimethyl-17-(6-methylheptan-2-yl)-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol. Kimyasal formülü  $C_{27}H_{46}O$ 'dur. Kolesterol, 5 ve 6 karbonu arasında bir çift bağ ve 17. pozisyonunda bir sekiz karbonlu alifatik yan grup ihtiva eder. (Bertholf RL, Jialal I, Winter WE. The Adrenal Cortex. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. United States of America, Elsevier, 2012, p.1848.)



İnsanlarda, kolesterol besin kaynakları ve de novo sentezinden elde edilir ve çoğunlukla düşük dansiteli lipoproteinlerde (LDL) taşınır. Mineralokortikoid, glukokortikoid, androjen ve östrojenlerin sentezi kolesterolden gerçekleşir. Şekil 2. 3. de adrenal kortekste kolesterolden mineralokortikoid, glukokortikoid ve androjenlerin sentezi şematize edilmektedir.



Şekil 2. 3. Adrenal kortekste kolesterolden mineralokortikoid, glukokortikoid ve androjenlerin sentezi. ([www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=2033](http://www.mku.edu.tr/getblogfile.php?keyid=2033) Erişim tarihi 2014)

### 2. 1. 2. 1. Mineralokortikoidler

Temel mineralokortikoid hormon aldosterondur. Mineralokortikoid etkinliği olan diğer bileşikler, 11-desoksikortikosteron, kortikosteron ve kortizoldür.

### Mineralokortikoidlerin sentezi

Adrenokortikotropik hormona (ACTH) yanıt olarak kolesterol esteraz ile steroid üreten hücrelerin sitoplazmasında bulunan kolesterol esterleri hidrolize olarak kolesterole serbestleşir. Sterol transfer protein, kolesterolün dış mitokondriyal membrandan mitokondriyal intermembranal alana transportunu sağlar. 30 kDa steroidojenik akut regülatör protein (StAR), kolesterolün mitokondriyal

intermembranal alandan mitokondri içine geçişini gerçekleştirir (Miller, 2008]. Mitokondri içine StAR aracılıklı kolesterol transportu steroid hormon sentezinde hız sınırlayıcı basamaktır. ACTH'ın reseptörüne bağlanmasına cevap olarak cAMP konsantrasyonunun artması StAR sentezini artırır. Mitokondride kolesterol pregnenolona CYP11A (P450ssc)'nin 20,22-desmolaz (20,22-liyaz) aktivitesiyle dönüştürülür. Pregnenolon mitokondriden endoplazmik retikulumun lümenine geçer. Zona glomerulozada CYP17 (P450c17) aktivitesi olmadığından, pregnenolon progesterona sitokrom P450 enzim ailesinden olmayan 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaz tip 2 (3 beta-HSD) tarafından dönüştürülür. Bu dönüşüm 5. pozisyondan 4. pozisyona çift bağ taşıyan delta-(5)-ketosteroid izomeraz aktivitesi gerektirir. Çift bağ lokalizasyonuna göre pregnenolon, 17-alfa-hidroksipregnenolon ve dehidroepiandrosteron (DHEA), delta-(5)-steroidler ve 17-alfa-hidroksiprogesteron (17-OHP) ve androstenedion ise delta-(4)-steroidler olarak da anılmaktadırlar.

Zona glomerulozada CYP21'in 21-alfa-hidroksilaz fonksiyonu tarafından progesteron, 11-DOC'a dönüştürülür. Oluşan 11-DOC yeniden mitokondriye girmektedir. Son olarak, CYP11B2, 11-DOC'un aldosterona dönüşümünü katalize etmektedir. Aldosteron, mitokondriden sitoplazmaya sonra hücre membranını geçerek interstisyuma çıkar ve oradan da dolaşıma salınmaktadır. Aldosteron sekresyon hızının 200 µg/24 saate kadar ulaşabildiği tahmin edilsede, sekresyon hızı 100 µg/24 saat ile 150 µg/24 saat arasındadır (Bertholf ve ark 2012). Böylece miktar bazında aldosteron sekresyonu yaklaşık kortizol sekresyonunun onda birine denk gelmektedir. Aldosteronun dolaşımdaki yarı ömrü 15 dakikadan daha azdır (Bertholf ve ark 2012).

CYP11A, CYP17 ve CYP11B1, ACTH kontrolü altında iken, CYP11B2 ağırlıklı olarak anjiyotensin II ile kontrol edilmektedir. Bu şekilde, aldosteron sentezinin kontrolü çoğunlukla ön hipofizden bağımsızdır. Zona glomerulozada CYP17 (P450c17) aktivitesi olmadığından kortizol ve androjenlerin üretimi yoktur.

### **Mineralokortikoidlerin fonksiyonu ve regülasyonu**

Mineralokortikoidler, distal kıvrımlı tübülde, nefronun kortikal toplayıcı kanallarında, kolonda ve tükürük bezlerinde bulunan mineralokortikoid reseptörüne (MR) bağlanarak sodyum emilimini ve potasyum, hidrojen iyonu atılımını

artırmaktadırlar (Yang ve Young 2009). Diğer steroid hormonları ve tiroid hormonu reseptörlerine benzerdir, MR bir transkripsiyon faktörü olarak işlev görmektedir. MR'nin kortizol ve 11-DOC'a bağlanma afinitesi aldosterona bağlanma afinitesine eşittir. Ancak 11-Beta-hidroksisteroiddehidrojenaz 2 (HSD11B2), kortizol ve 11-DOC'un MR'ye bağlanmasını kortizolü kortizona dönüştürerek engellemektedir. Kortizon MR'ye bağlanamamaktadır. HSD11B2 varyasyonlarında bazı durumlarda esansiyel hipertansiyon söz konusu olabilmektedir (Ferrari ve Krozowski 2000).

Aldosteron salınımının en önemli düzenleyicileri renin-anjiyotensin sistemi ve serum potasyum düzeyidir. Renin-anjiyotensin sistemi daha çok intravasküler hacim değişimlerine cevap olarak zona glomerulozaya etki etmektedir. ACTH ve antidiüretik hormon (ADH), aldosteron salınımı üzerinde sadece kısa süreli olarak etki göstermektedir. ACTH StAR ekspresyonunu artırmak, ADH ise zona glomerulazadaki kendine ait reseptörlere etki etmek suretiyle aldosteron salınımını artırmaktadırlar. Aldosteron sentezini ve salınımını kontrol eden anjiyotensinin kronik yüksekliği, miyokard fibrozisi ve böbrek damarında inflamatuvar değişikliklere yol açarak kalp ve böbrekte patolojik değişiklikler oluşturmaktadır (Kai ve ark 2009).

## **2. 1. 2. 2. Glukokortikoidler**

En etkin glukokortikoid kortizoldür. Metaboliti olan kortizon ikinci derecede önemlidir. Zona glomerulozadan salınmasına rağmen kortikosteron da aktif bir glukokortikoiddir.

### **Glukokortikoidlerin sentezi**

Dolaşımdaki ACTH konsantrasyonlarında ki artış dakikalar içinde kortizol üretimini artırmaktadır. Zona fasikülatada, CYP17 (P450c17) 17-alfa-hidroksilaz fonksiyonu ile, pregnenolonu 17-alfa-hidroksipregnenolona dönüştürmektedir (Miller ve ark 1997). CYP17, adrenal androjenlerin oluşumu için önemli olan 17,20-liyaz aktivitesi içermektedir. 3-beta-HSD ve delta(5)-4-izomeraz, sonraki 17-hidroksipregnanolonun 17-OHP'ye dönüşümünü katalize etmektedir. Mitokondrinin dışında gerçekleşen son basamak, 17-OHP'yi 11-deoksikortizole dönüştüren 21-alfa-hidroksilaz aktivitesi gösteren CYP21 gerektirmektedir. 11-deoksikortizol mitokondriye girer orada CYP11B1, 11-beta-hidroksilaz aktivitesiyle 11-deoksikortizolün kortizole dönüşümünü katalizlemektedir. Çok az CYP11B2 aktivitesi zona fasikülatada görülmektedir (Bertholf ve ark 2012). Son olarak

kortizolde aldosteron gibi hücreden çıkarak dolaşıma salınmaktadır. Normal kortizol sekresyon hızı 6-14 mg/m<sup>2</sup>/24 saattir (Bertholf ve ark 2012). Yetişkinde toplam kortizol sentezi yaklaşık 10-20 mg/gün, bazen 25 mg/gün kadar yükselebilmektedir (Bertholf ve ark 2012).

### **Glukokortikoidlerin fonksiyonu ve regülasyonu**

Glukokortikoidler, lenfositler, hepatositler ve kemik dahil olmak üzere bir çok dokuda bulunan glukokortikoid reseptörlere (GR) bağlanmaktadır (Biddie ve Hager 2009). Glukokortikoidler, glukoneogenez enzimlerinin sentezini arttırarak kan glikoz konsantrasyonlarını hızla yükseltir, glikojen sentazı aktive ve glikojen fosforilazı inhibe ederek karaciğer glikojen içeriğini arttırır ve hem kas hemde adipoz dokuda insülin direnci oluşturarak kan glikoz seviyesini daha fazla yükseltmektedirler. İskelet kasının aşırı katabolizması miyopatiye sebep olur ve bunun sonucunda kas güçsüzlüğü oluşmaktadır. Protein katabolizması deride incelmeye ve bağ dokularında güç kaybına neden olmaktadır. Glukokortikoid fazlalığında, kollajen katabolizması ve osteoid kaybından kaynaklanan kemik hasarı görülmektedir. Glukokortikoidler, boyun, gövde ve yüz merkezli adipoz dokunun yeniden dağılmasına, bu dokularda adiposit farklılaşmanın ve lipogenesizin artışına neden olmaktadır. İnsülin direnci, çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve trigliserid seviyelerini yükseltir ve yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) düzeyini düşürmektedir. Adipoz dokuda ki hormona duyarlı lipaz (HSL) aktivitesinin insülin direnci sebebiyle azalması trigliseridin serbest yağ asitlerine yıkılımına ve karaciğerde serbest yağ asitlerinin artışına yol açar buda hepatik trigliserid resentezi ve VLDL üretim ve taşınması için substrat sağlamaktadır. Glukokortikoidler iştahı arttırır ve bir sonraki basamak kalori alımının artışına bağlı kilo artışına neden olmaktadır.

Glukokortikoidler, sitoplazmik GR'ye bağlandığında, ısı şok proteinleri (HSP70 ve HSP90) salınmaktadır (De Bosscher ve ark 2009). Glukokortikoidler, İkappaB sentezinin indüksiyonu ile nuclear factor kappaB'yi (NFkappaB) inhibe eden güçlü bir anti-inflamatuar hormonlardır (Fong ve ark 2010). İkappaB, sitoplazma içinde NFkappaB'ye bağlanır, NFkappaB'nin çekirdeğin içine girişini azaltmaktadır. Çekirdeğin içinde, GR-kortizol kompleksi NFkappaB'ya bağlanarak onun DNA'ya bağlanmasını önlemektedir. Son olarak, çekirdek içinde, GR-kortizol

ve NFkappaB sınırlı miktarda mevcut olan kofaktörler için yarışmaktadırlar. IkappaB sentezinin artırmasına ilave olarak birçok proinflamatuvar genide baskılamaktadır, örneğin siklo-oksijenaz 2 (COX-2), indüklenbilir nitrik oksit sentaz (iNOS), çeşitli interlekinler (IL-1, IL-2 ve IL-6), tümör nekroz faktörü-alfa, interferon-gama ve E-selektin. Glukokortikoidler, vasküler tonusun, kardiyak outputun ve lizozomal membranın stabilitesinin korunmasına yardım etmektedir (Burry ve Wax 2004). Glukokortikoidler, bazofiller ve mast hücrelerinin histamin üretmesini inhibe ederek, hipersensitiviteyi bastırmaktadır. Glukokortikoid düşük dozlarda kişinin ruh halini iyileştirebilir, ancak farmakolojik konsantrasyonlarda, psikoza neden olabilmektedir (Bertholf ve ark 2012).

Stres, egzersiz ve hipoglisemi kortikotropin salgılatıcı hormon (CRH) salınımına yol açmaktadır. Fizyolojik stres örnekleri ağrı, travma, cerrahi ve kanama iken psikolojik stres örnekleri ise şiddetli anksiyete ve majör depresyondur. Suprafizyolojik dozlarda uzun süreli oral veya parenteral glukokortikoid uygulanması, hipotalamus-hipofiz-adrenal aksı bastırarak adrenal atrofiye yol açmaktadır. Bunun bir sonucu olarak, eksojen steroidlerin alımının aniden sonlandırılması akut ve muhtemelen yaşamı tehdit eden glukokortikoid yetmezliğine yol açabilmektedir.

CRH, hipotalamusun paraventriküler nükleusları tarafından üretilir. Prohormone convertase-1 (PC1) ve Prohormone convertase-2 (PC2), 196 amino asit içeren preprohormonun C-terminal tarafından, 43 amino asit içeren CRH prekürsörünü ayırmaktadır. Peptidylglycine alpha-amidating mono-oxygenase (PAM), iki C-terminal kalıntısını kaldırır ve bir amin grubu ekler 41 amino asit içeren polipeptid yapıda ki CRH'ı üretmektedir. Hipotalamik sekresyon sonrasında, CRH, hipotalamik hipofiz portal sistemi ile ön hipofiz bezine ulaşmaktadır (Papadimitriou ve Priftis 2009). CRH'dan daha az seviyede olmak birlikte ADH stimülasyonunda, ACTH salgılatmaktadır. Proinflamatuvar sitokinler IL-1, IL-6 ve tümör nekroz faktör-alfada ACTH salınımını uyarmaktadır. CRH-R1 ve CRH-R2 olmak üzere iki CRH reseptörü vardır. CRH-2'nin üç varyantı (CRH-2alpha, CRH-2beta ve CRH-2gamma) bulunmaktadır. CRH'ın kortikotroflar üzerindeki etkilerine sadece CRH-R1 aracılık etmektedir. CRH reseptörleri merkezi sinir sisteminde yaygın olarak bulunmaktadır.

ACTH, proteoliz ile 266 amino asitten oluşan pro-opiomelanokortinden (POMC) ayrılmaktadır ( Krieger ve ark 1980, Imura ve ark 1981). POMC, 32 kDa'lık öncül bir proteindir (Krieger ve ark 1980, Imura ve ark 1981). POMC geni, kromozom 2p23 üzerindedir ve 8 kilobazçifti (kb) büyüklüğündedir (Krieger ve ark 1980, Imura ve ark 1981). POMC, subtilisin-like proprotein convertase (PC1/3) tarafından iki parçaya bölünür: 22 kDa pro-ACTH ve işlevi tam olarak anlaşılamamış beta-lipotropin ( 42-134 amino asitler). Sonra, PC1/3, pro-ACTH'dan ACTH (1-39 amino asitler ) ayırmaktadır. Kalan N-terminal parça, pro-gamma melanosit-stimulan hormon (MSH) ve bir joining peptide (JP) olarak iki parçaya ayrılmaktadır. Hipotalamus, deri ve orta lobdaki melanotroflardaki PC2, pro-opiocortindan (N-POC) gamma-MSH'ı; ACTH'dan alfa-melanositstimulan hormonu (alpha-MSH; 1-13 amino asitler) ve corticotropin-like intermediate lobe peptid (CLIP; 18-39 amino asitler); ve beta-lipotropinden gamma-lipotropini (42-101 amino asitleri) ve beta-endorfini (104-134 amino asitleri) ayırmaktadır. Son olarak, beta-MSH (84-101 amino asitleri), gamma-lipotropinden PC2 tarafından üretilmektedir.

Sistemik dolaşımdaki ACTH, adrenal korteks içindeki hücreler üzerine yerleşmiş ACTH reseptörlerine bağlanmaktadır. ACTH reseptörü, G-proteini-bağlı melanokortin-2 reseptörüdür (MC2R; gen lokalizasyonu: kromozom 18p11.2) (Elias ve Clark 2000). İkinci haberci sistemleri adenil siklazı ve cAMP üretimini içermektedir. Artan cAMP ile protein kinaz A ve protein kinaz C aktive olur, bu aktivasyon ile hücrel organellerin işlevsel kapasitesi, boyutu artar ve adrenokortikal hücrelerin boyutu ve sayısı artar, bunlarda steroidogeneze yol açmaktadır. Adrenal korteks üzerine ACTH biyokimyasal etkileri; anında ACTH, StAR aracılığıyla kolesterol esteraz aktivitesini artırır; kolesterol ester sentezini azaltır; mitokondriye kolesterol transportunu artırır; pregnenolonun sentezini arttırmaktadır. Transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu yoluyla, CYP11A, CYP17 ve CYP11B1 ifade edilmesini ve LDL reseptörünü arttırmaktadır. ACTH ve daha tanımlanamamış diğer faktörler adrenal androjen sentezini kontrol etmektedir.

### **2. 1. 2. 3. Adrenal Androjenler**

DHEA, dehidroepiandrosteron sülfat (DHEA-S) ve androstenedion adrenal korteks kaynaklı androjenlerdir.

## **Adrenal Androjenlerin sentezi**

Adrenal androjen sentezinin anatomik lokasyonu hakkında ki tartışmalar devam etmektedir (Rainey ve Nakamura 2008). Geleneksel olarak, adrenal androjenlerin özellikle zona retikularisinde sentezlendiği bilinmektedir. Bununla birlikte, 17-hidroksilaz aktivitesi daha önce tarif edilmiş CYP17 proteinin 17,20-liyaz (17,20-desmolaz) enzimatik aktivitesi, 17-alfa-hidroksipregnanolonu DHEA'ya, 17-OHP'yi androstenediona dönüştürmektedir. Bu nedenle, androjenler, teorik olarak, zona fasikülata ve zona retikularisin her ikisinin de içinde sentezlenebilir. Bununla birlikte, zona retikularisinde adrenal androjen sentezinin predominansı, CYP17'nin 17,20-liyaz aktivitesini arttıran sitokrom $b_5$  sentezinin fazlalığından kaynaklanabilmektedir (Bertholf ve ark 2012). CYP17'nin 17,20-liyaz aktivitesi C21 steroidleri C19 steroidlere dönüştürmektedir. Aynı şekilde, zona retikularisinde kortizol sentezini engelleyen bir şey yoktur. DHEA, DHEA sülfotransferaz (SULT2A1; gen lokalizasyonu: kromozom 19q13.3) tarafından DHEAS'a çevrilmektedir.

Adrenal androjenlerin sentezi mitokondride bulunan CYP21, CYP11B1 veya CYP11B2 gerektirmediğinden adrenal androjenlerin sentezi endoplazmik retikulum içinde tamamlanmaktadır.

Bir miktar testosteron, adrenal korteks tarafından üretilmektedir. DHEA, 3-beta HSD ve delta(4)-5-izomeraz ile androstenediona dönüştürülür.

Adrenal korteksin ana ürünü adrenal androjenlerin toplam sentezi 20 ile 25 mg/gün'ü aşmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Bir yetişkinde DHEA, DHEA-S, androstenedion ve testosteronun sekresyon hızı sırasıyla 6-8 mg/gün, 8-16 mg/gün, 1,5 mg/gün, 0,05 mg/gündür (Bertholf ve ark 2012). Estradiol ve östronun sadece küçük miktarları ve progesteronun önemsiz miktarı ve diğer prekürsör steroidler üretilmektedir.

## **Adrenal androjenlerin fonksiyonu ve regülasyonu**

Adrenal androjenler, DHEA, DHEA-S ve androstenedion periferde testosterona dönüşerek androjenik etkilerini gösterirler ve androjen reseptörüne (AR) bağlanmaktadır (Kerkhofs ve ark 2009). 7-8 yaşları arasında, 17-ketosteroid (adrenal androjenlerin yıkım ürünleri) idrar atılımının artması ergenliğin önümüzdeki 3 ila 5

yıl içinde başlayacağını erken bir işaretidir (Orentreich ve ark 1984). Erkeklerde, DHEA ve androstenedion gibi adrenal androjenlerin önemi azdır çünkü testosteron en önemli androjendir. Ancak, adrenal androjenler pubertal ve yetişkin kadınlarda önemlidir çünkü aksiller ve pubik kıllanmayı sağlamaktadır.

Hayat boyunca DHEA-S'in dolaşımdaki konsantrasyonu DHEA'dan fazladır, örneğin DHEA'nın referans aralığı erkekte 180-1250 ng/dL, DHEA-S'in referans aralığı erkekte 125-619 µg/dL'dir (Bertholf ve ark 2012).

Adrenal androjen sentezi ve salgılanmasının düzenlenmesi yeterince anlaşılammıştır. Bir hipofiz adrenal androjen-uyarıcı hormon veya kortikal androjen-uyarıcı hormon varlığı yıllardır araştırılmasına rağmen hala şüphelidir (Havelock ve ark 2004). En iyi karakterize edilmiş androstendion ve DHEA sekresyon düzenleyicisi ACTH'dır. CYP17, ACTH tarafından düzenlenirken bu durum şaşırtıcı değildir. Adrenal androjen konsantrasyonlarının diurnal ritmi kortizol değişimleriyle paralellik göstermektedir. Bununla birlikte erkek ve kız çocuklarında prepubertal ve pubertal adrenal androjen sentezindeki normal artış, adrenal androjenlerin ACTH regülasyonu ile açıklanamaz çünkü ACTH puberte öncesi artmamaktadır. Kanıtlar, zona retikularisin sempatik invazyonun bulunduğu ve adrenal androjen salgısını düzenlediğine işaret etmektedir (Bertholf ve ark 2012).

### **2. 1. 3. Adrenal Steroidlerin Metabolizması**

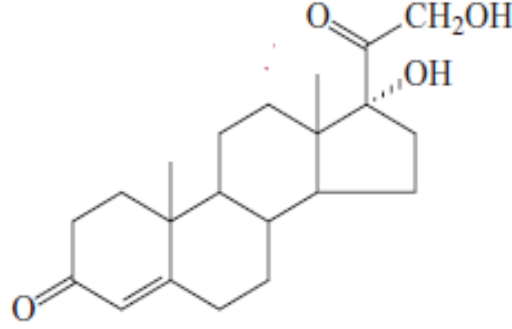
Karaciğer P450 enzim sistemlerinden dolayı steroid metabolizmasında önemli bir yer tutar, böbreğin metabolik rolü çok az iken atılımlarında önemli bir rolü bulunmaktadır (Andrew 2001). Steroid hormonların atılımının içerdiği basamaklar; hidrosilasyon, dehidrojenasyon, çift bağların indirgenmesi ve sülfat veya glukuronid grupları ile konjugasyondur. Steroidlerin indirgenmesi onların çözünürlüğünü artırır ve onların sülfat veya glukuronik asitlerle konjugasyonu için fonksiyonel bölgeler gerekmektedir (örneğin hidroksil grubu); bu onların idrarda ki çözünürlüğünü artırmakta, onların atılımını hızlandırmaktadır. Konjuge steroidlerin yaklaşık % 90'ını böbrek tarafından atılmaktadır.

### **2. 2. 11-Deoksikortizol**

11-deoksikortizol, adrenal bezde kortizol sentezi sırasında kortizolden hemen önceki basamakta yer almaktadır. Diğer adı "Compound S" dir. Moleküler ağırlığı



346,46 g/mol'dür. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{30}O_4$ dur. 11-deoksikortizol, pregnenolondan C-17, C-21 karbonlarının hidroksilasyonu, C-3'ün yükseltgenmesi ve C-4'ü C-5'e bağlayan çift bağı izomerizasyonunu ile oluşmaktadır (Şekil 2. 4.).

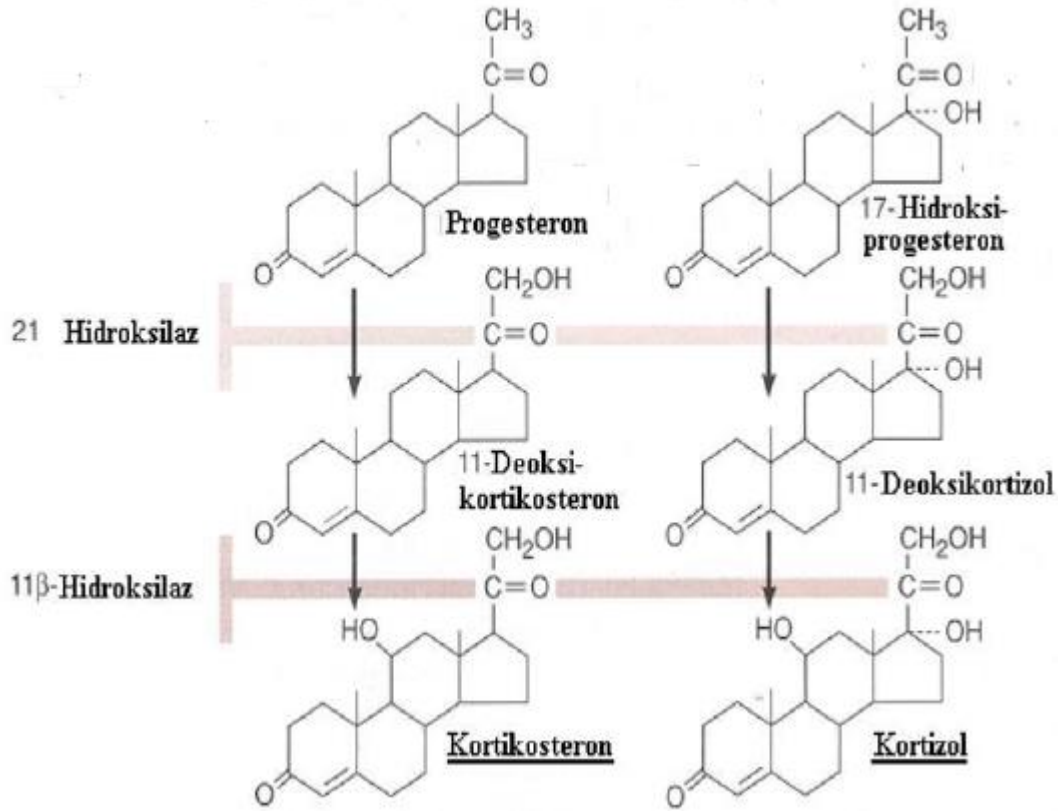


**Şekil 2. 4.** 11-Deoksikortizol. Kimyasal formülü  $C_{21}H_{30}O_4$ dur. 11-deoksikortizol, pregnenolondan C-17, C-21 karbonlarının hidroksilasyonu, C-3'ün yükseltgenmesi ve C-4'ü C-5'e bağlayan çift bağı izomerizasyonunu ile oluşmaktadır. (Bertholf RL, Jialal I, Winter WE. The Adrenal Cortex. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE, editors. Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics. 5th ed. United States of America, Elsevier, 2012, p.1855.)

11-deoksikortizol, adrenal bezde endoplazmik retikulumda 17-OHP'nin CYP21 tarafından 21-alfa-hidroksilazı ile oluşmaktadır (Şekil 1. 4.). CYP21 proteinini kodlayan CYP21 geni kromozom 6q21.3 yerleşimlidir (Bertholf ve ark 2012). CYP21 enzimi P450c21 olarak adlandırılmaktadır ve 21-alfa-hidroksilaz fonksiyonuna sahiptir. Adrenal kortekste tüm zonlarda yer almaktadır.

Oluşan 11-deoksikortizol mitokondriye geç etmektedir. Mitokondride 11-deoksikortizol CYP11B1'in 11-beta-hidroksilaz aktivitesiyle kortizole dönüştürülmektedir (Şekil 2. 5.). 11-beta-hidroksilazın CYP11B1 (P450c11) ve CYP11B2 (P450aldo) şeklinde iki izoenzimi bulunmaktadır (Nimkarn ve New 2008). P450c11 ve P450aldo sırasıyla kortizol ve aldosteron biosentezinden sorumlu iç mitokondriyal membranın matriks yüzünde yer alan sitokrom P450 ailesine ait enzimlerdir (Peter ve ark 1999). Her ikisinde 503 amino asit içeren rezidü olarak sentezlenir sonra bir sinyal peptid kesilerek 479 amino asit içeren matür protein oluşturulmaktadır (White ve ark 1994). Her iki protein dizelerinin % 93'ü aynıdır, P450c11 ve P450aldo 35 amino asitte farklılık göstermektedir (Mornet ve ark 1989). Zona retikularis ve zona fasikülata CYP11B1 (P450c11) 11-beta-hidroksilaz

fonksiyonu ile 11-deoksikortizolu kortizole, 11-DOC'u kortikosterona dönüştürmektedir (Arit ve Stewart 2005).



**Şekil 2. 5.** Adrenal kortekste 21-alfa-hidroksilaz enzimi progesteronu 11-DOC'a ve 17-OHP'yi 11-deoksikortizole dönüştürür, 11-beta-hidroksilaz enzimi ise 11-DOC'u kortikosterona ve 11-deoksikortizolu kortizole dönüştürür. (<http://tip.uludag.edu.tr/temel-tip-bilimleri/fizyoloji/ders-notlari/adrenal-korteks-hormonlari-mineralokortikoidler.pdf> Erişim Tarihi 2014.)

CYP11B2 zona glomerulozda eksprese edilmektedir (Nimkarn ve New 2008). CYP11B2 (P450aldo) 11-DOC'u kortikosterona dönüştüren 11-beta-hidroksilaz fonksiyonuna ilave aldosteron sentezinin diğer basamakları için gerekli olan 18-hidroksilaz ve 18-oksidaz fonksiyonlarınada sahiptir (Nimkarn ve New 2008). Anjiotensin II ve potasyum CYP11B2 aktivitesinin esas düzenleyicisidir; CYP11B1 ayrıca zona glomerulozda da eksprese edilir, ACTH kontrolü altında 11-DOC'u kortikosterona dönüştürmektedir (Nimkarn ve New 2008). Bu kortikosteron adrenal dışına salınmaktadır (Migeon ve Lanes 2007). Az miktarda CYP11B2 aktivitesi zona fasikülata da görülmektedir (Bertholf ve ark 2012). İnsanda 11-beta-hidroksilaz izoenzimlerini kodlayan iki genin lokalizasyonu 8q24.3'dür (Bertholf ve ark 2012). CYP11B1 geni P450c11 ve CYP11B2 geni P450aldo'yu kodlamaktadır.

Her iki gende ayrı ayrı yaklaşık 40 kb büyüklüğünde yer kaplamaktadır (Peter ve ark 1999). Her bir gen 7 kb büyüklüğünde 9 ekson içermektedir (Peter ve ark 1999). Her iki genin nükleotid dizelerinin %93'ü aynıdır ve yaklaşık %90 intronları da aynıdır (Peter ve ark 1999). CYP11B1 ekspresyonu primer olarak ACTH, G proteinine bağlı reseptöre bağlanmak suretiyle cAMP düzeyini artırarak kontrol etmektedir (Peter ve ark 1999). CYP11B2 başlıca anjiyotensin II ve potasyum tarafından düzenlenmektedir (Peter ve ark 1999). Her iki genin promotör bölgelerinin farklı olması transkripsiyonel seviyede her iki genin farklı düzenlendiğinin altını çizmektedir (Peter ve ark 1999).

### **2. 2. 1. 11-Deoksikortizolün Dolaşımı**

11-deoksikortizol plazmada proteine bağlı ve serbest şekillerde bulunmaktadır. Dolaşımdaki 11-deoksikortizolün büyük bir kısmı kortikosteroid bağlayıcı globülin ile bağlı biçimde taşınmaktadır (Dunn ve ark 1981). Kortikosteroid bağlayıcı globülin (CBG, transkortin), 58 kDa ağırlığında, 383 amino asit içeren alfa-1-globulindir (Hammond ve ark 1991, Rosner 1991). CBG, serin proteaz inhibitör süperfamilyasının bir üyesidir, özel olarak ise, SERPINA6'ıdır (A-alfa-1 antiproteaz soyundan antitripsin üyesi 6; gen lokalizasyonu: kromozom 14q3) (Law ve ark 2006). Karaciğerden sentez edilir ve plazma yarı ömrü yaklaşık 5 gündür. CBG her iki cinsiyet içinde kortizol, 11-deoksikortizol ve kortikosteron için majör transport proteindir ve üç hormonunda CBG'e bağlanma affiniteleri yaklaşık aynıdır, CBG'e bağlanan diğer steroid hormonlara göre en yüksek affinete bu üç hormon sahiptir (Dunn ve ark 1981). CBG konsantrasyonları östrojene yanıt olarak yükselmektedir (Bertholf ve ark 2012). Gebelikte, CBG iki üç kat artabilmektedir (Bertholf ve ark 2012). Kronik aktif hepatitli bazı hastalarda CBG konsantrasyonunda artış gözlemlenmektedir (Bertholf ve ark 2012). Bundan farklı olarak, CBG konsantrasyonu bazı durumlarda azalır, örneğin; nefroz (idrarda CBG kaybının bir sonucu olarak), siroz (üretimin azalması sonucu), hipertiroidizm (artmış metabolizma nedeniyle) ve glukokortikoid tedavisinde (muhtemelen katabolizmasının bir sonucu olarak) (Bertholf ve ark 2012). 11-deoksikortizol ikinci sıklıkta albümine daha az sıklıkta sex hormonu bağlayıcı globülin ile bağlı biçimde taşınmaktadır (Dunn ve ark 1981). 11-deoksikortizolün CBG'e bağlanma affinitesi seks hormonu bağlayıcı globüline bağlanma affinitesinden daha fazladır (Dunn ve ark 1981). Seks hormonu bağlayıcı globülin (SHBG), yaklaşık 100 kDa'lık bir

homodimerdir (Pugeat ve ark 1996). Her bir monomeri yaklaşık 50 kDa'dır (Pugeat ve ark 1996). SHBG, 373 amino asid içermektedir (Pugeat ve ark 1996). Gen lokalizasyonu kromozom 17p1'dir (Pugeat ve ark 1996). Östrojenler ve tiroid hormonları, SHBG konsantrasyonlarını artırırken, insülin, büyüme hormonu, glukokortikoidler, androjenler ve progesterinler SHBG konsantrasyonlarını azaltmaktadır (Bertholf ve ark 2012). SHBG konsantrasyonları çocuklarda yetişkinlere oranla daha yüksek saptanmaktadır (Bertholf ve ark 2012). 11-deoksikortizolün sağlıklı erkek, sağlıklı kadınlarda menstrüel luteal, foliküler fazlarda ve gebeliğin 3.trimestrinde CBG, SHBG, albümine bağlı ve serbest olan kısımlarının yüzde dağılımı Tablo 2. 1. de bulunmaktadır (Dunn ve ark 1981).

**Tablo 2. 1.** 11-deoksikortizolün sağlıklı erkek, sağlıklı kadınlarda menstrüel luteal, foliküler fazlarda ve gebeliğin 3.trimestrinde CBG, SHBG, albümine bağlı ve serbest olan kısımlarının yüzde dağılımı.

	SERBEST(%)	CBG(%)	ALBÜMİN(%)	SHBG(%)
SAĞLIKLI ERKEK	3,37	77,1	18,9	0,67
SAĞLIKLI KADIN FOLİKÜLER FAZ	3,24	77,1	18,1	1,57
SAĞLIKLI KADIN LUTEAL FAZ	3,33	76,4	18,7	1,60
SAĞLIKLI KADIN GEBELİĞİN 3.TRİMESTRİ	1,63	85	6,49	6,89

### 2. 2. 2. 11-Deoksikortizolün Metabolizması

Diğer steroid hormonlar gibi 11-deoksikortizolde karaciğerde metabolize edilmekte ve metabolitleri böbrek tarafından atılmaktadır. 5 $\beta$ -tetrahydro-11-deoksikortizol ve 5 $\alpha$ -tetrahydro-11-deoksikortizol 11-deoksikortizolün idrar metabolitleridir (Sone ve ark 2008).

11-deoksikortizol ve kortizol idrar metabolitleri 17-hidroksikortikosteroidler (17-OHCS) olarak sınıflandırılır. 17-OHCS ölçümleri, CYP11B1 eksikliğinden, CYP21 eksikliğini ayırt etmek için kullanılmaktadır. CYP21 eksikliğinde 11-

deoksikortizol ve kortizol her ikisi de düşük olduğundan, 17-OHCS yüksek olmamaktadır. Ancak, CYP11B1 eksikliğinde 11-deoksikortizol yüksek olduğundan, 17-OHCS, tedavi edilmemiş veya tedavisi yeterli gelmeyen CYP11B1 eksikliğinde yüksek olarak saptanmaktadır.

17-OHP, 11-deoksikortizol ve kortizolun oksidasyonu, 17 pozisyonunda bir keton grubu ile sağlandığından bu bileşiklerin idrar metabolitleri 17-ketojenik steroidlerdir (17-KGS). CYP17 eksikliğinde, 17-KGS yükselmiş olmamaktadır. Bununla birlikte, CYP21 ve CYP11B1 eksikliklerinin her ikisinde de, tedavi edilmemiş veya tedavinin yeterli gelmediği zaman, 17-KGS yükselmektedir.

### **2. 2. 3. 11-Deoksikortizol Ölçümü**

Serum veya plazma 11-deoksikortizol ölçümleri 11-beta-hidroksilaz eksikliğini tespit etmek için ya da metirapon testinin parçası olarak kullanılmaktadır. Metirapon, 11-beta-hidroksilaz enzimini inhibe eder ve normal hipofiz-adrenal rezervli hastalarda metirapon ile uyarıldıktan sonra plazma 11-deoksikortizol düzeyinde 40-80 kat artış görülmektedir. Bunun bir sonucu olarak, Metirapon testinde 11-deoksikortizol için kullanılacak analitik yöntemler yüksek hassasiyet gerektirmemektedir.

Plazma 11-deoksikortizolün direkt tespiti için Radyoimmunoassay yöntemler bulunmaktadır (Perry ve ark 1982).

11-deoksikortizol-3-karboksimetiloksim-BSA karşı ortaya çıkan antiserum, diğer adrenal steroidlere karşı çok az çapraz reaksiyon ile uygun bir özgüllük sağlamaktadır. Bazı radyoimmunoassay yöntemler bir ekstraksiyon adımı ya da kolon kromatografisi ya da her ikisini de içere bilmektedir (Demers ve ark 1979, Fernandes ve ark 2003). Serum 11-deoksikortizol ölçülmesi için tanımlanmış nonizotopik yöntemler; enzim içeren immunassayler (Kobayashi ve ark 1984, Lewis ve ark 1986), florimetrik yöntemler (Watanabe ve ark 1982, Fiet ve ark 2001), floresans polarizasyondur (Al-Ansari ve ark 1983). 11-deoksikortizol ölçümü için bir diğer yöntem, "open-sandwich enzyme immunoassay" iki klonlanmış antikor değişken bölgesinin bir köprü antijen tarafından yeniden birleştirilmesini temel almaktadır.

11-deoksikortizol ölçümü için sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometrisinde yöntemler tarif edilmiştir, çoğunlukla kortikosteroid profillerinin bir parçası olarak ölçülmektedir (Guo ve ark 2006, Cho ve ark 2009, Rauh 2009, Rossi ve ark 2010). Bu yöntemlerde en iyisi solid faz ekstraksiyon kullanılması olmasına rağmen bir organik çözücü içerisinde sıvı-sıvı ekstraksiyonda kullanılabilir (Cho ve ark 2009).

Kord kanında 11-deoksikortizolün referans aralığı 2.95-5.54 mikrogram/Litre ( $\mu\text{g/L}$ ), çocuk ve yetişkinde ki referans aralığı ise 0.2-1.58  $\mu\text{g/L}$ 'dir (Bertholf ve ark 2012).

11-deoksikortizol ölçümü için kullanılan yöntemlerin çoğunda, serum kullanılmasına rağmen plazma ve idrarda kullanılabilir. Depolanan örneklerde 11-deoksikortizol istikrarı üzerinde literatürde veriler eksiktir (Bertholf ve ark 2012).

#### **2. 2. 4. Serum veya Plazma 11-Deoksikortizol Ölçümünün Klinik Kullanımı**

Serum veya plazma 11-deoksikortizol ölçümleri 11-beta-hidroksilaz eksikliğini tespit etmek için ya da metirapon testinin parçası olarak kullanılmaktadır.

##### **2. 2. 4. 1. Metirapon Testi**

Hipotalamus-hipofiz-adrenal aksın fonksiyonun indirekt değerlendirilmesine olanak sağlayan daha az riskli olan bu test, primer ve sekonder adrenal yetmezlik tanısında kullanılabilir (Bertholf ve ark 2012). Metirapon, 11-deoksikortizolü kortizole dönüştüren 11-beta-hidroksilazın inhibitörüdür (Berneis ve ark 2002). Metirapon testine normal cevap alınması hipotalamik hipofizer aksın strese normal yanıt verdiğini gösterir ve insülinin uyardığı hipoglisemiye yanıt vermeyeyle tam korele bulunmaktadır (Wang 2005). Primer adrenal yetmezlik şüphesi kuvvetli olan hastalarda metirapon testi yapılmamalı, kısa ACTH testi tercih edilmelidir (Wang 2005). Bu hastalarda kortizol üretiminin bastırılmasının adrenal krizi tetikleyeceğinden korkulmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Metirapon testinin en çok kullanıldığı yer sekonder adrenal yetmezlik düşünülen ama ACTH testine normale yakın cevap veren hastalardır (Akarsu ve ark 2011). Ayrıca Cushing sendromunun sebebinin belirlenmesinde de yardımcı olabilmektedir (Bertholf ve ark 2012).

## **Bir gecelik tek doz metirapon stimülasyon testi için protokol**

### **Gerekçe**

Metirapon, kortizol sentezinden hemen önceki basamağı katalize eden 11-beta-hidroksilaz (CYP11B1) enzimini inhibe eder. Kortizol kan konsantrasyonunun azalması, negatif geribildirim ile hipofiz bezinden ACTH salınmasına neden olmaktadır. ACTH'ın adrenal korteks üzerine uyarıcı etkisi biyosentez yolağında kortizolden hemen önceki 11-deoksikortizolde bir artışa yol açmaktadır.

### **Prosedür**

Metirapon (30 miligram/kilogram (mg/kg) vücut ağırlığı), gece yarısı ağızdan süt veya bir atıştırma ile verilir (Roger ve ark 2012). Sonra ertesi sabah saat 08:00 de 11-deoksikortizol, kortizol ve ACTH konsantrasyonlarının belirlenmesi için kan alınmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Fenitoin kullananlar, metiraponu hızlı metabolize edenler ve %4 kadar sağlıklı insanlarda yeterince enzim inhibisyonu olmamasına bağlı yanlış sonuç çıkabilmektedir, bunu önlemek için eşzamanlı kortizol ölçümü yapılmaktadır (Akarsu ve ark 2011). Sabah kortizolünün < 10 mikrogram/desilitre ( $\mu\text{g}/\text{dl}$ ) olması yeterli inhibisyon demektir (Akarsu ve ark 2011).

### **Değerlendirilmesi**

Normal kişilerde, metirapon uyarısından sonra serum 11-deoksikortizol düzeyi artar ve 7  $\mu\text{g}/\text{dl}$  düzeyini geçmektedir, ACTH değerleri 150 pikogram/mililitre ( $\text{pg}/\text{ml}$ )'yi aşmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Metirapon testine anormal cevap primer adrenal yetersizliği sekonder adrenal yetmezlikten ayırmasa da ACTH'a cevap veren ama metirapona cevap vermeyen olgularda sekonder adrenal yetmezlik kuvvetle düşünülmelidir (Fisher ve Carlton 2006). Metirapon sonrası serum kortizolünün azalması, adrenokortikal neoplazmlı (adenoma veya karsinoma) hastalarda kronik hipofizer kortikotrop supresyona bağlı, serum 11-deoksikortizol konsantrasyonunda akut bir artış görülmemektedir (Fisher ve Carlton 2006). ACTH salgılayan tümör nedenli Cushing sendromunda teste yanıt olmaması veya yetersiz yanıt görülmektedir (Bertholf ve ark 2012). Hipofizer Cushing sendromunda aşırı cevap gözlenebilmektedir (Bertholf ve ark 2012). Addison hastalığı olan hastalarda metirapona yanıt olarak 11-deoksikortizol seviyesinde yetersiz bir artış olduğu söylenmektedir (Bertholf ve ark 2012).

## 2. 2. 4. 2. Konjenital Adrenal Hiperplazi

Konjenital adrenal hiperplazi (KAH), yenidoğanlarda adrenokortikal yetmezliğin en sık görülen nedenidir (White ve ark 1987). Ancak KAH genelde adrenal androjenlerin aşırı üretilmesine yol açtığından, adrenal hormon aşırı üretim sendromları altında tartışılmıştır. Böylece, daha önceden belirtildiği gibi KAH, kortizol eksikliği (hipofonksiyon) ve adrenal androjen fazlalığının (hiperfonksiyon) birlikte olduğu bir tablodur.

KAH'da kortizol sentezinden sorumlu olan belirli adrenokortikal enzimlerde fonksiyon kaybına neden olan mutasyonlar görülmektedir (Antal ve Zhou 2009). Otozomal resesif kalıtılmaktadırlar. Nadiren, yenidoğanda travmatik adrenal kanama veya sepsis nedenli adrenal kanamada adrenal yetmezliğe neden olmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Kolesterolün kortizole dönüşümü için gerekli bu altı enzimde eksiklikler görülmektedir: CYP11A (20,22-desmolaz; 20,22-liyaz diye de adlandırılır), CYP17 (17-alfa-hidroksilaz), 3-beta-hidroksisteroid dehidrogenaz, delta (4)-5-izomeraz, CYP21 (21-alfa-hidroksilaz) ve CYP11B1 (11-beta-hidroksilaz).

21-alfa-hidroksilaz eksikliği (CYP21 eksikliği), 11-beta-hidroksilaz eksikliği (CYP11B1) KAH'ın en yaygın iki nedenidir. Toplam KAH vakalarının %95'i 21-alfa-hidroksilaz eksikliğidir, kalan KAH vakalarının çoğunda 11-beta-hidroksilaz eksikliğidir (Roger ve ark 2012). 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinin genel popülasyonda insidansı yaklaşık 14000 canlı doğumda birdir (Pang ve ark 1988). Batı toplumlarında 21-alfa-hidroksilaz eksikliği KAH insidansı canlı doğumda 1/5000 ile 1/15000 arasında değişmektedir. Yenidoğanlarda 21-alfa-hidroksilaz eksikliği ve 11-beta-hidroksilaz eksikliği için yapılan taramalarda 17-OHP ölçülmesi Amerika Birleşik Devletleri ve diğer birçok ülkede standart bir uygulamadır (Hofman ve ark 1985, Speiser 2004, Van der Kamp ve Wit 2004, Spesier 2007). KAH taramalarında tandem kütle spektrometresi bazlı yöntemlerin steroid analizi için kullanılması yanlış pozitif 17-OHP sonuçlarını azaltmaktadır (Lacey ve ark 2004, Marsden ve Larson 2004).

Kortizol biyosentezindeki metabolik blok adrenal androjenler dahil prekürsörlerin birikimine yol açmaktadır (Migeon ve Donohoue 1991). Bu nedenle, kanda prekürsör steroidlerin ölçümü spesifik enzim eksikliklerinin tespiti ve kortizol replasman tedavisine yanıtı izlemek için faydalıdır. Parsiyel blok belirgin veya



hemen göze çarpmayan klinik bulgulara sebep olabildiği gibi enzimin tam blokajı hayatla bağdaşmamaktadır. KAH'ta, uterusu adrenal androjenlerin fazlalığı, dışı fetüste dış genitalyada virilizasyon ve ambigu genitalya oluşturmaktadır. KAH nadiren erkek cinsel gelişiminde yetersizliğe yol açar (3-beta-hidroksisteroid redüktaz eksikliğinde daha sonra görülür).

Etkilenen bireylerde kortizol eksikliği halsizlik, büyüme gelişme geriliğine, hipoglisemiye ve vasküler instabiliteye yol açmaktadır. 21-alfa-hidroksilaz eksikliği olan bebeklerin yaklaşık yarısında yetersiz kortizol üretimine ek olarak, yetersiz aldosteron üretimide görülmektedir bu da hiponatremi, hiperkalemi, asidoz, dehidratasyon ve hipotansiyona sebep olmaktadır (Bertholf ve ark 2012).

21-alfa-hidroksilaz eksikliğinin, enzim eksikliğinin şiddetine göre klasik tuz kaybettiren, basit virilizan ve geç başlangıçlı (non-klasik) olmak üzere üç farklı klinik tipi bulunmaktadır (Nimkarn ve ark 2011). KAH'lı vakalarda bazen genotip ile fenotip korelasyonu gözlenebilmektedir (Nimkarn ve ark 2011). 21-alfa-hidroksilaz-eksikliğinin klasik tuz kaybettiren tipinde büyük oranda geniş delesyonlar veya intron 2 mutasyonları tespit edilir ki, bu defekt sonucu hiç enzim aktivitesi izlenmez, basit virilizan tipinde %1-2 enzim aktivitesi vardır ve bu durum çoğunlukla nokta mutasyonlarından kaynaklanır (Nimkarn ve ark 2011). Non-klasik tipinde ise %20-60 oranında enzim aktivitesi mevcuttur ve bu vakalarda çoğunlukla birleşik heterozigottur (Speiser ve ark 1992).

Klasik tuz kaybettiren form, 21-alfa-hidroksilaz eksikliği KAH'ın en şiddetli olanıdır ve tüm olguların %66'sını oluşturmaktadır (Nimkarn ve ark 2011). Bu formda enzim aktivitesinin tamamen kaybı nedenli kortizol eksikliğine eşlik eden aldosteron eksikliği yaşamın 10-14. günlerinde adrenal kriz ile klinik bulgu vermektedir (Bertholf ve ark 2012). Tedavi edilmezse 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinin tuz kaybettiren formun mortalitesi çok yüksektir. 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinin tuz-kaybı ile seyretmeyen formları bilindiği gibi basit virilizasyon ile seyretmektedir. Bu formlardan basit virilizan form tüm olguların %30'unu oluşturmaktadır (Speiser ve ark 1992). Aldosteron eksikliği olmaksızın kortizol eksikliği ve androjen fazlalığına bağlı bulgular ön plandadır ve virilizasyonun derecesi enzim eksikliğinin şiddeti ve androjen yüksekliği ile paralel bulunmaktadır (Speiser ve ark 1992). Non-klasik ya da geç başlangıçlı formda ise enzimde kısmi

yetersizlik mevcuttur ve enzim aktivitesi %20-60 arasındadır (Speiser ve ark 1992). Bu formda ambigus genitalya görülmemektedir (Speiser ve ark 1992). Çocukluk çağında prematür pubarş, ileri kemik yaşı, adolesan kızlarda ve yetişkin kadınlarda hirsutizm, virilizasyon, oligomenore, amenore gibi adet düzensizlikleri, infertilite ve polikistik over sendromu görülebilmektedir (Chrous ve ark 1982, Labarta ve ark 2004). Bazı olgular semptom vermeyebilmektedir (Eugster ve ark 2001). Böylece, geç başlangıçlı 21-alfa-hidroksilaz eksikliği, prenatal başlangıçlı 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinin basit virilizan formundan daha hafif seyreder. Oysaki geç başlangıçlı 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde bazal ve ACTH sonrası 17-OHP konsantrasyonları kontrollerden daha yüksek, fakat klasik 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde görüldüğü kadar da yüksek saptanmamaktadır (Bertholf ve ark 2012). Gen taşıyıcılarda (heterozigot bireyler için wild-tip alel ve mutant alel) genellikle bazal 17-OHP konsantrasyonları normal ancak Kosintropine yanıt olarak 17-OHP aşırı yükselmektedir (Bertholf ve ark 2012).

Yenidoğanlarda KAH taraması için 17-OHP ölçümü yaygınlaşmadan önce KAH tanılı kız çocuklarının sayısı erkek çocuklarının sayısından fazla saptanmaktaydı (Pass ve Neto 2009). Tuz kaybettiren 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinden etkilenmiş fakat tanı almadan ölen erkek bebekler nedeniyle KAH tanılı erkek çocuk sayısı daha az saptanmaktaydı (Bertholf ve ark 2012). Ölüm nedeni adrenal kriz değil yanlışlıkla sepsis veya idiyopatik dehidratasyon olarak atfedilirdi. Şimdi yenidoğan KAH taraması ile, KAH erkek ve dişi insidansının yaklaşık eşit olduğu anlaşılmıştır, bu otozomal resesif geçişin bir özelliğidir (Bertholf ve ark 2012).

21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde ve 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde, ACTH fazlalığı ve kortizol biyosentezindeki metabolik blok, adrenal androjenler DHEA, DHEA-S ve androstenedionun fazla üretimi ile sonuçlanmaktadır (Merke ve Bornstein 2005). Adrenal androjen fazla üretimi uterusu dişi fetüste dış genitalyada virilizasyon ve ambigus genitalya oluşturmaktadır. Dişi fetüsteki virilizasyon evreleri, orta derece labial füzyondan kliteromegalinin eşlik ettiği belirgin labial füzyona, erkek dış genital görünümü tam maskülinizasyona (Not: Böyle yenidoğan yanlışlıkla inmemiş testisi olan erkek olarak ta kategorize edilebilir.) kadar değişebilmektedir (Bertholf ve ark 2012). Doğum sonrası, kız bebekler tedavi edilmezse virilizasyon devam etmektedir. Tuz kaybettiren 21-alfa-hidroksilaz

eksikliğinde tuz kaybettirmeyen 21-alfa-hidroksilaz eksikliğine göre kalıtsal sorun daha şiddetli ekspresse edildiğinden tuz kaybettiren 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde virilizasyon daha şiddetli olmaktadır.

Erkeklerde, adrenal androjen aşırı üretimi prekoks psödopuberteye ve erkek dış genital organlarında değişen derecelerde hiperpigmentasyona neden olmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Doğum sonrası, tedavi edilmezse erkeklerde ikincil cinsiyet özelliklerinin gelişimi ile erken başlangıçlı puberte oluşacak, onların büyüme hızındaki erken artış nedeni boyları uzayacak ancak epifizleri erken kapanacağından yaşlılarına göre boyları kısa olmaktadır (Hughes 2007). Kortizol biyosentezindeki daha büyük defekt, erkeklerdeki psödopuberte prekoks derecesini arttırmaktadır (Bertholf ve ark 2012). Testiküler büyümeninde kanıtladığı gibi gerçek prekoks puberte, luteinize edici hormon (LH) ve folikül uyarıcı hormon (FSH) tarafından başlatılmaktadır. Tersine KAH kaynaklı psödopubertede gerçek pubertede gözlenen testiküler büyüme görülmemektedir (Bertholf ve ark 2012).

KAH tiplerinden 11-beta-hidroksilaz eksikliği, 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinden sonra en sık görülmektedir. Tüm KAH'lı olguların %5-8'ini oluşturmaktadır ve insidansı 1/100000 dir (Miller ve ark 2008). Ancak Ortadoğu'da ve yahudilerde görülme sıklığının daha fazla olduğu ve %15'e kadar çıktığı bildirilmiştir ( White PC ve ark 1994). Ülkemizde yapılan bir çalışmada tüm KAH'lı olgular içinde 11-beta hidroksilaz eksikliği görülme oranı %13,5 olarak belirtilmiştir (Kandemir ve Yordam 1997). 11-beta-hidroksilaz eksikliğinin klasik ve klasik olmayan şeklinde iki tipi tanımlanmıştır.

CYP11B1 mutasyonlu 11-beta-hidroksilaz eksikliği vakalarında mineralokortikoid eksikliği görülmemektedir (Kelestimur 2006). 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde beklenen, zona glomerulozada 11-DOC, kortikosteron dönüşümünü esas olarak katalize eden CYP11B2 etkilenmemesidir. Ayrıca, yüksek ACTH düzeyinin, 11-DOC üretiminin uyarılmasını etkilediğinden 11-DOC seviyelerinin 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde yükselmiş olduğu bildirilmektedir (Nimkarn ve New 2008). CYP11B1 11-beta-hidroksilaz eksikliği kızlarda ambigu genitalyaya, erkeklerde psödopuberte prekoks neden olurken tuz kaybına neden olmamaktadır (Bertholf ve ark 2012). Bu yüzden, yenidoğan döneminde veya daha sonra elektrolit bozuklukları ve asidoz meydana gelmemekte, adrenal kriz görülmemektedir (Bertholf ve ark

2012). Klasik 11-beta hidroksilaz eksikliği olan hastaların yaklaşık üçte ikisinde hipokaleminin eşlik ettiği veya etmediği hipertansiyon görülebilmektedir (Peter ve ark 1999). Etkilenen yenidoğanların çoğunda hipertansiyon ve baskılanmış plazma renin aktivitesi yoktur, ancak yaşamlarının ilk yılı içinde gelişmektedir (Rösler ve ark 1982, Zachmann ve ark 1983). Hipertansiyon tedavi ile kontrol altına alınmazsa sol ventrikül hipertrofisi ve retinopati yanı sıra serebrovasküler apopleksi nedenli ölümler görülebilmektedir (Peter ve ark 1999). Hipertansiyona mineralokortikoid özellik gösteren 11-DOC düzeylerinde ki artışının neden olduğu belirtilmektedir (Peter ve ark 1999). Bu yüzden plazma renin aktivitesi baskılanır ve aldosteron sentezlenmesi ile ilgili bir problem olmamasına rağmen aldosteron düzeyleri düşük saptanmaktadır (Levine ve ark 1980). Tedaviden önce mineralokortikoid eksikliği belirtileri ile başvuran 11-beta-hidroksilaz eksikliği olan nadir vakalar bildirilmiştir ve bunun oluşum mekanizması tam olarak anlaşılammamaktadır (Zachmann ve ark 1983, Zadik ve ark 1984).

11-beta-hidroksilazın klasik olmayan formunda hastalar normal genital organlarla doğmaktadırlar ve çocukluk döneminde ise androjen fazlalığının belirtileri görülmektedir (Peter ve ark 1999). Yetişkin kadınlarda ise hirsutizm ve oligomenore şeklinde semptom vermektedir (Peter ve ark 1999). Ancak hirsutizmlili ve hiperandrojenik oligomenorik kadınların küçük bir persentilinde 11-beta-hidroksilaz eksikliği saptanmıştır (Carmina ve ark 1988, Joeher ve ark 1997). Bu formda olan hastalar normal kan basıncına sahiptirler (Peter ve ark 1999).

11-beta-hidroksilaz eksikliğinde bazal veya ACTH stimülasyonu sonrası yüksek serum 11-deoksikortizol ve 11-DOC seviyeleri saptanmıştır (Peter ve ark 1999). ACTH testi her zaman klasik 11-beta-hidroksilaz eksikliği tanısı için gerekli olmamaktadır çünkü bazal düşük kortizol seviyesi varlığında dahi büyük ölçüde 11-deoksikortizol ve 11-DOC bazal seviyeleri yüksek bulunmaktadır (Peter ve ark 1999). Bazı hastalarda 11-deoksikortizol veya 11-DOC'dan birisinin yüksek olabileceği belirtilmektedir (Zachmann ve ark 1983). Klasik olmayan 11-beta-hidroksilaz eksikliği olan hastalarda 11-deoksikortizol seviyeleri yüksek, 11-DOC seviyeleri ise yüksek veya düşük saptanabilmektedir (New 2003 ). Ayrıcı tanı için 24 saatlik idrar numunesinde 11-deoksikortizol ve 11-DOC'un tetrahidrometabolitlerin artışı kullanılabilir (Zachmann ve ark 1983, Wudy ve ark 1997). Biyokimyasal 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde 17-OHCS seviyeleri yüksek

saptanmaktadır (11-deoksikortizol yüksektir ve 17-OHCS'e katkıda bulunmaktadır), 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde ise 17-OHCS seviyeleri düşük saptanmaktadır (11-deoksikortizol ve kortizolün her ikisinde düşük olduğundan). 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde 11-deoksikortizol ve onun idrar metaboliti tetrahidrodeoksikortizol (THS) yüksektir, plazma 11-deoksikortizol plazma kortizol oranı ve bunların idrar metabolitlerinin yani THS'nin tetrahidrokortizol (THF)'e oranında yüksek tespit edilmektedir. 21-alfa-hidroksilaz eksikliğinde ise 11-deoksikortizol ve kortizolün her ikisinde sentezi bozulduğundan idrar THS/THF oranı yükselmemiştir. 11-beta-hidroksilaz eksikliğinde saptanabilen 17-OHP düzeyindeki orta seviyeli artış 11-beta-hidroksilaz eksikliğinin atlanmasına neden olabilmektedir (Peter ve ark 1999). 11-deoksikortizol ve 11-DOC seviyeleri ölçülmemişse 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı konabilmektedir (Honour ve ark 1983).

Bir ailede KAH tanısı alan ilk çocuktan sonraki gebeliklerde fetal DNA testi ile prenatal KAH tanısı konulabilmektedir (Pass ve Neto 2009). Ayrıca prenatal KAH tanısı için amniyotik sıvıda 11-deoksikortizol, 11-DOC ve 17-OHP ölçümü yapılabilmektedir ( Schumbert ve ark 1980, Rösler ve ark 1988). Prenatal tanının önemi anneye yüksek doz deksametazon tedavi ile fetal aşırı adrenal androjen üretiminin baskılanabilmesindedir. Bu, kız fetüste ambigü genitalya oluşumunu yanı sıra fetal beyin üzerinde aşırı fetal adrenal androjenlerin androjenik etkilerini de önleyebilmektedir (Manson 2008, Nimkarn ve New 2009).

11-beta-hidroksilaz eksikliği olan vakaların yenidoğan döneminde tanı alması için ve yanlışlıkla 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı almaması için 11-deoksikortizol ölçümü önemlidir. 11-deoksikortizol ölçümünün sıvı kromatografi/tandem kütle spektrometrisinde yapılması hassasiyeti artıracaktır ve bu yöntem 17-OHP ve kortizol düzeylerini de tek ölçümde saptama imkanı verecektir. Bu şekilde klinisyen gereksiz basamakları takip etmek zorunda kalmayacaktır.

### **2. 3. Metot Validasyonu ve Doğrulanması**

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır (Ellison ve ark 200). Yani bir metodun performansını belirlemek için yapılan test ve ölçme işlemidir, yapılan test ve ölçme işlemlerinin yazılı kayıtlarla kanıtlanmasıdır ve cihaz, metot, sistem performansının belirlenen

koşullara uygun olduğunun kanıtlanmasıdır. James Westgard: “Metot validasyonu bir hata değerlendirme sürecidir” demiştir (Westgard 2008). Analitik hatalar saptanır, tanımlanır ve değerlendirilir. Tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Kapsamlı geçerli kılma, rutin kullanım öncesi metot performans kriterlerinden tümünün veya belirli bir kısmının incelenip, dökümanate edilmesi anlamına gelirken; tam iç geçerli kılma metodun tüm performans kriterlerinin değerlendirilmesidir.

Doğrulama yani verifikasyon, laboratuvarlararası çalışmalarla performans kriterleri belirlenmiş olan bir metodun laboratuvar şartlarında teyididir (Ellison ve ark 2000).

Kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansı değişik faktörlere bağlıdır. Laboratuvar koşulları, cihaz, kullanılan kimyasal madde, standart, operatör deneyimi, matriks etkisi gibi faktörlere bağlıdır (Ellison ve ark 2000). Metodun performansının belirlenen analiz ihtiyacına uygun olduğunu belirlemek ve göstermek için metot validasyonu yapıyoruz. Metot validasyonu, analiz için yeni metot geliştirildiğinde, kullanılmakta olan metodda değişiklik yapıldığında, herhangi bir metot laboratuvarında ilk defa uygulanacak ise, valide edilen metot başka laboratuvarında veya farklı kişi veya farklı cihaz ile kullanılacak ise, iki metodu karşılaştırmak için ve kalite kontrol testleri sonunda metodun performansında zamanla bir değişme olduğu anlaşıldığı zamanlarda yapılmaktadır. Laboratuvarında kullanılacak her türlü metot rutin analiz için kullanılmadan önce laboratuvar koşullarında analizi yapan kişiler tarafından valide edilmesi gerekmektedir (Westgard 2008). Metot validasyonu akredite laboratuvarlar için bir zorunluluktur. Belli bir kalite sistemine uygun çalışan laboratuvarların kullandıkları metodu valide etmeleri gerekmektedir. Metot, metodu uygulayacak kişiler tarafından ve/veya metot geliştirme çalışmalarını yapan kişiler tarafından valide edilmelidir. Laboratuvarında bir metotla analiz yapan her kişinin metodu valide etmesine gerek olmayabilir. Yeni bir kişi daha önce valide edilen bir metodla analiz yapması gerektiğinde, daha önce metot validasyonu yapan kişilerle karşılaştırmalı analizleri yaparak uygulama performansının aynı olduğunu gösterebilir (Westgard 2008).

Metot validasyon parametreleri metodun uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenmelidir.

## Metot validasyon Parametreleri:

- Doğruluk (Accuracy)
- Kesinlik (Precision)
- Analitik Sensitivite (Analitik duyarlılık)
- Analitik spesifiklik (analitik özgüllük)
- Doğrusallık (Linearite)
- Tayin limiti
- İnterferans
- Recovery (Geri elde)
- Carryover (Taşıma)
- Matriks etkisi
- Yöntem karşılaştırma
- Referans aralığı doğrulama

### **2. 3. 1. Doğruluk (Accuracy)**

Doğruluk, ölçülen değer ile ilgili bir tanımlama olarak; ölçülen değer in gerçek değere yakınlığını ifade etmektedir (Ellison ve ark 2000). Ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark hata (bias) olarak tanımlanır (Ellison ve ark 2000). Doğruluğun göstergesi b iastır. Hatalar preanalitik, analitik ve postanalitik diye üçe ayrılmaktadır (Westgard 2008). Preanalitik hatalar, numune alınmadan önce yapılan hatalar (testin yanlış istenmesi gibi), numune alınırken yapılan hatalar (kirli malzeme kullanılması, ıslak malzeme kullanılması, venöz stazla kan almak, infüzyon yapılan ekstremiteden numune alma, tam kan, serum, plazma cinsinden uygun numune almamak ve aç karnına alınması gereken numunelerin yeterli açlık sağlanmadan alınması gibi) ve örneklerin laboratuvara ulaştırılmasında yapılan hataları (bekletilmiş numunenin gönderilmesi, yanlış etiketleme gibi) kapsar. Post analitik hatalar ise sonuç değerlendirilirken yapılan hatalardır. Analitik hatalar, büyük

hatalar, sistematik hatalar ve rastgele hatalar olmak üzere üçe ayrılmaktadır (Westgard 2008).

Büyük hatalar; yanlış deney planlama ve hesaplama ile ilgilidir. Deney tekrarlanmalı veya sonuçlar iptal edilmelidir (Ellison ve ark 2000).

Sistematik hatalar; analiz sonucunu sabit ve belirli düzeyde değiştiren, nedeni bilinen ve ölçülebilen kesin değerlere sahip hatalardır (Westgard 2008). Sabit ve oransal hata olmak üzere iki tiptir (Westgard 2008). Analiz sonucunun doğruluğunu etkilerler. Sabit hata kaynakları, genellikle interferanslardır ve bazan yanlış kör (blank) hazırlama da neden olabilmektedir (Ellison ve ark 2000). Oransal hata kaynakları, genellikle kalibratör değerinin doğru olmaması, bir miktar analitin yan reaksiyonlara uğraması da neden olabilmektedir (Ellison ve ark 2000). Sabit hata interferans çalışmalarıyla, oransal hata ise recovery (geri elde) çalışmalarıyla saptanmaktadır (Ellison ve ark 2000).

Rastgele hata, düzeltilemeyen ve kontrol edilemeyen birçok değişkene bağlı hatalardır. Analizin kesinliğine etki ederler, standart sapmanın büyük olmasına neden olmaktadır. Rastgele hatanın kaynağı, ortamdaki sıcaklık oynamaları, cihaz kararsızlığı, ayıraç ve kalibratör değişimleri, pipetleme, zamanlama ve karıştırma işlemlerindeki değişiklikler, çalışanların değişmesi gibi. Rastgele hata tekrarlanabilirlik deneyleri ile saptanmaktadır (Westgard 2008).

Bias, ölçülen değerden hedef değer çıkartılarak elde edilmektedir (Westgard 2008). Yüzde bias (%bias) ise biasın hedef değere bölünmesi ve çıkan değer yüz ile çarpılması ile elde edilmektedir (Westgard 2008).

Total hata, rastlantısal hata ve sistematik hatanın toplamından elde edilmektedir (Westgard 2008).

Toplam izin verilen hata (Total error allowable, TEa), testin klinik yararını ortadan kaldırmayacak büyüklükteki hata olarak tanımlanmaktadır (Westgard 2008). Hesaplanırken testin klinik yararı da göz önüne alınmaktadır. Biyokimyasal parametrelerin hesaplanan toplam izin verilen hata değerlerine [www.westgard.com](http://www.westgard.com) adresinden ve Tietz, Kaplan gibi kitaplardan ulaşılabilir.



### 2. 3. 2. Kesinlik (Precision)

Aynı örnekten yapılan tekrar çalışmalarında metodun aynı sonucu verebilme gücüdür diye tanımlanmaktadır (Ellison ve ark 2000). Rastgele hataların bir ölçüsü olarak kullanılmaktadır. Kesinlik için tekrarlanabilirlik çalışması yapılmaktadır (Westgard 2008). Ölçülen değer için doğruluk ve kesinlik birbirinden farklı kavramlardır. Bir analiz sonucu doğru olduğu halde kesin veya kesin olduğu halde doğru olmayabilir. Varyasyon katsayısı, kesinliğin simgesidir (Westgard 2008). Kesinlik standart sapma ile bulunabilmektedir (Westgard 2008). Standart sapma, ona bağlı varyasyon katsayısı ne kadar küçükse tekrarlanabilirlik yani kesinlik o kadar iyidir.

Varyans, verilerin ortalamadan farklarının karelerinin ortalamasıdır (Ellison ve ark 2000).

Standart sapma (Standard Deviation, SD), varyansın kareköküdür (Westgard 2008). Kesinliği tanımlamaktadır. Denk değerlerin örneklerin ortalamasından aşağı ve yukarı ne kadar saptığının ölçütüdür.

Varyasyon katsayısı (Coefficient of Variation, CV), standart sapmanın ortalamaya göre yüzde değişimi olarak tanımlanmaktadır (Westgard 2008). %CV, standart sapmanın ortalamaya bölünüp, çıkan değer yüz ile çarpılması ile elde edilmektedir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında çalışma içi, çalışmalar arası, gün içi, günler arası ve total %CV'ler hesaplanmaktadır.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP5-A2'ye göre tekrarlanabilirlik çalışmasında kullanılacak örneklerin matrisi hasta örnekleri ile uyumlu olmalıdır, iki veya üç farklı düzey gerekmektedir (en az iki) ve tıbbi karar konsantrasyonlarında olması istenmektedir (Westgard 2008). En az 20 gün, günlük 2 çalışma, her çalışmada 2 tekrar istenmektedir (Westgard 2008). Bu çalışmaya başlamadan önce ön presizyon çalışması önerilir. Ön presizyon çalışmasında örnek tek seferde en az 8 en çok 20 olacak şekilde tekrarlı okutulup SD hesaplanır (Westgard 2008). Çift çalışmalar arasındaki farkın kesin değeri, ön presizyon çalışmasından elde edilen standart sapmanın 5.5 katından fazla ise, çift dışlanır (Westgard 2008). Çalışma

tekrarlanmalıdır. Westgard kurallarına göre çalışma içi ve gün içi SD, TEa'nın dörtte birinden küçük olmalıdır ve günler arası SD, ise TEa'nın üçte birinden küçük olmalıdır (Westgard 2008). Sonuçlar kötüyse daha ileri çalışmaya gerek yoktur.

### **2. 3. 3. Analitik Sensitivite (Analitik duyarlılık)**

Yöntemin küçük konsantrasyonları belirleme yeteneğidir ve kalibrasyon eğrisinin eğimi ile saptanmaktadır (Westgard 2008).

### **2. 3. 4. Analitik spesiflik (analitik özgüllük)**

Diğer ilişkili analitle etkileşmeden, asıl analiti ölçme yeteneğidir (Westgard 2008). Metodun doğruluğu ile ilgili bir parametredir.

### **2. 3. 5. Doğrusallık (Linearite)**

Yöntemin örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı sonuçlar verme yeteneğidir (Westgard 2008). Geleneksel doğrusallık, X eksenine beklenen değerler Y eksenine ise bulunan değerlerin işaretlenmesiyle dağılım grafiği çizilir (Westgard 2008). Eğer eğri bir doğru çizgi şeklinde ise yöntem lineardir. İstatistiksel doğrusallık, doğrusallığın kabul edilebilirliğini istatistiksel olarak belirler (p değeriyle). Klinik doğrusallık, her örneğe ait nokta, kullanıcı tarafından tanımlanan hata sınırları içinde düz bir hat çiziyorsa yöntem doğrusaldır (Westgard 2008).

Rapor aralığı, şimdilerde analitik ölçüm aralığı olarak adlandırılmakta, cihaz, kit veya sistemin güvenilir sonuç verdiği test sonuçları aralığıdır (Westgard 2008).

CLSI standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP6-A ile doğrusallık (Linearite), doğruluk (accuracy), rapor edilebilir aralık ve kalibrasyon verifikasyonu değerlendirilmektedir (Westgard 2008). Kullanılacak örnekler klinik örneklerle benzer olmalıdır yani hasta örnekleri ile uygun matris kullanılmıdır (serum havuzları veya ticari ürünler kullanılabilir). Tüm örnekler interferan içermemelidir. Linear aralığı belirlemek için 9-11 düzey ve her örneğin 2 veya 4 tekrarlı çalışması önerilmektedir (ilk çalışma için linear aralığı beklenenden %20-30 daha geniş tutmak gerekir) (Westgard 2008). Modifiye yöntem veya laboratuvar içi kurulan yöntem doğrulamak için 7-9 nokta ve her düzeyde 2 veya 3 tekrar çalışma önerilmektedir (Westgard 2008). Laboratuvarda linear aralığın geçerliliğinin kanıtlanması için 5-7 örnek ve her düzeyde 2 tekrar çalışma önerilmektedir

(Westgard 2008). Linear aralık belirlenmesinde minimum analitik konsantrasyon veya lineer aralığın en alt sınırı, çeşitli tıbbi karar sınırları ve maksimum analitik konsantrasyon veya linear aralığın üst sınırı konsantrasyonları içermesi önemlidir.

### **2. 3. 6. Tayin Limiti**

CLSI Standartlarında:

Limit of Blank (LOB): Kör okumalarının belli bir olasılıkla karşılaşılabilecek en yüksek değeridir (Westgard 2008)

Limit of Detection (LOD): Belirli bir olasılıkla saptanabilen en düşük analit miktarıdır (Westgard 2008)

Limit of Quantitation (LOQ): Belli bir kesinlik ve doğruluk değerinde kantitatif olarak ölçülebilen en küçük analit miktarıdır (Westgard 2008).

CLSI standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP17-A'ya göre LOB ve LOD için kör ve düşük miktarda analit içeren örnekler hazırlanır 20 tekrarlı okutulur ve ortalama, SD ve %CV hesaplanır (Westgard 2008). LOQ için genellikle %20 CV'ye karşılık gelen en düşük konsantrasyon esas alınır. Düşük konsantrasyondan başlayıp gittikçe artan 5 – 10 örnek hazırlanır. Artış linear değil, logaritmik olmalıdır: 1, 2, 5, 10, 20 gibi. Bu örnekler porsiyone edilerek dondurulur. En az 20 gün çalışılır (Westgard 2008). Bu değerlerden %CV hesaplanır, konsantrasyona karşı grafiğe geçirilir ve %20 CV'ye karşılık gelen konsantrasyon saptanır (Westgard 2008). LOQ yapılması zordur ama zorunlu değildir.

### **2. 3. 7. Recovery (Geri Elde)**

Metodun numuneye eklenen belirli miktardaki analiti doğru olarak okuyabilme yeteneğidir. Oransal sistematik hata hakkında bilgi sağlar (Westgard 2008). %R olarak ifade edilir (Westgard 2008).

Analitin ölçümünün yapılacağı hasta örneğine, analit standart çözeltisinden eklenir. Aynı miktardaki hasta örneğine standart çözeltinin hazırlandığı çözücüden aynı miktarlarda eklenir. Her iki örnek analiz edilir. Ölçülen miktar ile eklenmiş olan miktar karşılaştırılır. Eklenen analit çözeltisi yoğun olmalıdır ki yol açacağı seyreltme %10'u aşmamalıdır (Westgard 2008).

$\%R = \frac{(\text{Eklenen konsantrasyon} - \text{Geri kazanılan konsantrasyon})}{\text{Eklenen konsantrasyon}} \times 100$

Orantılı Hata = 100 - Ortalama %R

### **2. 3. 8. İnterferans**

Sabit sistematik hata saptanır. Geri elde çalışması gibidir. Eklenen analit çözeltisi yoğun olmalıdır ki yol açacağı seyreltme %10'u aşmamalıdır (Westgard 2008).

CLSI standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP7-A2'ye göre klinik örneklerden 2 havuz elde edilir (Westgard 2008). Bir tanesi içinde yok denecek kadar az konsantrasyonda interferanın bulunduğu düşük-seviye havuz, diğeri ise içerisine belirli bir solvent ile çözülerek hazırlanmış konsantre interferan ilave edilerek hazırlanan yüksek-seviye havuz (Westgard 2008). Bu 2 havuz eşit miktarlarda karıştırılarak teorik oranda %50 konsantrasyonda havuz; düşük-seviye havuz ile %50'lik havuz eşit miktarlarda karıştırılarak %25'lik havuz; yüksek-seviye havuz ile %50'lik eşit miktarda karıştırılarak %75'lik havuz ve böylece toplam 5 farklı interferan konsantrasyonunda havuz elde edilmiş olur (Westgard 2008). Elde edilen bu 5 farklı havuz, aynı analitik çalışma içerisinde analiz edilir. Üç tekrarlı çalışma için; 1. tekrar interferan konsantrasyonu artan sırada, 2. tekrar azalan ve 3. tekrar artan sırada analiz edilmektedir (Westgard 2008).

### **2. 3. 9. Taşıma (Carryover)**

Otomatik veya akış hücresi olan sistemler için yapılmaktadır. Günümüzdeki teknik imkanlar taşıma hatalarını azaltmış bulunmaktadır. Düşük (D) ve çok yüksek (Y) değerli iki hasta örneği belirli bir düzen içinde yüklenerek çalışılır (Ellison ve ark 2000). Yüksek değerlerden önce gelen düşük değerler ile bir grup oluşturulmaktadır. İkinci grubu yüksek değerlerden sonra gelen düşük değerler oluşturur. İki grubun ortalamaları ve SD'leri hesaplanır.

### **2. 3. 10. Matriks Etkisi**

LC-MS/MS'in kendi özünde olan yüksek hassasiyet ve seçiciliğinden dolayı kantitatif bioanalizler için güçlü analitik bir tekniktir. Bioanalitik yöntemlerin doğruluğu, hassasiyeti ve kararlılığına matriks etkisi ilaç endüstrisinde artan bir

endişe konusudur (Chambers ve ark, 2007). Rezidüel matriks bileşenleri özellikle de endojen fosfolipidler LC-MS/MS ile yapılan yaygın kantitatif analizlerde tutarsızlığın güçlü kaynağıdır (Chambers ve ark, 2007). Matriks etkisi, kütle spektrometresinde plazma gibi biyolojik matriks içindeki analitten alınan cevap ile standart solüsyon içindeyken aynı analitten alınan cevap arasındaki fark olarak tanımlanmıştır (Chambers ve ark, 2007). Matriks etkileri eş salınımlı matriks bileşenlerinden kaynaklı hedef analitin iyonlaşmasını etkileyen iyon supresyon ya da bazı durumlarda iyon artırma sonucudur.

İyonizasyonun etkileri teorik olarak çözelti veya gaz fazında oluşabilir (Annesley, 2003). Biyolojik ekstraksiyon olarak ESI'yi içeren deneyler iyon supresyonunun ana sebebinin, uçucu olmayan veya az uçucu olan çözücüler nedenli püskürtmenin damlacık çözelti özelliklerinde oluşan bir değişiklik olduğunu göstermiştir (Annesley, 2003). Bu uçucu olmayan maddeler (tuzlar, iyon çifti ajanlar, endojen bileşikler, ilaçlar/metabolitler) damla buharlaşması veya oluşumu verimliliğini değiştirerek sonuçta detektöre ulaşan gaz fazında yüklü iyon miktarını etkilemektedir (Annesley, 2003).

Matriks etkisi son derece değişken olabilmektedir ve kontrol veya tahmin etmek zor olabilmektedir ve biyoanalitik yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinde önemli hatalara neden olabilmektedir (Chambers ve ark, 2007). Güncel Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (Food and Drug Administration, FDA) kılavuzunda artık bu etkilerin kantitatif LC-MS/MS yönteminin gelişimi, validasyonu ve rutin kullanımının bir parçası olarak değerlendirilmektedir.

Matriks etkisini değerlendirmek için iki yaygın yöntem vardır. Bunlar post-kolon infüzyon ve post-ekstraksiyon pik metodudur. Post-kolon infüzyon metodu büyük olasılıkla matriks etkisi ile karşılaşılan kromatografik bölgeleri tanımlar, matriks etkisinin nitel bir değerlendirmesini sağlamaktadır (Chambers ve ark, 2007). Tersine post-ekstraksiyon pik metodu matriks etkisini numune hazırlama işlemi gerçekleşmiş blank matriks örneğinden elde edilen analit pik cevabı ile matriks içermeyen çözeltideki analit pik cevabını karşılaştırarak kantitatif bir değerlendirme sağlamaktadır (Chambers ve ark, 2007). Bu şekilde, numundeki tüm analitlerde karşılaşılan iyon supresyon veya iyon arttırmanın kantitatif etkisi, analitik yöntemdeki her değişiklikte ölçülebilecektir. Bu yöntemde Chambers ve

ark(2007)'de matriks etkisini hesaplamak için %matriks etkisini kullanmışlardır ve %matriks etkisini aşağıdaki formülle hesaplamışlardır.

$$\% \text{Matriks Etkisi} = [(A/B) - 1] \times 100$$

A: *Cevap<sub>post-ekstrakte numune piki</sub>*

B: *Cevap<sub>non-ekstrakte matriks içermeyen numune piki</sub>*

Bu hesaplama sonucu elde edilen negatif sonuç analit sinyalinde supresyonu, pozitif sonuç analit sinyalinde artışı göstermektedir (Chambers ve ark, 2007).

### **2. 3. 11. Yöntem Karşılaştırma**

CLSI standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP9-A2'ye göre iki yöntemde rapor aralığı içinde en az 40 örnek hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemi ile çalışılmalıdır (Westgard 2008). Tek çalışılabilirse de çift çalışmak daha iyidir. Çalışmalar her iki yöntemle, paralel, 2 saat içinde yapılmalıdır. Analit kararsızsa, bu süre daha da kısa tutulmalıdır.

### **2. 3. 12. Referans Aralığı Doğrulama**

CLSI standartları yöntem değerlendirme protokolleri CLSI EP28-A3c referans aralığı ile ilgilidir (Westgard 2008). Referans aralık çalışması zordur ve pahalıdır. En az 120 denek gerekmektedir (Westgard 2008). Bu yüzden, akılcı olan daha küçük sayı ile verilen referans aralığını doğrulamaktır. Referans aralığını doğrulamak için en az 20 sağlıklı birey yeterlidir (Westgard 2008). Değerlendirmede verilen sınırlar dışına çıkan veri sayısı %10'dan küçük olmalıdır (Westgard 2008).

### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3. 1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

##### 3. 1. 1. Kullanılan Cihazlar

- Tandem MS (ABSCIEX API 3200, Amerika Birleşik Devletleri)
- HPLC {(Prominence Degaser; DGU-20-A3, Shimadzu, Japonya), (Prominence LIQUID Chromatograph UFLC; LC-20AD, Shimadzu, Japonya), (Prominence Auto Sampler; SIL-20AC HT, Shimadzu, Japonya)}
- Kolon Fırını (CTO-10AS VP, Shimadzu, Japonya)
- HPLC Kolon (Restek pinnacle DB C<sub>8</sub> 50x4,6mm, 3µm, Amerika Birleşik Devletleri )
- Otomatik Eliza Okuyucusu (Rayto RT-2100c microplate reader, Çin)
- Otomatik Eliza Yıkayıcısı (Rayto RT-2600+microplate washer, Çin)
- RİA (STRATEC, PC-RIA-MAS, Almanya)
- Evaporator (Teknosem, TAB 40-WEL WT, Türkiye)
- Santrifüj (Beckman Coulter Allegra X-22R, Amerika Birleşik Devletleri)
- Vortex (Heidolph D-91126, Almanya)
- Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)

##### 3. 1. 2. Kullanılan Malzemeler

- 11-deoksikortizol-*D*<sub>5</sub> internal standart {11-Deoxycortisol-2,2,4,6,6-*d*<sub>5</sub>, 98 atom %D, %99, (710784-1MG), (LOT: TA 2555 V), Sigma-Aldrich, Amerika Birleşik Devletleri}
- 11-deoksikortizol standart {10 mg LGC, (CAS No. 152-58-9), (Lot. No. 6691), Almanya}
- 11-deoksikortizol Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) Kiti {Cusabio, (Lot. No. A13166922), Çin}
- 11-deoksikortizol Radyoimmünoassay (RIA) Kiti { DIA Source, (Lot. No. 142905), Belçika}
- Kolesterol standart {Sigma-Aldrich, (Lot. No. 060 M1200 V), (CAS No. C8503-100G), Amerika Birleşik Devletleri}
- Kortizol standart {Sigma-Aldrich, (CAS No. 50-23-7), (Lot. No. SLBD0859V), Amerika Birleşik Devletleri}

- Kortikosteron standart {46148-100MG, Sigma-Aldrich, (CAS No. 50-22-6), (Lot. No. SZBC066XV), Amerika Birleşik Devletleri}
- 17-OHP standart {H5752-5G, Sigma-Aldrich, (CAS No. 68-96-2), (Lot. No. 041M1713V), Amerika Birleşik Devletleri}
- Bovin Serum Albumin (BSA) {Sigma-Aldrich, (CAS No. A9418-10G), (Lot. No.108K12772), Amerika Birleşik Devletleri}
- Metanol ( $CH_4O$ ) {34885-2,5L-R, Sigma-Aldrich, (CAS No. 67-56-1), (Lot. No. SZBD126SV), Amerika Birleşik Devletleri}
- Formik Asit (HCOOH) {Sigma-Aldrich, (Lot. No. 81420), Amerika Birleşik Devletleri}
- Dietil eter ( $C_4H_{10}O$ ) {Merck, (Lot. No. K43976621 245), Almanya}
- HPLC Grade Su {Chemsolute, (Bach No. Q2A085192A), Almanya}
- Yüksek Safılıkta Azot Gazı(Ar oksijen, Türkiye)

### 3. 2. 11-Deoksikortizol LC-MS/MS Ölçümü

#### 3. 2. 1. 11-Deoksikortizol Ölçümü için LC-MS/MS Cihazında Metot Geliştirme

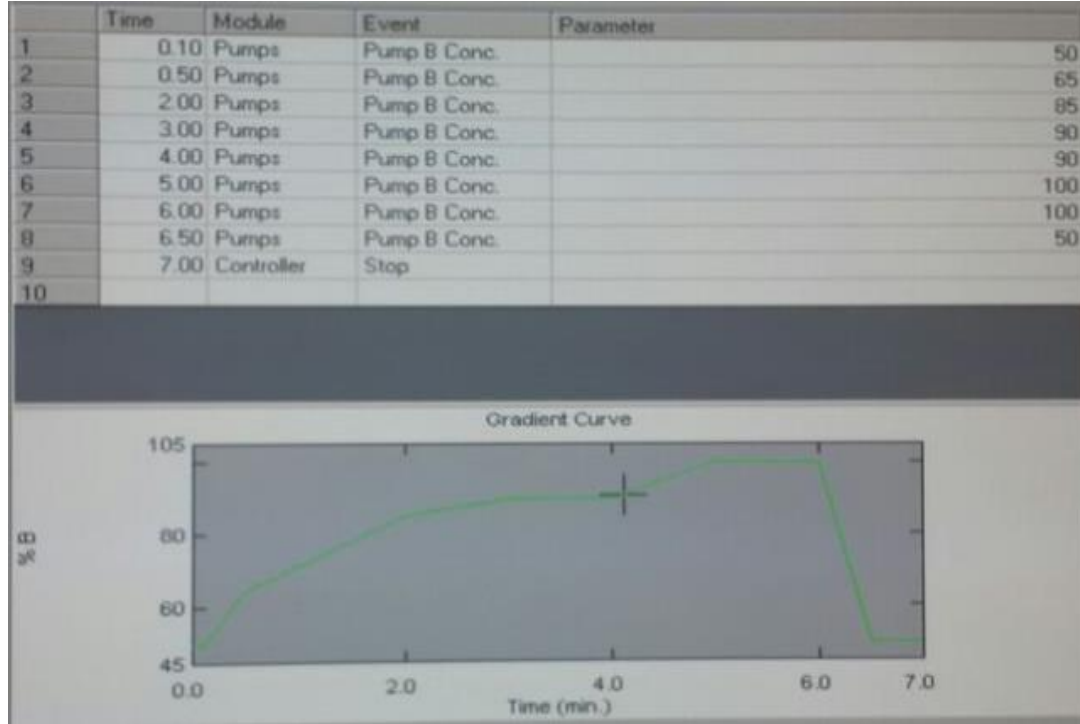
Çalışmamızda optimum parametreleri belirlemek için en yüksek intensiteye sahip pikleri elde etmek için çeşitli çalışmalar gerçekleştirdik. Uygun mobil fazı belirleme çalışmalarımızda %100'lük metanol ile hazırlanmış standartlar kullanıldı. İlk hazırlanan mobil faz A %0.1'lik formik asit içeren HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile yapıldı. İkinci deneme mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile yapıldı. Standartlar farklı olarak %0.1'lik formik asit içeren metanol ile hazırlanarak her iki mobil fazda denendi. En iyi intensite; %100 metanol ile çözülmüş standartların mobil faz A HPLC grade su, mobil faz B %0.1'lik formik asit içeren %100'lük metanol ile çalışılması ile elde edildi. Formik asitin iyonlaşmayı artırıcı etkisi nedeniyle denemelerde kullanıldı. Ancak fazla iyonlaşmanın da pik intensitesini olumsuz etkilediğine karar verildi ve standart hazırlamada ve mobil faz A da formik asit çıkarıldı. Cihaz ayarlarını belirlemek için yapılan deneme çalışmalarında belirlenen mobil faz A, mobil faz B ve metanol ile hazırlanmış standartlar kullanıldı.

Cihaz ayarları ile ilgili olarak time denemeleri 150 milisaniye, 200 milisaniye, 250 milisaniye, 400; enjeksiyon volümünü belirlemek için 30  $\mu$ L, 40  $\mu$ L,



60 µL ile; sıcaklık denemeleri 400°C, 500°C, 600°C ile çalışmalar gerçekleştirildi. Ionspray voltaj(IS) ile ilgili denemeler, 4500 V ve 5500 V ile gerçekleştirildi.

Akış gradientini belirlemek için yapılan deneme çalışması sonucunda total akış hızı 1mL/dk olarak belirlendi. Total akışta Pompa B'nin yüzdesini belirlemek için %50, %60 ve %80 ile deneme çalışmaları gerçekleştirildi. Yöntemde kullanılan akış gradienti Şekil 3. 1. de gösterilmiştir.



**Şekil. 3. 1.** 11-deoksikortizol ölçümünde LC-MS/MS yönteminde ABSCIEX API 3200 cihazında ayarlanan akış gradienti.

Metanol ile hazırlanmış standart cihaza enjekte edilerek uygun gaz ayarları ve potansiyel ayarları belirlendi.

Gerçekleştirdiğimiz deneme çalışmaları sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde ettiğimiz koşullar aşağıdaki Tablo 3. 1. de bulunmaktadır.

**Tablo. 3. 1.** 11-deoksikortizol ölçümünde LC-MS/MS yönteminde ABSCIEX API 3200 cihazında kullanılan ayarlar.

<b>Scan Type</b>	MRM
<b>Ionisation Mode</b>	Elektro Sprey İyonizasyon
<b>Polarity</b>	Pozitif
<b>11-deoksikortizol Q1 Mass (Da)</b>	347.2
<b>11-deoksikortizol Q3 Mass (Da)</b>	109.1
<b>11-deoksikortizol-D<sub>5</sub> internal standart Q1 Mass (Da)</b>	352.2
<b>11-deoksikortizol-D<sub>5</sub> internal standart Q3 Mass (Da)</b>	113.1
<b>Dwell Time (milisaniye)</b>	250
<b>Ionisation Source</b>	Turbo Spray
<b>Curtain Gas (CUR)</b>	10
<b>Collision Gas (CAD)</b>	5
<b>Ionspray Voltage (IS)</b>	5500 V
<b>Temperature (TEM)</b>	600 °C
<b>Ion Source Gas1 (GS 1)</b>	50
<b>Ion Source Gas2 (GS 2)</b>	60
<b>Declustering Potential (DP)</b>	51
<b>Entrance Potential (EP)</b>	5.0
<b>Collision Energy (CE)</b>	35
<b>Collision Cell Exit Potential (CXP)</b>	4.0
<b>Interface Heater</b>	On
<b>Collision Gas</b>	N <sub>2</sub>
<b>Analiz Süresi</b>	7 dakika
<b>Pompa Modu</b>	Binary Flow
<b>Total Akış</b>	1 ml/dk
<b>Enjeksiyon Volüm</b>	60 µl
<b>Mobil Faz A</b>	Distile Su
<b>Mobil Faz B</b>	%0,1'lik formik asit içeren metanol

### 3. 2. 2. 11-Deoksikortizol Standart Hazırlanışı

Stok 1 çözeltinin hazırlanışı; LGC markalı (Lot. No. 6691) 10 mg 11-deoksikortizol standardı 1ml metanol ile çözülerek 10000 parts per million (mg/L)'lik 1ml 11-deoksikortizol standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 2 çözeltinin hazırlanışı; 50 ml'lik balon jöjeye 500 mikrolitre (µl) stok 1 çözeltisinden alınıp üzeri metanol ile tamamlanarak 100 mg/L'lik 50 ml 11-deoksikortizol standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 3 çözeltinin hazırlanışı; stok 2 çözeltisinden bir cam tüpe 1000 µl alınıp 9000 µl metanol eklenerek 10 mg/L'lik 10 ml 11-deoksikortizol standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 4 çözeltinin hazırlanışı; stok 3 çözeltisinden bir cam tüpe 1000 µl alınıp 9000 µl metanol eklenerek 1 mg/L'lik 10 ml 11-deoksikortizol standart çözeltisi hazırlandı.

Metot validasyon çalışmalarında kullanmak için 1000 parts per billion (µg/L)'lik 11-deoksikortizol standardından (stok 4) Bovin Serum Albumin-Phosphate Buffered Saline (BSA-PBS) ile ¼ dilüsyon ile 200 µg/L (µg/L)'lik 11-deoksikortizol standardı hazırlandı. Hazırlanan 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından BSA-PBS kullanılarak seri dilüsyon ile 100 µg/L, 50 µg/L, 25 µg/L, 12.5 µg/L, 6.25 µg/L, 3.125 µg/L, 1.56 µg/L, 0.78 µg/L'lik standartlar elde edildi.

BSA-PBS: 0,1M PBS, %1 BSA, %0,9 NaCl, pH 7.4

BSA-PBS Çözeltisinin hazırlanışı: 1.134 gram(g) Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,302 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O, 0.9 g NaCl ve 1 g sığır serum albumin 75 mL HPLC grade suda önce çözdürüldü. Sonra 100 mL hacime tamamlandı pH ise NaOH ve HCl ile 7.4'e getirildi.

### **3. 2. 3. 11-Deoksikortizol-D<sub>5</sub> Internal Standart Hazırlanışı**

Stok 1 çözeltinin hazırlanışı; Sigma-Aldrich markalı (LOT: TA 2555 V) 1 mg 11-Deoksikortizol-D<sub>5</sub> Internal Standart 1ml metanol ile çözülerek 1000 mg/L'lik 1 ml 11-deoksikortizol-D<sub>5</sub> internal standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 2 çözeltinin hazırlanışı; 50 ml'lik balon jøjeye 500 µl stok 1 çözeltisinden alınıp üzeri metanol ile tamamlanarak 10 mg/L'lik 50 ml 11-deoksikortizol-D<sub>5</sub> internal standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 3 çözeltinin hazırlanışı; 100 ml'lik balon jøjeye stok 2 çözeltisinden 2000 µl alınıp üzeri metanol ile tamamlanarak 200 µg/L'lik 100 ml 11-deoksikortizol-D<sub>5</sub> internal standart çözeltisi hazırlandı.

Ölçümlerde kullanmak için stok 3 çözeltisinden bir cam tüpe 500 µl alınıp 9500 µl metanol eklenerek 10 µg/L'lik 10 ml 11-deoksikortizol- $D_5$  internal standart çözeltisi hazırlandı.

### 3. 2. 4. Mobil Faz Hazırlanışı

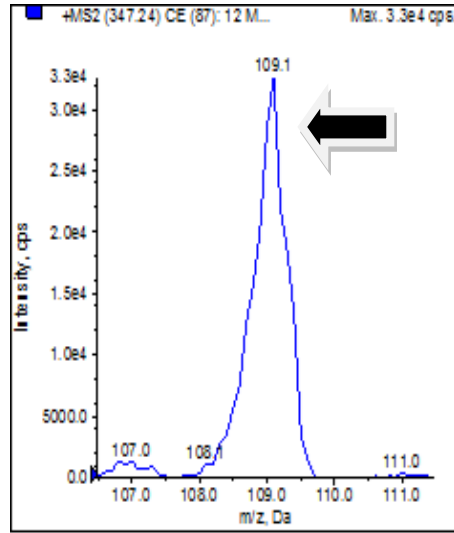
**Mobil Faz A:** Distile su

**Mobil Faz B:** %0,1'lik formik asit içeren metanol (2.5 litre metanolden 2500 µl metanol alınıp yerine 2500 µl formik asit ilave edildi.)

### 3. 2. 5. LC-MS/MS Yönteminde Precursor ve Product İyon Seçimi

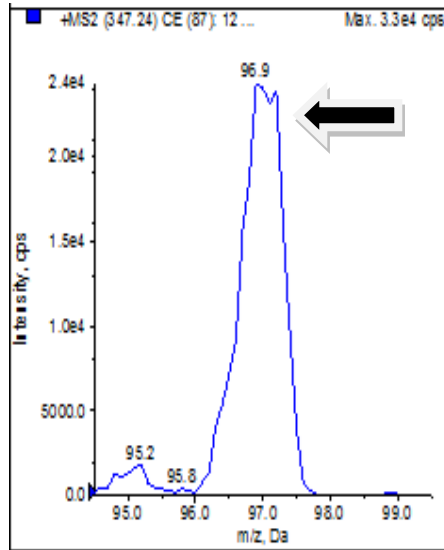
10 mg 11-deoksikortizol standardı metanolla çözülerek 1 mg/L'lik 11-deoksikortizol standartları hazırlandı. LC-MS/MS cihazında Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ile pozitif iyon modda MS/MS tarama metotlarından Single MS'de Quadrupole (Q)1 taramada 1 mg/L'lik 11-deoksikortizol standardı tandem MS kısmında infüzyon yaptırıldı. Bu tarama ile belirtilen zamanda belirtilen kütle aralığı incelendi, sırasıyla verilen aralıktaki tüm kütleler taranıp, kararlı olmayan iyonlar elimine edilerek 11-deoksikortizolün kararlı iyonu ve molekül ağırlığı saptandı. 11-deoksikortizolün kütle/yük (m/z) değeri 347 olarak tespit edildi.

Bu taramayla 11-deoksikortizolün kararlı iyonu tespit edildikten sonra elimizdeki 1 mg/L'lik 11-deoksikortizol standardından %0.1'lik formik asit içeren metanolla (50 ml %100 metanol + 50µl formik asit) 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol çözeltiler hazırlandı. LC-MS/MS cihazında Elektrosprey İyonizasyon (ESI) ile pozitif iyon modda MS/MS tarama metotlarından Multiple Reaction Monitoring (MRM) modda hazırlanan 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardı tandem MS kısmına infüzyon yaptırıldı. Bu modda 11-deoksikortizolü Q1'de çalışılarak precursor iyon seçildi ve seçilen bu iyon Q2 collision hücresinin içerisinde fragmante edilip Q3'de product iyonu seçildi. 11-deoksikortizolün precursor iyon m/z değeri 347.2, quantifier product iyon m/z değeri 109.1 (Şekil 3. 2.) olarak tespit edildi.



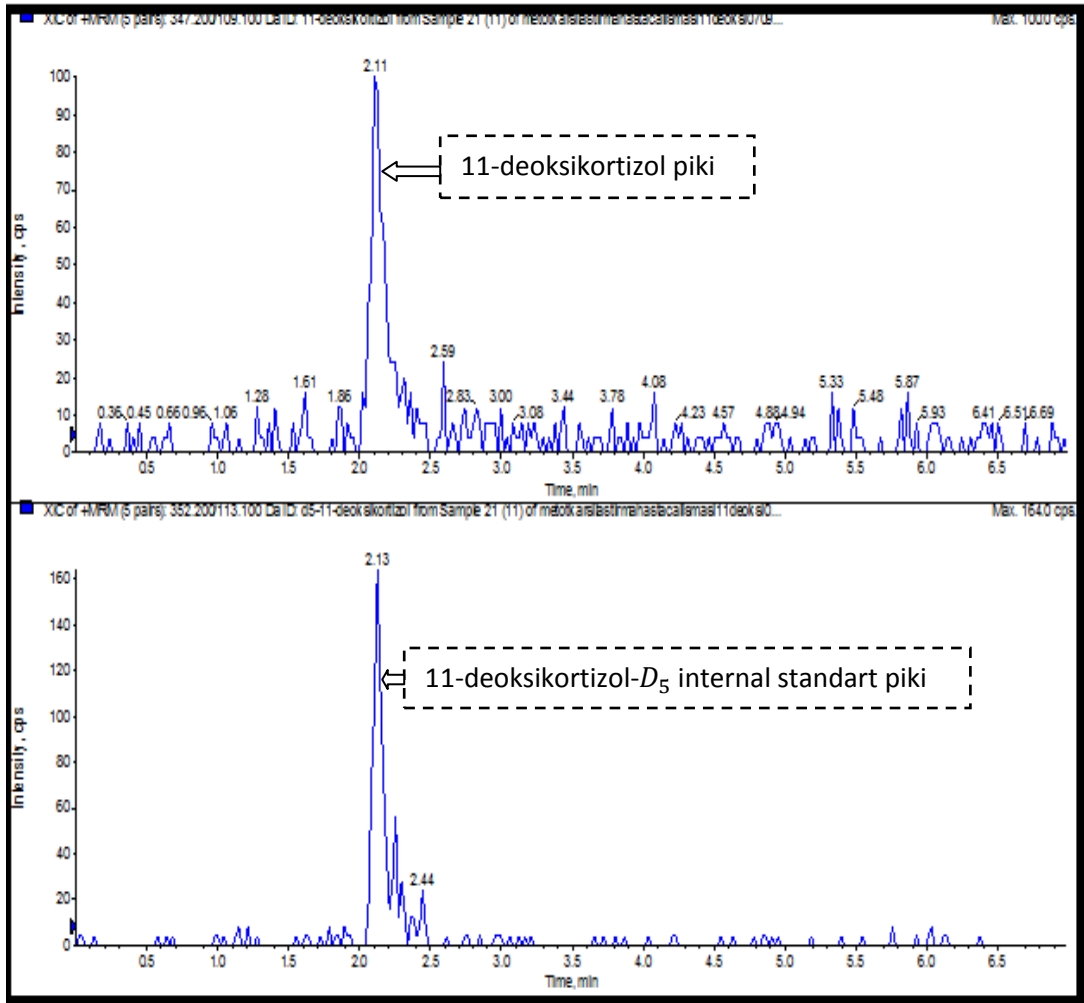
**Şekil 3. 2.** 11-deoksikortizol quantifier product iyon m/z değeri 109.1.

11-deoksikortizolün qualifier product iyon m/z değeri 96.9 (Şekil 3. 3.) olarak tespit edildi.



**Şekil 3. 3.** 11-deoksikortizol qualifier product iyon m/z değeri 96.9.

Metodun son halinde standartlar saf metanolle çözdürüldü. LC-MS/MS cihazında ESI ile pozitif iyon modda çalışıldı. Kromatografik ayırma, gradient elüsyonda (7 dakika) 1 ml/dakika akışta, mobil faz A olarak distile su mobil faz B olarak %0,1'lik formik asit içeren metanol kullanılarak gerçekleştirildi. Numune enjeksiyon volümü 60 µl olarak belirlendi. 11-deoksikortizol pikinin çıkış zamanı 2. dakika olarak bulundu (Şekil 3. 4.). 11-deoksikortizol- $D_5$  internal standart precursor iyon m/z değeri 352.2, product iyon m/z değeri 113.1 olarak tespit edildi. 11-deoksikortizol birimi µg/L dir.



Şekil 3. 4. 11-deoksikortizol (üstteki pik) ve 11-deoksikortizol- $D_5$  internal standart (alttaki pik) pikleri

### 3. 2. 5. 1. LC-MS/MS Metot Validasyon Parametreleri

#### Doğrusallık (Linearite)

Bu çalışmada yöntemin doğrusallığını kanıtlamak, analitik ölçüm aralığı belirlemek ve kalibrasyon grafiğini çizmek planlandı. Bunun için 1000 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından BSA-PBS ile ¼ dilüsyon ile 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardı hazırlandı. Hazırlanan 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından BSA-PBS kullanılarak seri dilüsyon ile 100 µg/L, 50 µg/L, 25 µg/L, 12.5 µg/L, 6.25 µg/L, 3.125 µg/L, 1.56 µg/L, 0.78 µg/L'lik standartlar elde edildi. Elde edilen bu standartlardan cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı. Her konstrasyon iki tekrarlı okutuldu.

#### Tayin Limitleri

LOB'u belirlemek için sadece BSA-PBS içeren (kör örneği) ve BSA-PBS ile hazırlanan 0.19 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından (düşük seviye analit içeren örnek) cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlanıp 60 tekrar olacak şekilde 5 gün ölçüm yapılır.

$$LOB = \text{Mean (blank)} + 1.65S (\text{blank})$$

$$LOD = LOB + 1.65S (\text{düşük seviye})$$

$$LOQ = \text{Bias (düşük seviye)} + 2S (\text{düşük seviye}) \text{ olduğu ilk nokta}$$

LOD için tekrarlı okumalarda sinyal/gürültü değeri üç olan en küçük değer belirlendi. LOQ için ise tekrarlı okumalarda sinyal/gürültü değeri 10 olan en küçük değer belirlendi.

#### Tekrarlanabilirlik Çalışması

Bu çalışmada 1000 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından BSA-PBS ile hazırlanmış 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartları kullanıldı. Bu standartlardan cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı. Üç konsantrasyonun her biri sabah 20 tekrarlı çalışma içi tekrarlanabilirliği görmek için, aynı gün öğleden sonra 20 tekrarlı gün içi tekrarlanabilirliği görmek için çalışıldı. Sonra üç konsantrasyonun

her biri 20 gün her gün 2 tekrarlı günler arası tekrarlanabilirliği görmek için çalışılmıştır.

### **Recovery (Geri Elde)**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakalanlarından serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan serum havuzundan dört cam tüpün her birine 900 µl pipetlendi. Bu cam tüplerden birincisine 900 µl serum havuzunun üzerine 100 µl BSA-PBS'a, ikincisine 900 µl serum havuzunun üzerine 200 µg/L 11-deoksikortizol standardından 100 µl, üçüncüsüne 900 µl serum havuzunun üzerine 50 µg/L 11-deoksikortizol standardından 100 µl, dördüncüsüne 900 µl serum havuzunun üzerine 12.5 µg/L 11-deoksikortizol standardından 100 µl pipetlendi. Hazırlanan tüplerden cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı. Hazırlanan numuneler cihaza okutuldu.

### **Matriks Etkisi**

Matriks etkisi çalışması Cahambers ve ark (2007)'de yaptıkları çalışmaya uygun yapıldı. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakalanlarından serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan serum havuzundan analiz için üç adet numune hazırlandı. Hazırlanan numuneler azot gazı altında uçurulan tüplere %0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözeltisinden 200 µl koyarak çözüldükten sonra viallere konulmadan önce birincisine 200 µl 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardı, ikincisine 200 µl 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardı ve üçüncüsüne 200 µl 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardı eklendi. Eklenen 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartları metanol ile hazırlandı. Bu üç karışımın her birinden 200 µl viallere pipetlendi ve analiz edildi. Boş bir cam tüpe metanol ile hazırlanan 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından 200 µl pipetlenip üzerine %0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözeltisinden 200 µl pipetlenip oluşan karışımdan vial 200 µl alınıp analiz edildi. Aynı işlemler 12.5 µg/L ve 100 µg/L 11-deoksikortizol standartları içinde yapıldı. Elde edilen altı analiz sonucu pik alanlarına göre değerlendirildi.



## **Carryover (Taşıma)**

Bu çalışmada düşük konsantrasyon için BSA-PBS ile hazırlanmış 0.78 µg/L 11-deoksikortizol standardı, yüksek konsantrasyon için BSA-PBS ile hazırlanmış 100 µg/L 11-deoksikortizol standardı kullanıldı. Bu standartlardan cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı. Hazırlanan numuneler aşağıda ki sırada okutuldu.

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9-Y10-D11

Düşük konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyonlardan 1. grup oluşturuldu. 1. Grup: D2-D3-D6-D7-D8

Yüksek konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyonlardan da 2. grup oluşturuldu. 2. Grup: D4-D5-D9-D10-D11

Her iki grubun ortalamaları ve SD'leri hesaplandı.

## **İnterferans**

Kortikosteron, kortizol, 17-OHP ve kolesterolün 11-deoksikortizolün LC-MS/MS yöntemiyle ölçümünü interfere edip etmeyeceğine bakılmıştır. Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastenesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakalanlarından düşük ve yüksek konsantrasyonda serum havuzları oluşturuldu.

Kortikosteron interferans çalışması için metanol ile 3.125 µg/L ve 50 µg/L'lik kortikosteron standartları hazırlandı. Hazırlanan düşük seviyeli serum havuzundan iki cam tüpe 900 µl pipetlendi. Serum havuzu pipetlenen bu cam tüplerden birincisine 100 µl 3.125 µg/L'lik kortikosteron standardı pipetlendi. Serum havuzu pipetlenen bu cam tüplerden ikincisine 100 µl 50 µg/L'lik kortikosteron standardı pipetlendi. Bu şekilde düşük ve yüksek seviyede kortikosteron içeren iki havuz elde edildi. Bu iki havuz eşit miktarlarda karıştırılarak teorik oranda %50 konsantrasyonda havuz; düşük-seviye havuz ile %50'lik havuz eşit miktarlarda karıştırılarak %25'lik havuz; yüksek-seviye havuz ile %50'lik eşit miktarda karıştırılarak %75'lik havuz ve böylece toplam beş farklı interferan konsantrasyonunda havuz elde edilmiş oldu. Bu beş havuzdan cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı. Elde edilen bu beş numune, aynı analitik çalışma içerisinde analiz edildi. Üç tekrarlı çalışma için; 1. tekrar interferan

konsantrasyonu artan sırada, 2. tekrar azalan ve 3. tekrar artan sırada analiz edildi. Aynı işlem yüksek seviyeli serum havuzu içinde yapıldı.

İnterferans çalışmasında ki diğer parametreler için metanol ile 12.5 µg/L ve 200 µg/L'lik kortizol standartları, 6.25 µg/L ve 100 µg/L'lik 17-OHP standartları ve 150 mg/dl ve 1500 mg/dl'lik kolesterol standartları hazırlandı. Kortikosteron interferans çalışmasında ki işlemler bu parametreler içinde tekrarlandı ve aynı şekilde analiz edildi.

### **Numune Stabilitesi**

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakanlarından üç seviye serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan üç seviye serum havuzundan ilk oluşturulduğu gün cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numune hazırlandı ve analiz edildi. Sonra serum havuzları 15. gün, 30. gün ve 45. gün analiz edilmek için porsiyonlanıp -20°C'de saklandı.

11-deoksikortizolün tekrarlayan don-çözlerdeki stabilitesi içinde aynı şekilde iki seviye serum havuzu oluşturuldu. Oluşturulan iki seviye serum havuzundan ilk oluşturulduğu gün cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlandı ve analiz edildi. Sonra porsiyonlanmadan -20°C'de saklandı. Belli aralıklar ile 4 kere çözdürülüp analiz edilip tekrar donduruldu.

### **Referans Aralığı Doğrulama Çalışması**

Referans aralığı doğrulama çalışması için 20 sağlıklı kadın ve erkekte kan örnekleri alındı. Alınan örneklerden cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numune hazırlandı ve analiz edildi. Sonuçlar Mayo Medical Laboratuvarı 11-deoksikortizol referans aralıkları ile karşılaştırıldı. (<http://www.mayomedicallaboratories.com/> Erişim tarihi 2014).

### **3. 2. 5. 2. LC-MS/MS Yönteminde Örnek Hazırlama Prosedürü**

Örnek hazırlığında sıvı-sıvı ekstraksiyon kullanılmıştır.

- Cam tüpe 250 µL örnek ya da 11-deoksikortizol standart pipetlenir,

- 10 µg/L'lik 50 µl 11-deoksikortizol- $D_5$  internal standart eklenir,
- 3 ml dietileter eklenip 1 dakika boyunca vortekslenir,
- Sonra 13500 ×g 10 dk santrifüj edilir,
- Üst faz temiz tüpe alınır (yaklaşık 3ml),
- Üst fazı alınan tüpe tekrar 3 ml dietileter konur 1 dk vortekslenir, vortekslenen tüp 13500 ×g 10 dk santrifüj edilir üst fazı ilk üst fazı alınan tübe alınır,
- Üst fazların alındığı tüp azot gazı altında uçurulur,
- Uçurulan tüplere %0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözeltisinden (50 ml %100 metanole 50 µl formik asit konularak hazırlandı) 200µl koyarak çözülür,
- Oluşan karışımı viallere alıp cihaza enjekte ettirilir.

### **3. 2. 5. 3. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması**

Yöntemlerin kıyaslanması için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakalanlarından 83 numunede 11-deoksikortizol üç yöntemle de analiz edildi. LC-MS/MS ölçümleri, belirtilen şekilde numune hazırlanıp ve belirtilen yöntem uygun şekilde ABSCIEX API3200 cihazında analiz edildi. ELISA analizi Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Araştırma Laboratuvarı'nda Cusabio markalı (Lot. No. A13166922) 11-deoksikortizol ELISA kiti ile Rayto RT-2600+microplate washer ve Rayto RT-2100c microplate reader cihazlarında yapıldı. 11 deoksikortizol RIA çalışması Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Anabilim dalımızda RIA laboratuvarı olmadığı için akredite bir laboratuvar olan Ankalab Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde yapıldı. DIA Source markalı (Lot. No. 142905) 11-deoksikortizol RIA kiti ile Stratec markalı PC-RIA-MAS cihazında çalışılmıştır.

### **3. 3. 11-Deoksikortizol ELISA Ölçümü**

#### **3. 3. 1. 11-Deoksikortizol ELISA Kiti Test Prensipleri**

Cusabio markalı (Lot. No. A13166922) 11-deoksikortizol ELISA kiti kullanıldı.

Bu test, yarışmalı inhibisyon enzim immünassay teknolojisini kullanmaktadır.

Bu kit içindeki mikrotitre plate bir antijen ile ön kaplamaya tabi tutulmuştur. Standartlar veya numuneler uygun mikrotitre plate kuyucuğa 11-deoksikortizol için spesifik antikor ve Horseradish Peroksidaz (HRP) konjuge goat-anti-rabbit antikor ile birlikte ilave edilmektedirler. Mikrotitre platede ön kaplama ile olan 11-deoksikortizol ve numunelerdeki 11-deoksikortizol arasında yarışmalı inhibisyon reaksiyonu başlamaktadır. Substrat solüsyonu kuyucuklara ilave edilir ve numunelerdeki 11-deoksikortizol miktarı ile ters orantılı olarak renklenme gerçekleşir. Renk gelişimi durdurulur ve rengin yoğunluğu ölçülür.

### **3. 3. 2. 11-Deoksikortizol ELISA Kitindeki Reaktiflerin Hazırlanması**

Çalışmaya başlamadan önce reaktifleri oda ısısında (18-25°C) 30 dakika boyunca bekletilmektedir.

Antibody reaktifini hazırlamak için kit prospektüsünün önerisi olan 1/100 dilüsyonu yapmak için 60 µl lik antibodyye 5940 µl antibody dilüent eklenmiştir.

HRP conjugate reaktifini hazırlamak için kit prospektüsünün önerisi olan 1/100 dilüsyonu yapmak için 120 µl lik HRP conjugate 11880 µl HRP conjugate dilüent eklenmiştir.

20 ml wash buffer konsantreye distile su ekleyerek hacmi 500 ml'ye tamamlanmıştır.

### **3. 3. 3. 11-Deoksikortizol ELISA Kitindeki Standartları Hazırlama**

400 pmol/mol'lük dondurularak kurutulmuş standart kit prospektüsünde önerildiği gibi 1 ml sample dilüent eklenerek çözündürüldü. Diğer standart konsantrasyonları elde etmek için 6 tane boş tüpe 150 µl sample dilüent konuldu. Sonra 100 pmol/mol'lük standardı elde etmek için 400 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 25 pmol/mol'lük standardı elde etmek için 100 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 6,25 pmol/mol'lük standardı elde etmek için 25 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 1,56 pmol/mol'lük standardı elde etmek için 6,25 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 0,39 pmol/mol'lük standardı elde etmek için 1,56 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 0,098

pmol/mol'lük standardı elde etmek için 0,39 pmol/mol'lük standarttan 50 µl, 150 µl sample dilüent konan tüpe ilave edildi. 0 konsantrasyonlu standart için 150 µl sample dilüent koyduğumuz tüp kullanıldı.

### **3. 3. 4. 11-Deoksikortizol ELISA Kiti Çalışma Prosedürü**

- Kit kutusu içinden çıkan mikrotitre plate blank kuyucuğu boş kalacak şekilde 50 µl standartlar ve numuneler pipetlendi.
- Sonra hemen blank kuyucuğu hariç standart ve numune koyduğumuz kuyucuklara 50 µl antibody ilave edilip 40 dakika 37°C de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası Rayto RT-2600+microplate washer cihazında wash buffer ile her seferinde her kuyucuk 200 µl ile 3 kez yıkandı.
- Yıkanan mikrotitre plate blank kuyucuğu hariç standart ve numune koyduğumuz kuyucuklara 100 µl HRP conjugate ilave edilip 30 dakika 37°C de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası Rayto RT-2600+microplate washer cihazında wash buffer ile her seferinde her kuyucuk 200 µl ile 5 kez yıkandı.
- Yıkanan mikrotitre plate blank kuyucuğu dahil standart ve numune koyduğumuz kuyucuklara 90 µl TMB Substrate ilave edilip ışısız bir ortamda 20 dakika 37°C de inkübe edildi.
- İnkübasyon sonrası mikrotitre plate blank kuyucuğu dahil standart ve numune koyduğumuz kuyucuklara 50 µl Stop solüsyonu ilave edilip 5 dk içinde 450 nm dalga boyunda Rayto RT-2100c microplate reader cihazında okutuldu.

### **3. 4. 11-Deksikortizol RIA Ölçümü**

#### **3. 4. 1. 11-Deoksikortizol RIA Kiti Test Prensibi**

11 deoksikortizol RIA çalışması Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Anabilim dalımızda RIA laboratuvarı olmadığı için akredite bir laboratuvar olan Ankalab Laboratuvarı'nda hizmet alımı şeklinde yapıldı. DIA Source markalı (Lot. No. 142905) 11-deoksikortizol RIA kiti ile Stratec markalı PC-RIA-MAS cihazında çalışılmıştır.

11-deoksikortizol antikoru kaplı tüplerde kontrollerdeki, kalibratörlerdeki, numunelerdeki 11-deoksikortizol ile  $i^{125}$ -11-deoksikortizol bağlanmak için yarışır.

$i^{125}$ -11-deoksikortizol ve kaplamalı antikor konsantrasyonları sabit olduğundan yarışma koşulunun devamı 11-deoksikortizol konsantrasyonlarına bağlıdır. Kaplı tüplere bağlı  $i^{125}$ -11-deoksikortizol miktarı numunelerdeki 11-deoksikortizol konsantrasyonuyla ters orantılıdır.

İnkübasyon sonrası, bağlı olmayan  $i^{125}$  etiketli 11-deoksikortizol fazlalıklarını uzaklaştırmak için tüp aspire edilir. Hasta numune konsantrasyonları kalibrasyon grafiği çizdirilip okutulur.

#### **3. 4. 2. 11-Deoksikortizol RIA Kiti Çalışma Prosedürü**

- Kalibratörler, kontroller ve numuneler uygun tüplere 25 µl pipetlenir.
- Sonra her bir tüpe 500 µl  $i^{125}$ -11-deoksikortizol tracer pipetlenir.
- Vortekslenir ve tüplerin üzeri kapatılıp 2.5 saat  $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilir.
- Tüm tüplerdeki solüsyon dikkatlice aspire edilir veya süzülür (süzmeden önce her bir tüpe 2 ml washing solüsyon ilave edilir.)
- Tekrar her bir tüpe 2 ml washing solüsyon ilave edilir. Dikkatlice aspire edilir veya süzülür.
- Her bir tüpe bağlanmış radyoaktif en az 60 saniye içinde ölçülür.

#### **3. 5. İstatistiksel Analiz**

Metot validasyon parametrelerinden doğrusallık, limit of blank, carryover (taşıma) ve kesinlik EP Evaluator programında hesaplandı. LC-MS/MS, RIA ve ELISA yöntemlerinin karşılaştırılmasında Passing-Bablok regresyon analizi ve Bland-Altman grafiği yapılırken Med Calc istatistik programı kullanıldı. Regresyon analizleriyle yöntemlerin intercept ve slope değerleri belirlendi.

## 4. BULGULAR

### 4. 1. Metot Validasyon Parametreleri

#### 4. 1. 1. Doğrusallık (Linearite) Çalışması

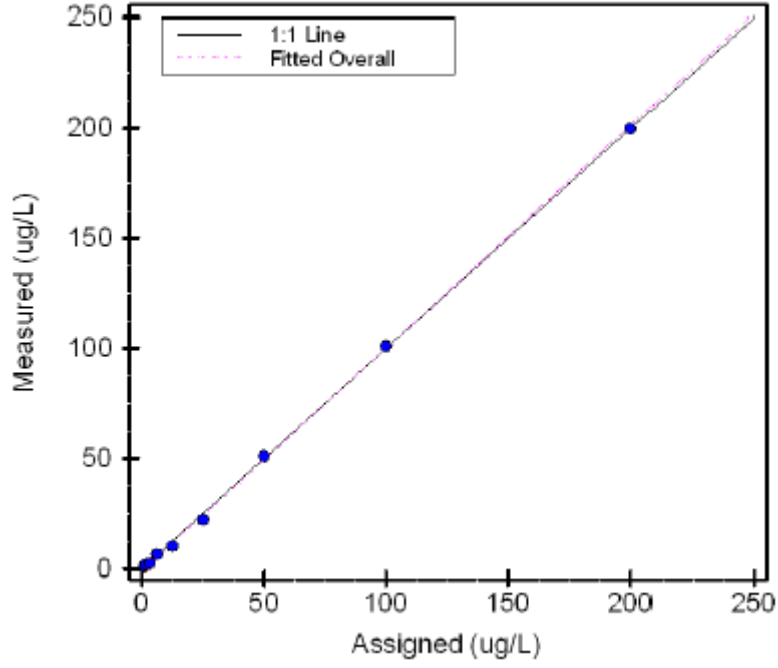
11-deoksikortizol için linearite belirleme çalışmasında 200 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından seri dilüsyonla 100 µg/L, 50 µg/L, 25 µg/L, 12.5 µg/L, 6.25 µg/L, 3.125 µg/L, 1.56 µg/L ve 0.78 µg/L'lik standartlar elde edilerek kullanıldı. 11-deoksikortizol için linearite belirleme çalışmasının sonuçları Tablo 4. 1.'de gösterilmektedir.

**Tablo 4. 1.** 11-deoksikortizol için linearite çalışmasında elde edilen veriler

11-deoksikortizol Konsantrasyonları (µg/L)	1. Ölçülen Değer (µg/L)	2. Ölçülen Değeri (µg/L)	1. ve 2. Ölçülen Değerlerin Ortalaması (µg/L)	Uygunluk (%)	Dilüsyon No
200	201	199	200	100	1
100	100	102	101	101	2
50	53	49	51	102	3
25	21.1	23.5	22.3	89	4
12.5	10.1	10.3	10.2	81.3	5
6.25	6.33	6.75	6.54	105	6
3.125	2.29	2.39	2.34	75	7
1.56	1.65	1.73	1.69	109	8
0.78	0.781	0.791	0.786	101	9

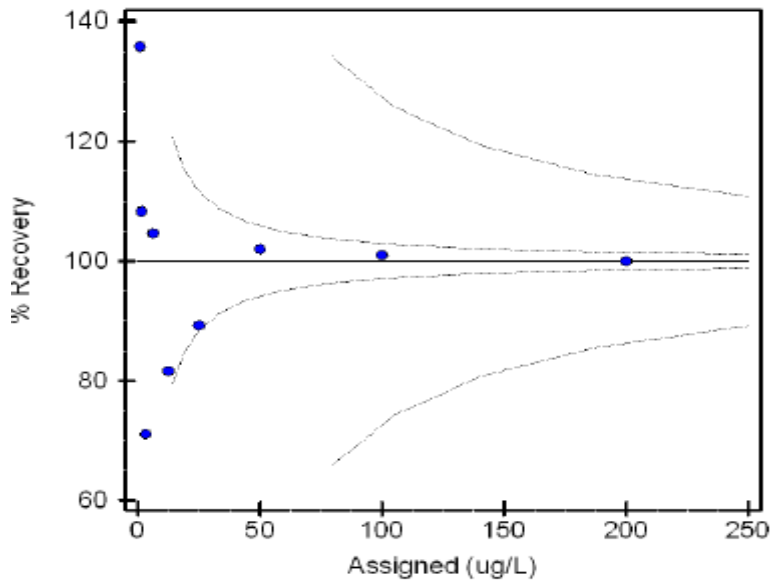
Tablo 4. 1.'de çift çalışılarak ölçülen 200 µg/L, 100 µg/L, 50 µg/L, 25 µg/L, 12.5 µg/L, 6.25 µg/L, 3.125 µg/L, 1.56 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol standartlarının ortalaması görülmektedir. Ölçülen değer, standartların değerine bölünüp sonuç 100 ile çarpılarak uygunluk yüzdeleri bulundu. Bulunan uygunluk yüzdeleri ile 0.78- 200 µg/L arasında 11-deoksikortizol linear saptanmıştır.

11-deoksikortizol için 0.78-200 µg/L için EP Evaluator istatistik programında çizilen linearite grafiği Şekil 4. 1'de görülmektedir. Linearite grafiğinin slope değeri 1.015, intercept değeri (-1.399) olarak saptanmıştır. Linearite grafiğinin denklemi  $y = (-1.399) + 1.015 x$  olarak bulundu.  $R^2$  değeri; 0.9996 olarak bulundu.



**Şekil 4. 1.** 11-deoksikortizol için 0.78-200 µg/L için linearite grafiği.

Linearite çalışmasındaki 11-deoksikortizol standartlarının EP Evaluator istatistik programında çizilen %recovery dağılım grafiği Şekil 4. 2. de görülmektedir. Düşük dozlarda belirsizliğin %30 değerlere yaklaştığı görülmektedir. Artan konsantrasyon ile belirsizlik önemli oranda azalmaktadır.



**Şekil 4. 2.** 11-deoksikortizol linearite çalışmasında kullanılan 0.78-200 µg/L'lik standartların % recovery dağılım grafiği.



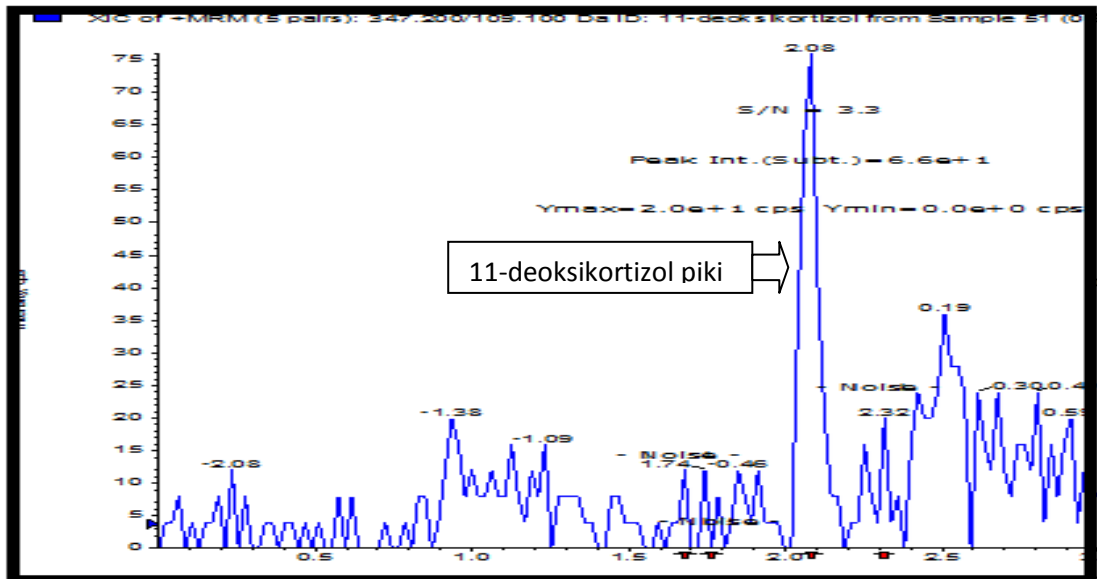
#### 4. 1. 2. Tayin Limitlerini Belirleme Çalışması

LOB'u belirlemek için sadece BSA-PBS içeren ve BSA-PBS ile hazırlanan 0.19 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından cihaza okutulmak üzere LC-MS/MS yönteminde örnek hazırlama prosedürüne uygun numuneler hazırlanıp 60 tekrar olacak şekilde 5 gün ölçüm yapılır. BSA-PBS tekrarlı analiz değerlerinin ortalaması 0.06204 ve SD değeri 0.02738, BSA-PBS ile hazırlanan 0.19 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analiz değerlerinin ortalaması 0.24639 ve SD değeri 0.05281 ve yöntemin limit of blank değeri 0.0564 µg/L (µg/L) olarak belirlendi (Şekil 4. 3.).

Sensitivity Statistics		
2 SD Limit of Blank (95% Conf): 0,0564 ug/L		
Manufacturer's Claim: -		
Passes: -		
Response Statistics		
Concentration	Mean	SD
0	0,06204	0,02738
0,19	0,24639	0,05281

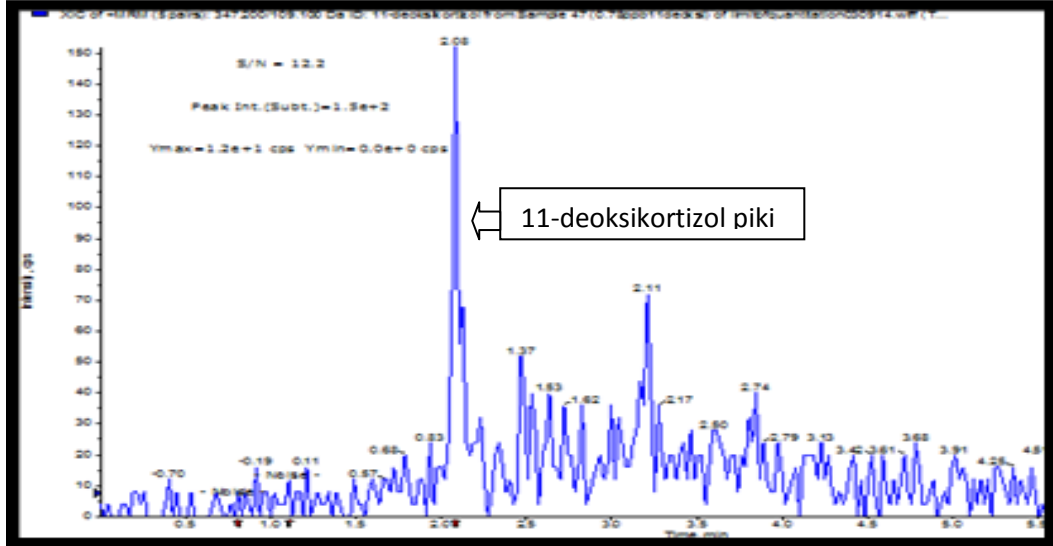
**Şekil 4. 3.** Limit of blank değeri ve BSA-PBS içeren ve BSA-PBS ile hazırlanan 0.19 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından elde edilen 20 okutmanın ortalama ve SD değerleri.

LC-MS/MS 11-deoksikortizol analiz yönteminde sinyal/gürültü oranının 4 (S/N=4) olduğu 0.39 µg/L (µg/L) değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi (Şekil 4. 4.).



**Şekil 4. 4.** LC-MS/MS 11-deoksikortizol analiz yönteminin dedeksiyon limitinin belirlendiği sinyal/gürültü oranı.

LC-MS/MS 11-deoksikortizol analiz yönteminde sinyal/gürültü oranının 12.2 (S/N=12.2) olduğu 0.78 µg/L (µg/L) değeri kantitasyon limiti olarak belirlendi (Şekil 4. 5.).



Şekil 4. 5. LC-MS/MS 11-deoksikortizol analiz yönteminin kantitasyon limitinin belirlendiği sinyal/gürültü oranı.

#### 4. 1. 3. Kesinliklik (Tekrarlanabilirlik) Çalışması

11-deoksikortizol için izin verilebilir hata düzeyi 27.1 ve %bias değeri 9.5 olarak <http://www.westgard.com/> adresinde belirtilen değerler kullanılmıştır (Şekil 4. 6.).

Note on abbreviations:  
CVw = within-subject biologic variation  
CVg = between-subject biologic variation  
I = desirable specification for imprecision  
B = desirable specification for inaccuracy  
TE = desirable specification for allowable total error

	Analyte	Number of Papers	Biological Variation		Desirable specification		
			CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
S-	11-Desoxycortisol	2	21.3	31.5	10.7	9.5	27.1

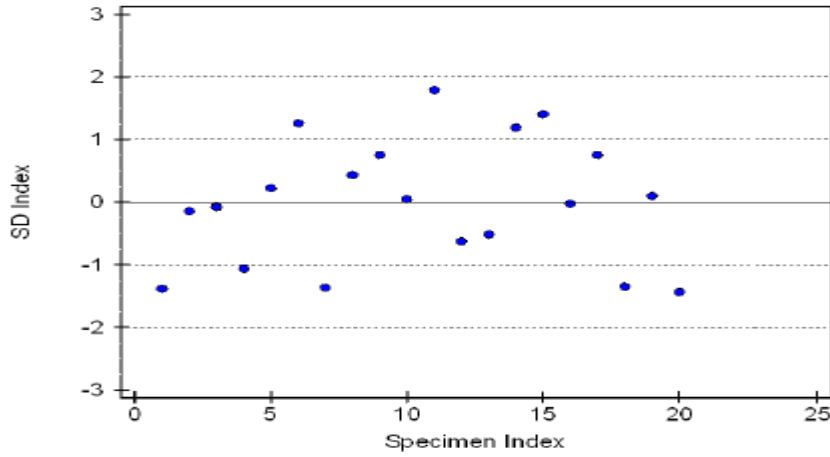
Şekil 4. 6. 11-deoksikortizol için izin verilebilir hata düzeyi ve %bias değeri olarak <http://www.westgard.com/> (Erişim Tarihi 2014) adresinde belirtilen düzeyleri.

Tekrarlanabilirlik çalışması da çalışma içi, çalışmalar arası gün içi ve günler arası şeklinde yapılmıştır.

#### 4. 1. 3. 1. Çalışma İçi Kesinlik Çalışması

Bu çalışma için 0.78, 12.5 ve 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartları aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışıldı.

Çalışma içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 7. de görülmektedir.



Şekil 4. 7. Çalışma içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

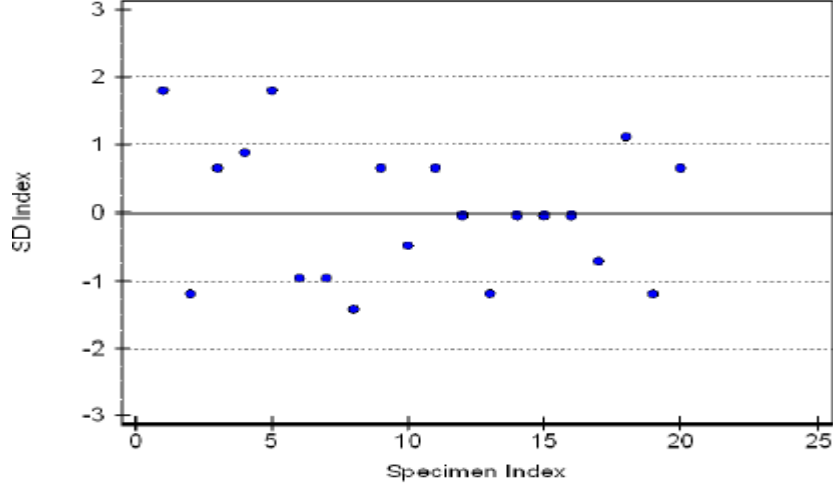
Çalışma içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 0.7647 µg/L, 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için %CV 5.3 ve SD değeri ise 0.0404 olarak bulundu (Şekil 4. 8.).

Precision Statistics			
Mean	0,7647 ug/L	95% Confidence for Mean	0,7458 to 0,7836
Standard Deviation (SD)	0,0404	2 SD Range	0,6839 to 0,8455
95% Confidence for SD	0,0307 to 0,0590	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	5,3%	Number of Outliers	-

Şekil 4. 8. Çalışma içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

0.78 µg/L 11-deoksikortizol için ortalama değerimizin %27.1'ini izin verilebilir hata kabul edersek 0.78'in %27.1'i olan 0.211 µg/L izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, TEa'nın 1/4'dür. 0.78 µg/L 11-deoksikortizolde izin verilebilir SD:  $0.211 \times 0.25 = 0.053$ 'dir.  $0.0404 < 0.053$  olduğundan 0.78 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışma içi kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışma içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 9. de görülmektedir.



**Şekil 4. 9.** Çalışma içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

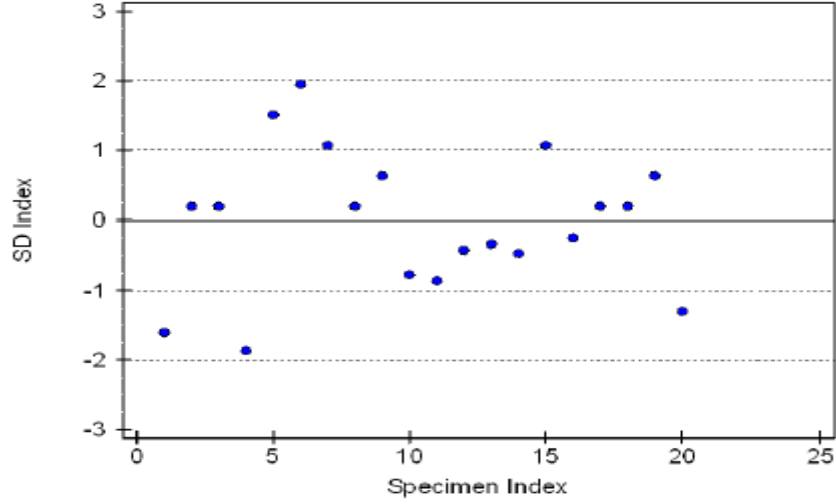
Çalışma içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 12.82 µg/L, 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için %CV 3.4 ve SD değeri ise 0.44 olarak bulundu (Şekil 4. 10.).

Precision Statistics			
Mean	12,82 ug/L	95% Confidence for Mean	12,61 to 13,02
Standard Deviation (SD)	0,44	2 SD Range	11,94 to 13,69
95% Confidence for SD	0,33 to 0,64	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	3,4%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 10.** Çalışma içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

12.5 µg/L 11-deoksikortizol için 3.39 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 0.85 izin verilebilir SD'dir.  $0.44 < 0.85$  olduğundan 12.5 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışma içi kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 11. de görülmektedir.



**Şekil 4. 11.** Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının aynı çalışma içinde ardı ardına 20 kez çalışılmasından elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 100.55 µg/L, 100 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için %CV 2.3 ve SD değeri ise 2.28 olarak bulundu (Şekil 4. 12.).

Precision Statistics			
Mean	100,55 ug/L	95% Confidence for Mean	99,49 to 101,62
Standard Deviation (SD)	2,28	2 SD Range	96,00 to 105,11
95% Confidence for SD	1,73 to 3,33	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	2,3%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 12.** Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

100 µg/L 11-deoksikortizol için 27.1 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 6.77 izin verilebilir SD'dir. 2.28<6.77 olduğundan 100 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri Tablo 4. 2. de görülmektedir.

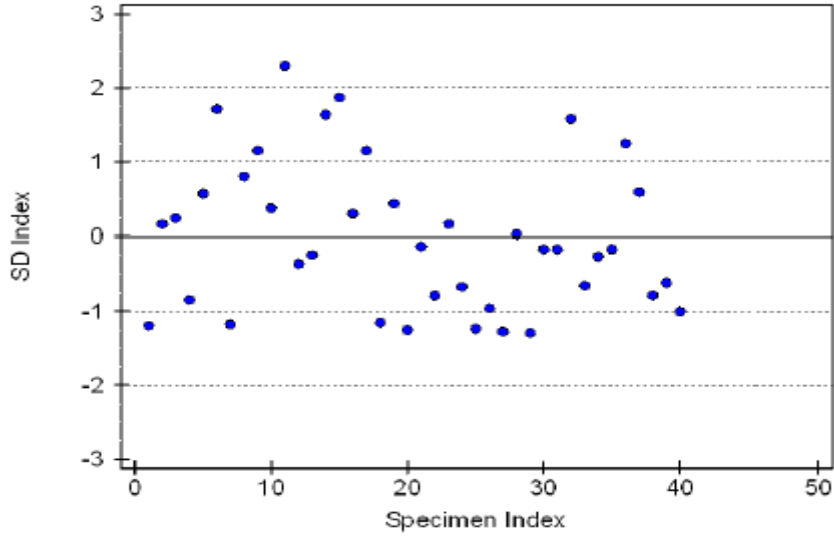
**Tablo 4. 2.** Çalışma içi kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri.

Konsantrasyon	Ortalama (µg/L)	SD	%CV
100 µg/L	100.55	2.28	2.3
12.5 µg/L	12.82	0.44	3.4
0.78 µg/L	0.7647	0.0404	5.3

#### 4. 1. 3. 2. Çalışmalar Arası Gün İçi Kesinlik Çalışması

Çalışmalar arası gün içi kesinlik çalışmasında 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L 11-deoksikortizol standartları kullanıldı.

Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 13. de görülmektedir.



**Şekil 4. 13.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

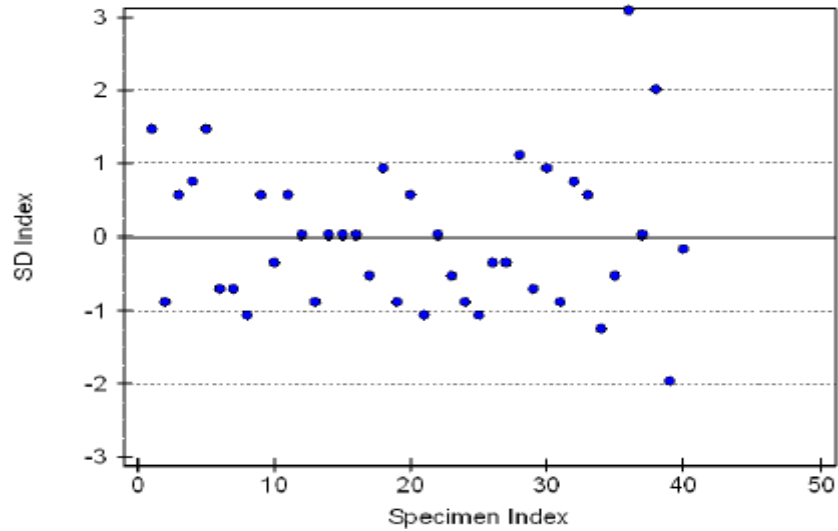
Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 0.7815 µg/L, 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için % CV 6.6 ve SD değeri ise 0.0515 olarak bulundu (Şekil 4. 14.).

Precision Statistics			
Mean	0,7815 ug/L	95% Confidence for Mean	0,7650 to 0,7980
Standard Deviation (SD)	0,0515	2 SD Range	0,6784 to 0,8846
95% Confidence for SD	0,0422 to 0,0662	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	6,6%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 14.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

0.78 µg/L 11-deoksikortizol için ortalama değerimizin % 27.1'ini izin verilebilir hata kabul edersek 0.78'in % 27.1'i olan 0.211 µg/L izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, TEa'nın 1/4'dür. 0.78 µg/L 11-deoksikortizolde izin verilebilir SD:  $0.211 \times 0.25 = 0.053$ 'dir.  $0.0515 < 0.053$  olduğundan 0.78 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışmalar arası gün içi kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 15. de görülmektedir.



**Şekil 4. 15.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

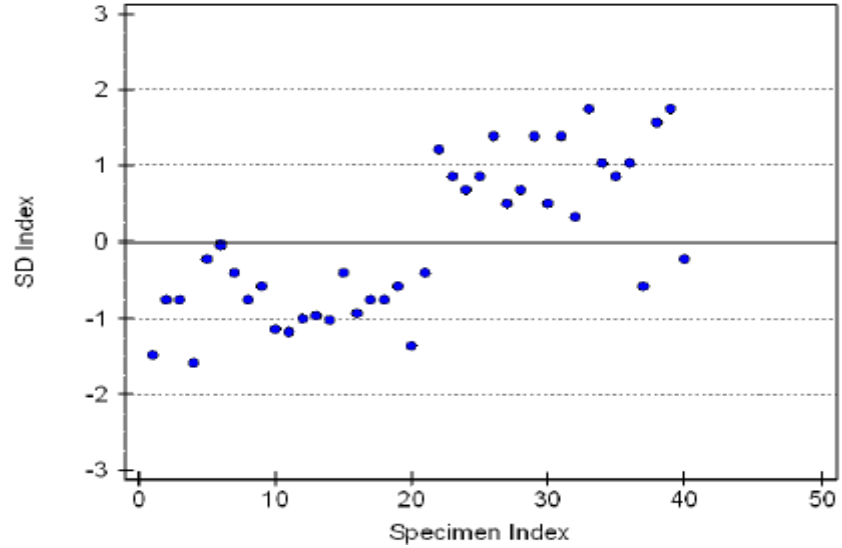
Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 12.79 µg/L, 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için %CV 4.3 ve SD değeri ise 0.55 olarak bulundu (Şekil 4. 16.).

Precision Statistics			
Mean	12,79 ug/L	95% Confidence for Mean	12,61 to 12,96
Standard Deviation (SD)	0,55	2 SD Range	11,68 to 13,89
95% Confidence for SD	0,45 to 0,71	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	4,3%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 16.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve % CV değerleri.

12.5 µg/L 11-deoksikortizol için 3.39 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 0.85 izin verilebilir SD'dir.  $0.55 < 0.85$  olduğundan 12.5 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışmalar arası gün içi kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 17. de görülmektedir.



**Şekil 4. 17.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.



Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 105.20 µg/L, 100 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için %CV 5.3 ve SD değeri ise 5.61 olarak bulundu (Şekil 4. 18.).

Precision Statistics			
Mean	105,20 ug/L	95% Confidence for Mean	103,41 to 107,00
Standard Deviation (SD)	5,61	2 SD Range	93,97 to 116,43
95% Confidence for SD	4,60 to 7,21	Number of Specimens (N)	40 of 40
Coefficient of Variation (CV)	5,3%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 18.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve % CV değerleri.

100 µg/L 11-deoksikortizol için 27.1 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 6.775 izin verilebilir SD'dir. 5.61<6.775 olduğundan 100 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışmalar arası gün içi kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri Tablo 4. 3. de görülmektedir.

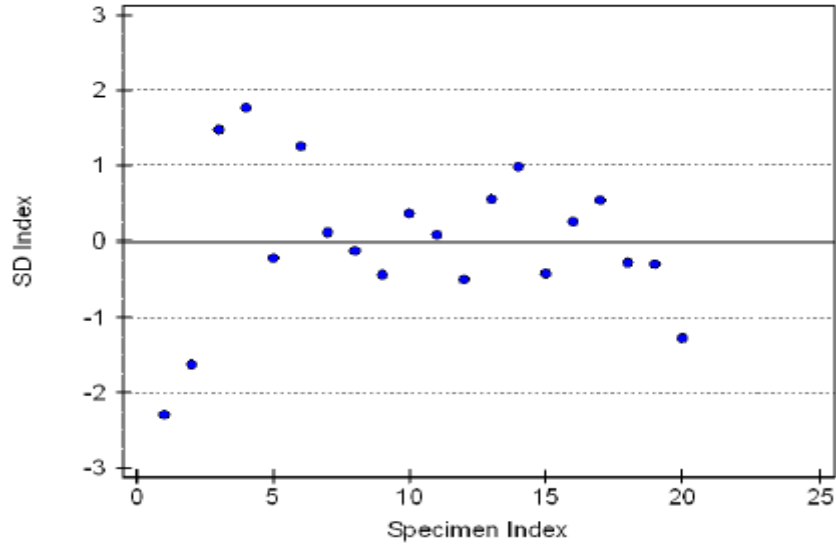
**Tablo 4. 3.** Çalışmalar arası gün içi kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri.

Konsantrasyon	Ortalama (µg/L)	SD	%CV
100 µg/L	105.20	5.61	5.3
12.5 µg/L	12.79	0.55	4.3
0.78 µg/L	0.7815	0.0515	6.6

#### 4. 1. 3. 3. Günler Arası Kesinlik Çalışması

Günler arası kesinlik çalışmasında 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L 11-deoksikortizol standartları kullanıldı.

Günler arası kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 19. de görülmektedir.



**Şekil 4. 19.** Günler arası kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

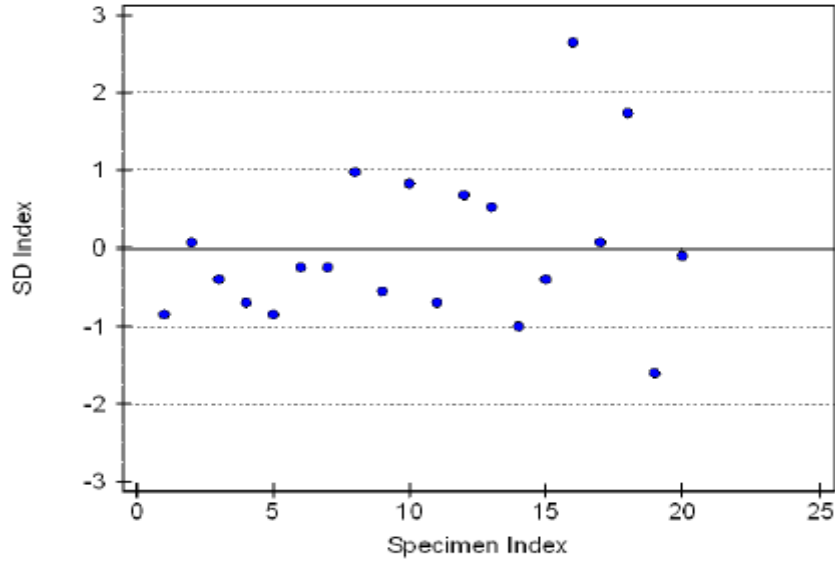
Günler arası kesinlik deneyinde 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 0.7270 µg/L, 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için % CV 8.6 ve SD değeri ise 0.0628 olarak bulundu (Şekil 4. 20.).

Precision Statistics			
Mean	0,7270 ug/L	95% Confidence for Mean	0,6976 to 0,7564
Standard Deviation (SD)	0,0628	2 SD Range	0,6013 to 0,8527
95% Confidence for SD	0,0478 to 0,0918	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	8,6%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 20.** Günler arası kesinlik deneyinde 0.78 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

0.78 µg/L 11-deoksikortizol için ortalama değerimizin % 27.1'ini izin verilebilir hata kabul edersek 0.78'in % 27.1'i olan 0.211 µg/L izin verilebilir hata düzeyidir. İzin verilebilir SD, TEa'nın 1/3'dür. 0.78 µg/L 11-deoksikortizolde izin verilebilir SD:  $0.211 \times 0.33 = 0.07$ 'dir.  $0.0628 < 0.07$  olduğundan 0.78 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için günler arası kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Günler arası kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 21. de görülmektedir.



**Şekil 4. 21.** Günler arası kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

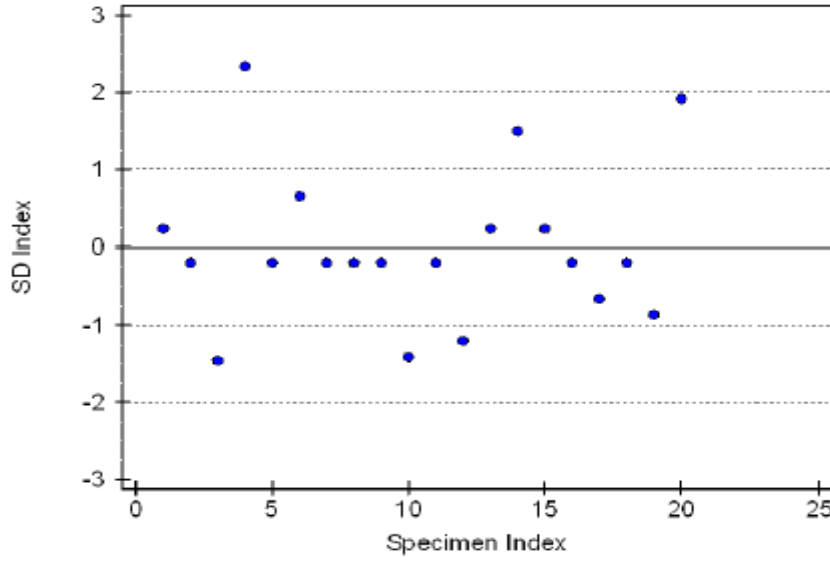
Günler arası kesinlik deneyinde 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 12.75 µg/L, 12.5 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için % CV 5.2 ve SD değeri ise 0.66 olarak bulundu (Şekil 4. 22.).

Precision Statistics			
Mean	12,75 ug/L	95% Confidence for Mean	12,45 to 13,06
Standard Deviation (SD)	0,66	2 SD Range	11,44 to 14,07
95% Confidence for SD	0,50 to 0,96	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	5,2%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 22.** Günler arası kesinlik deneyinde 12.5 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

12.5 µg/L 11-deoksikortizol için 3.39 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 1.12 izin verilebilir SD'dir. 0.66<1.12 olduğundan 12.5 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için günler arası kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği Şekil 4. 23. de görülmektedir.



**Şekil 4. 23.** Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardının analizinden elde edilen değerlerin dağılım grafiği.

Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması 101.45 µg/L, 100 µg/L 11-deoksikortizol değerleri için % CV 2.3 ve SD değeri ise 2.37 olarak bulundu (Şekil 4. 24.).

Precision Statistics			
Mean	101,45 ug/L	95% Confidence for Mean	100,34 to 102,56
Standard Deviation (SD)	2,37	2 SD Range	96,71 to 106,19
95% Confidence for SD	1,80 to 3,46	Number of Specimens (N)	20 of 20
Coefficient of Variation (CV)	2,3%	Number of Outliers	-

**Şekil 4. 24.** Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L'lik konsantrasyon için bulunan ortalama, SD ve %CV değerleri.

100 µg/L 11-deoksikortizol için 27.1 µg/L izin verilebilir hata düzeyi ve 8.943 izin verilebilir SD'dir. 2.37<8.943 olduğundan 100 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için günler arası kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri Tablo 4. 4. de görülmektedir.

**Tablo 4. 4.** Günler arası kesinlik deneyinde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol değerlerinin ortalaması, SD ve %CV değerleri.

Konsantrasyon	Ortalama (µg/L)	SD	%CV
100 µg/L	101.45	2.37	2.3
12.5 µg/L	12.75	0.66	5.2
0.78 µg/L	0.7270	0.0628	8.6

#### 4. 1. 4. Recovery (Geri Elde) Çalışması

Geri elde çalışması için 4 tüpe konulan serum havuzuna değişik dozlarda 11-deoksikortizol eklendi. Çalışma dizaynı;

Birinci tüp; 900 µl serum havuzu ve 100 µl BSA-PBS içermektedir.

İkinci tüp; 900 µl serum havuzu ve 100 µl 200 µg/L 11-deoksikortizol standardı içermektedir.

Üçüncü tüp; 900 µl serum havuzu ve 100 µl 50 µg/L 11-deoksikortizol standardı içermektedir.

Dördüncü tüp; 900 µl serum havuzu ve 100 µl 12.5 µg/L 11-deoksikortizol standardı içermektedir.

Birinci tüpte okunan değer ile ikinci, üçüncü ve dördüncü tüplerde okunan değerler arasındaki fark hesaplanarak geri elde edilen miktar bulundu. Yüzde geri elde edilen oran ise; geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplandı. Geri elde çalışmasının verileri Tablo 4. 5. de görülmektedir.

**Tablo 4. 5.** Geri elde çalışmasında birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü tüplere eklenen değerler, tüplerde okunan değerler, tüplerden geri elde değerleri ve % geri elde miktarları

	<b>Birinci Tüp</b>	<b>İkinci Tüp</b>	<b>Üçüncü Tüp</b>	<b>Dördüncü Tüp</b>
<b>Eklenen Değer (µg/L)</b>	0	1.25	5	20
<b>Okunan Değer (µg/L)</b>	0.524	1.64	4.97	17.9
<b>Geri Elde Değeri (µg/L)</b>		1.116	4.446	17.376
<b>% Geri Elde</b>		89.28	88.92	86.88

% Geri elde ortalaması %88.36 olarak bulundu. Orantılı hatayı bulmak için % geri elde ortalaması 100'den çıkartıldı ve 11.64 olarak bulundu.

#### **4. 1. 5. Matriks Etkisi Çalışması**

0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartları kullanıldı. Çalışma sonucunda elde edilen pik alanları aşağıdaki formülle hesaplanarak % matriks etkisi bulundu.

$$\% \text{Matriks Etkisi} = [(A/B) - 1] \times 100 \text{ (Chambers ve ark 2007)}$$

A: Analiz için hazırlanan serum havuzu azot gazı altında uçurulduktan sonra %0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözeltisinden 200µl koyarak çözüldükten sonra viallere konulmadan önce 0.78 µg/L, 12.5 µg/L veya 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standardından 200 µl eklenip oluşan karışımdan 200 µl vialle alıp analiz edildikten sonra elde edilen pikin alanı A ile temsil edildi.

B: Boş bir cam tüpe metanol ile hazırlanan 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartlarından A'da hangi seviye kullanıldıysa 200 µl pipetlenip üzerine %0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözeltisinden 200µl pipetlenip oluşan karışımdan vialle 200 µl alınıp analiz edildikten sonra elde edilen pikin alanı B ile temsil edildi.

Matriks etkisi çalışmasında 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartlarının %matriks etkisi değeri sırasıyla (-9.94), 4.84 ve (-7.22) olarak hesaplandı (Tablo 4. 6.).

**Tablo 4. 6.** Matriks etkisi çalışmasının verileri

	<b>Pik Alanı (counts)</b>	<b>Hesaplama</b>	<b>%Matriks Etkisi</b>
<b>Serum havuzu + 0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı</b>	$3.26 \times 10^2 (A_{0.78})$	$[(A_{0.78}/B_{0.78})-1] \times 100$	-9.94
<b>0.78 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı+%0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözültüsü</b>	$3.62 \times 10^2 (B_{0.78})$		
<b>Serum havuzu + 12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı</b>	$4.76 \times 10^3 (A_{12.5})$	$[(A_{12.5}/B_{12.5})-1] \times 100$	4.84
<b>12.5 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı+%0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözültüsü</b>	$4.54 \times 10^3 (B_{12.5})$		
<b>Serum havuzu + 100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı</b>	$3.21 \times 10^4 (A_{100})$	$[(A_{100}/B_{100})-1] \times 100$	-7.22
<b>100 µg/L'lik 11-deoksikortizol standartı+%0,1'lik formik asit içeren %50'lik metanol çözültüsü</b>	$3.46 \times 10^4 (B_{100})$		

#### **4. 1. 6. Carryover (Taşıma) Çalışması**

Taşıma çalışmasında yüksek ve düşük doz taşınimleri araştırıldı.

Düşük konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyonlardan 1.grup oluşturuldu. 1. Grup 1: D2-D3-D6-D7-D8

Yüksek konsantrasyondan sonra gelen düşük konsantrasyonlardan da 2. grup oluşturuldu. 2. Grup 2: D4-D5-D9-D10-D11



Grup 1'in ortalaması 0.7046, SD'si 0.1297 ve grup 2'nin ortalaması 0.7316, SD'si 0.1166 olarak bulundu (Şekil 4. 25.).

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	0,587		
L2	0,601	0,601	
L3	0,589	0,589	
H1	108		
H2	99,7		
L4	0,796		0,796
H3	100		
H4	105		
L5	0,524		0,524
L6	0,644	0,644	
L7	0,830	0,830	
L8	0,859	0,859	
H5	104		
H6	96,7		
L9	0,766		0,766
H7	96,9		
H8	85,4		
L10	0,792		0,792
H9	93,9		
H10	104		
L11	0,78		0,78
<b>Mean</b>		<b>0,7046</b>	<b>0,7316</b>
<b>SD</b>		<b>0,1297</b>	<b>0,1166</b>

**Şekil 4. 25.** Taşıma çalışmasında 0.78 µg/L ve 100 µg/L 11-deoksikortizol standartlarının analizinde elde edilen değerler ve grup 1 ve grup 2'nin ortalama ve SD değerleri.

Taşıma çalışmasında elde edilen carryover değeri 0.0270 µg/L olarak tespit edildi (Şekil 4. 26.).

Carryover Analysis			
High-Low Mean	0,7316	Error Limit	0,3892
Low-Low Mean	0,7046	Passes?	Yes
Carryover	0,0270		

**Şekil 4. 26.** Taşıma çalışmasında elde edilen carryover değeri.

#### 4. 1. 7. İnterferans Çalışması

11-deoksikortizol ölçümüne kortizol, kortikosteron, kolesterol ve 17-OHP interferansının tespiti için yapılan çalışmada 11-deoksikortizol düzeyi düşük serum havuzundan D1 (yok denecek miktarda interferans içeren), D2 (%25 oranında interferans içeren), D3 (%50 oranında interferans içeren), D4 (%75 oranında interferans içeren) ve D5 (en fazla miktarda interferans içeren) tüpleri hazırlandı. Aynı şekilde 11-deoksikortizol düzeyi yüksek serum havuzundan Y1, Y2, Y3, Y4 ve Y5 tüpleri hazırlandı. İlk en yüksek miktarda interferan içeren D5 ve Y5 tüplerinden elde edilen üç okumanın ortalaması alındı ve interferan içermeyen BSA-PBS içeren serum havuzu ile farkı hesaplanıp interferan içermeyen BSA-PBS içeren serum havuzunun değerine bölünüp 100 ile çarpılarak %bias değerleri hesaplandı. Hesaplanan % bias değeri izin verilen %bias değerinden küçükse interfere etmemektedir denildi ve Y1, D1, Y2, D2, Y3, D3, Y4 ve D4 tüplerinin % biası hesaplanmadı. En yüksek konsantrasyonda interferan içeren tüpte interferans saptanmamışsa daha düşük konsantrasyonda interferans içeren tüplerde interferans saptanmayacağından daha düşük konsantrasyonlar hesaplamaya dahil edilmedi.

Kortizolün 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasında D5 tüpünden hesaplanan % bias 9.412 ve Y5 tüpünden hesaplanan % bias 2'dir (Tablo 4. 7.).

**Tablo 4. 7.** Kortizolün 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasının verileri.

	<b>BSA-PBS içeren Düşük Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>D5 tüpünden elde edilen üç okumanın ortalaması</b>	<b>BSA-PBS içeren Yüksek Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>Y5 tüpünden elde edilen üç okumanın ortalaması</b>
<b>Analiz Değerleri (µg/L)</b>	0.425	0.465	3.35	3.33
<b>% Bias</b>		9.412		2

Kullanılan en yüksek konsantrasyonda interferans saptanmadığı için daha düşük interferan içeren tüplerde hesaplama yapılmadı.

Kortikosteronun 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasında D5 tüpünden hesaplanan % bias 3 ve Y5 tüpünden hesaplanan % bias 6'dır (Tablo 4. 8.).

**Tablo 4. 8.** Kortikosteronun 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasının verileri.

	<b>BSA-PBS içeren Düşük Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>D5 tüpünden elde edile den üç oku manın ortalaması</b>	<b>BSA-PBS içeren Yüksek Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>Y5 tüpünden elde edilen üç okumanın ortalaması</b>
<b>Analiz Değerleri (µg/L)</b>	1.01	1.04	7.48	7.54
<b>% Bias</b>		3		6

Kullanılan en yüksek konsantrasyonda interferans saptanmadığı için daha düşük interferan içeren tüplerde hesaplama yapılmadı.

Kolesterolün 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasında D5 tüpünden hesaplanan % bias 2.9 ve Y5 tüpünden hesaplanan % bias 4'dür (Tablo 4.9.).

**Tablo 4. 9.** Kolesterolün 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasının verileri.

	<b>BSA-PBS içeren Düşük Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>D5 tüpünden elde edileden üç okumanın ortalaması</b>	<b>BSA-PBS içeren Yüksek Seviyeli Serum Havuzu</b>	<b>Y5 tüpünden elde edilen üç okumanın ortalaması</b>
<b>Analiz Değerleri (µg/L)</b>	0.401	0.43	2.38	2.42
<b>% Bias</b>		2.9		4

Kullanılan en yüksek konsantrasyonda interferans saptanmadığı için daha düşük interferan içeren tüplerde hesaplama yapılmadı.

17-OHP'nin 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasında D5 tüpünden hesaplanan % bias 0.53 ve Y5 tüpünden hesaplanan % bias 6.1'dir (Tablo 4. 10.).

**Tablo 4. 10.** 17-OHP'nin 11-deoksikortizol ölçümüne interferansı çalışmasının verileri.

	<b>BSA-PBS içeren düşük seviyeli serum havuzu</b>	<b>D5 tüpünden elde edilecek üç okumanın ortalaması</b>	<b>BSA-PBS içeren yüksek seviyeli serum havuzu</b>	<b>Y5 tüpünden elde edilen üç okumanın ortalaması</b>
<b>Analiz değerleri (µg/L)</b>	0.505	0.51	0.985	0.924
<b>% Bias</b>		0.53		6.1

Kullanılan en yüksek konsantrasyonda interferans saptanmadığı için daha düşük interferan içeren tüplerde hesaplama yapılmadı.

#### **4. 1. 8. Numune Stabilitesi Çalışması**

Düşük, orta ve yüksek seviyeli serum havuzlarının 15. gün, 30. gün ve 45. gün analiz değerlerinin ilk gün analiz değerine göre % biası hesaplandı.

Düşük, orta ve yüksek seviyeli serum havuzlarının 15. gün analizinden elde edilen % biaslar sırayla 3.5, 4.1 ve 5.7'dir (Tablo 4. 11.).

Düşük, orta ve yüksek seviyeli serum havuzlarının 30. gün analizinden elde edilen % biaslar sırayla 15.7, 14.6 ve 30'dur (Tablo 4. 11.).

Düşük, orta ve yüksek seviyeli serum havuzlarının 45. gün analizinden elde edilen % biaslar sırayla 87, 4.3 ve 33.5'dir (Tablo 4. 11.).

**Tablo 4. 11.** Numune stabilitesi çalışması verileri.

	<b>1.gün ölçülen değerler (µg/L)</b>	<b>15.gün ölçülen değerler (µg/L)</b>	<b>15.gün %Bias</b>	<b>30.gün ölçülen değerler (µg/L)</b>	<b>30.gün %Bias</b>	<b>45.gün ölçülen değerler (µg/L)</b>	<b>45.gün %Bias</b>
<b>Düşük seviye serum havuzu</b>	0.287	0.297	<b>+3.5</b>	0.242	<b>-15.7</b>	0.538	<b>+87</b>
<b>Orta seviye serum havuzu</b>	0.610	0.585	<b>-4.1</b>	0.521	<b>-14.6</b>	0.584	<b>-4.3</b>
<b>Yüksek seviye serum havuzu</b>	3.16	2.98	<b>-5.7</b>	2.21	<b>-30</b>	2.10	<b>-33.5</b>

#### **4. 1. 9. Don-öz alışması**

Düşük ve yüksek seviyeli serum havuzlarının birinci, ikinci, üçüncü ve dördüncü don-özden elde edilen analiz değerlerinin ilk gün analiz değerine göre % biası hesaplandı.

Düşük ve yüksek seviyeli serum havuzlarının birinci don-öz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 41.65 ve 32.85'dir (Tablo 4. 12.).

Düşük ve yüksek seviyeli serum havuzlarının ikinci don-öz analizinde elde edilen % bias değerleri sırasıyla 0.7 ve 3.1'dir (Tablo 4. 12.).

Düşük seviyeli serum havuzlarının üçüncü ve dördüncü don-öz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 19.53 ve 20.47'dir (Tablo 4. 12.).

Yüksek seviyeli serum havuzlarının üçüncü ve dördüncü don-öz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 13.64 ve 17.35'dir (Tablo 4. 12.).

**Tablo 4. 12.** Don-çöz çalışması verileri

	<b>Düşük serum havuzu</b>	<b>%Bias</b>	<b>Yüksek serum havuzu</b>	<b>%Bias</b>
<b>İlk gün analiz değeri (µg/L)</b>	0.425		4.84	
<b>Birinci don-çöz analiz değeri (µg/L)</b>	0.248	<b>-41.65</b>	3.25	<b>-32.85</b>
<b>İkinci don-çöz analiz değeri (µg/L)</b>	0.428	<b>+0.7</b>	4.69	<b>-3.1</b>
<b>Üçüncü don-çöz analiz değeri (µg/L)</b>	0.342	<b>-19.53</b>	4.18	<b>-13.64</b>
<b>Dördüncü don-çöz analiz değeri (µg/L)</b>	0.338	<b>-20.47</b>	4.00	<b>-17.35</b>

#### **4. 1. 10. LC-MS/MS, RIA ve ELISA Yöntemlerinin Kıyaslanması**

Üç yöntemle elde edilen 11-deoksikortizol ölçüm sonuçları, istatistiksel olarak değerlendirildi. Aralarındaki ilişkiyi incelemek amacıyla Med Calc istatistik programında Passing-Bablok regresyon analizi yapıldı.

Yöntemlerin kıyaslanması için Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuvarı'na rutin tahlil için gelen kanların artakalanlarından 83 numunede 11-deoksikortizol üç yöntemde de analiz edildi.

#### 4. 1. 10. 1. LC-MS/MS ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması

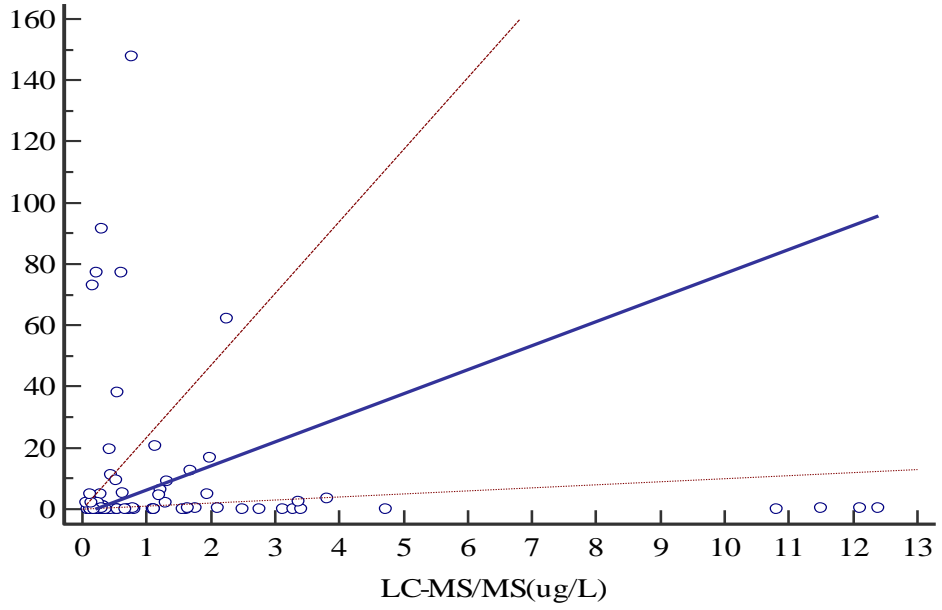
83 numunenin, LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinde ölçümü ile elde edilen 11-deoksikortizol değerlerinin Med Calc istatistik programında yapılan Passing-Bablok regresyon analizi sonucu slope değeri; (7.886463), intercept değeri; (-1.980166) olarak bulundu (Şekil 4. 27.). Regresyon analizindeki denklem olan  $y = a + bx$  denkleminde “a” değerini intercept ve “b” değerini slope yansıtmaktadır. Denklemde değerleri yerlerine koyduğumuzda  $y = (-1.980166) + (7.886463)x$  olarak denklem bulundu.

Variable X	LCMSMS	
Variable Y	ELISA	
Sample size	83	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,06350	0,0000
Highest value	12,4000	147,9200
Arithmetic mean	1,4213	8,7652
Median	0,5220	0,3000
Standard deviation	2,5332	24,2453
Standard error of the mean	0,2781	2,6613
<b>Regression Equation</b>		
$y = -1,980166 + 7,886463 x$		
<b>Systematic differences</b>		
Intercept A		-1,9802
95% CI		-8,5221 to -0,2609
<b>Proportional differences</b>		
Slope B		7,8865
95% CI		1,9387 to 23,4673
<b>Random differences</b>		
Residual Standard Deviation (RSD)		33,0431
± 1.96 RSD Interval		-64,7645 to 64,7645
<b>Linear model validity</b>		
Cusum test for linearity		Significant deviation from linearity (P<0,01)

Şekil 4. 27. LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinde 11-deoksikortizol sonuçlarının regresyon analizinde elde edilen sayısal verileri.

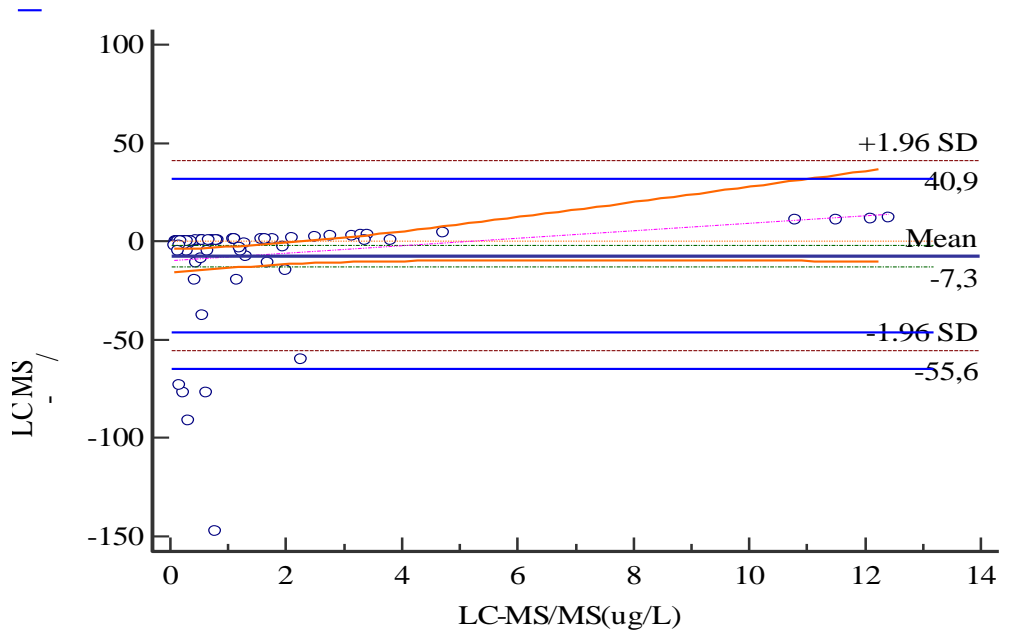


LC-MS/MS ve ELISA yöntemlerinde elde edilen 83 numunenin 11-deoksikortizol değerlerinin dağılım grafiği Şekil 4. 28.'de görülmektedir.



Şekil 4. 28. LC-MS/MS ve ELISA verilerinin dağılım grafiği

11-deoksikortizol sonuçlarının LC-MS/MS ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği Şekil 4. 29.'da görülmektedir.



Şekil 4. 29. 11-deoksikortizol sonuçlarının LC-MS/MS ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği

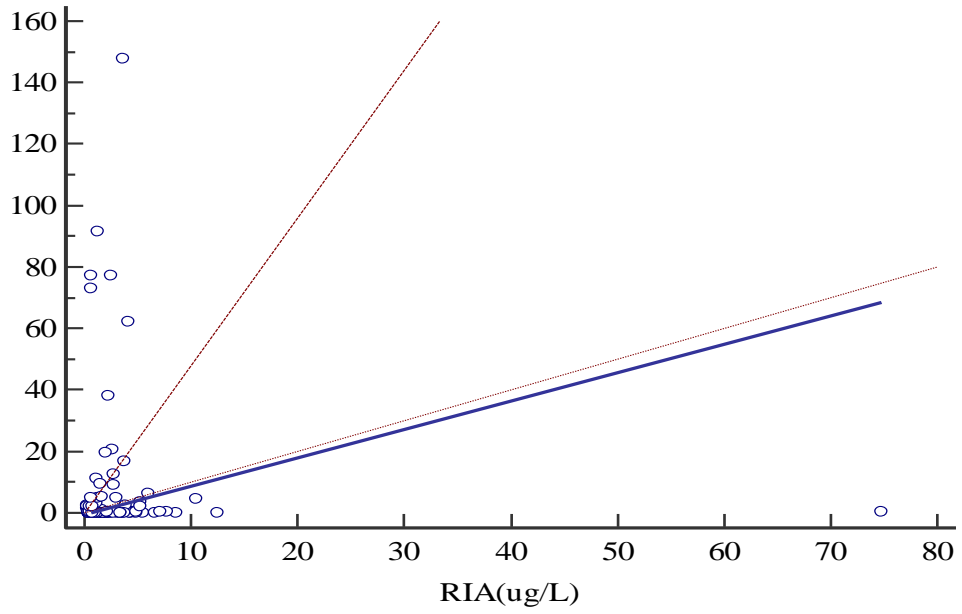
#### 4. 1. 10. 2. RIA ve ELISA Yöntemlerinin Karşılaştırılması

83 numunenin, RIA ve ELISA yöntemlerinde ölçümü ile elde edilen 11-deoksikortizol değerlerinin Med Calc istatistik programında yapılan Passing-Bablok regresyon analizi sonucu slope değeri; (0.928571), intercept değeri; (-0.867500) olarak bulundu (Şekil 4. 30.). Denklemden değerleri yerlerine koyduğumuzda  $y = (-0.867500) + (0.928571)x$  olarak denklem bulundu.

Variable X	RIA	
Variable Y	ELISA	
Sample size	83	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,2500	0,0000
Highest value	74,8200	147,9200
Arithmetic mean	3,4220	8,6608
Median	1,9800	0,3000
Standard deviation	8,2286	24,1178
Standard error of the mean	0,8978	2,6315
<b>Regression Equation</b>		
$y = -0,867500 + 0,928571 x$		
<b>Systematic differences</b>		
Intercept A		-0,8675
95% CI		-6,3300 to -0,03000
<b>Proportional differences</b>		
Slope B		0,9286
95% CI		0,1667 to 4,8000
<b>Random differences</b>		
Residual Standard Deviation (RSD)		26,5761
± 1.96 RSD Interval		-52,0891 to 52,0891
<b>Linear model validity</b>		
Cusum test for linearity		Significant deviation from linearity (P=0,02)

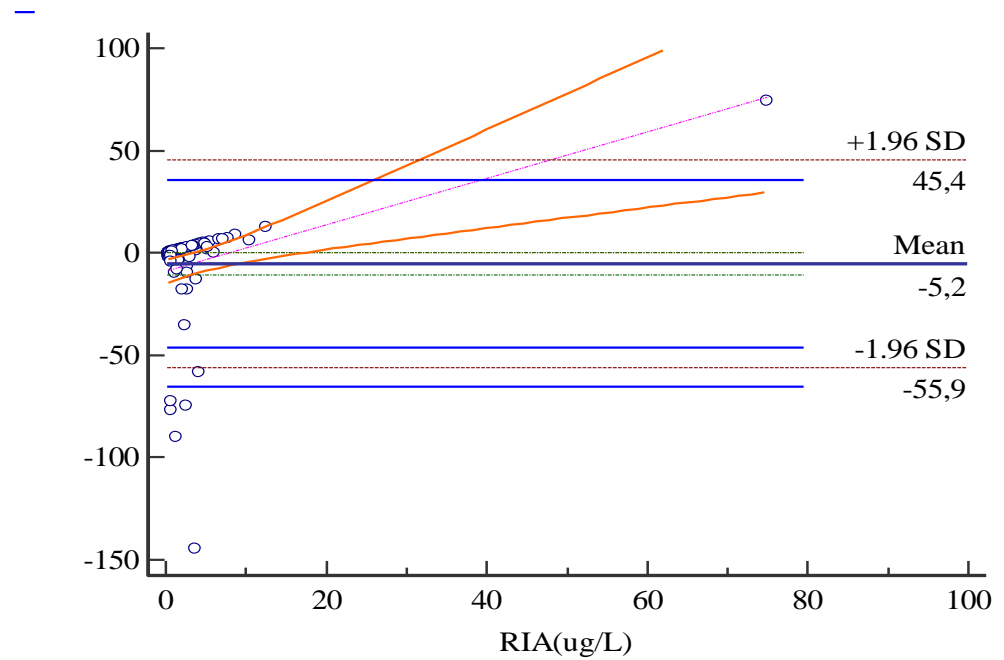
Şekil 4. 30. RIA ve ELISA yöntemlerinde 11-deoksikortizol sonuçlarının regresyon analizinde elde edilen sayısal verileri.

RIA ve ELISA yöntemlerinde elde edilen 83 numunenin 11-deoksikortizol değerlerinin dağılım grafiği Şekil 4. 31.'de görülmektedir.



Şekil 4. 31. RIA ve ELISA verilerinin dağılım grafiği

11-deoksikortizol sonuçlarının RIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği Şekil 4. 32.'de görülmektedir.



Şekil 4. 32. 11-deoksikortizol sonuçlarının RIA ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği

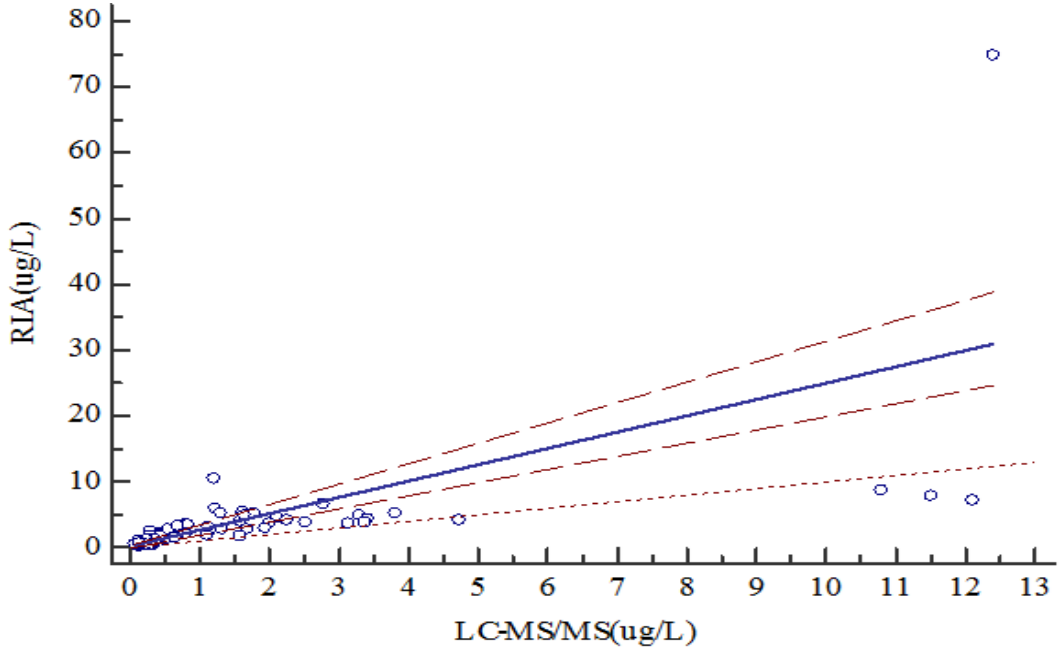
#### 4. 1. 10. 3. LC-MS/MS ve RIA Yöntemlerinin Karşılaştırılması

83 numunenin, LC-MS/MS ve RIA yöntemlerinde ölçümü ile elde edilen 11-deoksikortizol değerlerinin Med Calc istatistik programında yapılan Passing-Bablok regresyon analizi sonucu slope değeri; (2.471358), intercept değeri; (0.211882) olarak bulundu (Şekil 4. 33.). Denklemden değerleri yerlerine koyduğumuzda  $y = (0.211882) + (2.471358)x$  olarak denklem bulundu.

Variable X	LCMSMS	
Variable Y	RIA	
Sample size	83	
	Variable X	Variable Y
Lowest value	0,06350	0,2500
Highest value	12,4000	74,8200
Arithmetic mean	1,3900	3,2498
Median	0,5220	1,8400
Standard deviation	2,4802	8,0334
Standard error of the mean	0,2659	0,8613
<b>Regression Equation</b>		
$y = 0,211882 + 2,471358 x$		
<b>Systematic differences</b>		
Intercept A	0,2119	
95% CI	-0,08967 to 0,4011	
<b>Proportional differences</b>		
Slope B	2,4714	
95% CI	1,9903 to 3,1003	
<b>Random differences</b>		
Residual Standard Deviation (RSD)	6,4074	
± 1.96 RSD Interval	-12,5584 to 12,5584	
<b>Linear model validity</b>		
Cusum test for linearity	Significant deviation from linearity (P=0,04)	

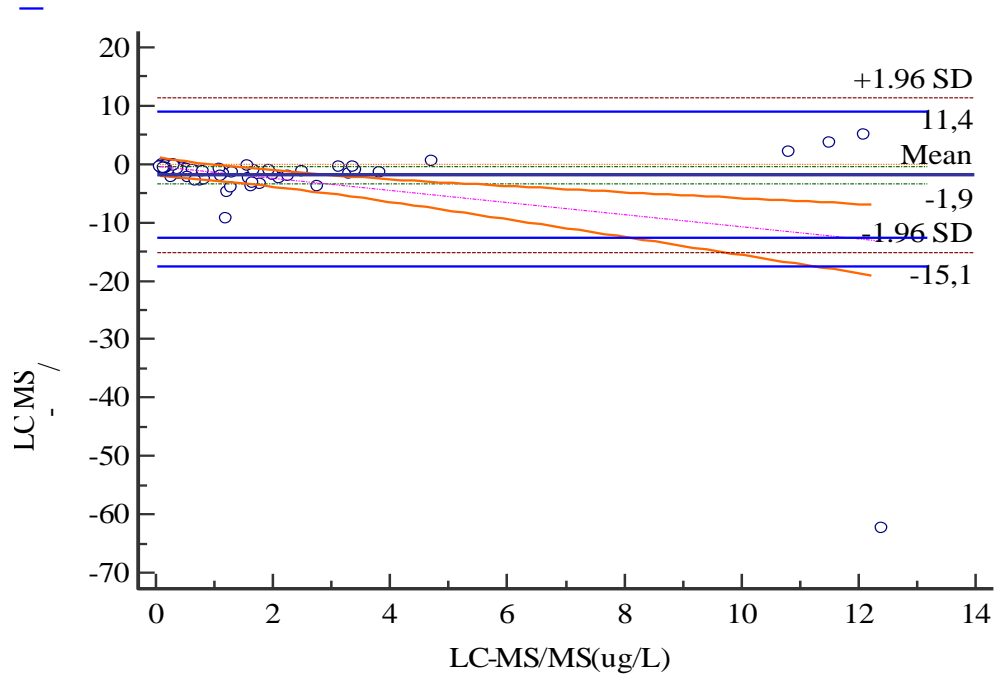
Şekil 4. 33. LC-MS/MS ve RIA yöntemlerinde 11-deoksikortizol sonuçlarının regresyon analizinde elde edilen sayısal verileri.

LC-MS/MS ve RIA yöntemlerinde elde edilen 83 numunenin 11-deoksikortizol değerlerinin dağılım grafiği Şekil 4. 34.'de görülmektedir.



Şekil 4. 34. LC-MS/MS ve RIA verilerinin dağılım grafiği.

11-deoksikortizol sonuçlarının LC-MS/MS ve RIA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği Şekil 4. 35.'de görülmektedir.



Şekil 4. 32. 11-deoksikortizol sonuçlarının LC-MS/MS ve RIA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği.

#### 4. 1. 11. Referans Aralığı Doğrulama Çalışması

Referans aralığı doğrulama çalışması için 20 sağlıklı kadın ve erkekten alınan numunelerin LC-MS/MS yöntemiyle analiz edilen 11-deoksikortizol değerleri aynı yöntemi kullanan akredite bir laboratuvar olan Mayo Medical Laboratuvarı 11-deoksikortizol referans aralıkları ile karşılaştırıldı. (<http://www.mayomedicallaboratories.com/> Erişim tarihi 2014). Elde edilen tüm değerler Mayo Medical Laboratuvarı referans aralığı içindedir. Geliştirilen LC-MS/MS yönteminde Mayo Medical Laboratuvarı 11-deoksikortizol referans aralıkları kullanılabilir.

Geliştirilen LC-MS/MS yönteminde kullanılacak olan Mayo Medical Laboratuvarı 11-deoksikortizol referans aralıkları;

-18 yaş ve altı için 11-deoksikortizol düzeyi;  $< 3.44 \mu\text{g/L}$

-18 yaş üzeri için 11-deoksikortizol düzeyi;  $0.1-0.79 \mu\text{g/L}$ 'dir.

RIA yöntemi için kit prospektüsünde belirtilen referans aralığı;

-Metirapon almamış bir birey için;  $< 7.2 \mu\text{g/L}$

-Metirapon uyarısı sonrası;  $72-225 \mu\text{g/L}$  olarak belirtilmiştir.

Yöntem kıyası için kullanılan numunelerde elde edilen değerler LC-MS/MS yöntemi için doğrulanan referans aralığı ile ve RIA yöntemi için belirtilen referans aralığı ile değerlendirildiğinde 84 numunede %76 oranında uyum tespit edildi.

## 5. TARTIŞMA

Serum veya plazma 11-deoksikortizol ölçümleri konjenital adrenal hiperplazinin ikinci en sık formu olan 11-beta-hidroksilaz eksikliğini tespit etmek için ya da metirapon testinin parçası olarak kullanılmaktadır. Metirapon, 11-beta-hidroksilaz enzimini inhibe eder ve normal hipofiz-adrenal rezervli hastalarda metirapon ile uyarıldıktan sonra plazma 11-deoksikortizol düzeyinde 40-80 kat artış görülmektedir (Bertholf ve ark 2012). Bunun bir sonucu olarak, Metirapon testinde 11-deoksikortizol için kullanılacak analitik yöntemlerin düşük 11-deoksikortizol seviyelerindeki hassasiyetinden daha çok yüksek 11-deoksikortizol seviyelerindeki hassasiyeti önemlidir.

Kao ve ark (2001)'de yaptıkları çalışmada 11-beta-hidroksilaz eksikliği olan iki hastada 11-deoksikortizol düzeylerini LC-MS/MS yöntemiyle 149 µg/L ve 100 µg/L olarak tespit etmişlerdir. Reisch ve ark (2013)'de yaptıkları bir çalışmada ise klasik olmayan 11-beta-hidroksilaz eksikliği tanısı alan dört hastanın LC-MS/MS yöntemiyle 11-deoksikortizol düzeylerini 32.71 µg/L, 88.12 µg/L, 49.62 µg/L ve 11.6 µg/L olarak tespit etmişlerdir.

LC/MS/MS için yapmış olduğumuz metod validasyonunda 11-deoksikortizol için linear aralığı 0.78-200 µg/L arasında bulduk. Magnisali ve ark (2011)'de yapmış olduğu validasyonda ise linear aralık 0.5-32.0 µg/L olarak bulunmuştur Bizim linearite çalışmamızda  $R^2$  değerini 0.9996 olarak bulurken, Magnisali ve ark (2011) linearite çalışmasında bu değer 0.9964 olarak bulunmuştur. Gerek metirapon testi sonucu gerekse de 11-beta-hidroksilaz eksikliği sonucu çıkabilecek olan 11-deoksikortizol seviyeleri için çalışmamızda elde ettiğimiz aralığın linear bir aralık olduğu görülmektedir. 200 µg/L seviyesindeki doğru ölçüm klinik kullanımda oldukça önemlidir ve denediğimiz kadarı ile bu seviyelerde kalibrasyon eğrimiz hala lineardir.

11-deoksikortizol için Mayo Medical Laboratuvarı referans aralığını 18 yaş ve altı için; < 3.44 µg/L, 18 yaş üzeri için; 0.1-0.79 µg/L olarak belirtmiştir. Bizde çalışmamızda 11-deoksikortizol için Mayo Medical Laboratuvarı referans aralığını doğruladık. Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics ise kord kanında 11-deoksikortizolün referans aralığını 2.95-5.54 µg/L, çocuk ve

yetişkinde ki referans aralığını ise 0.2-1.58 µg/L olarak belirtmiştir. Kullandığımız RIA yöntemi için kit prospektüsünde 11-deoksikortizol için belirtilen referans aralığı metirapon almamış bir birey için; < 7.2 µg/L, metirapon uyarısı sonrası; 72-225 µg/L olarak belirtilmiştir.

Çalışmamızda LOD ve LOQ limitleri sırasıyla 0.39 µg/L ve 0.78 µg/L olarak belirlenmiştir. 11 deoksikortizol seviyeleri metabolik olarak hızlı bir şekilde kortizole dönüştürüldüğünden normalde düşük değerlerdedir. Düşük değerlerinin klinik bir anlamı olmamaktadır.

LC-MS/MS yönteminde 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L konsantrasyonlarının çalışma içi kesinlik çalışmasında elde edilen %CV değerleri sırayla 2.3, 3.4 ve 5.3, gün içi çalışmalar arası kesinlik çalışmasında elde edilen %CV değerleri sırayla 5.3, 4.3 ve 6.6, günler arası kesinlik çalışmasında elde edilen %CV değerleri sırayla 2.3, 5.2 ve 8.6'dır. Magnisali ve ark (2011) yapmış oldukları kesinlik çalışmasında 0.5 µg/L, 2 µg/L ve 8 µg/L konsantrasyonlar için gün içi %CV değerlerini sırayla 3.4, 1.3 ve 1.4, aynı konsantrasyonlar için günler arası %CV değerlerini sırayla 11.2, 13, 6.8 olarak tespit etmişlerdir. 100 µg/L, 12.5 µg/L ve 0.78 µg/L 11-deoksikortizol konsantrasyonu için çalışma içi, gün içi çalışmalar arası ve günler arası kesinliği kabul edilebilir düzeydedir.

Geri elde çalışmamızda 200 µg/L, 50 µg/L ve 12.5 µg/L konsantrasyonlar için elde edilen % geri elde değerleri sırasıyla 89.28, 88.92 ve 86.88'dir ve standartlara uygundur.

Geçerliliğini belirlediğimiz metodumuzun matriks etkisinden etkilenmediği çalışmamızda gösterilmiştir. 0.78 µg/L, 12.5 µg/L ve 100 µg/L'lik konsantrasyonlarda %matriks etkisi sırasıyla (-9.94), 4.84 ve (-7.22) olduğu belirlenmiştir. Ekstraksiyon aşaması ile matriks uzaklaştırıldığından bu etkinin oldukça zayıf olduğunu gözlemledik.

Benzer steroid moleküller olan kortizol, kortikosteron, kolesterol ve 17-OHP'nin düşük seviyede 11-deoksikortizol değerlerine interferansı için hesaplanan %bias değerleri sırasıyla 9.412, 3, 2.9 ve 0.53, yüksek seviyede interferansı 11-deoksikortizol değerlerine interferansı için hesaplanan %bias değerleri sırasıyla 2, 6, 4 ve 6.1 olarak belirlenmiştir. Belirlenen bu değerler <http://www.westgard.com/>



adresinde belirtilen izin verilen %bias olan 9.5'ten küçük olduğundan kortizol, kortikosteron, kolesterol ve 17-OHP'nin düşük ve yüksek seviyede 11-deoksikortizol ölçümünü interfere etmediği kabul edilmiştir. İnterferans çalışması için 200 µg/L'lik kortizol, 50 µg/L'lik kortikosteron, 1500mg/dl'lik kolesterol ve 100 µg/L'lik 17-OHP standartları kullanılmıştır. Bu şekilde normal serum konsantrasyonlarındaki kortizol değerinin interfere etmediği anlaşılmıştır. Yüksek kortizol seviyelerinde de 11-deoksikortizol düzeylerinin klinik bir anlamının olmamasından dolayı yüksek kortizol seviyelerinde interferans analizleri yapılmamıştır.

Methlie ve ark (2013)'nın 11-deoksikortizolünde olduğu yedi steroid hormonun LC-MS/MS cihazında analizi için yaptıkları çalışmanın numune stabilitesi kısmında 11-deoksikortizolünde dahil olduğu yedi hormonun -20°C'de altı ay kaldıktan sonra yapılan ölçümlerinde elde edilen değerler ilk ölçümlerinden ±%10 şeklinde olduğu tespit etmişlerdir. Bizim yaptığımız numune stabilite çalışmasında ise 15. gün yapılan analizde düşük, orta ve yüksek serum havuzlarında elde edilen ölçümlerin ilk ölçümlere göre sapması sırasıyla ± %3.5, 4.1 ve 5.7 ve 30. gün yapılan analizde ise yine aynı sırayla ± %15.7, 14.6 ve 30 olarak tespit ettik ve 30. Günde elde edilen sapmalar izin verilen %bias olan 9.5'ten büyük olduğundan 30. gün numunelerin stabil olmadığı kabul edildi. Düşük ve orta seviyeli serum havuzlarının 45. gün analizlerinde rastgele bir hata olduğu düşünüldü. Methlie ve ark (2013)'de bulguların aksine 11-deoksikortizolün -20°C'de 15 gün stabil olduğunu düşünmekteyiz. Rutin 11 deoksikortizol analizinin yapıldığı Mayo Medical Laboratuvarı'nda da numune stabilitesi 15. Gün olarak verilmektedir. Kalibratör stabilitesinin daha uzun olduğu çalışmalar bulunmaktadır. Steroid molekülünün dayanıklı olduğu düşünülürse numune stabilitesinin proteine bağlanma kinetiğinden olduğu düşünülebilir. Numune stabilitesi için daha detaylı çalışma yapılması gerektiğini düşünmekteyiz.

Düşük ve yüksek seviyeli serum havuzlarının birinci don-çöz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 41.65 ve 32.85 olup izin verilen %bias olan 9.5'ten büyük olduğundan don-çöz ile numune stabilitesinin bozulduğu düşünüldü fakat ikinci don-çöz analizinde elde edilen %bias değerlerinin izin verilen % biastan küçük olduğu görülünce birinci don-çöz çalışmasında rastgele bir hata yapıldığı düşünüldü.

Düşük ve yüksek seviyeli serum havuzlarının ikinci don-çöz analizinde elde edilen % bias değerleri sırasıyla 0.7 ve 3.1 olup izin verilen %bias olan 9.5'ten küçük olduğundan iki kez don-çözde stabil olduğu kabul edildi.

Düşük seviyeli serum havuzlarının üçüncü ve dördüncü don-çöz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 19.53 ve 20.47 olup izin verilen %bias olan 9.5'ten büyük olduğundan iki kezden fazla don-çözde stabil olmadığı kabul edildi.

Yüksek seviyeli serum havuzlarının üçüncü ve dördüncü don-çöz analizinde elde edilen %bias değerleri sırasıyla 13.64 ve 17.35 olup izin verilen %bias olan 9.5'ten büyük olduğundan iki kezden fazla don-çözde stabil olmadığı kabul edildi

Methlie ve ark (2013)'de 11-deoksikortizolünde dahil olduğu yedi steroid hormonun en az beş don-çöz döngüsüne dayandığını tespit etmişlerdir fakat biz çalışmamızda iki don-çöze kadar stabil olduğunu tespit ettik.

Carryover çalışmasında taşımanın 0.0270 µg/L olduğu ve önemli bir taşıma etkisinin olmadığı görülmektedir.

11-deoksikortizol ölçümünde rutin analizlerde LC-MS/MS ve immunoassay yöntemlerden RIA kullanıldığını görmekteyiz. ELISA yöntemi ile ölçümün çok yaygın olmadığını muhtemelen bu nedenle ELISA kitinin sadece tek bir firmada olduğunu gördük. .

İmmunoassay temelli analizlerde antikorlar steroid yolağın diğer bileşikleri ile ya da benzer bir yapıya sahip ilaçlar, metabolitler ya da diğer steroid bileşikler ile çapraz reaksiyona girebilir (Kao ve ark 2001). Tüm steroid molekülleri immün yanıt oluşturabilecek kadar büyük olmadıklarından analiz için antikor üretimlerinde steroid moleküllerine bir takım peptid yapıları eklenmekte ve bu şekilde hapten molekülü oluşturabilmektedir. Üretilen antikorların molekülün hangi bölgesini tanıdığını literatür taramalarında bulamadık. Yapıca ufak nüanslarla birbirinden ayrılan steroid molekül analizlerinde en sık rastlanan analitik problemin spesifite olduğunu düşünmekteyiz. Özellikle düşük seviyelerdeki steroid analizlerinde spesifite problemi sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Erkeklerde östradiol (E2), kadınlarda testosteron seviyelerinin analizinde analitik belirsizliğin yüksek olduğunu görmekteyiz. Yine rutin kullanımdaki immünassayler ile meme kanserli hastaların takibinde istenilen düşük E2 seviyelerinde analitik belirsizliğin yüksek olabildiğini görmekteyiz. Bazı

kemiluminesans yöntemlerinin ise bu seviyelere inemediğini görmekteyiz. Ek olarak hasta serumunun human anti-mouse antibody (HAMA) içeriği interferansa neden olabilmektedir (Kao ve ark 2001). HAMA interferansı yanlış yüksek veya yanlış düşük sonuçlara neden olabilir buda yanlış tanı konulmasına yol açabilir (Lin ve ark 1997, Müller ve ark 1997, Hicks 1999). İmmunoassaylerde tespit edeceği molekülü fragmente edip ona özgü m/z değerini belirleme özelliğine sahip olmadıkları için ve ölçüm için spesifik antikorların kullanımı ile de cross-reaktivite kaçınılmaz olarak gözükmemektedir (Kao ve ark 2001). Özellikle bu yöntemlerin analiti saflaştırmak ve konsantre etmek için preanalitik ekstraksiyon gerektirmemeleri spesifikliği azaltmakta ve interferans gibi problemleri ortaya çıkarmaktadır (Kao ve ark 2001).

ELISA yöntemini LC/MS/MS yöntemi ile karşılaştırdığımızda intercept değerini (-1.980166) ve slope değerini (7.886463) olarak bulduk. ELISA yöntemini RIA yöntemi ile karşılaştırdığımızda ise intercept değerini (-0.867500) ve slope değerini (0.928571) olarak bulduk. Bu verilerde de görüldüğü gibi ELISA yöntemi 11-deoksikortizol ölçümü için uygun bir yöntem olmadığını düşündük. Yine ELISA kiti olarak kullandığımız markanın Çin menşeyli olması oldukça güvensiz sonuçların nedeni olabilir. İlgili ELISA kiti yönteminde kullanılan antikor ve antijenler 11-deoksikortizol için spesifik ve sensitif olmadığı için interferans kaynaklı hatalar ortaya çıkmaktadır. Son derece hatalı sonuçlar vermektedir.

RIA yöntemini LC/MS/MS yöntemi ile karşılaştırdığımızda intercept değerini (0.211882) ve slope değerini (2.471358) olarak bulduk. Methlie ve ark (2013)'de RIA yöntemini LC/MS/MS yöntemi ile karşılaştırmaları sonucu intercept değerini (2.11) ve slope değerini (3.47) olarak bulunmuştur. LC-MS/MS ile RIA yöntemi ELISA yöntemine göre daha uyumlu bulunmuştur.

Çalışmamızda kalp damar cerrahisi yoğun bakımda venöz emboli tanısıyla takip edilirken sepsis gelişen 65 yaşında erkek bir hastaya ait bir numunenin RIA yöntemiyle ölçülen 11-deoksikortizol değeri 74.82 µg/L, LC-MS/MS yöntemiyle ölçülen 11-deoksikortizol değeri 12.4 µg/L ve ELISA yöntemiyle ölçülen 11-deoksikortizol değeri 0.51 µg/L'dir. Aynı numunenin immunoassay yöntemiyle ölçülen kortizol değeri 89.96 µg/dL'dir. Bu hasta numunesinde de görüldüğü gibi 11-deoksikortizol ölçümünün ELISA yöntemiyle yapılması doğru değildir. Fakat 11-deoksikortizol ölçümünde kullanılacak yöntemin yüksek değerlerde hassasiyeti

önemli iken RIA yöntemiyle elde edilen değerler LC-MS/MS yöntemiyle uyumsuzluğu RIA yönteminde de cross-reaktivite görüldüğünü desteklemektedir.

Clinical Chemistry’de gelecekteki eğilimlerde bulunan bir makalede Parker “Flow sitometri ve kütle spektrometresi şu an için uzak gözükmese de yarının ana teknolojileri olacak.” demiştir (Parker 1999). Bu sözün üzerine akla gelen soru “Yarın ne zaman?” dır. Bir pilot çalışma yarının çok yakında olduğunu ve önümüzdeki beş yıl içinde olabileceğini düşündürmüştür (Kao ve ark 2001). Komplike adrenal hastalıklarda birçok test sonucu için LC-MS/MS kullanılması iyi bir alternatiftir. Geçmişte klinik açıdan yararlı pek çok endokrin testin (kortizol, kortizon, katekolaminler, 25-hidroksivitamin D ve 1,25-dihidroksivitamin D) aynı zamanlı analizi yüksek basınç likid kromatografisi (HPLC) metotlarıyla gerçekleştirilmiştir. Bu metotlarda spektrometrik veya amperometrik dedektörler kullanılarak sadece iki veya üç analit tespit edilebilmektedir (Kao ve Haser 1984, Jiang ve Machacek 1987). LC-MS/MS analitin ve analitlerin fragmentlerinin m/z değerini tespit eden bir kütle spektrometrik dedektör ile donatılmış HPLC cihazı olarak kabul edilebilir. LC-MS/MS, molekülü fragmente edip ona özgü m/z değerini belirleme özelliği ile eş zamanlı olarak birçok analiti ölçebilir ve tek bir aşamada birden fazla ölçüm yapabilir buda laboratuvarın çalışmasını kolaylaştırır. Bu şekilde hastadan fazla miktarda kan alınmasında engellenmiş olur. Serumda ki önemli steroid metabolitlerinin hepsi aynı anda tek bir ölçümde analiz edilebilir ve alınan kan hacmi ve sıklığı azaltılabilir.

Yazarlar, LC-MS/MS’in steroid biosentez yolağın birden fazla bileşiğinin bir tek serum analizi ile eş zamanlı olarak ölçülmesinden dolayı kısa sürede adrenal kortikal disfonksiyon teşhisi için ana teknoloji olacağını düşünmektedirler (Kao ve ark 2001). Bu teknolojinin uygunluğu KAH’da enzim eksikliği ayırıcı tanısında immunoassaylerdeki teşhis için izlenen algoritmayı kolaylaştırmasıdır. Tek bir test ile konjenital adrenal enzim eksikliğinin fenotipini tespit ediyor olabilmesi birçok endokrinolog, genetikçi ve pediatriği bu yöntem hakkında heveslendirmektedir. Klinisyenler zaman alıcı doğrulama çalışmaları için hastayı sevk etmeksizin kolayca tam olarak teşhisi koyabilmek istiyorlar. Ekonomi, LC-MS/MS’in rutin kullanım için klinik laboratuvara girişinde ya geciktirici ya da hızlandırıcı bir faktör gibi gözükmese de ülkemizde de kit karşılığı kiralama yöntemleri maliyeti biraz daha düşürmektedir. LC-MS/MS genellikle pahalı bir analitik yöntem olarak görülmesine rağmen, D

vitamini, homosistein, katekolaminler, metilmalonik asit gibi küçük moleküllerin analizinde tahlillerinin maliyet karşılaştırma çalışmaları, yeterli test hacmi oldukça LC-MS/MS'in HPLC ve immunoassaylerden daha az maliyetli olduğunu göstermiştir (Magera ve ark 1999, Magera ve ark 2000). Ardışık kütle spektrometrelerinin kullanımı ile tarama süresinin artmasına rağmen böylece sensitiviteyi artırdığı ve kantitasyon limitlerini düşürdüğü için bu yöntem steroid analizi için kuvvetle önerilmektedir (Kushnir ve ark 2010, Carvalho 2012). Serum bileşimde bireyler arası farklılıklar ölçümleri etkileyebilmektedir (Methlie ve ark 2013). Örneğin serumdaki steroidlerin ekstraksiyonunda proteinlerin ve lipidlerin bağlanma miktarı değişebilmektedir (Methlie ve ark 2013). Bu tür kayıpları telafi etmek için internal standart gibi analitin bir izotop analogu yaygın olarak kullanılmaktadır (Methlie ve ark 2013).

11-beta-hidroksilaz eksikliğinde saptanabilen 17-OHP düzeyindeki orta seviyeli artış 11-beta-hidroksilaz eksikliğinin atlanmasına neden olabilmektedir (Peter ve ark 1999). 11-deoksikortizol ve 11-DOC seviyeleri ölçülmemişse 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı konabilmektedir (Honour ve ark 1983). 11-beta-hidroksilaz eksikliği olan vakaların yenidoğan döneminde tanı alması için ve yanlışlıkla 21-alfa-hidroksilaz eksikliği tanısı almaması için 11-deoksikortizol ölçümü önemlidir. Bunun için 11-deoksikortizol ve diğer adrenal kortekste üretilen diğer steroid hormonlarla birlikte yeni doğan taramasında yer alabilmesi için en uygun yöntem LC-MS/MS'dir. LC-MS/MS yöntemi ile birçok hormon tek aşamada analiz edilebilecek ve klinisyen immunoassaylerin gereksiz algoritmasından kurtulacaktır.

Çalışmamızda eksik kalan kısım ise metod validasyonumuzun klinik validasyon kısmının eksik olmasıdır. Metirapon testinin çok pahalı olması nedeni ile ülkemizde çok tercih edilmemektedir. Yine 5 yıllık bir fakülte hastanesi olmamız nedeni ile kliniklerin kuruluş aşamalarını yeni yeni tamamlıyor olması, yeterince hasta bulunamaması nedeni ile klinik validasyonu gerçekleştiremedik.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Steroid hormonların küçük moleküller olması, vücut sıvılarında düşük miktarda bulunması, hidrofobisitelerinden dolayı bağlayıcı proteinler ile birlikte bulunmaları, bağlayıcı proteinlerin klinik duruma göre değişebilmeleri rutin kullanımda sıklıkla karşımıza yüksek analitik belirsizlik ve düşük analitik hassasiyet olarak çıkmaktadır. Hemen hemen tüm immünassayler bu parametrelerden etkilenmektedir. LC-MS/MS yönteminde ise ekstraksiyon yöntemi ile bağlayıcı globünlere ayırıştırma ile molekülün kendisi analiz edilmekte ve bu proteinlere bağlı analitik etkileşim ortadan kaldırılmaktadır. LC-MS/MS yöntemleri radyoaktif izotop kullanan RIA gibi yöntemlere de alternatif olabilmektedir. Tek bir seferde hastanın birçok steroid profilinde çıkartılabilmesi önemli bir avantaj olarak görülmektedir.

Validasyonunu gerçekleştirdiğimiz metodumuzun klinik validasyonunun yapılması ve analizin klinik kullanımı için maliyet analizi yapılması gerekmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Akarsu E, Atmaca H, Balcı MK, Bolu E, Çolak R, Demirbaş B, Emral R, Ertörer ME, Gürsoy G, İzol AN, Kadioğlu P, Kebapçı N, Keleştemur F, Tarkun İ, Tanrıverdi F, Ünlühırcı K, Yılmaz M. Adrenal ve gonadal hastalıklar kılavuzu. 5th ed. Ankara, Bayt, 2011; pp.10.
2. Al-Ansari AA, Massoud M, Perry LA, Smith DS. Polarization fluoroimmunoassay of 11-deoxycortisol in serum and saliva. *Clin Chem* 1983, 10:1803-5.
3. Andrew R. Clinical measurement of steroid metabolism. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2001;1:1-16.
4. Annesley TM. Ion Suppression in Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 2003, 49:7:1041–1044.
5. Antal Z, Zhou P. Congenital adrenal hyperplasia: diagnosis, evaluation, and management. *Pediatr Rev*, 2009,7:49-57.
6. Arit W, Stewart PM. Adrenal corticosteroid biosynthesis, metabolism, and action. *Endocrinol Metab. Clin North Am* 2005, 34:293.
7. Bertholf RL, Jialal I, Winter WE. The Adrenal Cortex. In: Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE editors. *Tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnostics*. 5th ed. United States of America, Elsevier, 2012, p.1847-95.
8. Berneis K, Staub JJ, Gessler A, Meier C, Girard J, Müller B. Combined stimulation of adrenocorticotropin and compound-S by single dose metyrapone test as an outpatient procedure to assess hypothalamic-pituitary-adrenal function. *J Clin Endocrinol Metab* 2002, 12:5470-5.
9. Biddie SC, Hager GL. Glucocorticoid receptor dynamics and gene regulation. *Stress* 2009;3:193-205.
10. Burry LD, Wax RS. Role of corticosteroids in septic shock. *Ann Pharmacother* 2004;3:464-72.
11. Carmina E, Malizia G, Pagano M, Janni A. Prevalence of late-onset 11-beta-hydroxylase deficiency in hirsute patients. *J Endocrinol Invest* 1988, 11:595–598.
12. Carvalho VM. The coming of age of liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry in the endocrinology laboratory. *Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2012, 883–884, 50–58.
13. Chambers E, Wagrowski-Diehl DM, Lu Z, Mazzeo JR. Systematic and comprehensive strategy for reducing matrix effects in LC/MS/MS analyses. *Journal of Chromatography B*, 2007, 852: 22–34.
14. Cho HJ, Kim JD, Lee WY, Chung BC, Choi MH. Quantitative metabolic profiling of 21 endogenous corticosteroids in urine by liquid chromatography-triple quadrupole-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2009, 1:101-8.
15. Chrousos GP, Loriaux DL, Mann D, Cutler GB Jr. Late-onset 21-hydroxylase deficiency is an allelic variant of congenital adrenal hyperplasia characterized by attenuated clinical expression and different HLA haplotype associations. *Horm Res* 1982, 4:193-200.
16. De Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids. *Mol Endocrinol* 2009;3:281-91.
17. Demers LM, Ebright L, Derck DD. Improved radioimmunoassay for 11-deoxycortisol (compound

- S) in plasma. *Clin Chem* 1979, 10:1704-7.
18. Duun JF, Nisula BC, Rodbard D. Transport of steroid hormones: binding of 21 endogenous steroids to both testosterone-binding globulin and corticosteroid-binding globulin in human plasma. *Clinical Endocrinology and Metabolism* 1981, 53:58-68.
  19. Elias LL, Clark AJ. The expression of the ACTH receptor. *Braz J Med Biol Res* 2000;10:1245-8.
  20. Ellison SLR, Rosslein M, Williams A. *Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*. Second Edition. USA, Eurachem/Citac, 2000; pp. 7-113.
  21. Eugster EA, Dimeglio LA, Wright JC, Freidenberg GR, Seshadri R, Pescovitz OH. Height outcome in congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: a meta-analysis. *J Pediatr*. 2001;138:26-32.
  22. Ferrari P, Krozowski Z. Role of the 11beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in blood pressure regulation. *Kidney Int* 2000;4:1374-81.
  23. Fernandes VT, Ribeiro-Neto LM, Lima SB, Vieira JG, Verreschi IT, Kater CE. Reversed-phase high-performance liquid chromatography separation of adrenal steroids prior to radioimmunoassay: application in congenital adrenal hyperplasia. *J Chromatogr Sci* 2003, 5:251-4.
  24. Fiet J, Giton F, Boudou P, Villette JM, Soliman H, Morineau G, et al. A new specific and sensitive time resolved-fluoroimmunoassay of 11-deoxycortisol in serum. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2001, 3:143-50.
  25. Fisher DA, Carlton E. Endocrine testing. In: DeGroot LJ, Jameson JL, editors. *Endocrinology*. 5th ed. Philadelphia, Elsevier Saunders Co., 2006, p.3605-3629.
  26. Franchimont D. Overview of the actions of glucocorticoids on the immune response: a good model to characterize new pathways of immunosuppression for new treatment strategies. *Ann N Y Acad Sci*, 2004;1024:124-37.
  27. Guo T, Taylor RL, Singh RJ, Soldin SJ. Simultaneous determination of 12 steroids by isotope dilution liquid chromatography-photospray ionization tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2006, 2:76-82.
  28. Hammond GL, Smith CL, Underhill DA. Molecular studies of corticosteroid binding globulin. structure, biosynthesis and function. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991, 6:755-62.
  29. Havelock JC, Auchus RJ, Rainey WE. The rise in adrenal androgen biosynthesis: adrenarche. *Semin Reprod Med* 2004;4:337-47
  30. Hicks JM. Excessive blood drawing for laboratory tests. *N Engl J Med*, 1999, 340:1690.
  31. Hofman LF, Klaniecki JE, Smith EK. Direct solid-phase radioimmunoassay for screening 17 alpha-hydroxyprogesterone in whole-blood samples from newborns. *Clin Chem* 1985;7:1127-30
  32. Honour JW, Anderson JM, Shackleton CH. Difficulties in the diagnosis of congenital adrenal hyperplasia in early infancy: The 11 $\beta$ hydroxylase defect. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1983, 103:101-109.
  33. Hughes IA. Congenital adrenal hyperplasia: a lifelong disorder. *Horm Res* 2007, 68:84-9.
  34. Imura H, Nakai Y, Nakao K, Oki S, Fukata J, Tanaka I. Biosynthesis and distribution of ACTH and related peptides. *Acta Physiol Pol* 1981;32:15-35.
  35. Jiang NS, Machacek D. Measurement of catecholamines in blood and urine by liquid chromatography



36. Joehrer K, Geley S, Strasser-Wozak EMC, Azziz R, Wollmann HR, Schmitt K, Kofler R, White PC. CYP11B1 mutations causing nonclassic adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency. *Hum Mol Genet* 1997, 6:1829–1834.
37. Kai H, Kudo H, Takayama N, Yasuoka S, Kajimoto H, Imaizumi T. Large blood pressure variability and hypertensive cardiac remodeling—role of cardiac inflammation. *Circ J* 2009;12:2198-203.
38. Kandemir N, Yordam N. Congenital adrenalhyperplasia in Turkey: a review of 273patients. *Acta Padiatr.* 1997, 86:22-25.
39. Kao PC, Hesar DW. Simultaneous determination of 25-hydroxy- and 1,25-dihydroxyvitamin D from a single sample by dual-cartridge extraction. *Clin Chem*, 1984, 30:56-61.
40. Kao PC, Machacek DA, Magera MJ, Lacey JM, Rinaldo P. Diagnosis of adrenal cortical dysfunction by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of Clinical & Laboratory Science*, 2001, 31:199-204.
41. Kelestimur F. Non-classic congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Endocrinol Rev* 2006, 3:451-4.
42. Kerkhofs S, Denayer S, Haelens A, Claessens F. Androgen receptor knockout and knock-in mouse models. *J Mol Endocrinol* 2009;1:11-7.
43. Kobayashi Y, Mukai H, Tsubota N, Watanabe F. Enzyme immunoassay of 11-deoxycortisol. *J Steroid Biochem* 1984, 4A:913-5.
44. Krieger DT, Liotta AS, Brownstein MJ, Zimmerman EA. ACTH, beta-lipotropin, and related peptides in brain, pituitary, and blood. *Recent Prog Horm Res* 1980;36:277-344.
45. Kushnir MM, Rockwood AL & Bergquist J. Liquid chromatography–tandem mass spectrometry applications in endocrinology. *Mass Spectrometry Reviews*, 2010, 29: 480–502.
46. Labarta JI, Bello E, Ruiz-Echarri M, Rueda C, Martul P, Mayayo E, et al. Childhood-onset congenital adrenal hyperplasia: long-term outcome and optimization of therapy. *J Pediatr Endocrinol Metab*, 2004, 17:411-22.
47. Lacey JM, Minutti CZ, Magera MJ, Tauscher AL, Casetta B, McCann M, et al. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004, 3:621-5.
48. Law RH, Zhang Q, McGowan S, Buckle AM, Silverman GA, Wong W, et al. An overview of the serpin superfamily. *Genome Biol* 2006, 5:216.
49. Levine LS, Rauh W, Gottesdiener K, Chow D, Gunczler P, Rapoport R, Pang S, Schneider B, New MI. New studies of the 11 $\beta$ -hydroxylase and 18-hydroxylase enzymes in the hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 1980, 50:258–263.
50. Lewis JG, Yeo KH, Elder PA. A competitive enzyme-linked immunosorbent assay for plasma 11-deoxycortisol(17,21-dihydroxy-4-pregnene-3,20-dione). *Steroids* 1986, 6:365-72.
51. Lin C-L, Wu T-J, Machacek DA, Jiang, N-S, Kao PC. Urinary free cortisol and cortisone determined by high performance liquid chromatography in the diagnosis of Cushing's syndrome. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82:151-155.
52. Magera M, Helgeson J, Matern D, Rinaldo P. Methylmalonic acid measured in plasma and urine by stable-isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 2000, 46:1804-1810.

53. Magera M, Lacey J, Casetta B, Rinaldo P. Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry. *Clin Chem*, 1999, 45:1517-1522.
54. Magnisali P, Chalioti M.B, Livadara T, Mataragas M, Paliatsiou S, Malamitsi-Puchner A, Moutsatsou P. Simultaneous quantification of 17-OH progesterone, 11-deoxycortisol, 4-androstenedione, cortisol and cortisone in newborn blood spots using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 2011, 879:1565-72.
55. Manson JE. Prenatal exposure to sex steroid hormones and behavioral/cognitive outcomes. *Metabolism* 2008, 57:16-21.
56. Marsden D, Larson CA. Emerging role for tandem mass spectrometry in detecting congenital adrenal hyperplasia. *Clin Chem* 2004, 3:467-8.
57. Merke DP, Bornstein SR. Congenital adrenal hyperplasia. *Lancet* 2005, 9477:2125-36.
58. Methlie P, Hustad S, Kellman R, Almas B, Erichsen MM, Husebye ES, Lovas K. Multisteroid LC– MS/MS assay for glucocorticoids and androgens and its application in Addison's disease. *Endocrine Connections*, 2013, 2:125–136.
59. Migeon CJ, Donohoue PA. Congenital adrenal hyperplasia caused by 21-hydroxylase deficiency: Its molecular basis and its remaining therapeutic problems. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991, 2:277-96.
60. Migeon CJ, Lanes R. Adrenal cortex: hypo- and hyperfunction. In: Lifshitz F, editors. *In pediatric endocrinology*. 5th ed. New York, Informa Healthcare, 2007, p.195-225.
61. Miller W: Steroidogenic enzymes. *Endocr Dev* 2008;13:1-18.
62. Miller WL, Acherman JC, Flück CE. The adrenal cortex and its disorder. In: Sperling MA, editors. *Pediatric Endocrinology*. 3th ed. Philadelphia, Saunders Elsevier Inc., 2008, p.444-511.
63. Miller WL, Auchus RJ, Geller DH. The regulation of 17,20 lyase activity. *Steroids* 1997;1:133-42.
64. Mornet E, Dupont J, Vitek A, White PC. Characterization of two genes encoding human steroid 11 $\beta$ -hydroxylase (P-45011 $\beta$ ). *J Biol Chem* 1989, 264:20961–20967.
65. Müller UHG, Stibbe W, Schuff-Werner P. Prostate specific antigen (PSA) in serum samples of female patients: possible pitfalls in evaluating the analytical sensitivity of ultrasensitive PSA-assay. *Anticancer Res*, 1997, 17:3067-3070.
66. New MI. Inborn errors of adrenal steroidogenesis. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2003 211:75–83
67. Nimkarn S, Lin-Su K, New MI. Steroid 21 hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Pediatr Clin North Am*. 2011, 58:1281-300
68. Nimkarn S, New MI. Prenatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 2009, 2:192-6.
69. Nimkarn S, New MI. Steroid 11beta- hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia. *Trends Endocrinol Metab* 2008, 19:96-9.
70. Orentreich N, Brind JL, Rizer RL, Vogelmann JH. Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *J Clin Endocrinol Metab* 1984;3:551-5.

71. Pang SY, Wallace MA, Hofman L, Thuline HC, Dorche C, Lyon IC, Dobbins RH, Kling S, Fujieda K, Suwa S: Worldwide experience in newborn screening for classical congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Pediatrics* 1988, 81:866–874.
72. Papadimitriou A, Priftis KN. Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Neuroimmunomodulation* 2009;5:265-71.
73. Parker KM. Peeking behind the curtain. *Clin Lab News*, 1999, 25:4.
74. Pass KA, Neto EC. Update: newborn screening for endocrinopathies. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2009, 4:827-37.
75. Perry LA, Al-Dujaili EA, Edwards CR. A direct radioimmunoassay for 11-deoxycortisol. *Steroids* 1982, 2:115-28.
76. Peter M, Dubuis JM, Sippell WG. Disorders of the aldosterone synthase and steroid 11 $\beta$ -hydroxylase deficiencies. *Horm Res* 1999, 51:211–222
77. Pugeat M, Crave JC, Tourniaire J, Forest MG. Clinical utility of sex hormone-binding globulin measurement. *Horm Res* 1996, 5:148-55.
78. Rainey WE, Nakamura Y. Regulation of the adrenal androgen biosynthesis. *J Steroid Biochem Mol. Biol* 2008;3-5:281-6.
79. Rauh M. Steroid measurement with LC-MS/MS in pediatric endocrinology. *Mol Cell Endocrinol*, 2009, 2:272-81.
80. Reisch N, Högler W, Parajes S, Rose IT, Dhir V, Götzinger J, Arlt W, Krone N. A diagnosis not to be missed: nonclassic steroid 11-beta-hydroxylase deficiency presenting with premature adrenarche and hirsutism. *J Clin Endocrinol Metab*, 2013, 98: E1620–E1625.
81. Rosner W. Plasma steroid-binding proteins. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1991;4:697-720.
82. Rossi C, Calton L, Hammond G, Brown HA, Wallace AM, Sacchetta P, et al. Serum steroid profiling for congenital adrenal hyperplasia using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chim Acta* 2010, 4:222-8.
83. Rösler A, Leiberman E, Sack J, Landau H, Benderly A, Moses SW, Cohen T. Clinical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency. *Horm Res* 1982, 16:133–141.
84. Rösler A, Weshler N, Leiberman E, Hochberg Z, Weidenfeld J, Sack J, Chemke J. 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency congenital adrenal hyperplasia: Update of prenatal diagnosis. *J Clin Endocrinol Metab* 1988, 66:830–838.
85. Schumbert Z, Rosemann A, Landa H, Rösler A. 11-Deoxycortisol in amniotic fluid: Prenatal diagnosis of congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency. *Clin Endocrinol Oxf* 1980, 12:257–260.
86. Sone M1, Shibata H, Homma K, Tamura N, Akahira J, Hamada S, Yahata M, Fukui N, Itoh H, Sasano H, Nakao K. Close examination of steroidogenesis disorders in a DOC- and progesterone-producing adrenocortical carcinoma. *Enndocr* 2009, 35:25-33.
87. Speiser PW, Dupont J, Zhu D, Serrat J, Buegeleisen M, Tusie-Luna MT, Lesser M, New MI, White PC. Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Invest.* 1992, 90:584-95.
88. Speiser PW. Improving neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 8:3685-6.

89. Speiser PW. Prenatal and neonatal diagnosis and treatment of congenital adrenal hyperplasia. *Horm Res* 2007,68:90-2.
90. Van der Kamp HJ, Wit JM. Neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *Eur J Endocrinol* 2004, 151:71 -5.
91. Wang M. Review: the role of glucocorticoid in pathophysiology of the metabolic syndrome. *Nutrit Metabol.* 2005, 2:3
92. Watanabe F, Tsubota N, Kobayashi Y, Miyata O, Ninomiya I, Miyai K. Solid phase fluoroimmunoassay for 11-deoxycortisol in serum using 21-amino-17-hydroxyprogesterone. *Steroids* 1982, 4:393-401.
93. Westgard JO. *Basic Method Validation*. 3rd Edition. Madison, Westgard QC, 2008; pp. 9-306.
94. White PC, Curnow KM, Pascoe L. Disorders of steroid 11 beta-hydroxylase isozymes. *Endocr Rev.* 1994, 15:421–438.
95. White PC, New MI, Dupont B. Congenital adrenal hyperplasia (2). *N Engl J Med* 1987, 25:1580-6.
96. Wudy SA, Homoki J, Wachter UA, Teller WM. Diagnosis of congenital adrenogenital hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency by gas chromatographic and mass spectrometric analysis of urinary steroids. *Dtsch Med Wochenschr* 1997, 122:3–11.
97. Yamaguchi Y, Hearing VJ. Physiological factors that regulate skin pigmentation. *Biofactors.* 2009;2:193-9.
98. Yang J, Young MJ. The mineralocorticoid receptor and its coregulators. *J Mol Endocrinol* 2009;2:53-64.
99. Zachmann M, Tassinari D, Prader A. Clinical and biochemical variability of congenital adrenal hyperplasia due to 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency. A study of 25 patients. *J Clin Endocrinol Metab* 1983, 56:222–229.
100. Zadik Z, Kahana L, Kaufmann H, Benderli A, Hochberg Z. Salt loss in hypertensive form of congenital adrenal hyperplasia (11 $\beta$ -hydroxylase deficiency). *J Clin Endocrinol Metab* 1984, 58:384–387.

## 8. ÖZET

T. C.  
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ

### 11-Deoksikortizol Ölçümünde İmmunoassay ve Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) Metodlarının Karşılaştırılması

**Dr. Hatice BARAN**

**Tez Danışman**

**Prof. Dr. Ali ÜNLÜ**

**Biyokimya Anabilim Dalı**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ / Konya**

11-deoksikortizol (Compound S) glukokortikoidlerin sentezinde aradaki bir steroid hormondur. 11-deoksikortizol, 17-alfa-hidroksiprogesteronun (17-OHP) 21-hidroksilasyon ile adrenal kortekste sentezlenir. CYP11B1 (P450c11) 11-beta-hidroksilaz aktivitesiyle 11-deoksikortizolü kortizole dönüşümünü katalizler. Serum veya plazma 11-deoksikortizol ölçümleri 11-beta-hidroksilaz eksikliğini tespit etmek için ya da metirapon testinin parçası olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada serum 11-deoksikortizol ölçümü için yeni bir sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS) yöntem geliştirilmiş, geçerli kılınmış ve bu yöntem radyoimmünoassay (RIA) ve enzymlenmiş immunosorbent assay (ELISA) yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

11-deoksikortizol rutin tesbitinde kararlı-izotop-işaretli internal standard (IS) ile beraber LC-MS/MS kullanılmıştır. Buradan elde edilen değerler RIA ve ELISA yöntemleriyle karşılaştırılmıştır. 11-deoksikortizol için 0.78, 12.5 ve 100 µg/L derişimlerinde gün içi yüzde varyasyon katsayısı (%CV) sırasıyla 6.6, 4.3 ve 5.3 olarak bulunmuştur. 11-deoksikortizol için LC-MS/MS yöntemin deteksiyon limiti <0.39 µg/L olarak tesbit edildi. Yöntemin total çalışma zamanı 7 dakikadır. Valide edilen metodumuzun matriks etkisinden etkilenmediği, diğer steroidlerle interfere olmadığı gözlenmiştir. Yöntem karşılaştırması çalışmasında LCMS/MS ile RIA yönteminin denklemi  $y = (0.211882) + (2.471358) x$  olarak hesaplandı.

Antikor sensitivite ve spesifitesinden etkilenmediği için LC-MS/MS yöntemi referans yöntem olarak değerlendirilmektedir. Çalışmamızda ELISA yönteminin rutin klinik çalışmalarda doğruluğunun yeterli olmadığı tesbit edildi. RIA yöntemi ile de elde edilen korelasyonun düşüklüğü nedeni ile özellikle klinik validasyon konusunda daha ileri çalışmalar yapılması gerekmektedir.

**Anahtar Sözcükler:** 11-deoksikortizol; ELISA; RIA; LC-MS/MS.

## 9. SUMMARY

### Comparison of Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LCMS/MS) Methods in the Measurement of

#### 11-Deoxycortisol

The 11-desoxycortisol (compound S) is an intermediate steroid in the glucocorticoids biosynthesis. 11-desoxycortisol is synthesized in the adrenal cortex by 21-hydroxylation of 17-alpha-hydroxyprogesterone (17-OHP). CYP11B1 (P450c11) catalyzes the conversion of 11-desoxycortisol to cortisol via its 11-beta hydroxylase activity. Serum or plasma 11-desoxycortisol measurements are used to detect 11 $\beta$ -hydroxylase deficiency or as part of the metyrapone stimulation test. In this study, *A new* liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS / MS) method was developed, validated for measuring serum 11-desoxycortisol. The Developed method was also compared with two immunassay methods which are radioimmunoassay (RIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) .

We used LC-MS/MS for determination of 11-desoxycortisol with a stable-isotope-labeled internal standard. The values we obtained by LC-MS/MS compared with RIA and ELISA methods. The interassay Coefficient of Variation (CV) for 11-desoxycortisol were 6.6%, 4.3% and 5.3% at 0.78, 12.5 and 100  $\mu$ g/L, respectively. The detection limit of the LC-MS/MS method was <0.39  $\mu$ g/L for 11-desoxycortisol. Total run time was 7 min. This method was not affected by the matrix effect and other steroid hormones interferences. Method comparison between LC-MS/MS and RIA showed a good correlation:  $y = (0.211882) + (2.471358) x$ .

Since LC-MS/MS methods are not prone to antibody sensitivity and specificity, the method is accepted as a gold standard for measuring especially low level steroids. Depending on the LC-MS/MS method, the accuracy of ELISA approaches can not sufficient in routine use. Method comparison with RIA needs some further investigation especially on clinical validation because of moderate correlation.

**Key Words:** 11-desoxycortisol; ELISA; RIA; LC-MS/MS.

## 10. ÖZGEÇMİŞ

### KİŞİSEL BİLGİLER

**Ad Soyad** : Hatice BARAN

**Doğum Tarihi** : 04.04.1985

**Doğum Yeri** :Karaman

### Eğitim

**Lise Eğitimi** 2000-2004 Meram Anadolu Lisesi

**Üniversite Eğitimi** 2004-2010 Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi

**Uzmanlık Eğitimi** 2011- Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi  
Biyokimya Anabilim Dalı