

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM KARNİTİN İÇİN
BİYOLOJİK VARYASYON BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Hazırlayan
Tarık AYDIN

Danışman
Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

2025-AFYONKARAHİSAR

T.C.
AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM KARNİTİN İÇİN
BİYOLOJİK VARYASYON BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Tarık AYDIN
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

Bu çalışma Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma
Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından 25.TUS.02 proje numarası ile
desteklenmiştir.

2025-AFYONKARAHİSAR

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Tezi Hazırlayanın

Adı Soyadı: Tarık AYDIN

İmza:

Danışmanın

Adı Soyadı: Prof. Dr. Müjgan ERCAN

KARADAĞ

İmza:

**AFYONKARAHİSAR SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ TIP
FAKÜLTESİ**

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

KABUL VE ONAY SAYFASI

Tez Başlığı: Sağlıklı Bireylerde Serum Karnitin İçin Biyolojik Varyasyon
Bileşenlerinin Belirlenmesi

Tez Hazırlayan: Arş. Gör. Dr. Tarık AYDIN

Tez Kabul Tarihi:

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

İş bu çalışma jürimiz tarafından TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM
DALI'NDA TIPTA UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

JÜRİ:

Başkan

Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

Üye

Prof. Dr. Tülay KÖKEN

Üye

Prof. Dr. Sefa ÇELİK

ONAY

DEKAN

Prof. Dr. Necip BECİT

TEŞEKKÜR

Tez sürecimin her aşamasında bilgi ve deneyimiyle yol gösteren, sabırla rehberlik eden, akademik gelişimime katkı sağlayan ve her zaman desteğini hissettiren değerli danışman hocam Müjgan ERCAN KARADAĞ'a sonsuz teşekkür ederim.

Gerek derslerde gerekse akademik anlamda bana ilham veren, tecrübesiyle mesleki kariyerime ışık tutan hocam Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e; asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım sayın hocalarım Prof. Dr. Ahmet KAHRAMAN'a, Prof. Dr. Sefa ÇELİK'e, Prof. Dr. Halit Buğra KOCA'ya, Doç. Dr. Ayhan VURMAZ'a, ve Dr. Öğr. Üyesi Özge FENERCİOĞLU'na şükranlarımı sunarım.

Asistanlığım boyunca dostluklarını her daim hissettiğim, her zaman yanımda olan ve beni her koşulda destekleyen Arş. Gör. Dr. Muammer ÜZÜM'e ve Ahmet ÇELİKKIRAN'a; tez yazımda yardımıyla desteğini hiç esirgemeyen Arş. Gör. Rümeysa ÇINAR'a ve asistanlık eğitiminde birlikte yol yürüdüğümüz tüm asistan arkadaşlarıma;

Tez çalışmamda numune vermeye gönüllü olan ve çalışmaktan memnuniyet duyduğum tüm laboratuvar çalışma arkadaşlarıma ve numune analizinde yardımlarını esirgemeyen Prof. Dr. Muhittin Abdulkadir SERDAR'a ve Clinlab Laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Hayatım boyunca her koşulda yanımda olan, sevgileri, sabırları ve sonsuz destekleriyle beni bugünlere getiren canım annem, babam ve kardeşime en içten teşekkürlerimi sunarım.

Son olarak; sabırla, anlayışla ve en önemlisi sevgisiyle bana güç veren, bir tebessümüyle yükümü hafifleten, varlığı en kıymetli desteğim olan biricik eşim Hatice AYDIN'a her şey için çok teşekkür ederim.

Tarık AYDIN

Afyonkarahisar, Temmuz 2025

SAĞLIKLI BİREYLERDE SERUM KARNİTİNİN BİYOLOJİK VARYASYON BİLEŞENLERİNİN BELİRLENMESİ

Tarık AYDIN

Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi

Temmuz 2025

Danışman: Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

ÖZET

Giriş ve Amaç: Biyolojik örneklerde karnitin analizi, karnitin eksikliği sendromları ve bazı doğuştan metabolizma bozuklukları olan hastaların tanı ve klinik yönetiminde önemlidir. Bu çalışmada, serum serbest karnitin, açilkarnitin, total karnitin ve açil/serbest karnitin oranının güvenli klinik uygulaması için güncel biyolojik varyasyon (BV) verileri sağlamayı amaçladık.

Yöntem: Bu prospektif biyolojik varyasyon (BV) çalışmasında, 30 sağlıklı kişiden (14 Erkek/ 16 Kadın; yaş aralığı, 23-56 yaş) oluşan bir grupta, ardışık 6 hafta boyunca gönüllülerden kan örnekleri toplandı. Toplanan tüm serum örnekleri sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) analizöründe tek bir çalışmada rastgele ve iki tekrarlı analiz edildi. Sonuçlar; aykırı değerler, varyans homojenliği, normallik ve kararlı durum açısından değerlendirildi ve ardından BV'yi ve %95 güven aralıkları (GA) ile birlikte birey içi, bireyler arası ve analitik varyasyon için nested ANOVA uygulandı. Cinsiyete göre de BV hesaplamaları yapıldı.

Bulgular: Total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin oranının birey içi biyolojik varyasyon (CV_I) değerleri; 13,8 (%95 GA; 12,3-15,6), 16,7 (%95 GA; 15,0-18,8), 23,1 (%95 GA ; 20,7-26,1) ve 26,5 (%95 GA 23,9-29,9) idi. Bireyler arası biyolojik varyasyon (CV_G) değerleri total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin oran için sırasıyla 14,9 (%95 GA; 12,4-18,4), 15,5 (%95 GA ; 13,7-17,8), 22,0 (%95 GA ;19,5-25,2) ve 24,4 (%95 GA; 21,6-28,0) idi. Serum karnitin için CV_I ve CV_G ' de cinsiyetler arasında anlamlı bir fark gözlenmedi. Karnitin çeşitlerinde bireysellik indeksi 0,6 ile 1,4 arasında olduğu

bulundu. Analitik kalite spesifikasyonları; total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin oranı için istenilen imprecizyon ve bias değerleri sırasıyla %6,9-%5,1; %8,3-%5,7; %11,6-%7,9 ve %13,2-%9,0 idi.

Sonuç: Bu çalışma ile serum karnitin konsantrasyonları için iyi karakterize edilmiş BV verilerinin sunulması amaçlanmıştır. Bu verilere dayalı hesaplamalar ile elde edilmiş değerler analitik performans spesifikasyonlarının objektif olarak belirlenmesine yardımcı olabilir. Analiz edilen karnitin çeşitleri için düşük bireysellik göstermiştir. Bu nedenle serum karnitin testleri için, toplum bazlı referans aralıklarının kullanılmasının daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Biyolojik Varyasyon, Bireysellik İndeksi, Karnitin, Referans Değişim Değeri

DETERMINATION OF BIOLOGICAL VARIATION COMPONENTS OF SERUM CARNITINE IN HEALTHY INDIVIDUALS

Tarık AYDIN

Afyonkarahisar University of Health Sciences

Faculty of Medicine Department of Medical Biochemistry Medical
Specialization Thesis

July 2025

Advisor: Prof. Dr. Müjgan ERCAN KARADAĞ

ABSTRACT

Introduction and Aim: The analysis of carnitine (L-3-hydroxy-4-trimethylaminobutyric acid) in biological specimens is critical for the diagnosis and clinical management of patients with carnitine deficiency syndromes and certain inborn errors of metabolism. In this study, we aimed to provide up-to-date biological variation (BV) data for serum free carnitine, acylcarnitine, and the acylcarnitine/free carnitine ratio to support their safe and reliable use in clinical practice.

Methods: This prospective BV study included a group of 30 healthy individuals (14 males and 16 females; age range: 23–56 years), from whom blood samples were collected weekly for six consecutive weeks. All serum samples were analyzed in a single run using liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS), with each sample tested in duplicate. The results were evaluated for outliers, homogeneity of variance, normality, and steady-state conditions. Subsequently, nested ANOVA was applied to estimate analytical (CV_A), within-subject (CV_I), and between-subject (CV_G) biological variation, along with 95% confidence intervals. BV calculations were also performed separately by sex.

Results: The within-subject biological variation (CV_I) values for serum free carnitine, acylcarnitine, and the acylcarnitine/free carnitine ratio were 13,8 (%95 GA;

12,3-15,6), 16,7 (%95 GA; 15,0-18,8), 23,1 (%95 GA ; 20,7-26,1) and 26,5 (%95 GA 23,9-29,9), respectively. The between-subject biological variation (CV_G) values for these analytes were 14,9 (%95 GA; 12,4-18,4), 15,5 (%95 GA ; 13,7-17,8), 22,0 (%95 GA ;19,5-25,2) and 24,4 (%95 GA; 21,6-28,0), respectively. No significant sex-based differences were observed in CV_I and CV_G values for serum carnitine. The index of individuality for the different types of carnitine was found to range between 0.6 and 1.4. The analytical performance specifications for desirable imprecision and bias were 6.9% and 5.1% for total carnitine, 8.3% and 5.7% for free carnitine, 11.6% and 7.9% for acylcarnitine, and 13.2% and 9.0% for the acylcarnitine/free carnitine ratio, respectively.

Conclusion: This study aimed to provide well-characterized BV estimates for serum carnitine concentrations. These data can support objective determination of analytical performance specifications. Serum carnitine exhibited low individuality; thus, the use of population-based reference intervals is considered more appropriate for its interpretation in clinical settings.

Keywords: Biological variation, carnitine, individuality index, reference change value

İÇİNDEKİLER

İÇ KAPAK.....	
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK.....	II
KABUL VE ONAY SAYFASI	III
TEŞEKKÜR	IV
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
İÇİNDEKİLER	IX
KISALTMALAR	XI
TABLolar DİZİNİ	XII
ŞEKİLLER DİZİNİ	XIII
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Karnitin.....	4
2.1.1. Karnitin Biyosentezi.....	4
2.1.2. Karnitin Metabolizması ve Homeostazı.....	5
2.1.3. Karnitinin Hücre Metabolizmasındaki Fonksiyonları.....	6
2.1.4. Karnitinlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması	8
2.1.5. Açıkarnitin Profil Analizi.....	11
2.1.6. Karnitin Eksiklikleri.....	12
2.1.7. Açıkarnitinlerin Çeşitli Patolojik Durumlar ve Hastalıklar Üzerindeki Etkisi	15
2.2. Tıbbi Laboratuvarlarda Varyasyon	19
2.2.1. Preanalitik Varyasyon	20
2.2.2. Analitik Varyasyonlar	23
2.3. Biyolojik Varyasyon	25
2.3.1. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Değerlendirilmesi	26
2.3.2. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Yaygın Kullanım Alanları.....	28
2.3.2.5. Homeostatik Ayar Noktasını Saptamak İçin Kullanılacak Örnek Sayısının Belirlenmesi	33
2.3.3. Biyolojik Varyasyon Çalışma Modelleri	34
2.3.5. Biyolojik Varyasyon Analizinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler.....	36
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	38
3.1. Gönüllü Popülasyonun Seçimi	38
3.1.1. Dahil Edilme Kriterleri	38
3.1.2. Dışlama Kriterleri.....	38
3.2. Numunelerin Toplanması ve Saklanması	39
3.3. Numunelerin Analizi.....	40
3.3.1. Biyokimya Analizi:	40

3.3.2. Karnitin Analizi.....	40
3.4. İstatistiksel Analiz	41
3.4.1. Çalışma Gücünün Değerlendirilmesi	42
3.4.2. Aykırı Değerlerin Tespit Edilmesi	42
3.4.3. Normal Dağılımın Değerlendirilmesi	42
3.4.4. Kararlı Durumun Değerlendirilmesi	43
3.4.5. Homojenitenin Değerlendirilmesi.....	43
3.4.6. Cinsiyet Grupları Arasındaki Farklılıkların Değerlendirilmesi	43
3.4.7. Varyans Analizi.....	43
4. BULGULAR	45
4.1. Gönüllü Bireylerin Demografik Bilgileri	45
4.2. Gönüllü Bireylerin Vücut Kitle İndeksi(VKİ) ve Rutin Biyokimya Parametrelerinin Analizi	45
4.3. Karnitin Analizi İçin Çalışma Gücünün Belirlenmesi.....	45
4.4. Karnitin Analizi İçin İstatistiksel Olarak Dışlanan Aykırı Değerler	45
4.5. Karnitin Analizi İçin Normal Dağılım, Kararlı Durum ve Homojenitenin Değerlendirilmesi	46
4.6. Karnitin Analizi İçin Varyasyon Analizi	46
4.7. Karnitin Çeşitleri İçin Bireylerdeki Dağılım ve Ortalama Değer Grafikleri	47
4.6. Analitik Performans Spesifikasyonlarının Hesaplanması.....	49
4.7. Homeostatik Ayar Noktasına Ulaşmak İçin Gereken Numune Sayısının Belirlenmesi	49
5. TARTIŞMA	50
5.1. Total Karnitin Biyolojik Varyasyon Verilerinin Değerlendirilmesi	53
5.2. Serbest Karnitin Verilerinin Değerlendirilmesi	55
5.3. Açıkarnitin/Serbest Karnitin Biyolojik Varyasyon Verilerinin Değerlendirilmesi	57
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	59
7. KAYNAKLAR	60
EK-1.....	70
EK-2.....	71
EK-3.....	73
EK-4.....	74
EK-5.....	75
EK-6.....	76

KISALTMALAR

ACP:	Açilkarnitin Profili
BA:	Bias
BIVAC:	Biyolojik Varyasyon Verileri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi
BV:	Biyolojik Varyasyon
CPT I:	Karnitin Palmitoiltransferaz I
CPT II:	Karnitin Palmitoiltransferaz II
CV:	Varyasyon Katsayısı
CV _A :	Analitik Varyasyon
CV _G :	Bireyler Arası Biyolojik Varyasyon
CV _I :	Birey İçi Biyolojik Varyasyon
EFLM:	Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbi Federasyonu
HTML:	3-Hidroksi-6-N-trimetillizin
HTMLA:	3-Hidroksi-6-N-trimetillizin Aldolaz
II:	Bireysellik İndeksi
KoA:	Koenzim A
OCTN2:	Organik Katyon/karnitin Taşıyıcısı 2
QI:	Kalite Ölçütü
RDD:	Referans Değişim Değeri
TEa:	İzin Verilebilir Toplam Hata
TMABA:	4-N-Trimetilaminobütiraldehit
TMABADH:	4-N-Trimetilaminobütiraldehit Dehidrogenaz
TML:	6-N Trimetillizin
VKİ:	Vücut Kitle İndeksi

TABLÖLER DİZİNİ

Tablo 2.1: Karnitin Açıltransferaz Enzim Tipleri Ve Hücre Lokalizasyonları.....	7
Tablo 2.2: Kontrol Edilemeyen Preanalitik Faktörler.....	23
Tablo 2.3: Performans Düzeylerine Göre Kullanılan CVA, BA, Tea Formülleri	32
Tablo 4.1: Çalışmaya Katılan Gönüllü Bireylerin Ortalama Yaş, Ortanca Yaş Ve Standart Sapmaları	45
Tablo 4.2: Karnitin Profili İçin Dışlanan Aykırı Değerler	46
Tablo 4.3: Karnitin Çeşitleri İçin Cinsiyet Gruplarına Göre Hesaplanan Ortalama Değerler.....	47
Tablo 4.4: Karnitin Çeşitleri İçin Cva, Cv1, Cvg Ve II Değerleri	47
Tablo 4.5: İstenilen Performans Düzeyindeki Kalite Spesifikasyonları	49
Tablo 4.6: Karnitin Çeşitleri İçin Nhsp Değerleri.....	49
Tablo 5.1: Total Karnitin Bv Verilerinin Karşılaştırılması.....	55
Tablo 5.2: Serbest Karnitin Bv Verilerinin Karşılaştırılması.....	57
Tablo 5.1: Açıl Karnitin/Serbest Karnitin Bv Verilerinin Karşılaştırılması	58

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: L-Karnitinin Yapısal Formülü	4
Şekil 2.2: L-Karnitin Biyosentez Yolağı	5
Şekil 2.3: Yağ Asitlerinin Mitokondriyal Membranlardan Karnitin Bağımlı Hareketi	7
Şekil 2.4: Toplam Test Süreci Basamakları	20
Şekil 2.5: Preanalitik Süreci Etkileyen Faktörler	21
Şekil 2.6: Rastgele Varyasyonların Normal Dağılımı	24
Şekil 2.7: Bias Ve İmprezisyonun Şematik Görüntüsü	25
Şekil 2.8: Birey İçi (CV _I) ve Bireyler Arası (CV _G) Varyasyon.....	26
Şekil 2.9: İmprezisyon İçin Analitik Kalite Spesifikasyonu	32
Şekil 2.10: Bias İçin Analitik Kalite Spesifikasyonu	33
Şekil 3.1: Lc-Ms/Ms İle Serbest Karnitin (C0) İçin Elde Edilen Örnek Kromatogram	41
Şekil 4.1: Total Karnitin 6 Hafta Boyunca Bireylerdeki Dağılımı Ve Ortalama Değerleri.....	48
Şekil 4.2: Serbest Karnitin 6 Hafta Boyunca Bireylerdeki Dağılımı Ve Ortalama Değerleri.....	48
Şekil 4.3: Açıkarnitin 6 Hafta Boyunca Bireylerdeki Dağılımı Ve Ortalama Değerleri.....	48
Şekil 4.4: Açıkarnitin/Serbest Karnitin Oranının 6 Hafta Boyunca Bireylerdeki Dağılımı Ve Ortalama Değerleri.....	49

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Klinik laboratuvarlarda günümüzde yüzlerce analit farklı numuneler kullanılarak ölçülmektedir. Bu ölçümlerin sonuçları çeşitli hastalıkların tanısında, prognozun belirlenmesinde ve tedavi takibinde büyük önem arz etmektedir (1). Bu analitlerin düzeyleri doğal yaşlanma süreci nedeniyle değişiklik gösterebildiği gibi sıklık, mevsimsel, preanalitik, analitik ve biyolojik varyasyon nedeniyle de değişiklik gösterebilmektedir. Herhangi bir analit için, belli bir zaman dilimi içinde birden fazla örnekleme yapıldığında sonuçlar arasında her analite özgü olarak gözlemlenen varyasyonun önemli bir bileşeni biyolojik varyasyondur. Bireyin analit düzeyinde homeostatik denge noktası etrafında meydana gelen rastgele değişimler birey içi biyolojik varyasyon (CV_I) olarak tanımlanırken, farklı bireylerin her birinin homeostatik denge noktaları arasındaki değişimler ise bireyler arası biyolojik varyasyon (CV_G) olarak tanımlanmaktadır (2,3).

Biyolojik varyasyon(BV) verileri klinik laboratuvarlarda ölçülene yönelik analitik kalite hedeflerinin belirlenmesi, ölçülen için popülasyona dayalı referans aralıklarının kullanılıp kullanılmayacağını belirlenmesi, ölçülenin ardışık ölçüm sonuçları arasındaki değişimin klinik bir anlamı olup olmadığı hakkında yorum yapılabilmesi, belirli bir olasılıkla homeostatik ayar noktasını tahmin etmek için gereken örnek sayısını belirlenmesi ve spesifik bir durumun klinik takip ve tedavi izlemi için en iyi testin belirlenmesi amacıyla kullanılabilir (1).

Biyolojik varyasyon verileri, hastalıkların tanı, takibinde ve klinik laboratuvarlarda kalitenin değerlendirmesinde potansiyel uygulamaları nedeniyle giderek daha fazla ilgi görmektedir. Tüm bu önemli uygulamalar için doğru ve güvenilir BV verilerine ihtiyaç vardır. Bu ihtiyacı karşılamak üzere, BV ile ilgili yayınları derleme girişimleri, İspanyol Laboratuvar Tıbbı Derneği Analitik Kalite Komisyonu tarafından bir BV veritabanı oluşturulmasıyla sonuçlanmıştır. Westgard'ın çevrimiçi web sitesinde sunulan bu veritabanı 2014 yılına kadar her 2 yılda bir güncellenmiştir (4). 2014 yılında ise, Avrupa Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (EFLM) biyolojik varyasyon grubu tarafından yeni bir çevrimiçi veritabanı oluşturulmuştur (5). EFLM Biyolojik Varyasyon Veritabanı, Biyolojik Varyasyon

Veri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi'nde (BIVAC) bulunan kriterleri dikkate alarak yapılan çalışmaların meta-analizinden elde edilen BV tahminlerini içerir (6). Ancak, EFLM veritabanında laboratuvar tıbbının güncel ilgi alanına giren birçok ölçüm için henüz veri bulunmamaktadır. Bunlardan biri de serum karnitin ve açilkarnitin testleridir.

Karnitin; lizin ve metiyoninden oluşan trimetillenmiş bir amino asit türevidir olup enerji metabolizmasında ve hücresel enerji üretiminde önemli bir role sahiptir (7). Karnitinin tüm canlı hücrelerde bulunan ana işlevi, uzun zincirli yağ asitlerinin β -oksidasyonu ve ATP enerjisi üretimi için iç mitokondriyal membran boyunca aktarılmasıdır (8).

Karnitin, organizmada serbest karnitin ve açıl gruplarına bağlı açilkarnitin esterleri formunda bulunur (9). Karnitin ve açilkarnitinler fizyolojik olarak tüm biyolojik sıvıların içerisinde bulunurlar, fakat karnitin en bol olarak, iskelet ve kalp kası gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokularda bulunur (10). Enzim defektine bağlı olarak, defektif enzime substrat olan karnitin çeşitlerinin artmasıyla spesifik açıl karnitin profili gözlenir bu yüzden açıl kalıntılarının karnitin ile konjugasyonu, doğuştan metabolizma hatalarını taramak veya tanı koymak için bir teşhis aracı olarak kullanılabilen açilkarnitin türlerini üretir (11). Açilkarnitin analizi, mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyonu ve organik asit metabolizması bozukluklarının biyokimyasal tespiti için yapılır. Açilkarnitin analizi ile ortaya çıkan koşullar, ortak olarak, farklı hücre içi bölmelerde ifade edilen birkaç karnitin açıl-KoA transferazından biri için substratlar olan kısa, orta ve/veya uzun zincirli açıl-KoA türlerinin birikimine sahiptir. Açilkarnitin analizleri, mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyon ve organik asit metabolizması bozukluklarının biyokimyasal tespiti amacıyla tandem kütle spektrometrisi ölçüm yöntemi kullanılarak yapılır (12).

Sonuç olarak, biyolojik örneklerde karnitin (l-3-hidroksi-4-trimetilaminobütirik asit) analizi, primer ve/veya sekonder karnitin eksikliği olan hastalıkların tanısında önemli rol oynar. Avrupa Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (EFLM) veri tabanında serumda serbest ve total karnitin biyolojik varyasyonuna yönelik bilgi bulunmamaktadır. Öte yandan Westgard veri tabanında serumda serbest ve total karnitin biyolojik varyasyonu için Albert ve arkadaşlarının 1997 yılında, 14

sağlıklı bireyi dahil ederek gerçekleştirdiği çalışmadan elde edilen BV hesaplama sonuçları sunulmuştur.

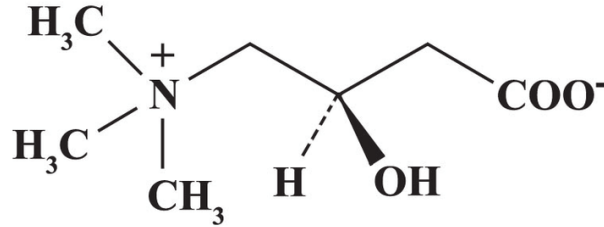
Çalışmamızda, EFLM Biyolojik Varyasyon Veritabanı web sitesinde sunulan BIVAC ile uyumlu bir çalışma protokolü uygulayarak, bir grup sağlıklı bireyde, serum serbest karnitin, açıl karnitin ve açıl/serbest karnitin oranı için, birey içi (CV_I) ve bireyler arası (CV_G) biyolojik varyasyonu, bireysellik indeksi (II), referans değişim değeri (RDD) ve özellikle analitik kalite hedeflerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Karnitin

Karnitin (3-hidroksi-4-N-trimetilaminobutirat), hemen hemen tüm memeli türlerinde, çeşitli mikroorganizmalarda ve bitkilerde bulunan vitamin benzeri suda çözünen küçük bir moleküldür. 1905 yılında kas dokusunda keşfedilmiş ve kimyasal yapısı(Şekil 2.1) 1927'de açıklığa kavuşturulmuş olsa da birincil fizyolojik işlevi ve yağ asidi metabolizmasındaki önemi ancak yaklaşık 30 yıl sonra belirlenmiştir (13).

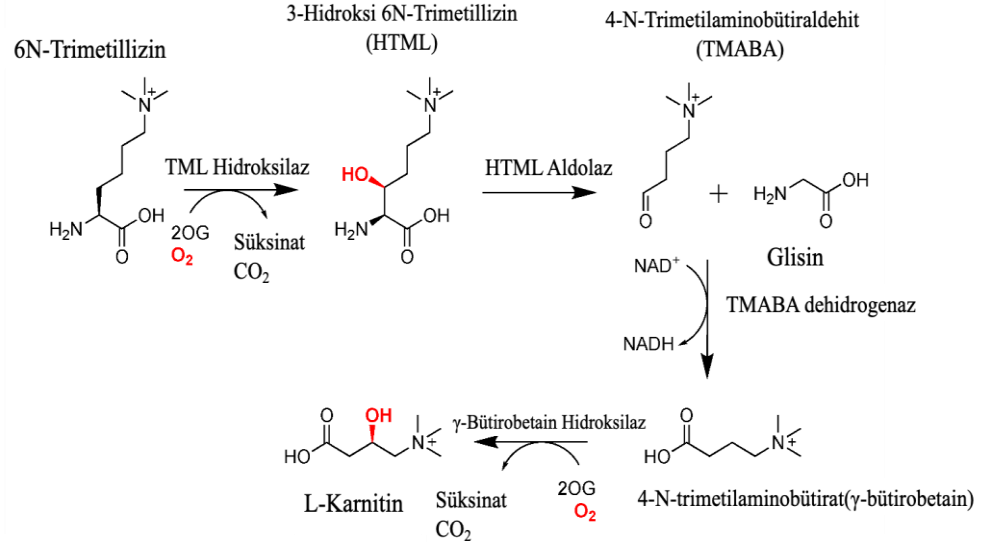


Şekil 2.1: L-karnitinin yapısal formülü (14)

2.1.1. Karnitin Biyosentezi

Karnitin biyosentezinin öncül aminoasitleri lizin ve metiyonin, sırasıyla karnitinin karbon iskeletini ve 4-N-metil gruplarını sağlar. Bu biyosentez süreci, substrat olarak 6-N-trimetillizin (TML) ile başlar. Sitokrom c, aktin, miyozin ve histonlar gibi bazı proteinler, translasyon sonrası modifikasyonla oluşan N-metillenmiş lizin kalıntılarını içerir. Bu metilasyon reaksiyonları, metil grubu donörü olarak S-adenosilmetiyonin kullanan metiltransferaz enzimleri tarafından katalize edilir. TML, söz konusu proteinlerin lizozomal veya proteazomal yıkımı sonucunda serbest hale gelir. Biyosentezin ilk basamağında, TML hidroksilaz enzimi tarafından TML'nin hidroksilasyonu gerçekleştirilerek 3-hidroksi-6-N-trimetillizin (HTML) oluşur. Takiben, HTML, HTML aldolaz (HTMLA) enzimi aracılığıyla parçalanarak 4-N-trimetilaminobütiraldehit (TMABA) ve glisin üretir. TMABA, TMABA dehidrogenaz (TMABADH) tarafından oksidasyona uğrayarak 4-N-trimetilaminobütirata (γ -bütirobetain) dönüştürülür. Biyosentezin dördüncü ve son

aşamasında ise γ -bütirobetain, γ -bütirobetain hidroksilaz enzimi aracılığıyla hidroksilasyonla karnitine çevrilir (Şekil 2.2) (15,16).



Şekil 2.2: L-karnitin biyosentez yolağı (17)

2.1.2. Karnitin Metabolizması ve Homeostazı

Karnitin, kiral bir karbon atomu içerdiğinden iki enantiyomeri bulunmaktadır: D- ve L-karnitin. Ancak, fizyolojik olarak aktif olan yalnızca L-izomeridir. Vücutta karnitin hem serbest formda hem de esterleşmiş formu olan açilkarnitin şeklinde bulunur. Bu formlar, metabolizmaları ve taşınmaları için gerekli olan hücresel proteinlerle birlikte karnitin sistemini oluşturur (18).

L-karnitin ve esterlerinin konsantrasyonları, metabolizmadaki temel rolleri doğrultusunda, normal biyolojik işlevlerin sürdürülebilmesi için nispeten dar sınırlar içinde korunur. Karnitin homeostazı çok yönlü bir süreçtir ve bu denge; oral emilim, endojen biyosentez, dokulara taşıyıcı aracılı dağılım ve kapsamlı ancak doygunluğa ulaşabilen renal tübüler reabsorbsiyon gibi mekanizmaların bir kombinasyonu ile sağlanır ve sürdürülür (19).

Karnitin esas olarak et ve süt ürünleri gibi ekzojen diyet kaynaklarından sağlanırken, endojen olarak da sentezlenir (20). Endojen sentez karaciğer, böbrek ve beyinde meydana gelir. Yaklaşık 1–2 $\mu\text{mol/kg/gün}$ endojen olarak sentezlenir ve B3

vitamini, B6 vitamini, C vitamini ve demir önemli yardımcı faktörler olarak görev yapar (21). Karnitinin büyük çoğunluğu iskelet kasında depolanırken, yalnızca yaklaşık %2'si karaciğer, böbrek ve kalpte; %1'den azı ise plazma ve eritrositlerde bulunur (22).

Karnitin serbest formda bulunduğu gibi kısa, orta ve uzun zincirli yağ asitleriyle çeşitli esterlenmiş (açilkarnitin) şekilde hemen hemen tüm biyolojik sistemlerde ve sıvılarda mevcuttur. Vücuttaki toplam karnitin içeriği dinamik bir denge hâlinde ve dokuların karnitin gereksinimi birbirinden farklılık gösterir. Örneğin, testis dokusunda karnitin düzeyi, sperm olgunlaşmasında önemli rol oynadığı için en yüksek seviyededir. İskelet kası ve miyokard da karnitin bağımlı dokulardır çünkü yağ asidi oksidasyonu, enerji talebini karşılamak için birincil enerji kaynağıdır. Herhangi bir metabolik değişime, ilgili dokuların karnitin ve açilkarnitin havuzları arasında yeniden dağılım eşlik eder (23,24).

Karnitin atılımı ise serbest karnitinin serbestçe filtrelendiği böbrek yoluyla gerçekleşir. Serbest karnitin %98'inden fazlası böbrek tübüllerinde yeniden emilirken, açilkarnitin formu öncelikli olarak atılır. Bu, sağlıklı popülasyonda dolaşımdaki açilkarnitin ve serbest karnitin arasındaki dengeyi yaklaşık 1:4 ortalama oranla korur (22,25).

2.1.3. Karnitinin Hücre Metabolizmasındaki Fonksiyonları

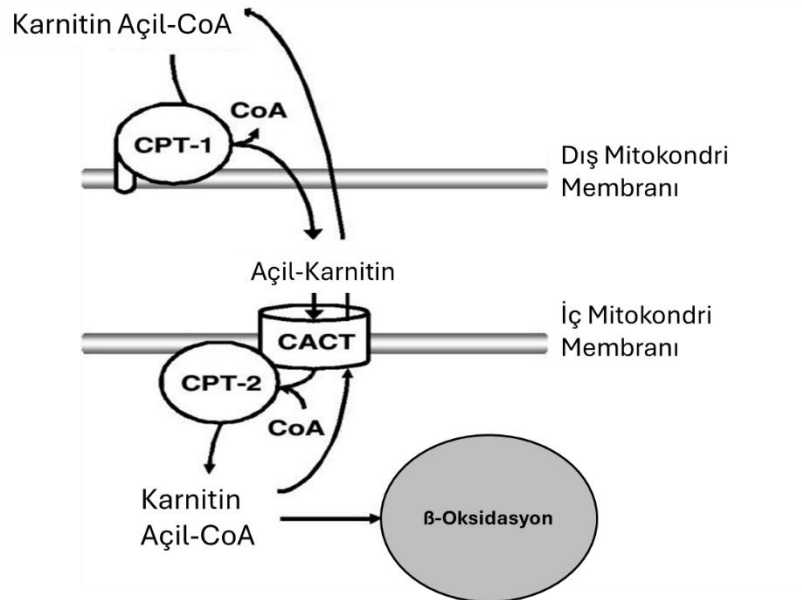
Hücre metabolizma, organizmaların yaşamını sürdürebilmesi için gerekli olan karmaşık biyokimyasal süreçlerin bütünüdür ve başlıca, besinlerin enerjiye dönüştürülmesinden sorumlu organel olan mitokondrilerde gerçekleşir (8). Mitokondride, özellikle periferik dokularda enerji üretimi amacıyla uzun zincirli yağ asitlerinin taşınması, L-karnitin varlığına bağlıdır. Serbest uzun zincirli yağ asitleri ve bunların koenzim-A (KoA) esterleri, tek başlarına iç mitokondriyal membranı geçemez; bu geçiş yalnızca karnitinle oluşturdukları ester formları aracılığıyla mümkündür. Bu bağlamda karnitin, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriyal oksidasyonu ve ketogenez süreçlerinde vazgeçilmez bir rol oynamaktadır (26).

Karnitin açıltransferazlar tarafından katalize edilen açilkarnitinlerin oluşumu, geniş ve örtüşen karbon zincir uzunluğu özgülüğüne, çeşitli hücresel lokalizasyonlara ve metabolik işlevlere sahip bir protein ailesidir (Tablo 2.1) (27).

Tablo 2.1: Karnitin açıltransferaz enzim tipleri ve hücre lokalizasyonları (27)

Enzim Grubu	Substrat Özgüllüğü	Hücre Lokalizasyonu
Karnitin Açıltransferaz	Kısa Zincirli Açıl Grupları (C1-C4)	Nukleus, Mitokondri, Peroksizom, Mikrozo
Karnitin Oktanoiltransferaz	Orta Zincirli Açıl Grupları (C5-C12)	Peroksizom, Mikrozo
Karnitin Palmitoiltransferaz I, II	Uzun Zincirli Açıl Grupları (>C12)	Mitokondri

Uzun zincirli yağ asitlerinin sitoplazmadan mitokondriye oksidasyon amaçlı taşınması sırasında mitokondri dış membranında bulunan karnitin palmitoiltransferaz I enzimi (CPT I) etkisiyle serbest karnitinden açilkarnitin üretilir. Mitokondri dış membranında açillenmiş olan yağ asidi, açilkarnitin molekülü sayesinde mitokondri içine transfer edilir. Mitokondri içinde ikinci bir enzim karnitin palmitoiltransferaz II enzimi (CPT II) yağ açil-KoA molekülünün rejenerasyonunu katalizler. Böylece yağ asidi mitokondri iç membrana aktif şekilde taşınmış olur (Şekil 2.3) (28).



Şekil 2.3: Yağ asitlerinin mitokondriyal membranlardan karnitin bağımlı hareketi (29)

Günümüzde karnitinin hücre metabolizmasındaki işlevinin yağ asidi oksidasyonunun rolüne indirgenemeyeceği açıktır. Karnitin, açıl-KoA/KoA oranını düzenleyerek trikarboksilik asit döngüsü, glukoneogenez, üre döngüsü ve yağ asidi oksidasyonunda yer alan KoA'ya bağlı birçok mitokondriyal enzim reaksiyonlarının optimum şekilde devam etmesini sağlar (30,31). Asetil-KoA ile KoA arasındaki hücre içi denge, L-karnitin aracılığıyla sağlanmasıyla fazla asetil-KoA'nın asetil-L-karnitine dönüştürülmesini katalizleyerek, asetil grubunun mitokondri dışına taşınmasını mümkün kılar. Böylece, mitokondri içinde potansiyel olarak toksik etkiler gösterebilecek açıl grupların birikimi önlenmiş olur. Bu mekanizma, hücre içi serbest KoA havuzunun korunmasına katkı sağlayarak, metabolik esnekliğin yani vücudun mevcut oksijen, substratlar ve besin kofaktörlerinin durumuna bağlı olarak farklı enerji kaynaklarını kullanabilme kapasitesinin sürdürülebilirliğine katkıda bulunur (32,33). Ayrıca, çok düşük yoğunluklu lipoproteinler şeklinde atılmasından önce endoplazmik retikulumdaki triaçilgliserolün yeniden esterleştirilmesinde, pirüvat ve dallı zincirli amino asitlerin oksidatif metabolizmasının uyarılmasında, eritrositlerde membran fosfolipitlerinin dönüşümü sırasında deaçilasyon ve reaçilasyon süreçlerinde, nöronlarda fosfolipitler ve trigliseritler arasında yağ asitlerinin iletilmesinde, çoklu doymamış yağ asitlerinin sentezinde ve uzamasında ve proteinlerin ve membranların stabilizasyonunda rol oynar (34).

2.1.4. Karnitinlerin Sınıflandırılması ve Adlandırılması

Toplam vücut karnitin havuzu, serbest karnitin, kısa zincirli (C2–C5), orta zincirli (C6–C12) ve uzun zincirli (C14–C20) açıl karnitinlerden oluşur. Açıl karnitinlerin geleneksel kısaltması, C olarak gösterilir, ardından zincir uzunluğu numarası gelir, iki noktadan sonraki sayı içerdiği çift bağ sayısını, DC bir dikarboksilik asidi, OH ise bir hidroksil grubunu temsil eder (35).

2.1.4.1. Kısa Zincirli Açıl karnitinler

Kısa zincirli açıl karnitinlerin (C2–C5), vücuttaki en bol bulunan açıl karnitin grubu olduğu düşünülmektedir; bu grupların plazmadaki düzeyleri, tüm açıl karnitinlerin yaklaşık %80'ine veya daha fazlasına ulaşabilmektedir. C2 karnitin veya asetil karnitin, plazmada en yaygın bulunan açıl karnitin çeşididir (36). Enerji

üretimindeki temel rolünün yanı sıra, asetilkarnitin asetilkolin sentezinde asetil grubu sağlayarak nörotransmitter biyosentezine katkı sunar (37).

Kısa zincirli açilkarnitinler, çeşitli hastalıklar ve patolojiler için takviye ya da deneysel tedavi ajanları olarak incelenmiştir. Birçok ülkede, asetilkarnitin çeşitli nörolojik hastalıkların tedavisinde onaylanmış ve endikasyon almış bir ajan olarak kullanılmaktadır. Farklı kısa zincirli açilkarnitinlerin anormal konsantrasyonları çeşitli genetik hastalıklarda gösterilmiştir; bu nedenle, referans açilkarnitin düzeylerinden sapmalar, kalıtsal metabolizma hastalıklarının tanısında bir araç olarak kullanılmaktadır. Buna ek olarak, kısa zincirli açilkarnitinlerin anormal düzeyleri, çeşitli kronik veya edinsel metabolik, onkolojik ve kardiyovasküler hastalıklarda da tanımlanmıştır (38).

2.1.4.2. Orta Zincirli Açilkarnitinler

Orta zincirli (C6–C12) açilkarnitinler, kısa zincirli açilkarnitine kıyasla çok daha az bulunur; ancak sayıca oldukça fazladır. Bu bileşikler tipik olarak, karşılık gelen orta zincirli yağ asitlerinin L-karnitin ile esterifikasyonu sonucu oluşurlar. Orta zincirli açilkarnitinlerin bir diğer kaynağı ise uzun, çok uzun ve dallanmış zincirli yağ asitlerinin peroksizomal metabolizmasıdır (39).

Sentezlerinin ardından, orta zincirli açilkarnitinler genellikle mitokondriye taşınır ve burada karbondioksit ve suya metabolize edilir (40). Orta zincirli açilkarnitin düzeyleri, plazma, idrar veya serum gibi çeşitli vücut sıvılarında ölçülerek, yağ asidi metabolizmasının kalıtsal hastalıklarının tanısında son derece değerli biyobelirteçler olarak kullanılır. Bunun yanı sıra, değişmiş orta zincirli açilkarnitin konsantrasyonları diyabet, kardiyovasküler hastalıklar ve kanser gibi diğer patolojik durumlarda da tanımlanmıştır (38).

2.1.4.3. Uzun Zincirli Açilkarnitinler

Uzun zincirli açilkarnitinler (C13–C20), diyetle alınan veya lipogenez yoluyla de novo sentezlenen uzun zincirli yağ asitlerinin L-karnitin ile esterifikasyonu sonucu oluşur. Farklı açilkarnitin sınıfları arasında, en fazla sayıya sahip olan grup uzun

zincirli açilkarnitinlerdir. Bu moleküllerin temel işlevi, uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasını sağlamaktır (41).

Doku ve plazmadaki uzun zincirli açilkarnitin düzeyleri, tok durumla karşılaştırıldığında açlık durumunda anlamlı ölçüde daha yüksektir (42). Plazmada en bol bulunan doymuş uzun zincirli açilkarnitin, palmitoilkarnitindir (43). Uzun veya çok uzun zincirli yağ asidi metabolizmasına ilişkin kalıtsal bozuklukları olan hastalarda, uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinde artış tespit edilmiştir; ancak bazı doğumsal hastalıklarda plazma uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinde azalma da gözlenebilmektedir. Ayrıca, dolaşımdaki uzun zincirli açilkarnitin düzeylerindeki değişikliklerin çeşitli kardiyovasküler hastalıklarla ilişkili olduğuna dair giderek artan sayıda kanıt bulunmaktadır. Daha sınırlı ölçüde olmakla birlikte, kardiyovasküler olmayan hastalıklarda da uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinde değişiklikler tanımlanmıştır (38).

2.1.4.4. Çok Uzun Zincirli Açilkarnitinler

Çok uzun zincirli açilkarnitinler, açıl grubunda 20'den fazla karbon atomu içeren açilkarnitinlerdir. Sitoplazmada yağ asidi sentaz enzimi aracılığıyla sentezlenen veya besinlerle alınan bu yağ asitleri, uzunlukları nedeniyle mitokondriyal β -oksidasyon sürecine katılamazlar. Bu nedenle, çok uzun zincirli yağ asitlerinin metabolize edildiği temel organeller peroksizomlardır (40).

Normal koşullarda, peroksizomlarda çok uzun zincirli açıl grupları daha kısa parçalara ayrılarak kısa veya orta zincirli açilkarnitinler hâline gelir. Bu kısa zincirli açilkarnitinler daha sonra mitokondriye geçerek β -oksidasyona katılabilir. Ancak, bazı peroksizomal enzimlerde doğuştan gelen metabolizma bozuklukları ya da peroksizom biyogeneziyle ilgili bozukluklar söz konusu olduğunda, çok uzun zincirli açilkarnitinler hücrede birikebilir (44).

X'e bağlı adrenolökodistrofi vakalarında hem plazmada hem de kuru kan örneklerinde C26:0 açilkarnitin düzeylerinin anlamlı şekilde arttığı gösterilmiştir (45). Başka bir çalışmada ise peroksizomal enzim eksiklikleri ya da peroksizomal

biyogenez bozuklukları bulunan hastaların plazma ve idrarında çok uzun zincirli açilkarnitinlerin (C22:0, C24:0, C26:0) düzeylerinin arttığı saptanmıştır (46).

Ek olarak, tip 2 diyabetli hastalarda da çok uzun zincirli açilkarnitin konsantrasyonlarının arttığı gözlenmiştir. Bu bulgu, diyabetin peroksizomal işlevlerde bir bozulmaya neden olabileceğine işaret etmektedir (47). Öte yandan, bazı çalışmalar diyabetin peroksizomal çok uzun zincirli yağ asidi katabolizmasını artırdığını da ortaya koymuştur (48).

2.1.5. Açilkarnitin Profil Analizi

Açilkarnitin profil (ACP) analizi, mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyonu ve organik asit metabolizması bozukluklarının biyokimyasal olarak saptanmasında kullanılan bir yöntemdir. ACP sonuçları, orta zincirli açil-KoA dehidrojenaz eksikliği gibi bazı hastalıkların tanısında belirleyici olabilmektedir; ancak bazı durumlarda kesin tanıya ulaşmak için ek testlerin yapılması gerekebilir. Açilkarnitin analizinin ortaya koyduğu bozukluklar, kısa, orta ve/veya uzun zincirli açil-KoA türlerinin birikimi ile karakterizedir. Bu birikimler, hücre içi farklı kompartmanlarda eksprese edilen çeşitli karnitin açil-KoA transferazların substratlarıdır. Ortaya çıkan açilkarnitin türleri klinik olarak aşağıdaki durumlarda ölçülmektedir (49):

- Semptomatik hastaların değerlendirilmesi,
- Tanı almış hastaların asemptomatik kardeşlerinin değerlendirilmesi,
- Yenidoğan tarama programları ve takip testleri,
- Prenatal tanı,
- Postmortem değerlendirme.

Karnitin ve karnitin esterleri neredeyse tüm biyolojik sıvılarda bulunur. Uygun bir biyolojik sıvının klinik olarak kullanılabilirliği, analiz amacına bağlıdır. Açilkarnitin türlerinin konsantrasyonları farklı numune tiplerinde değişiklik gösterir ve plazma konsantrasyonları her zaman doku konsantrasyonlarını yansıtmayabilir. Bu amaçla plazma ve serum, kuru kan damlası, safra, idrar, amniyotik sıvı ve kültür edilmiş fibroblast örnekleri kullanılır (50).

Yağ asidi oksidasyon bozuklukları ve organik asidemilerin saptanmasında en yüksek duyarlılık, plazma, serum, tam kan ve idrar örneklerinin akut hastalık döneminde toplanmasıyla elde edilir. Oda sıcaklığında, plazma açilkarnitinleri 2 günden daha kısa süreyle; kuru kan damlaları ise 2 haftadan daha kısa süreyle stabildir. Daha düşük sıcaklıklarda örnekler daha uzun süre korunabilir. Kısa zincirli açilkarnitin türleri, uzun zincirli olanlara kıyasla daha kararsızdır. Analizi gerçekleştiren laboratuvarlar, uygulamalarına özel uygun örnek işleme, gönderim ve saklama koşullarını tanımlamalıdır (49).

Orta zincirli trigliserit içeren mamalar, açlık, ketojenik diyet, karnitin takviyesi ve total parenteral beslenme gibi diyetle ilişkili faktörler, açilkarnitin profillerini etkileyebilir. Karnitin yetersizliği, vücut sıvılarındaki açilkarnitin konsantrasyonlarını düşürerek ACP testinin duyarlılığını azaltabilir. Buna karşılık, karnitin takviyesi kan açilkarnitin düzeylerini ve idrarla atılımını artırır ve bu durum profilin yorumlanmasını zorlaştırabilir. Böbrek yetmezliği, kısa ve orta zincirli dikarboksilik asit türevli açilkarnitin türlerinin, karaciğer disfonksiyonu ise uzun zincirli dikarboksilik asit türevli açilkarnitin türlerinde artışa yol açabilir (49,50).

ACP analizini klinik hizmet olarak sunan laboratuvarlar, çoğunlukla analitik platform olarak akım enjeksiyon analizine bağlı tandem kütle spektrometresi (FIA-MS/MS) yöntemini kullanmaktadır. Güncel MS/MS yöntemlerinde, izobar ve izomer bileşiklerin ayrılması amacıyla sıvı kromatografisi (LC) adımı da yer almaktadır. Bildirilen diğer yöntemler arasında gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC-MS), radyo yüksek performanslı sıvı kromatografisi (radio-HPLC) ve kapiler elektroforez yer almaktadır. Tüm kompleks metabolik profillerde olduğu gibi, uygun bir açilkarnitin analizi hem analitik yeterlilik hem de sonuçların derinlemesine yorumlanması ve bilgilendirici bir raporlama sürecini gerektirmektedir (49).

2.1.6. Karnitin Eksiklikleri

Karnitin eksikliğinin tanımı, normal hücre metabolizması için gerekenin altındaki azalmış doku karnitin konsantrasyonudur. Klinik ve biyokimyasal çalışmalardan elde edilen veriler, biyolojik etkilerin klinik olarak anlamlı olabilmesi için doku karnitin düzeylerinin normalin %10 ila %20'sinin altına düşmesi

gerekebileceğini göstermektedir (51). Karnitin eksikliği primer ve sekonder olarak ikiye ayrılır. Primer sistemik karnitin eksikliğinde çoğunlukla hücrel karnitin alımında bozulma görülürken, sekonder karnitin eksikliğinde karnitin eksikliği diğer durumların veya hastalıkların sekonder nedenidir (13).

Karnitin eksikliği, klinik semptomları oldukça değişken olan heterojen bir hastalık grubunu temsil eder. Karnitin sadece yağ asidi oksidasyonu için gerekli olmakla kalmayıp aynı zamanda serbest ve açıl-KoA'nın hücrel homeostazında da önemli bir rol oynadığından, karnitin eksikliğinin çok çeşitli klinik belirtilere sahip olması şaşırtıcı değildir. Dahası, yaş, diyet, metabolik koşullar (stres, tokluk ve açlık durumu, dinlenme ve egzersiz) ve yağ asidi oksidasyonuna doku bağımlılığı gibi diğer faktörlerin de karnitin gereksinimini etkilemesi karmaşıklığa katkıda bulunur (52,53).

2.1.6.1. Primer Karnitin Eksikliği

L-karnitin, hücre içine organik katyon/karnitin taşıyıcısı 2 (OCTN2) aracılığıyla alınır. Bu taşıyıcı iskelet kaslarında, kalpte, fibroblastlarda, plasentada, renal tübüllerde, kan-beyin bariyerini oluşturan kapiller endotel hücrelerinde, astrositlerde ve nöronlarda bulunur. OCTN2, hem Na^+ bağımsız organik katyon taşıyıcısı, hem de Na^+ bağımlı yüksek afiniteye sahip bir karnitin taşıyıcısı olmak üzere çift yönlü taşıma özelliğine sahip özgün bir taşıyıcıdır (54). Primer karnitin eksikliği, yağ asidi oksidasyonunun nadir görülen kalıtsal bir bozukluğudur ve OCTN2'yi kodlayan SLC22A5 genindeki mutasyonlardan kaynaklanır (55). Otozomal resesif kalıtımla aktarılan bu hastalıkta, serbest karnitin dolaşımından hücre içine alınamaz; buna bağlı olarak böbrek tübüler plazmalemmal geri alım bozukluğu nedeniyle idrarla serbest karnitin kaybı meydana gelir ve sonuçta dokularda karnitin eksikliği gelişir (56).

Primer karnitin eksikliği, bebeklikte metabolik dekompanzasyon, çocuklukta kardiyomiyopati, yetişkinlikte ise yorgunluk veya hatta asemptomatik bireyler şeklinde prezente olabilen geniş bir klinik spektrum gösterir (56) Klasik formda iki ana klinik tablo mevcuttur: İlki, yaşamın ilk aylarında başlayan ve akut nonketotik hipoglisemi epizotları, beslenme güçlüğü, gelişme geriliği, hipertrofik kardiyomiyopati, hepatomegali, karaciğer enzim yüksekliği, açlık ya da üst solunum

yolu enfeksiyonları, gastroenterit gibi yaygın enfeksiyonlarla tetiklenebilen hiperamyonemi, hipotoni, letarji veya ensefalopati ile karakterizedir. Bu tabloya hipoglisemiye bağılı Reye sendromu, kas güçsüzlüğüne bağılı motor gelişim geriliğı ve ani bebek ölümlü sendromu eşlik edebilir. İkinci tablo ise 1 ila 7 yaş arasında başlayan ilerleyici kardiyomiyopati ve kas güçsüzlüğü, hepatomegali ve karaciğer steatozu ile karakterizedir (56,57).

Primer karnitin eksikliği tanısı, plazma serbest karnitin düzeylerinin belirgin şekilde düşük bulunmasıyla konur; tanı, deri fibroblastlarında taşıyıcı aktivitesinin azalmış olması veya SLC22A5 geninde iki allelik patojenik varyantın saptanmasıyla doğrulanır (58,59).

Primer karnitin eksikliği infantil metabolik ve çocukluk çağı miyopatik tabloları tedavi edilmezse ölümcül olabilir. Karnitin takviyesi semptomların çoğunu önleyebilir ve kalp fonksiyonunu koruyabilir(56). 100-400 mg/kg/gün oral levokarnitin uygulaması, geri döndürülemez organ hasarından önce başlanırsa metabolik dekompanseasyonu ve iskelet ve kalp kası fonksiyonlarını iyileştirir. Uzun vadeli prognozu, etkilenen bireyler karnitin takviyelerine devam ettiğı sürece olumludur (59).

2.1.6.2. Sekonder Karnitin Eksikliği

Sekonder karnitin eksikliği, karnitin azalmasının uzun süreli açlık, gebelik gibi fizyolojik durumlarla ilişkili olabileceğı gibi, genetik olarak belirlenmiş metabolik hastalıklar, edinilmiş tıbbi durumların sonucu olarak da ortaya çıkabilir. Bu durumlar bazıları; azalmış alım (malnütrisyon, çölyak hastalığı veya kistik fibroz gibi malabsorpsiyon durumları), azalmış vücut depoları ya da artmış kayıplar (renal Fanconi sendromu) yer alabilir (60).

Sekonder karnitin eksikliklerinin klinik sonuçları primer forma kıyasla genellikle daha hafif olmasına rağmen, görülme sıklıkları daha fazladır. Sekonder karnitin eksikliğinde, karnitin havuzu serbest karnitinden açilkarnitine doğru kayar; çünkü altta yatan metabolik bozukluk nedeniyle biriken açil gruplarının elimine edilmesinde karnitin kullanılır. Bu nedenle, sekonder karnitin eksikliklerinde

genellikle plazma serbest karnitin düzeyi normal ya da hafif azalma ve açilkarnitinin serbest karnitine oranında artma gözlemlenir (61).

2.1.7. Açilkarnitinlerin Çeşitli Patolojik Durumlar ve Hastalıklar Üzerindeki Etkisi

2.1.7.1. Diyabet ve Açilkarnitin

Açilkarnitinler uzun süredir kalıtsal metabolik hastalıkların tanısında kullanılmakla birlikte, son dönemde diyabet ve insülin direnci gibi edinsel metabolik bozuklukların tanısında da araştırılmaktadır. Günümüzde klinik uygulamada tip 2 diyabetin tanısında esas olarak glukoz ve glikozile hemoglobin A1c (HbA1c) düzeyleri kullanılmaktadır (62). İnsülinin lipid metabolizmasını baskılayıcı etkisi göz önünde bulundurulduğunda, yağ asidi metabolizmasına ait ara ürünlerin düzeylerinin ölçülmesi yoluyla insülin duyarlılığının değerlendirilmesi mantıklı bir yaklaşım olacaktır. Bu bağlamda, uzun zincirli açilkarnitinler umut vadeden biyobelirteçler olarak öne çıkmaktadır (38).

Enerji metabolizması, dolaşımdaki enerji substratlarının mevcudiyetine bağlı olarak, tok ve açlık durumlarında önemli ölçüde değişiklik gösterir. Açlık durumunda yağ asidi kullanımı baskınken, insüline duyarlı dokular tok durumda artan glukoz mevcudiyetine yanıt olarak karbonhidrat metabolizmasına yönelir. Uzun zincirli açilkarnitinler, iskelet kasları ve kalpte uzun zincirli yağ asitlerinden sentezlenir; ancak plazma uzun zincirli açilkarnitin havuzuna esas katkının kalp tarafından sağlandığı düşünülmektedir (42,63). İnsülin sinyal yolunun aktivasyonu, CPT1 (karnitin palmitoiltransferaz 1) aktivitesini azaltarak, kas ve kalp dokularındaki uzun zincirli açilkarnitin içeriğini düşürür (64). Plazma uzun zincirli açilkarnitin konsantrasyonları, tok ve açlık durumlarındaki doku içeriği değişikliklerini yansıtarak, dokuya özgü insülin duyarlılığının değerlendirilmesinde değerli bir belirteç işlevi görebilir (65). Özellikle, açlık durumunda insülin düzeyleri tok duruma kıyasla belirgin şekilde düşük olması nedeniyle, açlıkta plazma açilkarnitin düzeylerinin ölçülmesi insülin duyarlılığını yansıtmaz. Buna karşılık, insülinin kalpte CPT1 aracılı yağ asidi metabolizmasını baskılayamaması nedeniyle tok durumda ölçülen yüksek uzun zincirli açilkarnitin düzeyleri, insülin direncinin bir göstergesidir (66,67).

Klinik ortamda tok durumun kesin tanımı net olmayabilir. Bu nedenle, oral glukoz tolerans testi (OGTT) veya kontrollü yüksek karbonhidrat içeren bir öğün, diyabet, prediyabet veya insülin direncinin değerlendirilmesi için daha uygun yöntemlerdir. OGTT, tanısal bir yöntem olarak yaygın kabul görmekte olup, glukoz verilmeden önce ve sonra açilkarnitin düzeylerinin ölçülmesi klinik uygulamalarda gerçekleştirilebilir (68). OGTT, açlık durumundaki mitokondriyal enerji durumunu veya açlık ile tok durum arasındaki insülin aracılı geçişi yansıtır. İnsülin dirençli bireylerin, OGTT ve standart bir öğün sırasında uzun zincirli açilkarnitin düzeylerini yeterince azaltamaması kavramı çeşitli klinik çalışmalarda doğrulanmıştır (64,69). Bu nedenle, OGTT sırasında plazma uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinin ölçülmesi hem kas dokularında hem de kalpte insülin direncinin değerlendirilmesi açısından uygun yöntemlerdir.

2.1.7.2. Kardiyovasküler Olaylar ve Açilkarnitin

Mitokondride gerçekleşen oksidatif fosforilasyon (OXPHOS), kalbin temel enerji üretim yoludur. Bu nedenle, mitokondriyal disfonksiyon, kalpte kontraktıl yetmezliğin önemli nedenlerinden biri olarak değerlendirilmektedir. Kalpteki oksidatif metabolizmanın başlıca enerji substratları uzun zincirli yağ asitleridir ve mitokondriyal OXPHOS kapasitesinin azalması durumunda en çok etkilenen metabolik yol yağ asidi metabolizmasıdır. Mitokondride yetersiz yağ asidi metabolizması, ATP üretim hızında azalmaya ve kalıcı enerji eksikliğine yol açar. AMPK, artmış AMP/ATP oranını algılayarak CPT1 aktivitesini uyarabilir. Açilkarnitin birikimi, CPT1 üzerinde inhibisyon oluşturmaması nedeniyle, patolojinin ilerlemesiyle birlikte açilkarnitin düzeyleri zamanla anlamlı şekilde artabilir. Kalp yetmezliğinin ilerlemesi sırasında, kalp metabolizması alternatif enerji substratlarına yönelse de bu metabolik bozulmalar açilkarnitin üretimini etkilemez. Kalp dokularının, plazmadaki uzun zincirli açilkarnitin havuzuna esas katkıyı sağladığı öne sürülmektedir; bu nedenle, plazmadaki uzun zincirli açilkarnitin ölçümleri, mitokondriyal disfonksiyonla ilişkili kardiyak hastalıkların tanısında özellikle uygundur (42).

Açlık sırasında, hücre içi yağ asidi metabolizmasının uyarılması sonucu, orta ve uzun zincirli açilkarnitinlerin dokularda ve plazmada konsantrasyonları sürekli

artar; bu artış, açlığın süresiyle orantılıdır (70,71). Bu durum, dolaşımdaki insülin düzeylerinin düşüklüğü, glukozun metabolik substrat olarak sınırlı mevcudiyeti ve hücre içi yağ asidi metabolizmasının uyarılmasıyla ilişkilidir. Artmış yağ asidi mevcudiyeti ve kolaylaştırılmış CPT1 aktivitesi, mitokondrinin yağ asitlerini metabolize etme kapasitesinin değerlendirilmesi açısından uygun metabolik koşulları oluşturur. Eğer β -oksidasyon ve OXPHOS kapasiteleri, sentezlenen yüksek miktarda açilkarnitini kullanmakta yetersizse, orta ve uzun zincirli açilkarnitin düzeyleri plazmada artış gösterecektir (70). Genel olarak, açlık durumu (veya ketojenik diyet uygulaması), kalpteki mitokondriyal disfonksiyonun tanısı için en uygun durumdur.

Kronik kalp yetmezliği olan hastalarda yapılan birçok çalışmada, dolaşımdaki uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinin arttığı gösterilmiştir (72–74). Kalp yetmezliği olan hastaları içeren tüm çalışmalarda, dolaşımdaki uzun zincirli açilkarnitinlerin artmış düzeyleri, olumsuz klinik sonuçlarla bağımsız olarak ilişkilendirilmiştir. Özellikle, son evre kalp yetmezliği olan hastalarda C16, C18:1 ve C18:2 açilkarnitin düzeyleri anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur. Sol ventrikül destek cihazı yerleştirilen hastalarda ise plazma uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinde düşüş gözlenmiştir. Artmış uzun zincirli açilkarnitin düzeyleri, mitokondride ve muhtemelen peroksizomlarda disfonksiyonel yağ asidi metabolizmasını yansıtır (75). Bu durum, kalp yetmezliği olan bireylerde görülen genel lipid dengesizliklerine katkıda bulunan önemli bir mekanizmayı ortaya koymaktadır. Genel olarak, uzun zincirli açilkarnitinler, kalp yetmezliği olan hastalarda tanı veya tedaviye yönelik müdahalelerde umut vadeden biyobelirteçler olarak değerlendirilmektedir.

2.1.7.3. İnflamasyon ve Açilkarnitin

Fare monosit/makrofaj hücre dizilerinde, açilkarnitinlerin proinflamatuvar sinyal yollarını, açil-zincir uzunluğuna (C10–C18) ve konsantrasyona (5–25 μ M) bağlı olarak aktive ettiği gösterilmiştir. Ayrıca, uzun zincirli açilkarnitinlerin tetiklediği proinflamatuvar yanıtın Toll-like reseptörler aracılığıyla değil, bunların alt bileşeni olan myeloid diferansiyasyon faktörü 88 (MyD88) üzerinden gerçekleştiği öne sürülmüştür (76). Uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinin arttığı yağ asidi oksidasyon bozukluğu (FAOD) hastalarında çeşitli inflamatuvar proteinlerde değişiklikler gözlemlenmiştir. Bunlar arasında, plazma IFN- γ ve IL-8 düzeylerinde hafif artış ve

inflamasyonu baskılayıcı bir sitokin olan IL-10 düzeyinde azalma yer almaktadır (77). Bu bulgular, uzun zincirli açilkarnitinlerin inflamatuvar sinyal yollarının aktivasyonunda rol alabileceğini düşündürmektedir. Ayrıca, uzun zincirli açilkarnitin birikiminin, yetersiz β -oksidasyonla birlikte, tip 2 diyabetli bireylerde Th17 aracılı inflamasyonu teşvik ettiği de gösterilmiştir (78). Genel olarak, bu veriler, uzun zincirli açilkarnitin birikiminin inflamasyonu tetiklediğini ve böylece diyabet gibi hastalıkların ilerlemesini kolaylaştırabileceğini düşündürmektedir.

Benzer şekilde, açilkarnitin mevcudiyetinin ilaçla azaltılması, aterosklerotik lezyonlarda makrofaj ve monosit birikimini azalttığı gibi, deneysel bir ateroskleroz modelinde dolaşımdaki inflamatuvar sitokin düzeylerinin de düşmesini sağlamıştır (79). Ayrıca, fare makrofaj hücre dizilerinde CPT1A'nın zorunlu ekspresyonu ve artmış yağ asidi oksidasyonu, proinflamatuvar süreçlerde azalma ile sonuçlanmıştır. Bu durum muhtemelen hücre içi açilkarnitin birikiminin azalmasıyla ilişkilidir.

Tüm bu bulgular birlikte değerlendirildiğinde, uzun zincirli açilkarnitinlerin taşınması ve üretiminde görev alan enzim ve proteinlerin, kronik hastalıklardaki inflamatuvar süreçleri hafifletmeye yönelik potansiyel farmakolojik hedefler olarak değerlendirilebileceği anlaşılmaktadır (80).

2.1.7.4. Nörolojik Hastalıklar ve Açilkarnitin

Yağ asidi oksidasyonu, beyinde birincil enerji üretim yolu değildir. Bununla birlikte, özellikle uzun ve orta zincirli açilkarnitinlerin yağ asidi oksidasyonu ve bu moleküllerin merkezi sinir sistemiyle ilişkili hastalıkların ilerleyişindeki rolü giderek daha fazla araştırılmaktadır.

Klinik çalışmalarda, Alzheimer hastalığı olan bireylerde dolaşımdaki uzun ve orta zincirli açilkarnitin düzeylerinin daha yüksek olduğu saptanmıştır (81). Ayrıca, uzun zincirli açilkarnitinlerin yüksek düzeyleri hastalığın ilerleyişiyle ve bilişsel bozulma ile ilişkilendirilmiştir (82,83). Öte yandan, daha büyük kohortlarda yapılan çalışmalarda, serumda yüksek düzeyde orta ve uzun zincirli açilkarnitin bulunmasının Alzheimer hastalığı gelişme riskinin daha düşük olmasıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (84).

Parkinson hastalığı olan bireylerde yürütülen klinik çalışmalarda ise, dolaşımdaki uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinin tutarlı şekilde azaldığı rapor edilmiştir (85,86). Şizofreni ve psikotik bozukluk tanısı konmuş bireylerde ise C3-karnitin ve palmitoilkarnitin düzeylerinde azalma gözlenmiştir. Bununla birlikte, bu hastalardaki bireysel uzun zincirli açilkarnitin düzeyleri tutarlı bir desen sergilememektedir. Örneğin, şizofreni hastalarında çoğu uzun ve orta zincirli açilkarnitin düzeyleri azalmışken, psikotik bozukluğu olan bireylerde uzun zincirli açilkarnitin düzeylerinde artış tespit edilmiştir (87,88).

Genel olarak, merkezi sinir sistemiyle ilişkili birçok hastalığın patogeneğinde mitokondriyal disfonksiyon ve inflamasyon temel rol oynamaktadır (89,90). Yapılan çalışmalar, mitokondrilerde uzun zincirli açilkarnitin birikiminin oksidatif fosforilasyon süreçlerinde bozulmalara yol açtığını, kalp dokusunda reaktif oksijen türleri üretimini tetiklediğini ve potansiyel olarak inflamasyonu teşvik ettiğini göstermiştir (91,92).

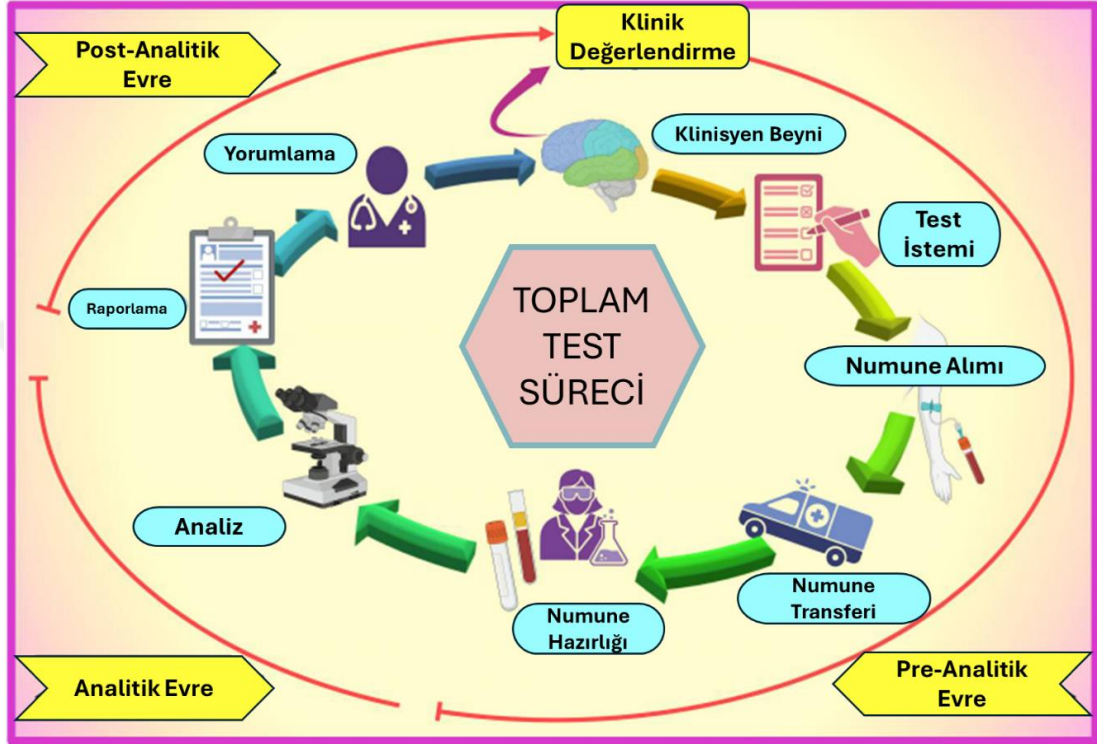
Benzer şekilde, beyinde uzun vadede uzun zincirli açilkarnitin birikimi, mitokondriyal işlev bozukluğunu ve buna eşlik eden inflamasyonla ilişkili bozulmaları tetikleyebilir ya da şiddetlendirebilir.

2.2. Tıbbi Laboratuvarlarda Varyasyon

Laboratuvar tıbbı, kullanıcılara sağlık ve hastalıkların önlenmesi, teşhisi, tedavisi ve yönetimi için temel bilgiler sağlayan sağlık sisteminin temel bir unsurudur (93). Laboratuvar tıbbı verileri sağlık hizmetlerindeki klinik kararların genellikle yaklaşık %70 olarak belirtilse de daha yakın tarihli bir değerlendirme laboratuvar tıbbının etkisinin klinik uzmanlık ve uygulamaya göre değiştiğini öne sürmektedir (94,95). Bu nedenle laboratuvar hataları yanlış tanı, tanıda gecikme, uygun olmayan tedavi, hasta güvenliğinde artmış risk, artmış maliyet ve zaman kaybı gibi önemli negatif sonuçlara neden olabilir (96).

George Lundberg tarafından tanımlanan ‘beyinden beyine döngüsü’ klinisyenin beyinde laboratuvar test seçimi ile başlayıp test sonucu ile yine klinisyenin beyinde sona eren 9 basamaklı bir süreç olarak tanımlamıştır (Şekil 2.4).

Bu süreçlerde meydana gelen eksiklik ya da kusur laboratuvar hatası olarak tanımlanabilmektedir (97). Toplam test sürecini oluşturan ana evrelerdeki yaklaşık hata oranları tarafından preanalitik evrede %62, analitik evrede %15, postanalitik evrede %23 oranında kaynaklanmaktadır (98).



Şekil 2.4: Toplam test süreci basamakları (99)

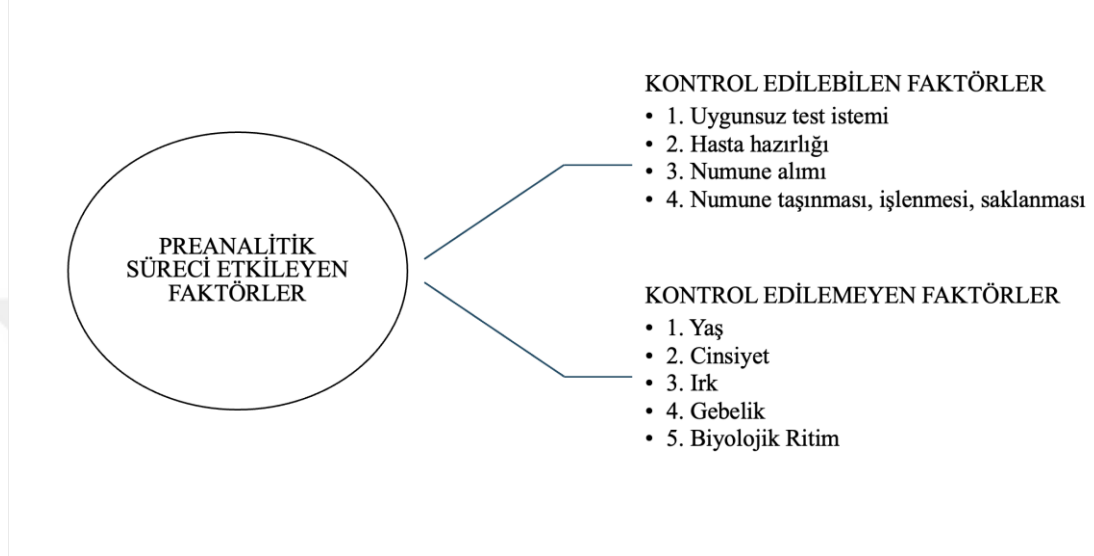
Tıbbi laboratuvar sonuçlarındaki varyasyon, toplam test sürecinin herhangi bir aşamasında ortaya çıkabilir. Bu aşamalarda laboratuvarlar hata ve yanlışlıklara açıktır. Bir laboratuvar tüm bu hata ve yanlışlıkları ortadan kaldırsa bile, test sonuçlarında yine de varyasyon gözlemlenebilir. Klinik laboratuvarlarda test sonuçlarını zamanla değişim gösterebilir. Bu değişimlerin sebebi üç başlık altında incelenir (100).

- Preanalitik varyasyon
- Analitik varyasyonlar (Rastgele ve sistematik hatalar)
- Biyolojik varyasyon

2.2.1. Preanalitik Varyasyon

Tıbbi laboratuvar akreditasyonu amacıyla kullanılan ISO 15189:2012 standardında, preanalitik evre, “klinik hekimin istemiyle kronolojik sırayla başlayan;

inceleme istemi, hastanın hazırlanması ve tanımlanması, numune örneklerin alınması, laboratuvara ve laboratuvar içi nakil süreçlerini kapsayan ve analitik incelemenin başlamasıyla sona eren işlemler bütünü” olarak tanımlanmaktadır (101). Bu evrede gerçekleşen varyasyon kaynakları kontrol edilebilen ve kontrol edilemeyen faktörler olarak ikiye ayrılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.5: Preanalitik süreci etkileyen faktörler

2.2.1.1. Kontrol Edilebilen Preanalitik Faktörler

Laboratuvar test istemiyle ilgili işlemler, pre-preanalitik aşama olarak tanımlanmakta olup, test sürecinin ilk ve kritik basamaklarından birini oluşturmaktadır. Bu aşamada yapılan hatalar, genellikle gereksiz testlerin istenmesi veya gerekli testlerin istenmemesi şeklinde kendini göstermektedir. Her iki durum da uygunsuz test istemi kapsamında değerlendirilmekte ve hem sağlık hizmeti maliyetlerinin artmasına hem de tıbbi hata riskinin yükselmesine neden olmaktadır (102,103).

Numune alımı öncesinde hastanın doğru şekilde hazırlanması, laboratuvar testlerinin güvenilirliği açısından büyük önem taşımaktadır. Bu hazırlıkların en kritiği ise açlık gerekliliğidir. Özellikle glukoz ve kolesterol testleri gibi bazı biyokimyasal testlerde, doğru sonuç elde edilebilmesi için açlık zorunludur. Gıda alımına yanıt olarak, başta sıvı, makro besin öğeleri ve diğer besin bileşenlerinin emilimine bağlı olarak belirgin metabolik ve hormonal değişiklikler meydana gelmektedir (104).

Açlık süresi, yapılan teste göre değişiklik göstermekle birlikte genellikle 8 ila 12 saat arasında değişmektedir. Yetersiz açlık durumunda, özellikle glukoz ve trigliserit düzeylerinde gerçeği yansıtmayan yüksek değerler gözlemlenebilir. Ayrıca, ağır bir öğün sonrası alınan kan örneklerinde lipemik plazma oluşabilir. Bu durum, kolesterol düzeylerinde yanlış yüksek sonuçlara neden olabileceği gibi, bazı elektrolit analizlerinde kullanılan optik ölçüm yöntemlerini de olumsuz etkileyebilir (104,105).

Bazı ilaçlar, kan test sonuçlarını önemli ölçüde etkileyebilir. Literatürde, ilaç-laboratuvar test etkileşimlerinin yaygınlığının %43'e kadar çıkabildiği bildirilmiştir. Özellikle reçetesiz satılan ilaçlar, bitkisel ürünler ve besin takviyelerinin artan kullanımı, bu tür etkileşimlerin görülme sıklığını artırmaktadır. İlaçlar ya istenmeyen fizyolojik etkiler ya da test yöntemine bağlı analitik etkileşimler yoluyla test sonuçlarını değiştirebilir (106).

Numune alım süreci, preanalitik hataların büyük bir bölümünü oluşturabileceği için oldukça kritiktir. Bu süreç; hasta kimliğinin doğrulanması, tüp etiketleme, kan alma teknikleri ve analiz öncesi taşıma işlemlerini kapsar (102).

Bir analitin bir numune içerisindeki stabilitesi, onun fizikokimyasal özelliklerini zaman içinde koruyabilme kapasitesi olarak tanımlanır. Analit stabilitesizliği, numune kalitesinin görünmeyen ancak kritik bir yönünü oluşturur ve genellikle numunenin işlenme şekli, taşıma süresi ve koşulları ile saklama sıcaklığı gibi faktörlerden etkilenir.

Tam kan örneklerinin, venepunkturdan sonra en geç iki saat içinde santrifüj edilerek serum veya plazmanın eritrositlerden ayrılması gerekmektedir. Santrifüj işleminden önce, kanın tamamen pıhtılaşması sağlanmalıdır ve bu süre kullanılan tüp tipine bağlı olarak değişebilir (105).

Ayrıştırma işleminden sonra, örnek oda sıcaklığında sekiz saate kadar, 2–4 °C'de ise 48 saate kadar kararlı kalabilir. 48 saatin ardından, serum örneği -20 °C'de dondurularak saklanmalıdır. Bu süreçlerin güvenilirliği açısından laboratuvarların, numune alımından analizine kadar geçen sürede zaman ve sıcaklık takibini içeren prosedürlere sahip olması ve belirli bir zaman sınırı tanımlaması zorunludur (105,107).

2.2.1.2. Kontrol Edilemeyen Preanalitik Faktörler

Tablo 2.2: Kontrol edilemeyen preanalitik faktörler(108,109)

Varyasyon Türü	Açıklama	Etkilenen Parametreler / Örnekler
Yaş	Yenidoğan, yetişkin ve geriatric dönemlerde fizyolojik değişiklikler görülür.	Hemen hemen tüm analitlerin düzeyleri yaşa bağlı olarak değişebilir.
Cinsiyet	Endokrin organlar ve iskelet kas kitlesi farklılığı analit düzeylerini etkiler.	Kadınlarda: Albümin, kalsiyum, magnezyum, hemoglobin, ferritin, kreatinin, demir genellikle daha düşüktür. Lipit profili de yaşla birlikte cinsiyete göre değişir.
Etnik Köken	Bazı analitler etnik kökene göre değişir, bu nedenle laboratuvar yorumunda dikkate alınmalıdır.	Afro-Amerikalılarda: Total protein ve ALP azalırken; albümin ve kreatin kinaz düzeyleri yüksektir.
Biyolojik Ritimler	Canlılarda görülen doğal fizyolojik döngülerdir. Jeofiziksel döngüye göre sınıflandır: ultradian (<24 saat), sirkadiyen (~24 saat), infradian (>24 saat).	Kortizol ve büyüme hormonu gibi analitler günlük ritimlere göre değişim gösterir; kendi sikluslarında değerlendirilmelidir.

2.2.2. Analitik Varyasyonlar

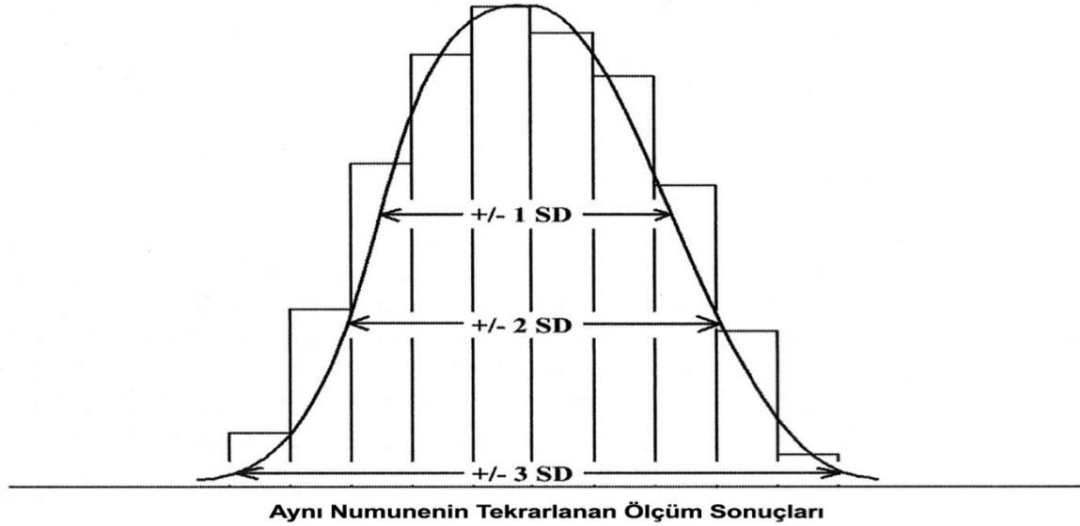
Numune analizi esnasında gözlemlenen varyasyonlara analitik varyasyon (CV_A) denir. Genellikle rastgele (imprezisyon) ve sistematik (bias) olarak iki başlıkta incelenir(110).

2.2.2.1. Rastgele Varyasyon (İmprezisyon)

Prezisyon, önceden tanımlanmış koşullar altında elde edilen bağımsız ölçüm sonuçları arasındaki uyum derecesini ifade eder. Rastgele varyasyonlar, cihazlardaki kararsızlıklar, ortam koşullarındaki dalgalanmalar veya operatör kaynaklı uygulama farklılıkları gibi tesadüfi etkilerden kaynaklanır. Bu etkiler, tekrarlanan ölçümler arasında farklılıklara neden olur. Yeterli sayıda tekrar yapıldığında, bu hataların etkisi rastlantısal kaynaklı olduğundan, ölçüm sonuçları ortalama değer etrafında düzenli bir şekilde dağılır. Küçük sapmalar en sık görülenlerdir; sapma değeri arttıkça bu tür sapmaların sıklığı azalır. Sapmaların bu şekildeki dağılımı, istatistikte normal (Gauss) dağılımı olarak bilinir. Sonuçlardaki dağılımın ölçüsü, yani kesinliğin düşüklüğü, standart sapma (s) ile ifade edilir. Ancak standart sapma, ölçülen niceliğin birimiyle

ifade edildiğinden ve değerin büyüklüğüne bağlı olarak değiştiğinden, genellikle göreceli standart sapma anlamına gelen ve yüzde (%) olarak ifade edilen varyasyon katsayısının (CV) kullanımı tercih edilir (111).

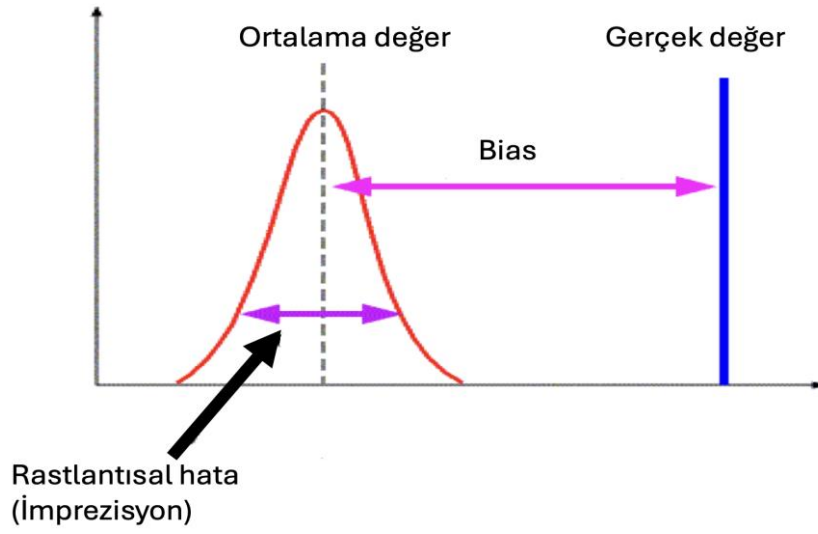
$$\text{Yüzde CV} = (\text{SD}/\text{Ortalama}) \times 100$$



Şekil 2.6: Rastgele varyasyonların normal dağılımı

2.2.2.2 Sistemik Varyasyon (Bias)

Sistemik hatalar kontrol edilebilen, sebebi bilinen ve ölçülebilen hatalardır. Teknik arızalar, kalibrasyon yanlışlığı, cihaz kirliliği gibi hatalar cihaz kaynaklı sistemik hatalardır. Bias, tekrarlı ölçümlerden elde edilen serinin ortalama değeri ile gerçek değer olduğu kabul edilen sonuç arasındaki farktır (Şekil 2.7). Sistemik hatanın göstergesidir. Laboratuvarlar, spesifikasyonları dahilinde çalıştıklarını doğrulamak için veya performansı etkileyen ve düzeltilmesi gereken bir değişikliği tespit etmek için kayıtlı oldukları bir dış kalite kontrol programı ile performanslarını takip edebilir (111).

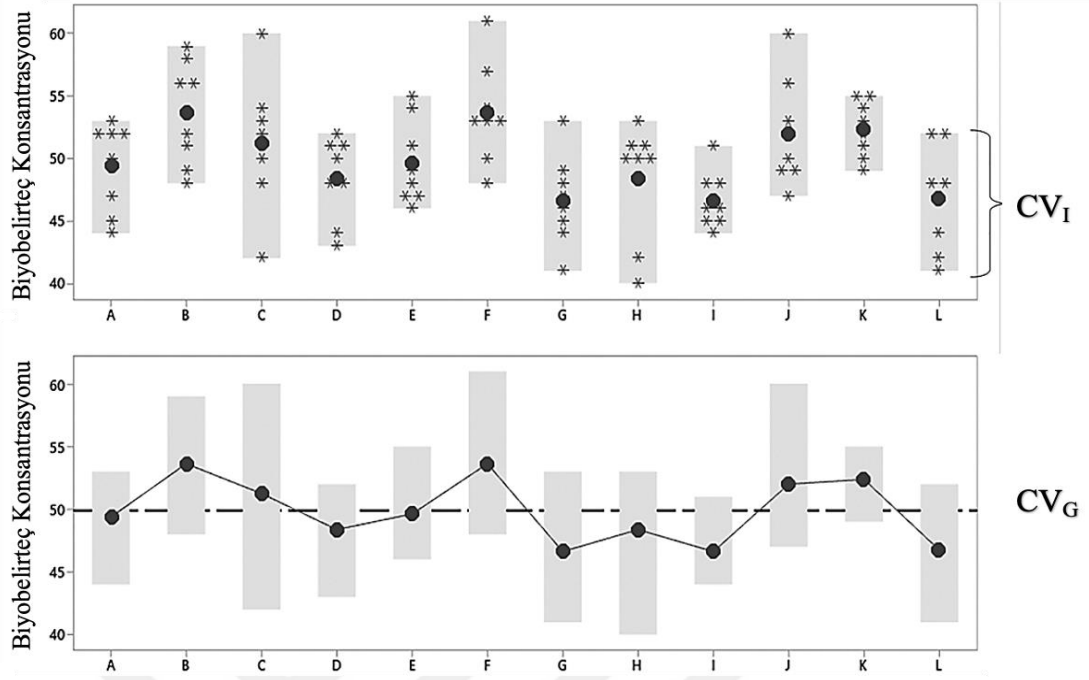


Şekil 2.7: Bias ve impreciziyonun şematik görüntüsü

2.3. Biyolojik Varyasyon

Biyolojik varyasyon (BV), genel kabul görmüş bir uzlaşma tanımına göre, vücut sıvılarındaki biyobelirteç konsantrasyonlarında gözlenen normal fizyolojik dalgalanmalar olarak bilinmektedir. Bu değişken varyasyon, özellikle bireyin tanımlanmış bir durağan durum noktasındaki ortalama biyobelirteç konsantrasyonu olarak tanımlanan homeostatik eşik noktası etrafında meydana gelmektedir (111).

Birey içi varyasyon (CV_I), sabit durumda tek bir bireyde bir ölçülenin konsantrasyonunun/aktivitesinin bir homeostatik ayar noktası etrafındaki varyasyonunu belirtirken; bireyler arası varyasyon (CV_G), farklı bireylerin homeostatik ayar noktaları arasındaki varyasyonu belirtir. Bu iki bileşen birlikte, preanalitik ve analitik test aşamalarından bağımsız olarak değerlendirilen temel ölçüm belirsizliği kaynaklarını temsil eder (107).



Şekil 2.8: Birey içi (CV_I) ve bireyler arası (CV_G) varyasyon (112)

2.3.1. Biyolojik Varyasyon Bileşenlerinin Değerlendirilmesi

2.3.1.1. Çalışma İçin Denek Seçimi

Biyolojik varyasyon çalışmaları kapsamında, çalışmaya dâhil edilecek bireylerin belirli kriterleri karşılaması büyük önem taşır. Bu bireylerin, belirlenen süre boyunca çok sayıda örnek vermeye istekli, görünürde sağlıklı, ilgili analiti etkileyebilecek herhangi bir ilaç kullanmayan, sağlıklı yaşam tarzı veya alışkanlıklara sahip olmayan, alkol tüketimi önerilen sınırların altında olan ve gerektiğinde tütün ürünü kullanmayan kişiler olması gerekmektedir (111).

Bazı uzmanlar, bireylerin çalışmaya alınmadan önce sağlık durumlarının kapsamlı şekilde değerlendirilmesini önermektedir. Bu amaçla klinik muayene yapılabilir; biyokimyasal ve hematolojik testler uygulanabilir. Ancak, bu kriterler çok katı şekilde uygulanacak olursa çalışmaya uygun birey sayısı oldukça azalabilir. Ayrıca, laboratuvar testlerinin yorumlanmasında cinsiyetin önemli bir değişken olması nedeniyle biyolojik varyasyon çalışmalarına hem kadın hem de erkek bireylerin dahil edilmesi gerekmektedir (111).

Çalışmaya dâhil edilecek toplam birey sayısı için belirlenmiş sabit bir sayı bulunmamaktadır; ancak genel olarak, birey sayısı arttıkça biyolojik varyasyonun ortalama tahmininin doğruluğu da artacaktır. Henüz biyolojik varyasyonu çalışılmamış analitler için, belirlenen her bir alt grup için en az 10 bireyin çalışmaya dâhil edilmesi, güvenilir bir biyolojik varyasyon tahmini elde etmek açısından yeterli kabul edilmektedir (113).

2.3.1.2. Numune Alımı, Ön İşlemler ve Depolama

Biyolojik varyasyonun sayısal olarak en doğru şekilde tahmin edilebilmesi için bireylerdeki preanalitik varyasyonun en aza indirilmesi büyük önem taşır ve bu amacı gerçekleştirmek adına mümkün olan tüm önlemler alınmalıdır. Bu kapsamda dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda sıralanmıştır (111).

- * Numuneler, genellikle sabah erken saatlerde olmak üzere, her seferinde günün aynı saatinde alınmalıdır. Ancak, bir günden daha kısa süreli biyolojik varyasyonun değerlendirilmesi amaçlanıyorsa, örnekler farklı zaman dilimlerinde de toplanabilir.

- * Numune alımı benzer koşullarda gerçekleştirilmelidir: Öncesinde aşırı fiziksel aktivite yapılmamış olmalı, standart bir akşam yemeği tüketilmiş olmalı, mümkünse kahvaltı yapılmamış olmalı ve numune alımından önce en az 30 dakika süreyle oturulmuş olmalıdır.

- * Numunelerin, tecrübeli bir flebotomist tarafından standart bir flebotomi tekniğiyle alınması ve aynı lot numarasına sahip tüplere yerleştirilmesi tercih edilmelidir.

- * Numuneler laboratuvara aynı süre ve sıcaklık koşullarında ulaştırılmalı; santrifüj gerekiyorsa, bu işlem sabit sıcaklık ve hızda, belirlenen sürede gerçekleştirilmelidir.

- * Analiz edilecek analitlerin depolama sırasında stabil kalmasını sağladığı için tüm numuneler dondurularak saklanmalıdır. Analitlerin stabil olmadığı durumlarda ise numunelerin alındığı anda analizlerin gerçekleştirilmesi tercih edilmelidir.

2.3.1.3. Analiz

Analitik varyasyonun en aza indirilebilmesi için, optimal koşullarda yüksek düzeyde presizyon sağlayan analitik tekniklerin kullanılması gereklidir. Bu doğrultuda, iyi bir presizyon ve ihmal edilebilir düzeyde bias elde edilebilmesi amacıyla, analiz öncesinde tüm ölçümlerin aynı analiz cihazında ve aynı teknisyen tarafından gerçekleştirilmesi, tek bir kalibratör setinin kullanılması ve tüm reaktifler ile diğer yardımcı malzemelerin aynı lot numarasından temin edilmesi gibi bazı temel şartların sağlanması önem taşır (111).

2.3.2. Biyolojik Varyasyon Verilerinin Yaygın Kullanım Alanları

2.3.2.1. Referans Değişim Değeri (RDD)

RDD kavramı ilk olarak 1983 yılında Harris ve Yasaka tarafından tanımlanmıştır (114). RDD, istatistiksel dağılım olasılığına dayanan bir kavram olup, bireyde yeni gelişen bir hastalık ya da durum olmaksızın, bir laboratuvar test sonucunun önceki değere kıyasla anlamlı düzeyde değişme ihtimalini değerlendirir. Bu değişikliğin yalnızca rastlantıya bağlı olmaması durumunda “anlamlı” kabul edildiği varsayılır. RDD, aynı zamanda “kritik fark” değeri olarak da adlandırılır (115,116).

RDD hesaplaması için her bir biyobelirteç açısından analitik varyasyon katsayısının doğru şekilde belirlenmesi kritik öneme sahiptir. CV_A değeri, klasik laboratuvar ölçümleriyle elde edilebileceği gibi, biyolojik varyasyon çalışmalarında da hesaplanabilir. RDD hesaplamasında dikkat edilmesi gereken önemli bir nokta, bireyler arası varyasyon katsayısı (CV_G) değerinin denkleme dahil edilmemesidir. Çünkü RDD yalnızca birey düzeyinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirir; grup düzeyindeki varyasyon bu hesaplamada dikkate alınmaz. Oysa klasik referans aralıkları CV_G bileşenini içerir (117).

Standart parametrik RDD hesaplaması, elde edilen veri setinin normal dağılıma sahip olduğu varsayımı üzerine kuruludur. Bu hesaplamada, birey içi varyasyonun (CV_I^2) ve analitik varyasyonun (CV_A^2) kareleri alınarak toplam varyans elde edilir ve bu değer karekökü, belirlenen olasılık düzeyine göre belirlenen z-değeriyle çarpılır.

%95 güven düzeyi için tek yönlü hesaplamalarda kullanılan çarpan 2,33'tür ($1,65 \times \sqrt{2}$), çift yönlü hesaplamalarda ise bu değer 2,77'dir ($1,96 \times \sqrt{2}$) (111).

Preanalitik varyasyonlar elimine edilip ihmal edilecek düzeye getirildikten sonra RDD için kullanılan formül şöyledir:

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

Tek yönlü hesaplamalar, yalnızca artışın ya da azalışın klinik olarak önemli olduğu durumlarda kullanılır. Örneğin, akut böbrek hasarını tespit etmek amacıyla serum kreatinin düzeyindeki artışı izlemek, bu tek yönlü yaklaşımın bir örneğidir (118). Ancak test sonucundaki hem artış hem de azalış klinik olarak önemliyse, çift yönlü yaklaşımı temel alan formül tercih edilmelidir. Eğer hangi yönün önemli olduğu önceden bilinmiyorsa, yalancı pozitif sonuçları azaltmak adına daha koruyucu bir yaklaşım olan çift yönlü hesaplama varsayılan yöntem olarak kullanılmalıdır (111). Bu Z değerleri, CV_A ve CV_I 'nin normal dağılıma uyduğu varsayılarak kullanılır. Fakat RDD sınırları genellikle simetrik değildir. Eğer veriler normal dağılıma uymuyorsa ve CV_I değeri %12'den küçük ise ln-RDD yönteminin kullanılması uygundur(119):

$$RDD_{ln(a)} = \%100 * \exp(\pm Z_a * 2^{1/2} * (CV_{lnA}^2 + CV_{lnI}^2)^{1/2})$$

2.3.2.2. Bireysellik İndeksi

Birey içi varyasyon katsayısının, bireyler arası varyasyon katsayısına oranı ilk olarak 1970 yılında potansiyel bir değerlendirme aracı olarak tanımlanmış ve bu kavram daha sonra "bireysellik indeksi" olarak adlandırılmıştır (115,120). Bu indeksin temel kullanım alanı, bir klinik testin popülasyona ait referans aralığının (RI), bireydeki patolojik değişiklikleri doğru şekilde tanıyıp tanıyamayacağını değerlendirmektir. Fraser ve Harris, CV_I / CV_G oranı 1,4'ten büyük olduğunda, popülasyon referans aralığının bireydeki anormal bir sonucu saptamada güvenilir kabul edilebileceğini belirtmiştir. Bu durumda, birey içi değişkenliğe kıyasla grup varyasyonu düşüktür ve bireyin test değerindeki küçük bir değişiklik dahi referans aralığı tarafından "anormal" olarak işaretlenebilir. Buna karşılık, oran 0,6'dan küçükse, bu durum birey içi değişkenliğe kıyasla grup varyasyonunun yüksek olduğunu gösterir; bu nedenle, referans aralığı bireydeki anlamlı değişimi saptamada

yetersiz kalabilir ve sonuç "normal" aralıkta görünmeye devam edebilir (115). Bu iki eşik değerin arasında kalan 0,6–1,4 aralığı ise gri bir alan olarak değerlendirilir. Bu durumda, bireylerin cinsiyet veya yaş gibi uygun alt gruplara ayrılması yoluyla CV_I ve CV_G değerlerinin yeniden hesaplanması, bireysellik indeksinin iyileştirilmesine katkı sağlayabilir (111).

Bazı biyobelirteçler için referans aralıklarının sınırlılıkları göz önünde bulundurulduğunda, güvenilir RDD hesaplaması için CV_I ve CV_G değerlerinin sağlam bir şekilde tahmin edilmesi, geleneksel referans aralık kullanımındaki bazı güçlükleri aşmak için etkili bir alternatif olabilir. Ancak bu yöntem, test edilen bireyin daha önceki laboratuvar sonuçlarının mevcut olmasını gerektirir. Bu durumda, laboratuvar raporuna hastanın yeni sonucu ile RDD arasındaki yüzde değişimi ve buna eşlik eden uyarı işaretleri eklenerek, klasik referans aralığı ile birlikte sunulması mümkündür. Bu yaklaşımın uygulanması, laboratuvar sonuçlarını genellikle referans aralığına göre değerlendirmeye alışkın olan sağlık profesyonellerinin bu yeni yönetime yönelik bilgilendirilmesini de gerektirecektir (117).

2.3.2.3. Delta Kontrolü

Laboratuvar bilgi sistemlerinde depolanan hastaya ait önceki test sonuçlarının dahili olarak karşılaştırılması, test raporlanmadan önce olası preanalitik veya analitik hataların belirlenmesine olanak tanır. Bu uygulama, literatürde yaygın olarak "delta kontrolü" olarak tanımlanır. Geleneksel olarak, bu kontrolde biyolojik varyasyona dayanmayan genel kurallar kullanılmakta; örneğin, mevcut test sonucunun önceki sonuca göre 2 veya 3 standart sapmadan (SD) fazla sapma göstermesi gibi kriterler esas alınmaktadır. Ancak, son yıllarda delta kontrol kriterlerinin biyolojik varyasyon verilerine dayalı olarak belirlenmesi, giderek daha fazla kabul gören alternatif bir yaklaşım hâline gelmiştir. Bu yöntem, anlamlı değişim değerinin hesaplanmasına dayanmaktadır (121).

Delta kontrol yönteminin, örnek karışıklığı ya da analitik hataların saptanmasındaki etkinliği, her biyobelirteç için güvenilir CV_I tahminlerinin elde edilmesine bağlıdır; çünkü RDD denklemi kullanılarak delta kontrol değeri belirlenirken bu gereklidir. Bu bilgiler için Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) tarafından yayımlanan EP33 dokümanı önemli bir kaynaktır (122).

Ayrıca, RDD'nin preanalitik aşamada testleri etkileyebilecek etkenlerin değerlendirilmesinde de kullanılabileceği gösterilmiştir. Buna örnek olarak, hasta örneklerinde hemoliz kaynaklı girişim düzeylerinin kabul edilebilir sınırlarının belirlenmesinde RDD'nin uygulanması verilebilir (123). Her durumda RDD hesaplama yöntemi aynı kalmakta; bu da klinik laboratuvar uzmanının, delta kontrolünde verilen uyarının örnek karışıklığından mı yoksa hastada meydana gelen fizyolojik bir değişiklikten mi kaynaklandığını ayırt etmesini gerektirmektedir. Bu ayrımı yapabilmek için olası bir yaklaşım, anlamlı değişikliğin (RDD'yi aşan) yalnızca tek bir biyobelirteçte mi, yoksa birden fazla biyobelirteçte mi görüldüğünü incelemektir. Eğer birden fazla biyobelirteç etkilenmişse ve bu biyobelirteçler klinik olarak birbiriyle ilişkili değilse, bu durum örnek karışıklığı olasılığını daha güçlü bir şekilde düşündürebilir (117).

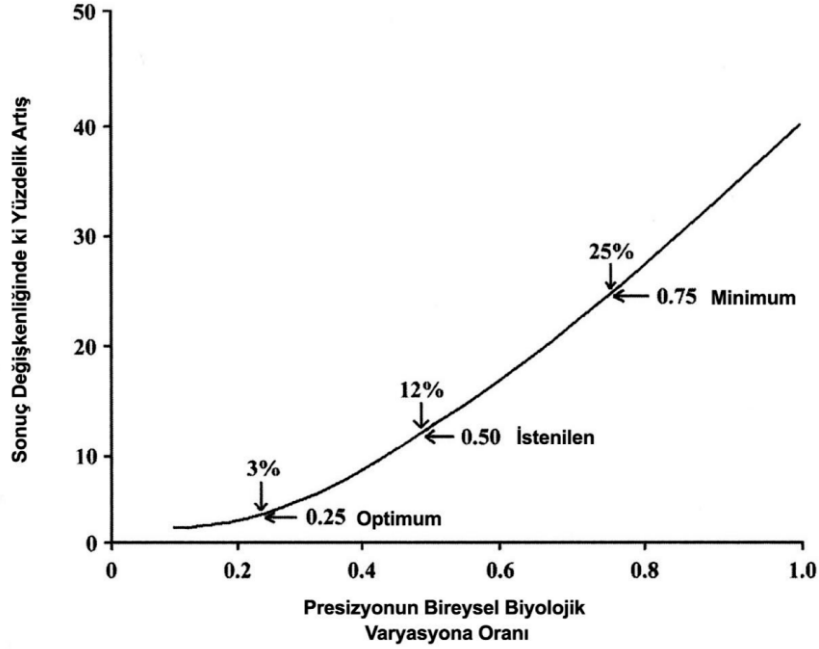
2.3.2.4. Analitik Performans Spesifikasyonları

Analitik performans spesifikasyonlarının her bir analiz parametresi için tanımlanması, o ölçümün klinik olarak kullanılabilirliğini sağlamak ve ölçüm hatasının sonuç üzerinde etkili olmamasını garanti altına almak açısından kritik bir öneme sahiptir (124).

Analitik performans özelliklerini tanımlamak için önerilen yaklaşımlar, öncelikle analitik performansın klinik sonuçlar üzerindeki etkisine veya ölçülenin biyolojik varyasyonuna dayanmalıdır (125). Deneysel çalışmalarla metodolojik performansların klinik etkisini değerlendirerek elde edilen analitik performans spesifikasyonları, uygulamada genellikle zor erişilebilir olduğundan, biyolojik varyasyon, birçok analiz için analitik hedeflerin tanımlanmasında en güvenilir bilgi kaynağını oluşturmaktadır (126).

Laboratuvarlarda rastgele varyasyonun (presizyon) değerlendirilmesi, genellikle cihazlara her gün çalışma öncesinde uygulanan iç kalite kontrol numuneleri üzerinden gerçekleştirilmektedir. Presizyondan kaynaklanan analitik belirsizlik, presizyon azaldıkça toplam varyasyon içinde daha belirgin bir paya sahip olur. Bu nedenle, analitik varyasyonu minimize etmek, test sonuçlarında gözlenen değişimlerin bireysel biyolojik değişkenlikten (CV_i) kaynaklandığını ortaya koymak açısından

önem taşır (Şekil 2.9). Böylece, gözlenen değişikliğin gerçekten hastanın klinik durumundaki bir iyileşme ya da kötüleşmeye bağlı olduğu daha net şekilde anlaşılabilir (127).



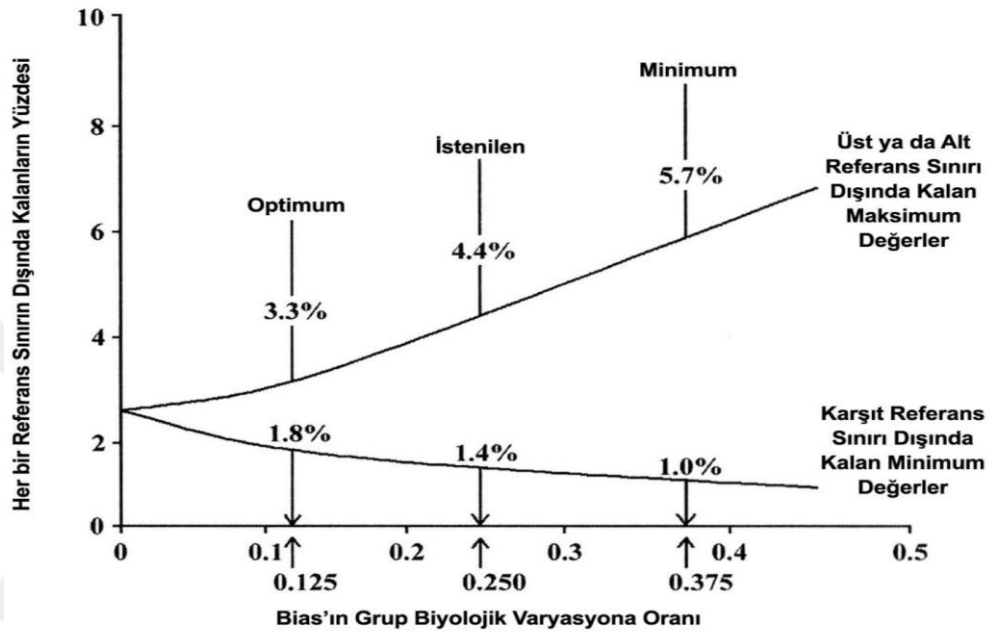
Şekil 2.9: İmprezisyon için analitik kalite spesifikasyonu

Fraser ve çalışma arkadaşları, biyolojik varyasyon verilerine dayanarak analitik kalite hedeflerinin belirlenmesine yönelik birtakım formüller geliştirmişlerdir. Her ne kadar bu formüllerin bazı kısıtlı yönleri bulunsun da Fraser'ın önerdiği biyolojik varyasyon temelli model, günümüzde tıbbi laboratuvarlarda en yaygın olarak benimsenen yaklaşım hâline gelmiştir (Tablo 2.3) (128).

Tablo 2.3: Performans düzeylerine göre kullanılan CV_A , BA , TE_a formülleri

Performans Düzeyi	CV_A (İmprezisyon)	BA (Bias)	TE_a (Total İzin Verilebilir Hata)
Minimum	$CV_A < 0,75 CV_I$	$BA < 0,375(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$	$TE_a < 0,375(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} + 1,65(0,75 CV_I)$
İstenilen	$CV_A < 0,5 CV_I$	$BA < 0,25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$	$TE_a < 0,25(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} + 1,65(0,5 CV_I)$
Optimum	$CV_A < 0,25 CV_I$	$BA < 0,125(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2}$	$TE_a < 0,125(CV_I^2 + CV_G^2)^{1/2} + 1,65(0,25 CV_I)$

Laboratuvar süreçlerinde ideal olarak anlamlı bir biasın ortadan kaldırılması hedeflenir ve ölçüm prosedürleri arasındaki biası asgari düzeye indirme çabaları sürdürülür (129). Ancak pratikte bu tür sistematik farkların tamamen ortadan kaldırılması mümkün olmayabilir. Bu nedenle, klinik kararları etkilemeyecek ölçüde kabul edilebilir sabit sistematik farklar için APS tanımlanması yararlı olabilir.



Şekil 2.10: Bias için analitik kalite spesifikasyonu

Toplam izin verilebilir hata (TEa), bias (sistematik hata) ve imprecizyon (rastgele hata) bileşenlerini kapsayan ve bir test sonucunun kabul edilebilir sınırlarını tanımlayan analitik bir kalite spesifikasyonudur. Laboratuvarlarda analiz edilen analitler için amaç, toplam hatanın belirlenen TEa sınırlarının altında tutulmasıdır.

2.3.2.5. Homeostatik Ayar Noktasını Saptamak İçin Kullanılacak Örnek Sayısının Belirlenmesi

Homeostatik ayar noktası, belirli bir ölçüm büyüklüğünün normal aralık içerisinde doğal olarak dalgalandığı fizyolojik değeri ifade eder. Bu değer gerçekte değerine belirli bir yüzde sapma sınırında ulaşabilmek için genellikle tekrarlı ölçümler gereklidir. Her bireyden biyolojik olarak stabil koşullarda elde edilen örnek sayısı arttıkça, homeostatik ayar noktasının tahmini daha doğru olacaktır. Bu durum özellikle

analitik yöntemlerin düşük imprecisyona sahip olduğu veya analiz edilen analitin yüksek birey içi varyasyon katsayısı gösterdiği durumlarda önem kazanmaktadır. Gerekli örnek sayısının (n) hesaplanmasında kullanılan formül şu şekildedir:

$$n: [1.962 (CV_A^2 + CV_I^2) / D^2]$$

Formüldeki D değeri, homeostatik ayar noktasına yakınlığın kabul edilebilen yüzde değeridir (130). Çalışmalarda kullanılan değerler sıklıkla %5, %10 ve %20'dir.

2.3.2.6. BV tahminlerini almak için EFLM veritabanını kullanma

Laboratuvar ortamında biyolojik varyasyon verilerinin uygulanabilmesi için, ilgili biyobelirteçler açısından birey içi ve bireyler arası varyasyon katsayısı tahminlerinin elde edilmesi gerekmektedir. EFLM veri tabanı, literatürden derlenmiş CV_I ve CV_G tahminlerine ilişkin zengin bir bilgi kaynağı sunmaktadır (5). Bu tahminler, güven aralıkları ile birlikte medyan değerleri içeren bir "meta-analiz" olarak raporlanmaktadır. Veri tabanından doğrudan elde edilen bilgiler, klinik laboratuvar uzmanının BV verilerini kullanarak test sonuçlarının klinik yorumuna yönelik uygun hedeflerin belirlenmesi ve analitik performansın değerlendirilmesi amacıyla uygulamasına olanak tanımaktadır (117).

2025 yılında EFLM tarafından uzman grupların katkısıyla geliştirilen çevrimiçi bir kaynak olan STARBIV, biyolojik varyasyon çalışmalarının daha tutarlı, şeffaf ve karşılaştırılabilir biçimde raporlanmasını sağlamak amacıyla hazırlanmış metodolojik bir kılavuzdur. Bu kılavuz, biyolojik varyasyon verilerinin kalitesini artırmak, çalışmaların standardizasyonunu sağlamak, klinik karar destek sistemlerine katkıda bulunmak ve elde edilen verilerin uluslararası düzeyde karşılaştırılabilirliğini mümkün kılmak üzere geliştirilmiştir (131).

2.3.3. Biyolojik Varyasyon Çalışma Modelleri

Biyolojik varyasyon bileşenlerini tahmin etmeye yönelik "doğrudan yöntem", prospektif bir çalışma tasarımına dayanmaktadır ve genel olarak birkaç temel aşamaya ayrılabilir:

- Bireylerin seçimi,
- Örneklerin toplanması,
- Örneklerin analizi
- İstatistiksel değerlendirme

İlk bakışta, güvenilir biyolojik varyasyon çalışmalarının her zaman prospektif, doğrudan yöntem tasarımı gerektirdiği izlenimi oluşabilir. Ancak, “dolaylı yöntem”e dayanan çalışmaların da değer taşıdığını göstermek önemlidir. Daha önce raporlanmış test sonuçlarının retrospektif analizlerine dayanan “dolaylı yöntem”, güvenilir biyolojik varyasyon tahminleri sağlama konusunda da başarı göstermiştir. Ayrıca Daha az invaziv ve maliyetli oluşu, daha kolay uygulanabilirliği, büyük örneklemeler kullanıldığından, mevsimsel değişimlerin ve çeşitli gruplar arasındaki farklılıkların daha ayrıntılı analiz edilmesine olanak sağlaması doğrudan yöntem tabanlı çalışmalardan ayıran avantajlarındandır (132). Bununla birlikte, bu yöntemin uygulanmasında da nihai veri kümesinin ilgili popülasyonunun gerçekten temsil ettiğinden emin olmak için dikkatli bir tarama süreci gereklidir (133).

2.3.4. Biyolojik Varyasyon Verileri Eleştirel Değerlendirme Kontrol Listesi (BIVAC)

EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu, biyolojik varyasyon araştırmalarını sistematik olarak değerlendirmek ve gelecekteki çalışmalara rehberlik etmek amacıyla 2018 yılında Biyolojik Varyasyon Verilerinin Kritik Değerlendirme Kontrol Listesini (BIVAC) geliştirmiştir. Bu kontrol listesi, yayımlanan çalışmaların standart bir yaklaşımla meta-analizin ve eleştirel incelemesinin yapılmasına olanak sağlamaktadır (6).

EFLM Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu, 2018 yılında biyolojik varyasyon araştırmalarını incelemek ve gelecekteki çalışmalara yön vermek amacıyla Biyolojik Varyasyon Verileri Kritik Değerlendirme Kontrol Listesi (BIVAC) yayınlamıştır. Bu sayede, yayınlanan çalışmaların meta-analizi ve eleştirel değerlendirilmesi standardize edilmiştir. Bu kontrol listesinin odak noktası, çalışmanın tasarımı, ölçüm teknikleri ve CV_I hesaplamalarına ilişkin verilerdir (6).

BIVAC derecelendirme sistemi, yayımlanmış biyolojik varyasyon çalışmalarına uygulanan on dört kalite ölçütünden (QI) oluşan bir listeye dayanmaktadır. BIVAC derecelendirme sisteminin, tüm kalite ölçütlerini eşit ağırlıkta değerlendirdiği unutulmamalıdır. Bu nedenle, herhangi bir QI için verilen en düşük not, ilgili yayının nihai özet puanı olarak kullanılır. Nihai puanlama, ilgili QI'lar için alt simge olarak belirtilen numaralarla birlikte harf notu şeklinde gösterilir. Örneğin, 14 kategoriden 13'ünde "A" notu almış, yalnızca QI-7 (kararlı durum) için "C" notu almış bir yayın, özet puanı C₇ olarak raporlanır (6). Bu kalite ölçütlerinin temel kategorileri şunlardır:

- Ölçek ve Ölçülen Büyüklük (QI-1, QI-4)
- Bireyler ve Numuneler (QI-2, QI-3)
- Preanalitik, Analitik ve Kararlı Durum Kriterleri (QI-5, QI-6, QI-7)
- İstatistiksel analiz öncesinde veriye yönelik kontroller (QI-8, QI-9, QI-10)
- Kullanılan istatistiksel yöntem ve bildirilen güven aralığı (CI) (QI-11, QI-12)
- Nihai veri setine dahil edilen toplam sonuç sayısı ve bildirilen CV_I ve CV_G değerlerinin türetildiği konsantrasyon değeri (QI-13, QI-14)

2.3.5. Biyolojik Varyasyon Analizinde Kullanılan İstatistiksel Yöntemler

2.3.5.1. Varyans Analizi (ANOVA) Testi

Tek yönlü ANOVA testinde, varyanslar gruplar arası ve grup içi olarak ayrılır. Bu varyanslar sırasıyla CV_G ve CV_I'ya karşılık gelir. CV_I ve CV_G, büyük ölçüde standart tek yönlü ANOVA testi ile ayrılabilse de bazı kaynaklar, grup içi varyansın kaynaklanan katkının elimine edilerek matematiksel olarak "saf" grup arası varyansın elde edilmesi için ek düzeltmeler yapılmasını önermektedir (134).

2.3.5.2. Nested ANOVA

BIVAC rehberinde biyolojik ve analitik varyasyon bileşenlerinin her ikisini de tahmin etmek için önerilen yöntem, hiyerarşik (nested) tasarıma sahip ANOVA testidir

(6). Bu yöntem, varyasyonun bireysel katmanlarını veya bileşenlerini doğrudan ayırır. Teknik tekrarlar kullanılarak CV_A tahmin edildiğinde, bu varyasyon CV_I içinde “iç içe” (nested) hale gelir ve hiyerarşik ANOVA yöntemi, CV_I ’dan bu ek bileşeni izole eder (135).

2.3.5.3. CV-ANOVA

Bu terim ilk olarak Roraas ve arkadaşları tarafından geliştirilen bir istatistiksel yaklaşımda tanımlanmıştır. CV-ANOVA yaklaşımında, her bir deneğin ölçülen konsantrasyon değerleri, o deneğin bireysel değerlerinin tüm test ölçümlerinin ortalamasına bölünerek normalize edilir. Normalizasyon sonucunda her deneğin normalize edilmiş değerlerinin ortalaması tasarım gereği 1’e eşit olur; dolayısıyla ANOVA’daki grup varyansı hesaplaması sıfıra indirgenir. CV_G ’nin sıfıra indirgenmesi için bu matematiksel yaklaşımın, CV_I ’nın daha sağlam tahminlerini sağladığı düşünülmektedir. Araştırmacıların CV_G tahminini elde etmek için ham veriler üzerinde ayrıca standart ANOVA testi çalıştırmaları gerekmektedir (119).

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Sağlıklı bireylerde serum karnitin için biyolojik varyasyon bileşenlerinin belirlenmesi başlıklı çalışmamız Afyonkarahisar Sağlık Bilimleri Üniversitesi Müdahale Olmayan Bilimsel Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 01.11.2024 tarihli 2024/9 toplantı numaralı kararı ile onaylanmıştır (EK-1).

3.1. Gönüllü Popülasyonun Seçimi

Araştırmaya normal günlük yaşantısını sürdüren yazılı ve sözlü olarak onamları alınmış 30 sağlıklı gönüllü katılmıştır.

Gönüllü popülasyon seçimi EFLM tarafından kurulan Biyolojik Varyasyon Çalışma Grubu (BVWG) tarafından yayınlanmış kritik kontrol değerlendirme listesine göre yapılmıştır (136).

Gönüllü bireylerden, çalışmaya dahil edilmeden önce genel sağlık durumlarını ve yaşam tarzları hakkında bilgi almak amacıyla, Ek-2’teki anketi doldurmaları istenmiştir. Gönüllülere altı hafta süresince her numune alınmasından önce, Ek-3’te yer alan kısa anket doldurulmuştur.

3.1.1. Dahil Edilme Kriterleri

Bir bireyin bu çalışmaya katılmaya uygun olabilmesi için aşağıdaki tüm kriterleri karşılaması gerekmektedir:

- Bilgilendirilmiş onam formunu okuyup kabul ederek imzalamış olmak,
- Öznel olarak kendini iyi hissetmek,
- 18 yaşından büyük olmak
- Herhangi bir ilaç kullanmıyor olmak
- İdeal olarak sigara veya alkol kullanmıyor olmak (tütün veya alkol kullanan gönüllülerin, kullanılan ürünün türü ve miktarını bildirmesi istenmiştir.).

3.1.2. Dışlama Kriterleri

Aşağıdaki kriterlerden herhangi birini karşılayan bireyler çalışma dışında bırakılmıştır:

- Tanısı konulmuş diyabeti olan ve oral antidiyabetik ya da insülin tedavisi gören bireyler
- Kronik karaciğer veya böbrek hastalığı öyküsü bulunan bireyler
- Talasemi sendromu ve diğer hemoglobinopatilere dair aile öyküsü olan bireyler
- Yapılan tetkiklerde kronik bir hastalık (kanser, dislipidemi, kardiyovasküler veya nörolojik hastalık) ya da akut hastalık bulgularının saptanması
- Hepatit B virüsü (HBV), hepatit C virüsü (HCV) veya insan immün yetmezlik virüsü (HIV) taşıyıcısı olduğu bilinen bireyler
- Son 4 hafta içinde hastanede yatarak tedavi görmüş ya da ciddi şekilde hastalanmış bireyler
- Son 3 ay içerisinde kan bağıışı yapmış bireyler
- Hamile, emziren ya da doğum yapmasının üzerinden 1 yıldan az süre geçmiş olan kadınlar
- Araştırmacının kanaatine göre, çalışmaya katılımın birey için risk oluşturabileceği ya da çalışma sonuçlarını etkileyebileceği diğer önemli bir hastalık ya da bozukluk varlığı
- Çalışmaya katılmayı reddeden ya da çalışma sırasında katılımdan vazgeçen bireyler

3.2. Numunelerin Toplanması ve Saklanması

Her gönüllü bireyden örnek alım işlemi, preanalitik faktörleri en az düzeye indirmek için standardize şartlar altında gerçekleştirildi. 6 hafta boyunca haftanın aynı gününde, en az 8 saatlik süren açlık sonunda, 8.00-10.00 saatleri arasında, 15 dakikalık istirahat sonrası, oturur pozisyonda, aynı tecrübeli flebotomist tarafından antekübital bölgeden bir adet jelli-pıhtı aktivatörlü tüpe venöz kan örneği alındı.

Jelli-pıhtı aktivatörlü tüpe alınan numuneler pıhtı oluşumu için 30 dakika bekletildikten sonra oda sıcaklığında 1500xg'de 12 dakika santrifüj edildi. Serum örnekleri biyokimya ve karnitin analizleri için ayrıldıktan sonra uygun bir şekilde gönüllü sırasına göre etiketlendi. Karnitin analizi için çalışılacak serum örnekleri için -80°C'de analiz gününe kadar saklandı. Biyokimya analizi ise aynı gün içinde yapıldı.

3.3. Numunelerin Analizi

3.3.1. Biyokimya Analizi:

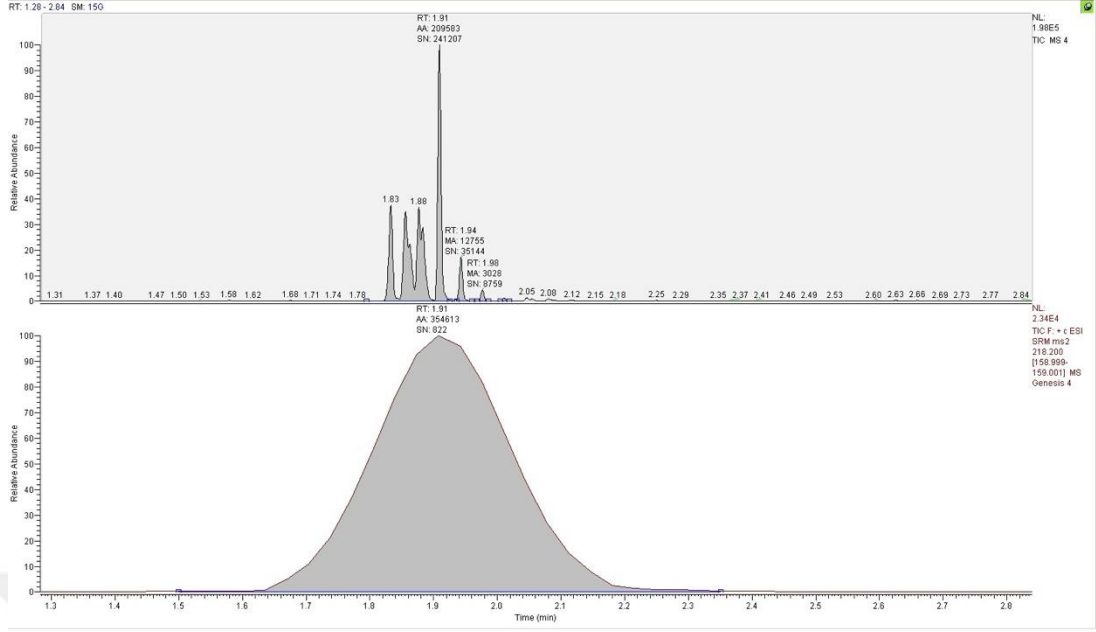
Her gönüllüden genel sağlık durumunu değerlendirmek amacıyla her hafta alınan numunelerden glukoz, kreatinin, total kolesterol, trigliserit, gama glutamil transferaz (GGT), alanin aminotransferaz (ALT), kreatin kinaz (CK), C-reaktif protein (CRP) ve serum indeks düzeyleri (hemoliz, ikter ve lipemi) Roche Cobas 7000 otoanalizöründe analiz edilmiştir.

3.3.2. Karnitin Analizi

6 hafta boyunca toplanan 360 numune, analiz gününde oda sıcaklığında analiz için uygun hale getirilmiştir. Analiz öncesi gereken karnitin analizi için kalibrasyon ve iç kalite kontrol çalışmaları gerçekleştirildi. Numunelerin ön aşama işlemleri aynı teknisyen tarafından yapıldı. Analitik varyasyonun mümkün olduğunca en aza indirilmesi için numunelerin hepsi aynı çalışmada rastgele ve çift çalışıldı. Analiz Clinlab Laboratuvarı, Ankara’da gerçekleştirildi.

Total karnitin, serbest karnitin ve açilkarnitin analizi için 1,5 mL hacimli mikro santrifüj tüplerine her bir numune örneğinden 20 µL alınarak eklendi. Her tüpe, iç standart içeren 400 µL’lik çalışma çözeltisi ilave edildi ve vortex cihazında kısa süreli karıştırıldı. Karışımların oda sıcaklığında 5 dakika bekletilmesinin ardından, 12.000×g kuvvetinde, 10 dakika süreyle santrifüjleme işlemi gerçekleştirildi. Santrifüj sonrası elde edilen süpernatant fazdan 300 µL’lik hacim alınarak cam tüplere aktarıldı. Aktarılan süpernatant, 40 °C sıcaklıkta, azot gazı akışı altında tamamen kurutuldu. Kuruyan kalıntıya 100 µL 3 N HCl/bütanol çözeltisi eklendi ve 60 °C sıcaklıktaki kuru blok inkübatörde 20 dakika süreyle inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından tüpler tekrar 40 °C’de azot akışı altında kurutuldu ve tüp dibinde kalan kalıntılar 900 µL %80 asetonitril/su çözeltisi ilavesiyle yeniden çözüldü. Homojen çözelti, analize uygun otosampler vial’lerine aktarıldı ve her numunedan 50 µL’lik hacim analiz için LC/MS/MS sistemine (Thermo Fisher Scientific Ultimate 3000) enjekte edildi.

LC-MS/MS ile serbest karnitin (C0) için elde edilen örnek kromatogram şekil 3.1’de gösterilmektedir.



Şekil 3.1: LC-MS/MS ile serbest karnitin (C0) için elde edilen örnek kromatogram

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler, IBM SPSS Statistics for Windows sürüm 20, Microsoft Office 365 Excel (2024) ve Microsoft Excel için Analyse-it yazılımı kullanılarak gerçekleştirildi; bu yazılımlar ileri düzey istatistiksel değerlendirmelerde kullanıldı.

APS değerleri, BV verilerine dayalı olarak Fraser ve arkadaşlarının (128) tanımladığı formül kullanılarak imprecisyon ve bias için hesaplandı. Bireysellik indeksi, Harris'in formülü(128,137) kullanılarak BV bileşenlerinden türetildi. Ölçümde artış ve azalışlar için referans değişim değerleri, Fokkema ve arkadaşlarının (138) tanımladığı log-normal yaklaşım ile belirlendi. NHSP hesaplamaları için gereken örnek sayısı (5 %, 10 % ve 20 % için), Fraser ve arkadaşlarının (128) önerdiği yöntemle saptandı.

Çalışma tasarımının CV_I tahminindeki gücü, tekrarlı ölçüm sayısı, örneklem büyüklüğü ve CV_A/CV_I oranı dikkate alınarak Røraas ve arkadaşlarının (135) yaklaşımıyla değerlendirildi.

3.4.1. Çalışma Gücünün Değerlendirilmesi

Çalışmamızın istatistiksel gücünün değerlendirilmesinde, Roraas ve arkadaşlarının yürüttüğü çalışma temel alınmıştır. Bu çalışmada belirtildiği üzere, biyolojik varyasyon çalışmalarının tasarımı; tekrar sayısı, numune sayısı ve birey sayısı gibi değişkenler, bir analitin CV_I ve RDD değerlerinin güvenilirliğinde belirleyici rol oynamaktadır. CV_I 'nin doğru tahmini açısından, birey başına toplanan numune sayısı, çalışmaya dâhil edilen birey sayısından daha kritik bir faktördür. Sabit toplam ölçüm sayısı göz önünde bulundurulduğunda, az sayıda bireyden daha fazla numune alınması tercih edilmelidir. CV_A yüksek olduğu durumlarda ise güven aralığının genişlemesi ve istatistiksel gücün azalması gibi durumlar tekrar sayısı artırılarak dengelenebilir. CV_A / CV_I oranı 1'den küçük ise çalışmanın gücü 100% olarak ifade edilmektedir. Genellikle %80 ve üzeri bir güç hedefi kabul edilebilir sayılmaktadır (135).

3.4.2. Aykırı Değerlerin Tespit Edilmesi

Biyolojik varyasyon verilerinin istatistiksel değerlendirmesindeki ilk adım, aykırı değerlerin belirlenmesidir. Aykırı değerlerin tespiti 3 farklı seviyede yapılmıştır. Tekrar sonuçları arasındaki aykırı değerler ile her bir bireyin kendi sonuçlarının varyanslarındaki aykırı değerler Cochran testi ile tespit edilmiştir. Herhangi bir bireyin diğer katılımcıların ortalamalarına göre bir aykırı değere sahip olup olmadığının tespitinde ise Reed's kriteri kullanılmıştır. Aykırı değer olarak tespit edilen sonuçlar kapsam dışında bırakılmış ve analize geriye kalan veri ile devam edilmiştir.

3.4.3. Normal Dağılımın Değerlendirilmesi

Elde edilen verilerin her bir birey için ve bireylerin tamamı için normal dağılıma uygun olup olmadığı Shapiro-Wilk testi ile gerçekleştirilmiştir. Normal dağılmayan veriler bir kez de Kolmogrow-smirnow testi ile analiz edilmiştir. Bu test ile de normalite göstermeyen verilere logaritmik transformasyon uygulanmıştır. Bir kez daha normal dağılım göstermeyen bireyler biyolojik varyasyon hesaplanmasına dahil edilmemiştir.

3.4.4. Kararlı Durumun Değerlendirilmesi

Gönüllülerin çalışma boyunca kararlı durumda olup olmadığı, her numune alma haftasında tüm bireylerden elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalama değeri ile karşılık gelen numune alma haftasına karşı lineer regresyon analizi kullanılarak değerlendirildi. Regresyon çizgisinin eğimi, %95 güven aralığında 0 (sıfır) değerini içeriyorsa, katılımcıların kararlı durumu sağladığı kabul edildi.

3.4.5. Homojenitenin Değerlendirilmesi

Biyolojik varyasyon bileşenlerinden elde edilen verilerin popülasyona genellenebilmesi ve uygulanabilmesi için, birey içi ve analitik varyansların homojen bir şekilde dağılması gerekmektedir (115). Birey içi ve analitik değişkenliğin homojenitesi ayrı ayrı Cochran testi ile analiz edildi. p değeri 0.05'ten büyük ise homojen olarak değerlendirilmiştir. Heterojenite varsa, homojenlik elde edilene kadar aykırı değerler çalışmadan çıkarıldı.

3.4.6. Cinsiyet Grupları Arasındaki Farklılıkların Değerlendirilmesi

Kadın ve erkek gruplarında hesaplanan CV_I ve CV_G değerleri için %95 güven aralıkları karşılaştırıldı. Eğer bu güven aralıkları cinsiyetler arasında örtüşüyorsa, gruplar arasında anlamlı bir fark olmadığı kabul edilir ve tüm bireylerin sonuçları birleştirilerek raporlanır. Ancak güven aralıkları örtüşmüyorsa, cinsiyetler arasında anlamlı bir fark olduğu sonucuna varılır ve bu durumda CV_I ve CV_G değerleri kadınlar ve erkekler için ayrı ayrı raporlanmalıdır (139). Cinsiyetler arasındaki ortalama değer farkları, Student t-testi ile de değerlendirilmiştir. Erkek ve kadın bireyler arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmaması durumunda, analitik performans spesifikasyonlarının hesaplanmasında tüm bireylerden elde edilen CV_I ve CV_G değerleri birlikte kullanılmıştır.

3.4.7. Varyans Analizi

Elde edilen veriler, standart sapmanın ortalamaya bölünüp 100 ile çarpılmasıyla tanımlanan varyasyon katsayısını hesaplamak üzere varyans analizi (ANOVA) kullanılarak değerlendirildi. CV_I ve CV_G ayrı ayrı erkekler, kadınlar ve tüm

Çalışma grubu için tahmin edildi. CV_A , örneklerin çift ölçümlerinden elde edildi. BV tahminlerinin %95 güven aralıkları Burdick ve Graybill (140) tarafından önerilen formüllerle hesaplandı. BV tahminleri hem tüm grup hem de kadın ve erkek alt grupları için ayrı ayrı hesaplandı. Eğer kadın ve erkek alt gruplarına ait BV tahminlerinin %95 güven aralıkları çakışıyorsa, cinsiyetler arasında anlamlı fark bulunmadığı kabul edildi. Cinsiyetler arasında herhangi bir analit için anlamlı fark bulunmazsa, APS hesaplamasında tüm bireylerden elde edilen CV_I tahmini kullanıldı. Anlamlı fark olduğunda ise en düşük CV_I değeri tercih edildi (141) . İki ortalama arasındaki fark Student t-testi ile değerlendirildi ve $p < 0,05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edildi. Benzer şekilde, kadın ve erkeklerin ortalama değerleri arasında anlamlı bir fark bulunduğunda en düşük CV_G tahmini APS için kullanıldı; aksi durumda birleşik gruptan hesaplanan CV_G değeri uygulandı (137).

4. BULGULAR

4.1. Gönüllü Bireylerin Demografik Bilgileri

Çalışmaya 14'ü kadın 16'sı erkek toplam 30 gönüllü katılmıştır. Gönüllü bireylerin demografik özellikleri Tablo 4.1'de özetlenmiştir.

Tablo 4.1: Çalışmaya katılan gönüllü bireylerin ortalama yaş, ortanca yaş ve standart sapmaları

Cinsiyet	Kişi Sayısı	Ortalama Yaş	Ortanca Yaş	Standart Sapma (SD)
Kadın	14	36,9	38,5	8,52
Erkek	16	34,8	32,5	10,2
Toplam	30	35,8	34	9,4

4.2. Gönüllü Bireylerin Vücut Kitle İndeksi(VKİ) ve Rutin Biyokimya Parametrelerinin Analizi

Çalışmaya katılan gönüllü bireylerin genel sağlık durumunu kontrol etmek için her hafta alınan numunelerinden albümin, total kolesterol, kreatinin, glukoz, GGT, trigliserit, ALT, CK, CRP ve serum indeksleri (hemoliz, ikter, lipemi) analiz edildi. İlgili haftaya ait referans aralık dışında kalan numuneler çalışmaya dahil edilmedi.

Tüm gönüllü bireylerden elde edilen biyokimya parametre sonuçları ve VKİ Ek-4, Ek-5, Ek-6'te belirtilmiştir.

4.3. Karnitin Analizi İçin Çalışma Gücünün Belirlenmesi

Çalışmamızda karnitin çeşitleri için CV_A/CV_I oranı total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin, açilkarnitin/serbest karnitin için sırasıyla 0,33; 0,36; 0,29 ve 0,39 hesaplanmıştır. Bu sonuçlar doğrultusunda çalışmamızın birey içi biyolojik varyasyonu belirleme gücü %100'dür.

4.4. Karnitin Analizi İçin İstatistiksel Olarak Dışlanan Aykırı Değerler

Total karnitin, serbest karnitin, asetilkarnitin, açilkarnitin için istatistiksel olarak dışlanan aykırı değerleri tablo 4.2'de gösterilmiştir.

Tablo 4.2: Karnitin profili için dışlanan aykırı değerler

		Homojenite elde edilene kadar analizden çıkarılan aykırı değerler			Biyolojik varyasyon verilerini tahmin etmek için kullanılan sonuçlar/bireyler	
		Birinci Adım	İkinci Adım (Aykırı sonuç sayısı/birey sayısı)	Üçüncü Adım (Aykırı sonuç sayısı/birey sayısı)	Sonuçlar	Birey sayısı
Total Karnitin	Hepsi	0	40/0	12/1	298	29
	Kadın	0	17/0	12/1	139	13
	Erkek	0	23/0	0	159	16
Serbest Karnitin	Hepsi	0	31/0	0	319	30
	Kadın	0	16/0	0	152	14
	Erkek	0	15/0	0	167	16
Açıkarnitin	Hepsi	0	30/0	0	320	30
	Kadın	0	17/0	0	151	14
	Erkek	0	13/0	0	169	16
Açıkarnitin / Serbest Karnitin	Hepsi	0	26/0	0	324	30
	Kadın	0	22/0	0	146	14
	Erkek	0	4/0	0	178	16

4.5. Karnitin Analizi İçin Normal Dağılım, Kararlı Durum ve Homojenitenin Değerlendirilmesi

Shapiro-Wilk testi ile yapılan normal dağılım değerlendirilmesinde total karnitin, serbest karnitin, açıkarnitin ve açıkarnitin/serbest karnitin oranı için normalite sağlandığı tespit edildi.

Total karnitin, serbest karnitin, açıkarnitin ve açıkarnitin/serbest karnitin verilerinin kararlı duruma uyduğu saptandı.

Cochran testi ile değerlendirilen verilerde ise tüm analitler için homojenite sağlandığı tespit edildi.

4.6. Karnitin Analizi İçin Varyasyon Analizi

Total karnitin, serbest karnitin, açıkarnitin ve açıkarnitin/serbest karnitin verileriyle nested ANOVA yöntemi kullanılarak tüm grubun ve cinsiyet alt grupları için CV_A , CV_I , CV_G değerleri hesaplandı. Cinsiyet alt gruplarının %95 güven aralıklarıyla birbirini kapsaması nedeniyle CV_A , CV_I , CV_G için cinsiyetler arasında fark bulunmadığı tespit edildi. Analitlere ait hesaplanan ortalama değerler Student t-

test ile değerlendirildi ve tüm karnitin çeşitlerinde anlamlı bir fark olduğu saptandı ($p<0,05$).

Total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin verilerinden hesaplanan ortalama değer tablo 4.3'te; CV_A , CV_I , CV_G ve II değerleri tablo 4.4'te %95 güven aralıklarıyla verilmiştir.

Tablo 4.3: Karnitin çeşitleri için cinsiyet gruplarına göre hesaplanan ortalama değerler

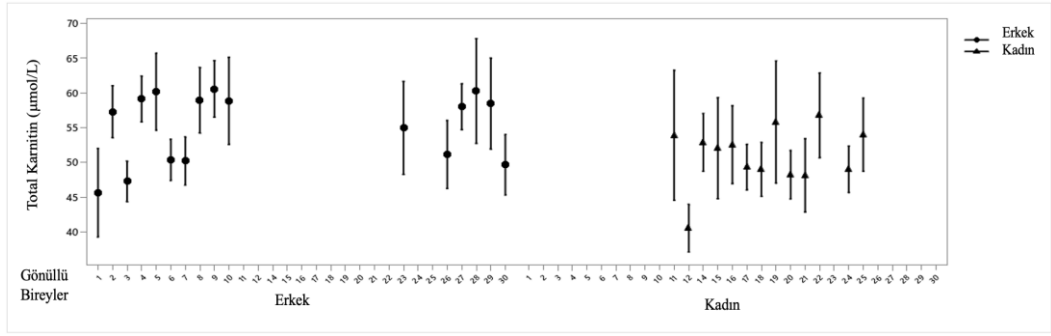
Karnitin Çeşitleri	Grup	Birey Sayısı	Toplam Sonuç Sayısı	Ortalama Değer ($\mu\text{mol/L}$) (%95 GA)
Total Karnitin	Tüm K E	29 13 16	298 139 159	52,9 (52,01-53,9) 50,8 (49,5-52,3) 54,8 (53,5-56,1)
Serbest Karnitin	Tüm K E	30 14 16	319 152 167	39,5 (38,7-40,3) 37,7 (36,6-38,8) 41,1 (40,0-42,1)
Açıl Karnitin	Tüm K E	30 14 16	320 151 169	12,4 (12,1-12,7) 12,2 (11,7-12,6) 12,7 (12,1-13,2)
Açilkarnitin / Serbest Karnitin	Tüm K E	30 14 16	324 146 178	0,32 (0,31-0,32) 0,33 (0,32-0,34) 0,31 (0,29-0,32)

Tablo 4.4: Karnitin çeşitleri için CV_A , CV_I , CV_G ve II değerleri

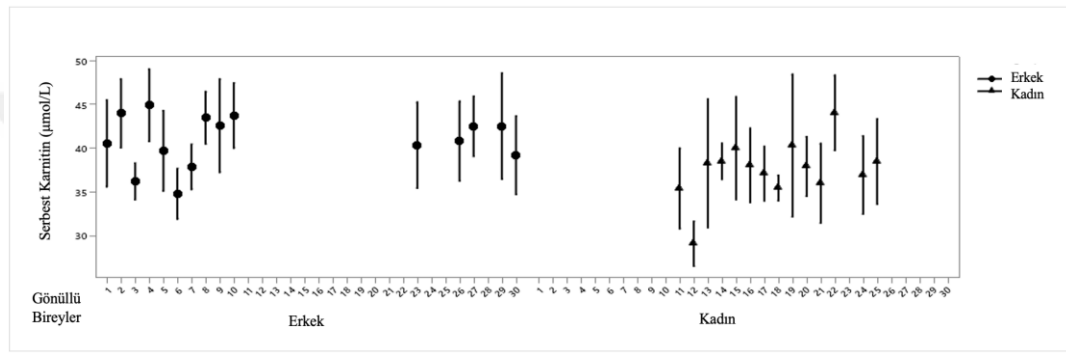
Karnitin Çeşitleri	Grup	CV_A (%95 GA), %	CV_I (%95 GA), %	CV_G (%95 GA), %	II	Online BV Veritabanı (4) % CV_I , % CV_G
Total Karnitin	Tüm K E	4,6 (4,1-5,2)	13,8 (12,3-15,6) 15,7 (13,4-19,0) 12,0 (10,4-14,4)	14,9 (12,4-18,4) 17,4 (11,7-33,5) 14,3 (10,5-22,1)	0,93	8,85 / 11,80
Serbest Karnitin	Tüm K E	6,1 (5,5-6,9)	16,7 (15,0-18,8) 15,7 (13,4-19,0) 12,0 (10,4-14,4)	15,5 (13,7-17,8) 17,4 (11,7-33,5) 14,3 (10,5-22,1)	1,08	8,05 / 16,65
Açilkarnitin	Tüm K E	6,9 (6,2-7,8)	23,1 (20,7-26,1) 23,4 (20,0-28,2) 22,8 (19,7-27,2)	22,0 (19,5-25,2) 22,5 (19,1-27,5) 21,5 (18,2-26,1)	1,05	
Açilkarnitin / Serbest Karnitin	Tüm K E	10,3 (9,3-11,6)	26,5 (23,9-29,9) 22,9 (19,8-27,5) 29,4 (25,6-34,7)	24,4 (21,6-28,0) 20,7 (17,1-25,7) 27,4 (23,2-33,0)	1,09	11,35 / 24,3

4.7. Karnitin Çeşitleri İçin Bireylerdeki Dağılım ve Ortalama Değer Grafikleri

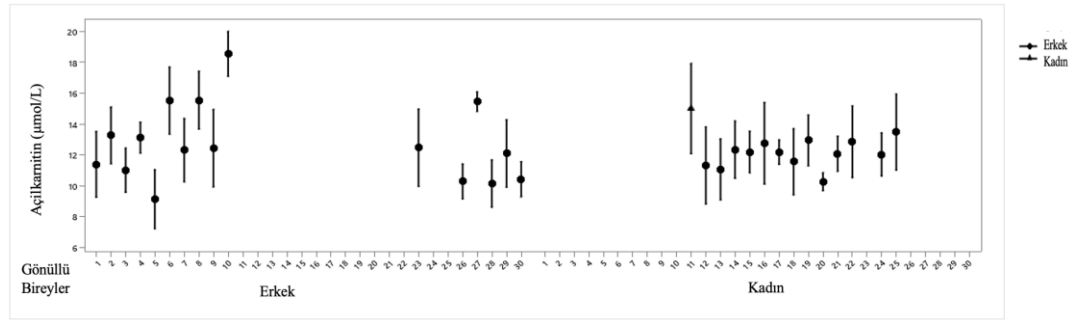
Total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin oranının bireylerdeki dağılım ve ortalama değerleri sırasıyla şekil 4.1, şekil 4.2, şekil 4.3 ve şekil 4.4'te gösterilmektedir.



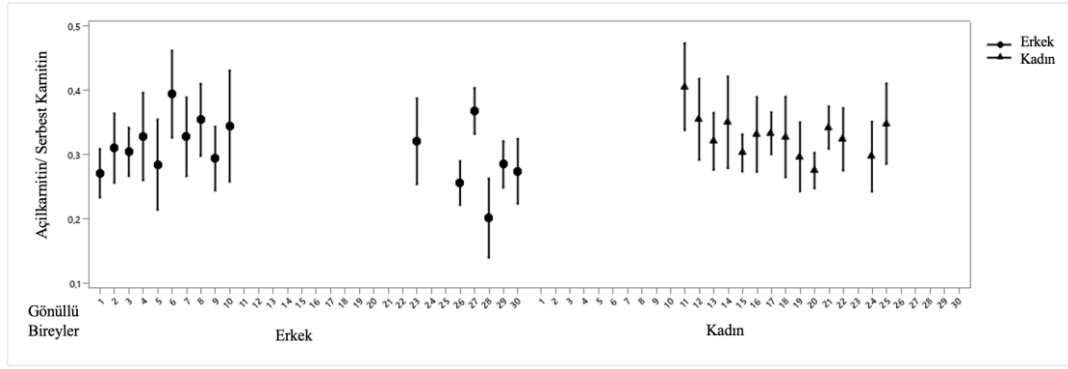
Şekil 4.1: Total karnitin 6 hafta boyunca bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri.



Şekil 4.2: Serbest karnitin 6 hafta boyunca bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri.



Şekil 4.3: Açık karnitin 6 hafta boyunca bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri.



Şekil 4.4: Açılkarnitin/serbest karnitin oranının 6 hafta boyunca bireylerdeki dağılımı ve ortalama değerleri.

4.6. Analitik Performans Spesifikasyonlarının Hesaplanması

Total karnitin, serbest karnitin, açılkarnitin ve açılkarnitin/serbest karnitin için elde edilen biyolojik varyasyon verilerinden hesaplanan ‘istenilen’ performans hedefleri tablo 4.5’te verilmiştir.

Tablo 4.5: İstenilen performans düzeyindeki kalite spesifikasyonları

Karnitin Çeşitleri	CV _{APS} , %	B _{APS} , %	TE _{aAPS} , %	RDD, % azalış/artış
Total Karnitin	6,9	5,1	16,5	-28,5/39,9
Serbest Karnitin	8,3	5,7	19,5	-33,6/50,7
Açılkarnitin	11,6	7,9	27,0	-42,4/73,2
Açılkarnitin / Serbest Karnitin	13,2	9,0	30,9	-47,8/91,5

4.7. Homeostatik Ayar Noktasına Ulaşmak İçin Gereken Numune Sayısının Belirlenmesi

Total karnitin, serbest karnitin, açılkarnitin ve açılkarnitin/serbest karnitin için elde edilen biyolojik varyasyon verilerinden %95 güven aralığı içinde %5, %10 ve %20 olasılıklarda bireyin homeostatik ayar noktasına ulaşmak için gerekli örnek sayılarının tahmini tablo 4.6’da verilmiştir.

Tablo 4.6: Karnitin çeşitleri için NHSP değerleri

Karnitin Çeşitleri	NHSP 20%	NHSP 10%	NHSP 5%
Total Karnitin	2	8	33
Serbest Karnitin	3	12	49
Açılkarnitin	6	22	89
Açılkarnitin / Serbest Karnitin	8	31	124

5. TARTIŞMA

Klinik laboratuvarların temel amacı, sağlık profesyonellerinin uygun tanısal veya terapötik kararlar almasına yardımcı olan doğru ve uygulanabilir laboratuvar sonuçları sunarak hasta sonuçlarının iyileştirilmesini sağlamaktır (142).

Tıbbi kararların yaklaşık %70 kadarında laboratuvar sonuçlarının etkili olduğu düşünüldüğünde toplam test sürecinde meydana gelebilecek hataların ve varyasyonların en aza indirilmesi doğru laboratuvar sonuçları için önem arz etmektedir (1). Laboratuvar test sonuçlarındaki değişimlerin kaynakları preanalitik varyasyon, analitik varyasyon ve biyolojik varyasyon olarak üç başlıkta incelenir.

“Klinik hekimin istemiyle kronolojik sırayla başlayan; inceleme istemi, hastanın hazırlanması ve tanımlanması, numune örneklerin alınması, laboratuvara ve laboratuvar içi nakil süreçlerini kapsayan ve analitik incelemenin başlamasıyla sona eren işlemler bütünü” olarak tanımlanan preanalitik evre, toplam test sürecindeki varyasyonlar ve hataların en çok meydana geldiği basamaktır. Preanalitik evredeki basamakların çoğunluğu laboratuvar dışında işlendiğinden kontrolü ve takibi daha zordur (143).

Analitik varyasyon, numunenin cihaza girmesiyle analizi sırasında ve doğrudan yöntemin performansıyla ilişkili olan varyasyondur. Analitik varyasyon rastgele ve sistematik hata olmak üzere iki başlık altında incelenir. Rastgele hata imprecizyon, sistematik hata ise bias kavramlarıyla ifade edilir. Laboratuvarlar yüksek presizyon ve olabildiğince düşük bias elde etmek için belirli düzenleyici ve önleyici faaliyetler yapmaktadırlar. Her ne kadar bu düzenlemeler ile analitik varyasyon azaltılmaya çalışılsa da analiz işleminin doğasında her zaman bir varyasyon olacaktır (144).

Biyolojik varyasyon, vücut sıvılarındaki biyobelirteç konsantrasyonlarının belirli homeostatik ayar noktası civarında fizyolojik dalgalanmaları olarak tanımlanmaktadır. Birey içi varyasyon, sabit durumda tek bir bireyde bir ölçülenin konsantrasyonunun/aktivitesinin bir homeostatik ayar noktası etrafındaki

varyasyonunu belirtirken; bireyler arası varyasyon, farklı bireylerin homeostatik ayar noktaları arasındaki varyasyonu belirtir (111).

Literatürdeki BV verileri incelendiğinde yayınlanmış çalışmalarda geniş çapta değişen tahminler görülmüştür. Bu sebeple mevcut verilerin kalitesi ve pratik uygulamadaki etkisi soru işaretlerine neden olmuştur. EFLM WG-BV adına 2015 yılında biyolojik varyasyon çalışmalarının standartlaştırılmış değerlendirilmesini sağlamak amacıyla Barlett ve ark. tarafından bir kontrol listesi hazırlandı (BIVAC). Yayınlanan çalışmaların meta-analizi ve eleştirel değerlendirilmesi bu sayede 65 standardize edilmiş oldu. Çalışmanın tasarımını, ölçüm tekniği ve CV₁ hesabına ilişkin veriler bu kontrol listesinin odak noktasını oluşturmaktadır. BV yayınları BIVAC doğrultusunda 14 kalite maddesi (QI) için A, B, C, D olmak üzere 4 basamakta derecelendirilir. A derecesindeki yayınlar tam puan alırken, D derecesindeki yayınlardaki biyolojik varyasyon verilerinin pratikte kullanılmaması önerilmektedir (6). Literatürdeki BV çalışmaları, BIVAC kriterlerine göre skorlanarak meta-analiz verisi olarak güncellenmekte ve yayınlanmaktadır (5).

Karnitin, öncül aminoasitleri lizin ve metiyonin olan; endojen olarak başlıca böbrek ve karaciğerde sentezlenen vitamin benzeri suda çözünen küçük bir moleküldür (13). Aktif form olan L-karnitin; temel olarak uzun zincirli yağ asitlerinin mitokondriye taşınmasını sağlayıp hücrel enerji üretiminde kritik rol oynayan ve bir bileşiktir. Ayrıca hücrel metabolizmada hücre içi KoA homeostazında düzenlenmesiyle trikarboksilik asit döngüsü, glukoneogenez, üre döngüsü gibi birçok enzim reaksiyonlarının devamını sağlar (31).

İnsan vücudunda toplam karnitin havuzu serbest karnitin ve esterlenmiş şekilleri olan açilkarnitinlerden oluşur. Karbon sayısına göre kısa, orta, uzun ve çok uzun zincirli açilkarnitin şeklinde sınıflandırılır. Kısa zincirli açilkarnitinler, toplam karnitin havuzunun yaklaşık %80'ini oluşturur (35).

Açilkarnitin profil analizi temel olarak mitokondriyal yağ asidi β -oksidasyonu ve organik asit metabolizması bozukluklarının tanısında kullanılır. Serum, plazma, kuru kan damlası örnekleri analiz için kullanılan başlıca örneklerdir (12).

Çalışmamızda, güncek kılavuzlar çerçevesinde sağlıklı ve gönüllü bireylerin katılımlarıyla serum karnitin çeşitlerinin biyolojik varyasyon bileşenlerinin belirlenmesi doğrultusunda EFLM WG-BV tarafından yayınlanan standartlar doğrultusunda karnitin çeşitlerinin CV_A , CV_I , CV_G , analitik kalite spesifikasyonları, RDD, II ve NHSP değerlerini hesaplanması amaçlandı (136). Bu amaçla 30 sağlıklı gönüllü bireyden (16 kadın ve 14 erkek), yaklaşık 6 hafta boyunca haftanın aynı günü serum örnekleri toplandı. Numuneler LC-MS/MS yöntemiyle ikişer tekrarlı ve rastgele olmak üzere analiz edildi. Tüm çalışma grubu ve cinsiyet alt gruplarında total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin için ortalama değer, analitik (CV_A) ve biyolojik varyasyon (CV_I ve CV_G) bileşenlerini, elde ettiğimiz biyolojik varyasyon verilerinden RDD, II ve analitik kalite spesifikasyonları hesaplandı.

Biyolojik varyasyon temelli bireysellik indeksi, referans aralıklarının bireysel test sonuçlarını değerlendirmedeki yararlılığını belirlemede önemli bir göstergedir. $II \leq 0.6$ ise klasik referans aralıkları bireyin alışılmadık sonuçlarını saptamada yetersizdir; $II \geq 1.4$ ise bu referans aralıklarının uygun olduğunu gösterir (111). Orta düzeydeki II değerleri (0.6–1.4 arası) gri bölgeyi temsil eder ve bu durumda popülasyon temelli referans aralıklarının dikkatli kullanılması gerekir (145). Yaptığımız çalışmada analiz edilen tüm analitler için II değeri 0,6 ile 1,4 arasında hesaplanmıştır. Çalışmamızda elde edilen sonuçlar serum karnitin düzeylerinin yorumlanmasında hem popülasyon temelli referans aralıklarının hem de bireye özgü seri ölçümlere dayalı RDD değerlerinin dikkate alınması gerektiğini göstermektedir. Bu durum, karnitin ölçümlerinin klinik karar süreçlerinde tek başına referans aralıklarına dayanarak yorumlanmasının yanıltıcı olabileceğini; bireysel biyolojik varyasyonun da göz önünde bulundurulmasının hasta takibine önemli katkı sağlayabileceğini ortaya koymaktadır.

Ardışık test sonuçları arasında anlamlı değişikliklerin tespit edilmesinde RDD kullanışlı bir ölçüt olarak önerilmiştir (111). Fokkema ve ark. laboratuvar ölçümlerinin dağılımındaki asimetriyi göz önünde bulundurarak artış ve azalışlar için ayrı RDD değerleri sunan asimetrik bir hesaplama yöntemi geliştirmiştir (138). EFLM BV Veritabanı bu asimetrik yaklaşımı benimsemiştir (5). Çalışmamızda, total karnitin en

düşük asimetrik RDD'yi göstermiştir (-28,5/39,9); en yüksek RDD ise açılıkarnitin/serbest karnitin için bulunmuştur (-47,8/91,5).

Homeostatik ayar noktası, bir biyobelirtecini fizyolojik olarak doğal olarak dalgalandığı değeri temsil eder. Bu değerin belirlenmesi için çoğunlukla tekrarlı ölçümler gerekir (111). Bu çalışmada, bir bireyin homeostatik set noktasını %20 doğrulukla belirlemek için gereken örnek sayısı karnitin çeşitleri için 2 ila 8 arasında değişmiştir.

Literatürde çalışmamıza benzer tek yayın Alberty ve ark. tarafından 1997 yılında yayınlanan serum serbest ve total karnitin konsantrasyonunun biyolojik varyasyonunun incelendiği çalışmadır. Bu çalışmaya 21 ile 23 yaş arası 14 sağlıklı birey (7 erkek ve 7 kadın) ile katılmış ve numune toplama süresi 4 hafta sürmüştür. Slovakya merkezli bu çalışma total ve serbest karnitin ölçümleri enzimatik spektrofotometrik yöntemle analiz edilmiştir (146).

Alberty ve ark. tarafından yayınlanan çalışmayla kendi çalışmamızın total karnitin, serbest karnitin ve açılıkarnitin/serbest karnitin sonuçları için CV_A, CV_I, CV_G ve II değerlerinin karşılaştırılması tablo 5.1, tablo 5.2 ve tablo 5.3'te verilmiştir.

5.1. Total Karnitin Biyolojik Varyasyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen total karnitin BV bileşenleri, Alberty ve ark.'nın raporladığı verilerle karşılaştırıldığında bazı benzerlikler ve farklılıklar ortaya koymaktadır (Tablo 5.1). Ortalama total karnitin düzeyleri değerlendirildiğinde, çalışmamızda hem kadın (50,8 µmol/L) hem de erkek (54,8 µmol/L) bireylerde, Alberty ve ark. tarafından bildirilen değerlerden (kadın: 42,6 µmol/L; erkek: 51,8 µmol/L) daha yüksek ortalamalar elde edilmiştir. Bu farklılıkların, çalışmalarda yer alan popülasyonların yaş dağılımı, beslenme alışkanlıkları, genetik yapıları ve yaşam tarzı faktörlerinden kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Literatürde karnitin düzeylerinin özellikle diyetle alınan et ve süt ürünleri tüketimi ile yakından ilişkili olduğu belirtilmektedir (147). Dolayısıyla toplumlar arası beslenme alışkanlıklarındaki farklılıklar, total karnitin düzeylerinde gözlenen değişikliklere katkı sağlamış olabilir.

CV_A , laboratuvar yöntemlerinin güvenilirliğini ve ölçüm tekrar edilebilirliğini yansıtan önemli bir parametredir. Çalışmamızda CV_A hem kadın hem erkeklerde %4,6 olarak hesaplanmış olup, Alberty ve ark.nın bildirdiği %2,2 değerinden daha yüksek bulunmuştur. Bu farklılığın, kullanılan cihaz ve yöntem çeşitliliği, laboratuvar koşullarındaki değişkenlikler veya ölçümlerin standardizasyonundaki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmektedir.

CV_I , bireyin zamana bağlı olarak gösterdiği biyolojik değişkenliği ifade etmektedir. Çalışmamızda kadınlarda %15,7, erkeklerde ise %12,0 olarak saptanmıştır. Alberty ve ark. tarafından bildirilen değerler kadınlarda %7,7, erkeklerde ise %10,0'dur. Kadınlarda gözlenen daha yüksek CV_I değerleri, çalışmamızda bireyler arası hormonal, metabolik veya çevresel farklılıkların daha belirgin olabileceğini düşündürmektedir. Literatürde cinsiyete bağlı biyolojik varyasyon farklılıklarının sıkça raporlandığı ve bu durumun klinik yorumlama sürecinde dikkate alınması gerektiği bildirilmektedir (6).

CV_G , çalışmamızda kadınlarda %17,4 erkeklerde ise %14,3 olarak hesaplanmıştır. Alberty ve ark. ise bu değerleri kadınlar için %13,8, erkekler için %9,8 olarak bildirmiştir. Özellikle kadın grubunda gözlenen daha yüksek CV_G değeri, çalışmamızdaki popülasyonun genetik çeşitlilik veya çevresel etkenler açısından daha heterojen olabileceğini göstermektedir.

Bireysellik indeksi, bir laboratuvar testinin bireysel izlemde kullanılabilirliğini değerlendirmek açısından kritik bir parametredir. Çalışmamızda tüm cinsiyet grupları için II değeri 0,93 alt gruplar için ise yaklaşık 0,9 olarak hesaplanmıştır. Alberty ve ark.nın çalışmasında bu değer kadınlarda 0,6, erkeklerde ise 1,0 olarak bildirilmiştir. II'nin 0,6–1,4 aralığında olması, referans aralıklarının yorumda tek başına yeterli olmadığını; referans değişim değeri temelli izlem ve bireyin önceki sonuçlarıyla karşılaştırmanın klinik karar sürecine anlamlı katkı sağlayacağını düşündürür (115).

Tablo 5.1: Total karnitin BV verilerinin karşılaştırılması

Total karnitin	Bizim çalışmamız	Alberty vd.
Ortalama ($\mu\text{mol/L}$) (%95 Güven aralığı)	K: 50,8 (49,5-52,3) E: 54,8 (53,5-56,1) TÜM: 52,9 (52,89-53,10)	K: 42,6 (36,4-48,8) E: 51,8 (46,1-57,5) TÜM: -
CV_A (%) (%95 Güven aralığı)	K: 4,6 (4,1-5,2) E: 4,6 (4,1-5,2) TÜM: 4,6 (4,1-5,2)	K: 2,2 E: 2,2 TÜM: -
CV_I (%) (%95 Güven aralığı)	K: 15,7 (13,4-19,0) E: 12,0 (10,4-14,4) TÜM: 13,8 (12,30-15,6)	K: 7,7 (3,4-0,7) E: 10,0 (4,2-15,4) TÜM: -
CV_G (%) (%95 Güven aralığı)	K: 17,4 (11,7-33,5) E: 14,3 (10,5-22,1) TÜM: 14,9 (12,4-18,4)	K: 13,8 E: 9,8 TÜM: -
II	K: - E: - TÜM: 0,93	K: 0,6 E: 1,0 TÜM: -

5.2. Serbest Karnitin Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda serbest karnitin ortalaması kadınlarda $37,7 \mu\text{mol/L}$ (GA %95: 36,6–38,8), erkeklerde $41,1 \mu\text{mol/L}$ (40,0–42,1) ve tüm örnekleme 39,5 $\mu\text{mol/L}$ (38,7–40,3) olarak saptanmıştır. Alberty ve ark. verileriyle karşılaştırıldığında kadınlarda (34,8 $\mu\text{mol/L}$; 28,8–40,8) hafifçe daha yüksek, erkeklerde ise (40,6 $\mu\text{mol/L}$; 34,8–46,4) büyük ölçüde benzer düzeyler elde edilmiştir. Söz konusu farklılıkların; yaş/VKİ dağılımı, kas kütlesi, fiziksel aktivite ve özellikle hayvansal kaynaklı gıda tüketimi gibi diyet örüntülerinden kaynaklanabileceği değerlendirilmektedir. Karnitin homeostazında diyetin ve kas kütlesinin belirleyici rolü iyi tanımlanmıştır (147).

Laboratuvar içi tekrarlanabilirliği yansıtan CV_A , çalışmamızda kadın ve erkeklerde benzer biçimde %6,1 (GA %95: 5,5–6,9) bulunmuş, Alberty ve ark.'nın rapor ettiği %1,8'in belirgin üzerindedir. Bu fark; yöntem (enzimatik/LC-MS/MS), kalibrasyon/izlenebilirlik, numune hazırlama, reaktif/lot farklılıkları ve kalite kontrol stratejileri gibi metodolojik unsurlarla açıklanabilir.

Serbest karnitin için CV_I değerleri çalışmamızda kadınlarda %15,7 (12,4–19,0), erkeklerde %12,0 (10,4–14,4) ve tüm örnekleme %16,7 (15,0–18,8) olarak hesaplanmıştır. Alberty ve ark.'nın bildirimleri ise kadınlarda %8,5 (3,0–11,1) ve erkeklerde %7,6 (2,7–13,2) düzeyindedir. Çalışmamızdaki daha yüksek CV_I ; örnekleme penceresinin uzunluğu (mevsimsellik), örnekleme öncesi kısıtlamaların (açlık, fiziksel aktivite) standardizasyonu, kadınlarda hormonal dalgalanmalar ve günlük ritim gibi preanalitik/biyolojik etmenlerle ilişkili olabilir. EFLM BV rehberliği; CV_I 'yı azaltmak için preanalitik standardizasyonun kritik olduğunu vurgular (6).

Popülasyon heterojenitesini yansıtan CV_G , çalışmamızda kadınlarda %17,4 (11,7–33,5), erkeklerde %14,3 (10,5–22,1) ve tüm popülasyonda %15,5 (13,7–17,8) olup, Alberty ve ark.'nın değerlerine (kadın %18,1; erkek %15,2) oldukça yakındır. Bu yakınlık, serbest karnitin için topluluklar arasında görece benzer bir dağılıma işaret etmekte; yine de diyet ve genetik arka plan farklılıkları CV_G 'nin kadın alt grubunda geniş güven aralığına yansıyabilecek düzeyde etkili olabilir (111).

Tüm popülasyon için hesaplanan bireysellik indeksi 1,08 olup orta düzeyde bireyselliğe işaret etmektedir; Alberty ve ark.'nın kadın ve erkek için raporladığı 0,5 ise düşük bireysellik göstermektedir. II'nin 0,6–1,4 aralığında olması, referans aralıklarının yorumda tek başına yeterli olmadığını; referans değişim değeri temelli izlem ve bireyin önceki sonuçlarıyla karşılaştırmanın klinik karar sürecine anlamlı katkı sağlayacağını düşündürür (113).

Tablo 5.2: Serbest karnitin BV verilerinin karşılaştırılması

Serbest karnitin	Bizim çalışmamız	Alberty vd.
Ortalama ($\mu\text{mol/L}$) (%95 Güven aralığı)	K: 37,7 (36,6-38,8) E: 41,1 (40,0-42,1) TÜM: 39,5 (38,7-40,3)	K: 34,8 (28,8-40,8) E: 40,6 (34,8-46,4) TÜM: -
$CV_A(\%)$ (%95 Güven aralığı)	K: 6,1 (5,5-6,9) E: 6,1 (5,5-6,9) TÜM: 6,1 (5,5-6,9)	K: 1,8 E: 1,8 TÜM: -
$CV_I(\%)$ (%95 Güven aralığı)	K: 15,7 (12,4-19,0) E: 12,0 (10,4-14,4) TÜM: 16,7 (15,0-18,8)	K: 8,5 (3,0-11,1) E: 7,6 (2,7-13,2) TÜM: -
$CV_G(\%)$ (%95 Güven aralığı)	K: 17,4 (11,7-33,5) E: 14,3 (10,5-22,1) TÜM: 15,5 (13,7-17,8)	K: 18,1 E: 15,2 TÜM: -
II	K: - E: - TÜM: 1,08	K: 0,5 E: 0,5 TÜM: -

5.3. Açıkarnitin/Serbest Karnitin Biyolojik Varyasyon Verilerinin Değerlendirilmesi

Çalışmamızda elde edilen açıkarnitin/serbest karnitin oranı değerleri, literatürde bildirilen sonuçlarla karşılaştırıldığında belirgin farklılıklar göstermektedir. Bizim çalışmamızda kadınlarda (0,33), erkeklerde (0,31) ve tüm grupta (0,32) benzer ortalama değerler saptanırken, Alberty ve arkadaşlarının çalışmasında bu oran kadınlarda 0,24, erkeklerde ise 0,27 olarak daha düşük bulunmuştur. Bu farklılık, incelenen popülasyonun demografik ve biyolojik özellikleri, beslenme alışkanlıkları, metabolik durumları veya kullanılan metodolojik yaklaşımlardan kaynaklanıyor olabilir.

CV_A açısından değerlendirildiğinde, çalışmamızda %10,3 olarak hesaplanan değer, Alberty ve ark. tarafından bildirilen %6,3'lük değerden daha yüksektir. Bu durum, ölçüm sürecimizde analitik değişkenliğin bir miktar daha fazla olduğunu,

ancak kabul edilebilir sınırlar içerisinde seyrettiğini göstermektedir. Öte yandan birey içi biyolojik varyasyon (CV_I) çalışmamızda %26,5 gibi oldukça yüksek bir değer göstermiş, Alberty ve ark.'nın çalışmasında ise %10–12 aralığında bildirilmiştir. Bu bulgu, özellikle erkeklerde belirgin şekilde yüksek CV_I saptanmasıyla, bireylerin metabolik yanıt farklılıklarının ve olası hormonal etkilerin açılıkarnitin/serbest karnitin oranında daha güçlü rol oynayabileceğini düşündürmektedir.

Bireyler arası biyolojik varyasyon (CV_G) değerleri karşılaştırıldığında, her iki çalışmada da benzer aralıklarda sonuçlar elde edilmiş olmakla birlikte, çalışmamızda erkeklerde (27,4) kadınlara (20,7) göre daha yüksek bulunmuştur. Bu durum, populasyon heterojenliği ile uyumlu görünmektedir. Bireysellik indeksi (II) açısından ise çalışmamızda 1,09 olarak hesaplanan değer, Alberty ve ark.'nın bildirdiği 0,4–0,6 aralığından anlamlı şekilde yüksektir. II değerinin >1,4 olması, bu parametrenin klinik izlemde referans aralıklarına kıyasla bireysel seri ölçümlerde daha anlamlı olabileceğini göstermektedir (111).

Tablo 5.1: Açılıkarnitin/serbest karnitin BV verilerinin karşılaştırılması

Açılıkarnitin/serbest karnitin	Bizim çalışmamız	Alberty vd.
Ortalama($\mu\text{mol/L}$) (%95 Güven aralığı)	K: 0,33 (0,32-0,34) E: 0,31 (0,29-0,32) TÜM: 0,32 (0,31-0,32)	K: 0,24(0,19-0,29) E: 0,27(0,20-0,33) TÜM: -
CV_A (%) (%95 Güven aralığı)	K: 10,3 (9,3-11,6) E: 10,3 (9,3-11,6) TÜM: 10,3 (9,3-11,6)	K: 6,3 E: 6,3 TÜM: -
CV_I (%) (%95 Güven aralığı)	K: 22,9 (19,8-27,5) E: 29,4 (25,6-34,7) TÜM: 26,5 (23,9-29,9)	K:12,3(2,9-28,9) E:10,4(1,6-18,9)) TÜM: -
CV_G (%) (%95 Güven aralığı)	K: 20,7 (17,1-25,7) E: 27,4 (23,2-33,0) TÜM: 24,4 (21,6-28,0)	K:21,4 E: 27,2 TÜM: -
II	K: - E: - TÜM: 1,09	K: 0,6 E: 0,4 TÜM: -

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamız 16 kadın ve 14 erkek toplamda 30 sağlıklı gönüllü kişiden oluşan bir grupta, ardışık 6 hafta boyunca kan örnekleri toplanarak yapılan ve serum örneğinden karnitin çeşitleri için biyolojik varyasyon bileşenlerinin değerlendirilmesini amaçlamıştır.

EFLM BV veri bankası ve güncel literatür incelendiğinde serum karnitin için BV çalışması bulunmamaktadır. Çalışmamız bu özelliği ile karnitin biyolojik varyasyon verilerini literatüre kazandıran BV-WG tarafından yayınlanan kritik kontrol listesine(BIVAC) uygun ilk çalışmadır.

30 sağlıklı bireyden alınan örneklerden elde edilen total karnitin, serbest karnitin, açilkarnitin ve açilkarnitin/serbest karnitin sonuçları biyolojik varyasyon analizi öncesinde aykırı değerlerin dışlanması, normaliteye uygunluğu, kararlı durum ve homojeniteye uygunluğu değerlendirildi. Ardından nested ANOVA ile biyolojik varyasyon verileri elde edildi. Biyolojik varyasyon verileri kullanılarak da analiz edilen tüm analitler için II, APS hedefleri, RDD ve NHSP değerleri elde edildi.

Çalışmamızın bazı kısıtlılıkları bulunmaktadır. Katılımcı popülasyonunun yalnızca sağlıklı erişkin bireylerden oluşması, bulguların farklı yaş gruplarına (çocuklar, ileri yaşlılar) veya komorbid hastalıklara sahip bireylere (örneğin metabolik sendrom, böbrek yetmezliği ya da karnitin metabolizma bozuklukları) genellenebilirliğini kısıtlamaktadır.

Katılımcıların beslenme alışkanlıkları, diyetle alınan karnitin miktarı ve fiziksel aktivite düzeyleri ayrıntılı olarak kontrol edilmemiştir. Bu faktörler serum karnitin konsantrasyonlarını etkileyebileceğinden, gözlenen varyasyonun bir kısmı bu değişkenlerden kaynaklanmış olabilir.

Sağlıklı bireylerde serum karnitin çeşitleri için hesapladığımız BV verileri, referans değişim değeri, bireysellik indeksi ve analitik kalite hedeflerinin; çalışmamızın EFLM WG-BV'nin önerdiği BIVAC kontrol listesi göz önüne alınarak tasarlanması ve yeterli sayıda katılımcıyla yürütülmesi, literatüre önemli katkı sağlayacak ve yeni çalışmalara öncü bir çalışma olma niteliği taşıyacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Plebani M, Laposata M, Lippi G. A manifesto for the future of laboratory medicine professionals. *Clin Chim Acta* 2019; 489:49–52.
2. Fraser CG. Biological variation: a rapidly evolving aspect of laboratory medicine. *J Lab Precis Med* 2017; 2(6):35–35.
3. Ricós C, Perich C, Minchinela J, Álvarez V, Simón M, Biosca C, et al. Application of biological variation – a review. *Biochem Med (Zagreb)* . 2009; 19(3):250–9
4. <https://westgard.com/clia-a-quality/quality-requirements/biodatabase1.html>
5. <https://biologicalvariation.eu/>
6. Aarsand AK, Røraas T, Fernandez-Calle P, Ricos C, Díaz-Garzón J, Jonker N, et al. The Biological Variation Data Critical Appraisal Checklist: A Standard for Evaluating Studies on Biological Variation. *Clin Chem* 2018; 64(3):501–14.
7. Malaguarnera M, Catania. Carnitine derivatives beyond fatigue: an update. *Curr Opin Gastroenterol.* 2023; 39(2):125–8
8. Virmani MA, Cirulli M. The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. *Int J Mol Sci* . 2022 ;23(5).
9. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet* . 2012; 51(9):553–72.
10. Maldonado C, Guevara N, Queijo C, González R, Fagiolino P, Vázquez M. Carnitine and/or Acetylcarnitine Deficiency as a Cause of Higher Levels of Ammonia. *Biomed Res Int* . 2016; 2016.
11. Longo N, Frigeni M, Pasquali M. Carnitine transport and fatty acid oxidation. *Biochim Biophys Acta.* 2016; 1863(10):2422–35.
12. Miller MJ, Cusmano-Ozog K, Oglesbee D, Young S. Laboratory analysis of acylcarnitines, 2020 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* . 2021; 23(2):249–58.
13. Bene J, Szabo A, Komlósi K, Melegh B. Mass Spectrometric Analysis of L-carnitine and its Esters: Potential Biomarkers of Disturbances in Carnitine Homeostasis. *Curr Mol Med* . 2020; 20(5):336–54.
14. Golzar Adabi S, Cooper RG, Ceylan N, Corduk M. L-carnitine and its functional effects in poultry nutrition. *Worlds Poult Sci J* . 2011 ;67(2):277–96.
15. Vaz FM, Wanders RJA. Carnitine biosynthesis in mammals. *Biochem J* . 2002 ; 417–29.
16. Strijbis K, Vaz FM, Distel B. Enzymology of the carnitine biosynthesis pathway. *IUBMB Life.* 2010; 62(5):357–62.
17. Maas MN, Hintzen JCJ, Porzberg MRB, Mecinović J. Trimethyllysine: From Carnitine Biosynthesis to Epigenetics. *Int J Mol Sci* . 2020; 21(24):1–33.
18. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev* . 1983; 63(4):1420–80.
19. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet* . 2012; 51(9):553–72.

20. Fouque D, Holt S, Guebre-Egziabher F, Nakamura K, Vianey-Saban C, Hadj-Aïssa A, et al. Relationship between serum carnitine, acylcarnitines, and renal function in patients with chronic renal disease. *J Ren Nutr* . 2006; 16(2):125–31.
21. Winther B, Jackson D, Mulroy C, MacKay M. Evaluation of serum carnitine levels for pediatric patients receiving carnitine-free and carnitine-supplemented parenteral nutrition. *Hosp Pharm* . 2014; 49(6):549–53.
22. Evans A. Dialysis-related carnitine disorder and levocarnitine pharmacology. *American Journal of Kidney Diseases* . 2003; 41(4 SUPPL. 4).
23. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D’Iddio S, Giordano V, Koverech A, et al. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1033:52–66.
24. Farahzadi R, Hejazi MS, Molavi O, Pishgahzadeh E, Montazersaheb S, Jafari S. Clinical Significance of Carnitine in the Treatment of Cancer: From Traffic to the Regulation. *Oxid Med Cell Longev* . 2023; 2023.
25. Azocar M. Total carnitine and acylated carnitine ratio: relationship of free carnitine with lipid parameters in pediatric dialysis patients. *Adv Perit Dial* 2006.
26. Bieber LL. Carnitine. *Annu Rev Biochem* . 1988; 57:261–83.
27. Adeva-Andany MM, Calvo-Castro I, Fernández-Fernández C, Donapetry-García C, Pedre-Piñeiro AM. Significance of l-carnitine for human health. *IUBMB Life* . 2017; 69(8):578–94
28. D’Antona G, Nabavi SM, Micheletti P, Di Lorenzo A, Aquilani R, Nisoli E, et al. Creatine, L-carnitine, and ω 3 polyunsaturated fatty acid supplementation from healthy to diseased skeletal muscle. *Biomed Res Int* . 2014; 2014.
29. Rufer AC, Thoma R, Hennig M. Structural insight into function and regulation of carnitine palmitoyltransferase. *Cell Mol Life Sci* . 2009; 66(15):2489–501.
30. Bremer J. Carnitine--metabolism and functions. *Physiol Rev* . 1983; 63(4):1420–80.
31. Virmani A, Pinto L, Bauermann O, Zerelli S, Diedenhofen A, Binienda ZK, et al. The Carnitine Palmitoyl Transferase (CPT) System and Possible Relevance for Neuropsychiatric and Neurological Conditions. *Mol Neurobiol* . 2015; 52(2):826–36.
32. Harrison D, Griendling KK, Landmesser U, Hornig B, Drexler H. Role of oxidative stress in atherosclerosis. *Am J Cardiol* . 2003; 91(3A):7–11.
33. Muoio DM. Metabolic inflexibility: when mitochondrial indecision leads to metabolic gridlock. *Cell*. 2014; 159(6):1253–62.
34. Reda E, D’Iddio S, Nicolai R, Benatti P, Calvani M. The carnitine system and body composition. *Acta Diabetol*. 2003; 40 Suppl 1(SUPPL. 1).
35. Evans AM, Fornasini G. Pharmacokinetics of L-carnitine. *Clin Pharmacokinet*. 2003; 42(11):941–67.
36. Adams SH, Hoppel CL, Lok KH, Zhao L, Wong SW, Minkler PE, et al. Plasma acylcarnitine profiles suggest incomplete long-chain fatty acid beta-oxidation and altered tricarboxylic acid cycle activity in type 2 diabetic African-American women. *J Nutr* . 2009; 139(6):1073–81.

37. Onofrj M, Ciccocioppo F, Varanese S, Di Muzio A, Calvani M, Chiechio S, et al. Acetyl-L-carnitine: from a biological curiosity to a drug for the peripheral nervous system and beyond. *Expert Rev Neurother*. 2013; 13(8):925–36.
38. Dambrova M, Makrecka-Kuka M, Kuka J, Vilskersts R, Nordberg D, Attwood MM, et al. Acylcarnitines: Nomenclature, Biomarkers, Therapeutic Potential, Drug Targets, and Clinical Trials. *Pharmacol Rev* . 2022; 74(3):506–51.
39. Violante S, IJlst L, Te Brinke H, Koster J, De Almeida IT, Wanders RJA, et al. Peroxisomes contribute to the acylcarnitine production when the carnitine shuttle is deficient. *Biochim Biophys Acta* . 2013; 1831(9):1467–74.
40. Schönfeld P, Wojtczak L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. *J Lipid Res* . 2016; 57(6):943–54.
41. Reuter SE, Evans AM. Carnitine and acylcarnitines: pharmacokinetic, pharmacological and clinical aspects. *Clin Pharmacokinet* . 2012; 51(9):553–72.
42. Makrecka-Kuka M, Sevostjanovs E, Vilks K, Volska K, Antone U, Kuka J, et al. Plasma acylcarnitine concentrations reflect the acylcarnitine profile in cardiac tissues. *Sci Rep* . 2017; 7(1).
43. Bene J, Komlósi K, Gasztonyi B, Juhász M, Tulassay Z, Melegh B. Plasma carnitine ester profile in adult celiac disease patients maintained on long-term gluten free diet. *World J Gastroenterol* . 2005; 11(42):6671–5.
44. Ferdinandusse S, Denis S, Van Roermund CWT, Wanders RJA, Dacremont G. Identification of the peroxisomal beta-oxidation enzymes involved in the degradation of long-chain dicarboxylic acids. *J Lipid Res* . 2004; 45(6):1104–11.
45. Van De Beek MC, Dijkstra IME, Van Lenthe H, Ofman R, Goldhaber-Pasillas D, Schauer N, et al. C26:0-Carnitine Is a New Biomarker for X-Linked Adrenoleukodystrophy in Mice and Man. *PLoS One* . 2016;11(4).
46. Klouwer FCC, Ferdinandusse S, van Lenthe H, Kulik W, Wanders RJA, Poll-The BT, et al. Evaluation of C26:0-lysophosphatidylcholine and C26:0-carnitine as diagnostic markers for Zellweger spectrum disorders. *J Inherit Metab Dis* . 2017; 40(6):875–81.
47. Zhang X, Zhang C, Chen L, Han X, Ji L. Human serum acylcarnitine profiles in different glucose tolerance states. *Diabetes Res Clin Pract*. 2014; 104(3):376–82.
48. Dhaunsi GS, Bitar MS. Antioxidants attenuate diabetes-induced activation of peroxisomal functions in the rat kidney. *J Biomed Sci* . 2004; 11(5):566–70.
49. Miller MJ, Cusmano-Ozog K, Oglesbee D, Young S. Laboratory analysis of acylcarnitines, 2020 update: a technical standard of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* . 2021; 23(2):249–58.
50. Kivilompolo M, Öhrnberg L, Orešič M, Hyötyläinen T. Rapid quantitative analysis of carnitine and acylcarnitines by ultra-high performance-hydrophilic interaction liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* . 2013; 1292:189–94.
51. Stanley CA. New Genetic Defects in Mitochondrial Fatty Acid Oxidation and Carnitine Deficiency. *Adv Pediatr*. 1987 Jan 1;34(1):59–88.
52. Rebouche CJ. Carnitine function and requirements during the life cycle. *The FASEB Journal*. 1992; 6(15):3379–86.

53. Almannai M, Alfadhel M, El-Hattab AW. Carnitine Inborn Errors of Metabolism. *Molecules*. 2019; 24(18).
54. Juraszek B, Nałęcz KA. SLC22A5 (OCTN2) Carnitine Transporter-Indispensable for Cell Metabolism, a Jekyll and Hyde of Human Cancer. *Molecules*. 2019; 25(1).
55. Nezu JI, Tamai I, Oku A, Ohashi R, Yabuuchi H, Hashimoto N, et al. Primary systemic carnitine deficiency is caused by mutations in a gene encoding sodium ion-dependent carnitine transporter. *Nat Genet* . 1999; 21(1):91–4.
56. El-Hattab AW, Scaglia F. Disorders of carnitine biosynthesis and transport. *Mol Genet Metab*. 2015; 116(3):107–12.
57. Melegh B, Bene J, Mogyorósy G, Havasi V, Komlósi K, Pajor L, et al. Phenotypic manifestations of the OCTN2 V295X mutation: sudden infant death and carnitine-responsive cardiomyopathy in Roma families. *Am J Med Genet A* . 2004; 131(2):121–6.
58. Frigeni M, Balakrishnan B, Yin X, Calderon FRO, Mao R, Pasquali M, et al. Functional and molecular studies in primary carnitine deficiency. *Hum Mutat* . 2017; 38(12):1684–99.
59. Wang Y, Ye J, Ganapathy V, Longo N. Mutations in the organic cation/carnitine transporter OCTN2 in primary carnitine deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* . 1999; 96(5):2356–60.
60. Pons R, De Vivo DC. Primary and Secondary Carnitine Deficiency Syndromes. *J Child Neurol* . 1995; 10(SUPPL. 2).
61. Calvani M, Benatti P, Mancinelli A, D’Iddio S, Giordano V, Koverech A, et al. Carnitine replacement in end-stage renal disease and hemodialysis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004; 1033:52–66.
62. Inzucchi SE, Bergenstal RM, Buse JB, Diamant M, Ferrannini E, Nauck M, et al. Management of hyperglycemia in type 2 diabetes, 2015: a patient-centered approach: update to a position statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes Care* . 2015; 38(1):140–9.
63. Koves TR, Ussher JR, Noland RC, Slentz D, Mosedale M, Ilkayeva O, et al. Mitochondrial overload and incomplete fatty acid oxidation contribute to skeletal muscle insulin resistance. *Cell Metab* . 2008; 7(1):45–56.
64. Mihalik SJ, Goodpaster BH, Kelley DE, Chace DH, Vockley J, Toledo FGS, et al. Increased levels of plasma acylcarnitines in obesity and type 2 diabetes and identification of a marker of glucolipotoxicity. *Obesity (Silver Spring)* . 2010; 18(9):1695–700.
65. Makarova E, Makrecka-Kuka M, Vilks K, Volska K, Sevostjanovs E, Grinberga S, et al. Decreases in Circulating Concentrations of Long-Chain Acylcarnitines and Free Fatty Acids During the Glucose Tolerance Test Represent Tissue-Specific Insulin Sensitivity. *Front Endocrinol (Lausanne)* . 2019;10.
66. Lock N, Mrcp H, Md Z, Mpath Y, Mrcpch SB, Siao T, et al. Biochemical profiling in two siblings with mitochondrial 2-methylacetoacetyl-CoA thiolase deficiency. *Malaysian J Pathol*. 2008;30(2):109–14.

67. Ramos-Roman MA, Sweetman L, Valdez MJ, Parks EJ. Postprandial changes in plasma acylcarnitine concentrations as markers of fatty acid flux in overweight and obesity. *Metabolism* . 2012; 61(2):202–12.
68. Jagannathan R, Neves JS, Dorcely B, Chung ST, Tamura K, Rhee M, et al. The Oral Glucose Tolerance Test: 100 Years Later. *Diabetes Metab Syndr Obes* . 2020; 13:3787–805.
69. Bouchouirab FZ, Fortin M, Noll C, Dubé J, Carpentier AC. Plasma Palmitoyl-Carnitine (AC16:0) Is a Marker of Increased Postprandial Nonesterified Incomplete Fatty Acid Oxidation Rate in Adults With Type 2 Diabetes. *Can J Diabetes* . 2018; 42(4):382-388.e1.
70. Elizondo G, Matern D, Vockley J, Harding CO, Gillingham MB. Effects of fasting, feeding and exercise on plasma acylcarnitines among subjects with CPT2D, VLCADD and LCHADD/TFPD. *Mol Genet Metab* . 2020; 131(1–2):90–7.
71. Hung PL, Lin JL, Chen C, Hung KY, Hsieh TY, Hsu MH, et al. An Examination of Serum Acylcarnitine and Amino Acid Profiles at Different Time Point of Ketogenic Diet Therapy and Their Association of Ketogenic Diet Effectiveness. *Nutrients* . 2020; 13(1):1–18.
72. Ahmad T, Kelly JP, McGarrah RW, Hellkamp AS, Fiuzat M, Testani JM, et al. Prognostic Implications of Long-Chain Acylcarnitines in Heart Failure and Reversibility With Mechanical Circulatory Support. *J Am Coll Cardiol* . 2016; 67(3):291–9.
73. Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW, Khouri MG, Craig D, Haynes C, et al. Metabolomic Profiling Identifies Novel Circulating Biomarkers of Mitochondrial Dysfunction Differentially Elevated in Heart Failure With Preserved Versus Reduced Ejection Fraction: Evidence for Shared Metabolic Impairments in Clinical Heart Failure. *J Am Heart Assoc* . 2016; 5(8).
74. Ruiz M, Labarthe F, Fortier A, Bouchard B, Legault JT, Bolduc V, et al. Circulating acylcarnitine profile in human heart failure: a surrogate of fatty acid metabolic dysregulation in mitochondria and beyond. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* . 2017; 313(4):768–81.
75. Houten SM, Violante S, Ventura F V., Wanders RJA. The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid β -Oxidation and Its Genetic Disorders. *Annu Rev Physiol* . 2016; 78:23–44.
76. Rutkowski JM, Knotts TA, Ono-Moore KD, McCoin CS, Huang S, Schneider D, et al. Acylcarnitines activate proinflammatory signaling pathways. *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2014; 306(12).
77. McCoin CS, Gillingham MB, Knotts TA, Vockley J, Ono-Moore KD, Blackburn ML, et al. Blood cytokine patterns suggest a modest inflammation phenotype in subjects with long-chain fatty acid oxidation disorders. *Physiol Rep* . 2019; 7(6).
78. Nicholas DA, Proctor EA, Agrawal M, Belkina AC, Van Nostrand SC, Panneerseelan-Bharath L, et al. Fatty Acid Metabolites Combine with Reduced β Oxidation to Activate Th17 Inflammation in Human Type 2 Diabetes. *Cell Metab* . 2019; 30(3):447-461.e5.

79. Vilskersts R, Kuka J, Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Volska K, Makarova E, et al. Methyl- γ -butyrobetaine decreases levels of acylcarnitines and attenuates the development of atherosclerosis. *Vascul Pharmacol* . 2015; 72:101–7.
80. Malandrino MI, Fucho R, Weber M, Calderon-Dominguez M, Mir JF, Valcarcel L, et al. Enhanced fatty acid oxidation in adipocytes and macrophages reduces lipid-induced triglyceride accumulation and inflammation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* . 2015; 308(9):E756–69.
81. Van Der Velpen V, Teav T, Gallart-Ayala H, Mehl F, Konz I, Clark C, et al. Systemic and central nervous system metabolic alterations in Alzheimer’s disease. *Alzheimers Res Ther* . 2019; 11(1).
82. Chatterjee P, Cheong YJ, Bhatnagar A, Goozee K, Wu Y, McKay M, et al. Plasma metabolites associated with biomarker evidence of neurodegeneration in cognitively normal older adults. *J Neurochem* . 2021; 159(2):389–402.
83. Toledo JB, Arnold M, Kastenmüller G, Chang R, Baillie RA, Han X, et al. Metabolic network failures in Alzheimer’s disease: A biochemical road map. *Alzheimers Dement* . 2017; 13(9):965–84.
84. Huo Z, Yu L, Yang J, Zhu Y, Bennett DA, Zhao J. Brain and blood metabolome for Alzheimer’s dementia: findings from a targeted metabolomics analysis. *Neurobiol Aging* . 2020; 86:123–33.
85. Chang KH, Cheng ML, Tang HY, Huang CY, Wu YR, Chen CM. Alterations of Metabolic Profile and Kynurenine Metabolism in the Plasma of Parkinson’s Disease. *Mol Neurobiol*. 2018; 55(8):6319–28.
86. Molsberry S, Bjornevik K, Hughes KC, Zhang ZJ, Jeanfavre S, Clish C, et al. Plasma Metabolomic Markers of Insulin Resistance and Diabetes and Rate of Incident Parkinson’s Disease. *J Parkinsons Dis* . 2020; 10(3):1011–21.
87. Cao B, Wang D, Pan Z, Brietzke E, McIntyre RS, Musial N, et al. Characterizing acylcarnitine biosignatures for schizophrenia: a longitudinal pre- and post-treatment study. *Transl Psychiatry* . 2019; 9(1).
88. Kriisa K, Leppik L, Balõtshev R, Ottas A, Soomets U, Koido K, et al. Profiling of Acylcarnitines in First Episode Psychosis before and after Antipsychotic Treatment. *J Proteome Res* . 2017; 16(10):3558–66.
89. Golpich M, Amini E, Mohamed Z, Azman Ali R, Mohamed Ibrahim N, Ahmadiani A. Mitochondrial Dysfunction and Biogenesis in Neurodegenerative diseases: Pathogenesis and Treatment. *CNS Neurosci Ther*. 2017; 23(1):5–22.
90. Skaper SD, Facci L, Zusso M, Giusti P. An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron. *Front Cell Neurosci* . 2018; 12.
91. Liepinsh E, Makrecka-Kuka M, Volska K, Kuka J, Makarova E, Antone U, et al. Long-chain acylcarnitines determine ischaemia/reperfusion-induced damage in heart mitochondria. *Biochem J* . 2016; 473(9):1191–202.
92. Makrecka-Kuka M, Korzh S, Videja M, Vilskersts R, Sevostjanovs E, Zharkova-Malkova O, et al. Inhibition of CPT2 exacerbates cardiac dysfunction and inflammation in experimental endotoxaemia. *J Cell Mol Med* . 2020; 24(20):11903–11.

93. Wolcott J, Amanda Schwartz Clifford Goodman M. Laboratory medicine : a national status report . 2008.
94. Beastall GH. Adding value to laboratory medicine: a professional responsibility. Clin Chem Lab Med . 2013; 51(1):221–7.
95. Hallworth MJ. The ‘70% claim’: what is the evidence base? Ann Clin Biochem . 2011; 48(Pt 6):487–8.
96. Lippi G, Chance JJ, Church S, Dazzi P, Fontana R, Giavarina D, et al. Preanalytical quality improvement: from dream to reality. Clin Chem Lab Med . 2011; 49(7):1113–26.
97. Lippi G, Guidi GC. Risk management in the preanalytical phase of laboratory testing. Clin Chem Lab Med . 2007; 45(6):720–7.
98. Carraro P, Plebani M. Errors in a stat laboratory: types and frequencies 10 years later. Clin Chem . 2007: 1338–42.
99. Nordin N, Rahim SNA, Omar WFAW, Zulkarnain S, Sinha S, Kumar S, et al. Preanalytical Errors in Clinical Laboratory Testing at a Glance: Source and Control Measures. Cureus . 2024; 16(3):e57243.
100. Sheriff S, Sheriff D. Clinical laboratory tests: Right choice of the test for the benefit of the patient. Journal of Health Research and Reviews . 2014 [cited 2025; 1(1):10.
101. ISO 15189:2012 - Medical laboratories — Requirements for quality and competence.
102. Cadamuro J, Simundic AM. The preanalytical phase - from an instrument-centred to a patient-centred laboratory medicine. Clin Chem Lab Med . 2022; 61(5):732–40.
103. Cadamuro J, Baird G, Baumann G, Bolenius K, Cornes M, Ibarz M, et al. Preanalytical quality improvement - an interdisciplinary journey, on behalf of the European Federation for Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM) Working Group for Preanalytical Phase (WG-PRE). Clin Chem Lab Med . 2022; 60(5):662–8.
104. Simundic AM, Cornes M, Grankvist K, Lippi G, Nybo M. Standardization of collection requirements for fasting samples: for the Working Group on Preanalytical Phase (WG-PA) of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (EFLM). Clin Chim Acta . 2014; 432:33–7.
105. Neogi S, Mehndiratta M, Gupta S, Puri D. Pre-analytical phase in clinical chemistry laboratory. Journal of Clinical and Scientific Research . 2016 ; 5(3):171.
106. Katanić J, Stanimirov B, Sekeruš V, Đanić M, Pavlović N, Mikov M, et al. Drug interference with biochemical laboratory tests. Biochem Med (Zagreb) . 2023; 33(2).
107. Gomez-Rioja R, Von Meyer A, Cornes M, Costelloe S, Vermeersch P, Simundic AM, et al. Recommendation for the design of stability studies on clinical specimens. Clin Chem Lab Med . 2023; 61(10):1708–18.
108. Turhan T. Tıbbi Laboratuvarlarda Doğru Sonuç. Palme Yayıncılık, Ankara, 2015: 368
109. Coskun A, Zarepour A, Zarrabi A. Physiological Rhythms and Biological Variation of Biomolecules: The Road to Personalized Laboratory Medicine. Int J Mol Sci. 2023;24(7).
110. Fraser CG. Test result variation and the quality of evidence-based clinical guidelines. Clinica Chimica Acta . 2004; 346(1):19–24.

111. Fraser CG. Biological variation : from principles to practice. AACC Press; 2001.
112. Johnson PR, Shahangian S, Astles JR. Managing biological variation data: modern approaches for study design and clinical application. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 2021; 58(7):493–512.
113. Gowans EM, Fraser CG. Longer-term biological variation of commonly analyzed serum constituents. *Clin Chem* . 1987; 33(5):717–717.
114. Harris EK, Yasaka T. On the calculation of a reference change for comparing two consecutive measurements. *Clin Chem* . 1983; 29(1):25–30.
115. Fraser GG, Harris EK. Generation and application of data on biological variation in clinical chemistry. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 1989; 27(5):409–37.
116. Jones GRD. Effect of the reporting-interval size on critical difference estimation: beyond ‘2.77’. *Clin Chem* . 2006; 52(5):880–5.
117. Johnson PR, Shahangian S, Astles JR. Managing biological variation data: modern approaches for study design and clinical application. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 2021; 58(7):493–512.
118. Section 2: AKI Definition. *Kidney Int Suppl* (2011) . 2012; 2(1):19–36.
119. Røraas T, Støve B, Petersen PH, Sandberg S. Biological Variation: The Effect of Different Distributions on Estimated Within-Person Variation and Reference Change Values. *Clin Chem* . 2016; 62(5):725–36.
120. Harris EK, Kanofsky P, Shakarji G, Cotlove E. Biological and Analytic Components of Variation in Long-Term Studies of Serum Constituents in Normal Subjects : II. Estimating Biological Components of Variation. *Clin Chem* . 1970; 16(12):1022–7.
121. Lund F, Petersen PH, Fraser CG, Sölétormos G. Calculation of limits for significant bidirectional changes in two or more serial results of a biomarker based on a computer simulation model. *Ann Clin Biochem* . 2015; 52(Pt 4):434–40.
122. EP33 | Use of Delta Checks in the Medical Laboratory .
123. Monneret D, Mestari F, Atlan G, Corlouer C, Ramani Z, Jaffre J, et al. Hemolysis indexes for biochemical tests and immunoassays on Roche analyzers: determination of allowable interference limits according to different calculation methods. *Scand J Clin Lab Invest* . 2015; 75(2):162–9.
124. Braga F, Panteghini M. Verification of in vitro medical diagnostics (IVD) metrological traceability: responsibilities and strategies. *Clin Chim Acta* . 2014; 432:55–61.
125. Sandberg S, Fraser CG, Horvath AR, Jansen R, Jones G, Oosterhuis W, et al. Defining analytical performance specifications: Consensus Statement from the 1st Strategic Conference of the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* . 2015; 53(6):833–5.
126. Klee GG. Establishment of outcome-related analytic performance goals. *Clin Chem* . 2010; 56(5):714–22.
127. Mercan H, Orhan B, Bercik-Inal B. Estimation of Reference Change Value and Biological Variation of Creatinine Measurements in Healthy Individuals. *Clin Lab* . 2022; 68(9):1920–9.
128. Fraser CG, Petersen PH, Libeer JC, Ricos C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. *Ann Clin Biochem* . 1997; 34 (Pt 1)(1):8–12.

129. Fraser CG, Petersen PH. Desirable standards for laboratory tests if they are to fulfill medical needs. *Clin Chem* . 1993; 39(7):1447–53; discussion 1453.
130. Braga F, Panteghini M. Generation of data on within-subject biological variation in laboratory medicine: An update. *Crit Rev Clin Lab Sci* . 2016; 53(5):313–25.
131. Bartlett WA, Sandberg S, Carobene A, Fernandez-Calle P, Diaz-Garzon J, Coskun A, et al. A standard to report biological variation data studies - based on an expert opinion. *Clin Chem Lab Med* . 2024; 63(1):52–9.
132. Miller WG, Erek A, Cunningham TD, Oladipo O, Scott MG, Johnson RE. Commutability limitations influence quality control results with different reagent lots. *Clin Chem* . 2011; 57(1):76–83.
133. Jones GRD. Estimates of Within-Subject Biological Variation Derived from Pathology Databases: An Approach to Allow Assessment of the Effects of Age, Sex, Time between Sample Collections, and Analyte Concentration on Reference Change Values. *Clin Chem* . 2019; 65(4):579–88.
134. Anders K. Resolution of Students t-tests, ANOVA and analysis of variance components from intermediary data. *Biochem Med (Zagreb)*. 2017 ; 27(2):253–8.
135. Røraas T, Petersen PH, Sandberg S. Confidence intervals and power calculations for within-person biological variation: effect of analytical imprecision, number of replicates, number of samples, and number of individuals. *Clin Chem* . 2012; 58(9):1306–13.
136. Carobene A, Strollo M, Jonker N, Barla G, Bartlett WA, Sandberg S, et al. Sample collections from healthy volunteers for biological variation estimates' update: a new project undertaken by the Working Group on Biological Variation established by the European Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. *Clin Chem Lab Med* . 2016; 54(10):1599–608.
137. Korkmaz S, Zarasız G, Göksülük D, Senes M, Sönmez C, Yucel D. BioVar: An online biological variation analysis tool. *Turkish Journal of Biochemistry* . 2020; 45(5):479–89.
138. Fokkema MR, Herrmann Z, Muskiet FAJ, Moecks J. Reference change values for brain natriuretic peptides revisited. *Clin Chem*. 2006; 52(8):1602–3.
139. Aarsand AK, Díaz-Garzón J, Fernandez-Calle P, Guerra E, Locatelli M, Bartlett WA, et al. The EuBIVAS: Within- and Between-Subject Biological Variation Data for Electrolytes, Lipids, Urea, Uric Acid, Total Protein, Total Bilirubin, Direct Bilirubin, and Glucose. *Clin Chem* . 2018; 64(9):1380–93.
140. Burdick. Confidence Intervals on Variance Components. *Confidence Intervals on Variance Components*.1992.
141. Carobene A, Aarsand AK, Guerra E, Bartlett WA, Coşkun A, Díaz-Garzón J, et al. European Biological Variation Study (EuBIVAS): Within- and Between-Subject Biological Variation Data for 15 Frequently Measured Proteins. *Clin Chem*. 2019;65(8):1031–41.
142. Pradhan S, Gautam K, Pant V. Variation in Laboratory Reports: Causes other than Laboratory Error. *JNMA J Nepal Med Assoc* . 2022; 60(246):222–4.
143. Young DS. Conveying the importance of the preanalytical phase. *Clin Chem Lab Med*. 2003; 41(7):884–7.

144. Burtis C, Ashwood E. Kalite Yönetimi. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, 5. Baskıdan çeviri. Ankara: Palme Yayıncılık; 2005:285-297.
145. Walton RM. Subject-based reference values: biological variation, individuality, and reference change values. Vet Clin Pathol. 2012;41(2):175–81.
146. Alberty R, Albertyová D. Biological variation of free and total carnitine in serum of healthy subjects. Clin Chem . 1997; 43(12):2441–3.
147. Demarquoy J, et al. Biochemical, physiological and therapeutic aspects of carnitine. Biochimie. 2004;86(1):137–142.



EK-2

Sayın Katılımcı,

Bir araştırma projesine davet edilmektesiniz.

Bu çalışmada amacımız, kan örneğinde bulunan karnitin bileşiğinin aynı kişide benzer koşullarda ölçüldüğünde, haftalar arası kendi içinde değişim gösterip göstermediğinin saptanması ve bu değişimlerin laboratuvar tarafından yapılan ölçüm sonuçlarına etkisini araştırmaktır. Bu çalışma, araştırma amaçlı olarak yapılmaktadır ve katılım gönüllülük esasına dayalıdır.

Bu çalışma uzmanlık öğrencisi Dr. Tarık AYDIN'ın tez çalışmasıdır. Eğer çalışmaya katılmayı kabul ediyorsanız, anket formundaki sorular size uzmanlık öğrencisi tarafından sorulacak ve verdiğiniz cevaplar kaydedilecektir. Süre olarak yaklaşık 5 dakikanızı alacak veri toplama uygulamasında verdiğiniz bilgiler, bilimsel araştırma amaçlı kullanılacak olup, başka bir amaç için kullanılmayacak ve gizli tutulacaktır. Yanıtlarınız çalışma açısından önemli olup, cevaplarınızın doğru ve eksiksiz olması gerekmektedir. Ancak herhangi bir nedenle ya da hiçbir neden göstermeksizin araştırmadan çekilme hakkına sahip olduğunuzu bilmenizi isterim. Bu çalışmaya katılımınız için sizden ücret talep edilmeyecek ve katılım sonucu size herhangi bir ücret ödemesi yapılmayacaktır.

İlgi ve katkılarınızdan dolayı teşekkür ederim.

Demografik Bilgiler

Doğum Tarihi (Yıl):

Cinsiyet:

☐ Erkek

☐ Kadın

Boy:..... cm Kilo:.....kg VKİ:.....

Yaşam Stili

1) Alkol kullanma alışkanlığınız var mı?

☐ Hayır • Evet

Cevabınız evet ise; Ne şekilde:

Hangi sıklıkla/süresi:

2) Sigara: • Hayır ☐ Evet (.....ay/yıldır.)

3) Düzenli egzersiz yapıyor musunuz: • Hayır • Evet

Cevabınız evet ise hangi sıklıkla:

Medikal Durum

1) Son zamanlarda hiç rahatsızlandınız mı? • Hayır • Evet

Cevabınız evet ise; Ne zaman?

Neden?

2) Son zamanlarda hastaneye yatış öykünüz var mı? • Hayır • Evet

Cevabınız evet ise; Ne zaman?

Neden?

3) Herhangi bir alerjiniz var mı? • Hayır • Evet

4) Bilinen kronik hastalığınız var mı? Varsa belirtiniz.

5) Reçete edilmiş ilaç alıyor musunuz? • Hayır • Evet

Cevabınız evet ise belirtiniz.

6) Vitamin ilacı, diyet hapi, bitkisel gıda takviyesi alıyor musunuz? • Hayır

• Evet

Cevabınız evet ise belirtiniz.

EK-3

Adı Soyadı:

Hafta sayısı:

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

1. En son saat kaçta yemek yediniz?

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

Evet ise türünü ve miktarını belirtiniz.....

3. Sigara içtiniz mi? ☐ Evet ☐ Hayır

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

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

Evet ise içeriğini belirtiniz.....

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

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

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

☐ Evet ☐ Hayır

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

.....

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

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

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

EK-4

Gönüllü numarası (cinsiyet)/ yaş(yıl)	VKİ (kg/m ²)	Alb, g/dL mean (min-max)	Total Kol, mg/dL mean (min-max)	Kreatinin, mg/dL mean (min-max)	Glukoz, mg/dL mean (min-max)
1 (E)/46	27	4,5(4,39-4,68)	178,5(159-189)	0,8(0,79-0,9)	83,5(77,7-88,4)
2 (E)/29	25	4,9(4,78-5,2)	156,3(148-168)	1,1(1,06-1,2)	91,4(85,5-97,8)
3 (E)/55	27	4,4(4,26-4,53)	148,5(135-161)	1,2(1,19-1,31)	88,9(85,6-94,7)
4 (E)/56	28	4,6(4,51-4,84)	85,9(79,6-94,1)	0,9(0,84-0,98)	84,5(77,8-89,3)
5 (E)/29	35	4,6(4,35-4,88)	167(144-190)	0,8(0,77-0,9)	88(77-102)
6 (E)/28	24	4,8(4,66-4,95)	204,5(193-214)	0,8(0,77-0,93)	84,7(81,6-88,5)
7 (E)/33	24	4,7(4,38-4,81)	144,8(133-153)	1(0,92-1,04)	76,9(70,5-82,5)
8 (E)/24	23	4,6(4,47-4,83)	159(130-169)	0,9(0,84-0,95)	92,8(81-114)
9 (E)/26	22	4,8(4,56-4,95)	200,7(190-209)	0,9(0,84-0,91)	94,4(91,5-98,4)
10 (E)/42	32	4,7(4,47-4,85)	212,2(185-235)	1(0,99-1,07)	84,6(79,4-88)
11 (K)/42	21	4,5(4,32-4,68)	166,8(145-191)	0,6(0,56-0,7)	85,4(82,4-89,7)
12 (K)/30	21	4,6(4,39-4,76)	162,8(149-183)	0,7(0,57-0,82)	79,3(72,2-90,1)
13 (K)/32	22	4,2(3,95-4,53)	206,8(142-237)	0,7(0,68-0,75)	81,7(73,8-89)
14 (K)/41	23	4,5(4,38-4,69)	154,8(143-166)	0,9(0,84-1,07)	78,9(76,7-81,7)
15 (K)/28	19	4,6(4,36-4,68)	144,2(136-166)	0,7(0,59-0,7)	80,6(76,4-86,8)
16 (K)/39	23	4,5(4,28-4,57)	169,2(161-177)	0,7(0,67-0,76)	86,6(81,1-92,5)
17 (K)/47	25	4,3(4,07-4,36)	200(173-216)	0,6(0,46-0,62)	85(80,6-88,7)
18 (K)/29	22	4,5(4,28-4,9)	163(157-167)	0,9(0,86-0,91)	81,4(76,3-85,8)
19(K)/38	25	4,1(3,88-4,35)	186,2(166-198)	0,7(0,64-0,75)	82,6(76,2-102)
20 (K)/45	23	4,4(4,28-4,51)	165(157-170)	0,6(0,62-0,69)	80,7(76,6-83,9)
21 (K)/39	31	4,3(4,19-4,64)	160(152-172)	0,7(0,62-0,83)	83,1(78,6-89,1)
22 (K)/54	31	4,4(4,13-4,53)	218,2(184-229)	0,8(0,76-0,9)	86(79,4-92,5)
23(E)/35	25	4,6(4,46-4,75)	171,5(158-183)	0,9(0,77-0,98)	93,8(88,6-97,5)
24(K)/27	23	4,4(4,25-4,65)	169,3(155-185)	0,7(0,68-0,75)	79,7(76,3-82)
25(K)/26	23	4,4(4,14-4,77)	149,5(140-165)	0,7(0,58-0,74)	82,3(77,9-86,3)
26(E)/32	31	4,7(4,55-5,06)	176,8(157-197)	0,8(0,76-0,88)	88,8(70,6-117)
27(E)/39	29	4,7(4,57-4,74)	197,6(188-208)	0,9(0,90-0,97)	99,5(94,3-102)
28(E)/26	25	4,5(4,39-4,61)	152,5(140-168)	1(0,97-1,06)	84,4(79,5-90,3)
29(E)/23	24	4,9(4,82-4,99)	141(131-153)	1,1(1,03-1,16)	72,2(69-73,5)
30(E)/35	33	4,4(4,38-4,49)	125,6(118-131)	0,9(0,83-0,96)	91(87,6-99,7)

EK-5

Gönüllü numarası (cinsiyet)/ yaş(yıl)	GGT, U/L mean (min-max)	Trig, mg/dL, mean (min-max)	ALT, U/L, mean (min-max)	CK, U/L, mean (min-max)
1 (E)/46	12,3(10,5-13,8)	128,5(112-162)	19,4(11,2-22,2)	74,2(59-94,7)
2 (E)/29	14,7(13,3-15,3)	76,8(48,7-123)	15(9,76-18)	199,1(90,6-325)
3 (E)/55	18,9(15,2-23,7)	96,5(74-124)	12,6(9,59-14,9)	121,8(88,4-165)
4 (E)/56	14(12,5-15,6)	40,8(38,1-45,9)	29,9(21,2-40,9)	67,5(43,4-114)
5 (E)/29	30,1(26,4-32,7)	131,2(84,1-161)	36,5(25,3-49)	97,2(71,2-194)
6 (E)/28	17(14,6-19,6)	102,9(89,3-118)	21,6(12,6-29,8)	83,9(76,2-91,4)
7 (E)/33	13,6(10,2-16,3)	73,8(62,4-82,6)	11(8,73-13,7)	170,2(101-320)
8 (E)/24	19,5(14,5-23,3)	120,5(69,4-190)	15,6(5,39-29,2)	118(88,3-171)
9 (E)/26	9,8(7,53-11,4)	85,6(70,9-97,9)	12,4(9,2-16,2)	93,6(67,2-169)
10 (E)/42	37,8(24,9-56,4)	180,5(145-220)	19,8(10,9-26,2)	160,2(86,9-247)
11 (K)/42	18,3(14,3-23,4)	90,4(69,6-119)	12,7(11-15)	58,5(50,7-68,5)
12 (K)/30	8,7(7,23-9,88)	86,5(72,9-96,8)	15,2(10,9-20,9)	113,1(69,9-198)
13 (K)/32	7(5,13-10,9)	190,2(85-231)	12,8(4,92-17,6)	61,5(50,3-75)
14 (K)/41	3,5(1,47-6,55)	107,1(76-147)	16,1(9,31-22,2)	43,3(35,9-60,7)
15 (K)/28	11,5(10,6-12,8)	61,5(46-80,2)	9,7(7,35-11,1)	70,2(55,5-107)
16 (K)/39	6,5(5,41-7,02)	63,3(54-70)	15,9(11,3-18,3)	91,7(52,7-191)
17 (K)/47	10,2(8,09-12)	81(51,4-104)	10,8(9,83-11,9)	54,9(41,4-67,7)
18 (K)/29	10,7(8,44-13,9)	65,4(62-68,9)	19,7(13-30,2)	188,4(93,2-306)
19(K)/38	19,2(17,2-21,4)	116,9(86-151)	14,9(9,08-23,2)	66,9(42,1-94,4)
20 (K)/45	7,6(6,76-8,75)	67,8(61,2-84,7)	5,1(4,44-5,88)	70,1(49,6-87,3)
21 (K)/39	15,8(14,1-18,9)	106,2(73,2-128)	16,6(11,6-20,9)	123,3(58-270)
22 (K)/54	9,2(7,76-10,1)	99,3(67,4-135)	12,1(10,5-15,2)	68,1(61,9-81,6)
23(E)/35	16(14-17)	89,3(74,2-109)	18,2(13,9-21,7)	206,7(191-237)
24(K)/27	9,8(8,22-13,9)	70,5(61,9-76,9)	12,2(8,25-17,3)	45,7(40,3-55,8)
25(K)/26	5(4,1-5,58)	69,9(65-83,5)	13,3(8,7-18,1)	70(53-110)
26(E)/32	21,7(19,6-24,8)	112,6(75,2-171)	16(12,3-21,1)	68,6(61,2-86,7)
27(E)/39	30,2(28,8-32,8)	156,2(113-198)	32(21,2-47,4)	85,2(70,8-109)
28(E)/26	8,8(7,15-9,65)	82,9(66,2-102)	12,8(8,55-16,7)	85,9(67,8-108)
29(E)/23	11(9,41-12,3)	109,3(75,2-158)	10,5(6,34-18,1)	82,5(77,3-89)
30(E)/35	34,5(31,8-38,1)	121,6(108-150)	22,7(12-30,6)	66(52,8-83)

EK-6

Gönüllü numarası (cinsiyet)/ yaş(yıl)	CRP, mg/L, mean (min-max)	Hemoliz indeks, mg/dL, mean (min-max)	İkter indeks, mg/dL, mean (min-max)	Lipemi indeks, mg/dL, mean (min-max)
1 (E)/46	1,6(0,76-3,9)	4,5(1-12)	0,5(0-1)	31,8(20-48)
2 (E)/29	0,7(0,35-1,87)	3,8(2-5)	1,8(1-2)	23,3(10-73)
3 (E)/55	2,9(0,81-7,15)	3,2(0-7)	1,2(0-2)	39,5(17-103)
4 (E)/56	0,7(0,40-1,46)	5,5(3-7)	1(1-1)	14,8(8-20)
5 (E)/29	2,8(1,17-4,54)	16,8(5-60)	0,7(0-1)	47(33-88)
6 (E)/28	3,1(2,03-4,24)	6,5(2-12)	0,3(0-1)	33(26-47)
7 (E)/33	0,8(0,53-1,13)	5,7(3-10)	1,5(1-2)	14,5(13-16)
8 (E)/24	2,9(0,58-4,9)	6,7(4-10)	0,7(0-1)	53,8(17-107)
9 (E)/26	0,9(0,26-2,37)	4,8(2-11)	1(1-1)	24,2(17-42)
10 (E)/42	2,4(1,58-3,66)	3,8(1-8)	1,2(1-2)	54,3(42-71)
11 (K)/42	0,4(0,31-0,48)	5(2-8)	1(1-1)	11,2(7-22)
12 (K)/30	0,4(0,18-0,58)	2,7(1-5)	1(1-1)	23,5(13-28)
13 (K)/32	3,7(0,41-4,8)	1,8(0-3)	0,7(0-1)	62(12-99)
14 (K)/41	0,6(0,23-1,96)	3,3(0-5)	1(1-1)	37,7(12-92)
15 (K)/28	0,2(0,19-0,36)	4,3(2-10)	1(1-1)	10,8(6-16)
16 (K)/39	0,2(0,18-0,27)	7(1-15)	1(1-1)	9(6-13)
17 (K)/47	1,5(1,24-1,77)	3,5(1-9)	1(1-1)	21,3(12-40)
18 (K)/29	0,4(0,34-0,5)	3,7(2-6)	1(1-1)	7,7(7-8)
19(K)/38	2(0,59-3,86)	4,7(3-8)	0,2(0-1)	23,2(9-49)
20 (K)/45	1,7(1,13-2,43)	6,5(0-17)	1(1-1)	7,5(5-9)
21 (K)/39	1,9(1,17-4,14)	4,8(2-8)	1(1-1)	28,7(12-43)
22 (K)/54	3,3(2,35-4,02)	4,5(2-8)	1(1-1)	27,5(20-38)
23(E)/35	1,2(0,48-4)	7,7(1-18)	0,5(0-1)	27,5(16-45)
24(K)/27	0,3(0,20-0,34)	4,2(0-8)	1,3(1-2)	21(14-33)
25(K)/26	1,2(0,99-1,41)	7,5(2-15)	1(1-1)	11,8(6-16)
26(E)/32	1,2(0,60-3,01)	4,8(0-8)	1(1-1)	48,8(19-114)
27(E)/39	2(1,21-4)	5,2(0-13)	1,2(1-2)	55,8(29-87)
28(E)/26	1,1(0,72-1,43)	3,5(0-6)	0,8(0-1)	31,8(14-71)
29(E)/23	0,9(0,23-3)	4,8(3-7)	2(2-2)	48,2(10-92)
30(E)/35	1,7(1,1-2,15)	7,4(2-15)	1(1-1)	57,6(44-106)