T..
ANKARA YILDIRIM C BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARI

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ve Rutin Spektrofotometrik Yöntemler ile Ölçülen Kreatinin Düzeylerinin Karşılaştırılması ve eGFR Hesabı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Cemil NURAL

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI
ANKARA ŞEHİR HASTANESİ TIBBİ BİYOKİMYA LABORATUVARI

Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi ve Rutin Spektrofotometrik Yöntemler ile Ölçülen Kreatinin Düzeylerinin Karşılaştırılması ve eGFR Hesabı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Uzmanlık Tezi

Araş. Gör. Cemil NURAL

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Gülsen YILMAZ

Ankara, 2020

BU TIBBİ BİYOKİMYA UZMANLIK TEZİ TÜBİTAK TARAFINDAN 218S873 NUMARALI 1002 PROJESİ İLE DESTEKLENMİŞTİR.



TEŞEKKÜRLER

Asistanlık eğitimim boyunca her konuda ilgi ve desteğini benden esirgemeyen, bu tezi hazırlayabilmek için bana her türlü imkânı sunan ve tezimin hazırlanmasında ve yazılmasında gece gündüz demeden bana yardım eden, tez danışmanım, değerli hocam sayın Prof. Dr. GÜLSEN YILMAZ'a;

Uzmanlık eğitimim boyunca bana birçok deneyim ve bilgi kazandıran, uzmalık eğitimi yanı sıra akademik bir vizyon da kazandırmaya çalışan sayın hocalarım Prof. Dr. Özcan EREL, Prof. Dr. Fatma Meriç YILMAZ, Prof. Dr. Leyla Didem KOZACI, Prof. Dr. Cemile BİÇER, Doç. Dr. Serpil ERDOĞAN, Doç. Dr. Ceylan BAL ve Dr. Öğr. Üyesi Salim NEŞELİOĞLU'na;

Ankara Şehir Hastane'sine geçiş sonrası birlikte olduğumuz süre boyunca tecrübe ve deneyimlerini aktaran sayın hocalarım Doç. Dr. Turan TURHAN, Doç. Dr. Sevilay SEZER ve Doç. Dr. Canan TOPÇUOĞLU, Uzm. Dr. Mevhibe BALK;

LC MS/MS analizlerindeki yardımları için Meryem Sena AKKUŞ'a;

Her zaman başarıma inanıp, yanımda olan ve beni sürekli motive eden değerli arkadaşlarım Arzu SAKALLI ve Betül ÖZBEK İPTEÇ'e;

Meslekteki tecrübelirini benimle paylaştıkları ve gelişimimdeki katkıları için tüm uzmanlarımıza;

Asistanlık eğitimim boyunca karşılıklı saygı ve anlayış içinde çalıştığım asistan arkadaşlarıma;

Hayatımın her anında yanımda olan ve her zorlukta desteklerini gördüğüm annem, babam ve kardeşlerime sonsuz teşekkür ederim.

Cemil NURAL

Ankara, 2020

ÖZET

Böbrek Hastalıkları ve özellikle çeşitli nedenlere bağlı olarak, fonksiyonel nefronların kronik, ilerleyici ve geri dönüşümsüz kaybının görüldüğü Kronik Böbrek Hastalığı (KBH), dünyada ve ülkemizde önemli bir halk sağlığı sorunudur. Böbrek yetmezliği, önlenebilir veya ilerlemesi geciktirilebilen bir durum olduğu için böbrek fonksiyonunun ve dolayısıyla glomerüler filtrasyon hızının (GFR) doğru göstergelerle tespit ve izlemi önemlidir. Ölçümünün zor ve zahmetli olması nedeniyle doğrudan GFR ölçümü yerine denklemlerle hesaplanan GFR (eGFR) yaygın olarak kullanılmaktadır. Günümüze kadar geliştirilen en az 40'a yakın eGFR formülleri içinde yaygın olarak kabul gören ve hem uluslararası hem de ulusal kullanımı önerilen CKD-EPI denkleminde kreatinin biyokimyasal olarak ölçümü yapılan tek parametre olarak yer almaktadır. Ayrıca GFR'nin izleminde serum kreatinin seviyelerinin tekrarlı ölçümlerle takibinin tek başına yeterli olduğu kabul görmektedir. Bu nedenlerle böbrek fonksiyonunun belirlenmesi açısından kreatinin düzeyleri yüksek hassasiyette analiz edilmesi gereken önemli bir parametredir. Kreatinin analizi için klinik laboratuvarlarda en çok Jaffe yöntemi kullanılmakta olup, bu yöntem alkali ortamda pikrik asitle renk veren kreatininin spektrofotometrik olarak ölçümüne dayanmaktadır. Ancak bu yönteme proteinler, biluribin, ketonlar gibi maddeler girişim yaparak yanlış ölçümlere neden olabilmektedir. Ayrıca kreatinin değerlerinin düşük olduğu aralıkta doğru sonuç verebilmesi için ölçülen yöntemin hassasiyeti kritik önemi sahiptir. Bu nedenlerle yaygın olarak kullanılan bir klinik parametre olmasına rağmen doğru kreatinin ölçüm yöntemi hakkındaki çalışmalar güncelliğini korumaktadır. Kreatinin tayininde testin doğruluğunu ve hassasiyetini sınırlandıran analitik sorunlar, GFR tahmini için kullanılan formüllerde yer almak üzere alternatif biyokimyasal parametre arayışına girilmesine yol açmıştır. Bu nedenle kreatinine alternatif olarak sistatin C, Beta Trace Protein (BTP) ve Simetrik-Dimetil Arjinin (SDMA) gibi düşük moleküler ağırlıklı proteinler renal belirteç olarak önerilmektedir. Bunlar arasında en çok tercih edilen, hatta rutinde kullanımı olan sistatin C ile ilgili GFR hesaplama formülleri Sağlık Bakanlığımız tarafından da önerilmektedir.

Çalışmamızda kreatinin miktar tayini için numune hazırlığı ve kullanım kolaylığı, hızlı sonuç vermesi ve yüksek hassasiyette olması sebebiyle sıvı-kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ölçüm yöntemini referans yöntem olarak belirledik. Yöntemimizin geçerli kılınması için yöntem validasyon çalışmalarını gerçekleştirdikten

sonra rutin kullanımdaki Jaffe yöntemi temelli kitlerin yanı sıra yine enzimatik kreatinin ölçümüne dayanan kitlerle analiz edilen kreatinin sonuçlarıyla da karşılaştırdık. Elde edilen sonuçların CKD-EPI eGFR hesaplamasına olan etkisini inceledik. Bu verilerin doğruluğunu irdelemek için ayrıca standart referans materyal olan SRM 967a'yı farklı kreatinin yöntemleri ile çalıştık. Alternatif belirteç olarak ise sistatin C ve BTP'yi nefelometre (BNII, Siemens) cihazında ve SDMA'yı ise LC MS/MS cihazlarında analiz ettik ve sonuçları referans yöntem olan LC MS/MS kreatinin sonuçları ile karşılaştırdık. Ayrıca sistatin C sonuçları ile sistatin C bazlı eGFR ve sistatin C ve kreatinini içeren kombine eGFR formülü ile hesaplamasını yaptık ve yaygın kullanımda olan CKD-EPI ile karşılaştırdık. Elde edilen tüm eGFR sonuçlarını KBH evrelemesine olan etkisi inceledik.

Çalışmamızın sonucunda referans olarak kullandığımız ve valide ettiğimiz LC-MSMS kreatinin yönteminin SRM 967a ile yaptığımız doğrulama çalışmasında seviye 1 (0,85 mg/dL) için 0,84 mg/dL ve seviye 2 (3,87 mg/dL) için 3,95 mg/dL sonuçlarını elde ettik. Referans LC-MSMS yöntemi ile karşılaştırdığımızda Jaffe ve enzimatik kreatinin yöntemleri ile güçlü korelasyon ve regresyon analizinde de uyumlu sonuçlar elde ettik. Alternatif belirteç olarak belirlediğimiz sistatin C, BTP ve SDMA sonuçlarından sistatin C ile yüksek seviyede (r^2= 0,91) olmak üzere tüm belirteçler ile pozitif korelasyon elde ettik. Kreatinin ölçüm yöntemlerinden hesaplanan eGFR, sistatin C ve sistatin C+kreatinin ile kombine olan eGFR değerlerini, LC-MSMS kreatinin verilerine göre elde edilen eGFR ile karşılaştırdığımızda yine güçlü korelasyon ve uygun regresyon analiz sonuçları elde ettik.

Klinik karar açısından büyük önemi olan testlere ait yöntemlerin laboratuvarlar arası standardizasyonun yapılması önerilmektedir. Bunun için standart referans materyaller (SRM) ya da referans bir yöntem kullanılabilir. Rutin yöntemde kullandığımız Jaffe yönteminin, LC-MSMS referans yöntemi ile uyumlu sonuçlar vermesine rağmen hem hesaplanan GFR değerlerinde yüksek standart sapmalara, hem de KBH evrelemesinde farklılaklar neden olabildiği için referans yöntem ya da SRM'ler ile doğrulanmasını önermekteyiz. Ayrıca referans yöntem LC-MSMS kullanılarak karşılaştırma çalışmaları ile daha iyi sonuçlar elde ettiğimiz enzimatik kreatinin yöntemi rutinde Jaffe yerine tercih edilebilir. Alternatif belirteç olarak kullanılan sistatin C'nin, kreatinin ile birlikte eGFR hesaplanmasında daha doğru ve uyumlu sonuçlar verebileceğini düşünmekteyiz. Elde ettiğimiz sonuçlar ışığında özellikle düşük kreatinin seviyelerine sahip pediyatrik ve geriatrik hasta popülasyonunda kreatinin ölçümleri için bir high-sensitif kreatinin (hs-

Kreatinin) yöntemine ihtiyaç duyumaktadır ve bu yönüyle kreatinin ölçümleri için LC-MSMS rutin kullanımı uygun olabilir.

Anahtar Kelime: Kreatinin ölçümü, GFR, LC-MS/MS, Jaffe yöntemi, Enzimatik kreatinin ölçümü, Sistatin C, Beta Trace Protein, SDMA, Kronik böbrek hastaliği.

ABSTRACT

Kidney Diseases and especially Chronic Kidney Failure, which has chronic, progressive and irreversible loss of functional nephrons due to various reasons, is an important public health problem in all over the world and in our country. Since renal failure is a condition that can be prevented or delayed, therefore it is important to detect and monitor kidney function and glomerular filtration rate (GFR) with accurate markers. Because of direct GFR measurement is difficult and also labored, estimated GFR is widely used instead. Creatinine is the only parameter that can be measured biochemically in the CKD-EPI (Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration) equation, which is one of the accepted over fourty eGFR equations that recommended for international and national use. Repeated measurement of serum creatinine levels is considered a sufficient parameter in monitoring GFR. Therefore, creatinine levels should be analyzed with high sensitivity in terms of determining kidney function. Jaffe method is mostly used in clinical laboratories for creatinine analysis and is based on spectrophotometric measurement of creatinine, which gives color with picric acid at alkaline media. Such as proteins, bilirubin and ketones substances can interfere with this method and cause false results. Further, sensitivity of the performed method is critical for accurate results in low creatinine values range. Therefore, creatinine is a commonly used clinical parameter, yet research on the accuracy of the measurement method remains current. Limitations in accuracy and precision in creatinine measurement have led to the search for new biomarkers. Low molecular weight proteins such as cystatin C, Beta Trace Protein (BTP) and Symmetric-Dimethyl Arginine (SDMA) are recommended as an renal marker as an alternative to creatinine. Among these, GFR calculation formulas related to cystatin C, which is the most preferred in routine use, are also recommended by our Ministry of Health.

In our study, we determined liquid-chromatography mass spectrometry (LC-MS / MS) measurement method as the reference method for ease of sample preparation and use, rapid results, and high sensitivity for creatinine quantification. After LC-MSMS creatinine method validation studies, we also compared the results of Jaffe method and enzymatic method with creatinine results. We examined the effect of the obtained results on CKD-EPI eGFR calculation. In order to examine the accuracy of these data, we also used standard reference material SRM 967a with different creatinine methods. As an

alternative marker, we analyzed cystatin C and BTP by nephelometer (BNII, Siemens) and SDMA by LC MS / MS. Then, we compared the results with creatinine measurement using reference method LC MS / MS. Also, after calculating the cystatin C results with the cystatin C based eGFR and also the combined eGFR equation with cystatin C and creatinine, we compared the results with the commonly used CKD-EPI. We examined the effect of all eGFR results obtained on classification of chronic renal failure.

As a result of our reference LC-MS / MS creatinine method, for accuracy study two levels (0.85 mg / dL and 3.87 mg / dL) of the SRM967a material we used concentrations were 0.84 mg/dL and 3.95 mg/dL respectively. Compared to the reference LC-MS / MS method, we found a strong correlation with Jaffe and enzymatic creatinine methods and obtained consistent results in regression analysis. We obtained a positive correlation with cystatin C, BTP and SDMA we determined as an alternative biomarkers, with high correlation with cystatin C ($r^2 = 0.91$). Three methods (LC-MSMS referance creatinine analyze method, eGFR equation and creatinine/cystatin C combined eGFR equation) has showed consistent regression and strong corelation in creatinine results.

It is recommended that the methods of the tests, which are important for clinical decision, to be standardized between the laboratories. Standard reference materials (SRM) or a reference method can be used for standardization. Although the Jaffe method we use in the routine method gives consistent results with the reference method, because may cause high standard deviations in the eGFR results and differences in classification of chronic renal failure, we recommend verifying with reference method or SRMs. Cystatin C, which is used as an alternative marker, can give more accurate and harmonious results when combined with creatinine in eGFR equation. As a result of our study, LC-MS / MS may be routinely used for creatinine measurements, since a high-sensitive creatinine (hs-creatinine) method is needed for low creatinine levels, such as in pediatric and geriatric patients.

Key Words: Creatinine measurement, GFR, LC-MS/MS, Jaffe method, Enzymatic Creatinine measurement, Cystatin C, Beta Trace Protein, SDMA, Chronic Renal Disease.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜRLER i

ÖZET ii

ABSTRACT v

İÇİNDEKİLER xi

ŞEKİLLER DİZİNİ xvii

TABLOLAR DİZİNİ xx

1. GİRİŞ: 1

2. GENEL BİLGİLER 5

2.1. Böbrek Anatomisi Ve Fizyolojisi 5

2.1.1. Nefron Yapısı 6

2.1.2. Nefronların Temel İşlevleri 7

2.2. Renal Hastalıkları 8

2.2.1. Akut Böbrek Yetmezliği 8

2.2.1.1. Akut Böbrek Yetmezliği Tanı Kriterleri 9

2.2.1.1.1. RIFLE Kriterleri 9

2.2.1.1.2. AKIN Kriterleri 10

2.2.1.1.3. KDIGO Kriterleri 11

2.2.2. Kronik Böbrek Hastalığı 12

2.2.2.1. Kronik Böbrek Hastalığı Evreleri 13

2.3. Böbrek ve Böbrek İşlevlerinin Değerlendirilmesi 16
2.3.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı 16
2.3.2. Klirens Ölçümünde Kullanılan Belirteçler 18
2.3.2.1. Ekzojen Belirteçler 18
2.3.2.2. Endojen Belirteçler 18
2.3.2.2.1. Üre Klirensi 19
2.3.2.2.2. Kreatinin ve Kreatinin Klirensi 20
2.3.3. GFR Hesabında Kullanılan Formüller 25
2.3.3.1. Cockcroft ve Gault Formülü 25
2.3.3.2. The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Formülü 25
2.3.3.3. Schwartz formülü 26
2.3.3.4. The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü 26
2.3.4. Düşük Molekül Ağırlıklı Proteinler 27
2.3.4.1. Sistatin C 27
2.3.4.2. Beta Trace Protein (BTP) 30
2.3.4.3. Arjinin ve Metilasyon Ürünleri 30
2.4. Yöntem Validasyonu 33
2.4.1. Doğruluk (accuracy) 33
2.4.1.1. Sertifikalı referans materyal kullanarak gerçekliğin tespiti 34
2.4.1.2. Geri elde (Recovery): 34
2.4.2. Tekrarlanabilirlik (Precision) 35

2.4.3. Doğrusallık (Linearite): 35

2.4.4. Ölçüm Aralığı ve Lineer Aralık (Lineerlik/Doğrusallık) 36

2.4.5. Gözlenebilirlik ve Belirlenebilirlik Sınırları (Tespit ve Tayin Limitleri) (LOD/LOQ): 36

2.4.5.1. Gözlenebilirlik Sınırı (Tespit Limiti)(LOD): 37

2.4.5.2. Belirlenebilirlik sınırı (Tayin Limiti)(LOQ): 37

2.4.6. Yöntem Karşılaştırma 37

3. GEREÇ VE YÖNTEM....38

3.1. Materyaller 38

3.1.1. Cihazlar....38

3.1.2. Kimyasallar....38

3.1.3. Ticari Kitler 39

3.1.4. Sarf Malzemeleri....39

3.2. Örnek Toplama 39

3.3. Yöntemler....40

3.3.1. Jaffe Yöntemi....40

3.3.2. Enzimatik Jaffe Yöntemi....40

3.3.3. Beta Trace Protein....41

3.3.4. Sistatin C 41

3.3.5. ADMA/SDMA Ölçüm Yöntemi....41

3.3.6. Kreatinin LC-MSMS Yöntemi 42

3.3.6.1. Numune Hazırlama Protokolü 42

3.3.6.2. Çözelti Hazırlama Protokolü 42
3.3.6.3. LC-MSMS Parametreleri 43
3.3.7. LC-MSMS Yöntem Validasyon Parametreleri 45
3.3.7.1. Doğrusallık (Linearite) 45
3.3.7.2. Analitik Ölçüm Limitleri 46
3.3.7.2.1. Limit of Dedection (LOD) 46
3.3.7.2.2. Limit of Quantitation (LOQ) 46
3.3.7.3. Tekrarlanabilirlik 46
3.3.7.4. Geri Elde (Recovery) 46
3.3.7.5. Taşıma (Carry Over) 47
3.3.7.6. Metot Karşılaştırma Çalışması 47
3.4. İstatistiksel Analiz 47
4. BULGULAR 48
4.1. Çalışılan Yöntemler 48
4.1.1. Kreatinin Ölçümleri ve Karşılaştırmaları 48
4.1.1.1. LC-MSMS Kreatinin Yöntemi 48
4.1.1.1.1. LC MSMS Kreatinin Yöntem Validasyon Parametreleri 50
4.1.1.2. Kreatinin Jaffe Yöntemi 53
4.1.1.3. Enzimatik Kreatinin Ölçüm Yöntemi 54
4.1.1.4. Kreatinin Yöntemleri Karşılaştırma Çalışması 55
4.1.2. Diğer Renal Belirteçler (Sistatin C, BTP ve SDMA) 60

4.1.2.1. Sistatin C 60

4.1.2.2. Beta Trace Protein (BTP) 61

4.1.2.3. SDMA 61

4.1.2.4. Diğer Renal Belirteçlerin Kreatinin ile Karşılaştırılması 63

4.2. GFR Hesaplanması ve Yöntemlerin eGFR'a Etkisinin Karşılaştırılması 65

4.2.1. Farklı Kreatinin Analiz Yöntemleri ile GFR Hesabı ve eGFR Sonuçlarının Karşılaştırılması 65

4.2.2. Sistatic C ile GFR Hesaplama ve CKD-EPI ile Karşılaştırılması 69

4.2.3. Sistatin C ve Kreatinin Ortak GFR Hesaplama Yöntemi ve CKD-EPI ile Karşılaştırılması 71

4.3. KBH Evreleme Kriterlerine Göre Yöntemlerin Karşılaştırılması 73

5. TARTIŞMA 75

5.1. Analitik Hedefler 75

5.2. İstatistiksel Karşılaştırma 78

5.3. Tanısal Hedefler 84

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 86

7. KAYNAKLAR 87

8. EKLER 95

8.1. Etik Kurul Onay Kararı 95

8.2. Özgeçmiş 96

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ABY	Akut böbrek yetmezliği
ADMA	Asimetrik dimetil arjinin
ADQI	Acute Dialysis Quality Initiative
AKIN	Acute Kidney Injury Network
ALP	Alkalen fosfataz
AMR	Analitik ölçüm aralığı
AUC	Eğri altında kalan alanın
BTP	Beta Trace Protein
BUN	Kan üre azotu
CG	Cockcroft and Gault
CKD-EPI	The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
Cr-EDTA	51-Chromium Etilendiaminetetra asetik asid
DTPA	99mTc işaretli dietilen triamin pentaasetikasit
ERBP	Avrupa Böbrek En İyi Klinik Uygulama Kılavuzu
IFCC	International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine
IRMM	Institute for Reference Materials and Measurements
GFR	Glomerüler filtrasyon hızı
KBH	Kronik böbrek hastalığı
KDIGO	Kidney Disease: Improving Global Outcomes
LC-IDMS/MS	Sıvı kromatografisi-izotop seyreltme kütle spektrometresi
LOD	Gözlenebilirlik Sınırı (Tespit Limiti)
LOQ	Belirlenebilirlik sınırı (Tayin Limiti)
MDRD	Modification of Diet in Renal Disease
NKDEP	ABD Ulusal Böbrek Hastalıkları Eğitim Programının
NKF	National Kidney Foundation
NKF–K/DOQI	ABD Ulusal Böbrek Vakfı
NMMA	NG-monometil-L-arjinin
PRMT	Protein arjinin metil transferaz
PTH	Paratiroid hormon
S/N	Sinyal/Gürültü
SCr	Serum kreatinin
SDMA	Simetrik dimetil arjinin
SRM	Standart Referans Materyalleri
TAH	Total Kabul Edilebilir Hata

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Böbreğin dikey kesimi 5

Şekil 2. Glomerül ve nefronun yapısı 7

Şekil 3. Glomerül ve tübül yapıları 8

Şekil 4. KBH' nin kavramsal modeli 15

Şekil 5. Kreatinin fotometrik analizi için Jaffe reaksiyonu 22

Şekil 6. Serum kreatinin ve GFR arasındaki ilişki 24

Şekil 7. Sistatin C'nin dimerik formunun üç boyutlu görünümü 28

Şekil 8. Arjinin ve metilasyon metabolitleri. 31

Şekil 9. ADMA ve SDMA metabolizması 32

Şekil 10. Kreatinin LC-MSMS yöntemi ile çalışılan metanol kromatogram sonucu. 48

Şekil 11. Kreatinin LC-MSMS kromatogramı.....49

Şekil 12. LC-MSMS Kreatinin yöntemi kalibrasyon eğrisi. 49

Şekil 13. Kreatinin LC- MSMS yöntemi linearite ve kalibrasyon eğrisi. 50

Şekil 14. Kreatinin deteksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N).....51

Şekil 15. Kreatinin kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N) 51

Şekil 16. Jaffe Siemens kreatinin kalibrasyon eğrisi grafiği. 54

Şekil 17. Enzimatik kreatinin yöntemi kalibrasyon eğrisi grafiği.....54

Şekil 18. Kreatinin yöntem karşılaştırma çalışmaları korelasyon grafikleri. (A:LC-MSMS ve Jaffe (Roche) yöntemlerinin korelasyon grafiği. B: LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) yöntemlerinin korelasyon grafiği. C: LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerine ait korelasyon grafiği. D: Enzimatik kreatinin ve Jaffe (Roche) yöntemlerine ait korelasyon

grafiği. E: Enzimatik kreatinin ve Jaffe Siemens yöntemlerinin korelasyon grafiği. F: Jaffe Siemens ve Roche firmalarının kitlerinin korelasyon grafiği.) 56

Şekil 19. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 57

Şekil 20. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 57

Şekil 21. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 58

Şekil 22. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği. 58

Şekil 23. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği. 59

Şekil 24. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği. 59

Şekil 25. Sistatin C testinin kalibrasyon eğri grafiği. 61

Şekil 26. BTP kalibrasyon eğri grafiği. 61

Şekil 27. ADMA/SDMA LC-MSMS kromatogramı. 62

Şekil 28. ADMA kalibrasyon eğrisi grafiği. 62

Şekil 29. SDMA kalibrasyon eğrisi grafiği. 63

Şekil 30. LC-MS/MS, BTP, Sistatin C ve SDMA korelasyon grafikleri. 64

Şekil 31. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 66

Şekil 32. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 67

Şekil 33. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin (E-CREA) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 67

Şekil 34. LC-MSMS ve Jaffe (ROCHE) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.....68

Şekil 35. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.....68

Şekil 36. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin (E-CREA) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri. 69

Şekil 37. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.....70

Şekil 38. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.....71

Şekil 39. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+ LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri. 72

Şekil 40. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri. 72

Şekil 41. CLSI C50 protokolü linearite tanımlama grafiği. 77

Şekil 42. Deteksiyon limiti ve kantitasyon limiti belirleme sinyal/gürültü grafiği. 77

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1. RIFFLE sınıflandırması 10

Tablo 2. Akut Böbrek Yetmezliği AKIN kriterleri. 11

Tablo 3. KDIGO ABY sınıflandırması 12

Tablo 4. Kronik böbrek hastalığı evreleri. 13

Tablo 5. KBH tanı kriterleri.....14

Tablo 6. Glomerüler filtrasyon hızı belirteçleri [9]. 20

Tablo 7. Kreatinin yapımını, atılımını ve serum kreatinin düzeyini etkileyen böbrek dışı faktörler 23

Tablo 8. CKD- EPI hesaplama formülü. 27

Tablo 9. Serum sistatin C konsantrasyonuna göre eGFR hesaplama formülleri [1]. 28

Tablo 10. Serum kreatinin ve sistatin C değerlerinin kombinasyou ile türetilen eGFR formülleri 29

Tablo 11. Kreatinin ölçümü LC-MSMS parametreleri 45

Tablo 12. EP-10 protokolüne göre tekrarlanabilirlik analiz sonuçları. 52

Tablo 13. Geri elde (Recovery) çalışma sonuçları. 53

Tablo 14. LC-MSMS ve farklı kreatinin yöntemlerine ait analiz sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri 60

Tablo 15. Farklı kreatinin yöntemleri ve diğer renal belirteçlerin LC-MSMS kreatinin yöntemi ile korelasyon verileri. 65

Tablo 16. LC-MSMS ve farklı kreatinin yöntemleri ile hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri. 69

Tablo 17. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri. 71

Tablo 18. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma analiz verileri. 73

Tablo 19. Farklı GFR hesaplama yöntemlerinin KBH evreleme verileri ve karşılaştırmaları. 74

1. GİRİŞ:

Böbrekler, metabolizma sonucu oluşan üre, kreatinin gibi zararlı yıkım ürünleri, ilaçlar ve toksinler ile fazla sıvının vücuttan atılması, mineral ve asit baz dengesinin sağlanması, hormonların (eritropoetin, renin vb.) salınımı, D vitaminin aktifleştirilmesi, kan basıncının düzenlenmesi gibi insan için hayati öneme sahip işlevleri olan retroperitoneal organlardır. Böbrek sağlığının bozulması kronik böbrek hastalığı gelişimi ile sonuçlanmaktadır. Kronik böbrek hastalığı, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de adeta salgın halini almış olan önemli bir halk sağlığı sorunudur. Erken saptandığında sıklıkla önlenebilir veya ilerlemesi geciktirilebilir olmasına karşın, farkındalığının ve erken tanısının düşük olması nedeniyle böbrek hastalıkları sıklıkla son dönem böbrek yetmezliği evresine ilerlemekte, yüksek morbidite ve mortalite oranları ve kötü yaşam kalitesi ile hasta sağlığını, uygulanması gereken yüksek maliyetli diyaliz ve böbrek nakli tedavileri ile sağlık bütçesini ciddi bir şekilde tehdit etmektedir. Bu nedenle böbrek fonksiyonunun ve varsa böbrek hasarının en erken tespiti geri dönüşümsüz böbrek hasarının önlenmesi için büyük bir öneme sahiptir.

Glomerüler filtrasyon hızı (GFR), böbreğin süzme fonksiyonunu gösteren fonksiyonel kapasitesinin en hassas ve özgül ölçüsü olduğu kabul edilmektedir [1]. GFR ölçümünde kullanılan ve klirens esasına dayanan yöntemler için seçilen maddeler glomerüllerden serbest olarak süzülmeli, tübüllerden reabsorbe ve sekrete edilmemelidir. Bu ölçüm için genellikle, üre, kreatinin gibi endojen veya inülin, Cr-EDTA (51-Chromium Etilendiaminetetra asetik asid), 99mTc işaretli dietilen triamin pentaasetikasit (DTPA) ve İyot-125 işaretli iothalamate gibi ekzojen maddelerin böbrekler tarafından temizlenme kabiliyetini gösteren yöntemler kullanılmaktadır [2]. GFR tayininde ekzojen maddeler ile klirensin ölçülmesi altın standart olmasına rağmen uzun zaman alması, pahalı olması ve alerji riski gibi dezavantajlarından dolayı kreatinin ve üre gibi endojen maddelerin kullanımı ile tahmini GFR hesaplamaları (eGFR) pratikte yaygın olarak yer almaktadır [3].

Klinik uygulamalarda endojen kreatinin klirensi eGFR tayininde kullanılan en yaygın yöntemdir. Kreatinin rutin olarak serumda ölçülebilen, küçük molekül ağırlıklı ve proteinlere bağlanmayan aminoasit türevi bir yapıya sahiptir. Tübüler reabsorbsiyon olmadan glomerüler filtrasyona uğrar [4]. Serum kreatinin konsantrasyonu, kreatinin

filtrasyonu dışındaki faktörlerden de etkilendiğinden hesaplamanın doğruluğunda bazı sınırlılıklar bulunmaktadır. Bu sınırlılıkların önüne geçmek için yaş, cinsiyet ve vücut büyüklüğünü göz önünde bulunduran çok sayıda formül geliştirilmiştir [5]. 1999 yılında, böbrek hastalığının tespitinde önemli olan GFR'nin hesaplanmasında ırk, cinsiyet ve yaş gibi demografik değişkenlerden oluşan bir denklem geliştirilmiş ve kullanıma sunulmuştur. Bu denklemin doğruluğunu arttırmak için ABD Ulusal Böbrek Hastalıkları Eğitim Programının (NKDEP) bir Laboratuvar Çalışma Grubu'nda kreatinin yöntemi biasının hesaplanan GFR değeri üzerindeki etkisi gibi önemli konuları kapsayan bir takım öneriler yayınlamıştır. NKDEP, yaygın olarak kullanılan The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formulünde kreatinin ölçüm metoduna bağlı ölçüm hatalarının GFR tahminlerinin klinik faydasını tehlikeye atacağı endişesinden dolayı hesaplanan GFR değerlerinin 60 mL/dak/1.73m2'nin üzerine çıkmamasını tavsiye etmiştir [6].

GFR tahmin hesaplarında yaygın olarak kullanılan kreatinin ölçümü için çeşitli yöntemler mevcuttur. Kreatinin düzeyleri idrar ve serum örneklerinde sıklıkla ölçülmektedir. Kreatinin ölçümünde Jaffé yöntemi, pikrat türevinin kolorimetrik tayini veya birkaç enzim analizi kullanımı yaygındır. Bunlar içinde en yaygın kullanımı olan yöntem, alkali ortamda pikrik asit ve kreatinin arasında renk oluşumuna dayanan Jaffe reaksiyonuna dayanmaktadır. Yakın zamana kadar kreatinin miktar tayini için referans yöntem olarak, izotop dilusyon kütle spektrometresine bağlı sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (GC-MS/MS) altın standart yöntemi kullanılmaktaydı. Ancak yöntemin, çok basamaklı olması, yüksek eğitimli personel ihtiyacı göstermesi, kullanılan örnek miktarının fazlalığı, uzun analiz zamanı ve zahmetli olması daha iyi bir alternatif olarak sıvı kromatografisi kütle spektrometresi (LC-MS/MS) yöntemine olan ilgiyi arttırmıştır. LC-MSMS analitik çalışmaları numune hazırlığı için uygun, kolay ve hızlı olması sebebiyle daha çok tercih edilmektedir.

Yaygın olarak kullanılan Jaffe reaksiyonu kreatinin için spesifik değildir; glukoz, proteinler, aseton, askorbik asit, alfa-keto bileşikler, bilirubin, sefalosporin grubu antibiyotikler gibi çok sayıda metabolit veya molekülden etkilenir [7]. Mevcut yöntemler, rutin analiz için gerekli örnek verim, hassasiyet ve titizliğe sahip olmakla birlikte, kalite güvenceai ve izlenebilirlik amacıyla hem rutin hem de referans yöntemler sertifikalı referans materyallerine karşı sıklıkla düzenli olarak kontrol edilmesi önerilmektedir [6].

Standart Referans Materyalleri (SRM), daha yüksek mertebeden klinik yöntemlerin doğruluğunu değerlendirmede çalışma veya ikincil referans materyallerini doğrulamak için kullanılır. Analitik performans kriterlerinin geliştirilmesi ile bağlantılı olarak kreatinin, yöntem kısıtlamaları ve yöntem performansının belirlenmesi için çalışmalar halen güncelliğini korumaktadır.

Kreatinin tayininde testin doğruluğunu ve hassasiyetini sınırlandıran analitik sorunlar, GFR tahmini için kullanılan formüllerde yer almak üzere alternatif biyokimyasal parametre arayışına girilmesine yol açmıştır. Molekül ağırlığı 30.000 daltondan düşük olan düşük molekül ağırlıklı proteinlerin bu amaçla kullanımın uygun olacağı düşünülmektedir. Bu proteinlere Beta Trace Protein, α2-Mikroglobulin, Retinol Bağlayıcı Protein, α1-Mikroglobulin, Tamm-Horsfall Proteini ve Sistatin C örnek olarak verilebilir. Bu proteinler düşük molekül ağırlıklarından dolayı glomerüler bazal membrandan serbest olarak geçerler [8]. Bu özellikleri nedeniyle GFR tahmininde kullanabilirler. Böbrek fonksiyonun göstergeleri olarak araştırmalarda kullanılan kreatinin alternatifi olabilecek testlerden son yıllarda yapılan çalışmalarda renal fonksiyonların gösterilmesinde başarılı sonuçlar elde edilen Beta Trace Protein (BTP), Sistatin C ve Asimetrik dimetil arjinin/Simetrik dimetil arjinin (SDMA/ADMA) testleri ön plana çıkmıştır. Ayrıca Sistatin C ölçümlerini esas alan eGFR formülleri ile serum kreatinin ve sistatin C ölçümlerinin birlikte kullanıldığı kombine eGFR formülleri ortaya konulmuştur. Sistatin C ile yapılan eGFR hesabının Kronik böbrek hastalığı'nin (KBH) sınıflandırılma, tanı ve takibi için kreatinin hesabı kullanılarak yapılan değerlendirmelerde klinik olarak daha üstün ve doğrulayıcı nitelikte olduğu çalışmalarda gösterilse de [1] kreatinine göre çok daha pahalı ve ayrıca hala standardizasyon sorunlarının mevcut olması gibi dezavantajları nedeniyle klinik laboratuvarlarda kullanımı yaygınlaşmamıştır.

Bu çalışmadaki amacımız kreatinin ölçümümünde yöntemler arası farklılığının olup olmadığını saptamak ve varsa mevcut farkın eGFR hesabı üzerine etkisini değerlendirmektir. Bu amaçla, spektrofotometrik yöntemlerle ölçülen kreatinin düzeyleri ile karşılaştırma yöntemi olarak kromatografik yöntemle ölçülen kreatinin düzeyleri karşılaştırılmıştır. Rutin spektrofotometrik kreatinin ölçüm yöntemlerinden klinik laboratuvarlarda sıklıkla kullanılan Jaffe yöntemi ve enzimatik yöntem kullanılarak kreatinin ölçümleri yapılmıştır. Kromatografik kreatinin ölçümleri ise LC-MSMS

yöntemi kullanılarak yapılmış elde edilen sonuçlar eş zamanlı SRM sonuçları ile karşılaştırılmış ve eGFR hesabı üzerindeki etkisi araştırılmıştır. Ayrıca kreatinin dışındaki böbrek fonksiyonu göstergeleri olan BTP, ADMA/SDMA ve Sistatin C ölçümleri yapılmış kreatinin ve alternatif eGFR hesaplamaları yapılarak ölçümlerin ve hesaplamaların birbiri ile ve evreleme ile olan ilişkisi araştırılmıştır. Özellikle LC-MSMS gibi analitik performansı yüksek cihazla daha hassas bir şekilde ölçülen kreatinin ile rutin kullanılan yöntemler ile ölçülen kreatinin düzeylerinin, renal fonksiyonların göstergesi olarak birçok çalışmaya konu olan BTP, Sistatin C ve ADMA/SDMA testlerinin tek bir çalışmada karşılaştırılması hedeflenmiştir.

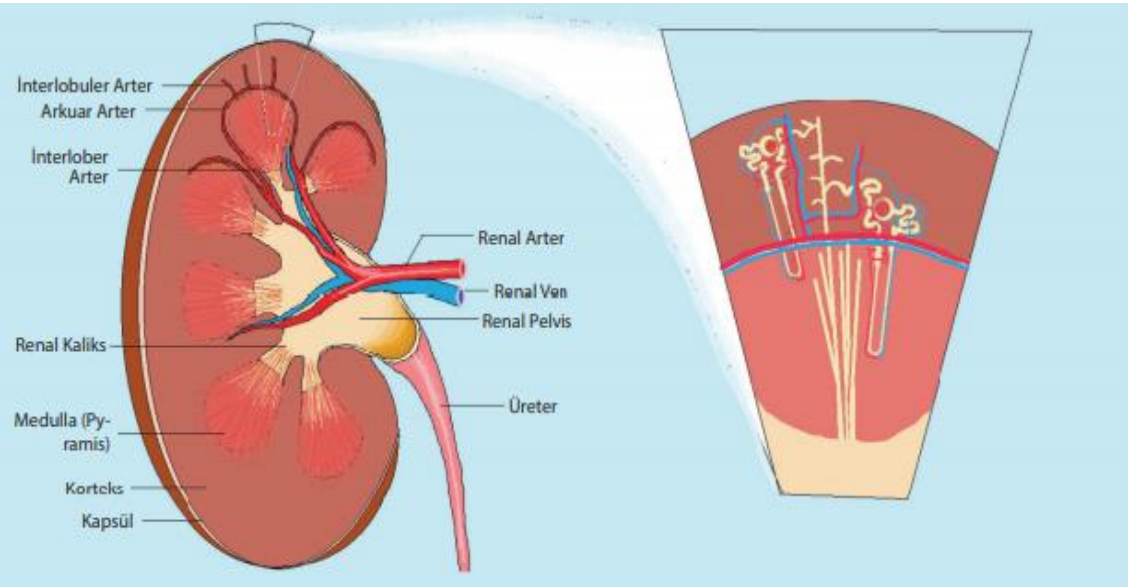
2. GENEL BİLGİLER

2.1.Böbrek Anatomisi Ve Fizyolojisi

Karın arka bölgesinde retroperitoneal kısmında bulunan böbrekler, kolumna vertebralis'in hemen lateralindeki ekstraperitoneal bağ dokusu içinde uzanırlar. Sırtüstü pozisyondayken böbreklerin üst kutupları T12. vertebra, alt kutupları ise L3. vertebra hizasında konumlanır (1). Yetişkin bir kişide, bir böbreğin ortalama ağırlığı 130-150 gr, boyutları 3x6x12 cm'dir (2).

Böbrek makroskopik olarak incelendiğinde şekil…'de de görüldüğü gibi dışta korteks, içte medulla olmak üzere iki ayrı bölgenin varlığı gözlemlenir ve bu her iki bölgede de böbreğin fonksiyonel birimleri olan nefronlar, kan damarları, lenfatikler ve sinirler bulunur.

Böbreklerdeki kan akımı, istirahatta kardiyak debinin yaklaşık %25'i kadardır. Renal arter dalları; interlober arter, arkuat arter, interlobular arter ve glomerüler kapillere ulaşan afferent arteryollere dallanır. Glomerüler kapillerler efferent arteryollerle birleşir. Bunlar da ikinci kapiller ağ olan ve nefronlara kan temin eden peritubüler kapillerlere ulaşır. Venöz sistem damarları arteryel damarlar ile paralel seyrederek interlobular ven, arkuat ven, interlobar ven ve renal veni oluşturur (3).

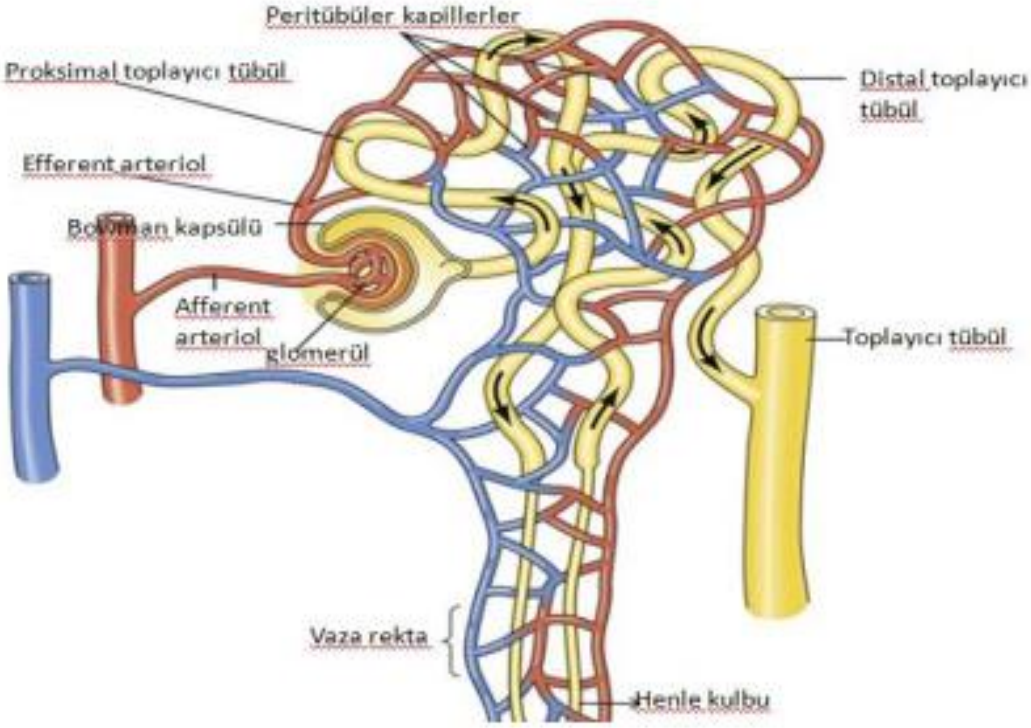


Şekil 1. Böbreğin dikey kesimi [9].

2.1.1. Nefron Yapısı

Böbreğin fonksiyonel birimi, her iki böbrekte yaklaşık 2 milyon adet bulunan nefronlardır. Her nefron tek başına fonksiyonel özellik gösterebilir ve idrar oluşturma yeteneğine sahiptir. Bir nefron temel olarak iki kısımdan meydana gelir. Bunlar; sıvının kandan filtre olduğu glomerül ve filtrasyon sonrasında idrar oluşumuna kadar giden sürecin gerçekleştiği tübüldür. Kortekste, glomerüller, proksimal ve distal tubüller ile dış korteksteki nefronların Henle kulpları bulunur. Medullada ise toplayıcı kanallar, Henle kulpları ve vasa rectalar bulunur. Medullada bulunan toplayıcı kanallar sırası ile küçük kaliks, büyük kaliks ve pelvise açılır.

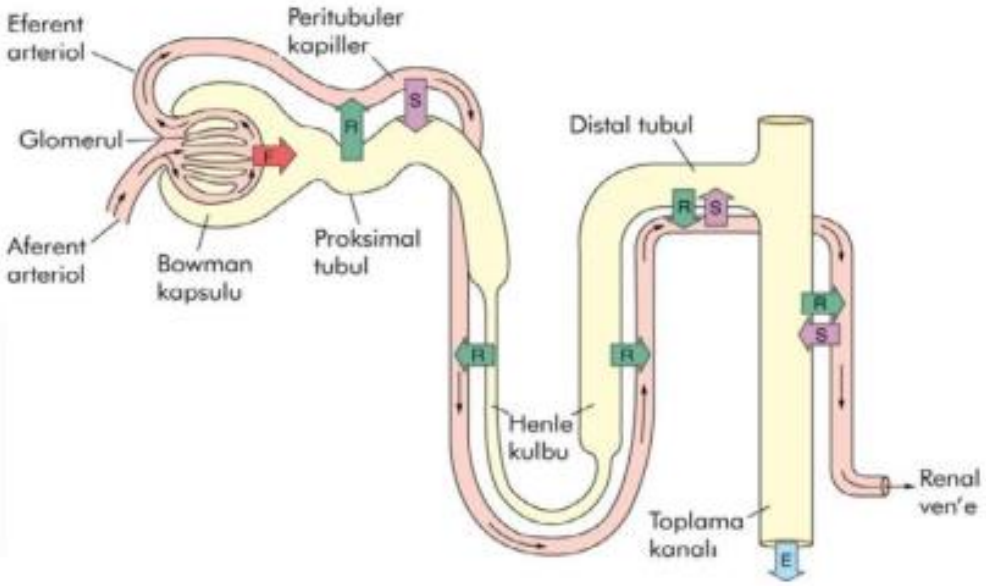
Glomerül olarak adlandırılan yapı, birbirine paralel, birbirleriyle anastomozları olan ve epitelyal hücrelerle kaplı kapillerden oluşan bir yumaktır (Şekil 2). Glomerüle arteryel kan, afferent arteryol aracılığı ile gelir ve efferent arteryol aracılığı ile uzaklaştırılır. Bowman kapsülü adı verilen bir yapı içinde yer alır. Glomerül içindeki kan basıncı sıvının Bowman kapsülü içine filtre olmasını sağlar ve bu sıvı böbreğin kortikal kısmında yer alan proksimal tübül içine ilerler. Bu sıvı proksimal tübülden sonra böbreğin derin medüller kısmında bulunan Henle kulpuna doğru ilerler. Her henle kulpu, inen ve çıkan kol olmak üzere iki kısma ayrılır. Henle kulpundan sonra sıvı sırasıyla distal tübüle ve kortikal toplayıcı kanala iletilir. Toplayıcı kanallar tübüller sistemi izleyerek sonunda renal papillaların uçlarından ve renal kaliksler aracılığıyla renal pelvise açılırlar. Böbreğin tüm tübüler sistemi çevresinde peritübüler kapiller ağ bulunur. Bu kapiller sisteme kan, efferent arteryolden, yani glomerülden daha önce geçmiş olan kandan gelir. Peritübüler kapiller ağın önemli bir bölümü kortekste olmakla birlikte vasa recta adı verilen uzantılarla Henle kulpunun derindeki kısımlarına da eşlik ederler.



Şekil 2. Glomerül ve nefronun yapısı [10]

2.1.2. Nefronların Temel İşlevleri

Böbrekte idrarın yapıldığı temel yapıyı oluşturan nefron, kanın süzüldüğü glomerül ve devamı olan tübülden oluşur. Nefronun temel işlevi, vücuttaki fizyolojik dengenin devamlılığının sağlanması için elektrolitlerin, çözünenlerin ve suyun selektif tutulumu veya atılımıyla stabil ortamın sürdürülmesidir. Sonuç olarak da idrar oluşumu ile bu süreç başarı ile sonlanır (Şekil 3).



Şekil 3. Glomerül ve tübül yapıları [10].

2.2.Renal Hastalıkları

Böbrek hastalıklarının çoğu asemptomatik seyreder. Böbreğin işlevselliğinde oluşan kısmi bozukluk ya da tamamen işlev kaybı akut olabildiği gibi, yıllar içinde sessizce seyredip kronikleşerek geri dönüşü olmayan bir tablo ortaya çıkarabilir.

2.2.1. Akut Böbrek Yetmezliği

Akut böbrek yetmezliği (ABY) saatler, günler ya da haftalar içinde gelişen GFR' deki azalma sonucu, sıvı-elektrolit ve asit baz dengesindeki bozukluğun hakim olduğu üre ve kreatinin gibi nitrojen içeren atıkların ve diğer üremik toksinlerin birikimine sebep olan, klinik bir sendromdur [11]. ABY'ndeki GFR, KBH aksine daha hızlı düşüş seyreder [12].

Günümüzde ABY patofizyolojik mekanizmalara göre prerenal, renal (intrinsik) ve postrenal olarak üç sınıfa ayrılmaktadır.

Prerenal Akut Böbrek Yetmezliği

ABY'nin en sık nedenidir. Sebebi renal parankim hasarı oluşturmayacak seviyede bozulan böbrek kan akımıdır. Böbrek kan akımındaki azalmanın nedeni genel olarak

damar içi volüm kaybı, dolaşan effektif volümdeki azalma veya renal kan akımını bozan ajanlara bağlı olarak gelişebilmektedir [13].

Renal (İntrinsik) Akut Böbrek Yetmezliği

Toplumda en sık kullanılan ilaçlar ve enfeksiyon sonrası görünen Renal böbrek yetmezliği glomerülün, tübülün, interstisyum ve damarların yaralanması sonucu oluşmaktadır. Hastanede ise renal ABY'nin en sık nedenlerinden biri de radyokontrast nefropatisidir [14].

Postrenal (Obstrüktif) Akut Böbrek Yetmezliği

ABY'nin %5'inden daha azından sorumlu olan obstrüktif üropati, genellikle yaşlı erkeklerde, tek böbrekli kişilerde ve intraabdominal malignitesi olanlarda görülür [15]. Erken müdahale edildiğinde iyi prognozlu olan postrenal ABY, tedavi edilmediği takdirde renal yetmezlikle sonuçlanabilir.

ABY'nin erken tanısı ve tedavisi prognoz açısından oldukça önemlidir. Bunun için çeşitli çalışma gruplarının belirlediği kriterler ile sınıflandırmalar yapılmıştır. 2004 yılında Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) çalışma grubu tarafından ABY tanısında kullanılacak standart bir sınıflandırma yapılmıştır (RIFLE) [16]. Bu sınıflandırmaya göre ilk üç kriter ile hastanın serum kreatinin seviyesi ya da idrar çıkışına göre risk, hasar, yetmezlik tanımlanırken, son iki kriter ile renal fonksiyonlarda kayıp ve son dönem böbrek yetmezliği tanımlanmıştır. 2007 yılında RIFLE kriterleri 48 saat içindeki değişimleri içerecek şekilde modifiye edilerek Acute Kidney Injury Network tarafından AKIN kriterleri doğmuştur [17]. 2012 yılında ise RIFLE ve AKIN kriterleri temel alınarak basit bir tanımlamayla bazal serum kreatinin düzeyi ve idrar çıkış miktarı kullanılarak KDIGO (Kidney Disease: Improving Global Outcomes) rehberi yayınlanmıştır [18].

2.2.1.1.Akut Böbrek Yetmezliği Tanı Kriterleri

2.2.1.1.1. RIFLE Kriterleri

RIFLE kriterleri renal disfonksiyonu mevcut bozukluk derecesine göre sınıflamaktadır; Üç şiddet derecesi; Risc (R=risk), Injury (I=hasarlanma), Failure (F=yetmezlik) ve iki sonuç sınıfı; Loss (L=böbrek fonksiyonlarının uzun süreli kaybı), End Stage Renal

Failure (E=son dönem böbrek yetmezliği) mevcuttur. Çalışmalarda, RIFLE sınıflamasının böbrek hasarının önlenebilir olduğu (R) dönemi için tanısal özellikte olduğu ve böbrek fonksiyonlarındaki erken değişiklikleri yüksek duyarlılıkta, böbrek fonksiyonlarının düzelmesini, renal replasman tedavisine gereksinimi, hastanede kalış süresini, hastane mortalitesini öngörebildiği gösterilmiştir [19, 20]. Tablo 1'de RIFLE sınıflamasını göstermektedir [16].

Tablo 1. RIFFLE sınıflandırması [21]

ABY Sınıflandırması	**sCr Artışına Göre**	**İdrar Çıkışına Göre**
Risk (R)	SCr x1,5 artış veya GFR'de >%25 azalma	< 0,5mL/kg/saat x6 saat
Hasar (İnjury)	SCr x2 veya GFR'de > %50 azalma	< 0,5mL/kg/saat x12 saat
Yetmezlik (Failure)	SCr x3 artış veya GFR'de > %75 azalma veya SCr >4mg/dL	< 0,3mL/kg/saat x24 saat ya da anüri x12 saat
Kayıp (Loss)	> 4 hafta tam renal fonksiyon kaybı	
Son Dönem (End Stage)	> 3 ay tam renal fonksiyon kaybı	

2.2.1.1.2. AKIN Kriterleri

Akut böbrek yetmezliği ile ilgili yapılan birçok çalışmada SCr (serum kreatinin) düzeyinde 0,3 mg/dL' lik artışın bile mortalitede belirgin bir artışa neden olduğu gösterilmiştir (8). Bu nedenle RIFLE sınıflandırma kriterlerine göre daha duyarlı bir tanımlama sistemi oluşturmak amacıyla daha sonraları AKIN tarafından yeni bir tanımlama sistemi geliştirilmiştir. Bu sınıflandırmaya göre hastalar 3 evreye ayrılmıştır ve RIFLE'da klinik sonuca göre düzenlenen kayıp ve son dönem sınıflandırmaları kaldırılmıştır. Bu sınıflandırmada hastaların bazal kreatinin düzeyleri yerine 48 saatlik

periyodlar içindeki SCr düzeylerindeki ani artış ya da idrar miktarındaki ani azalmalara göre evreleme yapılmaktadır. AKIN sınıflandırma kriterleri Tablo 2' de belirtilmiştir [17].

Tablo 2. Akut Böbrek Yetmezliği AKIN kriterleri.

ABY Sınıflandırması	**SCr Artışına göre**	**İdrar Çıkışına göre**
Evre 1	SCr'de >0,3mg/dL artış ya da % 150 <SCr <% 200	İdrar < 0,5mL/kg/st (6 saat)
Evre 2	% 200 <SCr <% 300 artış	İdrar <0,5mL/kg/st (12 saat)
Evre 3	% 300 <SCr artış ya da SCr > 4 mg/dl olması	İdrar < 0,3 mL/kg/st (24 saat)

2.2.1.1.3. KDIGO Kriterleri

Klinik uygulamalar, araştırmalar ve toplum sağlığı için tek basit bir tanımLama ile ABY tanısı koymak amacıyla RIFLE ve AKIN kriterleri temel alınarak 2012 Mart ayında KDIGO kriterleri yayınlaşmıştır. Burada yine bazal serum kreatinin düzeyi ve idrar çıkış miktarı kullanılmaktadır. AKIN kriterlerine benzer bir şekilde ABY 3 ayrı evreye ayrılmıştır (Tablo 3) [22].

Tablo 3. KDIGO ABY sınıflandırması

Evre	SCr değeri	İdrar çıkışı
Evre 1	SCr seviyesinde bazalden 1,5-1,9 kat artış ya da 6 ile 12 saat boyunca SCr seviyesinde ≥0,3 mg/dL	Saatte <0,5 mL/kg idrar çıkışı
Evre 2	SCr seviyesinde bazalden 2,0-2,9 kat artış olması	≥12 saat boyunca saatte <0,5 mL/kg idrar çıkışı
Evre 3	SCr seviyesinde bazalden 3 kat artış ya da SCr seviyesinin ≥ 4,0 mg/dL olması ya da RRT başlaması ya da < 18 yaş hastalarda 1,73m^2 başına GFR' de tahmini olarak < 35 mL/dk azalış	≥ 24 saat boyunca saatte < 0,3 mL/kg idrar çıkışı, ya da ≥12 saat boyunca anüri

2.2.2. Kronik Böbrek Hastalığı

Kronik böbrek hastalığı (KBH) yaygın olarak görülen ve yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen bir hastalıktır. KBH, glomerüler filtrasyon hızında azalma sonucu böbreğin sıvı-solüt dengesini ayarlama ve metabolik-endokrin fonksiyonlarında kronik ve ilerleyici bozulma hali olarak tanımlanabilir. KBH, böbrek yapısı ve fonksiyonlarının, nefronların çeşitli nedenlere bağlı olarak ilerleyici ve geri dönüşümsüz olarak uzun süreli harabiyetiyle sonuçlanan klinik bir tablodur [23].

KBH, dünyada ve ülkemizde epidemi halini almış önemli bir halk sağlığı sorunudur. Giderek artan sıklığı, yol açtığı yüksek morbidite ve mortalite oranları, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkilemesi ve tedavisi için gereken yüksek maliyet nedeniyle toplumsal yükü giderek artan bir hastalıktır [24-26]. Hastaların çoğu KBH'nin erken veya orta derecede evresinde asemptomatik iken, toplum içindeki gerçek insidansı ve prevalansının doğruluğundan emin olmak güçtür. Bu nedenle riskli grupların taranması için klinik muayene, biyokimyasal ölçümlere (serum kreatinini) veya idrar analizine (hematüri ve/veya proteinüri) başvurmak gerekir [27].

ABD Ulusal Böbrek Vakfı (NKF–K/DOQI), 2002 yılında KBH tanımı için 2 kriter belirlemiştir [28].

- GFR azalsın ya da azalmasın, 3 ay ve daha uzun süre devam eden böbreğin yapısal veya işlevsel bozukluğu sonucu kan ve idrar kompozisyonunda, görüntüleme testlerinde ve böbrek biyopsisinde izlenen anormallik,
- GFR'nin 3 ay ve daha uzun süre ile 60 mL/dk/1,73 m^2'den az olmasıdır.

KDIGO kılavuzlarına göre kronik böbrek hastalığı, en az 3 ay süre ile glomerüler filtrasyon hızının 60 mL/min/1,73m^2 nın altında olması ve böbrek fonksiyon ve hasarının gösterilmesidir. Bu hasarın göstergeleri; albüminüri (>30 mg/24saat), idrar sediment bozuklukları, elektrolit ve asit-baz bozuklukları, biyopsi ile saptanan histolojik bozukluklar, radyolojik olarak saptanan böbrek parankim hasarları ve renal transplant öyküsüdür. Tanıda laboratuvar testleri ve görüntüleme yöntemleri faydalı olabilir. Hiperfosfatemi, hipokalsemi, artmış paratiroid hormon (PTH) ve kemik alkalen fosfataz (ALP) düzeyleri metabolik kemik hastalığını ve böbrek yetmezliğindeki kronikleşmede bize yol gösterir. Normokrom normositer anemi, böbrek yetmezliğinin bir süre devam ettiğini ve böbreklerin ultrasonografik görüntülenmesinde bilateral böbrek boyutunun azalması ise bizi KBH'ne daha çok yakınlaştırır [1].

2.2.2.1.Kronik Böbrek Hastalığı Evreleri

NKF–K/DOQI 2002 tarafından KBH'nın 5 evreye ayrılarak incelenmesi önerilmiştir [28]. KBH evreleri Tablo 4'te gösterilmiştir.

Tablo 4. Kronik böbrek hastalığı evreleri.

	GFR (mL/dk/1,73 m^2)	Tanım
1	≥90	Normal ya da yüksek GFR'li böbrek hasarı
2	60-89	Hafif azalmış GFR'li böbrek hasarı
3	30-59	Orta azalmış GFR'li böbrek hasarı
4	15-29	Ağır azalmış GFR'li böbrek hasarı
5	<15 ve diyaliz	Kronik böbrek hastalığı

Böbrek yetersizliğinin evreleri birbiri içine girmiş olup kesin sınırlarla ayrılması mümkün değildir. Ancak, fonksiyonel değişiklik derecesine göre evreleme klinik ve tedavi

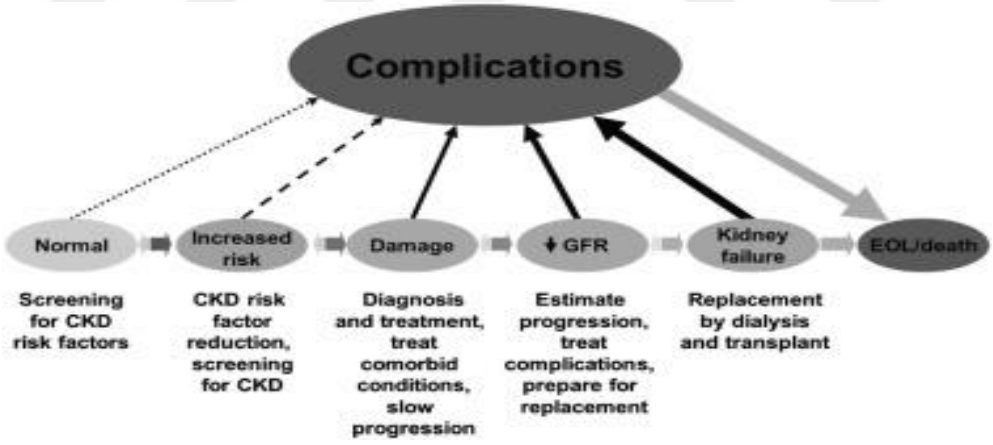
planlanması açısından faydalıdır. National Kidney Foundation/Kidney Disease Improving Global Outcomes (NKF/KDIGO) çalışmasının 2012 yılında yayınlanan raporuna göre KBH tanı kriterleri daha geliştirilmiş olarak verilmiştir (Tablo 5) [1].

Tablo 5. KBH tanı kriterleri

				Albuminiri katagorisi ; Tanımlaması ve Oranları		
				A1	**A2**	**A3**
				Normal ya da hafif seviye artış	Orta derecede artış	Ciddi oranda artış
				< 30 mg/g < 3 mg/mmol	30-300 mg/g 3-30 mg/mmol	> 300 mg/g > 30 mg/mmol
GFR (mL/min/1,73 m²)	**G1**	Normal	≥ 90			
	G2	Hafif seviyede azalış	60-89			
	G3a	Hafif-orta derecde azalış	45-59			
	G3b	Orta derecede azalış	30-44			
	G4	Ciddi oranda azalış	15-29			
	G5	Böbrek yetmezliği	< 15			
Yeşil: düşük risk; Sarı: Orta derece risk artışı; Turuncu: Yüksek risk; Kırmızı: çok yüksek risk						

KBH, tüm organ sistemlerinde patolojik hasara neden olabilen ve yaygın komplikasyonları olan değişken klinik tablolarla böbrek yapısını etkileyen heterojen hastalıklar için verilen genel bir terimdir [29]. Klinik açıdan KBH, asemptomatik böbrek fonksiyonu azalmasından üremik sendroma kadar uzanan bir spektrum gösterir. Canlılarda nefron çalışma kapasitesinde azalma olduğu zaman geri kalan nefronlarda bir adaptasyon mekanizması gelişir. Her evredeki klinik semptom ve biyokimyasal

anormallikleri, oluşturulan adaptasyonun derecesi belirler. Semptomlar ve bulgular böbrek yetersizliğinin derecesi ve gelişme hızı ile ilişkili olsa da genelde glomerüler filtrasyon hızı 35-50 mL/dk'nın altına inmedikçe semptom göstermeyebilir. Hastalarda noktüri ve anemiye bağlı halsizlik gibi genel semptomlarla kendini gösteren KBH, glomerüler filtrasyon hızı 20-25 mL/dakika gibi seviyelere düştüğünde en ciddi komplikasyonu olan böbrek yetmezliği sonucu yaygın olarak görülen üremi semptomları oluşur. Üremi; kronik böbrek yetersizliğinin neden olduğu tüm klinik ve biyokimyasal anormallikleri içeren bir terimdir ve birçok kaynakta kronik böbrek yetersizliği ile eş anlamda kullanılmaktadır. Glomerüler filtrasyon hızı 5-10 mL/dakika'ya düşmesi son dönem böbrek yetmezliğini işaret eder ve hastalar diyaliz, renal transplantasyon gibi renal replasman tedavilerine ihtiyaç duyarlar [30]. Şekil 4'te KBH gelişimi, ilerlemesi ve komplikasyonlarının devamı ve sonuçlarını iyileştirmek için stratejiler yer almaktadır. Daireler arasındaki yatay oklar KBH gelişimini, ilerlemesini ve remisyonunu gösterirken, sola dönük yatay ok başları, hastalığın remisyonun ilerleme durumundan daha az sıklıkta olduğunu gösterir [1].



Şekil 4. KBH' nin kavramsal modeli **[1].**

Bütün bu komplikasyonlar yüksek morbidite, mortalite ve maliyet ile ilişkilidir. KBH erken tespit edilirse, ilgili komplikasyonlar ve böbrek yetmezliğine ilerlemesi geciktirilebilir veya uygun müdahalelerle önlenebilir [31].

Kronik böbrek hastalığının hem tanısı, hem de tedavisinde geç kalınmaktadır. Erken evrelerde tanı konulması ile hem kronik böbrek hastalığına özgün genel önlemler, hem de altta yatan ya da eşlik eden hastalıklara yönelik tedavi yaklaşımları ile hastalığın ileri

evrelere doğru seyri yavaşlatılabilmektedir. Ancak bunun sağlanabilmesi için toplumda yaşam biçimi değişikliklerine yol açacak ve hastalığın tedavisinden çok önlenmesine dayalı, ulusal ölçekte uygulanacak bir hastalık yönetimi modeli geliştirilmelidir.

2.3.Böbrek ve Böbrek İşlevlerinin Değerlendirilmesi

Böbrekler, atık maddelerin uzaklaştırılması (üre, kreatinin, ürik asit vb); su, elektrolit, asit-baz dengesinin ayarlanması; kan basıncı, eritropoez ve kemik mineral metabolizmasının düzenlenmesini sağlayan hormonların salgılanması gibi çok sayıda yaşamsal fonksiyonun yürütülmesinden sorumludur. Böbrek patolojilerinde böbrek fonksiyonları bozulabilir ve tedavi yönteminin belirlenmesinde renal fonksiyonların doğru olarak değerlendirilmesi kritik bir öneme sahiptir. Her bir fonksiyonun kaybı ile ilişkili parametrelerin ölçümü böbrek hastalığının derecesi ile ilgili bir fikir verse de; filtrasyon fonksiyonunun değerlendirilmesi; böbrek fonksiyonundaki kaybın derecesi ile daha doğrusal bir ilişki ortaya koymaktadır.

Tarihsel süreçte, böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesi için ilk olarak kullanılan belirteç üre olmuştur. Nitrojen artıklarının esas formu olan ve neredeyse tamamen böbrekler ile atılan üre, protein ve aminoasit metabolizmasının bir ürünüdür. Böbreklerde işlev kayıplarında idrarda düştüğü ve kanda biriktiği gösterildikten sonra kan üre azotu (BUN) klinik kullanıma tanısal test olarak girmiştir [32]. Ancak BUN değerindeki değişimler, sadece böbrek ile ilişkili olmayıp aynı zamanda GFR ile ilgili değişimlerden bağımsız olarak kortikosteroid kullanımı, gastrointestinal sistem kanamaları gibi diğer metabolik durumlardan da köken alabildiği için böbrek fonksiyonlarının değerlendirilmesinde dikkatli olunmalıdır.

2.3.1. Glomerüler Filtrasyon Hızı

GFR, fonksiyonel olan her bir nefrona ait glomerüllerden birim zamanda süzülen plazma miktarının toplamıdır. Günde üretilen glomerüler filtrat miktarı yaklaşık 150-180 L'dir (125 mL/dakika X 1440 dakika) ama bunun % 99'undan fazlası reabsorbe edilir ve geri kalanı idrar olarak atılır [9]. Vücut yüzey alanı ve vücut kitle indeksi tarafından belirlenen böbrek büyüklüğündeki değişikliklere paralel olarak kişiden kişiye değişkenlik gösteren GFR; yaş, cinsiyet ve vücut kitlesi ile değişebilir, ayrıca hamilelik, ilaçlar, beslenme biçiminden de etkilenir. Sağlıklı bir insanda GFR'nin normal değeri 90-145

mL/dakika'dır. GFR'nin vücut kitlesi ile olan ilişkisi nedeni ile bu rakam, kadın ve erkek için ortalama vücut yüzey alanı olan 1,73 m^2'ye göre düzenlenmesi gerekmektedir. Kadın ve erkeklerde vücut yüzey alanına göre düzeltilmiş değerlere rağmen GFR kadınlarda % 8-10 oranında daha düşüktür ve bu nedenle cinsiyete özgü iki farklı referans değer belirlenmiştir. Normal GFR düzeyi 20-30 yaş aralığında erkeklerde 130 mL/dk/1,73 m^2 ve kadınlarda 120 mL/dk/1,73 m^2 civarındadır. GFR'nin önemli belirleyicilerinden birisi de yaştır ve 40 yaşından sonra her yıl GFR 1 mL/dakika azalır. Çocuklarda 2 yaşından sonra erişkinlere benzer GFR değerleri tespit edilmektedir [33].

Herhangi bir sebeple gelişen böbrek hasarında, nefron sayısı ve filtrasyon yüzeyinde azalmayla birlikte GFR'de de azalma beklenirken; diğer nefronlarda artan hidrostatik basınç GFR'nin aynı düzeyde kalmasına bazen de daha yüksek olmasına sebep olabilir. Bu nedenle aslında toplam GFR; her iki böbrekteki toplam fonksiyonel nefron miktarı hakkında kabaca bir fikir verebilirse de; hasarın boyutunu yeterince doğrusal olarak yansıtamaz [9]. GFR renal hasarın bir göstergesi olmakla birlikte, renal hastalık dışındaki faktörlerden de etkilenir. Bu faktörler; gebelik, renal perfüzyonda azalma, hücre dışı sıvı hacminde azalma, nonsteroidal antiinflamatuar ilaç kullanımı, akut protein yüklemesi, diyabet (DM), hipertansiyon ve antihipertansif ilaçlardır [33]. GFR'nın ölçümü; böbrek fonksiyonlarının tespitinde, böbrek yetmezliğinin derecesinin saptanmasında, ilaç dozunun ayarlanmasında, sistemik hastalıklarda böbrek tutulumunun değerlendirilmesinde, kronik diyaliz tedavisine başlangıç zamanı ve tedaviye yanıtın belirlenmesinde önemlidir.

GFR ölçümünde en sık kullanılan yöntemler genelde klirens ölçüm esasına dayanır [9]. Klirens, birim zamanda söz konusu maddeden temizlenen kan hacmi olarak tanımlanmaktadır. İdeal bir filtrasyon belirteci, glomerüllerden serbestçe filtre olup, tübüllerde reabsorbsiyon veya sekresyona uğramayan, toksik olmayan, böbrekte sentez veya metabolize olmayan ve ekskresyonu süresince değişmeden atılabilen bir madde olmalıdır. Böylelikle bu maddenin üriner klirensi, glomerüllerden filtre olan miktarına eşit olacaktır [34, 35]. İdeal bir belirteç ile yapılan ölçümde kreatinin klirensi, GFR'ye eşittir ve infüzyon hızından bağımsızdır.

2.3.2. Klirens Ölçümünde Kullanılan Belirteçler

GFR'yi tahmin etmede kullanılacak klirensin ölçümü için vücutta hâlihazırda var olan (endojen) veya dışarıdan verilen (ekzojen) maddeler kullanılabilir (Tablo 6).

2.3.2.1.Ekzojen Belirteçler

GFR'nin belirlenmesinde halen altın standart yöntem ekzojen filtrasyon belirteci inülin klirensi ölçümüdür [36, 37]. İnülin, 5000 dalton ağırlığında bir fruktoz polimeridir. Tanımlanan ideal belirteç özelliklerinin tümünü taşır; glomerüllerden serbestçe filtre olur, tübüllerde sekresyon ve reabsorbsiyona uğramaz, böbrek tarafından sentez veya metabolize edilmez. Dolayısıyla idrarla atılan inülinin ölçümü, glomerüllerden filtre edilen miktarına eşittir. Ancak, inülinin kısa ömürlü ve pahalı olması, intravenöz uygulanması, tayininin zor olması nedeniyle pratikte kullanışlı değildir [38]. İnüline ek olarak intravenöz enjeksiyonu takiben renal ultrafiltrata değişmeden geçen nükleer ilaç teknikleriyle de GFR tayini yapılabilmektedir. Bu amaçla en sık Cr–EDTA, Tc–DTPA, I^{125}–iothalamate ve Iohexol kullanılmaktadır [39, 40]. Ancak bu yöntemlerin de invazif ve pahalı olmaları, nükleer bir merkeze ihtiyaç duymalarından dolayı pratikte kullanımı zordur.

2.3.2.2.Endojen Belirteçler

Endojen belirteçler, vücut tarafından sentezlenirler ve sabit bir serum konsantrasyonuna sahiptirler. Filtrasyon belirteçlerinden idrarla atılanları için klirens hesaplanırken belirtecin kanda ölçülenleri için anlık durum konsantrasyonları kullanılır. Glomerüllerden serbestçe filtre edilip, tübüler sekresyon veya reabsorbsiyona uğrayabilmeleri nedeniyle idrar atılımları etkilenebilir. Bu nedenle akut böbrek hasarı gibi glomerüler filtrasyonun ve kan düzeyinin sabit olmadığı durumlarda çoklu kan örnekleri kullanılarak GFR hakkında bilgi sahibi olunabilir. Günümüzde en sık kullanılan belirteçler olarak kreatinin, üre veya üratın klirensi ya da direk plazma konsantrasyonu (kreatinin, üre, ürat, düşük molekül ağırlıklı proteinler) ölçülmektedir [35, 36, 41]. Kreatinin klirens ölçümü, plazma kreatinin ölçümüne göre daha doğru sonuç verir (40).

2.3.2.2.1. Üre Klirensi

Protein metabolizmasının esas yan ürünü olan üre, glomerüllerden serbestçe filtre edilir, tübülüslerden sekrete edilmez fakat büyük bir kısmı (% 40-70) renal tübüllerden pasif olarak reabsorbe olur. Dolayısıyla başta gerçek veya efektif volüm azalması olmak üzere proksimal sodyum ve su reabsorbsiyonu arttıran her türlü uyarı kan üre düzeyini arttıracaktır. Bu durum GFR ve serum kreatininde pek değişiklik olmadan üre konsantrasyonunun arttığı, dolayısıyla üre/kreatinin oranının yükselmesi ile tanısal olarak desteklenen böbrek perfüzyon defektinin göstergesidir [9]. Diyet, hepatik fonksiyon bozukluğu, kalp yetmezliği, enfeksiyon, malignite ve malnütrisyon durumlarında üretim hızı değişir. Böbrek fonksiyonlarının ileri derecede bozulduğu durumlarda üre klirensinin GFR'yi doğru yansıtma duyarlılığı artar. Son dönem böbrek yetmezliğinde (GFR<15 mL/dk) üre klirensi ve kreatinin klirensinin ortalaması GFR'nin daha iyi göstergesi olabilir [33].

Tablo 6. Glomerüler filtrasyon hızı belirteçleri [9].

Avantajlar		Dezavantajları
EKZOJEN		
İnulin	Altın standart	Zaman alıcı ve yapılmasaı zor. Analiz özgüllüğü zayıf. Ekstrarenal klirens; 0,83 mL/dk/10 kg
51 Cr-EDTA	İzotopik (basit ölçüm)	Zaman alıcı. 51 Cr teknesyumdan daha az bulunur.
131 I- İyodoasetat	İzotopik	Daha fazla zaman gerektirir.
131 I- Hippurat	İzotopik	%30 proteine bağlanır.
99 m Tc- DTPA	İzotopik	Daha fazla zaman gerektirir. Proteine bağlanır.
İyohekzol	İzotopik	Ekstrarenal klirens 0,87 mL/dk/10 kg
ENDOJEN		
Kreatinin	Ucuz, kolay	Duyarlılık ve özgüllüğü düşük.
Üre	Ucuz, kolay	Duyarlılık ve özgüllüğü düşük.
B2 Mikroglobulin	Salgılanmaz, geri emilir.	Üretim hızı böbrek dışı faktörlerden etkilenir.
Retinol Bağlayıcı Protein (RBP)	Salgılanmaz, geri emilir.	Üretim hızı böbrek dışı faktörlerden etkilenir. Serbest filtrasyonu B2 mikroglobulinden daha azdır.
a1- Mikroglobulin	Salgılanmaz, geri emilir.	Üretim hızı böbrek dışı faktörlerden etkilenir. Serbest filtrasyonu RBP' den daha azdır.
Sistatin C	Salgılanmaz, geri emilir.	İmmünolojik ölçüm gerektirir.

2.3.2.2.2. Kreatinin ve Kreatinin Klirensi

Kreatinin endojen olarak karaciğerde de sentezlenebildiği gibi, ekzojen olarak diyetle alınan hayvansal proteinlerden alınıp iskelet kasındaki fosfokreatinin metabolizması sonucu oluşturulabilir, bu nedenle vücuttaki üretimi kas kitlesi ile orantılıdır. Cinsiyet, ırk ve yaş gibi değişkenlerin yanı sıra kreatinin oluşum ve yıkım hızını etkileyecek egzersiz, kas hastalıkları gibi faktörler plazma kreatinin konsantrasyonunu ve idrarla atılımını da etkilemektedir [42].

Stabil durumda dolaşıma sabit miktarda geçen kreatinin proteinlere bağlanmaz. Molekül ağırlığı 113 dalton olan kreatinin, glomerüllerden serbestçe filtre edilir, tübüller

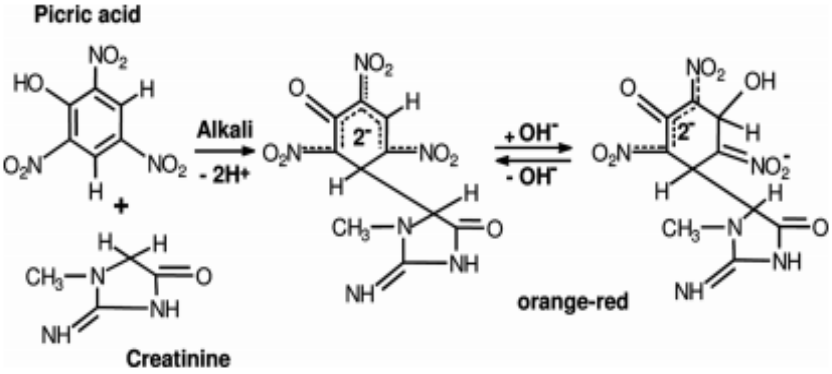
reabsorbsiyona uğramaz, ancak idrardaki kreatininin %10 ila 40 kadarı proksimal tübülden sekresyona uğrayabilir. Özellikle GFR'nin düşüp sekresyonun arttığı durumlarda kreatinin sekresyonu da artacağından GFR'nin yanlış olarak yüksek tahmin edilmesine ve klinik teşhisin gözden kaçırılmasına sebep olabilir [9].

Serum kreatinin, pratikliği ve maliyetinin düşüklüğü nedeniyle böbrek fonksiyonunun standart laboratuvar göstergesi olarak kullanılmaktadır. Ancak GFR'nin iyi bir göstergesi olduğunu söylemek zordur. Renal biyobelirteç olarak çok yaygın kullanılmasına rağmen hafif ve orta derecedeki böbrek hasarlarının saptanmasında sıklıkla yetersiz kalmaktadır. Serum kreatinin ile GFR arasında nonlineer bir ilişki vardır. Yani hastada hızla böbrek yetersizliği gelişip, GFR 100 mL/dak'dan 10 mL/dak seviyelerine inse de kreatininin plazmada birikimi için yeterli süre geçmediğinden serum kreatinin birinci günde hala normal sınırlarda kalabilmektedir. Ayrıca normal renal fonksiyonu olan bireylerde serum kreatinin düzeyinin 0,7 mg/dL'den 1,4 mg/dL'ye yükselmesi görünürde hafif bir artış olmasına rağmen GFR'de %50 gibi belirgin azalmaya (100mL/dk'dan 50 mL/dk'ya) karşılık gelmektedir. GFR ile serum kreatinin arasındaki ilişki kreatininin yapım hızına da bağlıdır [43].

Ağır egzersiz veya bir travma sonucu kreatinin seviyelerinde anlamlı bir renal bozukluk olmamasına rağmen artış söz konusu olabilir. Rabdomiyoliz, steroid kullanımı, et ağırlıklı diyet yapım artışına neden olurken, malnutrisyon ve kaşeksi nedeniyle oluşan kas kitlesindeki kayıplar ve siroz ise yapım azalmasına neden olmaktadır. Kreatinin seviyesi ayrıca diyetten de etkilenmektedir. Kreatin öncüsü arjinin ve glisinden fakir düşük proteinli diyet kreatinin yapımını kısıtlamaktadır. Bu nedenle kötü beslenen kişilerde serum kreatinin düzeylerinde anlamlı azalmalar izlenmektedir [44]. İleri hepatik hastalarda kreatin üretimindeki azalmaya bağlı olarak kreatinin düzeylerinde anlamlı düşmeler görülebilmektedir. Bunun sebebi ise karaciğerdeki kreatin sentezindeki azalma olarak bilinmektedir [45]. Ayrıca gebelerde ve erken dönem diyabetik nefropatisi olan hastalarda da glomerüler filtrasyon hızında azalma ve kan akımındaki artışlara bağlı olarak düşük düzeylerde serum kreatininle karşılaşılabilmektedir [46]. Kreatinin kas kitlesi ile dolayısıyla cinsiyet ile de ilişkilidir. Örnek olarak kadınlarda kas kitlesi daha az olduğu için kreatinin oranları da erkeklere kıyasla daha düşük seviyede görülmektedir. Ayrıca ileri yaşlarda da kas kitlesindeki azalmalar düşük kreatinin düzeylerine neden olabilmektedir. Kas kitlesindeki farklılık etnik yapıdan da etkilenebileceği için kreatinin

düzeylerinde de değişikliklere neden olabilmektedir. Afrika kökenli bireylerde kas yapısı daha gelişmiş olabileceğinden kreatinin düzeyleri de bu bireylerde normal değerlerden yüksek olabilmektedir [47]. Kreatinin vücutta tüm sıvılarda dağılmaktadır. Sıvı takviyesi amacıyla fazla miktarda sıvı replasmanı yapılan, özellikle yoğun bakım ünitelerinde yatan hastalarda kreatinin miktarında azalmalar izlenmektedir. Birçok ilaç (amilorid, spironolakton, triamteren, simetidin, aspirin, probenesid, trimetoprim vb.) kreatininin tübüler sekresyonunu arttıran ya da azaltan çeşitli etkilere yol açmaktadır [42].

Serum kreatinin düzeyini ölçmede kullanılan, bilinen en klasik yöntem alkali pikrat veya Jaffe yöntemidir. Bu yöntem kolorimetrik bir ölçüme dayandığından, örneğin diyabetik ketoasidozdaki asetoasetat gibi kromojenler varlığında analiz interfere olur. Sağlıklı bireylerde bile bundan dolayı hata payı yüksektir. Cefoxitin ve flucytosine gibi ilaçlar da benzer bir hataya sebep olur. Günümüzde bazı laboratuvarlarda kullanılan enzimatik yöntemler ile hata payı azaltılmaya çalışılsa da laboratuvarlar arası standardizasyonun sağlanabilmesi için kalibrasyon kalitesi öne çıkmaktadır. Aynı örneğe ait farklı sonuçların görülmesi yöntemin olduğu kadar kullanılan ticari kitten kaynaklanabileceği bildirilmiştir. Laboratuarlar arasındaki standardizasyonu sağlamak amacı ile kreatinin düzeyi bilinen donmuş serum örneklerinin isotope-dilution–mass spectrometry (IDMS) referanslı kontrolleri kullanılabilmektedir [9].



Şekil 5. Kreatinin fotometrik analizi için Jaffe reaksiyonu [47].

Kreatinin yapımını, atılımını ve serum kreatinin düzeyini etkileyen böbrek dışı faktörler de mevcuttur. Bu faktörler Tablo 7'de gösterilmiştir [48].

Tablo 7. Kreatinin yapımını, atılımını ve serum kreatinin düzeyini etkileyen böbrek dışı faktörler [1].

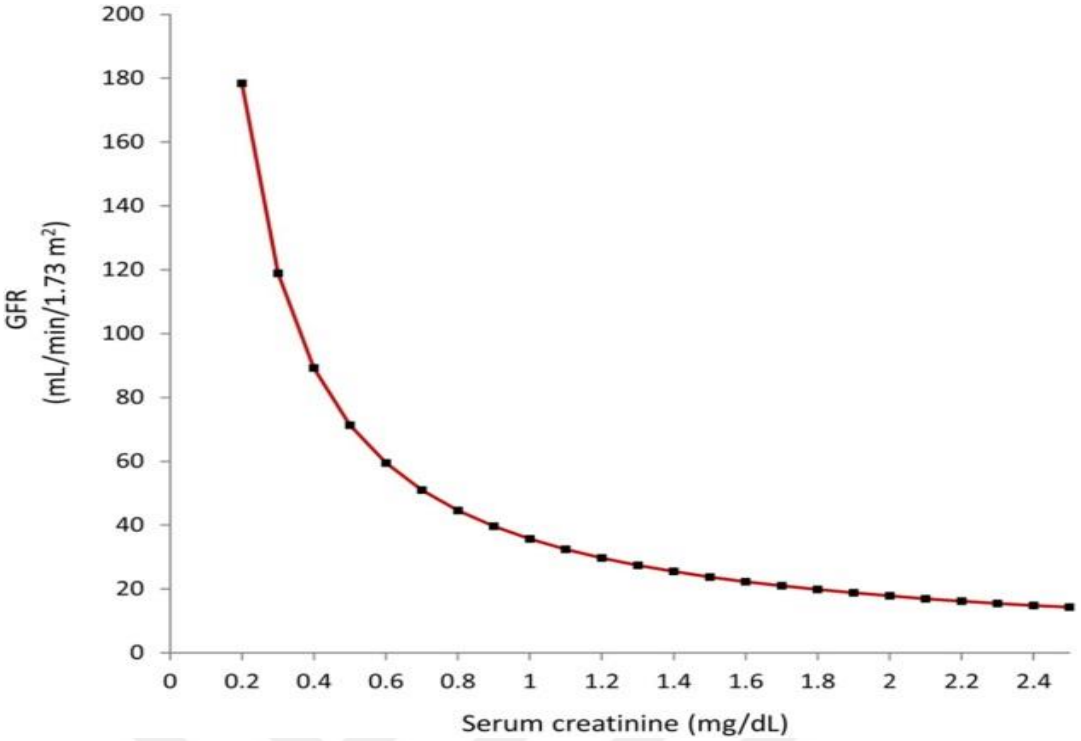
Kreatinin yapımını, atılımını ve serum kreatinin düzeyini etkileyen böbrek dışı faktörler		
Yapım artışı	**Yapım azalışı**	**Ölçüm yöntemindeki (Jaffe yöntemi) interferanslar**
Rabdomiyoliz	Kas kitlesi kaybı (malnutrisyon, kaşeksi)	Keton cisimleri
Sürekli ağır egzersiz	Karaciğer sirozu	Sefalosporinler
Anabolik steroid kullanımı	Tübüler sekresyonu azaltan ilaçlar	Flusitozin
Yemekte fazla et alımı	Simetidin	A-Metil dopa
	Trimetoprim	Levodopa
		Askorbik asit

Eğer GFR, kreatinin alımı, yapımı ve tübüler sekresyonu sabit ise, plazma kreatinin konsantrasyonu da sabittir. Bu durumda; kreatinin üretiminin atılımına eşit olduğu söylenebilir.

Yani; GFR x serum kreatinin = sabittir.

Eğer bu sabit duruma ek olarak kreatininin tübüler sekresyonunun da değişmediği varsayılırsa, kreatinin artışı aynı oranda GFR düşüşü anlamına gelecektir.

Bu örnekteki gibi GFR yarı yarıya azaldığında kreatinin 2 katına çıkacaktır. Ancak gerçekte böyle bir net matematiksel ilişki gözlenmez. Çünkü GFR düştükçe kreatininin hem tübüler sekresyonunda hem de intestinal atılımında belirgin değişiklikler olabileceği gösterilmiştir (Şekil 6) [9].



Şekil 6. Serum kreatinin ve GFR arasındaki ilişki [9].

Kreatinin Klirensi:

Kreatinin klirensi (CCr), klinikte GFR'nin ölçümünde en sık kullanılan yöntemdir. Kreatinin klirensi, daha önce analiz edilen idrar kreatinin düzeyi, SCr ve 24 saatlik idrar miktarının dakika idrar hacmine dönüştürülerek klirens formülüne uyarlanması ile bulunur.

24 saatlik idrar toplanarak hesaplanan kreatinin klirensi:

CCr (mL/dk) = İdrar kreatinin (mg/dL) × Günlük idrar hacmi (mL) / SCr x 1440

İdrar toplamak hastalar için zahmetli olduğu gibi, az veya fazla toplanmasına bağlı hatalar da oluşabilir. Kan kreatinin düzeyi ölçümünü ve kreatininin tübüler sekresyonunu etkileyen durumlar kreatinin klirensini etkiler. Kan kreatinin düzeyinin ölçümünü ve kreatinin tübüler sekresyonunu etkileyen durumlar kreatinin klirensini etkilerler. Diyabetik ketoasidoz, metanol veya isopropil alkol zehirlenmesinde vücutta biriken ketonlar ve birçok sefalosporin türevi ilaç Jaffe metoduyla ölçülen serum kreatinin düzeyinde yükselmelere neden olur. Simetidin, triamteren, spironolakton, amilorid, probenisid, trimetoprim gibi ilaçlar kreatininin tübüler sekresyonunu azaltarak serum kreatinini artırırlar ve kreatinin klirensini azaltırlar [34].

2.3.3. GFR Hesabında Kullanılan Formüller

2.3.3.1.Cockcroft ve Gault Formülü

GFR rutinde SCr ve bazı klinik değişkenler (cinsiyet, yaş, vücut ağırlığı, boy gibi) kullanılarak hesaplanabilir ve bu amaçla çeşitli formüller geliştirilmiştir. Bunlardan en yaygın kullanılanı Cockcroft ve Gault'un tanımlamış oldukları formüldür. Bu formülde hastanın yaşı ve yağsız vücut ağırlığı hesaba katılarak SCr ile birlikte tanımLanır. Pratik uygulamada böylece plazma kreatinin değerinden idrar ölçümü gerekmeden kreatinin klirensi aşağıda tanımlanmış olan formülle SCr (mg/dL)'den CCr (mL/dak) olarak hesaplanabilir.

Kreatinin Klirensi = (140 - Yaş) (kg) / (72 x Plazma kreatinin) (mg/dL)

Bu formülle bulunan değer kadınlarda %15 azaltılmalıdır (değer 0,85 ile çarpılır). Hepatik yetmezliği, ödemi, kas kitlesinde kayıp ya da obezitesi olan bireylerde doğru sonuçlar alınamaz. Bu formülün böbrek yetmezliği belirli bir sınıra kadar olan hastalarda kullanılması önerilir [35].

2.3.3.2.The Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) Formülü

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile GFR'nin belirlenmesinde Cockcroft-Gault eşitliğinden daha üstün bir eşitlik olarak böbrek hastalığında diyet modifikasyonu (MDRD) çalışmasından çıkarılan bu eşitlik (formül) bildirilmiştir.

Bu formülde SCr ve BUN yanı sıra albümin düzeyi, yaş, cinsiyet ve ırk göz önünde bulundurulur. Formülün avantaj ve üstünlükleri ise; boy, kilo ve renal etiyolojinin bilinmesinin ve idrar toplanmasının gerekmemesidir. Ayrıca etnik faktörün eşitlikte yer alması kronik renal hastalık prevalansının yüksek olduğu siyah ırkta bu farklılıklarından kaynaklı interferansının da dikkate alınması oldukça önemli bir avantajdır [18].

Dünyada 4 değişkenli ve 6 değişkenli olmak üzere 2 ayrı MDRD eşitliği kullanılmaktadır. Bu iki eşitlik olarak yaygın olarak kullanılan ise 4 değişkenli MDRD formülüdür:

4 değişkenli MDRD formülü:

$GFR_{MDRD} = 175 \times (S_{Cr})$ - 1,154 × (Yaş)-0,203 × 0,742 (kadınsa) × 1,212 (hasta siyahi ise)

6 değişkenli MDRD formülü:

GFR_{MDRD} = 170 × (S_{Cr}) -0,999 × (Yas)-0,176 × (BUN)-0,17 × (Albümin)0,318 × 0,762 (kadınsa) × 1,18 (hasta siyah ise)

2.3.3.3.Schwartz formülü

Çocuklarda GFR hesabında kullanılması önerilen bir formüldür.

Kreatinin klirensi = k x [boy/SCr (mg/dL)]

Bu formülde "k" sabiti,

- 2 yaşın altındaki çocuklar için 0,45,
- 2 ile 13 yaş arasındaki çocuklarda 0,55,
- 13 yaşın üzerindeki çocuk ve
- Ergenlik dönemindeki çocuklarda 0,7 (erkek), 0,55 (kız)

olarak belirlenmiştir [49].

Rutinde her ne kadar MDRD ve Cockcroft ve Gault formülleri yaygın olarak kullanılsa da obezite, yaygın ödem, akut ve hızlı gelişen böbrek yetmezliği, proteinden zengin veya fakir diyet gibi nedenlerle yanlış sonuçlar verebileceği unutulmamalıdır.

2.3.3.4.The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü

Ülkemizde de CKD-EPI formülünün kullanımı giderek yaygınlaşmaktadır. Yapılan çalışmalarda MDRD formülüne göre daha fazla doğruluğa sahip olduğu görülmüştür (38,39). CKD-EPI formülü tüm dünyada benimsenmiş olup, eGFR 90 mL/dk'ya kadar rapor edilebilmektedir. MDRD formülü ile sayısal olarak 60 olarak verilmesi gerektiği belirtilmektedir. Oysa CKD-EPI formülü ile >90 mL/dk/1.73 m^2 üzerindeki eGFR değerleri, sayısal olarak da verilebilir, >90 mL/dk/1.73 m^2 olarak da verilebilir. Bu laboratuvarın kendisinin belirleyeceği bir karardır. CKD-EPI ile >60 mL/dk eGFR değerleri güvenle verilebilmektedir. Bu yüzden serum kreatinini üzerinden otomatik olarak eGFR verilirken CKD-EPI formülünün kullanılması Sağlık Bakanlığı tarafından önerilmektedir.

CKD-EPI formülünde cinsiyete göre ve kadınlarda 0,7 mg/dL, erkeklerde 0,9 mg/dL sınırlarına göre dört farklı düzenleme yapılmış, siyahlar için ek bir faktör konulmuştur. Yaş da gene dikkate alınmaktadır [31].

Tablo 8. CKD- EPI hesaplama formülü.

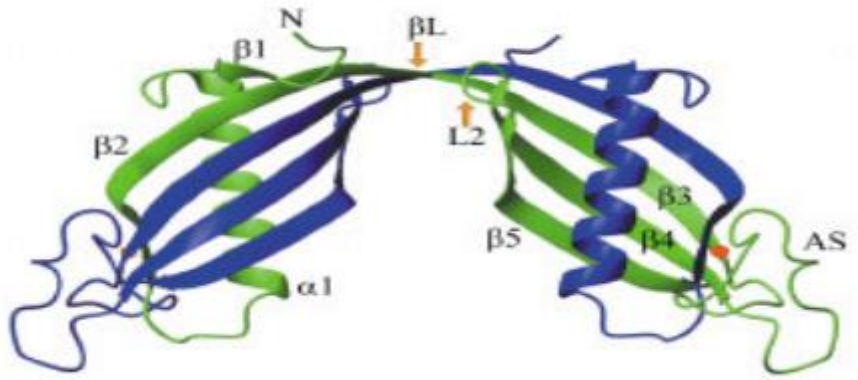
Kadın	≤0,7 mg/dL	144 x (SCr/0,7)-0,329 x 0,993Yaş [eğer siyahsa x 1,159]
	>0,7 mg/dL	144 x (SCr/0,7)-1,209 x 0,993Yaş [eğer siyahsa x 1,159]
Erkek	≤0,9 mg/dL	141 x (SCr/0,9)-0,411 x 0,993Yaş [eğer siyahsa x 1,159]
	>0,9 mg/dL	141 x (SCr/0,9)-1,209 x 0,993Yaş [eğer siyahsa x 1,159]

2.3.4. Düşük Molekül Ağırlıklı Proteinler

Günümüzde düşük molekül ağırlıklı proteinlerin (β2-mikroglobulin, Retinol Bağlayıcı Protein, Beta Trace Protein ve Sistatin C) glomerüler filtrasyon hızının tam ve doğru belirlenmesinde filtrasyon belirteci olarak, kreatinine üstünlüğü ve rutin kullanımları araştırılmaktadır. Normal glomerüler membrandan serbestçe filtre edilmeleri, renal tübüllerden reabsorbe olmamaları ve sekrete edilmemeleri nedeni ile GFR hesaplanmasında ideal endojen belirteçler olarak sistatin C ve beta trace protein (BTP) üzerine en yoğun çalışma yapılan proteinlerdir [50].

2.3.4.1.Sistatin C

Sistatin C, 122 aminoasit içeren, non-glikolize, 13 kDa ağırlığında, düşük molekül ağırlıklı bir protein olup, sistein proteaz inhibitörlerinden sistatin süper ailesinin bir üyesidir ve tüm çekirdekli hücreler tarafından sabit oranda üretilmektedir (Şekil 7). İnsan sistatin süper ailesi, başlıca 3 esas aileden oluşmuştur ve bilinen 12 protein içerir. Bu proteinler içinde özellikle sistatin C, lizozomal katepsinler gibi sistein proteazların en güçlü inhibitörüdür [51, 52].



Şekil 7. Sistatin C'nin dimerik formunun üç boyutlu görünümü [53].

Sistatin C tüm vücut sıvılarında yer alır ve 1-50 yaşları arasında serum düzeyi sabittir. Normal plazma konsantrasyonu 1,0 mg/L, aralığı ise 0,6- 2,5 mg/L'dir [54].

Serum sistatin C düzeyi, kreatinin aksine yaş, cinsiyet ve kas kitlesinden bağımsızdır. GFR ile iyi korele olduğunu belirten birçok çalışma yayınlanmıştır. Yapılan çalışmalarda, sistatin C'nin GFR'deki bir düşüşte kreatinin ile karşılaştırıldığında daha hızlı yükseldiği görülmüştür, bu da Akut Böbrek Hastalığı'nın daha erken saptanmasını sağlamaktadır [5, 55]. Özellikle serum kreatininin hatalı sonuçlar verebileceği durumlarda sistatin C ile eGFR hesabı daha tanısal olabilir. Sistatin C ile eGFR hesabında kreatinin temelli formüllerdeki gibi farklı formüller kullanımı söz konusudur (Tablo 9).

Sistatin C için yapılan çalışmalar ile eGFR hesabı için geliştirilen formüller Tablo 9' da verilmektedir.

Tablo 9. Serum sistatin C konsantrasyonuna göre eGFR hesaplama formülleri [1].

	SCysC	eGFR Formülü
Kadın - Erkek	≤0,8 mg/L	133 x (SCysC/0,8)-0,499 x 0,996Yaş [kadınsa x 0,932]
Kadın - Erkek	>0,8 mg/L	133 x (SCysC/0,8)-1,328 x 0,996Yaş [kadınsa x 0,932]

SCysC: Serum sistatin C konsantrasyonu (mg/L).

Sistatin C ile yapılan eGFR hesabı, Kronik Böbrek Hastalığı'nın sınıflandırılma, tanı ve takibi için kreatinin hesabı kullanılarak yapılan değerlendirmelerde klinik olarak daha

üstün ve doğrulayıcı niteliktedir [1]. Ancak, kreatinine göre çok daha pahalı ve ayrıca hala standardizasyon sorunlarının mevcut olması en önemli dezavantajlarıdır. Institute for Reference Materials and Measurements (IRMM) ve International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC) tarafından serum matriksli olan standart referans materyal üretilmiştir (ERM-DA471/IFCC Cystatin C in human serum, 5.48 mg/L). Buna rağmen ticari ürünlerde izlenebilirlik problemi hala yaşanmaktadır.

Yeni çalışmalar ile serum kreatinin ve sistatin C'nin kombinasyonu ile eGFR tahmininin, özellikle eGFR'nin 45-59 mL/dk/1,73 m^2 aralığında ayrı ayrı ölçülmesiyle elde edilen eGFR'den çok daha üstün olduğunu göstermektedir [8]. Serum kreatinin ve sistatin C değerlerinin kombinasyonu ile türetilen eGFR formülleri Tablo 10'da verilmektedir.

Tablo 10. Serum kreatinin ve sistatin C değerlerinin kombinasyou ile türetilen eGFR formülleri [1].

K	≤ 0,7 mg/dL (≤ 62 µmol/L)	≤0,8 mg/L	130 x $(SCr/0,7)^{-0,248}$ x $sCysC/0,8)^{-0,375}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
		>0,8 mg/L	130 x $(SCr/0,7)^{-0,248}$ x $sCysC/0,8)^{-0,711}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
	0,7 mg/dL (> 62 µmol/L)	≤0,8 mg/L	130 x $(SCr/0,7)^{-0,601}$ x $sCysC/0,8)^{-0,375}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
		>0,8 mg/L	130 x $(SCr/0,7)^{-0,601}$ x $sCysC/0,8)^{-0,711}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
E	≤ 0,9 mg/dL (≤ 80 µmol/L)	≤0,8 mg/L	135 x $(SCr/0,9)^{-0,207}$ x $sCysC/0,8)^{-0,375}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
		>0,8 mg/L	135 x $(SCr/0,9)^{-0,207}$ x $sCysC/0,8)^{-0,711}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
	> 0,9 mg/dL (≤ 80 µmol/L)	≤0,8 mg/L	135 x $(SCr/0,7)^{-0,601}$ x $sCysC/0,8)^{-0,375}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]
		>0,8 mg/L	135 x $(SCr/0,7)^{-0,601}$ x $sCysC/0,8)^{-0,711}$ x 0,995Yaş [siyahsa x 1,08]

K: Kadın, **E:** Erkek

Sistatin C tayini için plazma ya da serum dondurularak veya buzdolabında haftalarca muhtemelen aylarca saklanabilir. Bunun tersine serebro-spinal sıvı ve idrarda stabil değildir ve hızla parçalanır [56]. Sistatin C düzeyini ölçmekte kullanılan iki farklı lateks immun çalışma yöntemi vardır. Turbidimetri (PETIA=particle-enhanced immuno-turbidimetric assay) ve nefelometri (PENIA=particle-enhanced immuno-nephelometric assay) metodları daha önce kullanılan yöntemlere göre daha basit, hızlı ve güvenilirdir [51].

2.3.4.2.Beta Trace Protein (BTP)

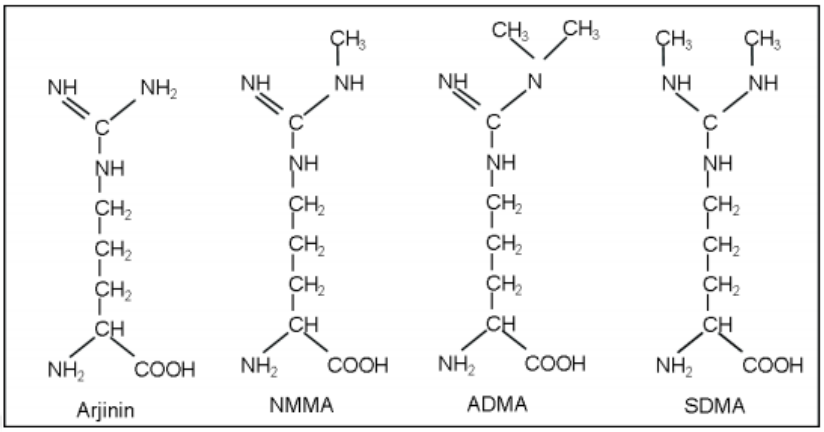
Glikoprotein grubunda yer alan, 168 aminoasitten oluşan ve diğer adı da prostoglandin D2 sentaz olan BTP, santral sinir sisteminde glial hücreler tarafından sabit bir hızda sentezlenmektedir ve GFR belirteci olarak araştırılan düşük molekül ağırlıklı proteinlerden biridir [57]. BTP; glomerüllerden serbestçe filtre edilir, proksimal tübüllerden reabsorbe edilir ve böbrek dışı eliminasyona minimal düzeyde uğrar [58]. Serum BTP seviyeleri progresif renal disfonksiyonu öngörmede ve GFR değeri hesaplamada kreatinin ve sistatin C'ye benzer özellikte olduğu gösterilmiştir. GFR değerini hesaplama için BTP'nin kullanıldığı eşitlikler oluşturulmuş. Ancak bunun için hala daha geniş popülasyonlarda yapılan çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. BTP'nin sistatin C'den en büyük avantajı ise kortikosteroid kullanımının serum BTP düzeylerini etkilememesidir [59, 60].

BTP'nin rutin kullanıma girebilmesi için gerekli standardizasyon ve harmonizasyon çalışmalarının yapılması gereklidir. Ayrıca referans laboratuvar değerlerinin oluşabilmesi ve laboratuvar içi-laboratuvarlar arası farklılıkların önlenebilmesi için de daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

2.3.4.3.Arjinin ve Metilasyon Ürünleri

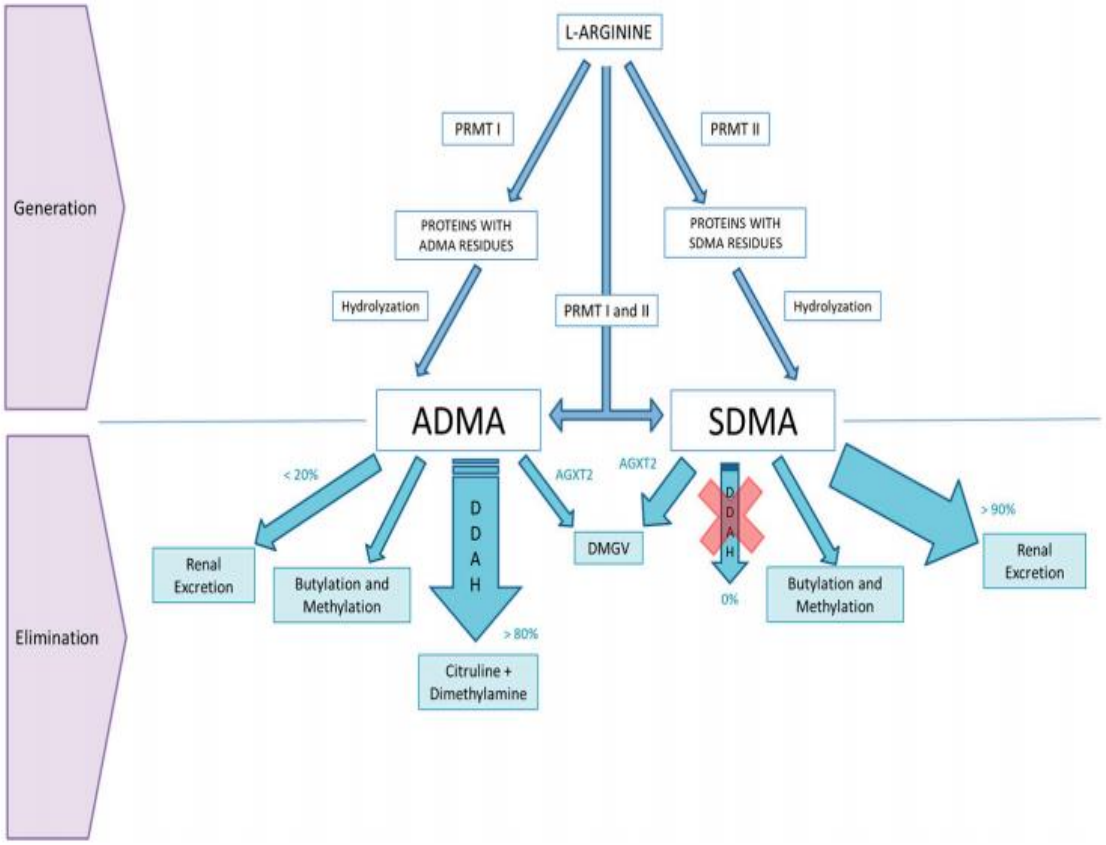
Arjinin, protein sentezine ve amonyak detoksifikasyonuna katılan esansiyel bir aminoasittir. Arjininin en önemli fizyolojik yollarından bir tanesi nitrik oksit (NO) oluşumunda nitrik oksit sentaz enziminin tek substratı olmasıdır. NO endotel bağımlı vazodilatasyon yanı sıra damar duvarındaki düz kas proliferasyonu, lümendeki hücre-hücre etkileşimleri, platelet adezyon ve agregasyon inhibisyonu ve monosit adezyon inhibisyonu gibi düzenleyici fonksiyonları da olan; vasküler dengenin sağlanmasında ve organ kan akımının devamında rol alan kilit bir moleküldür [61, 62].

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), N-monometil L-arjinin (l-NMMA) ve simetrik dimetil arjinin (SDMA) başlıca metil arjinin türevleridir. Metil arjininler proteinlerdeki arjinin rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyon ile metillenmesi sonucu oluşan türevlerdir.



Şekil 8. Arjinin ve metilasyon metabolitleri. [63]

Proteinlerdeki arjinin kalıntılarına metil gruplarının eklenmesini, protein arjinin metil transferaz (PRMT) enzimleri sağlar [64]. PRMT enziminin iki ana tipi vardır. Her ikisi de arjininin monometillenmesini sağlayabilir. Böylece NG-monometil-L-arjinin (NMMA) oluşur. Fakat ikinci bir metil grubu eklendiğinde oluşacak ürün, PRMT enziminin tipine bağımlıdır. Tip-1 PRMT enzimi, aynı guanidino azotunu dimetilleyerek NG,NG dimetil-L-arjinin (asimetrik dimetilarjinin = ADMA) oluşumunu katalizlerken, tip-2, her iki guanidino azotunu monometilleyerek NG,N'G-dimetil-L-arjinin (simetrik dimetilarjinin = SDMA) oluşumunu gerçekleştirir [65, 66]. Şekil 8'de arjinin ve endojen metilarjininlerin moleküler formülleri görülmektedir. Tip 1 PRMT en çok rastlanılan PRMT enzim tipidir ve kardiyovasküler sistemde kalp, düz kas hücreleri ve endotelyal hücrelerde bulunduğu gösterilmiştir [67]. Artan LDL ile birlikte artmış tip 1 PRMT ekspresyonu ile ADMA düzeylerinin LDL ile pozitif korelasyonu olduğu gözlemlenmiştir. Endotelyal hücre kültürlerinde LDL, okside LDL konsantrasyonu artışı PRMT gen ekspresyonu artışına neden olur. Bu etki ADMA oluşumundaki değişikliklerle koreledir (Şekil 9) [68].



Şekil 9. ADMA ve SDMA metabolizması [68].

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA), arjinin amino asitinin translasyon sonrası modifiye olmuş bir formudur. ADMA'nın biyokimyasal etkisi, nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini yarışmalı olarak inhibe etmesidir. "Endojen anti-aterojenik molekül" olarak da adlandırılan NO, anjiogenez sitimülasyonu, süperoksit radikallerinin salınışının engellenmesi gibi vasküler sistem üzerinde de etkileri vardır. ADMA, anti-aterojenik NO molekülünün sentezini selektif olarak inhibe ederek, vasküler sistemi koruyucu etkilerinden faydalanmasını engeller [69, 70].

Asimetrik dimetilarjinin (ADMA) seviyelerinin çeşitli hipertansiyon ve Kronik Böbrek Hastalığı (KBH) ile ilişkili çalışma modellerinde arttığı bildirilmektedir. ADMA'nın vasküler patofizyolojik mekanizmaları; son-organ yetmezliğine doğru ilerlemede rol oynayabilen endotel disfonksiyonunu ve vazokonstriksiyonu içerir [71]. ADMA'nın bir izomeri olan simetrik dimetilarjinin (SDMA), böbrekler tarafından metabolize edilmez.

Hem ADMA hem de SDMA'nın ortaya çıkan atılımı, normal GFR korunduğu zaman nispeten sabittir. Ancak, böbreğin GFR'ında yaşanan bir düşüşte SDMA'da ADMA'daki yükselişten daha büyük bir yükselme görülür [72, 73].

2.4.Yöntem Validasyonu

Geçerli kılma yani validasyon, metodun ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için metot parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik ve bir hata değerlendirme çalışmasıdır. Burada analitik hatalar belirlenir, tanımlanır ve değerlendirilir [74, 75]. Kapsamlı geçerli kılma, rutin kullanım öncesi metot performans kriterlerinden tümünün veya belirli bir kısmının incelenip, dökümante edilmesi anlamına gelir. Validasyon çalışması tek bir laboratuvar (internal validasyon) veya pek çok laboratuvarın katıldığı laboratuvarlar arası çalışma ile gerçekleştirilebilir. Kalite sisteminin yaygınlaşması laboratuvarlarda metot validasyonu çalışmaların yapılmasını zorunlu hale getirmiştir. Bu da çeşitli kalite sistemleri ile akredite olmuş laboratuvarların analiz yöntemlerinin validasyon çalışmalarını yapmış olmaları gerektirir.

Laboratuvarda yapılan ölçüm sonuçları; laboratuvar koşullarına, cihaz performanslarına, kullanılan kimyasal maddelerin analitik özelliklerine, standart, çalışan deneyimi gibi birçok faktöre bağlıdır. Bu nedenle metodun ölçüm sonucuna etki eden parametreleri tek tek analiz edilerek sonuca olan etkileri belirlenmeli ve değerlendirilmelidir [76]. Özellikle kimyasal analizlerde analiz metodunun uygulama performansını birçok faktörden etkilendiğinden, analiz edilen bileşenlerin cinsine ve miktarına bağlı olarak farklı metotlar kullanmak gerekebilmektedir. Metot seçiminde hangisinin kullanılacağı ise analiz edilen örnek cinsine, analiz edilecek bileşenlerin miktarına, günlük yapılacak analiz sayısına, istenen sonucun kalitesine, metodunun uygulama kolaylığına, analiz süresine, analiz maliyetine bağlı olarak yapılacak bir değerlendirme sonucunda belirlenmelidir [76].

Yöntem validasyon parametreleri:

2.4.1. Doğruluk (accuracy)

Doğruluk için sistematik hata (bias) hesabı yapılır. Sistematik hata ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark olarak tanımlanır [76]. Bias bir ölçüm metodunun gerçek sonucu verebilme kabiliyetini belirtir. Biasın hesaplanabilmesi için doğru olduğu kabul edilen

referans yani gerçek değer bilinmelidir. Referans değer sertifikalı referans materyallerden, valide edilmiş metodun ölçümü sonucu veya yeterlilik testleri sonucunda elde edilebilir. Bu üç yöntemde de ortak nokta gerçek değerin birçok laboratuvarda yapılmış ölçümlerin sonucunda elde edilmiş olmasıdır [75, 77].

Sistematik hatanın bir matriks ve bir seviyede hesaplanması tüm çalışma aralığında metodun aynı hata ile çalıştığı anlamına gelmemektedir. Bunun için değişik seviyelerde ve/veya değişik matrikslerle çalışma yapılmalıdır. Eğer metot farklı analistler tarafından kullanılıyorsa her biri için ayrı çalışma yapılmalıdır.

2.4.1.1.Sertifikalı referans materyal kullanarak gerçekliğin tespiti

Sertifikalı Referans Madde/Malzeme: Birimin doğru gerçekleştirilmesi için kullanılan ve izlenebilirliği sağlayan bir prosedür ile sertifikalandırılmış bir veya daha fazla özelliğinin değerleri ve bu değerlerin belirsizlikleri ile güvenilirlik seviyelerinin yer aldığı bir sertifika ile birlikte verilen madde veya malzeme.

Sistematik hata aşağıdaki eşitlikle hesaplanır [78].

Bias = $X_{bulunan} - X_{CRM}$

$X_{bulunan}$: Tekrarlanabilirlik veya tekrar üretilebilirlik koşulları altında yapılan ölçümlerin ortalaması

X_{CRM}: Sertifikalı referans materyalin sertifika değeri Sertifika değerine göre hesaplanan sistematik hatanın gerçek değerle arasında önemli bir farkını bulunup bulunmadığı t – testi yapılarak kontrol edilebilir.

S: Standart Sapma, n: örnek sayısı

$$t = \frac{(Xcrm - Xbulunan)\sqrt{n}}{s}$$

2.4.1.2. Geri elde (Recovery):

Metodun gerçekliğinin başka bir ifadesi de geri kazanım oranıdır. Geri kazanım oranı aşağıdaki şekillerde hesaplanır:

Sertifikalı Referans Madde Kullanılarak Bulunması

Geri kazanım testi için analiz edilen madde ile aynı veya benzer matrikste sertifikalı referans madde analiz edilerek bulunan sonuçtan geri kazanım oranı hesaplanır [78]:

$$\%Rm = \frac{Cobs}{\text{Ccrm}} x100$$

C_{obs}: Bulunan değer

C_{CRM}: Referansın değeri

% R_m: % Geri Kazanım Oran

2.4.2. Tekrarlanabilirlik (Precision)

Tekrarlanabilirlik, bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösteren ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının bir ifadesidir. Bir yöntemde aynı örneğin ardarda çalışılmasıyla metodun aynı sonucu verebilme gücüdür ve yöntemin kesinliğinin göstergesidir. Kesinlik doğruluğun gerçeklik dışındaki diğer bir bileşeni olup rastgele hataların dağılımını gösterir. Ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını belirlemek için yapılır. Bağımsız analiz sonuçları arasındaki tutarlılığı gösterir. Laboratuvardaki tekrarlanabilirlik koşullarında bir seri ölçüm yapılarak hesaplanır. Kesinlik ölçümünü 4 faktör etkilemektedir. Bunlar zaman (kısa ve uzun zaman aralığı), kalibrasyon, kullanıcı (aynı veya değişik kullanıcılar) ve ekipman (ölçümlerde aynı veya farklı ekipmanların kullanılıp kullanılmadığı) olup bunların değişkenliğine göre kesinlik de değişmektedir [79].

2.4.3. Doğrusallık (Linearite):

X eksenine beklenen değerler, Y eksenine ise elde edilen değerler girilerek kalibrasyon grafiği çizilir ve ortaya çıkan çizgi doğru ise yöntem lineerdir. Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnekle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “lineer regresyon formülü”

ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu Şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır.

2.4.4. Ölçüm Aralığı ve Lineer Aralık (Lineerlik/Doğrusallık)

Ölçüm aralığı metodun uygulama aralığını belirleyen, uygulama kapsamında belirtilen aralığıdır. Kalibrasyon eğrisinde (standart eğri) ölçülen analitin miktarı (konsantrasyonu) ve dedektör yanıtının (response) doğru orantılı olarak görüldüğü aralıktır. Metot validasyon çalışmaları kapsamında çalışılan parametreler, bu aralık göz önünde bulundurularak planlanır.

Standart eğri, metoda ve ürüne bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnekle veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve “lineer regresyon formülü” ile “korelasyon katsayısı” belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusal olup olmadığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı >0,99 olmalıdır.

Lineerlik; yöntemin hiç düzeltme yapılmadan örnekteki analit konsantrasyonu ile doğru orantılı sonuçlar verme yeteneğidir [75]. Lineer aralık ise kalibrasyon işleminin lineer bir doğru olarak elde edildiği konsantrasyon değerlerindeki aralıktır. Lineer aralık, metodun ölçüm aralığından daha dar olabilir ve genellikle daha dar aralıktır.

2.4.5. Gözlenebilirlik ve Belirlenebilirlik Sınırları (Tespit ve Tayin Limitleri) (LOD/LOQ):

Laboratuvarlarda çok düşük konsantrasyonlarda yapılan çalışmalarda sinyalin, kör numuneden ayrımının yapılması ve uygun bir kesinlikle kantitatif sonuçların elde edilmesi gerekir. Analiz sonucunda elde edilen değerin sıfırın üstünde olduğu durumlarda iki olasılık vardır. Birincisi, örnek aranan analiti içermiyor ve elde edilen sonuçlar körün dağılım aralığındadır. Bu durumda yani örneğin gerçekten analiti içermediği durumda, yanlış pozitif karar verilebilir ve α-hata şekillenir. İkincisi ise, örnek aranan analiti içeriyor ve analiz tekrarları ortalamanın elde edilmesini sağlar. Bu durumda ise analitik sonucun tespit edildiği halde örneğin gerçekte içermediği durumlarda yanlış negatif sonuç elde edilebilir ve β-hata şekillenir [78]. Bu nedenle laboratuvarların kullandıkları yöntemler için tespit limiti (limit of detection; LOD), tayin limiti (limit of quantification;

LOQ) ve bunların yanı sıra limit of blank (LOB) parametrelerini de değerlendirilmesi gerekir.

2.4.5.1.Gözlenebilirlik Sınırı (Tespit Limiti)(LOD):

Gözlenebilirlik Sınırı, miktarı kesin olarak belirlenemeyen ölçülebilen en düşük madde miktarıdır. Esas olan her bir laboratuvar için kendi yöntemlerinde tanımlanan şekilde sınır değerlerin belirlenmesidir [79].

2.4.5.2.Belirlenebilirlik sınırı (Tayin Limiti)(LOQ):

Belirlenebilirlik sınırı (Tayin Limiti) kabul edilebilir doğrulukta ve tekrarlanabilirlikte ölçülebilen en düşük derişimdir.

Kromatografik metotlarda LOD ve LOQ belirleme için azalan konsantrasyonda örnek hazırlanarak elde edilen kromatogram pik yüksekliği (S) ve gürültü (N) ölçülerek S/N oranı hesaplanabilir. LOD için S/N oranını üç katı alınarak, LOQ için ise S/N oranının 10 katı alınarak hesaplanabilir [79].

2.4.6. Yöntem Karşılaştırma

Karşılaştırma çalışmalarında hazırlanan örnekler iki yöntemde de ortam koşullarına bağlı değişkenlerinin sabitlendiği aynı zamanda çalışılır ve sonuçlar karşılaştırılır. Bunun için rapor aralığı içinde sayının daha da yüksek tutulabileceği en az 40 örnek olmak koşulu ile hem test yöntemi, hem de karşılaştırma yöntemleri ile çalışılır [76].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1.Materyaller

3.1.1. Cihazlar

- LC-MSMS (AB SCIEX Tripple Quad^{TM} 3500 Instrument, API 3500), ABD.
- Himac Ependorf Santrifüj (Hettich), Almanya.
- Otomatik pipet [Scorex (İsviçre), Nichipet (Japonya)]
- Vortex (Scilogex MX-S), ABD.
- Distile Su cihazı (Elga/Purelab Optionq-DV25), UK.
- Siemens Advia 1800 (Siemens Healtineers), ABD.
- Santrifüj (Beckman Coulter AllegraTM X-2212), ABD.
- HPLC kolonu (Restek Allure PFPP, 5 µ, 50 mm x 2,1 mm), ABD.
- Hassas Terazi (Schimadzu ATX 224), Japonya.

3.1.2. Kimyasallar

- Bovin Serum Albumin (BSA), Sigma-Aldrich, (CAS No. A9418-10G) (Lot. No.108K12772), ABD.
- Acetonitrile(C2H3N) Sigma-Aldrich (Lot No: 34851), ABD.
- Ammonium acetate Sigma-Aldrich (Lot No: 73594), ABD.
- Formik Asit (HCOOH) Sigma-Aldrich, (Lot No. 33015), ABD.
- Metanol, İsolab-2,5L-R (lot: 9.470.472.500), Almanya.
- 1-Butanol, Merck-2,5L-R (lot: M100988), ABD.
- Asetil Klorid, Sigma-Aldrich (Lot No: 3481), ABD.
- Amonyum asetat, Sigma-Aldrich (Lot No: 73594-25G-F), ABD.
- NG,NG-dimethyl-L-Arginine Dihydrochloride, Cayman (Lot No: 80230), ABD.
- NG,NG′-Dimethyl-L-arginine, Dihydrochloride, Sigma-Aldrich, (Lot No. 311204-25MG N), ABD.
- Asymmetrıc Dımethylargınıne, (2,3,3,4,4,5,5-D7, 98%) 5 mg, Cambiridge Isotype (Lot No: DLM-7476-5), ABD.
- Kreatinin, Sigma-Aldrich –Lot no. C4255, ABD.
- Kreatinin Standard, Sigma-Aldrich – NIST967A, ABD.

- Kreatinin internal standart, Sigma-Aldrich. Lot: C-165, ABD.

3.1.3. Ticari Kitler

- ADVIA® Chemistry Creatinine Concentrated (CRE_2c), REF 06860515, Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.,Almanya.
- Roche, Kreatinin, ABD.
- Dimension Vista Enzymatic Creatinine (ECREA), Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Almanya.
- Siemens N Latex Cystatin C Assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Inc. Almanya.
- Siemens N Latex BTP assay, Siemens Healthcare Diagnostics, Inc.Almanya.

3.1.4. Sarf Malzameleri

- Vial-vida kapak - N8 - 1,5 mL - 11,6 x 32 mm – amber, İSOLAB. (Lot: 095.00.002), ABD.
- 15 mL Centrifuge Tubes DNase, RNase and pyrogen free, Nest Scientific. (Lot: 601002), ABD.
- Pipet Ucu (İsolab), Almanya.

3.2. Örnek Toplama

Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran ve Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'na kreatinin testi istemi için örneği ulaşmış hastalardan elde edilen testleri sonuçlanmış ve saklama süresi bitmiş olan atık serum örnekleri, kreatinin seviyeleri dikkate alınarak 3 farklı seviyede (düşük, orta, yüksek) konsantrasyona sahip olacak şekilde gruplara ayrıldı. Ayrılmış numuneler çalışma gününe kadar -80 ^{0}C' de muhafaza edildi. Çalışma günü örnekler uygun koşullarda çözdürülüp ilgili testler çalışıldı.

3.3. Yöntemler

3.3.1. Jaffe Yöntemi

Çalışmaya dahil edilen örneklerin kreatinin testi istemleri, Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı'nda Roche Cobas 8000 cihazında pikrik asit ve potasyum hidroksit reaktiflerini içerin ticari kit kullanılarak rutin klinik laboratuvar koşullarında iç kalite kontrol ve dış kalite kontrol sonuçları açısından uygun olarak çalışıldı ve sonuçlandırıldı.

Siemens Advia 1800 kimyasal analiz cihazında kullanılan reaktifler kullanıma hazır halde teslim alındı. Kitin belirtilen son kullanım tarihi dikkate alınarak testin çalışılacağı güne kadar ışıktan korunmuş ve açılmamış olarak -80°C'de saklandı.

Alkali ortamda pikrik asit ve kreatinin arasında kompleks oluşumuna ve oluşan kompleksin 505/571 nm dalga boyunda ölçümüne dayanan ölçüm prensibi ile çalışan original kitiyle Siemens Advia 1800 cihazında ölçüldü.

3.3.2. Enzimatik Jaffe Yöntemi

Siemens Advia 1800 kimyasal analiz cihazında kullanılan reaktifler temin edilip kullanıma hazır halde temin alındı. Enzimatik kreatinin kitinin belirtilen son kullanım tarihi dikkate alınarak testin çalışılacağı güne kadar ışıktan korundu ve açılmamış olarak 2-8°C'de saklandı.

Yöntemin prosedüründe 3-[[tris(hydroxymethyl)methyl]amino]propanesulfonic acid (TAPS) tamponlu birleştirilmiş enzim reaksiyonunda ilk basamakta, kreatinin kreatininaz enzimi ile kreatin'e katalize olmaktadır. İkinci basamakta, kreatin kreatinaz enzimi ile sarkozine dönüşür. Oluşan sarkozin üçüncü basamakta sarkozin oksidaz enzimin katalizlediği reaksiyon ile glisin ve hidrojen peroksit oluşmaktadır. Peroksidaz eşliğinde ortamda bulunan hidrojen peroksit HTIB (2.4.6-triiodo-3-hydroxybenzoic acid) ve 4-Aminofenozon ile kromojen oluşturan bir komplekse dönüşte ve bu kromojenite son nokta tekniğine göre 540/700 nm dalga boylarında cihazda okunmaktadır.

3.3.3. Beta Trace Protein

BTP test prensibinde insan BTP'sine karşı yönlendirilen antikorlarla kaplı polistiren partiküller, BTP içeren örneklerle karıştırıldığında agregatlar oluşturmaktadır. Bu agregatlar, örnekten geçirilen bir ışık hüzmesini yaymaktadır. Saçılan bu ışığın şiddeti, örnekteki BTP konsantrasyonuyla orantılıdır. Sonuç, bilinen konsantrasyon standardıyla karşılaştırmalı olarak değerlendirilmektedir.

3.3.4. Sistatin C

Sistatin C test prensibinde, insan sistatin C'sine karşı spesifik antikorlarla kaplı polistiren partikülleri, insan sistatin C'si içeren örneklerle karıştırıldığında agrege olmaktadır. Bu agregatlar, örnekten geçirilen bir ışık demetinin dağılmasına yol açmaktadır. Dağılan ışığın şiddeti, örnekteki ilgili proteinin konsantrasyonuyla orantılıdır. Sonuç, konsantrasyonu bilinen bir standart ile karşılaştırma yapılarak değerlendirilmektedir.

3.3.5. ADMA/SDMA Ölçüm Yöntemi

ADMA ve SDMA ölçümlerinde Di Gangi ve ark.'nın [63] yaptıkları ölçüm referans alınmıştır. ADMA ve SDMA düzeyleri gradient pompa kullanılarak analiz edildi. Gradient mobil fazları olarak Mobil faz A ve B hazırlandı. Mobil Faz A, 1 L HPLC grade su içerisinden 1 mL çekilip atıldı, üzerine 1 mL formik asit ilave edilerek hazırlandı. Mobil Faz B ise 1 litre metanol içerisinden 1 mL çekilip atıldı, üzerine 1 mL formik asit ilave edilerek mobil faz B hazırlandı. Mobil fazların analiz öncesi degaze işlemi ultrasonik degazer ile gerçekleştrildi.

Türevlendirici reaktifi hazırlamak için bir cam beher veya erlene 19 mL bütanol konuldu. Üzerine 1 mL asetilklorid eklenerek türevleştirici reaktif hazırlandı. Çözdürücü Reaktif ise 18 mL HPLC grade distile su alınarak bir cam beher veya erlene konuldu. Üzerine 2 mL metanol eklendi. Bu karışımdan 20 µL çekilip atıldı. Üzerine 20 µL formik asit eklenerek çözdürücü reaktif hazırlandı

200 µL standart ve serum örneklerinin üzerine 100 µL metanol içerisinde çözülmüş internal standart (d7-ADMA) eklendi ve sonrasında 13.000 rpm'de 10 dakika santrifüj ile çöken proteinler uzaklaştırıldı. Süpernatant temiz bir tüpe toplanıp 60 ^{0}C'de azot gazı altında uçuruldu. Türevleştirme işlemi için taze hazırlanmış solüsyonu eklenip 60 ^{0}C'de

20 dakika sıcakta bekletildi. Tekrar 60 ^{0}C'de solvent uçuruldu ve çözdürücü eklendi. Analitik kolona 40 µL enjeksiyon yapıldı. Serum ADMA ve SDMA düzeyleri Shimadzu LC-20AD (Japonya) yüksek performanslı sıvı kromatografisi ile eşlenmiş Applied Biosystems MD Sciex (ABD) API 3500 marka kütle spektrometre (LC-MS/MS) cihazında elektrosprey iyonizasyon (ESI) tekniği kullanılarak pozitif mod ile ölçüldü.

3.3.6. Kreatinin LC-MSMS Yöntemi

3.3.6.1.Numune Hazırlama Protokolü

Numune hazırlama protokolü için farklı kimyasal ajanlar farklı oranlarda çalışılarak optimizasyon çalışmaları yapıldı. Bunun için metanol, acetonitril, bütanol ve etanol ile çöktürme denemeleri farklı oranlarda denendi ve en uygun numune ön işlem yöntemi belirlendi.

Standart ve numunelerden 50 µL ependorfa alınıp, üzerine 20 µL internal standart (kreatinin –d_3) ve 200 µL metanol ilave edildi. 10 sn vorteks sonrası 15.000 rpm'de 5 dk santrifüj edildi. Süpernatanttan 150 µL alınarak viallere aktarıldı. Daha sonra numuneler çalışmak için cihaza yüklendi.

3.3.6.2.Çözelti Hazırlama Protokolü

BSA Hazırlanması

Bovin Serum Albumin-Standart Buffer (BSA-PBS), 0,1 M PBS, % 1 BSA, % 0,9 NaCl, çözelti 1,134 g Na_2HPO_4, 0,302 g NaH_2PO_4 $2H_2O$, 0,9 g NaCl, 1 g sığır serum albumin 100 mL HPLC grade suda çözdürüldü. pH ise NaOH ve HCl kullanılarak 7,4 olarak ayarlandı.

Kreatinin Standartı Hazırlanması

Ana Stok çözeltisinin hazırlanışı; Sigma-Aldrich markalı liyofilize haldeki 100 mg kreatinin standardı 50 mL suda çözdürerek 200 mg/dL'lik kreatinin standart çözeltisi hazırlandı. Ana stok çözeltisinden 1/10 dilusyon ile 20 mg/dL kreatinin çözeltisi hazırlandı. Bu stok çözeltisinden ise kalibrasyon eğrisi için ara stok solüsyonları %20 metanol çözeltisi ile hazırlandı.

Kreatinin-d_3 İnternal Standart Hazırlanması

İnternal standart solüsyonu satın alınan ticari solüsyondan 2 ayrı stok hazırlayarak elde edildi.

Stok 1 çözeltinin hazırlanışı; 100 mg kreatinin internal standart (Sigma-Aldrich Lot: C-165, ABD) 1 mL % 20 metanol/su ile çözülerek 10.000 ng/mL'lik 1 mL kreatinin internal standart çözeltisi hazırlandı.

Stok 2 çözeltinin hazırlanışı; 10 mL'lik balon jojeye 500 µL stok 1 çözeltisinden alınıp üzeri 500 µL %20 metanol/su ile tamamlanarak 1000 µL'lik 5000 ng/mL çözeltisi hazırlandı.

Mobil Faz Hazırlanışı

Mobil Faz A, 500 mL HPLC grade su ve 500 µL formik asit ilave edilerek % 0,1'lik formik asit içeren mobil faz hazırlanmıştır. Mobil Faz B ise 500 mL metanol içermektedir. Mobil fazlarda kullanılan gradiyent akış oranı ise % 50 mobil faz A ve % 50 mobil faz B şeklinde uygulandı.

3.3.6.3.LC-MSMS Parametreleri

LC-MSMS parametreleri için optimizasyon çalışmaları cihazın LC ve MS/MS koşulları ayrı ayrı incelenerek gerçekleştirildi.

MS/MS Parametreleri; kreatinin saf standart çözeltisi hazırlandı ve Q1 ve Q3 iyonları AB Sciex API 3500 tandem mass spektrometre cihazında Automatic Tuning algoritması kullanılarak elde edilen veriler ve yapılan literatür taramaları ile karşılaştırılarak belirlendi.

Kreatinin ve internal standart olarak kullanılan izotop işaretli kreatinin (d_3-kreatinin) için en yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları sırasıyla 114,1/44 ve 117,1/47 olarak belirlendi.

İyonizasyon için yapılan Ionspray voltaj (IS) denemelerinde elde edilen litaratür verilerinden yola çıkılarak 3500, 4000, 4500, 5000, 5500 voltaj ile denemeler yapılmış ve en yüksek intensite 5500 voltajda elde edilmiştir. Sıcaklık denemeleri de aynı şekilde

araştırılıp 350 ^{0}C, 400 ^{0}C, 450 ^{0}C, 500 ^{0}C, 550 ^{0}C ve 600 ^{0}C ile yapılan denemeler ile en yüksek intensite 550 ^{0}C'de bulunmuştur.

LC Parametreleri; kromatografik ayrımın gerçekleştiği LC paramatreleri çalışmasında mobil faz, mobil faz akış hızı/gradiyanti, kolon seçimi ve sıcaklık gibi parametrelerin optimizasyonu için analizler yapıldı.

Uygun mobil fazı bulabilmek için acetoniril, metanol, formik asit ve amonyum asetat çözeltileri ve bunların farklı oranlardaki karışımları kullanılarak en uygun intensiteyi mobil faz % 0,1 formik asit ve metanol ile hazırlanan gradiyent akış ile yapılan çalışmada elde ettik.

Total akış hızı için, 0,3-0,4-0,5-0,6 ve 0,7 mL/dk ile denemeler yapıldı. En yüksek intensite 0,3 mL/dk'da bulundu. Piklerin çıkış süreleri kreatinin için 1. dakika olarak belirlendi.

LC-MSMS optimizasyonu sonucu en iyi piklere ve en yüksek intensiteye sahip parametreler Tablo 11 'de verilmiştir.

Tablo 11. Kreatinin ölçümü LC-MSMS parametreleri

İyonizasyon Modu	Elektro Sprey İyonizasyon
Declustering Potential (DP)	50
Entrance Potential [80]	4
Creatinin Q1 Mass (Da)	114,1
Creatinin Q3 Mass (Da)	44,0
Creatinin – D3 internal standart Q1 Mass	117,1
Creatinin– D3 internal standart Q3 Mass	47
Collision Energy. (CE)	17
Collision Cell Exit Potential. (CXP)	8
Curtain Gas	20
Collision Gas (CAD) .	6
Ionspray Voltage (IS) .	5500 V
Temperature (TEM) .	550 ºC
Ion Source Gas1 (GS1) .	40
Ion Source Gas2 (GS2) .	60
Interface .Heater	On
Ionisation Source	Turbo Sprey
Collision Gas	N2 (Azot)
Dwell Time	250 milisaniye
Pompa Modu	Gradient Flow
Total Akış	0,3 mL/dk
Enjeksiyon volume	3 µL
Analiz süresi	5 dk
Kolon	RESTEK LC Column Allure PFPP 5 µm 50 x 2,2 mm

3.3.7. LC-MSMS Yöntem Validasyon Parametreleri

3.3.7.1.Doğrusallık (Linearite)

Yöntem validasyonu kapsamında gerçekleştirilmiş olan linearite çalışması CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) EP6-A protokolüne uygun olarak yapıldı. Bu çalışma ile kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemek amaçlandı.

Bu protokol doğrultusunda kreatinin için 20-10-5-2-1-0,5-0,2-0,1-0,04-0,03 mg/dL konsantrasyonlar elde edilecek şekilde BSA ile seri dilüsyon yapılarak linearite çalışmasında kullanıldı.

3.3.7.2.Analitik Ölçüm Limitleri

3.3.7.2.1. Limit of Dedection (LOD)

LC-MSMS sistemlerindeki alt limitler sinyal/gürültü oranına baz alınarak belirlendi. Sinyal/gürültü oranının 3 olduğu konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlendi [81].

3.3.7.2.2. Limit of Quantitation (LOQ)

Kromatografik yöntemlerde alt limitler sinyal/gürültü oranlarına göre saptanması esas alındı. Sinyal/gürültü oranının 10 olduğu konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlenmiştir [81].

3.3.7.3.Tekrarlanabilirlik

CLSI EP10-A protokolüne göre belirlenlenen çalışmada kreatinin değeri 0,5-1,0-1,5 mg/dL olan serum örnekleri örnek hazırlama protokolüne uygun olarak hazırlandı. Protokolün önerdiği sıralamada yüksek-düşük-orta-orta-düşük-düşük-yüksek-yüksek-orta seviye olacak şekilde ölçüm çift çalışılarak tekrarlanabilirlik çalışması yapılıdı.

3.3.7.4.Geri Elde (Recovery)

Kreatinin geri elde çalışması için serum havuzu ve kreatinin master standart çözeltisi ve bu standart çözeltisinden distile su ile dilusyon işlemi yapılarak 20, 10 ve 5 mg/dL'lik 3 farklı standart çözelti oluşturuldu. Oluşturulan bu standart çözeltileri ile serum 100 mL standart: 900 mL serum havuzu oranında karıştırılarak geri elde çalışması gerçekleştirildi. Karıştırılan örnekler numune hazırlama prosedürüne uygun olarak hazırlanıp, cihaza verildi.

Serumda okunan değer ile diğer tüplerde okunan değerler arasındaki fark hesaplanarak geri elde edilen miktar bulundu. Geri elde edilen konsantrasyonun eklenen

konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması sonucu yüzde recovery (%R) değerleri hesaplandı.

3.3.7.5.Taşıma (Carry Over)

Çalışma CLSI EP10-A3 protokolüne göre gerçekleştirildi. Bu protokole göre çalışma tekrarlanabilirlik çalışmasında belirtilen şekilde dizayn edilerek gerçekleştirildi. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandı. Grup ortalamaları arasındaki fark total izin verilen hatadan küçük olması durumunda taşıma hatasının olmadığı söylendi [82].

3.3.7.6.Metot Karşılaştırma Çalışması

LC-MSMS ve Spektofotometrik yöntemleri karşılaştırmak için Ankara Şehir Hastanesi Tıbbi Biyokimya Laboratuarı'nda Siemens-Atelllica otoanalizöründe klasik Jaffe yöntemi ile kretinin testi çalışılan ve rutin istemleri tamamlanmış olan hasta serumlarından arta kalan numuneler analiz edildikten sonra LC-MSMS ve Enzimatik Jaffe yöntemleriyle analiz edilmek üzere ependorflara porsiyonlandı. Daha sonra Ankara Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Araştırma Laboratuvarında ABI-SCIEX API 3500 Sıvı kromotografisi-kütle spektrometrisi (LC-MS/MS)'de kreatinin, ADMA/SDMA, Siemens-Atellica (enzimatik Jaffe) ve Nefelometrik Cihaz (sistatin C, BTP) otoanalizörlerinde ölçümleri gerçekleştirildi.

3.4.İstatistiksel Analiz

Metod validasyon parametreleri için, Excel (2016) ve SPSS (23), MEDCALC programları kullanılarak istatistiksel analizler yapıldı. Gruplar arası farkın anlamlılık araştırması için, parametrik dağılım gösteren testlerin analizinde independent simple t testi uygulanırken, non-parametrik dağılım gösteren testlerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Kreatinin için LC-MS/MS, Jaffe ve Enzimatik Jaffe yöntemlerinin karşılaştırılmasında Passing-Bablok, Bland-Altman analizi gerçekleştirildi.

4. BULGULAR

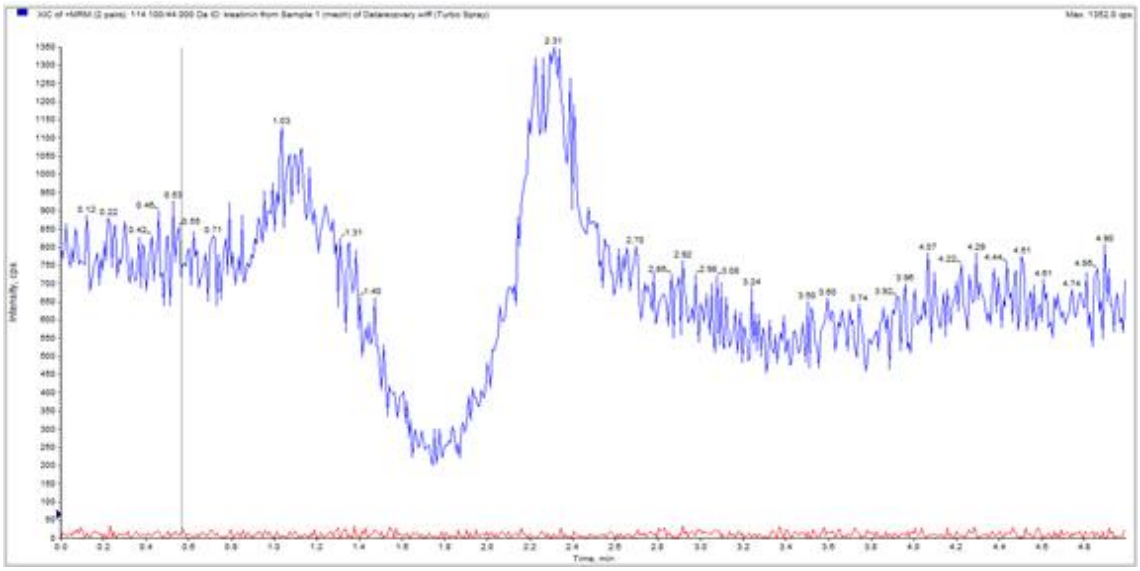
Ankara Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesine başvuran rutin biyokimya testleri istenen hastalarda kreatinin test istemi olup çalışılan bireylerin atık numuneleri çalışmamızda kullanılmıştır. Bu hastaların kimlik bilgileri silinerek yaş, kreatinin ve eGFR değerleri laboraratuvar bilgi işlem sisteminden (LBYS) alınıp referans aralığına göre düşük, normal ve yüksek konsantrasyonlarda kreatinin numuneleri çalışmaya dâhil edilmiştir. Çalışma örneklerinin istatistiksel tanımlayıcı verileri Tablo 18' de yer almaktadır.

4.1. Çalışılan Yöntemler

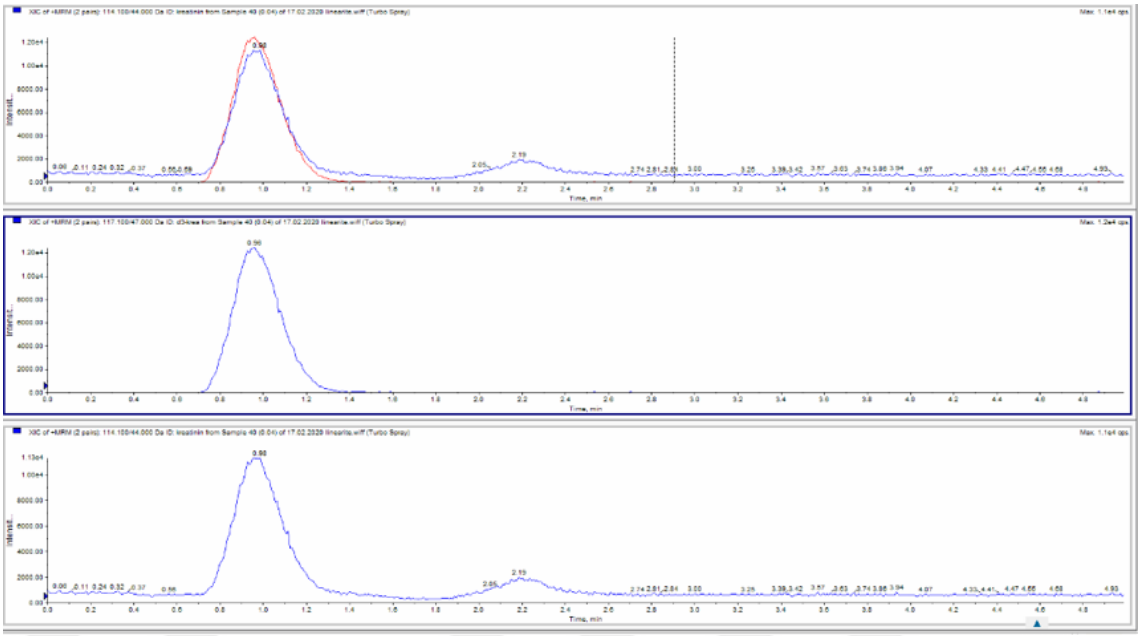
4.1.1. Kreatinin Ölçümleri ve Karşılaştırmaları

4.1.1.1. LC-MSMS Kreatinin Yöntemi

LC-MSMS kreatinin yöntemi Tablo 10'da tanımlanmış yöntemle çalışıldı. Yapılan optimizasyon sonucu kromatogramda kreatinin pikinin retansiyon zamanı şekil 11'de görüldüğü gibi 1.dakikada görüldü. Yine aynı yöntemle metanol enjeksiyonu sonucu ise oluşan kromatogram şekil 10'a eklenmiştir.

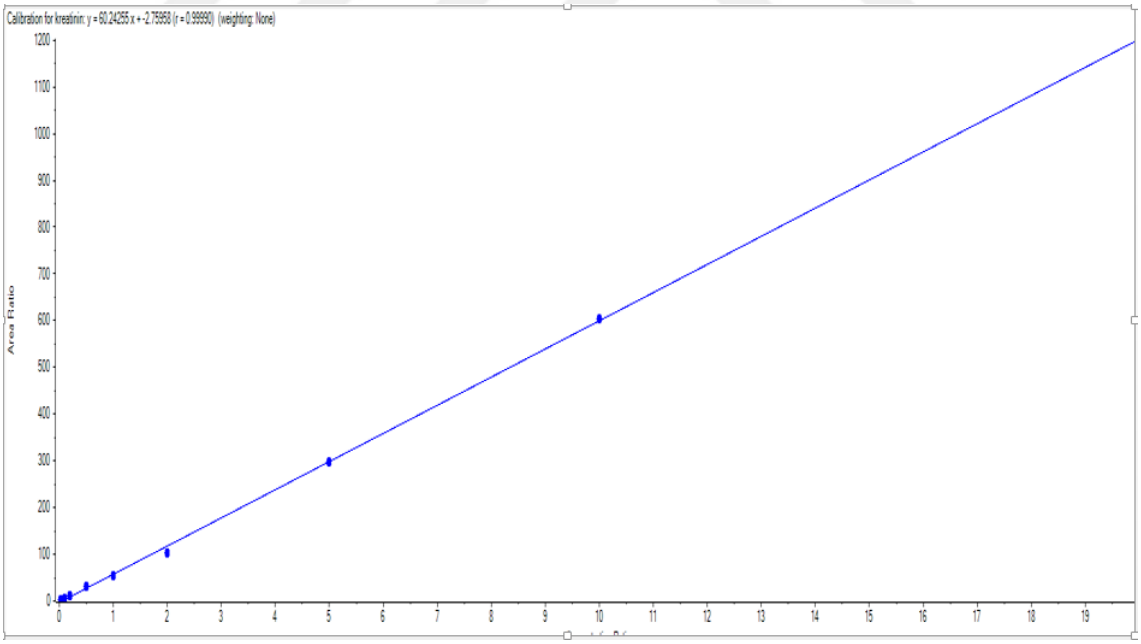


Şekil 10. Kreatinin LC-MSMS yöntemi ile çalışılan metanol kromatogram sonucu.



Şekil 11. Kreatinin LC-MSMS kromatogramı.

LC-MSMS kreatinin yönteminin kalibrasyonu 20-10-5-2-1-0,5-0,2-0,1-0,04-0,03 mg/dL değerlerine göre çalışıldı ve elde edilen kalibrasyon grafiği şekil 12' deki gibidir.



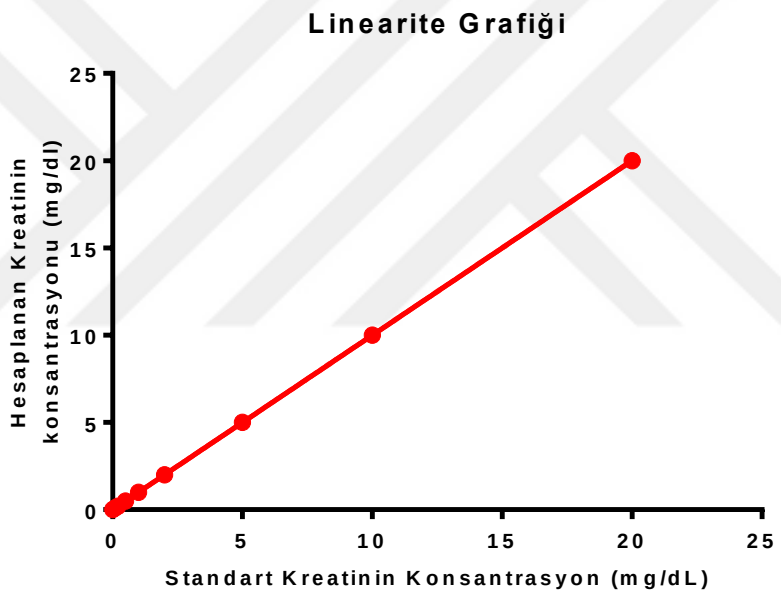
Şekil 12. LC-MSMS Kreatinin yöntemi kalibrasyon eğrisi.

4.1.1.1.1. LC MSMS Kreatinin Yöntem Validasyon Parametreleri

LC-MSMS yöntem validasyonu CLSI protokollerine göre yapılmıştır. Modifiye edilerek geliştirilmiş LC-MSMS kreatinin ölçüm çalışmasında doğrusallık, analitik ölçüm limitleri, tekrarlanabilirlik, geri elde, taşıma ve doğruluk parametreleri incelenmiştir.

4.1.1.1.1.1. Doğrusallık (Linearite)

Linearite çalışmasında her bir standart ön işlem basamaklarından geçerek hazırlanıp cihaza verildi. Çift çalışılarak elde edilen değerler sonucu cihazda kalibrasyon eğrisi çizildi ve bu eğriye göre standartların hesaplanmış kreatinin konsantrasyonlarına karşılık bir linearite grafiği elde edildi **(**şekil 13). R^2 = 0,999 olarak bulundu.



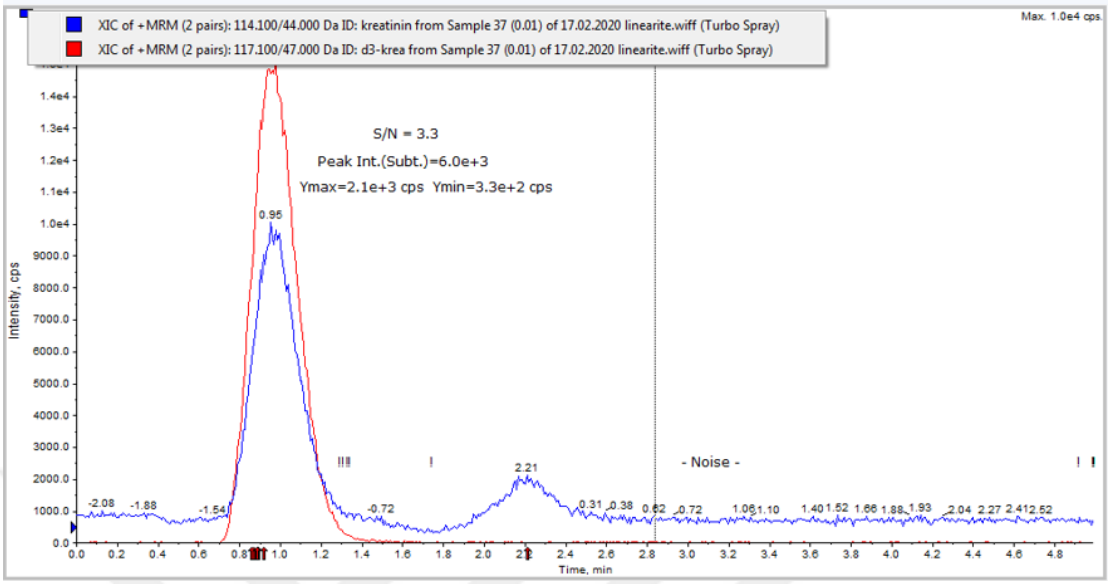
Şekil 13. Kreatinin LC- MSMS yöntemi linearite ve kalibrasyon eğrisi.

4.1.1.1.1.2.Analitik Ölçüm Limitleri

Analitik ölçüm bilimlerinin (LOD ve LOQ) analizi için seri dilüsyonlarla BSA ekli kreatinin standartları hazırlandı. Bu solüsyonların sinyal/gürültü oranları Analyse-it programı kullanılarak belirlendi.

Limit of Detection (LOD)

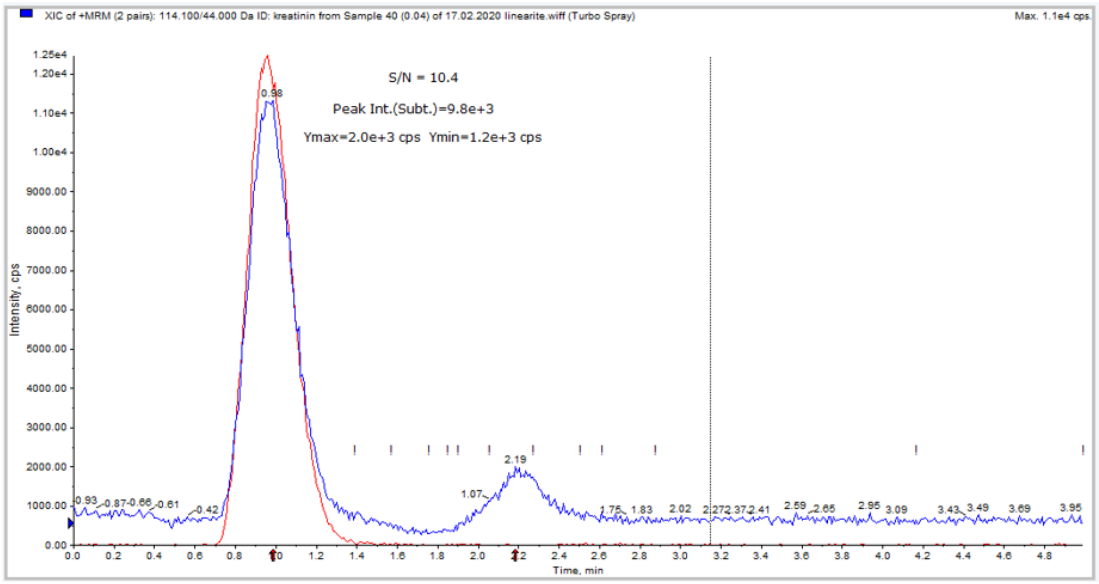
Kreatinin için LC-MS/MS'de sinyal/gürültü oranına göre belirlenen LOD (dedeksiyon limiti) 0,01 mg/dL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 14. Kreatinin deteksiyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

Limit of Quantitation (LOQ)

Kreatinin için LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenen LOQ (kantitasyon limiti) 0,04 mg/dL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 15. Kreatinin kantitasyon limiti (sinyal/gürültü=S/N)

4.1.1.1.1.3.Tekrarlanabilirlik (Precission)

Bu çalışmanın tekrarlanabilirlik protokolü CLSI'ın EP-10 protokolüne göre 0,5-0,9 ve 1,5 mg/dL seviyelerinde serum havuzları kullanılarak yapıldı. 5 gün boyunca yapılan ölçümler sonucu elde verilen Tablo 12'dedir.

Tablo 12. EP-10 protokolüne göre tekrarlanabilirlik analiz sonuçları.

		1. GUN	**2. GUN**	**3. GÜN**	**4. GÜN**	**5.GÜN**
Düşük Düzey Serum Havuzu	Gün içi ortalama	0,584	0,596	0,549	0,552	0,568
	Gün içi Std. Sapma	0,003	0,018	0,006	0,008	0,001
Orta Düzey Serum Havuzu	Gün içi ortalama	0,906	0,936	0,882	0,889	0,902
	Gün içi Std. Sapma	0,013	0,026	0,004	0,011	0,004
Yüksek Düzey Serum Havuzu	Gün içi ortalama	1,591	1,615	1,537	1,566	1,573
	Gün içi Std. Sapma	0,014	0,016	0,020	0,010	0,005
	Düşük Düzey Serum Havuzu		**Orta Düzey Serum Havuzu**		**Yüksek Düzey Serum Havuzu**	
Total CV	3,8		2,6		2	
Yorum	**Başarılı**		**Başarılı**		**Başarılı**	

4.1.1.1.1.4.Geri Elde (Recovery)

Kreatinin için hazırlanan serum havuzu ve stok 10-5 2,5 mg/dL'lik standartlar kullanılarak yapılan geri elde çalışmasının sonuçları Tablo 13' de verilmiştir.

Tablo 13. Geri elde (Recovery) çalışma sonuçları.

Serum havuzu	Ölçülen Değer (mg/dL)	Hedef değer (mg/dL)	% Geri elde
+0 mg/dL	0,9		
+2 mg/dL	3,1	2,9	109
+1 mg/dL	2,01	1,9	110
+ 0,5 mg/dL	1,45	1,4	110
+0,25 mg/dL	1,17	1,15	109

4.1.1.1.1.5.Taşıma (Carry Over)

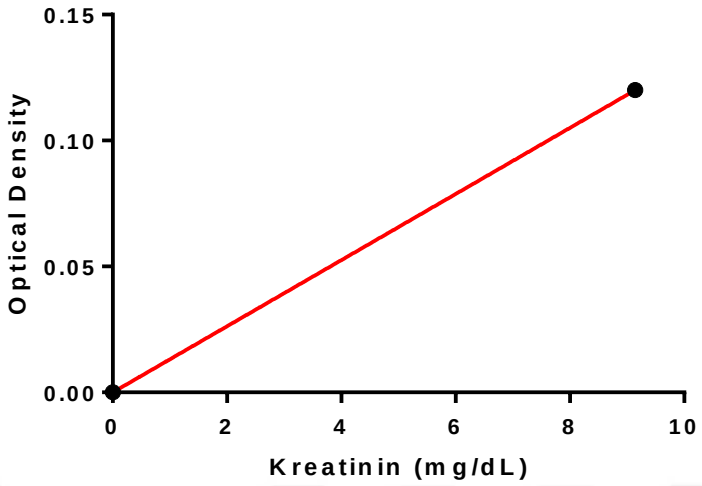
Taşıma çalışması EP-10 göre analiz edildi ve makro hesaplama yöntemleri sonucu *t*-testi sonucu 0,4 olarak belirlendi.

4.1.1.1.1.6. Doğruluk (Accuracy)

LC-MSMS kreatinin yönteminin doğruluk çalışması insan serum matriksli SRM 967a örnekleri kullanılmıştır. Seviye 1 (0,85 mg/dL) ve seviye 2 (3,87 mg/dL) olarak 2 farklı seviye kreatinin içeren referans materyalin çalışma sonuçlar sırası ile seviye 1 için 0,84 mg/dL ve seviye 2 için ise 3,95 mg/dL olarak elde edilmiştir.

4.1.1.2.Kreatinin Jaffe Yöntemi

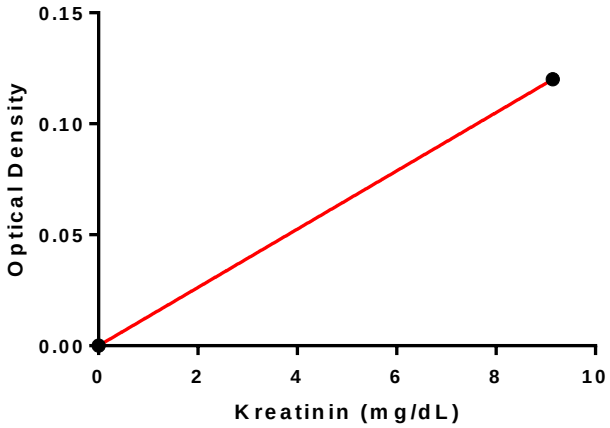
Kreatininin ölçümü rutin laboratuvar yöntemi olan Jaffe çalışmamızda Roche ve Siemens ticari kiti ile Cobas 8000 ve Advia 1800 cihazlarında çalışılmıştır. Kullanılan bu yöntemin kalibrasyon eğrisi şekil 16' deki gibidir. Jaffe Siemens ticari kitinin çalışıldığı güne ait iç kalite kontrol veriler seviye 1 için 2,35 mg/dL ve seviye 2 için 5,33 mg/dL' dir. SRM 967a analizlerinin sonuçları ise seviye 1 için 0,79 mg/dL ve seviye 2 için ise 3,61 mg/dL olarak elde edilmiştir. İç kalite kontrol ve dış kalite kontrol verileri kullanılarak hesaplanan Total Kabul Edilebilir Hata (TAH) sonuçları 12,38 olarak elde edilmiştir.



Şekil 16. Jaffe Siemens kreatinin kalibrasyon eğrisi grafiği.

4.1.1.3.Enzimatik Kreatinin Ölçüm Yöntemi

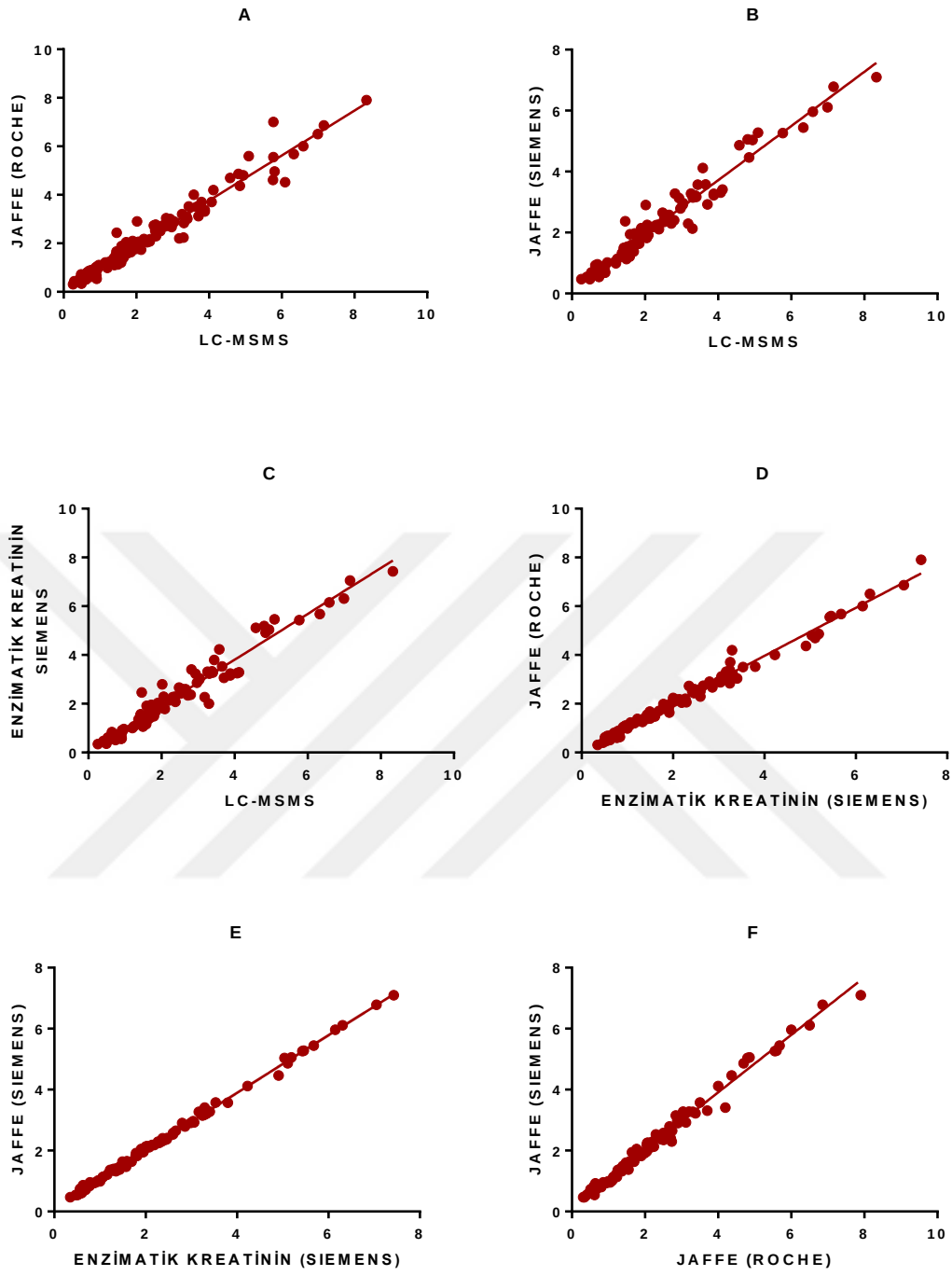
Bu yöntem Advia 1800 cihazında çalışılmış ve çalışma gününe ait kalibrasyon grafiği şekil 17'deki gibi elde edilmiştir. Aynı çalışma gününe ait kontrol verileri ise seviye 1 için 1,79 mg/dL ve seviye 2 için 5,01 mg/dL'dir. SRM 967a çalışma sonuçları ise Seviye 1 (0,85 mg/dL) için 0,78 mg/dL ve seviye 2 (3,87 mg/dL) için ise 3,79 mg/dL'dir.



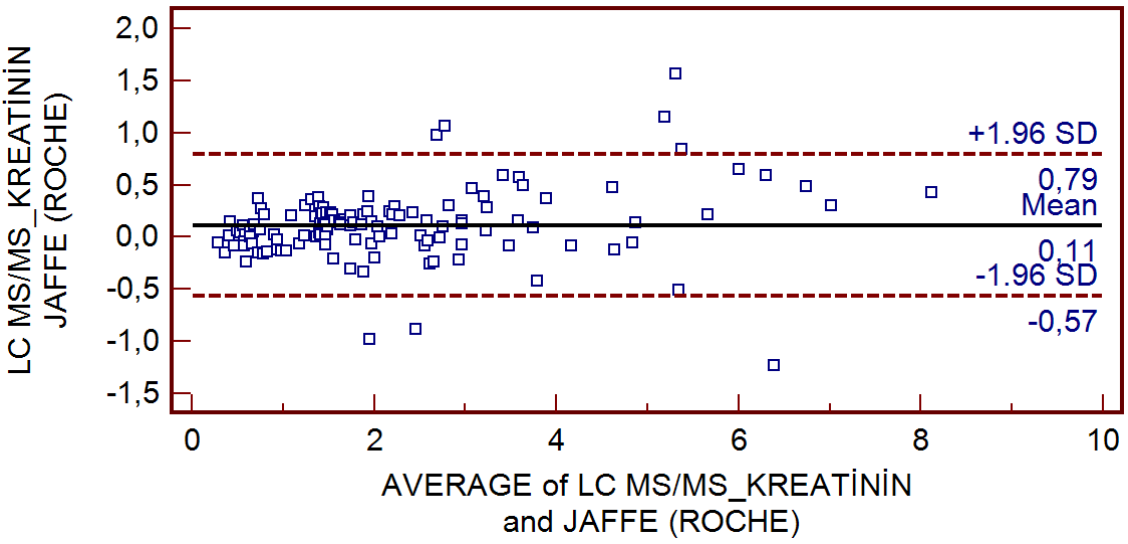
Şekil 17. Enzimatik kreatinin yöntemi kalibrasyon eğrisi grafiği.

4.1.1.4.Kreatinin Yöntemleri Karşılaştırma Çalışması

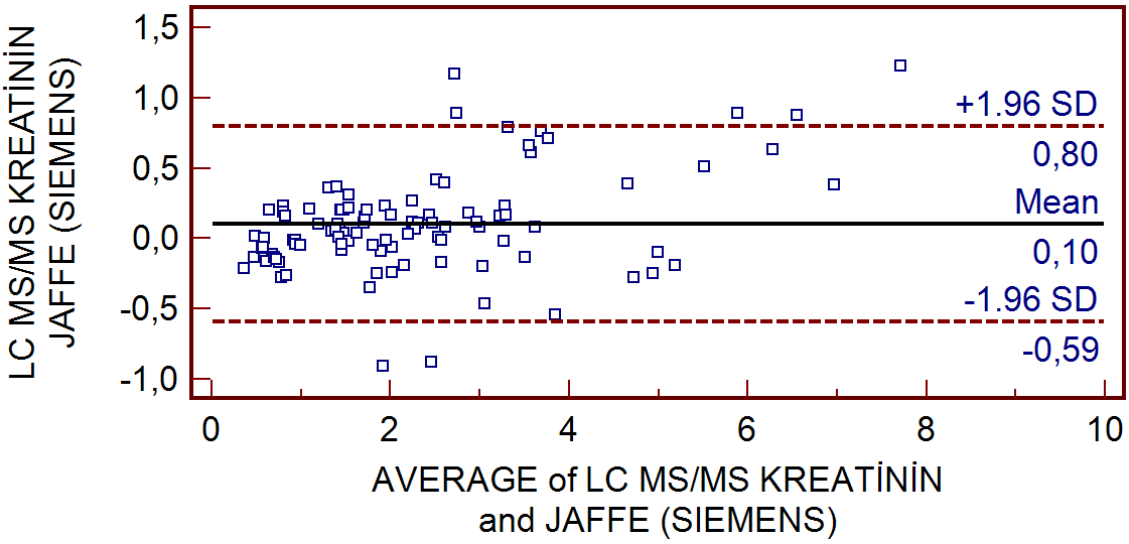
Çalışmamızda renal fonksiyonları değerlendirmek için LC-MSMS cihazında kreatinin için modifiye bir yöntem geliştirildi. Bu yöntem esas alınarak farklı kreatinin yöntemleri ile karşılaştırma çalışmaları yapıldı. Bunun için LC-MSMS cihazında geliştirilen yöntem ve proje kapsamında alınan ticari kitler ile karşılaştırıldı. Analiz sonucu karşılaştırılan testlerin korelasyon grafikleri şekil 18'deki gibi oluşturuldu. Yöntem karşılaştırma analizlerinde Bland-Altman ve Passing-Bablok grafikleri Şekil 19-24'te verilmiştir. Passing-Bablok regresyon analiz sonucu veriler Tablo 14'te yer almaktadır.



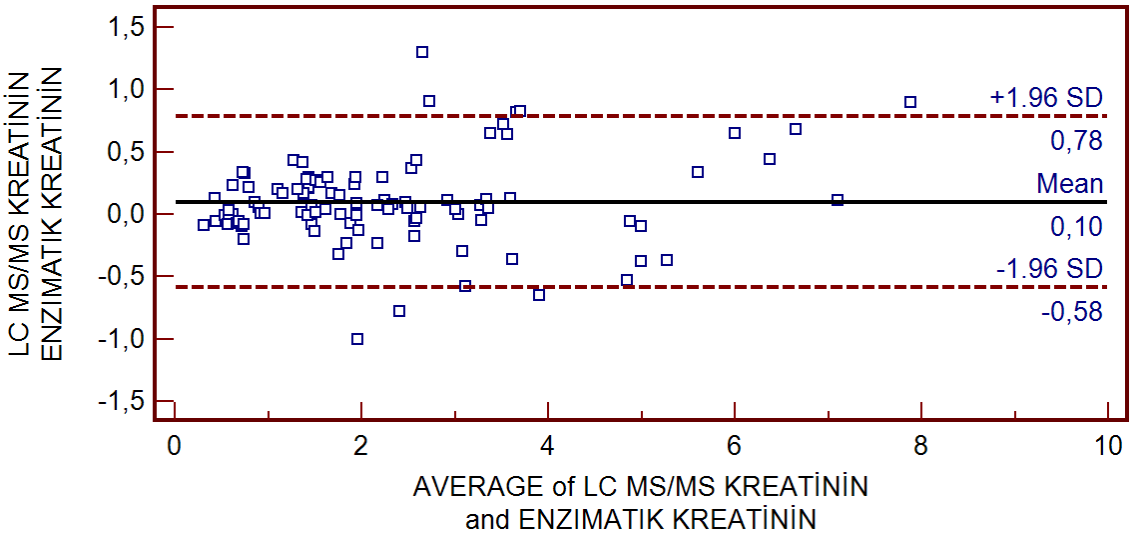
Şekil 18. Kreatinin yöntem karşılaştırma çalışmaları korelasyon grafikleri. (A:LC-MSMS ve Jaffe (Roche) yöntemlerinin korelasyon grafiği. B: LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) yöntemlerinin korelasyon grafiği. C: LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerine ait korelasyon grafiği. D: Enzimatik kreatinin ve Jaffe (Roche) yöntemlerine ait korelasyon grafiği. E: Enzimatik kreatinin ve Jaffe Siemens yöntemlerinin korelasyon grafiği. F: Jaffe Siemens ve Roche firmalarının kitlerinin korelasyon grafiği.)



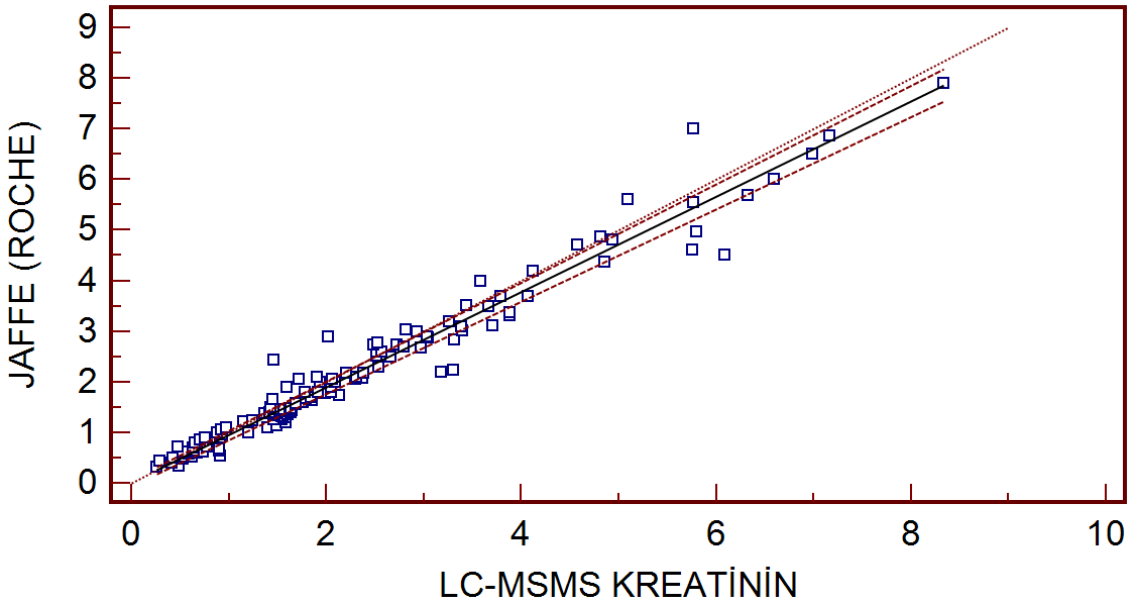
Şekil 19. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



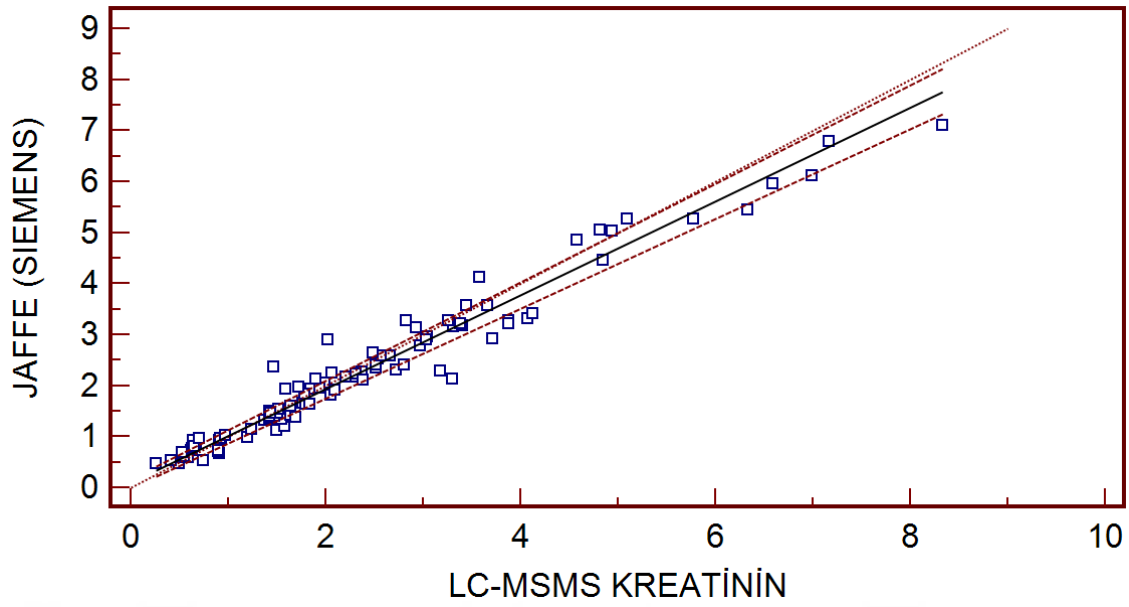
Şekil 20. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



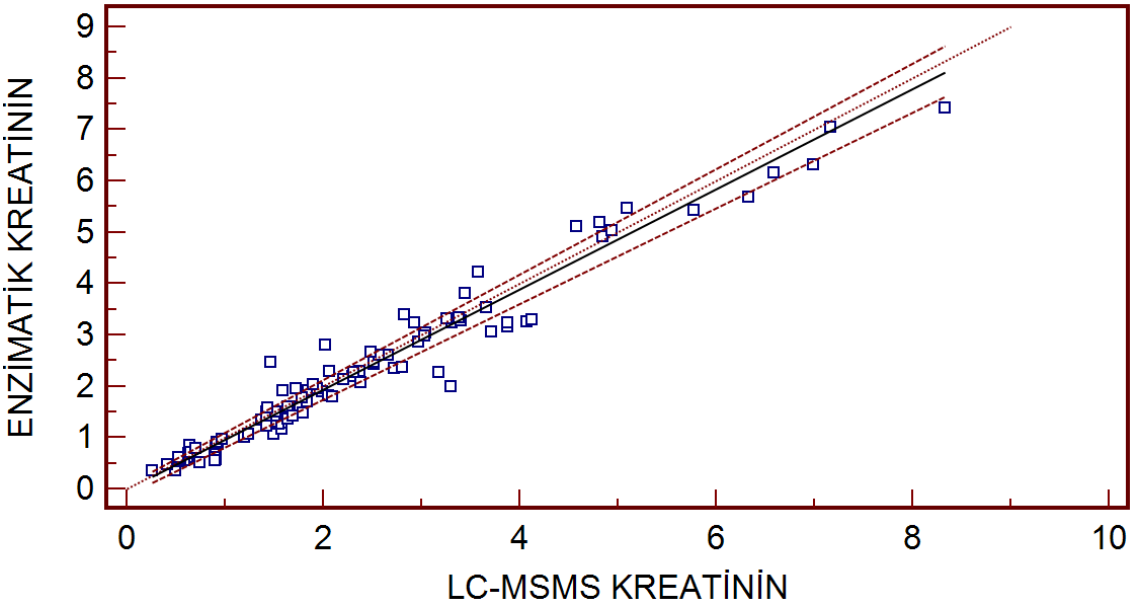
Şekil 21. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerinin Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



Şekil 22. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği.



Şekil 23. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği.



Şekil 24. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin yöntemlerinin Passing-Bablok grafiği.

Tablo 14. LC-MSMS ve farklı kreatinin yöntemlerine ait analiz sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri

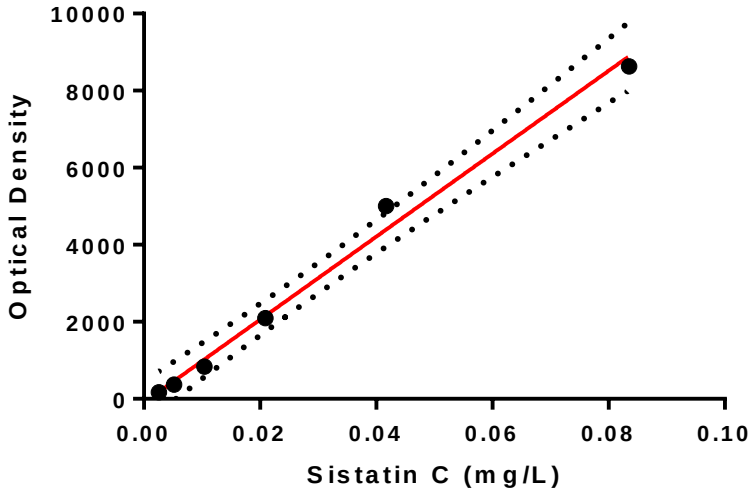
Passing-Bablok	Denklem	Slope (%95 Güven Aralığı)	İntercept (%95 Güven Aralığı)
Jaffe (Roche)	y = -0,0145 + 1,0609 x	1,0609	-0,0145
		1,0250 - 1,0959	-0,0634 - 0,0563
Jaffe (Siemens)	y = -0,0986 + 1,0866 x	1,0866	-0,0986
		1,0345 - 1,1369	-0,1896 - 0,0038
Enzimtaik kreatinin	y = 0,0167 + 1,0238 x	1,0238	0,0167
		(0,9734 - 1,0710)	-0,0736 - 0,1270

4.1.2. Diğer Renal Belirteçler (Sistatin C, BTP ve SDMA)

Endojen GFR hesaplama testi olarak rutinde kreatinin kullanılsa da yeni parametrelerinde renal belirteç olarak kullanımı güncel birçok çalışmaya konu olmuştur. Bunlardan bazıları rutin kullanıma bile geçmiştir. Düşük moleküler ağırlıklı maddelerden sistatin C, BTP ve SDMA moleküllerine bizim çalışmamızda da yer verilmiştir.

4.1.2.1.Sistatin C

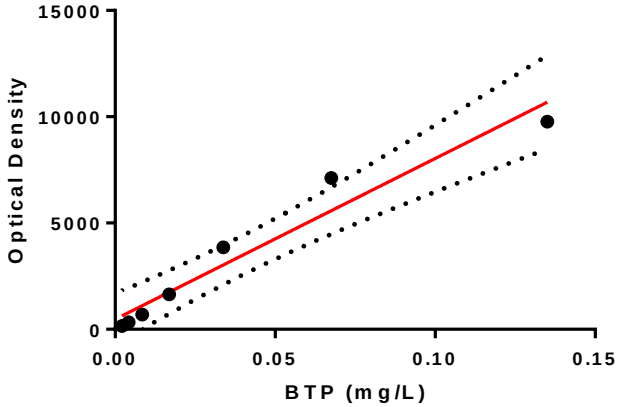
Laboratuvarımızda nefelometrik yöntemle çalışılan sistatin C'nin kalibrasyon eğri grafiği şekil 25'deki gibidir. Kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri ise 0,99'dur. Aynı çalışma gününe ait kontrol verileri ise seviye 1 için 1,08 mg/L (% -0,90) ve seviye 2 için 2,18 mg/L (% 3,20) olarak elde edilmiştir.



Şekil 25. Sistatin C testinin kalibrasyon eğri grafiği.

4.1.2.2. Beta Trace Protein (BTP)

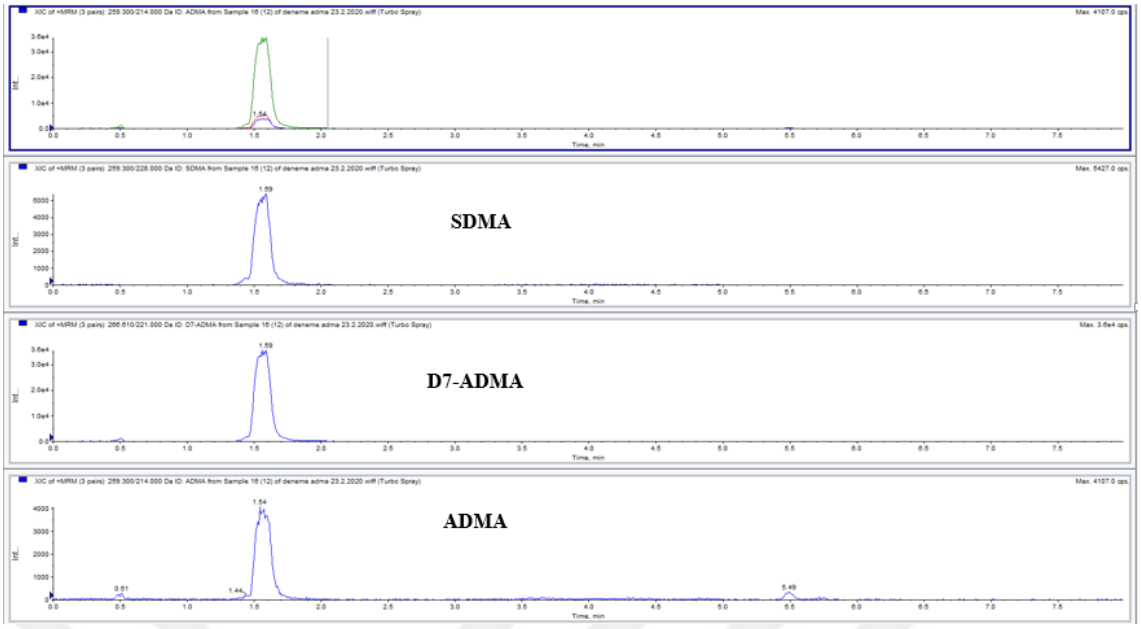
Laboratuvarımızda nefelometrik yöntemle çalışılan BTP'nin kalibrasyon eğri grafiği şekil 26'da verilmiştir. Kalibrasyon eğrisinin R^2 değeri ise 0,95'tir. Aynı çalışma gününe ait kontrol verileri ise 1,62 mg/L olarak elde edilmiştir.



Şekil 26. BTP kalibrasyon eğri grafiği.

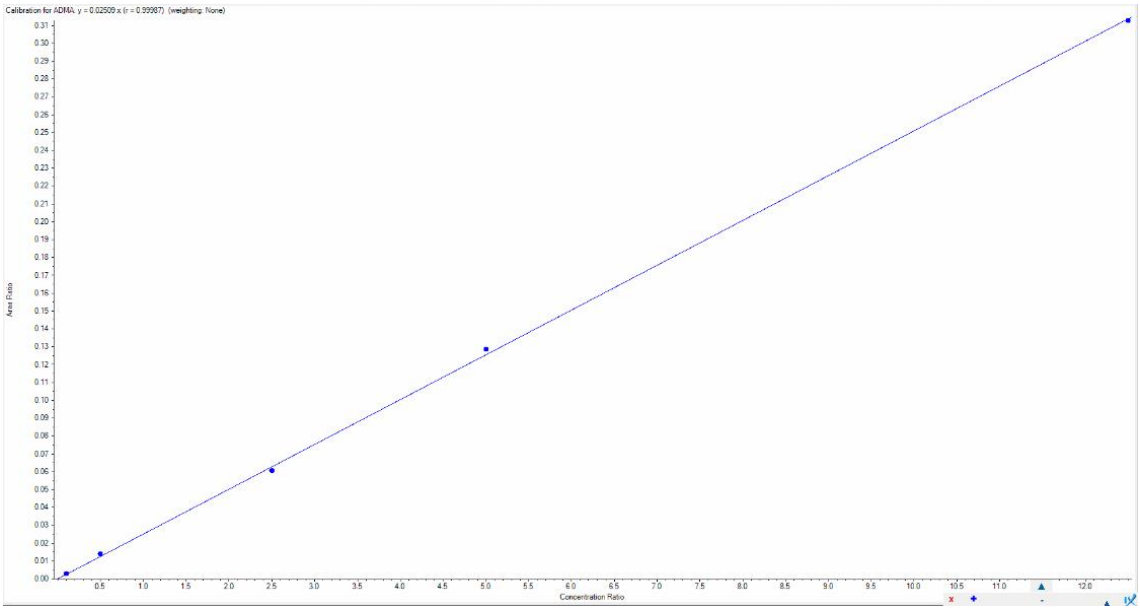
4.1.2.3. SDMA

Di Gangi ve ark.'nın geliştirmiş olduğu yöntem kullanılarak LC-MSMS ile çalışılan ADMA ve SDMA serum (1,37 umol/L) örnek kromatogramı şekil 27'de verilmiştir.

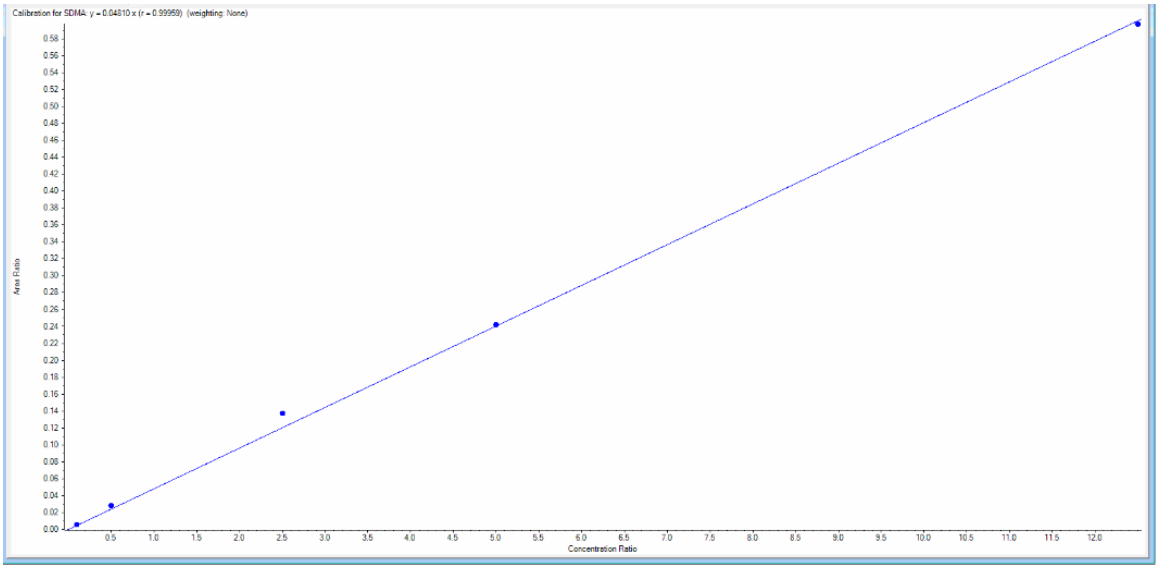


Şekil 27. ADMA/SDMA LC-MSMS kromatogramı.

ADMA ve SDMA yöntemlerinin çalışmada kullanılan kalibrasyon eğri grafikleri şekil 28-29'da verilmiştir.



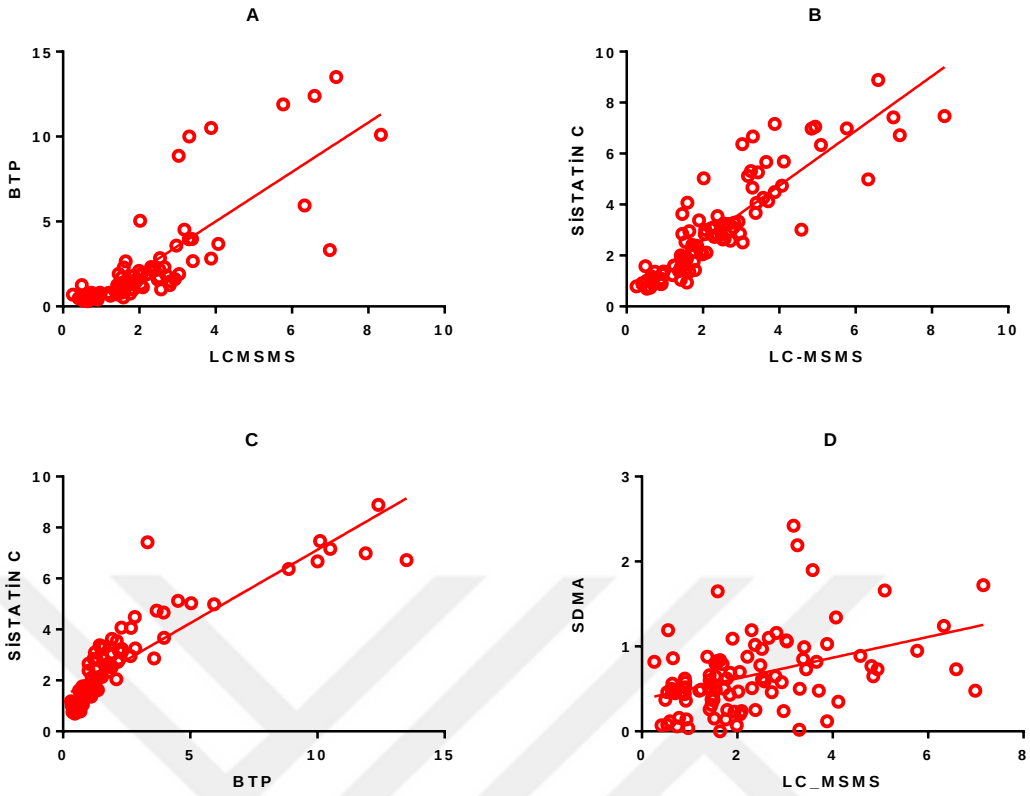
Şekil 28. ADMA kalibrasyon eğrisi grafiği.



Şekil 29. SDMA kalibrasyon eğrisi grafiği.

4.1.2.4.Diğer Renal Belirteçlerin Kreatinin ile Karşılaştırılması

Belirteçlerin yöntem performanslarını değerlendirmek için farklı yöntem ve parametrelerle karşılaştırma çalışmaları yapıldı. Bunun için LC-MSMS cihazında geliştirilen kreatinin yöntemi esas alındı. Bu analiz sonuçlarının LC-MSMS yöntemi ile ölçülen kreatinin ve kendi aralarındaki korelasyan grafikleri şekil 30'da verilmiştir.



Şekil 30. LC-MS/MS, BTP, Sistatin C ve SDMA korelasyon grafikleri.

Farklı kreatinin ölçüm yöntemlerinin ve çalışmamızda yer alan diğer düşük moleküler ağırlıklı parametrelerin normal dağılıp dağılmadığı Shapiro-Wilks testi kullanılarak değerlendirildi. Normal dağılım göstermeyen verilerin korelasyon analizi için spearman korelasyon yöntemi kullanıldı ve Tablo 15'teki veriler elde edildi [10].

Tablo 15. Farklı kreatinin yöntemleri ve diğer renal belirteçlerin LC-MSMS kreatinin yöntemi ile korelasyon verileri.

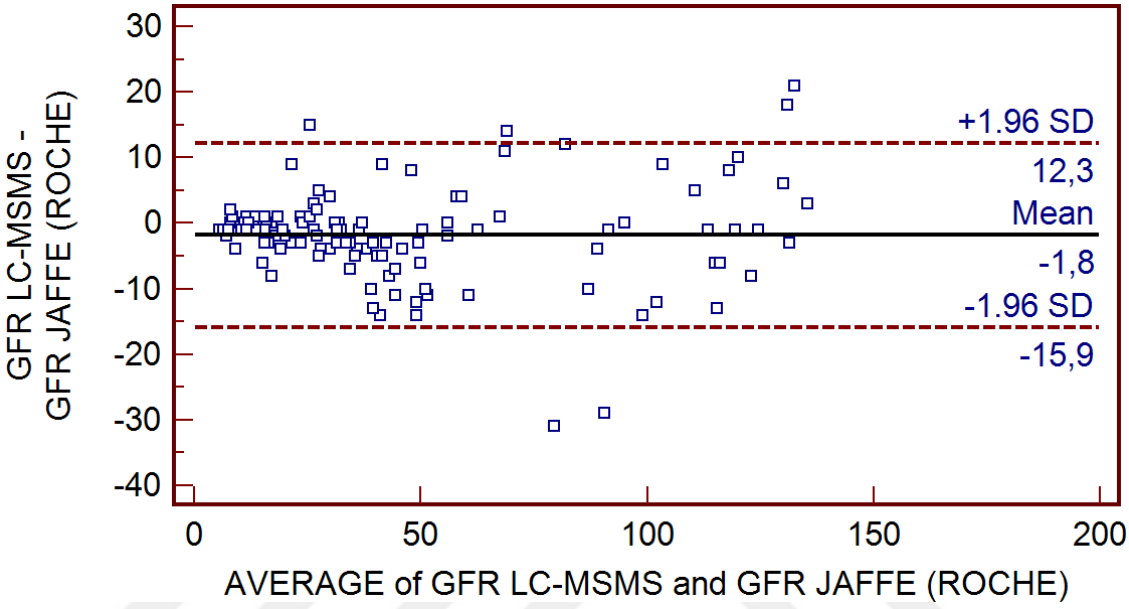
Spearman Korelasyon		LC-MS/MS
JAFFE ROCHE	Korelasyon Katsayısı	0,97
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	124
JAFFE SİEMENS	Korelasyon Katsayısı	0,97
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	99
ENZİMATİK KREATİNİN	Korelasyon Katsayısı	0,96
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	99
BTP	Korelasyon Katsayısı	0,87
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	87
SİSTATİN C	Korelasyon Katsayısı	0,91
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	98
SDMA	Korelasyon Katsayısı	0,44
	Sig. (2-tailed)	< 0,05
	Sayı	100

4.2.GFR Hesaplanması ve Yöntemlerin eGFR'a Etkisinin Karşılaştırılması

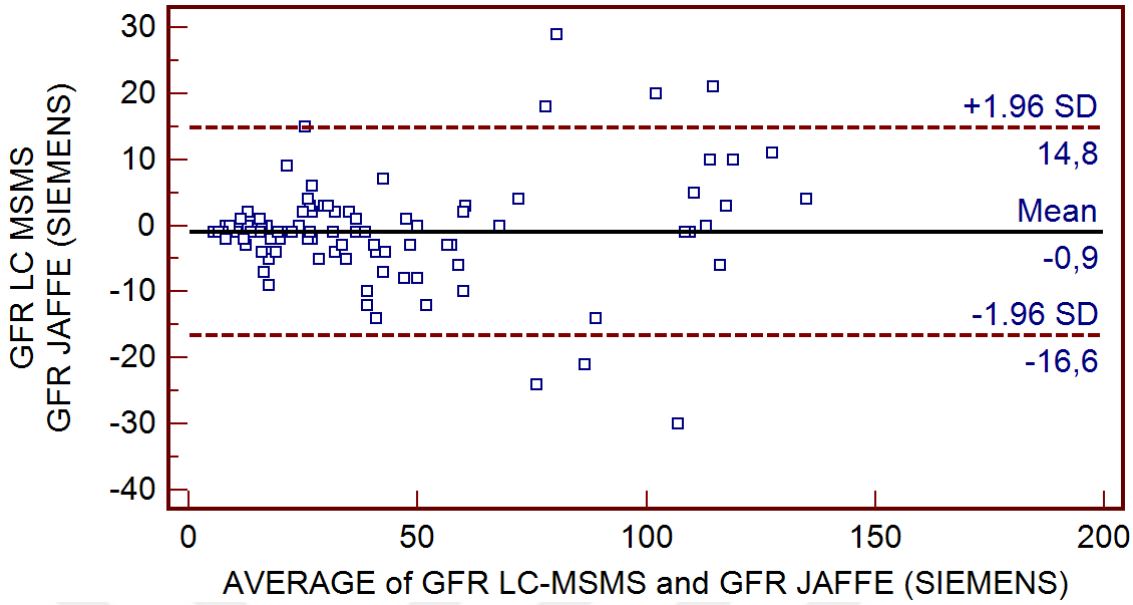
4.2.1. Farklı Kreatinin Analiz Yöntemleri ile GFR Hesabı ve eGFR Sonuçlarının Karşılaştırılması

Ülkemizde Sağlık Bakanlığı'nın tüm yetişkinler için önerdiği GFR hesaplama yöntemi CKD-EPI yöntemidir. Bu hesaplamada iki farklı değişken vardır. Bunlar yaş ve kreatinin değişkenleridir. Bu nedenle kullanılan kreatinin yöntemi GFR hesaplamasında oldukça önemlidir. Çalışmamızda LC-MSMS yöntemini esas alarak farklı kreatinin ölçüm

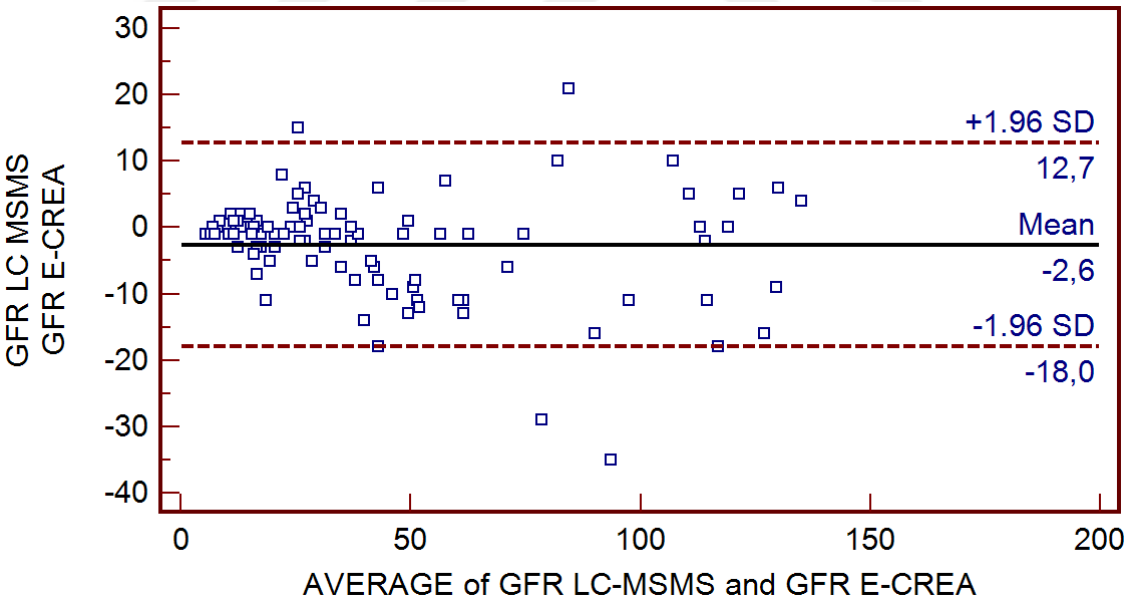
yöntemlerinin GFR hesaplaması üzerine etkisini inceledik. Diğer kreatinin yöntemlerinin GFR değerleri CKD-EPI ile hesaplandı. Yöntemlerin birbirleri ile karşılaştırma grafikleri olan Bland-Altman ve Passing-Bablok grafikleri şekil 31-36 ve analiz sonuçları tablo 16'daki gibidir.



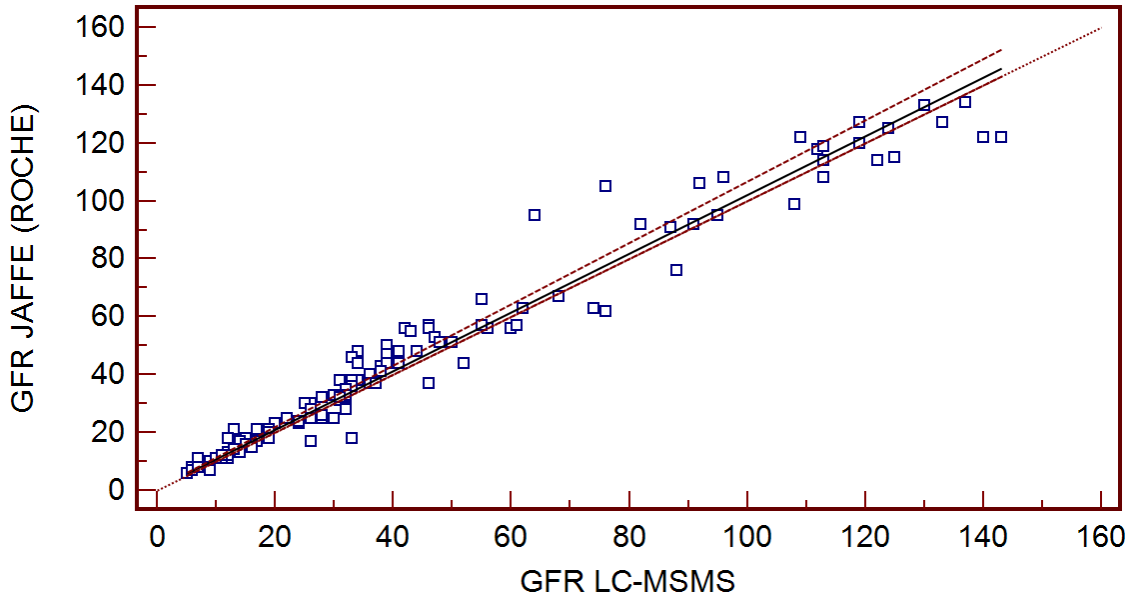
Şekil 31. LC-MSMS ve Jaffe (Roche) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



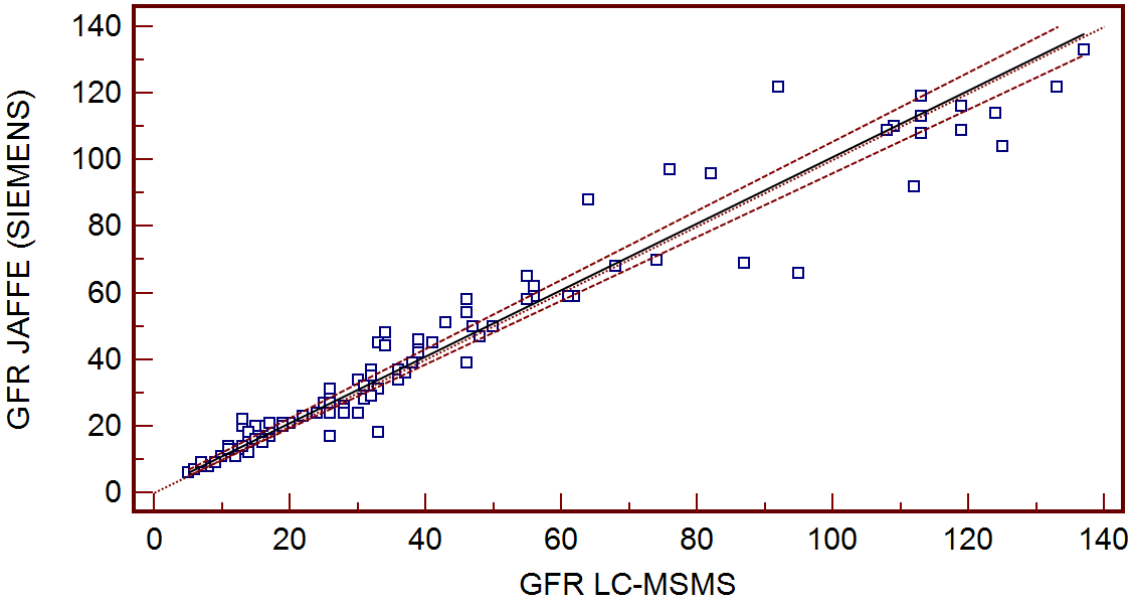
Şekil 32. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



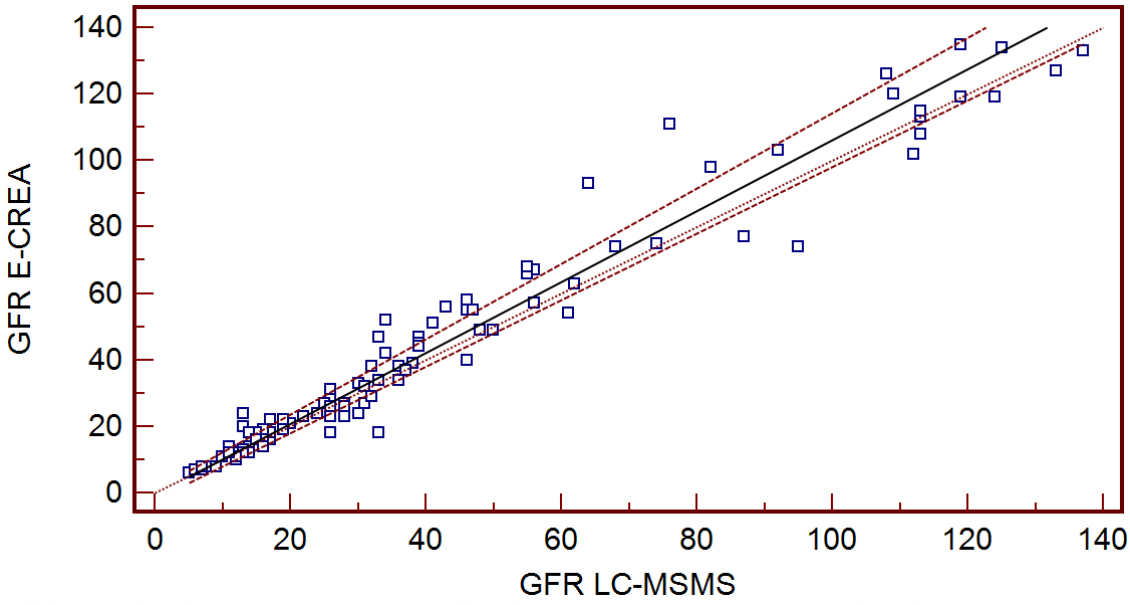
Şekil 33. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin (E-CREA) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



Şekil 34. LC-MSMS ve Jaffe (ROCHE) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.



Şekil 35. LC-MSMS ve Jaffe (Siemens) kreatinin yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.



Şekil 36. LC-MSMS ve Enzimatik kreatinin (E-CREA) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.

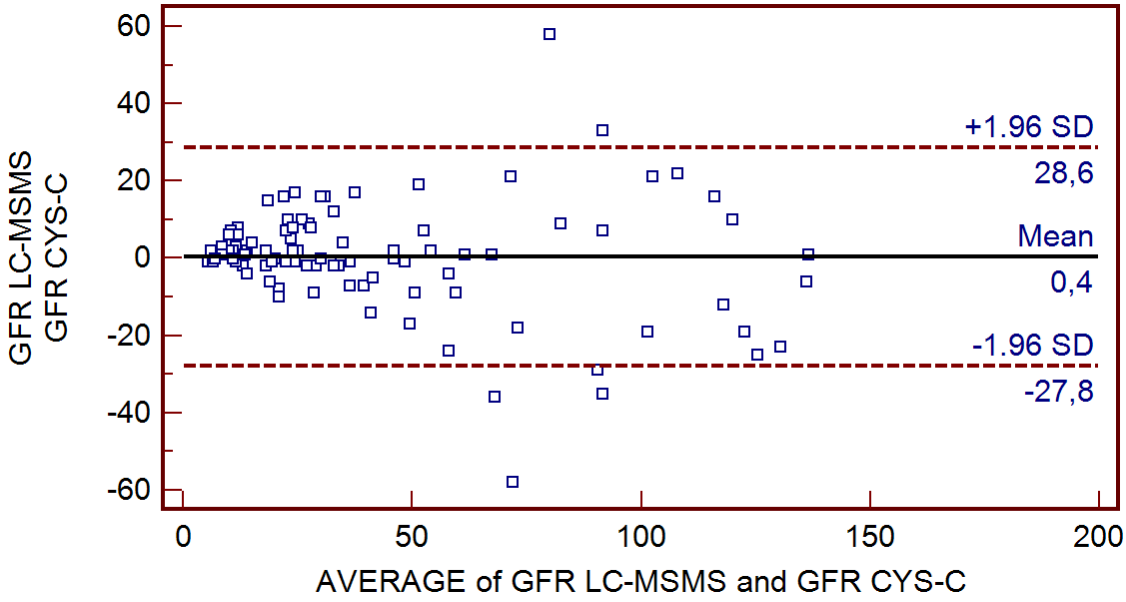
Tablo 16. LC-MSMS ve farklı kreatinin yöntemleri ile hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri.

	Passig&Bablok	**Denklem**	**Slope (%95 Güven Aralığı)**	**İntercept (%95 Güven Aralığı)**
eGFR	Jaffe (Roche)	y = 0,8636 + 1,0130 x	1,013	0,863
			1,000 to 1,057	0,019 to 1,00
	Jaffe (Siemens)	y = 1,000 + 1,000 x	1	1
			0,958 to 1,037	0,296 to 1,916
	Enzimtaik kreatinin	y = -0,4667 + 1,0667 x	1,066	-0,466
			1,00 to 1,133	-1,866 to 1,000

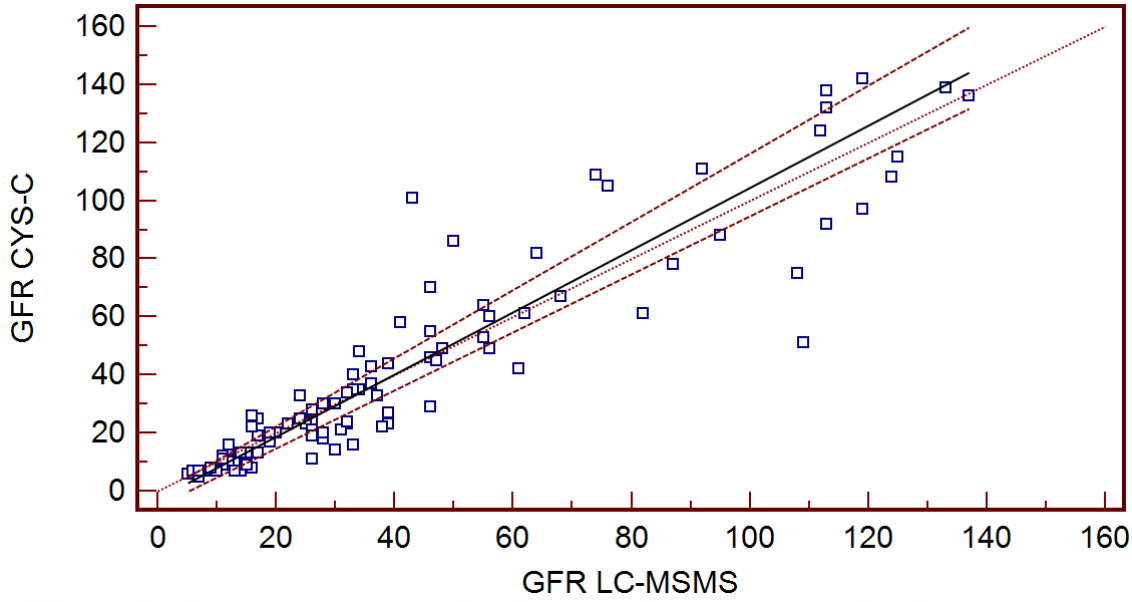
4.2.2. Sistatic C ile GFR Hesaplama ve CKD-EPI ile Karşılaştırılması

GFR hesaplama yönteminde ölçüm parametresi olarak kullanılan kreatinin dışında yeni belirteçler için günümüzde yeni hesaplama yöntemleri geliştirilmekte. Sağlık Bakanlığı'nın yayınlamış olduğu ekte sistatin C ile ilgili hesaplama yöntemleri de yer almaktadır. Bizde çalışmamızda elde ettiğimiz veriler ile Tablo 9'da yer alan hesaplama

yöntemine GFR hesabı yaptık ve bu hesaplanan GFR verilerini LC-MSMS kreatinin sonuçlarının CKD-EPI formülüne göre hesaplanan GFR verileri ile karşılaştırdık. Karşılaştırma analizlerinde Bland-Altman ve Passing-Bablok istatistik metodlarını kullandık. Elde edilen grafikler Şekil 37-38' de ki gibidir. Analiz verileri ise Tablo 17'de yer almaktadır.



Şekil 37. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



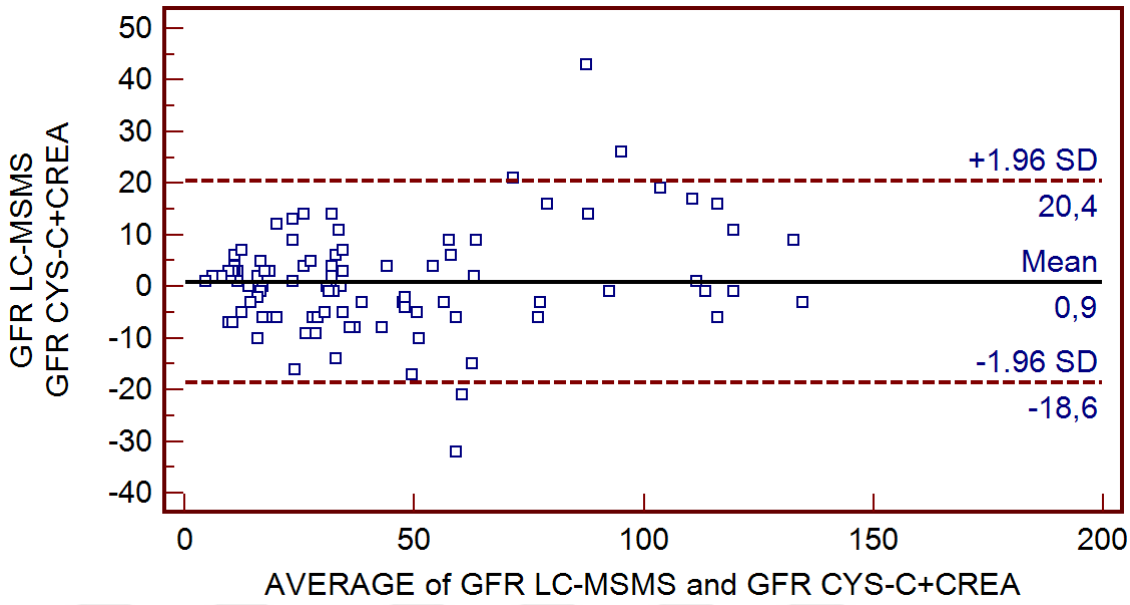
Şekil 38. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.

Tablo 17. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C (CYS-C) yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok regresyon analiz verileri.

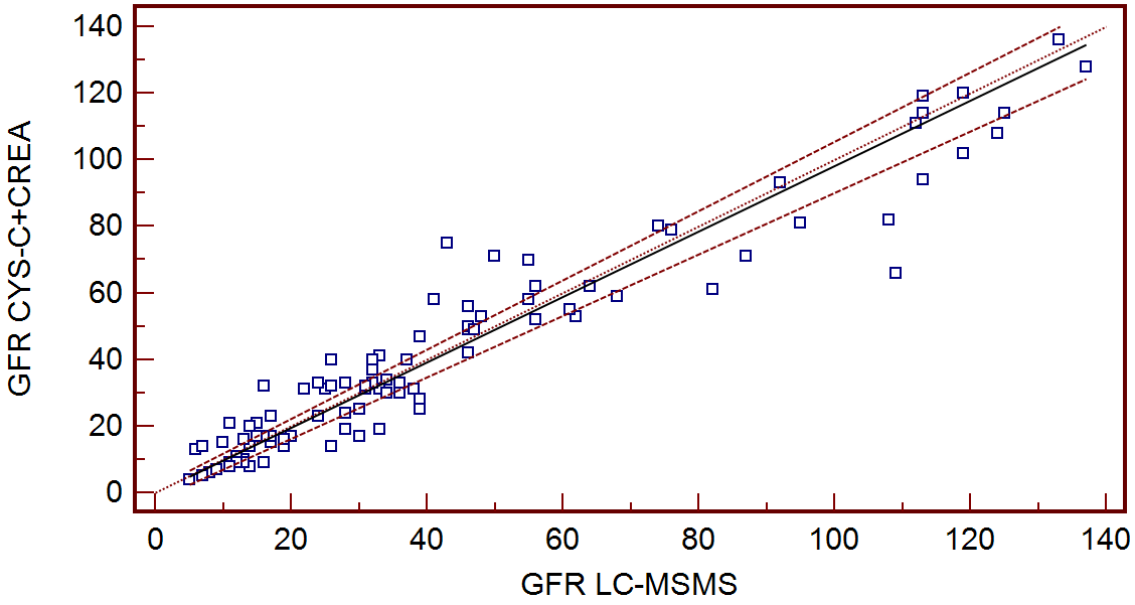
	Passig&Bablok	**Denklem**	**Slope** (%95 Güven Aralığı)	**İntercept** (%95 Güven Aralığı)
eGFR	Sistatin C	y = -2,6429 + 1,0714 x	1,071	-2,642
			1,000 to 1,172	-5,1897 to -1,0000

4.2.3. Sistatin C ve Kreatinin Ortak GFR Hesaplama Yöntemi ve CKD-EPI ile Karşılaştırılması

Aynı zamanda sistatin C ve kreatinin ile birlikte kombine edilmiş hesaplama yöntemi de yayınlanmıştır. Bu yöntemlere göre hesaplanan GFR sonuçları LC-MSMS ile hesaplanan GFR sonuçları ile karşılaştırma grafikleri ve elde edilen uygunluk analizleri şekil 19-20 ve Tablo 18'de yer almaktadır.



Şekil 39. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+ LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Bland-Altman karşılaştırma grafikleri.



Şekil 40. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma grafikleri.

Tablo 18. LC-MSMS kreatinin ve Sistatin C+LC-MSMS kreatinin (CYS-C+CREA) kombine yöntemlerine göre hesaplanan GFR sonuçlarının Passing-Bablok karşılaştırma analiz verileri.

	Passig-Bablok	Denklem	Slope (%95 Güven Aralığı)	İntercept (%95 Güven Aralığı)
eGFR	CYS-C+CREA	y = -0,182 + 0,983 x	0,983	-0,182
			0,923 to 1,040	-2,320 to 1,423

4.3. KBH Evreleme Kriterlerine Göre Yöntemlerin Karşılaştırılması

Çalışmamızda kreatinin yöntemlerinin karşılaştırılmasında sonuçların GFR hesaplamasına etkisi yanı sıra KBH evrelemesi üzerine etkisinide inceledik. Burada kliniktede kullanımı mevcut olan KBH'nın eGFR'ye göre evrelemeyi elde ettiğimiz sonuçlarla Tablo 5'e göre gerçekleştirdik. Burada geliştirdiğimiz LC-MSMS yöntemiyle ölçülen kreatinin değerleri ile hesaplanan GFR sonuçlarını kullanarak KBH evreleme sonuçlarını referans aldık. Sapan değerlerin oranlarını hesaplayarak yöntemlerin evreleme üzerine etkilerini inceledik. Elde edilen sonuçlar Tablo 19' da yer almaktadır.

Tablo 19. Farklı GFR hesaplama yöntemlerinin KBH evreleme verileri ve karşılaştırmaları.

		LC-MSMS					% UNDER	% UPPER
		EVRE 1	EVRE 2	EVRE 3	EVRE 4	EVRE 5	ESTİMATE	ESTİMATE
JAFFE ROCHE	EVRE 1	20					-	-
	EVRE 2	4	5	3			33,3	25
	EVRE 3		1	37	3		4,9	7,3
	EVRE 4			4	22		15,4	-
	EVRE 5				5	21	19,2	-
JAFFE SİEMENS	EVRE 1	13	1				-	7,1
	EVRE 2	2	6				25	-
	EVRE 3		3	26	3		9,4	9,4
	EVRE 4			1	23		4,2	-
	EVRE 5				4	17	19	-
ENZİMATİK KREATİNİN	EVRE 1	13	1				-	7,1
	EVRE 2	3	4	1			37,5	12,5
	EVRE 3		3	26	3		9,4	9,4
	EVRE 4			1	22	1	4,2	4,2
	EVRE 5				3	18	14,3	-
SİSTATİN C	EVRE 1	11	2	1			-	21,4
	EVRE 2	2	5	1			25	12,5
	EVRE 3	1	4	18	8	1	15,6	28,1
	EVRE 4			2	17	5	8,3	20,8
	EVRE 5				1	19	5	-
CYS-C + KREATİNİN	EVRE 1	11	3				-	21,4
	EVRE 2		6	2			-	25
	EVRE 3		4	23	5		12,5	15,6
	EVRE 4			9	12	3	37,5	12,5
	EVRE 5				4	16	20	-

5. TARTIŞMA

Kreatinin, böbrek hastalıklarının teşhis ve tedavisinde, böbrek diyalizinin izlenmesinde yaygın olarak kullanılan biyokimyasal parametrelerden biridir. Bu araştırmada LC MS/MS ve rutin spektrofotometrik yöntemleri ile ölçülen kreatinin düzeylerini karşılaştırmak ve eGFR hesabı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın sonuçlarının irdelenmesini 3 farklı hedef doğrultusunda inceledik.

- **Analitik Hedefler**

Karşılaştırma yöntemi olarak belirlenen LC-MSMS kreatinin analizi için bütün parametreler optimize edilip doğruluğunun ve hassasiyetinin arttırılması, ön işlem için protein çöktürme yönteminin belirlenmesi ve yöntem için gerekli yöntem validasyon analizlerinin yapılması gibi ölçümü etkileyecek ve doğruluğu irdeleyecek çalışmalar gerçekleştirilerek kesin bir ölçüm yöntemi hazırlanması.

- **İstatistiksel Analiz Hedefleri**

Rutin spektrofotometrik yöntemleri, farklı istatistiksel analiz yöntemleri kullanılarak, referans ölçüm yöntemi olarak kabul edilen LC-MSMS yöntemi ile karşılaştırmak.

- **Tanısal Hedefler**

Kronik böbrek hastalığı gibi son yıllarda prevelansı artan hastalıkların tanısında kullanılan ve çalışmamıza konu olan eGFR hesaplama parametresinin çalışma sonucu çıkması muhtemel ölçüm farklılıklarının özellikle KBH evrelemesi üzerine etkisinin incelenmesi.

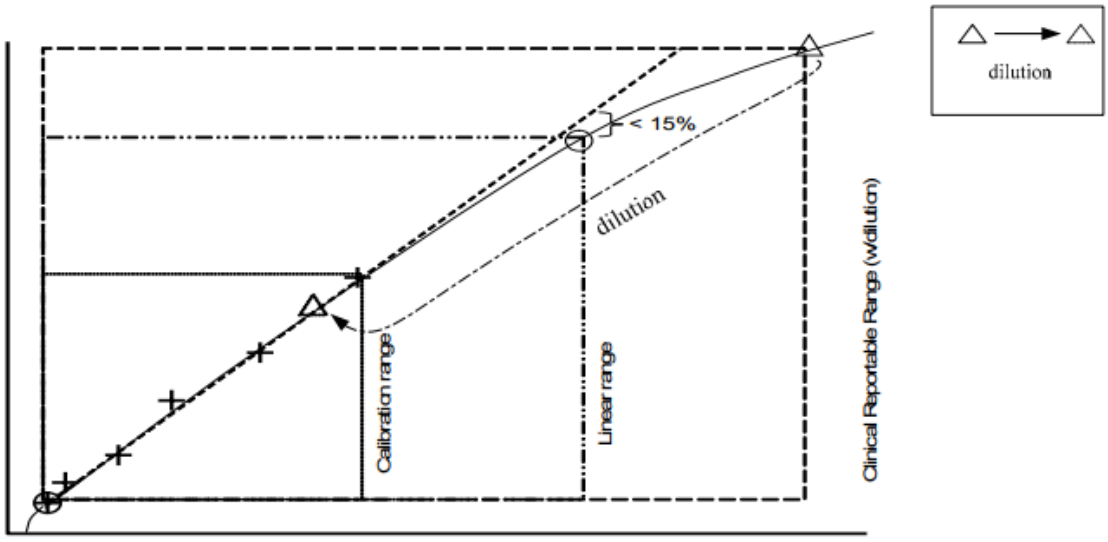
5.1.Analitik Hedefler

Kreatinin için referans yöntem olarak kromatografik yöntemler kabul edilmektedir. Yakın zamana kadar, kreatinin miktar tayini için referans metot olarak, izotop dilusyon kütle spektrometresine bağlı GC-MS/MS altın standart yöntemi olarak kullanılmaktaydı. Ancak yöntemin, çok basamaklı olması, yüksek eğitimli personel ihtiyacı göstermesi, kullanılan örnek miktarının fazlalığı, uzun analiz zamanı ve zahmetli olması nedeniyle daha iyi bir alternatif olarak LC MS/MS yöntemine olan ilgiyi arttırmıştır. Kreatinini

serumda belirlemek üzere LC-MSMS kullanımıyla ilgili önceki çalışmalarda, GC-MS/MS kullanıldığında gözlemlenenlerden daha büyük bir standart sapmalar rapor edilmiştir. Bu belirsizliğin çoğu, kullanılan iyonizasyon işlemlerinin kararlılığına bağlanabilir. Yeni geliştirilmiş elektrosprey iyonizasyonunun kullanımı, modern LC-MSMS cihazları ile elde edilebilen hassasiyeti büyük ölçüde artırmıştır [83].

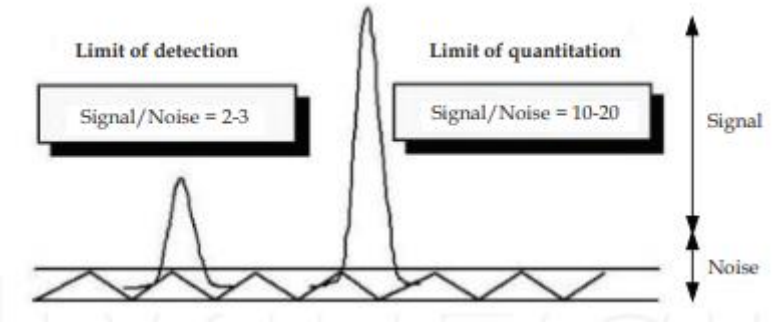
Nathan G. Dodder ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, referans yöntem olarak kabul edilen GC-MS/MS ile LC-MSMS yöntemleri farklı iki konsantrasyondaki kreatinin Standart Referans Materyalleri (SRM 967a) kullanılarak karşılaştırılmıştır. SRM 967a için ortalama GC-MS ve LC-MS ölçümleri arasında sırasıyla % 1,4'lük ve % 0.10'lık bir fark bulunmuştur. Yine aynı çalışmada SRM909b (liyofilize insan serum) kontrol numunesi kullanılarak GC-MS/MS ve LC-MSMS cihazlarının doğrulukları karşılaştırılmış; GC-MS/MS yönteminin kontrol numunesinden 1. Seviye (56.18 µmol/L) için %-1 ve 2. Seviye (467,4 µmol/L) için ise %-0,04 daha düşük olduğu bulunmuştur. Aynı durum LC-MSMS için ise 1. Seviyede %-0,5 ve 2. Seviyede % -0,23 daha düşük saptanmıştır [83]. Bütün bu literatür çalışmalarına göre elde edilen sonuçları karşılaştırarak hem pratikliği, ucuz maliyeti hem de GC-MS/MS ile benzer hassasiyete sahip olması nedeniyle çalışmamızda karşılaştırma yöntemi olarak LC-MSMS yöntemini belirledik ve bunun için modifiye LC MS/MS kreatinin yöntemi geliştirdik.

Analitik ölçüm yöntemlerinde lineer aralık genelde kalibrasyon aralığını da kapsayacak şekilde daha geniş aralıkta yapılmaktadır. Analitik ölçüm aralığı (AMR), örneğin doğrudan ölçüm aralığında olduğu aralıktır. AMR, yöntemin doğrusal aralığına girecek şekilde belirtilmelidir. AMR'nin kalibrasyon eğrisi içinde ya da lineer aralık içinde olması çalışılan teste göre verilecek bir karardır. Çünkü AMR'yi kapsayacak şekilde yüksek konsantrasyonlarda daha geniş bir kalibrasyon eğrisi oluşturmak kalibrasyon aralığının alt ucunda istatitstiksel bir belirsizliğe yol açabilir. Burada eğer çalışılan düşük seviyeler tıbbi karar seviyelerini etkileyecek seviyede değilse daha yüksek kalibratörler kullanılabilir. Çalışmamızda, AMR'yi kapsayacak bir lineer aralıkla birlikte düşük seviyelerde de yüksek doğrulukta sonuçlar elde edebileceğimiz bir kalibrasyon eğrisi oluşturduk. Kreatinin için doğrusal regresyon çizgisinin farkını 20 mg/dL'ye kadar kabul edilebilir olan ve şekil 'de belirtilen %15'ten az olduğunu bulduk.



Şekil 41. CLSI C50 protokolü linearite tanımlama grafiği.

Yöntem validasyon çalışmalarında analitik limit düzeylerini belirlemek için çeşitli farklı yöntemler mevcuttur. LC-MSMS gibi kromatografik yöntemlerde CLSI C50 protokolünde de belirtildiği gibi elde edilen piklerin sinyal/gürültü (Sinyal/Gürültü: S/N) oranlarına göre analitik limitler belirlenmektedir. Bunun için, S/N oranının 3'e denk geldiği seviye dedeksiyon limiti ve 10'a denk geldiği seviye ise kantitasyon limiti olarak belirlenmektedir (Şekil 42). Çalışmamızda, kreatinin için LC MS/MS'de S/N oranına göre belirlenen dedeksiyon limiti 0,01 mg/dL, kantitasyon limiti ise 0,04 mg/dL olarak tespit edilmiştir.



Şekil 42. Deteksiyon limiti ve kantitasyon limiti belirleme sinyal/gürültü grafiği.

Çeşitli kalite kuruluşları, kreatinin ölçümlerinde farklı seviyelerde total kabul edilebilir hata oranları (TAH) önermişlerdir. Royal College of Pathologists of Australasia Analytical Quality Requirements kreatinin için TAH' yı ±8 umol/L olarak kabul etmiştir [84]. CLIA için kabul edilebilir hedef değer ± 0,2 mg/dL ya da ± % 10 olarak belirtilmiştir

[85]. Çalışmamızda belirlediğimiz 0,5–0,9 ve 1,55 mg/dL seviyelerinin tümü uluslararası kuruluşların kabul edilebilir aralığında sonuç vermiştir.

Doğruluk çalışması her validasyon çalışmasında mutlaka analiz edilmesi gereken bir parametredir. Bunu belirlemenin çeşitli yöntemleri vardır. Bunlar arasında CLSI C50A protokolünde de önerdiği gibi standart referans materyallerin kullanımı da vardır. Çalışmamızda kullandığımız serum matriksi içeren SRM 967a materyali ile her iki seviyede yaptığımız tekrarlı ölçüm sonucu total kabul edilebilir hata oranlarından çok daha düşük, neredeyse belirtilen ortalama değerine birebir yakın konsantrasyonlarda tespit ettik.

Yöntem doğrululuğu için gerçekleştirdiğimiz geri elde çalışmasında; 10 mg/dL, 5 mg/dL, 2,5 mg/dL konsantrasyonunda üç kreatinin standardı kullandık. Geri elde kabul edilebilir aralığı Westgard'ında tanımladığı gibi CLIA ya da diğer uluslararası kuruluşların kabul edilebilir hata oranına göre belirledik. Elde ettiğimiz sonuçlar CLIA'nın önerdiği < %10 'e göre uygun bulunmuştur (Clia 2019).

Taşıma (carry over), EP-10 protokolüne göre yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen *t* değerinin, $t < -4,6$ ya da $t > 4,6$ değerlerinde anlamlı farklılık ($p<0,05$) oluşturduğu kabul edilir. Makro hesaplama yöntemleri kullanarak, 0,4 hesaplanan *t* değerinin EP 10' a göre taşıma için herhangi bir anlamlı farklılık göstermediği belirlenmiştir.

5.2.İstatistiksel Karşılaştırma

Böbrek işlevini değerlendirmede kullanılan GFR'yi doğru tahmin etmek için yöntem standardizasyonu ve harmonizasyonu çok önemlidir. Standart Referans Materyalleri (SRM), daha yüksek mertebeden klinik yöntemlerin doğruluğunu değerlendirmede çalışmayı veya ikincil referans materyallerini doğrulamak için kullanılır. Projemiz kapsamında temin ettiğimiz SRM 967a'yı LC MS/MS yöntemini doğulamanın yanı sıra, rutinde kullanılan Jaffe ve Enzimatik kreatinin yönemleri ile karşılaştırma sonucunda rutin yöntemlerin referans materyalleri CLIA' nın kabul sınırları içinde yer alan (± 0.2 mg/dL ya da ± 10%) aralıkta analiz etmesine karşılık LC MS/MS'e göre biraz daha düşük okuduğunu gözlemledik.

Rutin Tıbbi Laboratuvarların Standart Referans Materyaller'ine (SRM) sürekli erişimi sınırlıdır. Bu nedenle, oldukça spesifik ve doğruluğu yüksek bir yöntem ile karşılaştırma

yapmak oldukça önemlidir. Rutinde karşılaştıma için kullanabileceğimiz modifiye LC-MS/MS yöntemini geçerli kıldıktan sonra bu yöntemi diğer yöntemler ile karşılaştırma analizlerini SRM kullanarak gerçekleştirdik.

Klinik laboratuvarlarda yaygın kullanımı olan kreatinin ölçüm yöntemi, alkali ortamda pikrik asit ve kreatinin arasında renk oluşumuna dayanan Jaffe reaksiyonuna dayanmaktadır [6]. Jaffe reaksiyonu kreatinin için spesifik değildir; glukoz, proteinler, aseton, askorbik asit, alfa-keto bileşikler, bilirubin, sefalosporin grubu antibiyotikler gibi çok sayıda metabolit veya molekülden etkilenir [86]. Yenidoğan ve hiperbilirubinemili yetişkin hastalarda görülen yüksek bilirubin konsantrasyonları, yaygın olarak kullanılan kreatinin ölçüm yöntemlerine önemli ölçüde interfere olmaktadır. Bu nedenle laboratuarlarda kullanılan yöntemlerin sınırlamalarının irdelenmesi gerekmektedir. Karaciğer transplant hastaları için, serum bilirubin konsantrasyonlarının, Hitachi enzimatik ve Jaffe kreatinin testleri için bilirubin girişiminin önerilen sınırların üzerinde olduğunda sonuçları etkilediği belirtilmektedir [87]. Sıklıkla gözden kaçırılan diğer bir girişim, 6 aylık bebeklerde fetal hemoglobin (HbF) içeren hemolizli örneklerde görülür. HbF varlığında, negatif kreatinin sonuçları elde edilebilir. Yetişkin hemoglobinlerin aksine, Jaffe testinde NaOH varlığında alkali ortamda görülen hızlı kahverengi renk değişimi fetal hemoglobin (HbF)'de daha dirençli ve yavaştır [88].

Serum kreatinin ölçümünün kalitesi çeşitli analitik sorunlardan dolayı düşmektedir ve standardizasyonu da zordur. Komenda ve arkadaşları, Kanada'da yaptıkları bir çalışmada, kendi eyaletlerinde mevcut olan 107 klinik laboratuvarda, kreatinin ölçüm standardizasyonunu sağlamak üzere bir program başlatmışlardır [89]. Bu çalışmada, eyalette kreatinin ölçümünde büyük değişkenlik olduğu (% 4-54, ortalama % 23.9) tespit edilmiştir.

Referans Materyaller ve Ölçümler Enstitüsü (IRMM) tarafından yürütülen başka bir çalışmada ise, 1000'den fazla laboratuvarda, bir kreatinin örneğinin analizi için sunulan sonuçların çoğunluğunun, SRM değerinden %10-50 daha yüksek olduğu raporlanmıştır. Ayrıca rutin analizörlerdeki farklı yöntemler ile ölçülen kreatinin farklılıklarının klinik önemi yüksektir. Örneğin, referans aralığının üst sınırında (120 µmol /L) plazma kreatinin değerleri yönteme bağlı olarak 111 µmol/L ve 130 µmol/L arasında değişebilmektedir. Bu %17' lik fark, beklenen analitik varyasyonun çok ötesindedir ve klinik karar verme sürecini etkileyecektir. Chertow ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada serum

kreatinindeki 0,3mg/dL ve üzeri artışların mortaliteyi etkilediği,Lassnigg ve ark (2004) yaptığı çalışmada ise kardiyak cerrahi geçiren hastalarda, serum kreatininde 0,5 ve üzeri artışlarda ya da serum kreatininde 0,3 ve üzeri bir azalma olmasının sağ kalımı etkilediği bulunmuştur [90, 91]. Aynı zamanda AKIN ve KDİGO kriterlerine göre, Akut Böbrek Yetmezliği hastalarında 0,3 mg/dL' lik bir değişimin evrelemede kritik olduğu ve bu nedenle kullanılan ölçüm yönteminin hassasiyetinin tanısal olarak önemli olduğu vurgulanmaktadır [1, 17].

Literatürde, Jaffe yöntemi ile birçok interferansa bağlı olarak kreatinin değerlerinde yüksek sonuçlar elde edildiğini gösteren veriler mevcuttur. Rutin ölçümlerde ise bu interferansı düzeltmek adına birçok firma kompanse Jaffe yöntemi kullanmaktadır. Bu yöntemde, non-kreatinin kromojen düzeyine ait interferansın düzeltilmesi hedeflenmekte ve bunun için elde edilen kreatinin sonuçları 0,2–0,32 mg/dL daha düşük raporlanmaktadır. Rutin ölçümlerde bu interferansı düzeltmek adına kendi markalı kitleri ile çalışıldığında Siemens cihazlarında 0,3 mg/dL, Roche cihazlarında ise okunan tüm sonuçlardan 0,2 mg/dL çıkarılmaktadır. Bu yaklaşım, non-kreatinin kromajenlerin katkısının sabit olduğunu varsaymakta ve yaşlılar gibi düşük protein düzeyleri olan ve düşük kreatinin üretimi olan bireylerdeki non-kreatinin kromojen düzeyindeki değişimi hesaba katmamaktadır. Çalışmamızda elde ettiğimiz sonuçlar doğrultusunda Jaffe ve Enzimatik Kreatinin yöntemlerini esas aldığımız LC-MSMS yöntemi ile karşılaştırdığımızda, sonuçların daha düşük olduğunu gözlemledik. Bunun sebebinin yöntemdeki non-spesifik ölçümlerden kaynaklanan tutarsızlık ve düşük analitik hassasiyet olduğu düşünülmektedir. Yöntemler arası yaptığımız korelasyon ve regresyon analizi sonucu ise esas aldığımız yöntem ile Siemens ve Roche firmalarına ait Jaffe yöntemlerini karşılaştıracak olursak Siemens ve Roche'un yüksek korelasyon ile birlikte regresyon analizinde uyumluluk gösterdiği gözlemlenmiştir.

Serum kreatinini anlizlerinde enzimatik yöntemin Jaffe kadar interferansı yoktur ve ayrıca daha özgül bir yöntem olarak kabul edilir. IDMS ile izlenebilir enzimatik kreatinin deneylerini değerlendiren çok merkezli bir çalışmada doğrulama çalışmaları yapıldığı ve enzimatik yöntemlerin çoğunun IDMS ile yeterli şekilde kalibre edildiğinde, kreatinin izlenebilirliğini ve standardizasyonunu geliştirerek düşük serum kreatinin değerleri için hedeflenen kabul edilebilir toplam analitik hata olan % 8 seviyelerinin elde edildiği rapor edilmiştir [92]. George J. Schwartz ve arkadaşlarının pediyatrik grupta Kronik böbrek

hastalığı ile ilgili yapmış oldukları bir çalışmada enzimatik kreatinin yöntemini HPLC ile oluşturulun kreatinin yöntemi ile karşılaştırmışlardır. Çalışma sonucunda serum kreatinin seviyesinin 0,4-4,5 mg/dL olduğu aralıkta enzimatik kreatinin yöntemi ile % 7 daha yüksek sonuçlar elde edilmiştir. Ancak pediatrik grupta daha düşük serum kreatinin seviyelerini de gözlemlemek için yaptıkları çalışmada ise enzimatik yöntem ile % 18 daha düşük sonuçlar elde etmişlerdir [93]. Çalışmamızda, enzimatik yöntemle elde ettiğimiz kreatinin sonuçlarının, LC-MSMS yöntemi ile ölçtüğümüz kreatinin sonuçları ile karşılaştırdığımızda enzimatik yöntem sonuçlarından yaklaşık %5 daha düşük olduğunu gözlemledik. Enzimatik yöntemi, referans aldığımız LC MS/MS yöntemi ile karşılaştırdığımızda korelasyon analizi sonucu yüksek korelasyon gösterdiğini, bununla birlikte yaptığımız regresyon analizine göre de iki yöntemin birbiryle uyumlu olduğunu gözlemledik.

Cinsiyet, vücut kütlesi, ırk ve yaş faktörlerinden birkaçı ya da hepsi ile düzeltilmiş serum kreatinin kullanılarak tarif edilmiş en az kırk farklı eGFR formülü bulunmaktadır [25]. Bu formüller içinde Cockcroft and Gault (CG) ve Modification of Diet in Renal Disease (MDRD) eşitlikleri en çok kullanılan ve önerilen formüllerdir [3]. Bu formüllere 2009 yılında kullanılmaya başlanan Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü de eklenmiştir. CKD- EPI hesaplama yöntemi, Sağlık Bakanlığı'nın günümüzde rutin kullanımda önerdiği yöntemdir. Biz de çalışmamızda, laboratuarımızda rutin kullanımda olan CKD-EPI yöntemini kullanarak GFR hesabı yaptık. CKD-EPI hesaplama yöntemi ölçülebilir parametre olarak sadece kreatinin değişkenini içeren bir hesaplama yöntemidir. Bu nedenle kreatinin ölçümündeki hatalar eGFR değeri üzerinde etkilidir. Özellikle kreatinin değerlerinin düşük olduğu aralıkta doğru sonuç verebilmesi için ölçülen yöntemin hassasiyeti kritik önemi sahiptir. Yeni ölçüm tekniklerinin geliştirilmesiyle bu sorunlar çözülmeye çalışılsa da, bu problemin güncelliğini koruduğu, GFR'si 30ml/dk'dan yüksek olan hastaların tekrarlanan ölçümlerinin kreatinin için varyasyon katsayısının % 11 olarak bulunduğu bazı çalışmalarla ortaya konmuştur. Bu nedenle doğru hesaplama için doğru ölçüm sonucu oldukça önemlidir. Ölçüm yöntemi kaynaklı farklılıklar klinik karar noktalarında oldukça önemlidir. Renal hastalıklar içinde tanı ve tedavi önemi çok yüksek olan KBH' nın erken ve orta evreleri genellikle asemptomatik olduğundan, bu evrelerse hastalığın insidans ve prevalansını belirlemek zordur. Toplum temelli çalışmalarda, KBH taramasında kullanılan GFR hesaplama formüllerindeki bazı kısıtlılıkları ve eGFR'si düşük olan yaşlıların toplumdaki oranının

yüksekliği nedeniyle KBH sıklığının olduğundan yüksek bulunduğu tespit edilmiştir [94, 95]. Bununla birlikte, hatalı kreatinin ölçümüne bağlı GFR'nin yanlış hesaplanması, tanı ve evrelemede kullanılan keskin sınırlı tanımlamalar da göz önüne alındığında, özellikle azalmış GFR'nin sık görüldüğü yaşlı popülasyonun normal böbrek fonksiyonlarına rağmen böbrek hastalığına sahip olduğu şeklinde yanlış olarak sınıflandırıldığı anlamına gelebilir [96]. Çalışmamızda da önemli amaçlarımızdan biri olan yöntemsel hataların GFR'ye olan etkisini incelemekti. Bunun için esas aldığımız LC-MSMS kreatinin yöntemi ile hesaplanan GFR'yi diğer yöntemlerin eGFR verileri ile karşılaştırdık. Elde ettiğimiz verilerin korelasyon ve regresyon analizlerinin sonuçlarında her 2 yöntemin de yüksek korelasyon ve regresyon sonuçları LC-MSMS ile uyumluluk göstermiştir.

Serum kreatinin düzeyi, pratikliği ve ucuzluğu nedeniyle böbrek fonksiyonunun standart laboratuvar ölçütü olarak kullanılmasına rağmen, GFR'nin iyi bir göstergesi değildir. Serum kreatinin düzeyi ile GFR arasında doğrusal olmayan bir ilişki vardır. Daha önceki çalışmalar, GFR belirteçleri olarak plazma kreatinin ve kreatinin klirensine odaklanmışlardır, ancak GFR, %50 ya da daha fazla azalıncaya kadar plazma kreatinin düzeyi genellikle artmaz ve normal kreatinin düzeyleri olan hastaların çoğunun GFR' ları sıklıkla daha düşüktür. Aynı zamanda, kreatinin klirensi genellikle GFR'yi olduğundan yüksek gösterir [97]. Bu nedenle renal fonksiyonları göstermek için alternatif belirteçlerin de kullanımı ön plana çıkmıştır.

Sistatin C tüm çekirdekli hücreler tarafından sabit bir oranda üretilen, glomerüllerden serbestçe filtre edilen, tübüler sekresyon ve reabsorbsiyonu olmayan ve endojen GFR belirteci olarak kullanımı artan bir moleküldür [98]. Helin ve ark. [99] 56 çocukta sistatin C ile ilgili yapmış oldukları çalışmada normal GFR'na sahip çocukların yaş ve kreatinin arasında önemli derecede olumlu bir ilişki saptarken ($r=0.74$; $p<0,001$) sistatin C ile bu şekilde bir ilişki bildirmemişlerdir. Corderio ve ark.'nın [100] 254 çocuk hasta üzerinde yapmış oldukları araştırmada da kreatinin düzeylerinin kilo ve boy ile önemli ölçüde değiştiği gözlenirken, bu değişkenlerin sistatin C ile arasında bir ilişki saptamamışlardır. Nalan çakıcı ve ark. [101] yapmış olduğu çalışmada Sistatin C ve kreatinin düzeyinin düşük GFR'yi saptamadaki performansı Schwartz GFR <90 ml/dk/1,73 m^2 referans alınarak değerlendirilmiştir. Sistatin C duyarlılığının %70,8, özgüllüğünün %58,4, eğri altında kalan alanın (AUC) ise 0,63 ±0,05 ($p=0,02$) olduğu saptanmıştır. Helin ve ark.[99], Ylinen ve ark.[102] ve Filler ve ark.[50], yapmış oldukları çalışmalarda Sistatin

C’nin daha duyarlı olduğunu bildirilmiştir. Ancak Sistatin C düzeyi immünsupresyon durumunda, inflamasyon, malign hastalıklarda, steroid tedavisinde ve kemoterapi alımında etkilenmekte olup, böbrek fonksiyonlarını değerlendirmekte yeterli olamamaktadır [57, 103]. Sistatin C’nin GFR’yi yansıtmadaki değeri ile ilgili değişik olgu gruplarını içeren çeşitli çalışmalar mevcuttur. Ancak transplant hastalarındaki kullanımı hem sınırlı hem de sonuçları henüz tartışmalıdır. Zahran ve ark. [104] transplant hastalarında GFR ölçümünde sistatin C’nin serum kreatinine herhangi bir üstünlüğü olmadığını bildirirken, Keevil [56] ve Risch’in [105] yaptıkları çalışmalar da sistatin C’nin bireysel varyasyonunun serum kreatinine göre daha fazla olduğunu, bu nedenle serum kreatinin değerinin, sistatin C’ye göre daha iyi bir belirteç olduğunu ifade etmişlerdir. Bizim çalışmamızda Sistatin C ile kreatinin arasında güçlü korelasyon bulunmuştur. Ayrıca sistatin C ile hesaplanan GFR verileri incelendiğinde yüksek korelasyon ile birlikte regresyon analizinde ise LC-MSMS kreatinin ile hesaplanan GFR ile uyumlu olduğu görülmüştür.

Serum β trace proteini (BTP), düşük molekül ağırlıklı (25 kD) ve prostaglandin D sentaz sınıfı bir enzimdir. BTP, santral sinir sisteminde glial hücreler tarafından sabit bir hızda sentezlenir, glomerüllerden serbestçe filtre edilerek proksimal tübüllerden reabsorbe edilir ve minimal böbrek dışı eliminasyona uğrar [57]. Son çalışmalarda BTP’nin erişkin hasta populasyonunda sistatin C gibi GFR’ı yansıtan bir belirteç olabileceği vurgulanmıştır [59]. Ancak Anıl Baysoy ve arkadaşlarının BTP ve Sistatin C ile ilgili yapmış olduğu biyolojik varyasyon çalışmada BTP’nin daha yüksek biyolojik varyasyona sahip olduğu ve bunun nedeninin vücut sıvılarında (beyin omurilik sıvısı, seminal plazma, plazma ve idrar gibi) dağılımının geniş olmasının yanı sıra beyin, retina, melanositler, kalp ve böbrekler gibi birçok dokudan sentezlenmesi olabileceğini belirtilmiştir. Bununla birlikte tiroid fonksiyon bozuklukları, hepatik fonksiyon bozuklukları, enfeksiyon gibi bir çok patolojik durumdan etkilendiğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır [106]. Çalışmamızda elde ettiğimiz BTP sonuçları literatürle uyumlu olacak şekilde kreatinin ile yüksek korelasyon göstermesine rağmen, bazı değerlerde yüksek sapmalar gözlemlenmiştir. Bu nedenle hala kreatinine ya da sistatin C’ye alternatif bir belirteç olarak kullanımının uygunluğu tartışma konusudur.

Arjinin metilasyonunun bir ürünü olan simetrik dimetilarjinin (SDMA), böbrekler tarafından metabolize edilmez. SDMA'nın ortaya çıkan atılımı, normal GFR korunduğu

zaman nispeten sabittir [107]. Ancak, böbreğin GFR'sinde ortaya çıkan bir düşüşte, SDMA'da bir yükselme görülür [72]. 2006 yılında 18 çalışma ile yapılan bir meta analiz çalışmasında SDMA ile böbrek fonksiyonları arasında anlamlı yüksek korelasyonlu sonuçlar elde edilmiştir [73]. Joe El-Khoury ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada SDMA'ın üstünlüğünün biyolojik varyasyonunun (%5,8), BTP'nin biyolojik varyasyonundan (% 8,6) daha düşük olduğunu göstermektedir [108]. Çalışmamızda ölçtüğümüz SDMA sonuçlarını kreatinin sonuçları ile karşılaştırdığımızda istatistiksel olarak anlamlı bir korelasyon sonucu bulunmuştur.

5.3.Tanısal Hedefler

Kronik böbrek hastalığı tanımındaki parametrelerden biri de GFR'deki 3 aydan uzun süren <60 ml/dk/1,73m^2 düşüklüktür. Burada kritik nokta sınır değerlerde kreatinin ölçümündeki sapmalar takipteki hastaların kaçırılmasına neden olabilmektedir. Bu sapmalar artan yaşla birlikte azalmış kreatinine bağlı olarak daha da önemli olabilmektedir.

KBH evrelemesi hastaların tanısından itibaren bütün tedavi süreçlerinde önemli bir aşamadır. Avrupa Böbrek En İyi Klinik Uygulama Kılavuzu (ERBP)' na göre bu hastalarda eGFR değerinin farkında olmak, ilaç dozlarını ayarlamak için, oldukça önemli olduğunu ve yaşlı hastalarda, kreatinin üretimiyle ilgili bazı düzeltmeler yapmaksızın, sadece doğrudan serum kreatinin düzeyine göre yapılacak GFR hesaplamaları yeterince doğru bir sonuca erişemeyeğini belirtmektedir. Böbrek işlevinin yanlış hesaplanması durumunda ise, KBH tedavisi ve renal atılım ile uzaklaştırılan ilaçların güvenli kullanımları tehlikeli hale gelebilir.

Çalışmamızda LC-MSMS kreatinin verileri ile evreleme KDIGO' nun önerdiği kriterlere göre sınıflandırıldık ve diğer kreatinin ve sistatin C GFR hesaplama yöntemlerine göre yapılan evreleme sonuçlarını karşılaştırdık (Tablo 17). Karşılaştırdığımız verilerde evreleme sonuçlarını LC MS/MS kreatinin eGFR'a göre evrelerdan daha düşük evrede olanlara daha düşük tahmin ettiği için under-estimate, yüksek tahmin edilenlere ise over-estimate olarak değerlendirdik. LC MS/MS yöntemini referans olarak belirlediğimiz için bu yönteme göre under-estimate ve over-estimate yüzde oranları ile karşılaştırma çalışmalarını gerçekleştirdik.

Değerlendirmeyi ilk olarak kreatinin ölçüm yöntemleri ve bunların GFR'ın CKD-EPI hesaplama formülüne göre yapacak olursak Evre 1 olarak belirlenen hastalarda sapmanın çok düşük çıkmaktadır. Buna karşın bütün sapmalar Evre 2'de hem yanlış yüksek hem de yanlış düşük olarak dağılım göstermiştir. Bunun nedeni kreatinin ölçümünde yaş ile birlikte hafif düşük kreatinin seviyerini yöntemlerin çok iyi analiz edemediği ve sapmaların çok yüksek olduğu görülmektedir. Aynı zamanda kreatinin, GFR ile çok iyi korelasyon göstermediği ve GFR'de belirli bir düşüşte azda olsa tubuler reabsorbe olduğu için Evre 2'de farklı yöntemlerin farklı sonuçlar elde edilmiştir. Ancak Evre 3'te bu geniş hatalı sonuç dağılımı görülmemiştir. Bu da bu hipotezimizide desteklemektedir. Evre 4' te ise yine diğer kreatinin yötemleri ile çok yüksek bir uyumsuzluk görülmediği ancak evre 5 verilerinde bazı sonuçların evre 4'e kaydığı görülmektedir. Bütün veriler total olarak analiz edersek Jaffe yöntemlerindeki hatalı evreleme oranları enzimatiğe göre daha yüksek çıkmıştır. Bu durumda enzimatik ölçüm yönteminin evrelemede daha uyumlu olduğunu sonucuna varılmaktadır.

Total olarak kreatinin ölçümlerinde LC-MSMS ölçüm yönteminin diğer yöntemlere göre daha yüksek sonuçlar verdiğini belirtmiştik. Bu durumda CKD-EPI ile hesaplanan GFR sonuçlarıda diğer kreatinin yöntemlerine göre düşük çıkmıştır. Evrelemede çıkan sonuçlara göre Jaffe yöntemlerine göre evrelerde aynı sonuçlar elde edilmiştir.

ERBP aynı zamanda yaşlı hastalarda böbrek işlevini değerlendirmek için, sadece serum kreatinin düzeyiyle yetinmek yerine, kreatinin üretim değişimlerine göre tahmin formüllerinin kullanılmasını tavsiye etmekte ve burada alternatif olarak sistatin C kullanılarak hesaplanan GFR değerlerininde kullanılabileceğini de önermektedir. Çalışmamızda sistatin C ile evrelemede kreatinin ile karşılaştırmada yüksek oranlarda under-estimate ve over-estimate oranlarına sahipti. Buna karşın sistatin C ve kreatinin ile kombine edilmiş yöntem kullanıldığında bu oranların düştüğü tespit edilmiştir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Kreatinin ölçümünde görülen hata kaynaklarını incelemek için ülkemiz dışında birçok laboratuvarda karşılaştırma ya da referans materyal ve yöntem ile doğrulama çalışmaları yapılmıştır. Çalışmalara katılan laboratuvarlar elde edilen sonuçlar neticesinde kendi yöntemlerini ve sonuçlarını düzeltecek hesaplamalar ve önlemler almıştır. Ülkemizde de çeşitli nedenlere bağlı olarak sıklığı giderek artan kronik hastalıklardan biri olan Kronik böbrek hastalığının tanı ve takibinde önemli bir test olan kreatinin ölçümlerinin doğruluğunun saptanmasının önemi giderek artmaktadır. Bu nedenle klinik laboratuvarlar tarafından üretilen kreatinin ölçümlerinin karşılaştırıldığı geniş katılımlı bir çalışma ihtiyacı hissedilmektedir. Bunun için öncelikle rutin kullanımda olan spektrofotometrik yöntemler metodolojik olarak daha üst sıralarda yer alan kromatografik yöntemler ile karşılaştırılmalı, sonuçlar SRM'ler kullanılarak değerlendirilmelidir. Ayrıca serum kreatinin konsantrasyonları ile eGFR değerleri arasında ters ilişki olduğundan özellikle düşük kreatinin konsantrasyonlarında kreatinin ölçümündeki doğruluk ve tekrarlanabilirlikteki azalma etkisi büyük olmaktadır. Bu nedenle böbrek yetmezliğinin ilk evrelerindeki eGFR değerleri düşük kreatinin düzeylerindeki ölçüm doğruluğunun mutlaka kanıtlanması ihtiyacını doğurmaktadır. Klinik önemi bu denli yüksek ve ölçüm yöntemine bağlı birçok interferansa açık bu test için, kendi laboratuvarımızda çalışılan numuneleri, ek olarak diğer rutin spektrofometrik yöntemler ve karşılaştırma yöntemi olarak hassasiyeti yüksek LC-MSMS ile karşılaştırdık. Hata kaynaklarımızı irdelediğimiz son derece önemli bir tez çalışması sonucunda rutin kullanımda enzimatik yöntemin daha doğru sonuçlar verebileceğini ve oluşturduğumuz referans yöntemle takip edilebilir bir rutin yöntemin daha standardize olabileceği sonucuna ulaştık.

7. KAYNAKLAR

1. Andrassy, K.M., *Comments on 'KDIGO 2012 clinical practice guideline for the evaluation and management of chronic kidney disease'.* Kidney international, 2013. **84**(3): p. 622-623.

2. Qiu, X., et al., *The diagnostic value of serum creatinine and cystatin c in evaluating glomerular filtration rate in patients with chronic kidney disease: a systematic literature review and meta-analysis.* Oncotarget, 2017. **8**(42): p. 72985.

3. Levey, A.S., et al., *A more accurate method to estimate glomerular filtration rate from serum creatinine: a new prediction equation.* Annals of internal medicine, 1999. **130**(6): p. 461-470.

4. Bagshaw, S.M., C. George, and R. Bellomo, *A comparison of the RIFLE and AKIN criteria for acute kidney injury in critically ill patients.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2008. **23**(5): p. 1569-1574.

5. Randers, E. and E.J. Erlandsen, *Serum cystatin C as an endogenous marker of the renal function–a review.* Clinical chemistry and laboratory medicine, 1999. **37**(4): p. 389-395.

6. Myers, G.L., et al., *Recommendations for improving serum creatinine measurement: a report from the Laboratory Working Group of the National Kidney Disease Education Program.* Clinical chemistry, 2006. **52**(1): p. 5-18.

7. Henkel, E., A. Kokenge, and H. Meier, *A comparison of methods for creatinine determination.* Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie, 1980. **301**(2): p. 175-177.

8. Inker, L.A., et al., *Estimating glomerular filtration rate from serum creatinine and cystatin C.* New England Journal of Medicine, 2012. **367**(1): p. 20-29.

9. Arınsoy, T., Ö. Güngör, and İ. Koçyiğit, *BÖBREK FİZYOPATOLOJİSİ.*

10. Anguiano, L., et al., *Endothelin blockade in diabetic kidney disease.* Journal of clinical medicine, 2015. **4**(6): p. 1171-1192.

11. Cala, K., *Biomarkers of acute kidney injury: early recognition and timely intervention is a need of the hour*. 2010.

12. Abernethy, V.E. and W. Lieberthal, *Acute renal failure in the critically ill patient.* Critical care clinics, 2002. **18**(2): p. 203-222.

13. Demir, N., *Hastanede yatan erişkin hastalarda gelişen akut böbrek yetmezliği insidansı.* 2011.

14. Merten, G.J., et al., *Prevention of contrast-induced nephropathy with sodium bicarbonate: a randomized controlled trial.* Jama, 2004. **291**(19): p. 2328-2334.

15. Ympa, Y.P., et al., *Has mortality from acute renal failure decreased? A systematic review of the literature.* The American journal of medicine, 2005. **118**(8): p. 827-832.

16. Bellomo, R., et al., *Acute renal failure–definition, outcome measures, animal models, fluid therapy and information technology needs: the Second International Consensus Conference of the Acute Dialysis Quality Initiative (ADQI) Group.* Critical care, 2004. **8**(4): p. R204.

17. Mehta, R.L., et al., *Acute Kidney Injury Network: report of an initiative to improve outcomes in acute kidney injury.* Critical care, 2007. **11**(2): p. R31.

18. Fliser, D., et al., *A European Renal Best Practice (ERBP) position statement on the Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) clinical practice guidelines on acute kidney injury: part 1: definitions, conservative management and contrast-induced nephropathy.* Nephrol Dial Transplant, 2012. **27**(12): p. 4263-72.

19. Uchino, S., et al., *An assessment of the RIFLE criteria for acute renal failure in hospitalized patients.* Critical care medicine, 2006. **34**(7): p. 1913-1917.

20. Abosaif, N.Y., et al., *The outcome of acute renal failure in the intensive care unit according to RIFLE: model application, sensitivity, and predictability.* American journal of kidney diseases, 2005. **46**(6): p. 1038-1048.

21. Ricci, Z., D. Cruz, and C. Ronco, *The RIFLE criteria and mortality in acute kidney injury: a systematic review.* Kidney international, 2008. **73**(5): p. 538-546.

22. Kellum, J.A. and N. Lameire, *Diagnosis, evaluation, and management of acute kidney injury: a KDIGO summary (Part 1).* Critical care, 2013. **17**(1): p. 204.

23. YALÇIN, A.U. and T. AKPOLAT, *KRONİK BÖBREK YETMEZLİĞİ.*

24. El Nahas, A.M. and A.K. Bello, *Chronic kidney disease: the global challenge.* The Lancet, 2005. **365**(9456): p. 331-340.

25. Levey, A.S., et al., *CKD: common, harmful, and treatable—World Kidney Day 2007.* American Journal of Kidney Diseases, 2007. **49**(2): p. 175-179.

26. Gilbertson, D.T., et al., *Projecting the number of patients with end-stage renal disease in the United States to the year 2015.* Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**(12): p. 3736-3741.

27. Coresh, J., et al., *Prevalence of high blood pressure and elevated serum creatinine level in the United States: findings from the third National Health and Nutrition Examination Survey (1988-1994).* Archives of internal medicine, 2001. **161**(9): p. 1207-1216.

28. Levey, A.S., et al., *K/DOQI clinical practice guidelines for chronic kidney disease: evaluation, classification, and stratification.* American Journal of Kidney Diseases, 2002. **39**(2 SUPPL. 1).

29. Tonelli, M.A., et al., *Introduction: The case for updating and context.* Kidney international supplements, 2013. **3**(3): p. 266-+.

30. Tanrıverdi, M., *Kronik Böbrek Hastalığı*. Konuralp tıp dergisi, 2010. **2**(2): p. 27-32.

31. Levey, A.S., L.A. Stevens, and J. Coresh, *Conceptual model of CKD: applications and implications.* American journal of kidney diseases, 2009. **53**(3): p. S4-S16.

32. Bywaters, E. and D. Beall, *Crush injuries with impairment of renal function.* Br Med J, 1941. **1**(4185): p. 427-432.

33. TİRYAKİ, Ö. and C. USALAN, *Glomerüler Filtrasyon Hızının Değerlendirilmesi.* Turkiye Klinikleri Journal of Internal Medical Sciences, 2006. **2**(38): p. 1-7.

34. Perrone, R.D., N.E. Madias, and A.S. Levey, *Serum creatinine as an index of renal function: new insights into old concepts.* Clinical chemistry, 1992. **38**(10): p. 1933-1953.

35. Manjunath, G., M.J. Sarnak, and A.S. Levey, *Estimating the glomerular filtration rate: dos and don'ts for assessing kidney function.* Postgraduate medicine, 2001. **110**(6): p. 55-62.

36. Price, C.P. and H. Finney, *Developments in the assessment of glomerular filtration rate.* Clinica chimica acta, 2000. **297**(1-2): p. 55-66.

37. Gaspari, F., N. Perico, and G. Remuzzi, *Measurement of glomerular filtration rate.* Kidney International Supplement, 1997(63).

38. Stevens, L.A. and A.S. Levey, *Measurement of kidney function.* Medical Clinics, 2005. **89**(3): p. 457-473.

39. Brown, S. and P. O'Reilly, *Iohexol clearance for the determination of glomerular filtration rate in clinical practice: evidence for a new gold standard.* The Journal of urology, 1991. **146**(3): p. 675-679.

40. Blaufox, M., et al., *Report of the Radionuclides in Nephrourology Committee on renal clearance.* Journal of Nuclear Medicine, 1996. **37**(11): p. 1883-1888.

41. Shemesh, O., et al., *Limitations of creatinine as a filtration marker in glomerulopathic patients.* Kidney international, 1985. **28**(5): p. 830-838.

42. Warrell, D.A., et al., *Oxford textbook of medicine*. Vol. 2. 2003: Oxford University Press, USA.

43. İliçin, G., et al., *İç hastalıkları, 2. baskı.* Güneş Kitabevi, Ankara, 2003: p. 1791-95.

44. Thomas, M.E., et al., *The definition of acute kidney injury and its use in practice.* Kidney international, 2015. **87**(1): p. 62-73.

45. Assy, N., et al., *The changes in renal function after a single dose of intravenous furosemide in patients with compensated liver cirrhosis.* BMC gastroenterology, 2006. **6**(1): p. 39.

46. Aono, T., et al., *Normal ranges of blood urea nitrogen and serum creatinine levels in the community-dwelling elderly subjects aged 70 years or over--correlation between age and renal function.* Nihon Ronen Igakkai zasshi. Japanese journal of geriatrics, 1994. **31**(3): p. 232-236.

47. Park, J., et al., *Serum creatinine level, a surrogate of muscle mass, predicts mortality in peritoneal dialysis patients.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2013. **28**(8): p. 2146-2155.

48. Swan, S.K., *The search continues—an ideal marker of GFR*. 1997, Clinical Chemistry.

49. Schwartz, G., et al., *A simple estimate of glomerular filtration rate in children derived from body length and plasma creatinine.* Pediatrics, 1976. **58**(2): p. 259-263.

50. Filler, G., et al., *β-Trace protein, cystatin C, β2-microglobulin, and creatinine compared for detecting impaired glomerular filtration rates in children.* Clinical chemistry, 2002. **48**(5): p. 729-736.

51. Laterza, O.F., C.P. Price, and M.G. Scott, *Cystatin C: an improved estimator of glomerular filtration rate?* Clinical chemistry, 2002. **48**(5): p. 699-707.

52. Mussap, M., et al., *Cystatin C is a more sensitive marker than creatinine for the estimation of GFR in type 2 diabetic patients.* Kidney international, 2002. **61**(4): p. 1453-1461.

53. Janowski, R., et al., *Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping.* Nature Structural & Molecular Biology, 2001. **8**(4): p. 316.

54. Filler, G., et al., *Cystatin C as a marker of GFR—history, indications, and future research.* Clinical biochemistry, 2005. **38**(1): p. 1-8.

55. Herget-Rosenthal, S., et al., *Early detection of acute renal failure by serum cystatin C.* Kidney international, 2004. **66**(3): p. 1115-1122.

56. Keevil, B.G., et al., *Biological variation of cystatin C: implications for the assessment of glomerular filtration rate.* Clinical chemistry, 1998. **44**(7): p. 1535-1539.

57. Bökenkamp, A., et al., *β-Trace protein—A marker of kidney function in children:"Original research communication–clinical investigation".* Clinical biochemistry, 2007. **40**(13-14): p. 969-975.

58. Vynckier, L.L., et al., *Urinary β-trace protein as a new renal tubular marker.* Clinical chemistry, 2009. **55**(6): p. 1241-1243.

59. Pöge, U., et al., *Beta-trace protein-based equations for calculation of GFR in renal transplant recipients.* American Journal of Transplantation, 2008. **8**(3): p. 608-615.

60. Abbink, F.C., et al., *Beta-trace protein is not superior to cystatin C for the estimation of GFR in patients receiving corticosteroids.* Clinical biochemistry, 2008. **41**(4-5): p. 299-305.

61. Cooke, J.P., *Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases.* Circulation, 1997. **96**: p. 379-382.

62. Napoli, C. and L.J. Ignarro, *Nitric oxide and atherosclerosis.* Nitric oxide, 2001. **5**(2): p. 88-97.

63. Di Gangi, I.M., et al., *Simultaneous quantitative determination of NG, NG-dimethyl-l-arginine or asymmetric dimethylarginine and related pathway's metabolites in biological fluids by ultrahigh-performance liquid chromatography/electrospray ionization-tandem mass spectrometry.* Analytica chimica acta, 2010. **677**(2): p. 140-148.

64. Yılmaz, T., E.G. Koçan, and H.T. Besler, *The role of oxidants and antioxidants in chronic tonsillitis and adenoid hypertrophy in children.* International journal of pediatric otorhinolaryngology, 2004. **68**(8): p. 1053-1058.

65. Moon, G.J., et al., *Antioxidant effects of statins in patients with atherosclerotic cerebrovascular disease.* Journal of Clinical Neurology, 2014. **10**(2): p. 140-147.

66. Atlan, N., A. Dinçel, and C. Koca, *Diabetes mellitus ve oksidatif stres.* Türk Biyokimya Dergisi, 2006. **31**(2): p. 51-6.

67. Clarke, S., *Protein methylation.* Current opinion in cell biology, 1993. **5**(6): p. 977-983.

68. Boger, R.H., et al., *LDL cholesterol upregulates synthesis of asymmetrical dimethylarginine in human endothelial cells: involvement of S-adenosylmethionine–dependent methyltransferases.* Circulation research, 2000. **87**(2): p. 99-105.

69. Vallance, P., et al., *Endogenous dimethylarginine as an inhibitor of nitric oxide synthesis.* Journal of cardiovascular pharmacology, 1992. **20**: p. S60-2.

70. Cooke, J.P. and P.S. Tsao, *Is NO an endogenous antiatherogenic molecule?* Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology, 1994. **14**(5): p. 653-655.

71. Stühlinger, M.C., et al., *Asymmetric dimethyl L-arginine (ADMA) is a critical regulator of myocardial reperfusion injury.* Cardiovascular research, 2007. **75**(2): p. 417-425.

72. Busch, M., et al., *Asymmetrical (ADMA) and symmetrical dimethylarginine (SDMA) as potential risk factors for cardiovascular and renal outcome in chronic*

kidney disease–possible candidates for paradoxical epidemiology? Amino Acids, 2006. **30**(3): p. 225-232.

73. Nijveldt, R., et al., *The liver is an important organ in the metabolism of asymmetrical dimethylarginine (ADMA).* Clinical Nutrition, 2003. **22**(1): p. 17-22.

74. Sahillioğlu, B., et al., *25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması.* Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 2011. **36**(1).

75. Westgard, J., *Method validation-the detection limit experiment.* Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc, 2008: p. 168-176.

76. Ellison, S.L., M. Rosslein, and A. Williams, *Quantifying uncertainty in analytical measurement*, in *Quantifying uncertainty in analytical measurement*. 2000, Eurachem.

77. Bal, C., et al., *Biyokimya parametrelerinin ölçüm belirsizliğinin hesaplanması.* Turk J Biochem, 2014. **39**(4): p. 538-43.

78. Yılmaz, A., *Kimyasal analizlerde metod validasyonu ve verifikasyonu.* Turklab Rehber, 2012(01).

79. Chesher, D., *Evaluating assay precision.* The Clinical Biochemist Reviews, 2008. **29**(Suppl 1): p. S23.

80. Whorwood, C.B., et al., *Tissue localization of 11β-hydroxysteroid dehydrogenase and its relationship to the glucocorticoid receptor.* The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1992. **41**(1): p. 21-28.

81. Guideline, I.H.T. *Validation of analytical procedures: text and methodology Q2 (R1)*. in *International conference on harmonization, Geneva, Switzerland*. 2005.

82. Westgard, J.O. and P.L. Barry, *Basic Method Validation*. 2008: Westgard QC.

83. Dodder, N.G., et al., *Certification of creatinine in a human serum reference material by GC-MS and LC-MS.* Clinical chemistry, 2007. **53**(9): p. 1694-1699.

84. Serum, G., *Royal College of Pathologists of Australasia Allowable Limits of Performance*.

85. Hušková, R., et al., *Determination of creatinine in urine by tandem mass spectrometry.* Clinica chimica acta, 2004. **350**(1-2): p. 99-106.

86. Aydınbelge, B., et al., *" Gerçek" Kreatinin Ölçümü İçin Geliştirilen Kreatinin Ölçüm Yöntemlerinin Karşılaştırılması.* Turkish Journal of Biochemistry/Turk Biyokimya Dergisi, 2011. **36**(4).

87. Hardeman, D. and E. Backer, *Ultrafiltration of serum to eliminate bilirubin interference in the kinetic Jaffe determination of creatinine.* Clinical chemistry, 1991. **37**(11): p. 2010-2011.

88. Mazzachi, B., J. Phillips, and M. Peake, *Is the Jaffe creatinine assay suitable for neonates?* CLINICAL BIOCHEMIST REVIEWS, 1998. **19**: p. 82-82.

89. Komenda, P., et al., *Regional implementation of creatinine measurement standardization.* Journal of the American Society of Nephrology, 2008. **19**(1): p. 164-169.

90. Lassnigg, A., et al., *Minimal changes of serum creatinine predict prognosis in patients after cardiothoracic surgery: a prospective cohort study.* Journal of the American Society of Nephrology, 2004. **15**(6): p. 1597-1605.

91. Chertow, G.M., et al., *Acute kidney injury, mortality, length of stay, and costs in hospitalized patients.* Journal of the American Society of Nephrology, 2005. **16**(11): p. 3365-3370.

92. Piéroni, L., et al., *A multicentric evaluation of IDMS-traceable creatinine enzymatic assays.* Clinica Chimica Acta, 2011. **412**(23-24): p. 2070-2075.

93. Schwartz, G.J., et al., *Validation of creatinine assays utilizing HPLC and IDMS traceable standards in sera of children.* Pediatric Nephrology, 2009. **24**(1): p. 113-119.

94. Hallan, S.I., et al., *International comparison of the relationship of chronic kidney disease prevalence and ESRD risk.* Journal of the American Society of Nephrology, 2006. **17**(8): p. 2275-2284.

95. Johnson, R.J., J. Feehally, and J. Floege, *Comprehensive Clinical Nephrology E-Book*. 2014: Elsevier Health Sciences.

96. Murphy, D., et al., *Trends in prevalence of chronic kidney disease in the United States.* Annals of internal medicine, 2016. **165**(7): p. 473-481.

97. Burrows, N.R., Y. Li, and D.E. Williams, *Racial and ethnic differences in trends of end-stage renal disease: United States, 1995 to 2005.* Advances in chronic kidney disease, 2008. **15**(2): p. 147-152.

98. Pöge, U., et al., *Cystatin C-based calculation of glomerular filtration rate in kidney transplant recipients.* Kidney international, 2006. **70**(1): p. 204-210.

99. Helin, I., M. Axenram, and A. Grubb, *Serum cystatin C as a determinant of glomerular filtration rate in children.* Clinical nephrology, 1998. **49**(4): p. 221-225.

100. Cordeiro, V.F., et al., *Comparative study of cystatin C and serum creatinine in the estimative of glomerular filtration rate in children.* Clinica Chimica Acta, 2008. **391**(1-2): p. 46-50.

101. Yakıcı, N., *Çocuklarda glomerüler filtrasyon hızının değerlendirilmesinde serum sistatin C ile kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması.* 2009.

102. Ylinen, E.A., et al., *Cystatin C as a marker for glomerular filtration rate in pediatric patients.* Pediatric nephrology, 1999. **13**(6): p. 506-509.

103. Knight, E.L., et al., *Factors influencing serum cystatin C levels other than renal function and the impact on renal function measurement.* Kidney international, 2004. **65**(4): p. 1416-1421.

104. Zahran, A., M. Qureshi, and A. Shoker, *Comparison between creatinine and cystatin C-based GFR equations in renal transplantation.* Nephrology Dialysis Transplantation, 2007. **22**(9): p. 2659-2668.

105. Risch, L., A. Blumberg, and A.R. Huber, *Assessment of renal function in renal transplant patients using cystatin C. A comparison to other renal function markers and estimates.* Renal Failure, 2001. **23**(3-4): p. 439-448.

106. Orenes-Piñero, E., et al., *β-Trace protein: from GFR marker to cardiovascular risk predictor.* Clinical journal of the American Society of Nephrology, 2013. **8**(5): p. 873-881.

107. Bergamini, S., et al., *Relationship of asymmetric dimethylarginine to haemodialysis hypotension.* Nitric Oxide, 2004. **11**(3): p. 273-278.

108. El-Khoury, J.M., et al., *Comparison of symmetric dimethylarginine with creatinine, cystatin C and their eGFR equations as markers of kidney function.* Clinical biochemistry, 2016. **49**(15): p. 1140-1143.