

# Farklı İki Matris ve Isıda Paratiroid Hormon Ölçümleri

## Parathyroid Hormone Measurements in Two Different Matrices and Temperatures

Dr. Erdiñç SERİN,<sup>a</sup>  
Dr. Güler BUĞDAYCI,<sup>a</sup>  
Dr. Aysu KIYAN,<sup>b</sup>  
Dr. Özlem ŞAHİN<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Biyokimya ABD, <sup>b</sup>Halk Sağlığı ABD,  
<sup>c</sup>Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon ABD,  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi,  
İzzet Baysal Tıp Fakültesi, BOLU

Geliş Tarihi/Received: 09.03.2007  
Kabul Tarihi/Accepted: 02.06.2007

Yazışma Adresi/Correspondence:  
Dr. Erdiñç SERİN  
Abant İzzet Baysal Üniversitesi,  
İzzet Baysal Tıp Fakültesi,  
Biyokimya ABD, BOLU  
erdincserin@yahoo.com

**ÖZET Amaç:** Bu çalışmanın amacı oda ısısı ve soğuk şartlarda alınan ve çalışmaya kadar bu ısılarda bekletilen iki tip matristeki (serum ve plazma) paratiroid hormon (PTH) ölçümünü incelemektir.

**Gereç ve Yöntemler:** Laboratuvarımıza kan vermek üzere başvuran, paratiroid patolojisi bulunmayan 50 hastadan ardarda 4 tüpe (2 EDTA'lı, 2 jelli tüp) kan alınmış ve bunlardan EDTA'lı ve jelli tüplerden birer adedi soğukta (buza gömülerek), birer adedi de oda ısısında olacak şekilde santrifülemeye kadar 15 dk. bekletilmiştir. Daha sonra soğukta bekletilenler +4 °C'de, oda ısısında bekletilenlerse normal santrifüyle çevrilerek serum ve plazmalar ayrılmıştır. Tüm örneklerin PTH düzeyleri/Immülite 2000 hormon analizöründe aynı gün çalışıldı. PTH değerleri referans aralığının (16-87 pg/mL) dışında kalanlar çalışmaya dahil edilmemiş, böylece geriye kalan 30 kişinin örnekleri istatistiksel olarak değerlendirilmiştir. Normal serum-soğuk serum, normal plazma-soğuk plazma, normal serum-normal plazma ve soğuk serum-soğuk plazma şeklinde yapılan eşleştirmelerin istatistiksel değerlendirmesi için eşleştirilmiş t-testi kullanılmıştır. **Bulgular:** Tüm eşleştirmeler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmuştur (sırasıyla p= 0.035, p< 0.001, p< 0.001, p< 0.001). PTH değerleri EDTA'lı plazmalarda seruma göre daha yüksek saptanmıştır. Bu durum soğukta biraz daha yüksek, oda ısısında biraz daha düşük sonuçlarla birliktelik göstermiştir. **Sonuç:** Kan alma noktalarında PTH ölçümleri için soğuk zincire uyularak kan alınıyorsa veya serum yerine EDTA'lı plazmadan çalışılıyorsa, bu durumun kliniklerden gönderilen kanlar için de standart hale getirilmesi, yatan hasta ve ayaktan hastalar arasında gözlenebilecek PTH sonuçları uyumsuzluğunu ortadan kaldırabilir.

**Anahtar Kelimeler:** Paratiroid hormon; ekstrasellüler matris, ısı

**ABSTRACT Objective:** The purpose of this study was to investigate parathyroid hormone (PTH) measurements in two types of matrices (serum and plasma) collected and kept under room temperature and cold conditions. **Material and Methods:** Blood was drawn successively into 4 tubes (2 with EDTA, 2 with clot-activator gel) from 50 patients without parathyroid pathology who attended to our laboratory. Two of the tubes (one with EDTA and one with gel) were kept in cold (embedded in ice) and the other two in room temperature for 15 minutes until centrifugation. Then, the tubes kept in cold were centrifuged at 4°C and the tubes kept in room temperature underwent normal centrifugation to separate the sera and plasma. PTH levels were measured in all sample groups with Immulite 2000 immunoassay on the same day of blood collection. PTH levels outside the reference limits (16-87 pg/mL) were not included in the study and the samples from the remaining 30 subjects were statistically evaluated. Paired t-test was used for evaluating the statistical difference between the following pairs: normal serum-cold serum, normal plasma-cold plasma, normal serum-normal plasma, cold serum-cold plasma. **Results:** The difference between all pairs were statistically significant (p= 0.035, p< 0.001, p< 0.001, p< 0.001, respectively). PTH levels were higher in plasma with EDTA than in sera. This was associated with relatively higher levels in cold and lower levels in room temperature. **Conclusion:** If blood is drawn according to cold chain rules for PTH measurements at blood drawing units or plasma with EDTA is used instead of serum, standardization of this process for the blood sent from the clinics can eliminate the disparity in PTH measurements between outpatients and inpatients.

**Key Words:** Parathyroid hormone; extracellular matrix; temperature

**P**TH, insanlarda 11. kromozomun kısa kolu tarafından kodlanan, plazmadaki iyonize kalsiyumun miktarının azalmasına cevap olarak paratiroid bezleri tarafından sentezlenerek kana salınan 84 aminoasitli ve tek zincirli bir polipeptid hormondur.<sup>1-3</sup> Paratiroid bezindeki sentezin kodlanması 25 aminoasitlik pre- kısmı ile 6 aminoasitlik pro- kısımlarını da içerir. Bu 115 aminoasitlik ürüne preproparatiroid hormonu denmektedir. Pürüzlü endoplazmik retikuluma girişi ile amino ucundan 25 aminoasidi kopartılan bu tek zincirli hormon artık paratiroid hormonu olarak adlandırılmaktadır. Daha sonra Golgi cisimciğine geçen paratiroid hormonun 6 aminoasitlik parçası daha amino ucundan koparılarak PTH sentezlenmiş olur. Sentezlenen 1-84 PTH'ye sekretuar granüller içerisinde salgılanmayı beklerken ya da kana salgılandıktan hemen sonra proteolizle yıkılarak N-terminalinden 6 aminoasid daha kaybeder ve majör proteolitik ürün 7-84 PTH oluşur.<sup>4</sup> Normal kişilerde kandaki 1-84 PTH'nin 7-84 PTH'ye oranı yaklaşık 1/1'dir.<sup>5</sup> Kanda PTH'nin bu değişik moleküler formları karışım halinde bulunur. Bu PTH formları, tam PTH molekülü [PTH(1-84)] ve karaciğer ile paratiroid bezlerinden kaynak alan N- ve C- terminaleridir. İntakt olarak kana salınan PTH moleküllerinin yarı ömrü 4-5 dk.dır ve bu kısa sürenin sonunda karaciğer ve böbreklerde N-terminali, C-terminali ve orta-bölüm fragmanlarına ayrıştırılır.<sup>6</sup> PTH, böbrekler ve kemikler üzerindeki biyolojik etkisini, ilk 34 aminoasitlik kısım olan amino terminali (N-terminal) üzerinden gösterir. İlginç olan, PTH(1-84)'ın majör biyolojik etkilerini N-terminali yaratırken, kanda dolaşan esas çoğunluğu C-terminalinin oluşturmasıdır.<sup>3,7-11</sup>

PTH'nin bu farklı formlarının kanda dolaşması ölçümlerde de farklılıkları beraberinde getirmiştir. Daha önce "radioimmunoassay (RIA)"lerle yapılan PTH ölçümlerinde, daha çok C-terminaline duyarlı (mid- ve C-terminal PTH RIA'ları) epitoplardan kullanılırdı. Bu yöntem daha çok son dönem böbrek yetmezliğinde kanda yükselen bu fragmanların ölçülmesi açısından yarar sağlarken gerçek biyolojik etkinliğin ölçülmesinde fayda sağlayamamıştır. Daha sonra PTH ölçümlerinde 2. jenerasyon yöntemlerin gelişimi hızlanmıştır.

PTH ölçüm yöntemleri bu tür gelişimler gösterirken yöntemin PTH'nin ölçüleceği matriksten ve ortam ısısından etkilenip etkilenmediği de farklı araştırmaların konusu olmuştur. Biz bu çalışmada PTH'nin matriks değişikliğinden ve farklı matrikslerin ortam ısılarından ne derece etkilendiğini araştırdık.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Üniversitemiz etik kurulundan onay alındıktan sonra, hastanemiz merkez laboratuvarına aynı gün başvuran 50 hastadan (yaş ortalamaları  $\pm$  standart sapma (SS),  $45.2 \pm 8.9$ ) sözlü onay alınarak kan alındı. Hastalar, kan alımı öncesinde geçirdikleri veya sahip oldukları paratiroid patolojisi açısından sorgulandı; bu tür hastalar çalışmaya dahil edilmedi. Bu şekilde kanları alınan 50 hastadan PTH'değerleri referans aralığı (16-87 pg/mL) dışında çıkanlar da istatistiksel hesaplamaları yanılmaması açısından çalışmaya dahil edilmediler. Her hastadan 2 adet vakumlu kuru tüpe, 2 adet de EDTA'lı vakumlu tüpe (Beckton-Dickinson, Franklin, New Jersey, USA) kan alındı. Alınan kanlardan kuru ve EDTA'lı olanlardan birer adedi buz içine kondu. Diğer birer örnek ise normal tüp standına yerleştirildi ve bu şekilde santrifüj edilene kadar 2 tüp soğuk şartlarda, 2 tüp ise normal oda ısısında en fazla 15 dk. olacak şekilde bekletildi. Soğukta beklemiş olan kanlar  $+4^\circ\text{C}$ 'de, oda ısısında bekletilenler normal santrifüjde çevrildi. Ayrılan plazmalar ve serumların tümü aynı gün kemiluminesans yöntemi ile İmmülite 2000 (Diagnostics Products Cooperation (DPC), Los Angeles, CA, USA) cihazında yine aynı firmanın intakt PTH kitleri ile çalışıldı. DPC, kemiluminesans yöntemi ile PTH ölçümünde, PTH aminoasid dizininin 1-3 ve 9-15. aminoasidlerine duyarlı antikorlar kullanılmaktadır. Bu şekildeki yöntemle sadece tam molekül (intakt) PTH ölçümü yapılmaktadır.

EDTA'lı tüplerden elde edilen soğuk ve normal plazmalardaki PTH düzeyleri ile normal kuru tüplerden elde edilen soğuk ve normal serumlardaki PTH düzeyleri, dağılımın Kolmogorov-Smirnov testi ile normal olduğu saptandıktan sonra, istatistiksel olarak eşleştirilmiş t-testi kullanılarak karşılaştırıldı.

**TABLO 1:** Normal ve soğuk, serum ve plazmalarda ölçülen PTH (pg/mL) Ort ± SS, en düşük ve en yüksek değerleri.

n= 30	Soğuk serum	Normal serum	Soğuk plazma	Normal plazma
Ort ± SS (pg/mL)	41.85 ± 12.69	40.22 ± 12.88	57.65 ± 14.70	53.27 ± 14.1
En düşük (pg/mL)	16.4	15.5	26.7	25.4
En yüksek (pg/mL)	63.6	66.2	86	84.2

## BULGULAR

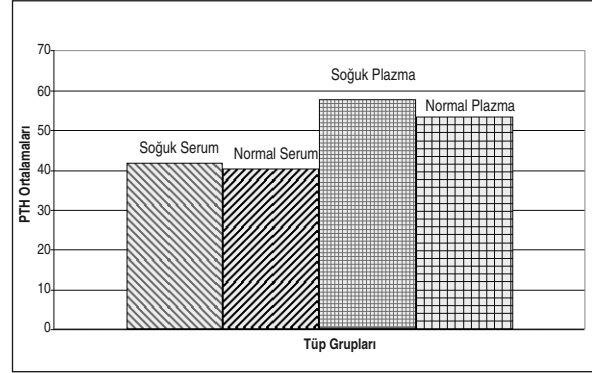
Bulunan PTH sonuçlarının en düşük, en yüksek ve Ort ± SS değerleri Tablo 1’de verilmiştir.

Oda ısısındaki plazma PTH düzeyi oda ısısındaki serum PTH değerine göre %25 daha yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ). Soğuk serum ve soğuk plazma PTH değerleri karşılaştırıldığında ise soğuk plazmadaki PTH değerleri %28 kadar daha yüksek bulundu ( $p < 0.001$ ).

Normal serum ile soğuk serum PTH sonuçları karşılaştırıldığında normal serum PTH değerlerinde %4’lük bir düşüklük gözlenirken ( $p = 0.035$ ), normal plazma ile soğuk plazma PTH değerlerinin karşılaştırılmasında bu farkın %8 olduğu gözlemlendi ( $p < 0.001$ ). Şekil 1 incelendiğinde PTH değerlerinin normal serumdan soğuk plazmaya doğru giderek yükseldiği görülmektedir. Tüm eşleştirmelerde istatistiksel olarak anlamlı ( $p < 0.05$ ) fark gözlemlendi.

## TARTIŞMA

PTH’nin ölçüm yöntemleri yıllar içinde moleküler peptid zinciri içerisindeki farklı aminoasit dizinlerine özgü antikorların üretimi ile 1. jenerasyon’dan 3. jenerasyona doğru sürekli olarak geliştirilmiştir. Bizim laboratuvarımızda kullandığımız yöntem kemiluminesans olup, tam molekül PTH’leri ölçmektedir. PTH’nin serum ve plazma arasındaki stabilite farkları birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır.<sup>7,12-15</sup> PTH’nin oda ısısında bekletilen serumlarda stabilitesini kaybettiğini ortaya koyan çalışmalar vardır.<sup>4,7,13,14,16,17</sup> Ancak bu çalışmaların bizim yaptığımız çalışmadan farkları, alınan örneklerin 2-3 gün bekletilerek çalışılması ve bu şekilde stabilitenin aranmasıdır. Yaptığımız çalışmada soğuk zincire uyularak alınan ve santrifüj edilen serum ve plazmaların, oda ısısındakilere göre daha yüksek sonuçlar verdiği saptanmış ve bu sonuç literatürdeki diğer çalışmalar ile uyumlu bu-



**ŞEKİL 1:** Farklı tüp gruplarındaki PTH ortalamalarının karşılaştırılması (n=30).

lunmuştur.<sup>7,13,16,17</sup> Soğuk EDTA’lı plazmada sonuçlar seruma göre daha yüksek bulunmuştur. İstatistiksel olarak gruplar arasında (normal serum-normal plazma, soğuk serum-soğuk plazma, normal serum-soğuk serum, normal plazma-soğuk plazma) anlamlı farklar bulunsa da bu değerler referans aralığı içerisinde olduğundan patolojik değerlerdeki serum ve plazmalarda PTH ölçümünün nasıl etkilendiğini görmek daha ileri çalışmaların konusu olacaktır.

Daha önce yapılmış olan çalışmalar bekleyen serum ve plazmalar üzerine yoğunlaşmışken.<sup>4,7,13,16,17</sup> çalışmamızda kan alınır alınmaz santrifüjleme süresine kadarki süreçte soğukta veya oda ısısında bekletmenin serum ve plazma PTH düzeyleri üzerine olan etkisi araştırılmıştır. Yaptığımız çalışmada PTH ölçümlerinde dikkat edilmesi gereken esas noktanın PTH’nin hangi tip örnekten çalışılacağı (serum veya EDTA’lı plazma), soğuk şartlar sağlanarak mı yoksa oda ısısı şartlarında mı alındığı ve santrifüjlemenin de ne tipte (soğuk veya normal) yapılması gerektiği sorgulanmıştır. Genel uygulamada klinisyenin çalıştığı hastanenin laboratuvarında, PTH ne şekilde çalışılıyorsa, buna hem kliniklerden gönderilen kanlarda uyumluluğun aranması, hem de hastanın bazı durumlarda

olduğu gibi hastane dışında bir başka merkezde PTH tetkikini yaptırması durumunda yine aynı uygunluğun aranması hastanın sonuçlarının karşılaştırılmasında bir şart gibi görünmektedir. Daha önce de yapılmış çalışmaların sonuçları ile uyumlu olan çalışmamız göstermiştir ki, PTH düzeyleri EDTA'lı plazmada, seruma göre daha stabil kalmakta ve bu durum soğuk zincire uyularak alınan ve transferi sağlanan kanlarda daha belirgin olmaktadır.

## SONUÇ

Biyokimya laboratuvarlarında çalışılan PTH testlerine kliniklerin uyum sağlaması ve yatan hastalardan gönderilen kanların laboratuvar ile uyumlu olması gerekmektedir. Kan alma noktalarında PTH ölçümleri için soğuk zincire uyularak kan alı-

nıyorsa veya serum yerine EDTA'lı plazmadan çalışılıyorsa, bu durumun kliniklerden gönderilen kanlar için standart hale getirilmesi, yatan hasta ve ayaktan hastalar arasında gözlenebilecek PTH sonuçları uyumsuzluğunu ortadan kaldırabilir.

Çalışmamızın özellikle paratiroid patolojisine sahip hastalarla tekrarlanmasının, bu farkın yüksek veya düşük PTH değerlerine sahip hastalarda nasıl bir sonuç vereceğini göstermesi ve bu durumun daha da açıklık kazanması açısından fayda sağlayacağı görüşündeyiz.

## Teşekkür

*Çalışmada kullanılan PTH kitleri ve kan alma tüpleri ile işlerini sağlayan Bio-DPC Teşhis Sistemleri A.Ş.'ye teşekkürlerimizi bir borç biliriz.*

## KAYNAKLAR

1. Glendenning P, Gutteridge DH, Retallack RW, Stuckey BG, Kermod DG, Kent GN. High prevalence of normal total calcium and intact PTH in 60 patients with proven primary hyperparathyroidism: a challenge to current diagnostic criteria. *Aust N Z J Med* 1998;28:173-8.
2. Vasikaran SD, Sturdy G, Musk AA, Flicker L. Vitamin D insufficiency and hyperparathyroidism in Perth blood donors. *Med J Aust* 2000;172:406-7.
3. Walker KS, Seth J. Stability of parathyroid hormone in blood from renal patients on haemodialysis. *Ann Clin Biochem* 2000;37( Pt 6):800-1.
4. Holmes DT, Levin A, Forer B, Rosenberg F. Preanalytical influences on DPC IMMULITE 2000 intact PTH assays of plasma and serum from dialysis patients. *Clin Chem* 2005;51:915-7.
5. Winter WE, Haris NS. Calcium biology and disorders. In: Clarke W, Dufour DR, eds. *Contemporary Practice in Clinical Chemistry*. 1st ed. Washington DC: AACC Press; 2006. p.387-97.
6. Thomas L, Kasperk C, Reinhard Z. Parathyroid hormone (PTH). In: Thomas L, ed. *Clinical Laboratory Diagnostics: Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. 1st ed. Frankfurt: TH Books; 1998. p.248-51.
7. Omar H, Chamberlin A, Walker V, Wood PJ. Immulite 2000 parathyroid hormone assay: stability of parathyroid hormone in EDTA blood kept at room temperature for 48 h. *Ann Clin Biochem* 2001;38(Pt 5):561-3.
8. Teal TK, Reed M, Stevens PE, Lamb EJ. Stability of parathyroid hormone ex vivo in haemodialysis patients. *Ann Clin Biochem* 2003;40(Pt 2):191-3.
9. Levin GE, Nisbet JA. Stability of parathyroid hormone-related protein and parathyroid hormone at room temperature. *Ann Clin Biochem* 1994;31( Pt 5):497-500.
10. Inaba M, Nakatsuka K, Imanishi Y, Watanabe M, Mamiya Y, Ishimura E, et al. Technical and clinical characterization of the Bio-PTH (1-84) immunochemiluminometric assay and comparison with a second-generation assay for parathyroid hormone. *Clin Chem* 2004;50:385-90.
11. Nussbaum SR, Zahradnik RJ, Lavigne JR, Brennan GL, Nozawa-Ung K, Kim LY, et al. Highly sensitive two-site immunoradiometric assay of parathyrin, and its clinical utility in evaluating patients with hypercalcemia. *Clin Chem* 1987;33:1364-7.
12. Evans MJ, Livesey JH, Ellis MJ, Yandle TG. Effect of anticoagulants and storage temperatures on stability of plasma and serum hormones. *Clin Biochem* 2001;34:107-12.
13. Glendenning P, Laffer LL, Weber HK, Musk AA, Vasikaran SD. Parathyroid hormone is more stable in EDTA plasma than in serum. *Clin Chem* 2002;48:766-7.
14. Twomey PJ, Whitlock T, Pledger DR. Differences between serum and plasma for intact parathyroid hormone measurement in patients with chronic renal failure in routine clinical practice. *J Clin Pathol* 2005;58:1000-1.
15. Teal TK, Wood JL, Stevens PE, Lamb EJ. Stability of Bio-Intact (1-84) parathyroid hormone ex vivo in serum and EDTA plasma from hemodialysis patients. *Clin Chem* 2004;50:1713-4.
16. Scharnhorst V, Valkenburg J, Vosters C, Vader H. Influence of preanalytical factors on the immulite intact parathyroid hormone assay. *Clin Chem* 2004;50:974-5.
17. Glendenning P, Musk AA, Taranto M, Vasikaran SD. Preanalytical factors in the measurement of intact parathyroid hormone with the DPC IMMULITE assay. *Clin Chem* 2002;48:566-7.