



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΤΜΗΜΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ

ΤΟΜΕΑΣ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

στην «Κλινική Φαρμακευτική»

Μελέτη σύγκρισης μεθόδων μέτρησης Βιταμίνης D και
Παραθορμόνης με αυτοματοποιημένες ανοσοενζυμικές τεχνικές

Comparison study of Vitamin D and Parathormone assays with
automated immunoenzyme techniques

ΚΟΥΤΣΟΒΑΣΙΛΗ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

Αθήνα, 2023



ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ

Εθνικόν και Καποδιστριακόν
Πανεπιστήμιον Αθηνών

— ΙΔΡΥΘΕΝ ΤΟ 1837 —

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη σύγκρισης μεθόδων μέτρησης Βιταμίνης D και
Παραθορμόνης με αυτοματοποιημένες ανοσοενζυμικές τεχνικές

ΚΟΥΤΣΟΒΑΣΙΛΗ ΑΔΑΜΑΝΤΙΑ

ΑΜ: 1452012101003

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Χαλιάσος Αλέξανδρος (Επιβλέπων): Ιατρός-Κλινικός Χημικός-EurClinChem
2. Μαρκαντώνη- Κυρούδη Σοφία: Καθηγήτρια, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών
3. Δρακούλης Νικόλαος: Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Φαρμακευτικής, Τομέας Φαρμακευτικής Τεχνολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Ευχαριστίες

Πριν προχωρήσω στην έκθεση της παρούσας διπλωματικής εργασίας, αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες μου σε όλους αυτούς που συνέβαλλαν στην ολοκλήρωσή της.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τον κ. Χαλιάσο Αλέξανδρο, Ιατρό- Κλινικό Χημικό, για την ανάθεση του παρόντος θέματος και για τη συνεχή καθοδήγησή του κατά την εκπόνηση της διπλωματικής μελέτης. Επίσης, για τον χρόνο που αφιέρωσε στη διόρθωση του συγγραφικού μέρους της, καθώς και για τις πολύτιμες υποδείξεις του.

Από τις ευχαριστίες δε θα μπορούσα να παραλείψω τον κ. Μακρή Κωνσταντίνο, Κλινικό Βιοχημικό, Διευθυντή του Βιοχημικού Τμήματος του Γενικό Νοσοκομείο Αττικής ΚΑΤ, για όλες τις γνώσεις, τις κατευθυντήρες γραμμές και τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις που μου προσέφερε τόσο στο εργαστήριο όσο και κατά τη συγγραφή του παρόντος κειμένου.

Ευχαριστώ, επίσης, την κα. Μαρκαντώνη-Κυρούδη Σοφία, Καθηγήτρια του ΕΚΠΑ στο τμήμα Φαρμακευτικής και τον κ. Δρακούλη Νικόλαο, Αναπληρωτή Καθηγητή του ΕΚΠΑ του τμήματος Φαρμακευτικής, μέλη της τριμελούς επιτροπής για τον χρόνο που αφιέρωσαν για την εξέταση της εργασίας μου.

Στη συνέχεια, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλο το προσωπικό του εργαστηρίου για τη συνεργασία μας. Ιδιαίτερο ευχαριστώ θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Μπελιμέζη Απόστολο, Country Manager της Snibe Diagnostic στην Ελλάδα, για τις εποικοδομητικές παρατηρήσεις του και τον χρόνο που αφιέρωσε. Επίσης, την κα. Παϊδούση Καλλιόπη για όλη τη βοήθεια στο εργαστήριο και τη θετική ενέργεια που προσφέρει απλόχερα με την παρουσία της.

Φυσικά, δε θα μπορούσα να παραλείψω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην οικογένειά μου για τη συνεχή υποστήριξή της. Κλείνοντας, απόλυτα καθοριστική υπήρξε η συμπαράσταση των στενών μου φίλων όλα αυτά τα χρόνια. Τους ευχαριστώ όλους, έναν προς έναν.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Περίληψη	6
Abstract.....	7
Συντομογραφίες.....	8
Κεφάλαιο 1^ο: Βιταμίνη D και Παραθορμόνη	10
1.1 Βιταμίνη D	10
1.1.1 Εισαγωγή	10
1.1.2 Σύνθεση	10
1.1.3 Μεταβολισμός	11
1.1.4 Ρύθμιση.....	12
1.1.5 Βιολογική δράση	13
1.1.6 Πηγές βιταμίνης D.....	14
1.1.7 Προσδιορισμός βιταμίνης D.....	15
1.1.7.1 Συνθήκες σταθερότητας δειγμάτων	16
1.1.7.2 Επιλογή κατάλληλου μεταβολίτη για προσδιορισμό.....	16
1.1.7.3 Μέθοδοι για τη μέτρηση της 25(OH)D	17
1.2 Παραθορμόνη.....	22
1.2.1 Εισαγωγή	22
1.2.2 Σύνθεση και αποικοδόμηση της PTH.....	22
1.2.3 Ρύθμιση.....	23
1.2.4 Υποδοχείς της PTH	26
1.2.5 Βιολογική δράση	28
1.2.6 Παθήσεις.....	31
1.2.7 Προσδιορισμός PTH.....	32
1.2.7.1 Συλλογή δειγμάτων.....	33
1.2.7.2 Συνθήκες σταθερότητας δειγμάτων	34

1.2.7.3 Επιλογή κατάλληλου μορίου για προσδιορισμό	34
Κεφάλαιο 2ο: Σύγκριση μεθόδων- Στατιστική ανάλυση.....	35
2.1 Παλινδρόμηση Passing-Bablok.....	35
2.2 Γραφική παράσταση Bland-Altman.....	37
Κεφάλαιο 3ο: Ειδικό Μέρος	39
3.1 Εισαγωγή.....	39
3.1.1 Ηλεκτροχημειοφωταύγεια (ECL).....	39
3.1.2 Χημειοφωταύγεια (CL)	39
3.2 Υλικά και μέθοδοι.....	40
3.2.1 Κριτήρια ένταξης και συλλογή δειγμάτων	40
3.2.2 Όργανα και αντιδραστήρια.....	40
3.2.3 Ανάλυση δείγματος	43
3.2.3.1 Διαδικασία προσδιορισμού βιταμίνης D με ECLIA	43
3.2.3.2 Διαδικασία προσδιορισμού PTH με ECLIA.....	44
3.2.3.3 Διαδικασία προσδιορισμού βιταμίνης D με CLIA	44
3.2.3.4 Διαδικασία προσδιορισμού PTH με CLIA	45
3.2.4 Ανάλυση δεδομένων.....	45
3.3 Αποτελέσματα.....	45
3.3.1 Μελέτη 1: Σύγκριση απόδοσης των δύο ανοσοχημικών μεθόδων για τη μέτρηση της βιταμίνης D.....	45
3.3.2 Μελέτη 2: Σύγκριση απόδοσης των δύο ανοσοχημικών μεθόδων για τη μέτρηση της PTH.....	48
3.4 Συζήτηση.....	51
3.5 Συμπεράσματα.....	53
Βιβλιογραφία	54
Παράρτημα Α: Πίνακας μετρήσεων 25(OH)D και PTH.....	65
Παράρτημα Β: Πίνακες αποτελεσμάτων από το λογισμικό MedCalc	69

Περίληψη

Υπόβαθρο: Η ανεπάρκεια βιταμίνης D σχετίζεται με αυξημένο κίνδυνο για διάφορες παθολογικές καταστάσεις, συμπεριλαμβανομένων των οστεοπορωτικών καταγμάτων, του καρκίνου, του διαβήτη και της υπέρτασης. Για τον λόγο αυτό, κρίθηκε αναγκαία η μέτρηση των επιπέδων της βιταμίνης D και πιο συγκεκριμένα της 25-υδροξύ-βιταμίνης D [25(OH)D], που αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της βιταμίνης στον οργανισμό. Έτσι, έχουν προκύψει πολλές εργαστηριακές δοκιμές ανίχνευσης και μέτρησης για την κάλυψη διαγνωστικών αναγκών που σχετίζονται με τη βιταμίνη D και την παραθορμόνη (PTH). Καθώς υπάρχουν περιορισμένα διαθέσιμα δεδομένα σύγκρισης των μεθόδων αυτών, κρίνεται, λοιπόν, απαραίτητη η διεξαγωγή μελετών σύγκρισης των εργαστηριακών μεθόδων με σκοπό τον καθορισμό της αξιοπιστίας των μετρήσεων.

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις διαφορές στις μετρήσεις βιταμίνης D και PTH μεταξύ της ανοσοχημικής μεθόδου ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECLIA) με τον αναλυτή Cobas e411 της Roche Diagnostics και της ανοσοχημικής μεθόδου χημειοφωταύγειας (CLIA) με τον αναλυτή Maglumi X3 της Snibe Diagnostics.

Μέθοδος: Για τη μελέτη συλλέχθηκαν συνολικά 158 δείγματα ορού και πλάσματος από ενήλικους, υγιείς εθελοντές. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C και διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι τη μέτρησή τους στο εργαστήριο. Η ανάλυση των δειγμάτων έγινε σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κάθε κατασκευαστή. Κάθε δείγμα αναλύθηκε για 25(OH)D και PTH ταυτόχρονα. Οι μετρήσεις μεταξύ των δύο μεθόδων απείχαν χρονικά μία εβδομάδα.

Αποτελέσματα: Τα αποτελέσματά μας αποκαλύπτουν χαμηλή συμφωνία μεταξύ των προσδιορισμών. Στη τεχνική ECLIA τα μέσα επίπεδα 25(OH)D ήταν υψηλότερα κατά 30.07% (95% CI: 27.8 έως 32.4) και της PTH χαμηλότερα κατά 39.7% (95% CI: -42.3 έως -37.0) σε σχέση με τα αντίστοιχα μετρούμενα επίπεδα με τη τεχνική CLIA. Η ανάλυση παλινδρόμησης μεταξύ των μεθόδων αποκάλυψε γραμμικό μοντέλο ($p > 0,05$) και για τις δύο προσδιοριζόμενες ουσίες.

Συμπεράσματα: Υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο μεθόδων. Η σημασία των επιπέδων βιταμίνης D, αλλά και της παραθορμόνης είναι σημαντικά για την κλινική πρακτική. Κατά συνέπεια απαιτούνται περισσότερες μελέτες για να καθοριστεί ένα παγκόσμιο εύρος τιμών αναφοράς για τα επίπεδα της βιταμίνης D και της παραθορμόνης.

Abstract

Background: Vitamin D deficiency is associated with an increased risk for many abnormal conditions, including osteoporotic fractures, cancer, diabetes, and on hypertension. For this reason, it was deemed necessary to quantify the levels of vitamin D and more specifically 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D], which represents the levels of the vitamin D in the body. Thus, many laboratory assays and measurement tests have emerged to meet diagnostic needs related to vitamin D and parathyroid hormone (PTH). As there are limited data available comparing these methods, it is necessary to carry out comparison studies of the laboratory methods in order to establish the reliability of the measurements.

The aim of the study was to evaluate the differences in vitamin D and PTH measurements between the electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) method on the Roche Diagnostics cobas e411 analyzer and the chemiluminescence immunoassay (CLIA) on the Maglumi Diagnostics X3 analyzer.

Method: A total of 158 serum and plasma samples from adult, healthy subjects were collected for the study. Samples were centrifuged at 4°C and stored at -80°C until measured in the laboratory. Sample analysis was performed according to each manufacturer's protocol. Each sample was analyzed for 25(OH)D and PTH simultaneously. The measurements between the two methods were performed with one week interval.

Results: High inter-assay disagreement was found. In the ECLIA technique 25(OH)D levels were 30.07% (95% CI: 27.8 to 32.4) higher and PTH lower by 39.7% (95% CI: -42.3 to - 37.0) relative to the corresponding levels measured by the CLIA technique. Regression analysis between methods revealed a linear model ($p>0.05$) for both analytes.

Conclusions: There are significant differences in measurements between the two methods. The significance of vitamin D levels, but also of parathyroid hormone, are important for clinical practice. It is needed more studies to be established a global reference range for vitamin D and parathormone levels.

Συντομογραφίες

1,25(OH)₂D: 1,25- Dihydroxyvitamin D

7-DHC: 7-Dehydrocholesterol

24R,25(OH)₂D: 24R, 25-Dihydroxyvitamin D

25(OH)D: 25- Hhydroxyvitamin D

ABEI: N-(4-aminobutyl)-N-ethylisoluminol

BSA: Bovine serum albumin

C3-epi-25(OH)D: C3 epimer of 25-hydroxyvitamin D

cAMP: Cyclic Adenosine Monophosphate

CaSR: Calcium-Sensing Receptor

CI: Confidence interval

CLIA: Chemiluminescence Immunoassay

CPBA: Competitive protein-binding assay

cTAL: cortical Thick Ascending Limb of Henle's loop

DBP: vitamin D-Binding Protein

DCT: Distal Convolutd Tubule

ECLIA: Electrochemiluminescence Assay

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic acid

ELISA: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

FGF23: Fibroblast Growth Factor-23

FHH: Familial hypocalciuric hypercalcemia

HPLC: High-performance liquid chromatography

IDS: Iduronate 2-Sulfatase

iPTH: intact-PTH

LC-MS: Liquid Chromatography–Mass Spectrometry

LC-UV: Liquid Chromatography with UV detection

MEN1: Multiple endocrine neoplasia type 1

MS: Mass Spectrometry

PBS: Phosphate-buffered saline

PKC: Protein Kinase C

PLC: Phospholipase C

PTH: Parathyroid Hormone

PTHrP: Parathyroid hormone-related protein

RIA: Radioimmunoassay

RLU: Relative Light Units

RSD: Relative standard deviation

SD: Standard deviation

UVB: Ultraviolet B

VD: Vitamin D

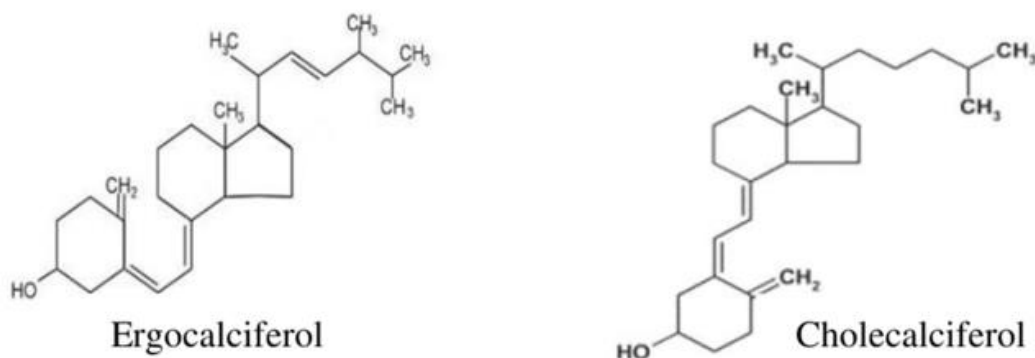
VDR: Vitamin D Receptor

Κεφάλαιο 1^ο: Βιταμίνη D και Παραθορμόνη

1.1 Βιταμίνη D

1.1.1 Εισαγωγή

Η βιταμίνη D ανήκει σε μια ομάδα λιποδιαλυτών ενώσεων αποτελούμενες από ένα σκελετό χοληστερόλης με τέσσερις δακτυλίους (1). Οι κύριες μορφές της βιταμίνης D είναι η βιταμίνη D₂ (εργοκαλσιφερόλη) και η βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη). Όσον αφορά τη σκελετική τους δομή, διαφέρουν στην ύπαρξη μίας ομάδας μεθυλίου στη θέση άνθρακα C24 και σε ένα διπλό δεσμό μεταξύ των ανθράκων στις θέσεις C22-23 στην πλευρική αλυσίδα της εργοκαλσιφερόλης. Ωστόσο, οι δύο ενώσεις έχουν εξίσου αποτελεσματική βιολογική δράση (Εικόνα 1) (2). Η βιταμίνη D είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της εύρυθμης λειτουργίας του ανθρώπινου οργανισμού συμμετέχοντας σε μία πληθώρα διεργασιών.



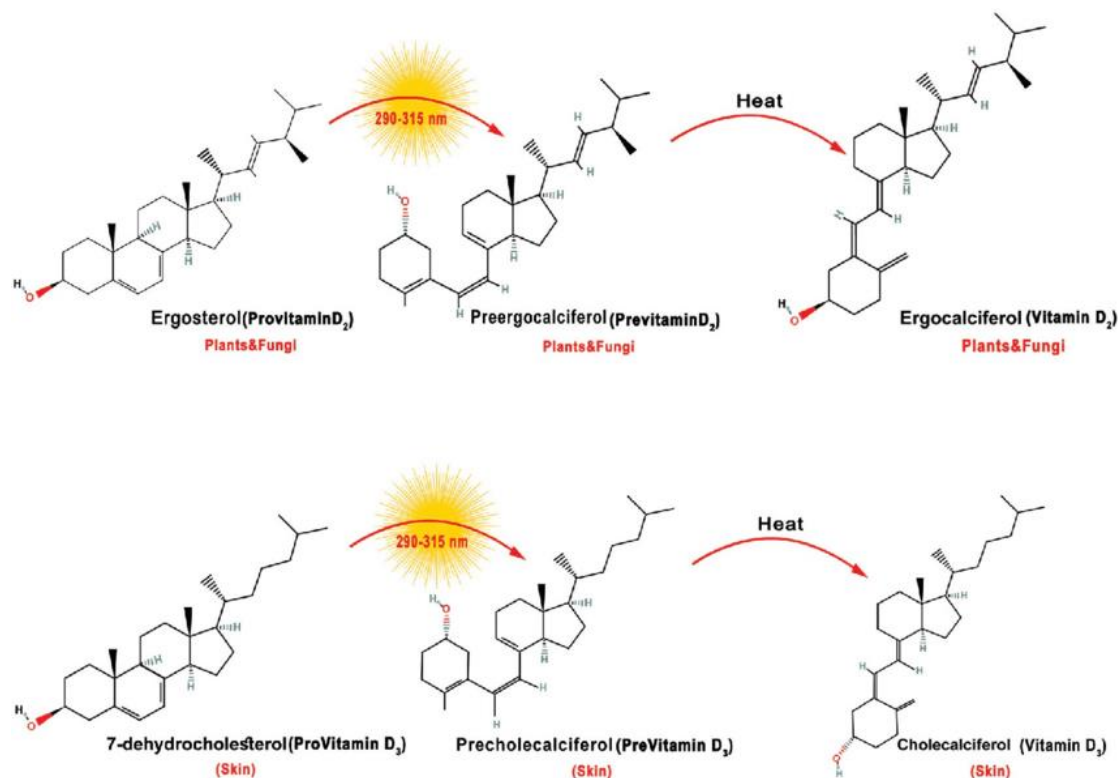
Εικόνα 1: Χημική δομή εργοκαλσιφερόλης (D₂) και χοληκαλσιφερόλης (D₃) (3)

1.1.2 Σύνθεση

Η προ-βιταμίνη D συντίθεται στον οργανισμό στην επιφάνεια του δέρματος με τη βοήθεια της έκθεσής του σε υπεριώδες φως μήκους κύματος 290 έως 315 nm, το οποίο διεγείρει τη μετατροπή της 7-δεϋδροχοληστερόλης (7-DHC) σε προ-βιταμίνη D₃ και ακολουθούμενο από θερμικό ισομερισμό σε βιταμίνη D₃ (χοληκαλσιφερόλη) (Εικόνα 2) (4). Η μελάγχρωση του δέρματος και η ένταση της υπεριώδους ακτινοβολίας (UVB) είναι δύο σημαντικοί παράγοντες στον ρυθμό σχηματισμού και την ποσότητα της βιταμίνης D₃ (5).

Το πρόδρομο μόριο για την σύνθεση της βιταμίνης D₂ είναι η εργοστερόλη, η οποία υπάρχει σε φυτά και μύκητες. Χημικά διαφέρει από την 7-δεϋδροχοληστερόλη

στην πλευρική της αλυσίδα, η οποία περιέχει μια επιπλέον ομάδα μεθυλίου στον άνθρακα 4 στη θέση C-24. Η υπεριώδης ακτινοβολία (UV) στην περιοχή μήκους κύματος 290–315 nm διασπά τον δακτύλιο B της εργοστερόλης, παράγοντας εργοκαλσιφερόλη (Εικόνα 2) (6).



Εικόνα 2: Σύνθεση vit-D₂ και D₃ (6)

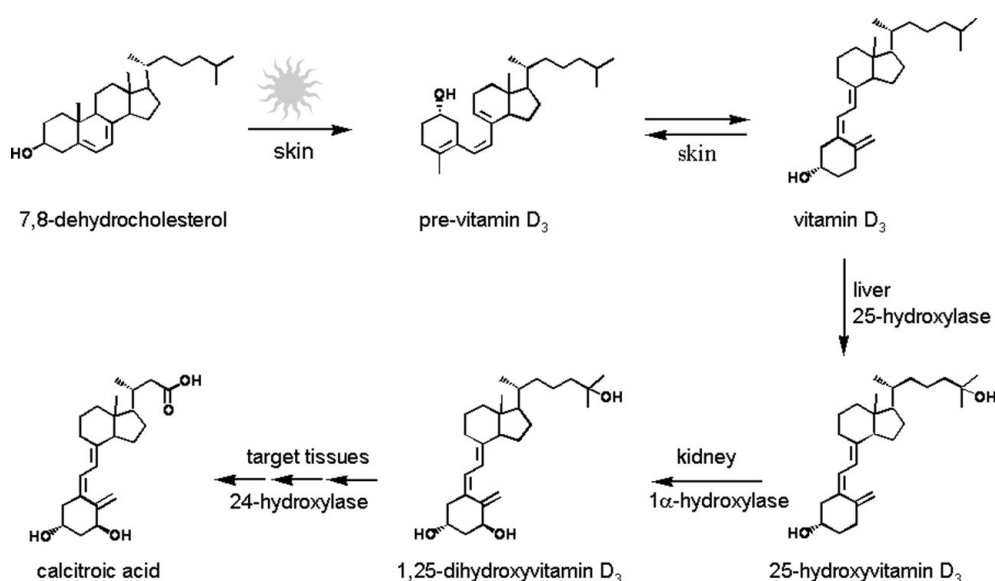
1.1.3 Μεταβολισμός

Η βιταμίνη D είναι ανενεργή στην αρχική μορφή της και για να έχει βιολογική δράση χρειάζεται να μετατραπεί στους ενεργούς μεταβολίτες της μέσω ενζυματικής υδροξυλίωσης σε δύο στάδια.

Το πρώτο στάδιο πραγματοποιείται στο ήπαρ. Η βιταμίνη D, που συντίθεται στο δέρμα, διαχέεται στο αίμα και μεταφέρεται από την "πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιταμίνη D (VDPB)" στο ήπαρ. Αντιστοίχως, η βιταμίνη D που προσλαμβάνεται από τη διατροφή απορροφάται στο λεπτό έντερο και ενσωματώνεται στα χυλομικρά, τα οποία απελευθερώνονται στο λεμφικό σύστημα. Εν συνεχεία, εισέρχεται στο φλεβικό αίμα όπου συνδέεται με την VDBP και τις λιποπρωτεΐνες και μεταφέρεται στο ήπαρ (7). Στο ήπαρ, η βιταμίνη D υδροξυλιώνεται από την 25-υδροξυλάση (CYP2R1) και μετατρέπεται στη 25-υδροξυβιταμίνη D [25(OH)D], την κύρια μορφή της βιταμίνης D που κυκλοφορεί στην συστηματική κυκλοφορία. Ένα μικρό ποσοστό αυτής της

υδροξυλίωσης πραγματοποιείται τόσο από το μιτοχονδριακό ένζυμο CYP27A1 όσο και από τα μικροσωμικά CYP2D11, CYP2D25, CYP2J2/3 και CYP3A4 (8).

Το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται στους νεφρούς. Η 25(OH)D μεταφέρεται μέσω της VDBP στους νεφρούς, όπου υφίσταται α-υδροξυλίωση από το ένζυμο CYP27B1. Προϊόν της ενζυμικής μετατροπής αποτελεί ο δραστικός μεταβολίτης: η 1,25-δihydroξυβιταμίνη D [1,25(OH)₂D] ή καλσιτριόλη (9). Ο καταβολισμός της βιταμίνης D πραγματοποιείται από την 24-υδροξυλάση (CYP24A1), η οποία καταλύει μια σειρά από στάδια οξείδωσης με αποτέλεσμα τη διάσπαση της πλευρικής αλυσίδας προς καλσιτροϊκό οξύ, το οποίο είναι υδατοδιαλυτό, βιολογικά ανενεργό και αποβάλλεται από τον οργανισμό (Εικόνα 3) (10), (11).



Εικόνα 3: Μονοπάτι μεταβολισμού βιταμίνης D (12)

1.1.4 Ρύθμιση

Η δραστηριότητα της 25-υδροξυλάσης ρυθμίζεται ελάχιστα από κάποιο μηχανισμό ανάδρασης (feedback) στο πλαίσιο του ενδοκρινικού συστήματος της βιταμίνης D και φαίνεται να εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της βιταμίνης D (13).

Η καλσιτριόλη και ο FGF23 μπορούν να διεγείρουν την έκφραση της 24-υδροξυλάσης, ενώ η PTH και το χαμηλό επίπεδο ασβεστίου καταστέλλουν την έκφρασή της. Η έκφραση του ενζύμου CYP24A1 (ή 24-υδροξυλάσης) στους νεφρούς παρέχει ένα άλλο μονοπάτι ελέγχου της ομοιόστασης της βιταμίνης D.

1.1.5 Βιολογική δράση

Η βιταμίνη D είχε ονομαστεί αρχικώς ως βιταμίνη, ωστόσο ύστερα από επιστημονικές μελέτες προσδιορίστηκε ότι λειτουργεί ως ορμόνη. Συγκεκριμένα, ανήκει στις στεροειδείς ορμόνες (14). Η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ εισέρχεται μέσα στο κύτταρο και συνδέεται με έναν πυρηνικό υποδοχέα στους ιστούς στόχους, τον VDR. Ο VDR ανήκει στην ομάδα των υποδοχέων στεροειδών ορμονών κατηγορίας II, καθώς σχετίζεται στενά με τους υποδοχείς ρετινοϊκού οξέος και θυρεοειδικών ορμονών. Ο ανθρώπινος υποδοχέας VDR είναι ένα πεπτίδιο που αποτελείται από 427 αμινοξέα (15).

Με τη σύνδεση της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ στον υποδοχέα VDR ρυθμίζεται η γονιδιακή μεταγραφή και έτσι, διεγείρεται η εντερική απορρόφηση του ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων (7). Ρυθμίζει κυρίως τον μεταβολισμό του ασβεστίου και των φωσφορικών και είναι απαραίτητο για τη διατήρηση της υγείας των οστών. Επίσης, ρυθμίζει τις λειτουργίες των οστεοβλαστών και των αιμοποιητικών κυττάρων και καταστέλλει τη δραστηριότητα του παραθυρεοειδούς αδένου (16).

Γενικά, φαίνεται ότι πέρα της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ και άλλοι μεταβολίτες της βιταμίνης D παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα. Ένας σημαντικός παράγοντας που καθορίζει τη βιολογική δραστηριότητα ενός μεταβολίτη είναι η συγγένειά του με τον VDR. Πειραματικές μελέτες έχουν δείξει ότι η $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ παρουσιάζει την υψηλότερη συγγένεια με τον VDR μεταξύ όλων των μεταβολιτών της βιταμίνης D (17), ενώ η συγγένεια των υπολοίπων μεταβολιτών είναι σημαντικά χαμηλότερη. Για παράδειγμα, η $25(\text{OH})\text{D}$ και η $24,25(\text{OH})_2\text{D}$ παρουσιάζουν περίπου 900 και 5000 φορές χαμηλότερη συγγένεια με τον VDR, αντίστοιχα, σε σύγκριση με αυτή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ (18).

Η κλινική έρευνα απέδειξε ότι πολλοί τύποι ανθρώπινων κυττάρων φέρουν τον υποδοχέα βιταμίνης D (VDR). Πολλά από αυτά τα όργανα και κύτταρα, συμπεριλαμβανομένου του εγκεφάλου, των λείων μυών των αγγείων, του προστάτη, του μαστού και των μακροφάγων, όχι μόνο έχουν υποδοχείς VDR αλλά έχουν επίσης την ικανότητα να παράγουν $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Αυτή η παραγωγή εξαρτάται πιθανώς από τη διαθεσιμότητα της κυκλοφορούσας $25(\text{OH})\text{D}$, υποδεικνύοντας τη βιολογική σημασία των επαρκών επιπέδων στο αίμα του μεταβολίτη της βιταμίνης D (19).

Ο VDR δύναται να συμμετέχει στη ρύθμιση του πολλαπλασιασμού και της διαφοροποίησης των κυττάρων, για παράδειγμα, στα κύτταρα του ανοσοποιητικού συστήματος (T κύτταρα, μακροφάγα και μονοκύτταρα). Γενικά, μελέτες παρατήρησης έδειξαν μία πληθώρα λειτουργιών της βιταμίνης D. Ειδικότερα, φαίνεται ότι υπάρχει

συσχέτιση μεταξύ των επιπέδων της βιταμίνης D και διαφόρων ασθενειών. Απόρροια αυτού, είναι το έναυσμα για περαιτέρω μελέτη των επιδράσεων της βιταμίνης D στην υγεία, συμπεριλαμβανομένης της πρόληψης ασθενειών που προκαλούνται από το ανοσοποιητικό (άσθμα, σακχαρώδης διαβήτης τύπου 1), μολυσματικές ασθένειες (λοιμώξεις του αναπνευστικού, γρίπη) και καρδιαγγειακές παθήσεις (20).

1.1.6 Πηγές βιταμίνης D

Η βιταμίνη D προέρχεται από δύο πηγές: την ενδογενή σύνθεσή της, κατά την οποία παράγεται στο δέρμα μέσω της έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία και την εξωγενή, κατά την οποία λαμβάνεται από τροφές και συμπληρώματα διατροφής. Ωστόσο, λίγα είναι τα τρόφιμα τα οποία περιέχουν βιταμίνη D, όπως λιπαρά ψάρια, ιχθυέλαια, μανιτάρια και σε μικρότερο βαθμό κρόκος αυγού και ξηροί καρποί. Σε κάποιες ευρωπαϊκές χώρες, ορισμένα τρόφιμα είναι εμπλουτισμένα με βιταμίνη D, συγκεκριμένα το γάλα, τα γαλακτοκομικά προϊόντα, η μαργαρίνη, τα δημητριακά πρωινού και οι χυμοί φρούτων (20).

Γενικά, όπως έχει αναφερθεί, η D₂ μορφή της βιταμίνης είναι δομικά διαφορετική από τη D₃ μορφή, με αποτέλεσμα τη χαμηλότερη συγγένειά του με την VDBP, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε ταχύτερη απομάκρυνσή της από την κυκλοφορία, περιορισμένη μετατροπή στη δραστική μορφή και ταχύτερη απομάκρυνση από τον οργανισμό. Ως αποτέλεσμα, τα συμπληρώματα διατροφής με D₂ δεν επιφέρουν εξίσου υψηλά επίπεδα VD στον ορό όσο η D₃ (21).

Δεδομένης της αβεβαιότητας και έλλειψης ομοφωνίας γύρω από τις βέλτιστες συγκεντρώσεις της 25(OH)D στον ορό, οι ορισμοί της επάρκειας, της μερικής ανεπάρκειας και της ανεπάρκειας βιταμίνης D υφίστανται κατά προσέγγιση. Η πλειονότητα των μεθόδων χρησιμοποιεί επί του παρόντος τις ακόλουθες τιμές για να κατηγοριοποιήσει την κατάσταση της βιταμίνης D στους ενήλικες (22):

- ✚ Η επάρκεια βιταμίνης D ορίζεται ως η συγκέντρωση της 25(OH)D μεγαλύτερη από 20 ng/mL (50 nmol/L).
- ✚ Η μερική ανεπάρκεια βιταμίνης D ορίζεται ως η συγκέντρωση της 25(OH)D από 12 έως 20 ng/mL (30 έως 50 nmol/L).
- ✚ Η ανεπάρκεια βιταμίνης D ορίζεται ως ένα επίπεδο της 25(OH)D μικρότερο από 12 ng/mL (30 nmol/L).

✚ Ένας «κίνδυνος» τοξικότητας βιταμίνης D ορίζεται ως ένα επίπεδο της $25(\text{OH})\text{D} >100 \text{ ng/mL}$ ($>250 \text{ nmol/L}$) σε ενήλικες που καταναλώνουν σημαντικές ποσότητες ασβεστίου.

Γενικά, ανεπάρκεια βιταμίνης D εμφανίζεται ακόμη και σε ανεπτυγμένες χώρες και σχετίζεται με οστεοπόρωση και πιθανώς κατάγματα. Τα αποθέματα βιταμίνης D μειώνονται με την ηλικία, ειδικά τον χειμώνα (23), (24).

Η συνιστώμενη επαρκής πρόσληψη βιταμίνης D ήταν 200 IU/ημέρα για όλα τα παιδιά και τους ενήλικες 50 ετών, κάτω από 400 IU/ημέρα για άτομα ηλικίας 51 έως 70 ετών και 600 IU/ημέρα για άτομα άνω των 70 ετών. Ωστόσο, λόγω των ευεργετικών της επιδράσεων, οι ποσότητες βιταμίνης D που απαιτούνται για τη βέλτιστη υγεία είναι πιθανώς υψηλότερες από ό,τι θεωρούνταν έως σήμερα. Στις 30 Νοεμβρίου 2010, το Ινστιτούτο Ιατρικής των ΗΠΑ δημοσίευσε επικαιροποιημένες συστάσεις σχετικά με τη πρόσληψη βιταμίνης D: 600 IU/ημέρα για άτομα ηλικίας 1 έως 70 ετών και 800 IU για άτομα ηλικίας 71 ετών και άνω (25).

Το Ινστιτούτο Ιατρικής των ΗΠΑ δε συνιστά συγκεκριμένες δόσεις, αλλά χορήγηση με βάση τους βιοδείκτες των οστών. Η ανάλυση υποδηλώνει ότι η καθημερινή χρήση της βιταμίνης D είναι 600 IU για άτομα ηλικίας από 1 έως 70 ετών και 800 IU για άτομα 71 ετών και άνω, μέρος ή το σύνολο των οποίων μπορεί να επιτευχθεί με τη συνήθη έκθεση στον ήλιο. Ανώτατο όριο διατροφικής πρόσληψης βιταμίνης D είναι 4000 IU ημερησίως, ένα επίπεδο στο οποίο ο κίνδυνος τοξικότητας αρχίζει να αυξάνεται. Ωστόσο, το Ινστιτούτο Ιατρικής των ΗΠΑ τονίζει ότι αυτό το ανώτατο όριο δε πρέπει να θεωρηθεί ως η ποσότητα που χρειάζεται ή πρέπει να καταναλώνουν οι άνθρωποι (26).

1.1.7 Προσδιορισμός βιταμίνης D

Επί του παρόντος, περισσότεροι από 50 μεταβολίτες της βιταμίνης D έχουν περιγραφεί και χαρακτηριστεί, με μερικούς από αυτούς να παρουσιάζουν βιολογική δραστηριότητα (27). Ωστόσο, επαρκείς μέθοδοι για μέτρηση αναπτύχθηκαν μόνο για πέντε από αυτούς [vitamin D, $25(\text{OH})\text{D}_2$, $25(\text{OH})\text{D}_3$, $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}$, $24\text{R},25(\text{OH})_2\text{D}$, C3- $\text{epi-}25(\text{OH})\text{D}$], καθώς απαντώνται στον ορό σε συγκεντρώσεις που επιτρέπουν τη μέτρησή τους με αυτές τις μεθόδους (Πίνακας 1) (28).

Πίνακας 1: Οι κύριοι μεταβολίτες της βιταμίνης D στον άνθρωπο και η φυσιολογική συγκέντρωσή τους στη συστηματική κυκλοφορία (29)

Μεταβολίτης	Επίπεδα στον ορό
Βιταμίνη D ₂ /D ₃	18-29 nmol/L
25(OH)D ₃	8-165 nmol/L
25(OH)D ₂	<7 nmol/L
1,25(OH) ₂ D ₃ /1,25(OH) ₂ D ₂	48-168 pmol/L [0,1% της 25(OH)D]
24R,25(OH) ₂ D	<2.3-30 nmol/L [11% της 25(OH)D]
3-επι-25(OH)D	<2-22 nmol/L [4% της 25(OH)D]

Για τη μέτρηση των επιπέδων των μεταβολιτών της βιταμίνης D μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ο ορός όσο και το πλάσμα. Όμως, ο ορός είναι προτιμότερος, καθώς έχει το πλεονέκτημα ότι είναι απαλλαγμένος από αντιπηκτικά που χρησιμοποιούνται για τη συλλογή πλάσματος, όπως EDTA, ηπαρίνη ή κιτρικό, τα οποία μπορεί να επηρεάσουν τη μέτρηση των μεταβολιτών. Ωστόσο, ακόμη και όταν ο ορός είναι το μέσο, παρατηρούνται σημαντικές παρεμβολές σε ορισμένες μεθόδους μετρήσεων όταν χρησιμοποιούνται σωληνάρια αιμοληψίας ορού με ενεργοποιητές πήξης με γέλη (30).

1.1.7.1 Συνθήκες σταθερότητας δειγμάτων

Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D είναι σταθεροί στο πλάσμα και στον ορό όταν τα δείγματα φυλάσσονται σε θερμοκρασία δωματίου (24 °C) ή στους 4 °C ή όταν καταψύχονται, επειδή οι μεταβολίτες δε διαχωρίζονται από την πρωτεΐνη δέσμευσης (VDPB). Επομένως, δεν απαιτούνται ιδιαίτερες προφυλάξεις κατά τη μεταφορά των δειγμάτων στο εργαστήριο. Σε αποθηκευμένα δείγματα, οι επαναλαμβανόμενοι κύκλοι κατάψυξης-απόψυξης δε φαίνεται να έχουν σημαντική επίδραση στα επίπεδα 25(OH)D. Απαιτείται προσοχή μόνο όταν τα δείγματα έχουν ήδη υποβληθεί σε προεπεξεργασία και η βιταμίνη D έχει διαχωριστεί από τη συνδετική πρωτεΐνη της. Στη συνέχεια, τα δείγματα θα πρέπει να φυλάσσονται σε σκοτεινά φιαλίδια για να αποφευχθεί η έκθεση στο φως και σε θερμοκρασία μεγαλύτερη των – 70 °C (31).

1.1.7.2 Επιλογή κατάλληλου μεταβολίτη για προσδιορισμό

Από το σύνολο των μεταβολιτών της βιταμίνης D, η 25(OH)D είναι αυτή που αποτελεί τον δείκτη που μετριέται και αντιπροσωπεύει τα επίπεδα της βιταμίνης στον οργανισμό (29), καθώς:

- ✚ Τα επίπεδά της 25(OH)D στο αίμα είναι υψηλότερα από αυτά οποιουδήποτε άλλου μεταβολίτη της βιταμίνης D: η συγκέντρωσή της στον ορό κυμαίνεται από 25–200 nmol/L, που είναι 1000 φορές υψηλότερη από εκείνη της 1α,25(OH)₂D, της οποίας η συγκέντρωση είναι στην περιοχή από 50 έως 150 pmol/L. Επιπλέον, το μεγαλύτερο μέρος της βρίσκεται στη συστηματική κυκλοφορία, με περιορισμένη κατανομή σε λιγότερο προσβάσιμους ιστούς (π.χ. λίπος) (32).
- ✚ Έχει σχετικά μεγάλο χρόνο ημιζωής (2–3 εβδομάδες), σε σύγκριση με την 1α,25(OH)₂D (περίπου 4–6 ώρες) και, ως εκ τούτου, τα επίπεδά της στον ορό ποικίλλουν ελάχιστα μέσα σε σύντομες χρονικές περιόδους (33), (34).
- ✚ Τα επίπεδα της 25(OH)D στον ορό είναι σχετικά σταθερά και δεν επηρεάζονται από τη διατροφή (δηλαδή την πρόσληψη ασβεστίου) και τον τρόπο ζωής (πχ. χαλαρή άσκηση ή τακτική σωματική άσκηση), ενώ τα επίπεδα της 1α,25(OH)₂D επηρεάζονται από όλα τα προαναφερόμενα (32), (33).
- ✚ Η 25(OH)D αντιπροσωπεύει το άθροισμα της εξωγενούς πρόσληψης βιταμίνης D και της δερματικής παραγωγής (35).
- ✚ Τα ένζυμα υδροξυλάσης που μεταβολίζουν τη βιταμίνη D σε 25(OH)D *in vivo* συμπεριφέρονται σύμφωνα με την κινητική αντίδρασης πρώτης τάξης. Αυτό σημαίνει ότι ο ρυθμός παραγωγής της εξαρτάται από τα επίπεδα βιταμίνης D και επομένως, το επίπεδό της στη συστηματική κυκλοφορία είναι ο καλύτερος δείκτης της διατροφικής κατάστασης της βιταμίνης D (36).

Συνήθως οι εξετάσεις για την 25(OH)D δε διαχωρίζουν την D₂ μορφή και την D₃ μορφή της βιταμίνης και τα αποτελέσματά τους προσδιορίζουν το σύνολο της 25(OH)D. Οι πιο πρόσφατες μέθοδοι προσδιορίζουν ξεχωριστά τις 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃ και με το άθροισμα των τιμών τους υπολογίζεται η συγκέντρωση της ολικής 25(OH)D. Η συγκέντρωση της ολικής 25(OH)D χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των επιπέδων βιταμίνης D (37).

1.1.7.3 Μέθοδοι για τη μέτρηση της 25(OH)D

Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για τη μέτρηση της 25(OH)D μπορούν να ταξινομηθούν σε τρεις τύπους: (1) δοκιμασίες δέσμευσης ανταγωνιστικών πρωτεϊνών (CPBA), (2) ανοσοδοκιμασίες και (3) χημικές δοκιμασίες.

(1) Δοκιμασίες δέσμευσης ανταγωνιστικών πρωτεϊνών (CPBA): Η CPBA είναι η πρώτη μέθοδος που αναπτύχθηκε για μετρήσεις 25(OH)D και δημοσιεύτηκε το 1971 (38). Χρησιμοποιούσε τη DBP ως κύριο συνδετικό παράγοντα και τη 3H-25(OH)D ως ιχνηθέτη. Η μέθοδος εγκαταλείφθηκε σε μεγάλο βαθμό, καθώς αποδείχθηκε μη ικανοποιητική για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D. Βασισμένη σε αυτή τη μέθοδο, η Roche Diagnostics εισήγαγε μία αυτοματοποιημένη μέθοδο CPBA. Σε αυτή, το δείγμα επωάζεται με DBP σημασμένη με ερυθρό του ρουθηνίου. Στη συνέχεια, προστίθεται η 25(OH)D συζευγμένη με βιοτίνη για να δεσμεύσει την ελεύθερη DBP. Σφαιρίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη προστίθενται για τη σύνδεση της συζυγούς βιοτίνης 25(OH)D. Στη συνέχεια, τα σφαιρίδια συλλαμβάνονται μαγνητικά και προκαλείται χημειοφωταύγεια. Η συγκέντρωση της 25(OH)D στο δείγμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το σήμα χημειοφωταύγειας (36).

(2) Ανοσοδοκιμασίες: Οι ανοσοδοκιμασίες χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: (a) ραδιοανοσοδοκιμασίες (RIA), (b) συνδεδεμένες με ένζυμα ανοσοπροσροφητικές δοκιμασίες (ELISA) και (c) δοκιμές χημικής φωταύγειας (CLIA).

- a. Η ανάπτυξη πολυκλωνικών αντισωμάτων κατά της 25(OH)D επέτρεψε την ανάπτυξη της πρώτης RIA στις αρχές της δεκαετίας του 1980 (39). Αυτές ήταν επίσης, ανταγωνιστικές δοκιμασίες και η 25(OH)D στο δείγμα ανταγωνιζόταν ένα ραδιοσημασμένο 25(OH)D [125I-25(OH)D]. Η προετοιμασία του δείγματος απλοποιήθηκε με τη χρήση ακετονιτριλίου για τον διαχωρισμό της 25(OH)D από την πρωτεΐνη δέσμευσής της. Και αυτή η μέθοδος δεν ήταν απαλλαγμένη από παρεμβολές. Το πολυκλωνικό αντίσωμα αντέδρασε επίσης με τις μορφές της βιταμίνης D: 24R,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D και 25(OH)D-26,23-λακτόνη, αυξάνοντας το φαινομενικό επίπεδο της μέτρησης της 25(OH)D. Άλλα μειονεκτήματα ήταν η μικρή διάρκεια ζωής των αντιδραστηρίων, οι δυσκολίες και οι κίνδυνοι λόγω της χρήσης ραδιοσημασμένων αντιδραστηρίων και ο χειροκίνητος χαρακτήρας της μεθόδου, που απέκλειε την αυτοματοποιημένη χρήση (40).
- b. Οι ELISA εισήχθησαν για πρώτη φορά στα μέσα της δεκαετίας του 1990. Χρησιμοποιούν ένα πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου για την επικάλυψη φρεατίων μικροτιτλοδότησης, τα οποία στη συνέχεια επωάζονται με ένα δείγμα στο οποίο η 25(OH)D έχει διαχωριστεί από την DBP σε ανταγωνισμό με βιοτίνη επισημασμένη με 25(OH)D. Μετά το πλύσιμο τα φρεάτια επωάζονται με στρεπταβιδίνη συζευγμένη με υπεροξειδάση χρένου που επιτρέπει τη διάσπαση της

τετραμεθυλβενζιδίνης για την παραγωγή ενός χρωμογόνου προϊόντος. Η ποσότητα της 25(OH)D στο δείγμα είναι αντιστρόφως ανάλογη με το χρώμα που σχηματίζεται. Το αντίσωμα IDS είναι λιγότερο αποτελεσματικό στην ανίχνευση της 25(OH)D₂ από ότι στον εντοπισμό της 25(OH)D₃ (41).

- c. Ξεκινώντας από τις αρχές της δεκαετίας του 2000, αναπτύχθηκαν οι πρώτες αυτοματοποιημένες μέθοδοι και είναι πλέον οι κύριες μέθοδοι για την ποσοτικοποίηση της 25(OH)D. Βασίζονται στην αρχή του ανταγωνισμού, μόνο που ο ιχνηθέτης είναι διαφορετικός: είναι μια χημειοφωταυγής ουσία. Σε αυτούς τους προσδιορισμούς, το αντίσωμα συνδέεται στο υλικό στερεάς φάσης και το δείγμα 25(OH)D ανταγωνίζεται για σύνδεση με 25(OH)D συζευγμένη με σήμανση χημειοφωταύγειας. Μετά την έκπλυση το φωτεινό σήμα εκπέμπεται και ποσοτικοποιείται. Η ποσότητα του παραγόμενου φωτός σχετίζεται αντιστρόφως με την ποσότητα της 25(OH)D στο δείγμα (36). Αυτές οι αναλύσεις CLIA προσφέρουν καλύτερη ευαισθησία και αναπαραγωγιμότητα και φυσικά, η αυτοματοποίηση επιτρέπει στα κλινικά εργαστήρια να μετρούν σε μικρό χρονικό διάστημα μεγάλους όγκους δειγμάτων. Τα κύρια μειονεκτήματα περιελάμβαναν παρεμβολές από άλλους μεταβολίτες και τις τεράστιες διακυμάνσεις, που παρατηρήθηκαν μεταξύ διαφορετικών αναλύσεων από διαφορετικούς κατασκευαστές. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη συγκρισιμότητας, όχι μόνο των μετρήσεων μεταξύ κλινικών εργαστηρίων που χρησιμοποιούσαν δοκιμές από διαφορετικούς κατασκευαστές, αλλά και μεταξύ ερευνητικών μελετών (18), (42).

Οι ανοσοδοκιμασίες γενικά, δεν ανιχνεύουν το C3-επιμερές-25(OH)D, έτσι η επιμερική μορφή της 25(OH)D δεν περιλαμβάνεται στο συνολικό επίπεδο της 25(OH)D (37). Ωστόσο, τα διαφορετικά αντισώματα που χρησιμοποιούνται έχουν μεταβλητή ικανότητα να μετρούν τη 25(OH)D₂ σε σχέση με τη 25(OH)D₃. Οι διαδικασίες ταχείας εκχύλισης δε διαχωρίζουν τη 25(OH)D από άλλους μεταβολίτες, όπως τη 24,25(OH)₂D, η οποία μπορεί να βρεθεί σε επίπεδα που είναι 10-15% της 25(OH)D (40). Αυξημένα επίπεδα της DBP στο δείγμα μπορεί να μειώσουν την ανάκτηση (43). Αυτές οι δοκιμασίες μπορούν να παρουσιάζουν μεγάλες αποκλίσεις σε σύγκριση με την LC-MS (δηλαδή, δεν παραλληλίζονται με τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις μετρήσεις LC-MS στο συνολικό εύρος τους) (44). Αυτό έχει ιδιαίτερη σημασία στα χαμηλότερα επίπεδα της 25(OH)D όταν η απόφαση για θεραπεία ή μη θεραπεία εξαρτάται από τα ακριβή αποτελέσματα.

(3) Χημικές δοκιμασίες: Οι μέθοδοι μέτρησης περιλαμβάνουν ένα αρχικό στάδιο σαπωνοποίησης του δείγματος, που ακολουθείται από οργανική εκχύλιση, η οποία απαιτεί τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) προκειμένου να ξεχωρίσουν οι κορυφές για τη D₂ και τη D₃ μορφής της βιταμίνης. Αυτές οι κορυφές μπορούν να ανιχνευθούν και να ποσοτικοποιηθούν είτε με απορρόφηση υπεριώδους (UV) με ανιχνευτή διάταξης διόδων (LC-UV) είτε με φασματομετρία μάζας (LC-MS) (45).

- a. **LC-UV:** Η χρήση της HPLC για τον διαχωρισμό των μεταβολιτών της βιταμίνης D αναπτύχθηκε τη δεκαετία του 1970 (46). Αν και οι αρχικές στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν με βάση το πυρίτιο, οι στήλες C18 αντίστροφης φάσης χρησιμοποιούνται ευρύτερα σήμερα. Η ανίχνευση γίνεται κυρίως με χρήση της υπεριώδους ακτινοβολίας στα 265 nm αν και μπορεί επίσης, να χρησιμοποιηθεί ηλεκτροχημική ανίχνευση. Η μέθοδος μπορεί να διαχωρίσει τη D₂ από τη D₃ μορφή, ενώ είναι ακριβής για τη μέτρηση της 25(OH)D. Ωστόσο, η απόδοσή της είναι εντελώς ανεπαρκής για τη μέτρηση άλλων μεταβολιτών που κυκλοφορούν σε συγκεντρώσεις πολύ χαμηλότερες από αυτές της 25(OH)D, καθώς απαιτούνται πολύ υψηλοί όγκοι δειγμάτων. Είναι αρκετά ακριβή, συσχετίζεται καλά με την LC-MS. Επιπλέον, δείγματα με υψηλή περιεκτικότητα σε λιπίδια μπορούν να επηρεάσουν την απόδοση της έκλουσης, απαιτώντας προσεκτική προετοιμασία δειγμάτων για την αποφυγή εσφαλμένων αποτελεσμάτων (47). Λόγω των μεγάλων απαιτήσεων σε όγκο δειγμάτων και της αργής μέτρησης του δείγματος, η LC-UV αντικαθίσταται σε πολλά εργαστήρια από την LC-MS.
- b. **LC-MS:** Η LC-MS γίνεται το πρότυπο για τις αναλύσεις της 25(OH)D και αναπτύσσεται για τη μέτρηση και άλλων μεταβολιτών της βιταμίνης D. Ουσιαστικά, πραγματοποιείται HPLC για αρχικό διαχωρισμό των μεταβολιτών της βιταμίνης D που ακολουθείται από διαδοχική φασματομετρία μάζας. Η διαδοχική φασματομετρία μάζας, που περιλαμβάνει πολλά στάδια MS, αν και πιο ακριβής και πολύπλοκη από τη φασματομετρία μάζας ενός σταδίου, είναι ουσιαστικά πιο ευαίσθητη με λιγότερες παρεμβολές στρώματος (matrix) (δηλαδή, λιγότερες παρεμβαλλόμενες ουσίες στο δείγμα που εγχύθηκε) (48). Η MS δε διακρίνει το C3-βήτα-επιμερές από το C3-άλφα-επιμερές της 25(OH)D, επομένως απαιτεί ένα προηγούμενο χρωματογραφικό βήμα που διαχωρίζει αυτά τα επιμερή. Οι στήλες πενταφθοροφαινυλοπροπυλίου χρησιμοποιούνται συχνά για τον σκοπό αυτό στις

τρέχουσες μεθόδους. Η συμβολή του επιμερούς C3-βήτα στις συνολικές μετρήσεις της 25(OH)D (αν δε διαχωριστεί) είναι σημαντική σε βρέφη (μέσο επίπεδο 18 nm αλλά έως και 61% του συνόλου) αλλά μπορεί επίσης, να είναι σημαντική σε ενήλικες (μέσα επίπεδα 4,3 nm, αλλά έως και 47% του συνολικού 25(OH)D (49). Επιπλέον, η συγκέντρωση (και το % του συνόλου) του C3-βήτα επιμερούς αυξάνεται με τη λήψη συμπληρωμάτων βιταμίνης D. Μετά τον χρωματογραφικό διαχωρισμό, οι μεταβολίτες πρέπει να ιονίζονται. Οι μεταβολίτες της βιταμίνης D είναι λιπόφιλοι και έτσι, ο ιονισμός μπορεί να αποτελέσει όριο ευαισθησίας.

Αν και η LC-MS είναι μια πολύ ευέλικτη μέθοδος και σε αντίθεση με τις ανοσοδοκιμασίες, οι οποίες μετρούν εύκολα πολλαπλούς μεταβολίτες σε ένα μόνο δείγμα, δεν είναι ελεύθερη μειονεκτημάτων (π.χ. αδυναμία διάκρισης των επιμερών). Αυτά περιλαμβάνουν την καταστολή ιόντων από παρεμβαλλόμενες ουσίες (τα λεγόμενα φαινόμενα στρώματος) (50) και τις φασματικές επικαλύψεις μάζας με ισοβαρικές ενώσεις με συγκρίσιμες αναλογίες m/z (π.χ. 7α-υδροξυ-4 χολεστεν-3-όνη) (51). Το πρόβλημα με τις φασματικές επικαλύψεις μάζας οφείλεται εν μέρει στην τυπική χρήση μη ειδικών μεταβάσεων (π.χ. απώλεια H₂O) που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση πολλαπλών αντιδράσεων. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να μετριαστούν με τη χρήση ενός εσωτερικού προτύπου, συγκεκριμένα του δευτεριωμένου 25(OH)D ως μάρτυρα για την αποτελεσματικότητα ιονισμού (52), την καλύτερη προετοιμασία του δείγματος που περιλαμβάνει ένα βήμα LC για τον διαχωρισμό των επιμερών και των πιθανών ισοβαρών και τη χρήση MS υψηλής ανάλυσης (και tandem MS) για τη διάκριση πιθανών φασματικών επικαλύψεων.

Ένα τελευταίο ζήτημα για τη μέτρηση της 25(OH)D είναι η πρόταση ότι θα πρέπει να συνοδεύεται από μέτρηση των επιπέδων της παραθορμόνης (PTH). Ωστόσο, το Ινστιτούτο Ιατρικής των ΗΠΑ θεωρεί αυτήν την προσέγγιση αμφιλεγόμενη λόγω διακυμάνσεων στη σχέση μεταξύ 25(OH)D και PTH, και επειδή δεν έχει καθοριστεί σαφές όριο για τον ορισμό της «επάρκειας» χρησιμοποιώντας τόσο την 25(OH)D όσο και την PTH (25), (37).

1.2 Παραθορμόνη

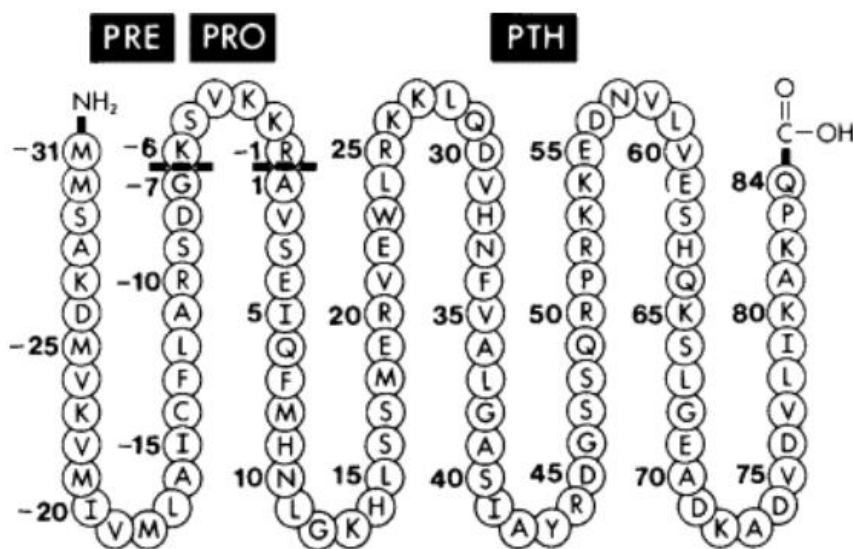
1.2.1 Εισαγωγή

Η παραθορμόνη ή παραθυρεοειδής ορμόνη (PTH) αποτελεί μία από τις τρεις κύριες ορμόνες που ρυθμίζουν την ομοιοστάση του ασβεστίου και των φωσφορικών αλάτων. Οι άλλοι δύο παράγοντες είναι η καλσιτριόλη $[1,25(\text{OH})_2\text{D}]$ και ο αυξητικός παράγοντας ινοβλαστών 23 (FGF23) (53).

Ο έλεγχος της συγκέντρωσης του ιονισμένου ασβεστίου στον ορό ρυθμίζεται αποκλειστικά από την PTH, διατηρώντας τη συγκέντρωσή του εντός στενού εύρους μέσω διέγερσης της επαναρρόφησης ασβεστίου στα νεφρικά σωληνάκια και της οστικής απορρόφησης (54), (55).

1.2.2 Σύνθεση και αποικοδόμηση της PTH

Η PTH στην αρχική της μορφή είναι ένα πολυπεπτίδιο 115 αμινοξέων και ονομάζεται προ-προ-PTH, το οποίο εντός των παραθυρεοειδικών κυττάρων διασπάται στο αμινοτελικό τμήμα αρχικώς σε προ-PTH (90 αμινοξέα) και στη συνέχεια σε PTH (84 αμινοξέα). Το τελευταίο μόριο είναι η κύρια αποθηκευτική, εκκρινόμενη και βιολογικά ενεργή μορφή της ορμόνης (Εικόνα 4) (53), (56).



Εικόνα 4: Δομή της παραθορμόνης (57)

Η PTH 1-84 εκκρίνεται με εξωκυττάρωση μέσα σε δευτερόλεπτα μετά την πρόκληση υπασβεσταιμίας (56). Μόλις εκκριθεί, η PTH απομακρύνεται ταχέως από το πλάσμα μέσω της πρόσληψής της κυρίως από το ήπαρ και τους νεφρούς, όπου η PTH 1-84 διασπάται σε ενεργά αμινο- και ανενεργά καρβοξυτελικά θραύσματα, τα

οποία στη συνέχεια υπόκεινται σε κάθαρση από τους νεφρούς. Η άθικτη PTH έχει χρόνο ημιζωής στο πλάσμα δύο έως τέσσερα λεπτά. Συγκριτικά, τα καρβοξυτελικά θραύσματα έχουν χρόνους ημιζωής 5 έως 10 φορές μεγαλύτερους. Η κυκλοφορούσα ανοσοαντιδραστική PTH σε φυσιολογικά άτομα αποτελείται από:

- ✚ Άθικτη PTH – 5 έως 30%
- ✚ Καρβοξυλικά τερματικά θραύσματα – 70 έως 95%
- ✚ Αμινοτελικά θραύσματα – Ένα μικρό ποσοστό

Το ασβέστιο ρυθμίζει όχι μόνο την απελευθέρωση αλλά τη σύνθεση και την ενδοαδενική αποδόμηση της PTH, σε όλες τις μοριακές της μορφές (58). Κατά τη διάρκεια της υπασβεστιαϊμίας, η αποικοδόμηση της PTH εντός των παραθυρεοειδικών κυττάρων μειώνεται και εκκρίνεται μεγαλύτερο ποσοστό PTH 1-84 σε σχέση με άλλες μοριακές μορφές της ορμόνης. Συγκριτικά, κατά τη διάρκεια της υπερασβεστιαϊμίας, η ενδοκυτταρική αποικοδόμηση της άθικτης PTH αυξάνεται και μειώνεται η διαθεσιμότητα της βιολογικά ενεργής PTH 1-84 προς έκκριση. Κατά συνέπεια, ως επί το πλείστον, βιολογικά ανενεργά καρβοξυτελικά θραύσματα της PTH εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της υπερασβεστιαϊμίας (53), (55), (58). Υπό φυσιολογικές τιμές ασβεστίου στο αίμα, η PTH 1-84 αποτελεί το 20% των συνολικών κυκλοφορούντων μορίων PTH. Αυτό το ποσοστό αυξάνεται σε 33% σε υποασβεστιαϊκές συνθήκες και μειώνεται στο 4% σε κατάσταση υπερασβεστιαϊμίας (58).

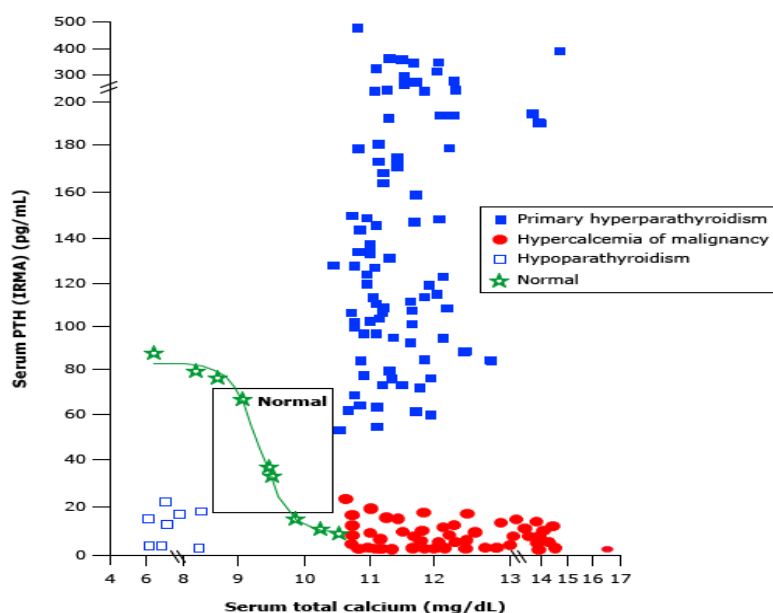
1.2.3 Ρύθμιση

Η έκκριση PTH ρυθμίζεται κυρίως από το επίπεδο του εξωκυττάριου ασβέστιου, μαζί με αυτό των εξωκυττάριων φωσφορικών, την καλσιτριόλη και τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23).

- a. **Εξωκυτταρικό ασβέστιο** – Η σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ασβεστίου στον ορό και της έκκρισης PTH περιγράφεται από μια αντίστροφη, σιγμοειδή καμπύλη, που βασίζεται σε μελέτες έκκρισης PTH ρυθμιζόμενης από ασβέστιο τόσο *in vivo* όσο και *in vitro* (Εικόνα 5) (54), (59). Το μεσαίο σημείο ή το σημείο ρύθμισης της καμπύλης ασβεστίου-PTH είναι ένας βασικός καθοριστικός παράγοντας για το επίπεδο στο οποίο η συγκέντρωση ιονισμένου ασβεστίου στον ορό "ρυθμίζεται" *in vivo*, και η απότομη κλίση της καμπύλης διασφαλίζει ότι αυτή η συγκέντρωση ποικίλλει ελάχιστα. Σε φυσιολογικά άτομα, μια μείωση της συγκέντρωσης ιονισμένου ασβεστίου στον ορό μόλις 0,1 mg/dL (0,025 mmol/L) προκαλεί μεγάλη

αύξηση στη συγκέντρωση της PTH στον ορό μέσα σε δευτερόλεπτα έως λεπτά. Αντίθετα, μια εξίσου μικρή αύξηση του ιονισμένου ασβεστίου στον ορό μειώνει γρήγορα τη συγκέντρωση της PTH στον ορό.

Serum parathyroid hormone (PTH) concentrations in hypercalcemia and hypocalcemia



Serum PTH concentrations according to the serum total calcium concentration in various disease states. The normal range is shown in the white box. The sigmoidal curve (green stars) is derived from a calcium citrate infusion protocol administered to 38 normal subjects. Serum PTH and calcium values are low in hypoparathyroidism (open blue boxes) and high in primary hyperparathyroidism (blue squares). The serum calcium concentration is high and serum PTH is appropriately low in patients with non-PTH-induced hypercalcemia of malignancy (red circles).

PTH: parathyroid hormone.

Data from: Haden ST, Brown EM, Hurwitz S, et al. The effects of age and gender on parathyroid hormone dynamics. *Clin Endocrinol* 2000; 52:329.

UpToDate®

Εικόνα 5: Σχέση μεταξύ συγκέντρωσης ασβεστίου στον ορό και έκκρισης PTH

Η αλλαγή στη συγκέντρωση του ασβεστίου γίνεται αισθητή από έναν εξαιρετικά ευαίσθητο υποδοχέα ανίχνευσης του ασβεστίου (CaSR) στην επιφάνεια των παραθυρεοειδικών κυττάρων (60). Ο υποδοχέας έχει ένα μακρύ αμινοτελικό άκρο, επτά διαμεμβρανικά τμήματα και ένα μικρότερο ενδοκυτταρικό καρβοξυλικό άκρο.

Όταν ενεργοποιείται από μια μικρή αύξηση του ιονισμένου ασβεστίου ορού, το σύμπλεγμα ασβεστίου-CaSR δρα μέσω μιας ή περισσότερων πρωτεϊνών που δεσμεύουν νουκλεοτίδια γουανίνης (G) μέσω δεύτερου σήματος, όπως αυξήσεις στην ενδοκυτταρική συγκέντρωση ασβεστίου και φωσφορικής ινοσιτόλης ή αναστολή της

κυκλικής αδενίνης (cAMP), για την αναστολή της έκκρισης PTH και τη μείωση της νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης του ασβεστίου από τις δράσεις του CaSR στον παραθυρεοειδή και στους νεφρούς, αντίστοιχα. Αντίθετα, η επίδραση της απενεργοποίησης του υποδοχέα από μια μικρή μείωση της συγκέντρωσης ιονισμένου ασβεστίου στον ορό είναι η διέγερση της έκκρισης PTH και η ενίσχυση της νεφρικής σωληναριακής επαναρρόφησης του ασβεστίου.

Η απόκριση της PTH στην υπασβεσταιμία έχει το ακόλουθο χρονικό προφίλ. Όλες αυτές οι ενέργειες ελέγχονται από το CaSR (53), (55):

- ✚ Δευτερόλεπτα έως λεπτά – Εξωκυττάρωση PTH από εκκριτικά κυστίδια στο εξωκυττάριο υγρό
- ✚ Λεπτά έως μία ώρα – Μείωση της ενδοκυτταρικής αποικοδόμησης της PTH
- ✚ Ώρες έως ημέρες – Αύξηση της έκφρασης του γονιδίου PTH ως αποτέλεσμα της σταθεροποίησης του PTH-mRNA (επίσης, διεγείρεται από χαμηλή συγκέντρωση καλσιτριόλης στον ορό, η οποία αυξάνει τη μεταγραφή του γονιδίου PTH λόγω της φυσιολογικής ανασταλτικής δράσης της καλσιτριόλης στη μεταγραφή του γονιδίου PTH) (61)
- ✚ Ημέρες έως εβδομάδες – Πολλαπλασιασμός των παραθυρεοειδικών κυττάρων (διεγείρεται επίσης, από χαμηλές συγκεντρώσεις καλσιτριόλης στον ορό)

b. **Εξωκυττάριο φωσφορικό άλας** – Το φωσφορικό άλας, όπως και το ασβέστιο, δρα ως εξωκυττάριος ιονικός αγγελιοφόρος. Η υπερφωσφαταιμία ρυθμίζει αρκετές από τις ίδιες παραμέτρους της λειτουργίας του παραθυρεοειδούς αδένος που ρυθμίζονται από το εξωκυττάριο ασβέστιο, την καλσιτριόλη και τον FGF23. Συγκεκριμένα, διεγείροντας την έκκριση PTH, πιθανότατα σε μεγάλο βαθμό αυξάνοντας τη σταθερότητα του PTH-mRNA και προάγοντας την ανάπτυξη των παραθυρεοειδικών κυττάρων (62), (63), (64). Αυτές οι αποκρίσεις μπορεί να προκαλούνται, εν μέρει, από την πρόκληση υπασβεσταιμίας λόγω της αύξησης της συγκέντρωσης φωσφορικών στον ορό.

Ωστόσο, μικρές αυξήσεις στη συγκέντρωση φωσφορικών στον ορό μπορεί να μην είναι επαρκείς για τη μείωση της συγκέντρωσης του ασβεστίου στον ορό σε επίπεδο που να διεγείρει την έκκριση PTH (65). Επιπλέον, υπάρχουν αυξανόμενες ενδείξεις ότι η υπερφωσφαταιμία (ανεξάρτητη από τις συγκεντρώσεις ασβεστίου και καλσιτριόλης στον ορό) διεγείρει άμεσα τη σύνθεση της PTH, καθώς και τον

κυτταρικό πολλαπλασιασμό των παραθυρεοειδών σε ασθενείς με προχωρημένη νεφρική ανεπάρκεια, που αποτελεί την πιο κοινή αιτία υπερφωσφαταιμίας (62), (63), (64). Ο υποτιθέμενος μηχανισμός ανίχνευσης των φωσφορικών είναι έως σήμερα άγνωστος. Έχει προταθεί ένας άμεσος ρόλος των φωσφορικών στην αναστολή της δραστηριότητας του CaSR μέσω μη ανταγωνιστικού ανταγωνισμού (66).

- c. **Καλσιτριόλη** – Τα παραθυρεοειδικά κύτταρα περιέχουν υποδοχείς βιταμίνης D (VDR) και το γονίδιο PTH περιέχει ένα στοιχείο απόκρισης στη βιταμίνη D. Η καλσιτριόλη δεσμεύοντας τον υποδοχέα της βιταμίνης D αναστέλλει την έκφραση του γονιδίου PTH και επομένως, τη σύνθεση της PTH (61). Η καλσιτριόλη αναστέλλει επίσης, τον πολλαπλασιασμό των παραθυρεοειδικών κυττάρων. Ορισμένες από τις δράσεις της καλσιτριόλης στη λειτουργία του παραθυρεοειδούς μπορεί να προκύψουν από την ικανότητά της να αυξάνει την έκφραση του CaSR (67).
- d. **FGF23** – Εκτός από τη φωσφατουρική του δράση, ο FGF23 ασκεί άμεση δράση στον παραθυρεοειδή αδένα, αναστέλλοντας τη σύνθεση και την έκκριση της PTH (68), (69). Στην πραγματικότητα, η PTH, η καλσιτριόλη και ο FGF23 συμμετέχουν στη διατήρηση της ομοιόστασης τόσο του ασβεστίου όσο και των φωσφορικών και υπάρχουν εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών των δύο ομοιοστατικών συστημάτων.

1.2.4 Υποδοχείς της PTH

Η PTH, στις διάφορες μοριακές της μορφές, δρα δεσμεύοντας και ενεργοποιώντας έναν από τους διάφορους τύπους υποδοχέων PTH που είναι αναγνωρισμένοι μέχρι σήμερα (53), (70).

- a. **PTH1R** – Η PTH, η πρωτεΐνη που σχετίζεται με την PTH (PTHrP) και τα βιολογικά ενεργά αμινοτελικά τμήματα της PTH (π.χ. η PTH 1-34) δεσμεύονται στον υποδοχέα PTH1R (71). Ο υποδοχέας αναγνωρίζει τόσο την PTH όσο και την PTHrP λόγω του σημαντικού βαθμού ομολογίας στα αμινοτελικά μέρη αυτών των δύο πεπτιδίων. Ο PTH1R εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στα οστά και στα νεφρά και

υπάρχει επίσης, σε άλλους ιστούς όπως ο μαστός, το δέρμα, η καρδιά, τα αιμοφόρα αγγεία και το πάγκρεας (70).

- b. **PTH2R** – Ο υποδοχέας PTH2 (PTH2R) δεσμεύει επιλεκτικά την PTH, αλλά όχι την PTHrP (70). Εκφράζεται σε μεγάλο βαθμό στο κεντρικό νευρικό σύστημα, στο καρδιαγγειακό και στο γαστρεντερικό σύστημα, καθώς στους πνεύμονες και τους όρχεις και φαίνεται ότι μπορεί να συμμετέχει στην αντίληψη του πόνου (72).
- c. **Νέοι υποδοχείς** – Όλο και περισσότερες ενδείξεις υποδεικνύουν την παρουσία νέων υποδοχέων PTH με ειδικότητα για τα καρβοξυτελικά τμήματα της PTH (C-PTHrPs), μια περιοχή της ορμόνης που προηγουμένως πιστευόταν ότι είναι βιολογικά αδρανής, αλλά τώρα έχει αποδειχθεί ότι διαθέτει υποασβεστιαστική δραστηριότητα. Οι C-PTHrPs υποδοχείς υπάρχουν σε διάφορους ιστούς αλλά εκφράζονται περισσότερο στα οστά (70), (73).

Η ενεργοποίηση του PTH1R ενεργοποιεί πολλαπλές οδούς κυτταρικής σηματοδότησης που εξαρτώνται από πρωτεΐνες και ανεξάρτητες από τη δέσμευση νουκλεοτιδίων γουανίνης (G), συμπεριλαμβανομένης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), της οδού φωσφολιπάσης C (PLC), της πρωτεϊνικής κινάσης C (PKC), της απελευθέρωσης ασβεστίου από τις ενδοκυτταρικές αποθήκες κα. (70), (74), (75), (76).

Η βιολογική δραστηριότητα της PTH (τουλάχιστον η υπερασβεστιαστική της δράση) οφείλεται στο αμινοτελικό της άκρο, όπως αποδεικνύεται από την παρατήρηση ότι οι δραστηριότητες της PTH 1-34 και της PTH 1-84 είναι παρόμοιες σε μοριακή βάση. Ωστόσο, δεν είναι όλα τα αμινοτελικά θραύσματα βιοϊσοδύναμα σε δοκιμασίες δέσμευσης υποδοχέα και ενεργοποίησης cAMP (77). Αντίθετα, ένας αυξανόμενος όγκος δεδομένων υποστηρίζει μια υποασβεστιαστική επίδραση του καρβοξυτελικού τμήματος της PTH, η PTH 7-84, η οποία αντιστρέφεται από την PTH 1-34 και την PTH 1-84 (78). Το αμινοτελικό άκρο της PTHrP είναι δομικά παρόμοιο με αυτό της PTH. Προκαλεί υπερασβεστιασμία σε ασθενείς με όγκους που εκκρίνουν PTHrP ενεργοποιώντας τον ίδιο υποδοχέα.

1.2.5 Βιολογική δράση

Η PTH εκκρίνεται σχεδόν ακαριαία ως απόκριση σε πολύ μικρές μειώσεις του ιονισμένου ασβεστίου στον ορό, οι οποίες ανιχνεύονται από τον υποδοχέα CaSR. Η αύξηση της έκκρισης της PTH αυξάνει τη συγκέντρωση ασβεστίου στον ορό προς αποκατάσταση του φυσιολογικού του επιπέδου μέσω τριών ενεργειών:

- ✚ Αυξημένη οστική απορρόφηση, η οποία συμβαίνει μέσα σε λίγα λεπτά μετά την αύξηση της έκκρισης PTH.
- ✚ Αυξημένη εντερική απορρόφηση ασβεστίου με τη μεσολάβηση της αυξημένης παραγωγής καλσιτριόλης, η οποία εμφανίζεται μια ημέρα ή περισσότερο μετά την αύξηση στην έκκριση PTH.
- ✚ Μειωμένη απέκκριση ασβεστίου στα ούρα λόγω διέγερσης της επαναρρόφησης ασβεστίου στο άπω σωληνάριο του νεφρού, η οποία συμβαίνει μέσα σε λίγα λεπτά μετά την αύξηση της έκκρισης PTH.

Σκελετικές δράσεις της PTH — Η PTH δρα στα οστά, την κύρια δεξαμενή ασβεστίου, για να απελευθερώσει το ασβέστιο σε δύο φάσεις (79) :

- a. Η άμεση δράση της PTH είναι η κινητοποίηση του ασβεστίου προς τον ορό από σκελετικές αποθήκες, που είναι άμεσα διαθέσιμες και σε ισορροπία με το εξωκυττάριο υγρό.
- b. Αργότερα, η PTH διεγείρει την απελευθέρωση ασβεστίου (και φωσφορικού) με την ενεργοποίηση της οστικής απορρόφησης.

Η επικρατούσα άποψη ήταν ότι οι οστεοβλάστες, αλλά όχι οι οστεοκλάστες, εκφράζουν υποδοχείς PTH (53), (80). Η PTH στοχεύει τους οστεοβλάστες και τα οστεοκύτταρα για να ενισχύσει την αναδόμηση των οστών. Με τη διέγερση της PTH, οι προοστεοβλάστες ωριμάζουν σε οστεοβλάστες που σχηματίζουν οστό που αποθέτουν κολλαγόνο και στη συνέχεια ανοργανοποιούν το υπόβαθρο (81). Εφόσον η μονάδα αναδιαμόρφωσης είναι πάντα συνδεδεμένη (δηλαδή, ο σχηματισμός οστού ισούται με την οστική απορρόφηση), μόλις διεγερθούν οι προοστεοβλάστες, απελευθερώνουν κυτοκίνες που μπορούν να ενεργοποιήσουν τους οστεοκλάστες με αποτέλεσμα την οστική απορρόφηση. Έτσι, ο σχηματισμός οστεοκλαστών απαιτεί μια αλληλεπίδραση με κύτταρα της οστεοβλαστικής γενεαλογίας, η οποία μπορεί να εξαρτάται από την επαφή κυττάρου-κυττάρου και τους ρυθμιστές του σχηματισμού οστεοκλαστών όπως το RANK (ο ενεργοποιητής υποδοχέα του πυρηνικού παράγοντα

κάπα-B), η οστεοπρωτεγερίνη και ο συνδέτης RANK (RANKL) (82). Η PTH αυξάνει τη δραστηριότητα και τον αριθμό των οστεοκλαστών έμμεσα μέσω επιδράσεων στο RANKL και στην οστεοπρωτεγερίνη (83). Ωστόσο, ορισμένα δεδομένα υποδηλώνουν μια βιολογικά σχετική δέσμευση άθικτης PTH, αλλά όχι PTH 1-34, με οστεοκλάστες πιθανώς μέσω των νέων αλλά ατελώς χαρακτηρισμένων υποδοχέων PTH με εξειδίκευση για την καρβοξυλ-τερματική περιοχή της PTH (C-PTHrPs) (70).

Η καθαρή επίδραση της PTH στα οστά ποικίλλει ανάλογα με τη σοβαρότητα και τη χρονιότητα της περίσσειας PTH. Η χρόνια έκθεση σε υψηλές συγκεντρώσεις PTH ορού (όπως παρατηρείται με πρωτοπαθή ή δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό) έχει ως αποτέλεσμα την οστική απορρόφηση, ενώ η διαλείπουσα χορήγηση ανασυνδυασμένης ανθρώπινης PTH (και πλήρους μήκους 1-84 ή θραύσμα 1-34) έχει αποδειχθεί ότι διεγείρει περισσότερο τον σχηματισμό οστού παρά την απορρόφηση.

Συγκεκριμένα τμήματα του μορίου της PTH φαίνονται απαραίτητα για τον αναβολισμό των οστών. Οι PTH 1-31 και 1-34 διατηρούν όλη τη βιολογική δραστηριότητα του ανέπαφου πεπτιδίου (1-84) (84). Από την άλλη πλευρά, η αμινοτελική περικοπή των δύο πρώτων αμινοξέων της PTH εξαλείφει το μεγαλύτερο μέρος της σηματοδότησης της κυκλικής μονοφωσφορικής αδενοσίνης (cAMP), μια οδό που φαίνεται σημαντική, αλλά όχι προγνωστική, για την αναβολική επίδραση της PTH στα οστά (77), (85).

Νεφρικές δράσεις της PTH — Ο νεφρός αποτελεί σημαντικό όργανο στην ομοιοστάση των ανόργανων ιόντων που μεσολαβείται σε μεγάλο βαθμό από τις δράσεις της PTH και των εξωκυτταρικών ιόντων ασβεστίου στους αντίστοιχους υποδοχείς τους.

Επαναπορρόφηση ασβεστίου — Το φιλτραρισμένο ασβέστιο επαναρροφάται κατά μήκος μεγάλου μέρους του νεφρώνα. Οι μηχανισμοί με τους οποίους επαναρροφάται και η ρύθμισή τους, ωστόσο, ποικίλλουν ανάλογα με τη θέση κατά μήκος του νεφρώνα. Το μεγαλύτερο μέρος του φιλτραρισμένου ασβεστίου επαναρροφάται παθητικά στο εγγύς σωληνάριο κάτω από τις ευνοϊκές ηλεκτροχημικές βαθμίδες που δημιουργούνται από την επαναρρόφηση νατρίου και νερού. Αντίθετα, η μεταφορά ασβεστίου ρυθμίζεται ενεργά στον περιφερικό νεφρώνα σύμφωνα με τις ανάγκες του οργανισμού. Αυτό λαμβάνει χώρα στο φλοιώδες παχύ ανιόν άκρο του βρόχου του Henle (cTAL), καθώς και στο άπω εσπειραμένο σωληνάριο (DCT) και στο παρακείμενο συνδετικό

τμήμα (ένα μικρό τμήμα μεταξύ του απώτερου σωληνίσκου και του φλοιώδους συλλεκτικού σωληναρίου) (86), (87).

Η PTH δρα τόσο στο cTAL όσο στο DCT και στο περιφερικό σωληνάριο για να διεγείρει την επαναρρόφηση του ασβεστίου (88). Έτσι, εάν η έκκριση της PTH μειωθεί κατάλληλα μετά από μια αύξηση του ιονισμένου ασβεστίου στον ορό, η επακόλουθη πτώση της σωληναριακής επαναρρόφησης ασβεστίου και η αύξηση της απέκκρισης ασβεστίου θα συμβάλει στην αποκατάσταση της φυσιολογικής ασβεστιαμίας. Το ίδιο το υψηλό επίπεδο ασβεστίου του ορού συμβάλλει επίσης, στην ασβεστοποίηση, δρώντας μέσω του CaSR, ιδιαίτερα στο cTAL (89), (90).

Η επαναρρόφηση των φωσφορικών — Η PTH, μαζί με τον αυξητικό παράγοντα ινοβλαστών 23 (FGF23), είναι ένας καθοριστικός παράγοντας της συγκέντρωσης φωσφορικών στον ορό. Αναστέλλει κυρίως την εγγύς σωληναριακή επαναρρόφηση του φωσφόρου. Αυτή η επίδραση προκαλείται κυρίως από τη μειωμένη δραστηριότητα, την εσωτερίκευση και την αποικοδόμηση των συμμεταφορέων Npt2A και Npt2C φωσφορικού νατρίου στην αυλική μεμβράνη των εγγύς σωληναρίων που μεσολαβούν στη σωληναριακή επαναρρόφηση του φωσφορικού (91), (92).

Σύνθεση καλσιτριόλης — Η PTH διεγείρει τη σύνθεση της α-υδροξυλάσης στα εγγύς σωληνάκια και επομένως, τη μετατροπή της 25(OH)D σε 1,25(OH)₂D (93). Η PTH μειώνει επίσης, τη δραστηριότητα μιας 24-υδροξυλάσης στον καταβολισμό της 1,25(OH)₂D. Αυτή είναι μια ιδιαίτερα σημαντική δράση της PTH στη διατήρηση της ομοιόστασης του ασβεστίου σε καταστάσεις ανεπάρκειας βιταμίνης D.

Άλλες δράσεις της PTH — Η πιθανότητα ότι η PTH δρα σε άλλους ιστούς έχει αυξηθεί μετά από προσπάθειες να εξηγηθούν ορισμένες κλινικές εκδηλώσεις του υπερπαραθυρεοειδισμού και κάποιες πειραματικές μελέτες έχουν βρει επιδράσεις της PTH στο έντερο, το ήπαρ, το λιπώδη ιστό, την καρδιαγγειακή λειτουργία και τη νευρομυϊκή λειτουργία. Για παράδειγμα, στον υπερπαραθυρεοειδισμό έχουν περιγραφεί μειωμένη ανοχή στη γλυκόζη και αλλαγές στον μεταβολισμό των λιπιδίων που θυμίζουν το μεταβολικό σύνδρομο. Ομοίως, οι ασθενείς με πρωτοπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό έχουν αυξημένη πιθανότητα για υπέρταση, υπερτροφία αριστερής κοιλίας και νευρομυϊκές ανωμαλίες.

Επιπλέον, η χρόνια περίσσεια PTH, μαζί με τις σχετικές αυξήσεις στο επίπεδο του FGF23, έχει εμπλακεί στην παθογένεση της αγγειακής ασβεστοποίησης και της

υπέρτασης σε ασθενείς με χρόνια νεφρική νόσο (94), (95). Αυτές οι μη κλασικές επιδράσεις της PTH μπορεί να προκαλούνται από διαφορετικά τμήματα PTH και/ή διαφορετικούς υποδοχείς PTH (70). Επιπλέον, ο βαθμός βελτίωσης αυτών των ανωμαλιών μετά την παραθυρεοειδεκτομή ποικίλλει σημαντικά και εξαρτάται από το αν στην πραγματικότητα προκαλούνται άμεσα από την περίσσεια PTH.

1.2.6 Παθήσεις

Πρωτογενής υπερπαραθυρεοειδισμός — Σε ασθενείς με υπερπαραθυρεοειδισμό που προκαλείται από αδένωμα ή υπερπλασία παραθυρεοειδούς, η έκκριση της PTH είναι πολύ υψηλή σε σχέση με τη συγκέντρωση ασβεστίου στον ορό (η καμπύλη ασβεστίου-PTH ορού μετατοπίζεται προς τα δεξιά) (54). Η κυτταρική βάση για τη μετατόπιση είναι πιθανώς ένας συνδυασμός μειωμένης ευαισθησίας των παραθυρεοειδικών κυττάρων στο ασβέστιο, πιθανώς λόγω μείωσης του αριθμού των λειτουργικών CaSR και/ή των κατάντη οδών σηματοδότησης, αύξησης της μάζας των παραθυρεοειδών κυττάρων ή και των δύο. Η μοριακή βάση του πρωτοπαθούς υπερπαραθυρεοειδισμού είναι γνωστή σε ένα μικρό αριθμό περιπτώσεων. Μερικά παραδείγματα είναι γενετικές βλάβες στη μενίνη (σε πολλαπλή ενδοκρινική νεοπλασία 1 [MEN1] και αδενώματα), την παραφιβρωμίνη (σε σποραδικό και οικογενή καρκίνο του παραθυρεοειδούς), την κυκλίνη D1 (στα αδενώματα) και το CaSR (σε άτυπη FHH που παρουσιάζεται ως πρωτοπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός) (96).

Δευτεροπαθής υπερπαραθυρεοειδισμός — Σε ασθενείς με νεφρική ανεπάρκεια που έχουν μη ελεγχόμενο υπερπαραθυρεοειδισμό, η αυξημένη έκκριση της PTH σχετίζεται όχι μόνο με την υπερπλασία και τη διεύρυνση του αδένου αλλά και με τη μειωμένη έκφραση των CaSR και ίσως με τα κατάντη σηματοδοτικά στοιχεία του (97), (98). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα μειωμένη ανταπόκριση στα επίπεδα ασβεστίου ορού, με συνεχή έκκριση PTH παρά τα φυσιολογικά ή υψηλά επίπεδα ασβεστίου ορού και τελικά, σε ορισμένες περιπτώσεις, σε πραγματική αυτονόμηση του παραθυρεοειδούς αδένου (έκκριση PTH ανεξάρτητα από το επίπεδο ασβεστίου ορού). Σε ασθενείς με δευτεροπαθή υπερπαραθυρεοειδισμό από σοβαρή ανεπάρκεια βιταμίνης D, η υπερπλασία των τεσσάρων παραθυρεοειδών αδένων αποτελεί την κύρια παθοφυσιολογία και αυτή η υπερπλασία μπορεί να χρειαστεί μήνες έως και περισσότερο από ένα χρόνο για να αποκατασταθεί (99).

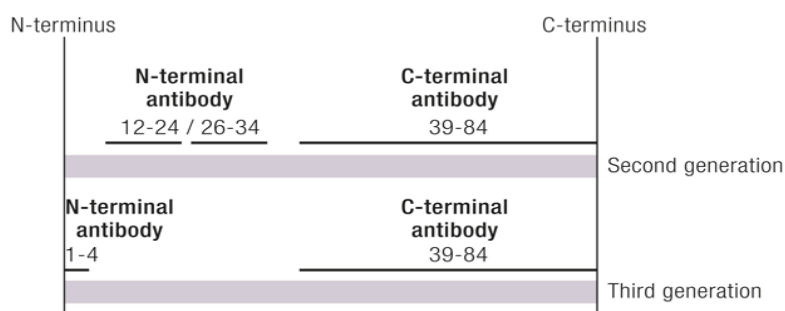
1.2.7 Προσδιορισμός PTH

Οι μέθοδοι προσδιορισμού της PTH δύνανται να ταξινομηθούν σε τρεις γενικές κατηγορίες ανάλογα με την περιοχή του μορίου που αναγνωρίζεται από το ζεύγος αντισώματος-ιχνηθέτη:

- τις ανταγωνιστικές ανοσοδοκιμασίες (1^η γενιά)
- τις ανοσομετρικές δοκιμασίες (2^η γενιά)
- και τις νέες δοκιμασίες που χρησιμοποιούν φασματομετρία μάζας (3^η γενιά) (100).

Οι μέθοδοι PTH πρώτης γενιάς χρησιμοποιούν ένα μόνο πολυκλωνικό αντίσωμα που στρέφεται κατά του C-τερματικού τμήματος ή του ενδιάμεσου τμήματος της PTH. Επειδή αυτές οι δοκιμασίες μετρούν πολλά βιολογικά ανενεργά C-τερματικά θραύσματα, επί του παρόντος χρησιμοποιούνται πιο ειδικοί προσδιορισμοί PTH (101).

Στις μεθόδους 2^{ης} γενιάς, οι οποίες ονομάζονται αναλύσεις άθικτης PTH, δύο διακριτά αντισώματα (συνήθως μονοκλωνικά), που στρέφονται εναντίον διαφορετικών επιτόπων, δεσμεύουν τις μορφές PTH που υπάρχουν στο δείγμα. Ένα από τα αντισώματα είναι συνδεδεμένο σε μια στερεά φάση και το άλλο είναι επισημασμένο (102), (103). Ένα αντίσωμα κατευθύνεται ενάντια στο C-τελικό τμήμα και ένα δεύτερο αντίσωμα κατευθύνεται κατά του N-τερματικού τμήματος της PTH (Εικόνα 6). Με αυτόν τον τρόπο, η δοκιμασία υποτίθεται ότι μετρούσε μόνο την πλήρους μήκους PTH. Ωστόσο, επειδή το N-τερματικό αντίσωμα δεν κατευθύνεται στα πρώτα τέσσερα αμινοξέα, αυτός ο προσδιορισμός σχεδιάστηκε για τη μέτρηση και των C-τερματικών θραυσμάτων, κυρίως του θραύσματος PTH 7-84 (104). Στις δοκιμασίες δεύτερης γενιάς εξακολουθούν να υπάρχουν δύο διαφορετικά είδη αντισωμάτων για την αναγνώριση του N-τερματικού τμήματος της PTH. Το αντίσωμα μπορεί να κατευθυνθεί προς τα αμινοξέα 12-24 ή τα αμινοξέα 26-32 (105). Άρα, ανάλογα με τον στόχο της δοκιμασίας, μετρούνται διαφορετικά θραύσματα.



Εικόνα 6: Θέσεις αναγνώρισης αντισωμάτων σε αναλύσεις PTH δεύτερης και τρίτης γενιάς (101)

Οι ανοσομετρικές μέθοδοι για τη μέτρηση της iPTH στον ορό είναι ευρέως διαθέσιμες σε κλινικά εργαστήρια, έχουν καλή ευαισθησία και επαναληψιμότητα και καλά καθορισμένες τιμές αναφοράς (102), (103).

Οι εξετάσεις PTH 3^{ης} γενιάς ονομάζονται ολικές ή βιοάθικτες αναλύσεις PTH. Η ανοσοδοκιμασία τύπου sandwich χρησιμοποιεί ένα N-τερματικό αντίσωμα που κατευθύνεται κατά των πρώτων τεσσάρων αμινοξέων της PTH και ένα C-τερματικό αντίσωμα παρόμοιο με τους προσδιορισμούς δεύτερης γενιάς (Εικόνα 6). Ως εκ τούτου, μετρίεται μόνο η PTH πλήρους μήκους. Τα θραύσματα, όπως 7–84 PTH, δεν ανιχνεύονται. Αν και οι δοκιμασίες τρίτης γενιάς φαίνονται πιο ειδικές από τις δοκιμασίες δεύτερης γενιάς, αυτές οι δοκιμασίες μπορούν να ανιχνεύσουν μορφές PTH που τροποποιούνται μετά τη μετάφραση, όπως η μορφή που βρέθηκε να υπερπαράγεται στο καρκίνωμα του παραθυρεοειδούς. Οι μετρήσεις της PTH με μεθόδους δεύτερης και τρίτης γενιάς μπορεί να αποκλίνουν έως και 47% (106), (107). Αυτές οι διαφορές είναι σημαντικό να λαμβάνονται υπόψη κατά την ερμηνεία των συγκεντρώσεων PTH. Τα χαρακτηριστικά των εξετάσεων δεύτερης και τρίτης γενιάς συνοψίζονται στον Πίνακα 2.

Πίνακας 2: Χαρακτηριστικά εξετάσεων PTH δεύτερης και τρίτης γενιάς (101)

	Μέθοδοι 2ης γενιάς	Μέθοδοι 3ης γενιάς
Όνομα μεθόδου	Άθικτη PTH	Ολόκληρη PTH
		Βιο-άθικτη PTH
Τεχνική	Ανοσοπροσδιορισμός τύπου sandwich	
Αντισώματα	N-τερματικό αντίσωμα (αμινοξέα 12-24 ή 26-32)	N-τερματικό αντίσωμα (αμινοξέα 1-4)
	C-τερματικό αντίσωμα (αμινοξέα 34-84)	C-τερματικό αντίσωμα (αμινοξέα 34-84)
Διασταυρούμενη αντιδραστικότητα	C-τερματικά θραύσματα	Αμινο-PTH
	Οξειδωμένη PTH	Οξειδωμένη PTH
Βαθμονόμηση	Οι κατασκευάστριες εταιρείες χρησιμοποιούν διαφορετικά διεθνή πρότυπα	

1.2.7.1 Συλλογή δειγμάτων

Η συλλογή δειγμάτων αίματος για τη μέτρηση της PTH προτείνεται να πραγματοποιείται μεταξύ 10:00 και 16:00 (weakly recommendation) λόγω του κερκάρδιου ρυθμού που ακολουθεί η έκκριση της PTH. Καθώς η τα επίπεδα ασβεστίου επηρεάζονται από την πρόσληψη τροφής, τα δείγματα για τη μέτρηση της PTH θα πρέπει να λαμβάνονται όταν ο ασθενής είναι σε κατάσταση νηστείας (108).

1.2.7.2 Συνθήκες σταθερότητας δειγμάτων

Έχει αποδειχθεί πειραματικά ότι για δείγματα σε θερμοκρασία δωματίου το πλάσμα-EDTA είναι προτιμότερο για τη μέτρηση της PTH. Όταν τα δείγματα όμως, υποβληθούν σε επεξεργασία στο εργαστήριο και διατηρηθούν κατεψυγμένα, η PTH είναι πιο σταθερή στον ορό από το πλάσμα-EDTA (109).

Η παρατηρούμενη σταθερότητα μπορεί να εξαρτάται από τη μέθοδο. Για παράδειγμα, η PTH ήταν σταθερή τόσο στον κατεψυγμένο ορό όσο και στο πλάσμα για τουλάχιστον 2 χρόνια όταν αναλύθηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο Roche Elecsys (108).

1.2.7.3 Επιλογή κατάλληλου μορίου για προσδιορισμό

Η τυπική μέτρηση της παραθυρεοειδούς ορμόνης (PTH) είναι η άθικτη δοκιμασία PTH (iPTH). Σε αντίθεση με τα προϊόντα αποικοδόμησης της PTH, η συγκέντρωση της iPTH είναι σχετικά ανεξάρτητη από τον ρυθμό πειραματικής διήθησης και αντανακλά το βιολογικά ενεργό τμήμα της ορμόνης (110).

Ο προσδιορισμός της iPTH αντιδρά όχι μόνο με τη 1–84 PTH, αλλά και με μεγάλα περικομμένα θραύσματα μη-1–84 PTH, συμπεριλαμβανομένης της 7–84 PTH. Από την άλλη πλευρά, η μέθοδος της ολόκληρης PTH είναι ειδική ως προς τη 1–84 PTH (111). Γενικά, απαιτείται προσοχή στη μέτρηση της iPTH σε ασθενής με νεφρική δυσλειτουργία. Οι μέθοδοι προσδιορισμού της φαίνεται να υπερεκτιμούν την πραγματική PTH, καθώς αντιδρούν διασταυρούμενα με μη (1–84) θραύσματα PTH (C-PTH) που συσσωρεύονται σε νεφρική ανεπάρκεια (112).

Επίσης, έχει αποδειχθεί ότι τα μετρούμενα επίπεδα PTH ποικίλλουν ευρέως μεταξύ διαφορετικών εμπορικών κιτ λόγω της έλλειψης προτυποποίησης των δοκιμασιών της PTH. Έτσι, η βέλτιστη διαδικασία για τη μέτρηση της iPTH είναι η ταχεία φυγοκέντρηση μετά τη συλλογή αίματος, ακολουθούμενη από άμεση μέτρηση (113).

Κεφάλαιο 2^ο: Σύγκριση μεθόδων- Στατιστική ανάλυση

Η σύγκριση μεθόδων χρησιμοποιείται για να προσδιοριστεί εάν μια νέα μέθοδος μέτρησης είναι ισοδύναμη με μια άλλη μέθοδο που χρησιμοποιείται αυτήν τη στιγμή.

Για τον σκοπό της μελέτης ελήφθησαν δύο σερ δεδομένων στα ίδια βιολογικά δείγματα που τα ορίζουν ως εξαρτημένα δείγματα. Κατά συνέπεια, οι γνωστές στατιστικές δοκιμασίες, που χρησιμοποιούνται συνήθως, δε δύναται να εφαρμοστούν για τις αναλύσεις των δεδομένων. Για τον λόγο αυτό, έχουν αναπτυχθεί άλλες στατιστικές και γραφικές μέθοδοι αποκλειστικά για αναλύσεις δεδομένων σύγκρισης μεθόδων όπως: παλινδρόμηση Passing-Bablok, παλινδρόμηση Deming, διαγράμματα Bland-Altman κ.ά. (114), (115).

Για την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων αξιοποιήθηκαν οι ακόλουθες μέθοδοι:

2.1 Παλινδρόμηση Passing-Bablok

Η παλινδρόμηση Passing-Bablok είναι ένα μοντέλο παλινδρόμησης για τη σύγκριση μεθόδων που βασίζονται σε ισχυρό, μη παραμετρικό μοντέλο (116). Το μοντέλο δεν είναι ευαίσθητο σε ακραίες τιμές, υποθέτει ότι τα σφάλματα μέτρησης και στις δύο μεθόδους έχουν ίδια κατανομή (όχι απαραίτητα κανονική), σταθερή αναλογία διακύμανσης, αυθαίρετη κατανομή δειγματοληψίας και ανακρίβεια και στις δύο μεθόδους. Τα κριτήρια για την εφαρμογή του μοντέλου είναι:

- ✚ συνεχείς κατανεμημένες μετρήσεις (που καλύπτουν ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων) και
- ✚ γραμμική σχέση μεταξύ δύο μεθόδων (114).

Η παλινδρόμηση Passing-Bablok υπολογίζει την εξίσωση γραμμής παλινδρόμησης από δύο σύνολα δεδομένων. Το αποτέλεσμα της παλινδρόμησης Passing-Bablok αποτελείται από πολλά μέρη και το καθένα κατέχει το ρόλο του στην ερμηνεία των δεδομένων σύγκρισης μεθόδων και στο συμπέρασμα σχετικά με τη συμφωνία μεθόδων.

Το πρώτο αποτέλεσμα αποτελεί το διάγραμμα διασποράς με γραμμή παλινδρόμησης που επιτρέπει την οπτική επιθεώρηση των δεδομένων μέτρησης και την προφανή συμφωνία προσαρμοσμένης γραμμής παλινδρόμησης. Η εξίσωση

παλινδρόμησης ($y = a + bx$) αποκάλυψε σταθερή [τομή της γραμμής παλινδρόμησης με τους άξονες (a)] και αναλογική [κλίση γραμμής παλινδρόμησης (b)] διαφορά με τα διαστήματα εμπιστοσύνης τους 95% (95% CI). Τα διαστήματα εμπιστοσύνης εξηγούν εάν η τιμή τους διαφέρει από την τιμή μηδέν (0) για την τομή και την τιμή ένα (1) για την κλίση. Έτσι, εάν το 95% CI για την τομή (a) περιλαμβάνει την τιμή μηδέν, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της λαμβανόμενης τιμής τομής και της τιμής μηδέν και δεν υπάρχει σταθερή διαφορά μεταξύ δύο μεθόδων. Αντίστοιχα, εάν το 95% CI για την κλίση (b) περιλαμβάνει την τιμή 1, μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της τιμής κλίσης που προκύπτει και της τιμής 1 και δεν υπάρχει αναλογική διαφορά μεταξύ δύο μεθόδων. Σε μια τέτοια περίπτωση μπορούμε να υποθέσουμε ότι $x = y$ και ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ των μεθόδων, επομένως και οι δύο μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά (117).

Η εξίσωση $y = a + bx$ ορίζει τη γραμμή παλινδρόμησης, αλλά δε βρίσκονται όλες οι μετρήσεις σε αυτήν τη γραμμή. Στην πραγματικότητα, οι μετρήσεις δεν ορίζονται από την εξίσωση $y = a + bx$, αλλά μάλλον από $y = a + bx + e$, με το e (το υπόλοιπο) να είναι η διαφορά της παρατηρούμενης τιμής y με την τιμή που προβλέπεται από την εξίσωση παλινδρόμησης για το αντίστοιχη τιμή x . Οι Passing και Bablok προτείνουν ότι τα υπολείμματα πρέπει να υπολογίζονται ως η ορθογώνια απόσταση από την προσαρμοσμένη γραμμή. Αυτό είναι απλώς ένας γραμμικός μετασχηματισμός των υπολειμμάτων, όπως ορίζονται παραπάνω (116). Έτσι, εκτός από τη συνηθισμένη γραφική παράσταση διασποράς, η παλινδρόμηση Passing-Bablok αποτυπώνει επίσης, την υπολειπόμενη γραφική παράσταση. Δείχνει δηλαδή, τα υπολείμματα από την προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης, αποτυπώνει τις ακραίες τιμές (outliers) σε όλο το εύρος μέτρησης και προσδιορίζει οπτικά τη μη γραμμικότητα (117). Εφόσον η διαδικασία προϋποθέτει μια γραμμική σχέση, τα υπολείμματα θα πρέπει να απεικονίζονται σε ένα τυχαίο μοτίβο και θα πρέπει να είναι κοντά σε μια κανονική κατανομή. Επομένως, το 95% των υπολειμμάτων θα πρέπει να βρίσκεται στο διάστημα $\pm 1,96$ φορές της υπολειπόμενης τυπικής απόκλισης (SD). Αυτό το διάστημα ορίζει στη συνέχεια τις τυχαίες διαφορές μεταξύ των δύο εργαστηριακών μεθόδων. Με τομή κοντά στο 0 και την κλίση κοντά στο 1, το διάγραμμα των υπολειμμάτων δείχνει μια αξιοσημείωτη αντιστοιχία με το διάγραμμα μεροληψίας και η ερμηνεία του μπορεί να είναι παρόμοια (118), (119).

Η διαδικασία Passing-Bablok είναι έγκυρη μόνο όταν υπάρχει μια γραμμική σχέση μεταξύ του x και του y . Έτσι, το μοντέλο υπολογίζει τη δοκιμή αθροιστικής γραμμικότητας αθροίσματος (cusum linearity test) που προσδιορίζει εάν τα υπολείμματα κατανέμονται τυχαία πάνω και κάτω από τη γραμμή παλινδρόμησης. Η τιμή P της δοκιμής Cusum μικρότερη από 0,05 ($P < 0.05$) υποδεικνύει σημαντική διαφορά από τη γραμμικότητα και οι δύο συγκρίσιμες αναλυτικές μέθοδοι θα πρέπει να διερευνηθούν περαιτέρω. Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη πιθανώς μεγαλύτερος αριθμός δειγμάτων με καλύτερη συνεχή κατανομή (117).

Όσον αφορά το μέγεθος του δείγματος, όταν το μέγεθος του δείγματος γίνεται μικρότερο, τα CI γίνονται μεγαλύτερα και η πιθανότητα ότι το 0 είναι στο CI της τομής και το 1 στο CI της κλίσης αυξάνεται (120). Το αποτέλεσμα είναι ότι οι μελέτες σύγκρισης μεθόδων που βασίζονται σε μικρά μεγέθη δειγμάτων οδηγούν, πιθανώς εσφαλμένα, στο συμπέρασμα ότι οι εργαστηριακές μέθοδοι συμφωνούν. Επομένως, τα μεγέθη δειγμάτων για παλινδρόμηση Passing-Bablok δεν πρέπει να είναι μικρά. Αναφέρεται ότι ένα επιθυμητό μέγεθος δείγματος είναι τουλάχιστον 50 (121).

2.2 Γραφική παράσταση Bland-Altman

Η γραφική παράσταση Bland-Altman (ή διάγραμμα διαφοράς) είναι μια γραφική μέθοδος για τη σύγκριση δύο μεθόδων μέτρησης για την ίδια μεταβλητή, που χρησιμοποιείται στην αναλυτική χημεία ή τη βιοϊατρική. Όταν οι παράμετροι σύγκρισης είναι συνεχείς μεταβλητές, η ανάλυση Bland-Altman είναι ο κατάλληλος τρόπος για να πραγματοποιηθεί αυτή η σύγκριση και παρουσιάζει ποσοτικά μέτρα για να αποφασίσει εάν η νέα μέθοδος είναι αποδεκτή ή όχι (122).

Σε αυτή τη γραφική μέθοδο οι διαφορές (ή εναλλακτικά οι αναλογίες) μεταξύ των δύο τεχνικών απεικονίζονται σε γραφική παράσταση σε σχέση με τους μέσους όρους των δύο τεχνικών. Το γράφημα που προκύπτει, δηλαδή, είναι ένα διάγραμμα διασποράς XY , στο οποίο ο άξονας Y απεικονίζει τη διαφορά μεταξύ των ζευγαρωμένων μετρήσεων ($A-B$) και ο άξονας X αντιπροσωπεύει το μέσο όρο αυτών των μέτρων $[\frac{(A+B)}{2}]$. Η γραφική παράσταση της διαφοράς έναντι του μέσου όρου μας επιτρέπει επίσης να διερευνήσουμε οποιαδήποτε πιθανή σχέση μεταξύ του σφάλματος μέτρησης και της πραγματικής τιμής. Αλλά επειδή δε γνωρίζουμε την πραγματική τιμή, ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων είναι η καλύτερη εκτίμηση που διαθέτουμε (123).

Είναι επίσης δυνατό να απεικονιστούν οι διαφορές ως ποσοστά ή αναλογίες και μπορεί να χρησιμοποιηθεί η πρώτη μέθοδος ή η δεύτερη αντίστοιχα, αντί του μέσου

όρου και των δύο μεθόδων. Στη μελέτη μας χρησιμοποιήθηκε η απεικόνιση των διαφορών ως ποσοστά. Πιο συγκεκριμένα, οι διαφορές εκφράζονται ως ποσοστά των μετρήσεων που αντιστοιχούν στον άξονα X (δηλαδή αναλογικά με το μέγεθος των μετρήσεων). Αυτή η επιλογή είναι χρήσιμη όταν υπάρχει αύξηση της μεταβλητότητας των διαφορών καθώς αυξάνεται το μέγεθος της μέτρησης (123).

Τα όρια συμφωνίας (LoA) υπολογίζονται για τη σύγκριση των δοκιμών και ορίζονται ως η μέση διαφορά $\pm 1,96$ SD των διαφορών. Εάν αυτά τα όρια δεν υπερβαίνουν τη μέγιστη επιτρεπόμενη διαφορά μεταξύ των μεθόδων (οι διαφορές εντός του μέσου όρου $\pm 1,96$ SD δεν είναι κλινικά σημαντικές), οι δύο μέθοδοι θεωρείται ότι συμφωνούν και μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά (124).

Η μεροληψία μεταξύ των δύο δοκιμών μετράται με τον μέσο όρο των διαφορών που υπολογίζονται με τον συνήθη τρόπο (125), όπως:

$$\bar{d} = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n d_k$$

Οι μεταβλητές συνεχούς μέτρησης δεν είναι απαραίτητο να ακολουθούν κανονική κατανομή, αλλά οι διαφορές τους θα πρέπει. Εάν δεν πληρείται η υπόθεση της κανονικής κατανομής, τα δεδομένα μπορεί να μετασχηματιστούν λογαριθμικά. Τα δεδομένα μπορούν να ελεγχθούν έναντι της κανονικής κατανομής χρησιμοποιώντας κλασικές post-hoc μεθόδους, όπως η δοκιμή Shapiro-Wilk ή η δοκιμή Kolmogorov-Smirnov.

Στη μέθοδο, μια ιδανική συμφωνία είναι η μηδενική διαφορά μεταξύ των μετρήσεων. Επομένως, η μέση διαφορά και τα όριά της μπορούν επίσης να βρεθούν κοντά στο μηδέν σε αυτήν την περίπτωση (122).

Η ανάλυση συσχέτισης μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένα ή αμφιλεγόμενα αποτελέσματα σε σύγκριση δύο μεθόδων μέτρησης. Η ανάλυση Bland-Altman είναι ένας απλός και ακριβής τρόπος για να ποσοτικοποιηθεί η συμφωνία μεταξύ δύο μεταβλητών και μπορεί να βοηθήσει τους ενδιαφερόμενους να συγκρίνουν μια νέα μέθοδο μέτρησης με μια άλλη ή ένα πρότυπο αναφοράς. Πρέπει ωστόσο, να λαμβάνεται υπόψιν πάντα ότι μια υψηλή συσχέτιση δε σημαίνει απαραίτητα ότι υπάρχει καλή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων (122).

Κεφάλαιο 3^ο: Ειδικό Μέρος

3.1 Εισαγωγή

Σκοπός της μελέτης ήταν να αξιολογήσει τις διαφορές στις μετρήσεις βιταμίνης D και PTH μεταξύ της ανοσοχημικής μεθόδου ηλεκτροχημειοφωταύγειας (Electrochemiluminescence immunoassay- ECLIA) και της ανοσοχημικής μεθόδου χημειοφωταύγειας (Chemiluminescence immunoassay- CLIA).

3.1.1 Ηλεκτροχημειοφωταύγεια (ECL)

Η ανοσοχημική μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECLIA) είναι μια ποσοτική μέθοδος για τη μέτρηση του αντιγόνου ή του αντισώματος που βασίζεται στην αλλαγή στο σήμα ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL) πριν και μετά την ανοσοαντίδραση. Η ECL είναι η διαδικασία κατά την οποία τα ιόντα που παράγονται στο ηλεκτρόδιο υφίστανται μια αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας για να σχηματίσουν διεγερμένες καταστάσεις που εκπέμπουν φως (126).

3.1.2 Χημειοφωταύγεια (CLIA)

Η χημειοφωταύγεια (CL) περιγράφει την εκπομπή φωτός που συμβαίνει ως αποτέλεσμα ορισμένων χημικών αντιδράσεων που παράγουν μεγάλες ποσότητες ενέργειας που χάνονται με τη μορφή φωτονίων όταν τα ηλεκτρονικά διεγερμένα μόρια προϊόντος μεταβαίνουν στη σταθερή βασική τους κατάσταση (126). Αυτά τα όργανα διαθέτουν ευαίσθητους φωτοπολλαπλασιαστές για την ανίχνευση του φωτός που εκπέμπεται από μια χημική αντίδραση. Δεν απαιτούνται πηγές φωτός. Αυτοί οι αναγνώστες έχουν συνήθως πολύ μεγαλύτερο δυναμικό εύρος, επιτρέποντας έτσι την αύξηση της ευαισθησίας. Τα σήματα ή οι αποκρίσεις μετρώνται σε μονάδες σχετικού φωτός (RLU) και μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με τη σχεδίαση του οργάνου (127).

Γενικά, δύο κύριες αναλυτικές τεχνικές χημειοφωταύγειας χρησιμοποιούνται στην κλινική ανάλυση: (1) ως ιχνηθέτης στην ανοσοδοκιμασία χημειοφωταύγειας χρησιμοποιείται η λουμινόλη ή εστέρας ακριδινίου, κ.λπ. (2) τεχνικές ανίχνευσης χημειοφωταύγειας χρησιμοποιώντας υπεροξειδάση χρένου (HRP) ή αλκαλική φωσφατάση (ALP) ως ιχνηθέτης για την ενζυμική ανοσοδοκιμασία. Η πρώτη τεχνική ανιχνεύει απευθείας μια ελαφριά λάμψη του αντιδραστηρίου χημειοφωταύγειας για τον προσδιορισμό των αναλυτών. Στη δεύτερη μέθοδο, το υπόστρωμα χημειοφωταύγειας

υφίσταται οξείδωση που καταλύεται από υπεροξειδάση παρουσία ενός κατάλληλου οξειδωτικού και το όριο ανίχνευσης για τον ιχνηθέτη ενζύμου μπορεί να είναι κάτω από το εύρος ατομολίων με ανίχνευση χημειοφωταύγειας (126). Ο αναλυτής που χρησιμοποιήθηκε για τη διεκπεραίωση της μελέτης χρησιμοποιεί τη λουμινόλη.

Συμπερασματικά, η χημειοφωταύγεια είναι η εκπομπή φωτός κατά τη διάρκεια μιας χημικής αντίδρασης, ενώ η ηλεκτροχημειοφωταύγεια είναι ένα είδος φωταύγειας που παράγεται από αντιδράσεις με ηλεκτροδία.

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Κριτήρια ένταξης και συλλογή δειγμάτων

Όλα τα δείγματα που συμπεριλήφθηκαν στη συγκεκριμένη μελέτη προέρχονται από 158 ενήλικες υγιείς ανώνυμους εθελοντές. Αυτό σημαίνει ότι τη χρονική στιγμή που έγινε η αιμοληψία οι εθελοντές δεν έπασχαν από κάποια νόσο, δε λάμβαναν φαρμακευτική αγωγή, ούτε είχαν λάβει στο παρελθόν κάποιου είδους χημειοθεραπεία. Οι δημογραφικές πληροφορίες και τα βασικά χαρακτηριστικά του πληθυσμού της μελέτης δεν είναι γνωστά.

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από περιφερικό αίμα (strong recommendation) κατά τις πρωινές ώρες (weak recommendation) μετά από ολονύκτια νηστεία. Τα δείγματα φυγοκεντρήθηκαν στους 4°C και διατηρήθηκαν σε συνθήκες βαθιάς ψύξης (θερμοκρασία -80°C) μέχρι τη μέτρησή τους στο εργαστήριο (108). Ως επί των πλείστων αναλύθηκαν δείγματα ορού, ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις που δεν υπήρχε απόθεμα ορών, χρησιμοποιήθηκαν εναλλακτικώς δείγματα πλάσματος.

3.2.2 Όργανα και αντιδραστήρια

Το πρώτο στάδιο μετρήσεων των δειγμάτων διενεργήθηκε με τον αναλυτή Cobas e-411 της Roche Diagnostics, όργανο ανοσοδοκιμασίας ηλεκτροχημειοφωταύγειας (ECL), στο ΓΝΑ Αττικής ΚΑΤ.

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της Βιταμίνης D είναι το:

- Elecsys Vitamin D total III (Ref: 09038078190)

Όπου περιέχει το πακέτο αντιδραστηρίων (M, R1, R2) και τα αντιδραστήρια προεπεξεργασίας (PT1, PT2) και επισημαίνονται ως VITDT 3 (Πίνακας 3).

Πίνακας 3: Συστατικά του κιτ προσδιορισμού βιταμίνης D (ECL)

Συστατικά	Περιγραφή	Ποσότητα
PT1 Αντιδραστήριο προεπεξεργασίας 1	Διθειοθρεϊτόλη 1 g/L, pH 5,5	4.0 mL
PT2 Αντιδραστήριο προεπεξεργασίας 2	Υδροξείδιο του νατρίου 57,5 g/L	4.0 mL
M Μικροσωματίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη	Μικροσωματίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη 0,72 mg/mL; συντηρητικό	6.5 mL
R1 Πρωτεΐνη δέσμευσης βιταμίνης D-Ru/(bpy)	Πρωτεΐνη δέσμευσης βιταμίνης D σημασμένη με ρουθίνιο 150 µg/L. bis-tris ρυθμιστικό διάλυμα προπανίου 200 mmol/L; αλβουμίνη (ανθρώπινη) 25 g/L; pH 7,5; συντηρητικό	9.0 mL
R2 25-υδροξυβιταμίνη D~ βιοτίνη	Βιοτινυλιωμένη 25-υδροξυβιταμίνη D 20 µg/L. Ρυθμιστικό διάλυμα δις-τρεις προπανίου 200 mmol/L; pH 8,6; συντηρητικό	8.5 mL

Και για τον προσδιορισμό της PTH το:

- Elecsys PTH (Ref: 11972103122)

Η συσκευασία του αντιδραστηρίου φέρει την ένδειξη PTH και περιέχει (Πίνακας 4):

Πίνακας 4: Συστατικά του κιτ προσδιορισμού PTH (ECL)

Συστατικά	Περιγραφή	Ποσότητα
M Μικροσωματίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη	Μικροσωματίδια επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη 0,72 mg/mL; συντηρητικό	6.5 mL
R1 Anti-PTH-Ab~biotin	Βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα αντι- PTH (ποντικός) 2,3 mg/L. Ρυθμιστικό φωσφορικών 100 mmol/L, pH 7,0; συντηρητικό	7 mL
R2 Anti-PTH-Ab~Ru (bpy)	Μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-PTH (ποντίκι) επισημασμένο με ρουθίνιο σύμπλοκο 2,0 mg/L. Ρυθμιστικό φωσφορικών 100 mmol/L, pH 7,0; συντηρητικό.	7 mL

Πρόσθετα υλικά για τον αναλυτή cobas e 41 που απαιτούνται και για τους δύο προσδιορισμούς:

- ProCell, 6 x 380 mL system buffer (Ref:11662988122)
- CleanCell, 6 x 380 mL measuring cell cleaning solution (Ref: 11662970122)

- Elecsys SysWash, 1 x 500 mL washwater additive (Ref: 11930346122)
- Adapter for SysClean (Ref: 11933159001)
- AssayCup, 60 x 60 reaction cups (Ref: 11706802001)
- AssayTip, 30 x 120 pipette tips (Ref: 11706799001)
- Clean-Liner (Ref: 11800507001)

Το δεύτερο στάδιο των μετρήσεων πραγματοποιήθηκε με τον αναλυτή MAGLUMI® X3, όργανο ανοσοδοκιμασίας χημειοφωταύγειας (CLIA), στο κλινικό εργαστήριο της *Diamedica – Διαγνωστική Ιατρική Α.Ε.*

Τα αντιδραστήριο που χρησιμοποιήθηκε αντιστοίχως για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D είναι το:

- MAGLUMI 25-OH Vitamin D (CLIA) (Ref: 130211004M) και περιέχει τα στοιχεία που αναφέρονται στον Πίνακα 5.

Πίνακας 5: Συστατικά του κιτ προσδιορισμού βιταμίνης D (CLIA)

Συστατικά	Περιγραφή	100 test/kit
Μαγνητικά μικροσφαιρίδια	Μαγνητικά μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-25(OH)D αντίσωμα (~10.0 µg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, NaN ₃ (<0.1%)	2.5 mL
Calibrator Low	Μια χαμηλή συγκέντρωση του 25(OH)D αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, NaN ₃ (<0,1%)	1.0 mL
Calibrator High	Μια υψηλή συγκέντρωση του 25(OH)D αντιγόνου σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, NaN ₃ (<0,1%)	1.0 mL
Ρυθμιστικό διάλυμα	Ρυθμιστικό διάλυμα οξικού	14.5 mL
ABEI label	ABEI επισημασμένα με anti-25(OH)D αντίσωμα (-0.500 µg/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα PBS, NaN ₃ (<0.1%)	17.5 mL
Control 1	Μια χαμηλή συγκέντρωση του 25(OH)D αντιγόνου (20.0 ng/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, NaN ₃ (<0,1%)	1.0 mL
Control 2	Μια υψηλή συγκέντρωση του 25(OH)D αντιγόνου (50.0 ng/mL) σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών, NaN ₃ (<0,1%)	1.0 mL

Και για τον προσδιορισμό της PTH το:

- MAGLUMI Intact PTH (CLIA) (Ref: 130211001M) και περιέχει τα στοιχεία που αναφέρονται στον Πίνακα 6.

Πίνακας 6: Συστατικά του κιτ προσδιορισμού PTH (CLIA)

Συστατικά	Περιγραφή	100 test/kit
Μαγνητικά μικροσφαιρίδια	Μαγνητικά μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με anti-PTH αντίσωμα, περιλαμβανομένου ρυθμιστικού διαλύματος PBS, NaN ₃ (<0.1%)	2.5 mL
Calibrator Low	Περιλαμβάνει BSA και intact PTH αντιγόνο, NaN ₃ (<0,1%)	3.0 mL
Calibrator High	Περιλαμβάνει BSA και intact PTH αντιγόνο, NaN ₃ (<0,1%)	3.0 mL
ABEI label	ABEI επισημασμένα με anti-PTH μονοκλωνικό αντίσωμα σε ρυθμιστικό διάλυμα BSA, NaN ₃ (<0.1%)	12.5 mL
Control	Περιλαμβάνει BSA και intact PTH αντιγόνο, NaN ₃ (<0,1%)	2.0 mL

Πρόσθετα υλικά για τον αναλυτή Maglumi® X3 που απαιτούνται και για τους δύο προσδιορισμούς:

- MAGLUMI Reaction Module (Ref: 630003)
- MAGLUMI Starter 1+2 (Ref: 130299004M, 130299027M)
- MAGLUMI Wash Concentrate (Ref: 130299005M)
- MAGLUMI Light Check (Ref: 130299006M)
- MAGLUMI Reaction Cup (Ref: 13010500101)

3.2.3 Ανάλυση δείγματος

Η ανάλυση των δειγμάτων διεξήχθη σύμφωνα με το πρωτόκολλο του κάθε κατασκευαστή και τα αναλυτικά χαρακτηριστικά για αυτές τις αναλύσεις έχουν αναφερθεί προηγουμένως. Κάθε δείγμα εξετάστηκε για PTH και βιταμίνη D ταυτόχρονα. Οι μετρήσεις μεταξύ των δύο μεθόδων απείχαν χρονικά μία εβδομάδα. Στο μεσοδιάστημα τα δείγματα παρέμειναν αποθηκευμένα σε συνθήκες ψύξης. Τα αποθηκευμένα δείγματα αναμίχθηκαν καλά πριν από τη χρήση με Vortex.

3.2.3.1 Διαδικασία προσδιορισμού βιταμίνης D με ECLIA

Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D, απαιτείται η προεργασία του δείγματος ώστε να αποδεσμευτεί η 25(OH)D από την VDBP. Πραγματοποιείται μέσω της επώασης του δείγματος με dithiothreitol 1g/L και Sodium hydroxide 57.5 g/L. Στη συνέχεια, με την επώαση του προκατεργασμένου δείγματος με την επισημασμένη με ρουθίνιο πρωτεΐνη δέσμευσης βιταμίνης D, σχηματίζεται ένα σύμπλεγμα μεταξύ της

25(OH)D και της ρουθενυλιωμένης VDBP. Ένα συγκεκριμένο, μη επισημασμένο αντίσωμα συνδέεται με την 24,25(OH)₂D που υπάρχει στο δείγμα και αναστέλλει τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα σε αυτόν τον μεταβολίτη της βιταμίνης D. Μετά την προσθήκη (a) των μικροσωματιδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη και (b) της 25(OH)D επισημασμένης με βιοτίνη, οι μη δεσμευμένες ρουθενυλιωμένες επισημασμένες πρωτεΐνες δέσμευσης βιταμίνης D καταλαμβάνονται. Ένα σύμπλεγμα που αποτελείται από τη ρουθενυλιωμένη πρωτεΐνη που δεσμεύει τη βιταμίνη D και τη βιοτινυλιωμένη 25(OH)D σχηματίζεται και συνδέεται με τη στερεά φάση μέσω αλληλεπίδρασης βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναρροφάται μέσα στην κυψέλη μέτρησης, όπου τα μικροσωματίδια δεσμεύονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες αφαιρούνται ύστερα από έκπλυση με ProCell/ProCell M. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί την εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετριέται με φωτοπολλαπλασιαστή.

3.2.3.2 Διαδικασία προσδιορισμού PTH με ECLIA

Κατά την 1^η επώαση το βιοτινυλιωμένο μονοκλωνικό αντίσωμα ειδικό για τη PTH και το μονοκλωνικό ειδικό αντίσωμα PTH, επισημασμένο με σύμπλοκο ρουθηνίου, σχηματίζουν ένα σύμπλεγμα sandwich. Έπειτα, πραγματοποιείται μία 2^η επώαση κατά την οποία μετά την προσθήκη μικροσωματιδίων επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη, το σύμπλοκο δεσμεύεται στη στερεά φάση μέσω αλληλεπίδρασης βιοτίνης και στρεπταβιδίνης. Το μίγμα της αντίδρασης αναρροφάται στο κελί μέτρησης, όπου τα μικροσωματίδια συλλαμβάνονται μαγνητικά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι μη δεσμευμένες ουσίες αφαιρούνται ύστερα από έκπλυση με ProCell/ProCell M. Η εφαρμογή τάσης στο ηλεκτρόδιο προκαλεί στη συνέχεια εκπομπή χημειοφωταύγειας, η οποία μετριέται με φωτοπολλαπλασιαστή.

3.2.3.3 Διαδικασία προσδιορισμού βιταμίνης D με CLIA

Το δείγμα, τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα anti-25(OH)D και το ρυθμιστικό διάλυμα αναμειγνύονται, επωάζονται στους 37 °C και εκτελούν έναν κύκλο πλύσης μετά από καθίζηση σε μαγνητικό πεδίο. Στη συνέχεια, προστίθενται ABEI επισημασμένα με άλλο αντίσωμα anti-25(OH)D, αντιδρώντας σχηματίζοντας σύμπλοκα sandwich και επωάζονται. Μετά την καθίζηση σε ένα μαγνητικό πεδίο, αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και στη συνέχεια εκτελείται ένας άλλος κύκλος πλύσης. Έπειτα, ο εκκινητής 1+2 προστίθεται για να ξεκινήσει μια

αντίδραση χημικής φωταύγειας. Το φωτεινό σήμα μετριέται με έναν φωτοπολλαπλασιαστή ως μονάδες σχετικού φωτός (RLUs), το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της 25(OH)D που υπάρχει στο δείγμα.

3.2.3.4 Διαδικασία προσδιορισμού PTH με CLIA

Το δείγμα, τα ABEI επισημασμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-PTH, τα μαγνητικά μικροσφαιρίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικό αντίσωμα αντι-PTH αναμειγνύονται και επωάζονται στους 37 °C, σχηματίζοντας σύμπλοκα sandwich. Μετά από καθίζηση σε μαγνητικό πεδίο, αποχύνεται το υπερκείμενο υγρό και εκτελείται ένας κύκλος πλύσης. Ακολούθως, ο εκκινητής 1+2 προστίθεται για να ξεκινήσει μια αντίδραση ταχείας χημικής φωταύγειας. Το φωτεινό σήμα μετριέται με έναν φωτοπολλαπλασιαστή ως σχετικές φωτεινές ενώσεις (RLUs), το οποίο είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της PTH που υπάρχει στο δείγμα.

3.2.4 Ανάλυση δεδομένων

Τα δεδομένα από τις μετρήσεις που συλλέχθηκαν σε αυτή τη μελέτη αναλύθηκαν με το λογισμικό πρόγραμμα MedCalc, το οποίο χρησιμοποιείται στη βιοϊατρική έρευνα. Για την σύγκριση των δύο μεθόδων χρησιμοποιήθηκαν η γραφική παράσταση Bland-Altman (Bland-Altman plots), η παλινδρόμηση Passing-Bablok (Passing-Bablok regression) και η μέθοδος των υπολοίπων Passing-Bablok (Passing-Bablok residuals). Η τιμή $P < 0,05$ θεωρήθηκε σημαντική.

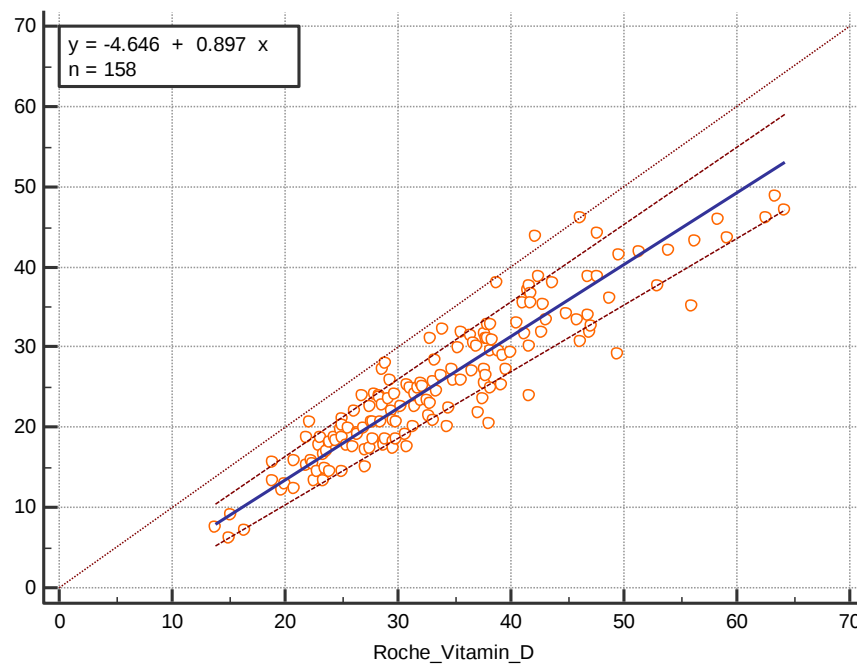
3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Μελέτη 1: Σύγκριση απόδοσης των δύο ανοσοχημικών μεθόδων για τη μέτρηση της βιταμίνης D

Η βιταμίνη D μετρήθηκε σε 158 δείγματα χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους, όπου όλα τα δείγματα είχαν έγκυρες μετρήσεις εντός των ορίων μέτρησης των δοκιμασιών. Οι συγκεντρώσεις δειγμάτων της 25(OH)D κυμαίνονταν από 13.89 έως 64.19 ng/mL στην πρώτη μέθοδο (ECLIA) και από 6.15 έως 48.7 ng/mL στη δεύτερη μέθοδο (CLIA) αντιστοίχως.

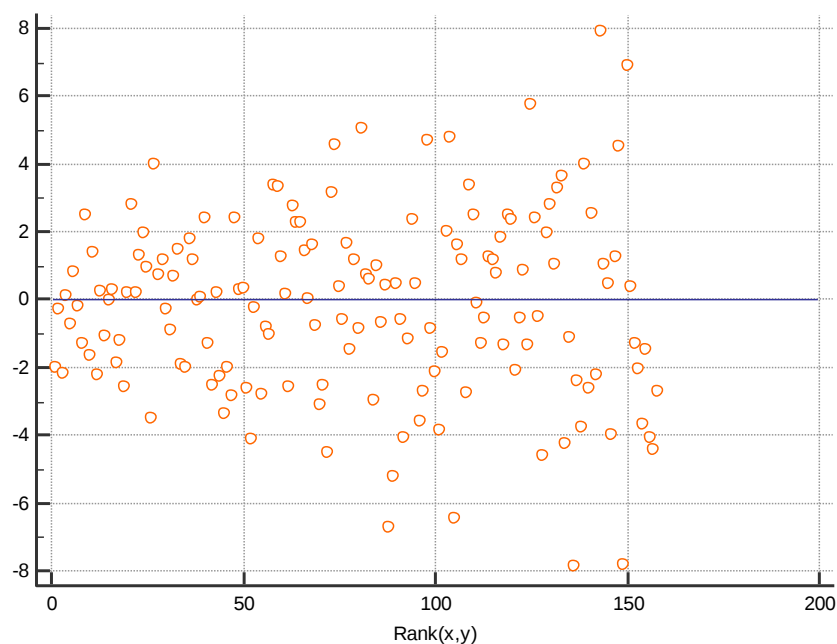
Οι δύο δοκιμασίες έδειξαν μια γραμμική εξάρτηση (στατιστική δοκιμής Cusum: $P=0.91 > 0.05$). Η εξίσωση παλινδρόμησης Passing-Bablok υπολογίστηκε $y = -4.646 + 0.897x$, με κλίση 0.897 (95% CI: 0.834 έως 0.963) και τομή -4.646 (95% CI: -6.401 έως -2.897) (Εικόνα 7). Τα αποτελέσματα της παλινδρόμησης μπορούν να

οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι οι δύο μέθοδοι δεν έχουν συμφωνία, καθώς περιέχεται στις μεταβλητές συστηματικό και αναλογικό σφάλμα.



Εικόνα 7: Γράφημα παλινδρόμησης Passing–Bablok (Μελέτη 1)

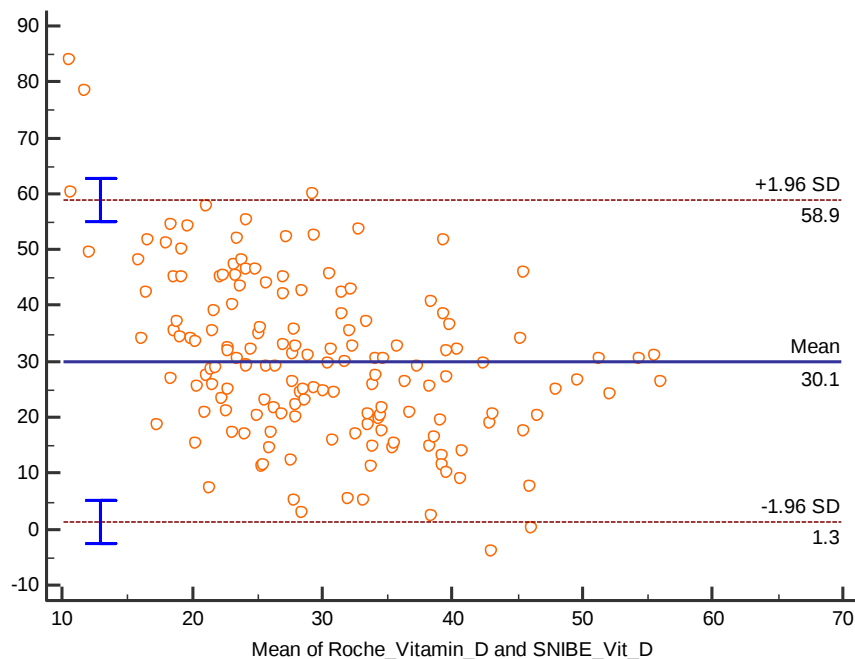
Η απεικόνιση των υπολοίπων κατά Passing-Bablok έδειξε τυχαίες διαφορές με υπολειπόμενη τυπική απόκλιση (RSD) 2.714 και με $\pm 1,96$ διάστημα RSD -5.320 έως 5.320 (Εικόνα 8).



Εικόνα 8: Απεικόνιση των υπολοίπων κατά Passing-Bablok (Μελέτη 1)

*cobas e411 στον άξονα x και Magnumi X3 στον άξονα y

Στη συνέχεια, για να περιγραφθεί καλύτερα η συμφωνία μεταξύ των δύο ποσοτικών μετρήσεων, αξιοποιήθηκε το γράφημα Bland-Altman, όπου οι διαφορές εκφράστηκαν ως ποσοστά των τιμών στον άξονα. Η μεροληψία (μέση διαφορά) είναι 30,1% (95% CI: 27.8 έως 32.4), σχεδόν σταθερή για όλες τις μετρούμενες συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τη γραφική παράσταση των μοναδιαίων τιμών, αυτή η μεροληψία είναι σημαντική, καθώς η γραμμή ισότητας δε βρίσκεται στο 0. Το κατώτερο όριο συμφωνίας είναι 1.3% (95% CI: -2.7 έως 5.2) και το ανώτερο 58,9% (95% CI: 54.3 έως 62.8) (Εικόνα 9). Παρατηρούνται, επίσης, διαφορές εκτός των ορίων συμφωνίας. Επομένως, οι διαφορές αυτές κρίνονται ως κλινικά σημαντικές και οι μέθοδοι δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά. Η μέθοδος Roche φαίνεται στα αποτελέσματα να μετράει με υψηλότερες τιμές τη συγκέντρωση της βιταμίνης D.

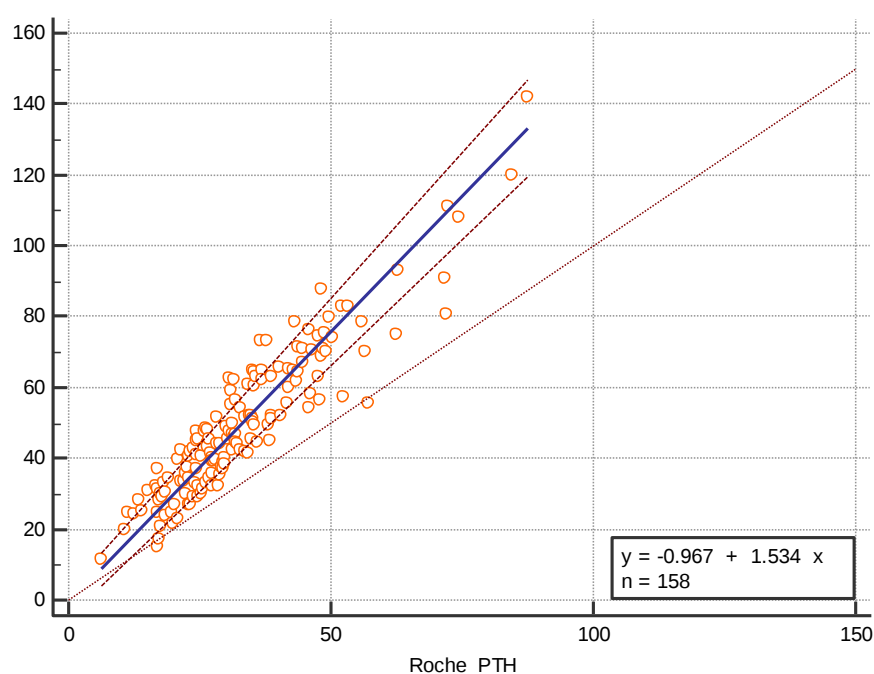


Εικόνα 9: Γράφημα Bland-Altman (Μελέτη 1)

3.3.2 Μελέτη 2: Σύγκριση απόδοσης των δύο ανοσοχημικών μεθόδων για τη μέτρηση της PTH

Η PTH μετρήθηκε σε 158 δείγματα χρησιμοποιώντας και τις δύο μεθόδους, όπου όλα τα δείγματα είχαν έγκυρες μετρήσεις εντός των ορίων μέτρησης των δοκιμασιών. Οι συγκεντρώσεις δειγμάτων της PTH κυμαίνονταν από 6.3 έως 87.49 pg/mL στην πρώτη μέθοδο (ECLIA) και από 11.3 έως 142 pg/mL στη δεύτερη μέθοδο (CLIA) αντιστοίχως.

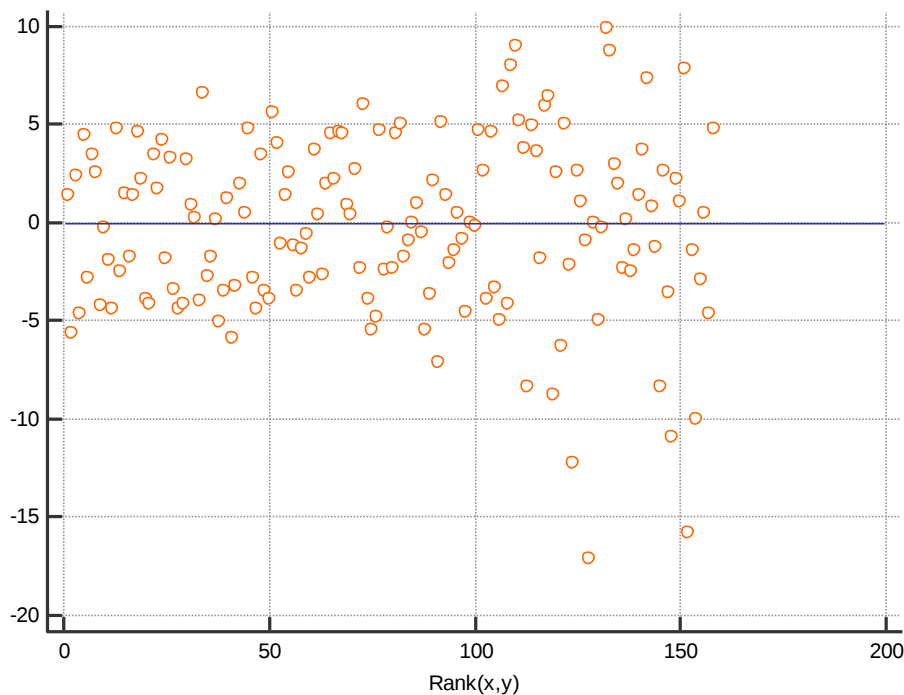
Οι δύο δοκιμασίες έδειξαν μια γραμμική εξάρτηση (στατιστική δοκιμής Cusum: $P = 1.00 > 0.05$). Η εξίσωση παλινδρόμησης Passing–Bablok υπολογίστηκε ως $y = -0.967 + 1.534x$, με κλίση 1.534 (95% CI: 1.420 έως 1.646) και τομή -0.967 (95% CI: -4.965 έως 2.642) (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Γράφημα παλινδρόμησης Passing–Bablok (Μελέτη 2)

Τα αποτελέσματα της παλινδρόμησης μπορούν να οδηγήσουν στο συμπέρασμα ότι οι δύο μέθοδοι δεν έχουν συμφωνία, καθώς περιέχεται στις μεταβλητές αναλογικό σφάλμα.

Η απεικόνιση των υπολοίπων κατά Passing-Bablok έδειξε τυχαίες διαφορές με υπολειπόμενη τυπική απόκλιση (RSD) 4.565 και με $\pm 1,96$ διάστημα RSD από -8.947 έως 8.947 (Εικόνα 11).



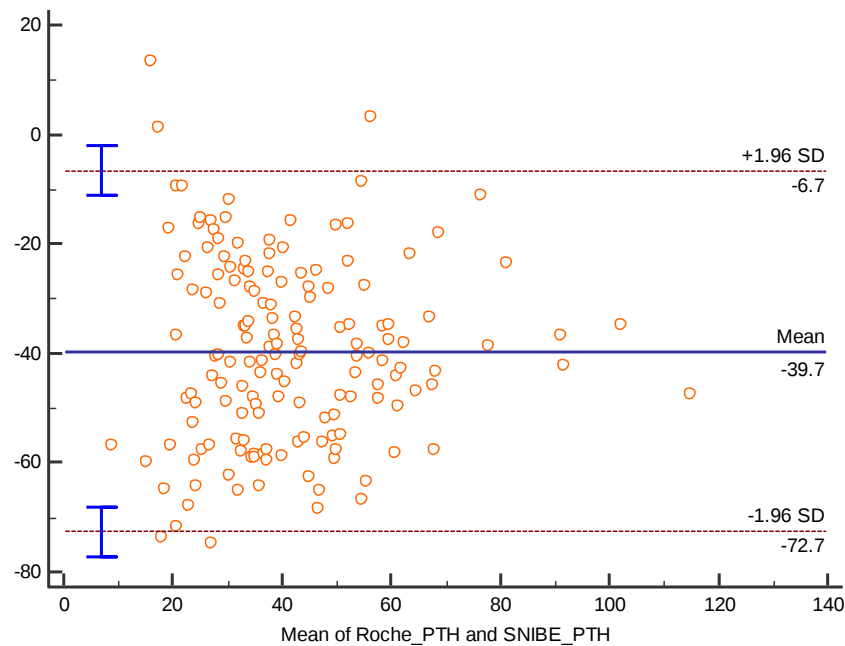
Εικόνα 11: Απεικόνιση των υπολοίπων κατά Passing-Bablok (Μελέτη 2)

*cobas e 411 στον άξονα x' και Magnumi X3 στον άξονα y'

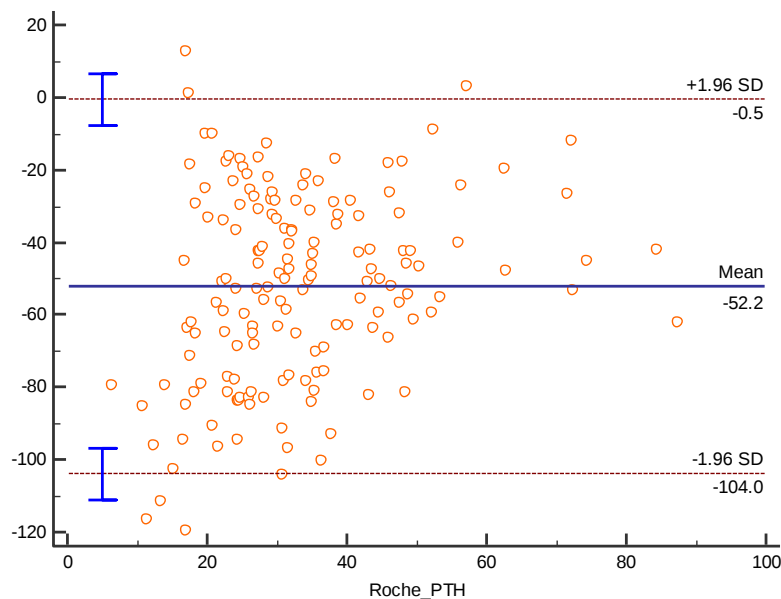
Στη συνέχεια, για να περιγραφεί καλύτερα τη συμφωνία μεταξύ των δύο ποσοτικών μετρήσεων, αξιοποιήθηκε το γράφημα Bland-Altman, όπου οι διαφορές στις μετρήσεις της PTH εκφράστηκαν ως ποσοστά των τιμών στον άξονα. Η μεροληψία (μέση διαφορά) είναι -39,7% (95% CI: -42.3 έως -37.0), σχεδόν σταθερή για όλες τις μετρούμενες συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τη γραφική παράσταση των μοναδιαίων τιμών, αυτή η μεροληψία είναι σημαντική, καθώς η γραμμή ισότητας δεν βρίσκεται στο 0. Το κατώτερο όριο συμφωνίας είναι -72.7 (95% CI: -77.2 έως -68.2) και το ανώτερο -6.7 (95% CI: -11.2 έως -2.16) (Εικόνα 12). Παρατηρούνται, επίσης, διαφορές εκτός των ορίων συμφωνίας. Επομένως, οι διαφορές αυτές κρίνονται ως κλινικά σημαντικές και οι μέθοδοι δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά. Η μέθοδος SNIBE φαίνεται στα αποτελέσματα να μετράει με υψηλότερες τιμές τη συγκέντρωση της PTH.

Ταυτόχρονα, για τις μετρήσεις της PTH κατασκευάστηκε ένα διάγραμμα Bland-Altman, όπου θεωρούμε τη μέθοδο της Roche ως μέθοδο αναφοράς (Εικόνα 13). Στο διάγραμμα αυτό, η μεροληψία (μέση διαφορά) είναι -52.2% (95% CI: -56.4 έως -48.1), σχεδόν σταθερή για όλες τις μετρούμενες συγκεντρώσεις. Όσον αφορά τη γραφική παράσταση των μοναδιαίων τιμών, η μεροληψία αυτή είναι σημαντική, καθώς

η γραμμή ισότητας δεν βρίσκεται στο 0. Το κατώτερο όριο συμφωνίας είναι -104.0% (95% CI: - 111.1 έως -96.9) και το ανώτερο -0.5% (95% CI: -7.6 έως 6.6). Παρατηρούνται, επίσης, διαφορές εκτός των ορίων συμφωνίας. Επομένως, οι διαφορές αυτές κρίνονται ως κλινικά σημαντικές και οι μέθοδοι δε μπορούν να χρησιμοποιηθούν εναλλακτικά. Η μέθοδος SNIBE φαίνεται στα αποτελέσματα να μετράει με υψηλότερες τιμές τη συγκέντρωση της PTH.



Εικόνα 12: Γράφημα Bland-Altman (Μελέτη 2)



Εικόνα 13: Γράφημα Bland-Altman (Μελέτη 2). Η μέθοδος Roche ως μέθοδος αναφοράς

3.4 Συζήτηση

Σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται μια συγκριτική μελέτη δύο εμπορικών μεθόδων μέτρησης των 25(OH)D και PTH, που πραγματοποιήθηκαν σύμφωνα με τις συστάσεις των κατασκευαστών. Τους δύο εμπορικούς αναλυτές αποτελούν ο Cobas e 411 της Roche (μέθοδος ηλεκτροχημειοφωταύγειας) και ο Maglumi X3 της SNIBE (μέθοδος χημειοφωταύγειας). Ο σκοπός αυτής της μελέτης ήταν να παράσχει ένα μοντέλο για την αξιολόγηση και τη σύγκριση διαφόρων στις μετρήσεις των 25(OH)D και PTH.

Για το σκοπό αυτό αναλύθηκαν 158 δείγματα ορού ή πλάσματος από ενήλικους υγιείς εθελοντές. Τα δείγματα διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία -80°C μέχρι την ανάλυσή τους. Το χρονικό διάστημα που μεσολάβησε μεταξύ των δύο αναλύσεων ήταν μία βδομάδα.

Σε αυτή τη μελέτη συμπεριλήφθηκαν δύο στατιστικές αναλύσεις και τα δεδομένα δείχνουν σημαντική μεταβλητότητα μεταξύ αυτών των μεθόδων. Χρησιμοποιήθηκε η ανάλυση παλινδρόμησης Passing-Bablok επειδή υποθέτει σφάλμα και στις δύο μεθόδους X και Y. Για τις δύο προσδιοριζόμενες ουσίες τα διαγράμματα έδειξαν κλίσεις (b) που υποδεικνύουν την παρουσία αναλογικών σφαλμάτων, δηλαδή η διαφωνία μεταξύ της ανάλυσης αυξάνεται με ένα αυξανόμενο επίπεδο ορού της 25(OH)D και της PTH. Στη μέτρηση της βιταμίνης D, η ανάλυση Passing-Bablok υπέδειξε τιμές τομής (a) που υποδηλώνει και συστηματικό σφάλμα. Ωστόσο, υπάρχει γραμμική σχέση μεταξύ των μεθόδων και για τις δύο ουσίες ($P > 0.05$). Επίσης, τα διαγράμματα διαφοράς Bland-Altman έδειξαν μεροληψία που διέφερε σημαντικά μεταξύ των μεθόδων. Πιο συγκεκριμένα, στον προσδιορισμό της 25(OH)D η μέθοδος της Roche μετράει με υψηλότερες τιμές, ενώ αντίστοιχα στον προσδιορισμό της PTH η μέθοδος της SNIBE μετράει με υψηλότερες τιμές.

Επιπλέον, οι ανοσοδοκιμασίες επηρεάζονται από διάφορες άλλες παρεμβολές. Μπορεί να οφείλονται στην παρουσία ουσιών διασταυρούμενης αντίδρασης, αντισωμάτων κατά των προσδιοριζόμενων ουσιών ή αντισωμάτων κατά των αντιδραστηρίων, τα οποία όλα μπορεί να οδηγήσουν σε εσφαλμένα υψηλά ή χαμηλά αποτελέσματα (128). Πιο συγκεκριμένα, τα αποτελέσματα από τη μέθοδο ECL στη μέτρηση της PTH, δύναται να επηρεαστούν από εξωγενείς παράγοντες που σχετίζονται με τη λήψη από τους εθελοντές συμπληρωμάτων διατροφής που περιέχουν βιτίνη.

Όσον αφορά τη βιταμίνη D, οι διαφορές δύνανται να οφείλονται σε ανεπαρκή διαχωρισμό από την πρωτεΐνη δέσμευσης (VDBP).

Βασικός, επίσης, παράγοντας για τη διαφοροποίηση των μετρήσεων αποτελεί η σταθερότητα των προσδιοριζόμενων ουσιών στα δείγματα. Η ανάλυσή τους δεν πραγματοποιήθηκε στο ίδιο εργαστήριο και απαιτήθηκε η μεταφορά των δειγμάτων μέσα σε φορητό ψυγείο με παγοκύστες. Γνωρίζοντας την ευαισθησία, κυρίως του μορίου της PTH, ενδέχεται η διαφοροποίηση που διαπιστώθηκε σε κάποιο βαθμό να οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας κατά τη μεταφορά ή ακόμα σε διαφοροποίηση της θερμοκρασίας δωματίου κατά τη πραγματοποίηση των μετρήσεων. Από τα παραπάνω αποτελέσματα συμπεραίνει κανείς τη σημασία του Εξωτερικού Ελέγχου Ποιότητας Εργαστηρίων, ο οποίος βελτιώνει τη μεταβλητότητα μεταξύ εργαστηρίων και μεθόδων (129).

Στο ερώτημα, λοιπόν, στο ποια μέθοδο ένα εργαστήριο μπορεί να χρησιμοποιήσει συνυπολογίζονται κάποια βασικά πρακτικά ζητήματα. Η αξιολόγηση σε πρακτικά ζητήματα περιελάμβανε την ευκολία χρήσης, την απόδοση και τη ροή εργασίας της μεθόδου. Η προεπεξεργασία δείγματος για τη μέθοδο CLIA είναι ταχύτερη από τη μέθοδο ECLIA, λόγω της χρήσης ενός αντιδραστηρίου και πρωτοκόλλου προεπεξεργασίας δείγματος. Η μέθοδος ECLIA για τη 25(OH)D έχει χρόνο ανάλυσης 28 λεπτά σε σύγκριση με αυτόν της CLIA που ανέρχεται στα περίπου 22 λεπτά και για την PTH οι χρόνοι διαμορφώνονται σε 18 και 14 λεπτά αντιστοίχως. Τόσο η ECLIA όσο και η CLIA έχουν μεγάλη σταθερότητα βαθμονόμησης περίπου ενός μήνα, απαιτώντας έτσι παρόμοια συχνότητα βαθμονόμησης. Μαζί οι ανάγκες του μεμονωμένου κλινικού εργαστηρίου θα υπαγορεύσουν εάν ορισμένες από αυτές τις πρακτικές εκτιμήσεις συμμετέχουν στην επιλογή της μεθόδου μέτρησης.

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι αυτή η μελέτη δεν σχεδιάστηκε για να αντιμετωπίσει το ζήτημα της εναρμόνισης ή τυποποίησης των μετρήσεων της 25(OH)D και της PTH, αλλά για τη διευκόλυνση της ορθής κλινικής αξιολόγησης των αποτελεσμάτων των μετρήσεων.

3.5 Συμπεράσματα

Από τη μελέτη σύγκρισης των δύο μεθόδων διαπιστώνεται ότι μεταξύ τους υπάρχουν εμφανείς διαφορές στις μετρήσεις των δειγμάτων τόσο για τη 25(OH)D όσο για την PTH. Είναι σαφές ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν στατιστικώς, αλλά απαιτείται περισσότερη μελέτη και δοκιμές σύγκρισης προκειμένου να εξαχθούν εμπειριστατωμένα συμπεράσματα.

Βιβλιογραφία

1. **Surdu, AM, et al.** Vitamin D and Its Role in the Lipid Metabolism and the Development of Atherosclerosis. *Biomedicines*. 2021, Vol. 9, 2, p. 172.
2. **Oliveri, B, et al.** Vitamin D3 seems more appropriate than D2 to sustain adequate levels of 25OHD: a pharmacokinetic approach. *European Journal of Clinical Nutrition*. 2015, Vol. 69, pp. 697-702.
3. **Rabelo, HT, Gouvea Barro, WB and Magalhães, JL.** Micronutrients as an Innovation Opportunity for the Pharmaceutical Industry: A Case Study of Vitamin D in Brazil. *Food Science and Nutrition Studies*. 2017, Vol. 1, 1, p. 50.
4. **Bouillon, R, et al.** Vitamin D Metabolism and Action. *Osteoporosis International*. 1998, Vol. 8, pp. 13-19.
5. **Holick, MF, et al.** Photosynthesis of previtamin D3 in human skin and the physiologic consequences. *Science*. 210, 1980, Vol. 4466, pp. 203-205.
6. **Mousavi, SE, et al.** Air pollution, environmental chemicals, and smoking may trigger vitamin D deficiency: Evidence and potential mechanisms. *Environment International*. 2019, Vol. 122, pp. 67-90.
7. **Holick, MF.** Vitamin D deficiency. *N Engl J Med*. 357, 2007, pp. 266-281.
8. **Jones, G, Prosser, DE and Kaufmann, M.** Cytochrome P450-mediated metabolism of vitamin D. *Journal of Lipid Research*. 2014, Vol. 15.
9. **Atef, SH.** Vitamin D assays in clinical laboratory: Past, present and future challenges. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 2018, Vol. 175, pp. 136-137.
10. **Dusso, AS, Brown, AJ and Slatopolsky, E.** Vitamin D. *American Journal of Physiology-Renal Physiology*. 2005, Vol. 289, 1, pp. 8-28.
11. **Jones, G, Strugnell, SA and DeLuca, HF.** Current understanding of the molecular actions of vitamin D. *Physiological Reviews*. 1998, Vol. 78, 4, pp. 1193–1231.
12. **Alshaymaa, AZE, et al.** A Closer Insight into The Role of Vitamin D in Polycystic Ovary Syndrome (Pcos). *Glob J Pharmaceu Sci*. 2018, Vol. 6, 4, p. 555692.

13. **Henry, HL.** Regulation of vitamin D metabolism. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*. 2011, Vol. 25, 4, pp. 531-541.
14. **Norman, AW.** From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 2008, Vol. 88, 2, pp. 491–499.
15. **Pike, JW and Meyer, MB.** The Vitamin D Receptor: New Paradigms for the Regulation of Gene Expression by 1,25-Dihydroxyvitamin D₃. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2010, Vol. 39, 2, pp. 255–269.
16. **Haddad, JG.** Vitamin D--solar rays, the Milky Way, or both? *N Engl J Med*. 1992, Vol. 326, 18, pp. 1213-5.
17. **Norman, AW, et al.** Current concepts of the chemical conformation, metabolism, and interaction of the steroid, vitamin D, with the endocrine system for calcium homeostasis. *Calcified Tissue Research*. 1976, Vol. 21, pp. 153–159.
18. **Herrmann, M, et al.** Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med*. 2017, Vol. 55, 1, pp. 3-26.
19. **Hosseini-Nezhad, A and Holick, MF.** Vitamin D for health: a global perspective. *Mayo Clin Proc*. 88, 2013, Vol. 7, pp. 720-755.
20. **Grossman, Z, et al.** Vitamin D in European children—statement from the European Academy of Paediatrics (EAP). *European Journal of Pediatrics*. 176, 2017, pp. 829–831.
21. **Viljakainen, HT, et al.** Positive dose–response effect of vitamin D supplementation on site-specific bone mineral augmentation in adolescent girls: a double-blinded randomized placebo-controlled 1-year intervention. *J Bone Miner Res*. 2006, Vol. 21, 6, pp. 836-44.
22. **Giustina, A, et al.** Controversies in Vitamin D: Summary Statement From an International Conference. *J Clin Endocrinol Metab*. 2019, Vol. 104, 2, pp. 234-240.
23. **Tsai, KS, et al.** Effect of aging on vitamin D stores and bone density in women. *Calcif Tissue Int*. 1987, Vol. 40, 5, pp. 241-3.
24. **MacLaughlin, J and Holick, MF.** Aging decreases the capacity of human skin to produce vitamin D₃. *J Clin Invest*. 1985, Vol. 76, 4, pp. 1536–1538.

25. **Institute of Medicine (US).** *Dietary Reference Intakes for Calcium and Vitamin D.* [ed.] AC Ross, et al. Washington (DC) : National Academies Press (US), 2011. pp. 362-63.
26. **Demer, LL, Hsu, JJ and Tintut, Y.** Steroid Hormone Vitamin D. *Circulation Research.* 2018, Vol. 122, 11, pp. 1576–1585.
27. **Zerwekh, JE.** Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008, Vol. 87, 4, pp. 1087–1091.
28. **Baecher, S, et al.** Simultaneous quantification of four vitamin D metabolites in human serum using high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry for vitamin D profiling. *Clin Biochem.* 2012, Vol. 45, 16-17, pp. 1491-6.
29. **Makris, K, Sempos, C and Cavalier, E.** The measurement of vitamin D metabolites: part I—metabolism of vitamin D and the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Hormones.* 2020, Vol. 19, pp. 81–96.
30. **Heureux, N.** Vitamin D Testing-where are we and what is on the horizon? *Adv Clin Chem.* 2017, Vol. 78, pp. 59-101.
31. **Hayden, Y, et al.** Pre-analytical stability of 25(OH)-vitamin D in primary collection tubes. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM).* 2015, p. 55.
32. **Lips, P.** Relative value of 25(OH)D and 1,25(OH)₂D measurements. *J Bone Miner Res.* 2007, Vol. 22, 11, pp. 1668–1671.
33. **Su, Z, Narla, SN and Zhu, Y.** 25-Hydroxyvitamin D: analysis and clinical application. *Clin Chim Acta.* 2014, Vol. 433, pp. 200-205.
34. **Jones, G.** Pharmacokinetics of vitamin D toxicity. *Am J Clin Nutr.* 2008, Vol. 88, 2, pp. 582–586.
35. **Holick, MF.** Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol.* 2009, Vol. 19, 2, pp. 73-78.
36. **Bikle, DD.** Vitamin D Assays . *Front Horm Res.* 2018, Vol. 50, pp. 14-30.
37. **Jukic, AMJ, Hoofnagle, AN and Lutsey, PL.** Measurement of Vitamin D for Epidemiologic and Clinical Research: Shining Light on a Complex Decision. *American Journal of Epidemiology.* 2018, Vol. 187, 4, pp. 879–890.

38. **Haddad, JG and Chyu, KJ.** Competitive protein-binding radioassay for 25-hydroxycholecalciferol. *J Clin Endocrinol Metab.* 1971, Vol. 33, 6, pp. 992-995.
39. **Hollis, BW and Napoli, JL.** Improved radioimmunoassay for vitamin D and its use in assessing vitamin D status. *Clin Chem.* 1985, Vol. 31, 11, pp. 1815–1819.
40. **Granado Lorenzo, F, Blanco-Navarro, I and Perez-Sacrsitan, B.** Critical evaluation of assays for vitamin D status. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care.* 16, 2013, pp. 734–740.
41. **Farrell, CJ and Herrmann, M.** Determination of vitamin D and its metabolites. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2013, Vol. 27, pp. 675–688.
42. **Couchman, L and Moniz, CF.** Analytical considerations for the biochemical assessment of vitamin D status. *Ther Adv Musculoskelet Dis.* 2017, Vol. 9, 4, pp. 97–104.
43. **Heijboer, AC, et al.** Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem.* 58, 2012, pp. 543–548.
44. **Farrell, CJ, et al.** State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem.* 2012, Vol. 58, pp. 531–542.
45. **Byrdwell, WC, et al.** Analyzing vitamin D in foods and supplements: methodologic challenges. *Am J Clin Nutr.* 2008, Vol. 88, 2, pp. 554-557.
46. **Jones, G and DeLuca, HF.** High-pressure liquid chromatography: separation of the metabolites of vitamins D2 and D3 on small-particle silica columns. *J Lipid Res.* 1975, Vol. 16, pp. 448-453.
47. **Wootton, AM.** Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *Clin Biochem Rev.* 2005, Vol. 26, pp. 33-36.
48. **Bedner, M and Phinney, KW.** Development and comparison of three liquid chromatography-atmospheric pressure chemical ionization/mass spectrometry methods for determining vitamin D metabolites in human serum. *J Chromatogr A.* 2012, Vol. 1240, pp. 132–139.
49. **Bailey, D, et al.** Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C3-epimer. *Clin Biochem.* 2013, Vol. 46, pp. 190-96.

50. **Van Eeckhaut, A, et al.** Validation of bioanalytical LC-MS/MS assays: evaluation of matrix effects. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2009, Vol. 877, pp. 2198–2207.
51. **Shah, I, et al.** Misleading measures in Vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutr J.* 2011, Vol. 10, p. 46.
52. **Maunsell, Z, Wright, DJ and Rainbow, SJ.** Routine isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for simultaneous measurement of the 25-hydroxy metabolites of vitamins D2 and D3. *Clin Chem.* 2005, Vol. 51, pp. 1683–1690.
53. **Naveh-Many, T, Silver, J and Kronenberg, HM.** *Parathyroid hormone molecular biology.* In: *Principles of Bone Biology.* [ed.] JP Bilezikian, et al. 4. San Diego : Elsevier CA, 2019. p. 575. Vol. 1.
54. **Brown, EM.** Four-parameter model of the sigmoidal relationship between parathyroid hormone release and extracellular calcium concentration in normal and abnormal parathyroid tissue. *J Clin Endocrinol Metab.* 1983, Vol. 56, 3, pp. 572-81.
55. **Diaz, R, El-Hajj Fuleihan, G and Brown, EM.** Regulation of parathyroid function. [ed.] GGS Fray. *Handbook of Physiology.* New York : Oxford University Press, 1999, 7.
56. **Habener, JF, et al.** Biosynthesis of parathyroid hormone. *Recent Prog Horm Res.* 1976, Vol. 33, pp. 249-308.
57. **Cohn, DV and Ting, J.** Biosynthesis, Processing, and Secretion of Parathormone and Secretory Protein-I. [ed.] R O Greep. *Recent Progress in Hormone Research.* s.l. : Academic Press-Proceedings of the 1982 Laurentian Hormone Conference, 1983, Vol. 39, pp. 181-209.
58. **D'Amour, P, et al.** Acute regulation of circulating parathyroid hormone (PTH) molecular forms by calcium: utility of PTH fragments/PTH(1-84) ratios derived from three generations of PTH assays. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006, Vol. 91, 1, pp. 283-289.
59. **Haden, ST, et al.** The effects of age and gender on parathyroid hormone dynamics. *Clin Endocrinol (Oxf).* 2000, Vol. 52, 3, pp. 329-38.

60. **Brown, EM, et al.** Calcium-ion-sensing cell-surface receptors. *N Engl J Med.* 1995, Vol. 333, 4, pp. 234-40.
61. **Naveh-Many, T, et al.** Calcium regulates parathyroid hormone messenger ribonucleic acid (mRNA), but not calcitonin mRNA in vivo in the rat. Dominant role of 1,25-dihydroxyvitamin D. *Endocrinology.* 1989, Vol. 125, 1, pp. 275-80.
62. **Naveh-Many, T, et al.** Parathyroid cell proliferation in normal and chronic renal failure rats. The effects of calcium, phosphate, and vitamin D. *J Clin Invest.* 1995, Vol. 96, 4, pp. 1786-93.
63. **Slatopolsky, E, et al.** Phosphorus restriction prevents parathyroid gland growth. High phosphorus directly stimulates PTH secretion in vitro. *J Clin Invest.* 1995, Vol. 97, 11, pp. 2534-40.
64. **Fine, A, Cox, D and Fontain, B.** Elevation of serum phosphate affects parathyroid hormone levels in only 50% of hemodialysis patients, which is unrelated to changes in serum calcium. *J Am Soc Nephrol.* 1993, Vol. 3, 12, pp. 1947-53.
65. **Adler, AJ, Ferran, N and Berlyne, GM.** Effect of inorganic phosphate on serum ionized calcium concentration in vitro: a reassessment of the "trade-off hypothesis". *Kidney Int.* 1985, Vol. 28, 6, pp. 932-5.
66. **Centeno, PP, et al.** Phosphate acts directly on the calcium-sensing receptor to stimulate parathyroid hormone secretion. *Nat Commun.* 2019, Vol. 10, 1, p. 4693.
67. **Canaff, L και Hendy, G N.** Human calcium-sensing receptor gene. Vitamin D response elements in promoters P1 and P2 confer transcriptional responsiveness to 1,25-dihydroxyvitamin D. *J Biol Chem.* 2002, Τόμ. 277, 33, σ. 30337.
68. **Silver, J and Naveh-Many, T.** FGF23 and the parathyroid glands. *Pediatr Nephrol.* 2010, Vol. 25, 11, pp. 2241-5.
69. **Berndt, T and Kumar, R.** Phosphatonins and the regulation of phosphate homeostasis. *Annu Rev Physiol.* 2007, Vol. 69, pp. 341-59.
70. **Murray, TM, et al.** Parathyroid hormone secretion and action: evidence for discrete receptors for the carboxyl-terminal region and related biological actions of carboxyl- terminal ligands. *Endocr Rev.* 2005, Vol. 26, 1, pp. 78-113.

71. **Jüppner, H, et al.** A G protein-linked receptor for parathyroid hormone and parathyroid hormone-related peptide. *Science*. 1991, Vol. 254, 5034, pp. 1024-6.
72. **Dobolyi, A, Palkovits, M and Usdin, TB.** The TIP39-PTH2 receptor system: unique peptidergic cell groups in the brainstem and their interactions with central regulatory mechanisms. *Prog Neurobiol*. 2010, Vol. 90, 1, pp. 29-59.
73. **D'Amour, P.** Acute and chronic regulation of circulating PTH: significance in health and in disease. *Clin Biochem*. 2012, Vol. 45, 12, pp. 964-9.
74. **Dunlay, R και Hruska, K.** PTH receptor coupling to phospholipase C is an alternate pathway of signal transduction in bone and kidney. *Am J Physiol*. 1990, Τόμ. 258, 2, σσ. 223-31.
75. **Hruska, KA, et al.** Stimulation of inositol trisphosphate and diacylglycerol production in renal tubular cells by parathyroid hormone. *J Clin Invest*. 1987, Vol. 79, 1, pp. 230-9.
76. **Abou-Samra, AB, et al.** Parathyroid hormone causes translocation of protein kinase-C from cytosol to membranes in rat osteosarcoma cells. *Endocrinology*. 1989, Vol. 124, 3, pp. 1107-13.
77. **Murrills, RJ, et al.** In vitro and in vivo activities of C-terminally truncated PTH peptides reveal a disconnect between cAMP signaling and functional activity. *Bone*. 2004, Vol. 35, 6, pp. 1263-72.
78. **Jüppner, H and Potts Jr, JT.** Immunoassays for the detection of parathyroid hormone. *J Bone Miner Res*. 2002, Vol. 17, 2, pp. 81-6.
79. **Talmage, RV and Mobley, HT.** Calcium homeostasis: reassessment of the actions of parathyroid hormone. *Gen Comp Endocrinol*. 2008, Vol. 156, 1, pp. 1-8.
80. **Gardella, TJ and Jüppner, H.** Molecular properties of the PTH/PTHrP receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2001, Vol. 12, p. 210.
81. **Black, DM, et al.** The effects of parathyroid hormone and alendronate alone or in combination in postmenopausal osteoporosis. *N Engl J Med*. 2003, Vol. 349, p. 1207.
82. **Yasuda, H, et al.** Osteoclast differentiation factor is a ligand for osteoprotegerin/osteoclastogenesis-inhibitory factor and is identical to TRANCE/RANKL. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1998, Vol. 95, 7, pp. 3597-602.

83. **Lee, SK and Lorenzo, JA.** Parathyroid hormone stimulates TRANCE and inhibits osteoprotegerin messenger ribonucleic acid expression in murine bone marrow cultures: correlation with osteoclast-like cell formation. *Endocrinology*. 1999, Vol. 140, 8, pp. 3552-61.
84. **Hodsman, AB, et al.** Parathyroid hormone and teriparatide for the treatment of osteoporosis: a review of the evidence and suggested guidelines for its use. *Endocr Rev*. 2005, Vol. 26, p. 688.
85. **Mohan, S, et al.** Comparison of bone formation responses to parathyroid hormone(1-34), (1-31), and (2-34) in mice. *Bone*. 2000, Vol. 27, p. 471.
86. **Friedman, PA and Gesek, FA.** Calcium transport in renal epithelial cells. *Am J Physiol*. 1993, Vol. 264, p. 181.
87. **Van Abel, M, et al.** Coordinated control of renal Ca(2+) transport proteins by parathyroid hormone. *Kidney Int*. 2005, Vol. 68, p. 1708.
88. **Gesek, FA and Friedman, PA.** On the mechanism of parathyroid hormone stimulation of calcium uptake by mouse distal convoluted tubule cells. *J Clin Invest*. 1992, Vol. 90, p. 749.
89. **Hebert, SC.** Extracellular calcium-sensing receptor: implications for calcium and magnesium handling in the kidney. *Kidney Int*. 1996, Vol. 50, p. 2129.
90. **El-Hajj Fuleihan, G, et al.** Calcium-regulated renal calcium handling in healthy men: relationship to sodium handling. *J Clin Endocrinol Metab*. 1998, Vol. 83, p. 2366.
91. **Murer, H, et al.** Renal brush border membrane Na/Pi-cotransport: molecular aspects in PTH-dependent and dietary regulation. *Kidney Int*. 1996, Vol. 49, p. 1769.
92. **Pfister, MF, et al.** Parathyroid hormone-dependent degradation of type II Na⁺/Pi cotransporters. *J Biol Chem*. 1997, Vol. 272, p. 20125.
93. **Broadus, AE, et al.** The importance of circulating 1,25-dihydroxyvitamin D in the pathogenesis of hypercalciuria and renal-stone formation in primary hyperparathyroidism. *N Engl J Med*. 1980, Vol. 302, p. 421.
94. **Neves, KR, et al.** Vascular calcification: contribution of parathyroid hormone in renal failure. *Kidney Int*. 2007, Vol. 71, p. 1262.

95. **Rostand, SG and Drüeke, TB.** Parathyroid hormone, vitamin D, and cardiovascular disease in chronic renal failure. *Kidney Int.* 1999, Vol. 56, p. 383.
96. **Costa-Guda, J and Arnold, A.** Genetic and epigenetic changes in sporadic endocrine tumors: parathyroid tumors. *Mol Cell Endocrinol.* 2014, Vol. 386, p. 46.
97. **Yano, S, et al.** Association of decreased calcium-sensing receptor expression with proliferation of parathyroid cells in secondary hyperparathyroidism. *Kidney Int.* 2000, Vol. 58, p. 1980.
98. **Cañadillas, S, et al.** Calcium-sensing receptor expression and parathyroid hormone secretion in hyperplastic parathyroid glands from humans. *J Am Soc Nephrol.* 2005, Vol. 16, p. 2190.
99. **Al-Ali, H and Fuleihan, GE.** Nutritional osteomalacia: substantial clinical improvement and gain in bone density posttherapy. *J Clin Densitom.* 2000, Vol. 3, p. 97.
100. **Vieira, JGH.** PTH Assays: Understanding What We Have and Forecasting What We Will Have. *Journal of Osteoporosis.* 2012, Vol. 2012.
101. **Smit, MA, et al.** Clinical Guidelines and PTH Measurement: Does Assay Generation Matter? *Endocrine Reviews.* 2019, Vol. 40, 6, pp. 1468–1480.
102. **Aloia, JF, Feuerman, M and Yeh, JK.** Reference range for serum parathyroid hormone, *Endocrine Practice.* 2006, Vol. 12, 2, pp. 137-144.
103. **Rejnmark, L, et al.** Determinants of plasma PTH and their implication for defining a reference interval. *Clinical Endocrinology.* 2011, Vol. 74, 1, pp. 37-43.
104. **Lepage, R, et al.** A non-(1-84) circulating parathyroid hormone (PTH) fragment interferes significantly with intact PTH commercial assay measurements in uremic samples. *Clin Chem.* 1998, Vol. 44, 4, pp. 805-809.
105. **Couchman, L, et al.** LC-MS candidate reference methods for the harmonisation of parathyroid hormone (PTH) measurement: a review of recent developments and future considerations. *Clin Chem Lab Med.* 2014, Vol. 52, 9, pp. 1251–1263.
106. **Einbinder, Y, et al.** Comparison of intact PTH and bio-intact PTH assays among non-dialysis dependent chronic kidney disease patients. *Ann Lab Med.* 2017, Vol. 37, 5, pp. 381–387.

107. **Gao, P, et al.** Development of a novel immunoradiometric assay exclusively for biologically active whole parathyroid hormone 1-84: implications for improvement of accurate assessment of parathyroid function. *J Bone Miner Res.* 2001, Vol. 16, 4, pp. 605-14.
108. **Hanon, EA, Sturgeon, CM and Lamb, EJ.** Sampling and storage conditions influencing the measurement of parathyroid hormone in blood samples: a systematic review. *Clin Chem Lab Med.* 2013, Vol. 51, 10, pp. 1925-1941.
109. **Cavalier, E, et al.** Stability of intact parathyroid hormone in samples from hemodialysis patients. *Kidney Int.* 2007, Vol. 72, 3, pp. 370-372.
110. **Goltzman, D and Hendy, GN.** Parathyroid hormone. [ed.] KL Becker. *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism.* 3rd edition. Philadelphia : Lippincott Williams & Wilkins, 2001, pp. 497-512.
111. **Taniguchi, M, et al.** Comparison between Whole and Intact Parathyroid Hormone Assays. *Therapeutic Apheresis and Dialysis.* 2011, Vol. 15, pp. 42-49.
112. **Waller, S, et al.** Differences between ‘intact’ PTH and 1–84 PTH assays in chronic renal failure and dialysis. *Pediatric Nephrology.* 2004, Vol. 20, 2, pp. 197–199.
113. **Khalil, H, et al.** Stability and validity of intact parathyroid hormone levels in different sample types and storage conditions. *J Clin Lab Anal.* 2021, Vol. 35, 6, p. 23771.
114. **Bablok, W and Passing, H.** Application of statistical procedures in analytical instrument testing. *J Automat Chem.* 1985, Vol. 7, pp. 74-9.
115. **Linnet, K.** Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. *Clin Chem.* 1993, Vol. 39, pp. 424-32.
116. **Passing, H και Bablok, W.** A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from two different analytical methods. Application of linear regression procedures for method comparison studies in Clinical Chemistry, Part I. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1983, Τόμ. 21, σσ. 709-20.
117. **Bilić-Zulle, L.** Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochem Med (Zagreb).* 2011, Vol. 21, 1, pp. 49-52.

118. **Bland, JM and Altman, DG.** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986, Vol. 1, 8476, pp. 307-10.
119. **Krouwer, JS.** Why Bland-Altman plots should use X, not $(Y+X)/2$ when X is a reference method. *Stat Med*. 2008, Vol. 27, 5, pp. 778-80.
120. **Mayer, B, Gaus, W and Braisch, U.** The fallacy of the Passing-Bablok-regression. *Jökull Journal*. 2016, Vol. 66, pp. 95-106.
121. **Ludbrook, J.** Linear regression analysis for comparing two measurers or methods of measurement: but which regression? *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2010, Vol. 37, 7, pp. 692-9.
122. **Doğan, NO.** Bland-Altman analysis: A paradigm to understand correlation and agreement. *Turkish Journal of Emergency Medicine*. 2018, Vol. 18, 4, pp. 139-141.
123. **Giavarina, D.** Understanding Bland Altman analysis. *Biochem Med (Zagreb)*. 2015, Vol. 25, 2, pp. 141-51.
124. **MedCalc Software Ltd.** *Bland-Altman plot*. 2022.
125. **NCSS Statistical Software.** *Bland-Altman Plot and Analysis*.
126. **Wu, J and Ju, HX.** Clinical Immunoassays and Immunosensing. [ed.] J Pawliszyn. *Comprehensive Sampling and Sample Preparation: Analytical Techniques for Scientists*. 2012.
127. **Karen, L, et al.** Immunoassay Methods. [ed.] S Markossian. *Assay Guidance Manual [Internet]*. Bethesda (MD) : Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
128. **Sturgeon, CM and A, Viljoen.** Analytical error and interference in immunoassay: minimizing risk. *Ann Clin Biochem*. 2011, Vol. 48, 5, pp. 418-32.
129. **Badrick, T.** Integrating quality control and external quality assurance. *Clinical Biochemistry*. 2021, Vol. 95, pp. 15-27.

Παράρτημα Α: Πίνακας μετρήσεων 25(OH)D και PTH

ΔΕΙΓΜΑ	ROCHE		SNIBE	
A/A	Vit-D (ng/mL)	PTH (pg/mL)	Vit-D (ng/mL)	PTH (pg/mL)
1	32,81	32,24	31,1	44,2
2	28,79	50,44	17,8	74,1
3	28,65	71,6	27,2	90,6
4	41,19	26,88	31,6	34,3
5	25,01	38,59	18,7	52,2
6	22,38	27,46	15,8	32
7	23,6	52,41	14,9	57,1
8	23,45	34,28	13,4	41,6
9	27,47	74,45	17,3	108
10	24,35	41,7	18,8	55,4
11	27,04	46,41	19,9	70,6
12	26,91	62,55	24	75
13	27,69	72,11	20,6	80,7
14	41,71	40,61	30	52,2
15	29,48	56,46	22	70,3
16	25,44	26,25	17,8	32,9
17	19,98	34,66	13	52,2
18	32,8	35,35	21,4	49,5
19	58,42	19,79	45,8	24,8
20	30,87	28,83	17,5	35,2
21	39,97	48,7	29,4	75,2
22	34,8	31,53	27,2	45,7
23	22,58	22,4	13,4	30
24	33,87	47,96	26,4	56,5
25	24,03	34,72	14,4	45,6
26	28,76	28,58	18,1	32,2
27	25,12	31,78	21,1	46,9
28	29,83	48,28	18,6	68,8
29	43,17	36,06	33,4	44,4
30	23,39	41,89	16,6	59,9
31	34,37	25,33	20,1	40,5
32	31,41	20,73	20,1	22,8
33	37,59	17,06	23,6	14,9
34	27,15	57,23	15	51,8
35	27,76	34,9	18,5	52,2
36	21,91	19,83	18,8	21,8
37	30,66	20,28	19,1	27
38	-	-	-	-
39	25,11	29,48	14,4	37,2
40	36,52	35,48	27	64,3

41	21,89	30,51	15,3	47,7
42	28,48	31,2	20,6	46,9
43	37	45,93	30,1	54,2
44	34,94	48,52	25,9	70,9
45	29,62	42,94	17,4	64,9
46	15,05	53,35	6,15	82,9
47	31,5	33,77	22,6	51,7
48	42,94	25,72	35,3	31,2
49	24,93	43,31	19,7	61,6
50	16,39	46,18	7,15	58,3
51	-	-	-	-
52	41,76	17,41	36,6	17,2
53	41,61	29,45	37,6	39
54	26	31,14	17,5	42,5
55	25,13	31,8	20,3	44,7
56	32,54	29,13	23,4	37,3
57	22,4	22,85	15,4	26,9
58	23,2	44,75	18,8	67,2
59	19,75	38,7	12,1	51,3
60	33,11	32,22	20,9	44,1
61	38,21	24,83	32,8	32,2
62	30,33	38,44	22,6	45
63	20,86	32,85	12,3	42,3
64	20,82	25,15	15,9	30
65	35,35	44,58	29,8	71
66	29,8	47,64	20,7	63
67	27,6	29,91	22,5	40
68	36,42	23,19	31,4	27
69	59,15	43,63	43,5	64,3
70	22,16	22,62	20,6	37,3
71	24,56	24,84	18,4	29,1
72	41,51	17,61	37	20,9
73	38,8	27,32	37,9	35,8
74	38,33	23,76	30,8	29,3
75	18,92	35,76	13,4	63
76	26,11	35,18	22	50,4
77	29,71	30,1	24,2	49,1
78	28,29	35,07	23,8	64,6
79	38,07	27,43	20,5	39,1
80	22,81	30,49	14,4	45,3
81	38	47,61	31	74,6
82	40,54	35,51	32,9	60,4
83	31,82	22,34	24,9	35,5
84	41,13	55,96	35,5	78,4
85	28,85	29,76	28	38,3
86	-	-	-	-

87	33,4	49,57	24,4	79,9
88	46,89	22,11	38,8	33,4
89	37,68	31,37	25,5	49,8
90	29,3	38,1	25,9	49,2
91	18,95	28,8	15,7	43,9
92	27,88	38,66	24,1	63
93	23,72	62,85	16,9	92,9
94	32,88	23,93	22,9	42,6
95	38,21	84,39	29,5	120
96	28,38	30,87	23,9	59,1
97	42,14	41,94	43,8	65,3
98	29,57	22,81	18,1	34,3
99	37,97	24,27	32,8	37,1
100	23,04	10,74	17,8	19,9
101	51,32	72,36	41,9	111
102	32,11	48,32	23,4	87,6
103	13,89	36,46	7,45	73,1
104	43,64	17,56	37,9	30,1
105	42,42	16,55	38,8	32,2
106	44,97	6,3	34,2	11,3
107	24,01	11,31	18,2	24,5
108	53,02	43,7	37,6	71,5
109	37,81	45,95	26,4	76,4
110	37,83	24,24	31	33,1
111	30,78	17,16	25,2	28,1
112	37,17	40,17	21,7	65,5
113	25,59	36,86	19,9	62,3
114	49,55	21,56	41,5	42,4
115	41,83	43,13	35,5	78,6
116	56,3	25,97	43,1	47,5
117	28,58	26,51	22,7	43,3
118	26,87	30,9	24	55,1
119	15,19	26,84	9,15	45,2
120	26,47	15,2	19,2	30,8
121	-	-	-	-
122	33,32	24,65	28,4	45,3
123	36,66	26,6	30,4	44
124	32	24,42	25,4	47,5
125	41,6	18,4	24	23,8
126	28,92	24,39	18,6	44,8
127	31,15	30,78	24,9	62,8
128	46,9	22,97	33,9	40,7
129	39,3	34,18	28,9	61
130	49,5	18,15	29,2	32,9
131	38,85	13,37	29,5	28,3
132	27,19	37,85	17,2	73,1

133	29,59	16,92	20,8	31,3
134	38,17	16,95	24,8	37,2
135	29,21	26,47	23,5	48
136	-	-	-	-
137	62,67	23,08	46,1	41,9
138	42,72	31,85	31,9	56,3
139	63,47	31,6	48,7	62,2
140	53,93	21,38	42	33,5
141	34,58	12,44	22,4	24,4
142	35,65	32,78	25,8	54,2
143	37,65	24,77	31,6	45,3
144	34	52,1	32,3	83
145	39,16	28,24	25,3	51,7
146	48,72	19,13	36,1	34,3
147	47,64	14,03	38,7	25,2
148	37,72	18,41	27,1	30,4
149	33,16	27,53	25,7	39,2
150	47,67	33,75	44,2	42
151	39,61	27,48	27,2	40,1
152	31,45	28,22	24,1	44
153	46,97	27,11	31,8	41,4
154	46,2	36,76	30,6	64,6
155	27,75	20,88	20,7	39,8
156	64,19	17,81	47	28,9
157	32,15	87,49	25	142
158	26,49	24,44	19,1	41,2
159	46,19	16,87	46,1	24,5
160	35,67	28,06	31,9	39,7
161	55,98	49,18	35,1	70
162	45,89	34,99	33,3	51,2
163	47,13	26,1	32,6	48,3

Παράρτημα Β: Πίνακες αποτελεσμάτων από το λογισμικό MedCalc

Bland-Altman plots

Προσδιορισμός βιταμίνης D

Method A	Roche_Vitamin_D Roche_Vitamin_D
Method B	SNIBE_Vit_D SNIBE_Vit_D
Sample size	158
Option	Plot differences as %
Arithmetic mean	30.0723%
95% Confidence interval	27.7627 to 32.3819
P (H ₀ : Mean=0)	<0.0001
Lower limit	1.2638%
95% Confidence interval	-2.6917 to 5.2193
Upper limit	58.8808%
95% Confidence interval	54.9253 to 62.8363

Προσδιορισμός PTH

Method A	Roche_PTH Roche_PTH
Method B	SNIBE_PTH SNIBE_PTH
Sample size	158
Option	Plot differences as %
Arithmetic mean	-39.6872%
95% Confidence interval	-42.3327 to -37.0417
P (H ₀ : Mean=0)	<0.0001
Lower limit	-72.6848%
95% Confidence interval	-77.2155 to -68.1541
Upper limit	-6.6896%
95% Confidence interval	-11.2203 to -2.1589

Passing and Bablok regression

Variable X	Roche_Vitamin_D Roche_Vitamin_D
Variable Y	SNIBE_Vit_D SNIBE_Vit_D

Sample size	158
-------------	-----

	Variable X	Variable Y
Lowest value	13.8900	6.1500
Highest value	64.1900	48.7000
Arithmetic mean	33.9782	25.5962
Median	32.3450	24.1000
Standard deviation	10.0954	8.9356
Standard error of the mean	0.8031	0.7109

Regression Equation

y = -4.646154 + 0.897436 x	
Systematic differences	
Intercept A	-4.6462
95% CI	-6.4007 to -2.8975
Proportional differences	
Slope B	0.8974
95% CI	0.8342 to 0.9630
Random differences	
Residual Standard Deviation (RSD)	2.7144
± 1.96 RSD Interval	-5.3202 to 5.3202
Linear model validity	
Cusum test for linearity	No significant deviation from linearity (P=0.91)

Bias at specific decision levels

Level X	Modelled Y	Difference	Relative difference
10.0000	4.3282 2.9890 to 5.4819 ^a	-5.6718 -7.0110 to -4.5181 ^a	-56.72% -70.11 to -45.18% ^a
20.0000	13.3026 12.3243 to 13.9276 ^a	-6.6974 -7.6757 to -6.0724 ^a	-33.49% -38.38 to -30.36% ^a
30.0000	22.2769 21.4199 to 22.7873 ^a	-7.7231 -8.5801 to -7.2127 ^a	-25.74% -28.60 to -24.04% ^a
50.0000	40.2256 38.6400 to 41.8654 ^a	-9.7744 -11.3600 to -8.1346 ^a	-19.55% -22.72 to -16.27% ^a

^a Bootstrap confidence interval (1000 iterations; random number seed: 978).