



## RESEARCH ARTICLE

### Ölçüm teknikleri arasındaki uyumun belirlenmesinde kullanılan grafiksel yöntemlerin ve regresyon modellerinin bir uygulama ile incelenmesi

Doğukan Özen<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi, Biyoistatistik Anabilim Dalı, Ankara, Türkiye

Geliş:16.07.2018, Kabul: 10.10.2018

\* ozen@ankara.edu.tr

### Evaluation of concordance between measurement techniques using graphical methods and regression models with an application

Eurasian J Vet Sci, 2018, 34, 4, 265-271

DOI: 10.15312/EurasianJVetSci.2018.209

#### Öz

**Amaç:** Bu çalışmada, iki ölçüm tekniği arasındaki ilişkisel ve mutlak uyumun incelenmesinde kullanılan grafiksel (Bland Altman ve Mountain Plot) ve metodolojik (Passing-Bablok ve Deming regresyon analizleri) yöntemlerin bir uygulama veri seti yardımı ile gösterilmesi amaçlanmıştır.

**Gereç ve Yöntem:** Uygulama materyalini alanında uzman bir araştırmacının temin ettiği toplam 84 adet timus dokusu örneği oluşturmaktadır. Bu doku örneklerine ilişkin bloklardan alınan kesitlere TUNEL (Yöntem 1) ve Caspase 3 immunohistokimya teknikleri (Yöntem 2) uygulanmış ve tespit sonrası her iki yöntem ile de apoptozise uğrayan hücrelerin sayısı yapılmıştır. İki ölçüm yönteminin uyumunun incelenmesinde ise Bland Altman ve Mountain Plot grafiksel yöntemleri ile Passing-Bablok ve Deming regresyon analizlerinden yararlanılmıştır.

**Bulgular:** İki ölçüm yöntemi arasında sistematik olarak sabit bir hatanın (yanlılığın) bulunduğu ve TUNEL yönteminin Caspase 3 immunohistokimya yöntemine göre ortalama 4,11 birim daha yüksek sonuç verdiği bulunmuştur. Ancak iki teknik arasında orantısal bir yanlılığın bulunmadığı tespit edilmiştir. İki yöntem arasında pozitif yönlü orta derecede bir uyum olduğu bulunmuştur ( $\rho_c=0,51$  %95GA: 0,41-0,60).

**Öneri:** Metot karşılaştırılmasında kullanılan hatalı yaklaşımlar tartışılarak, bunlara alternatif olabilecek, daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesinde kullanılacak yöntemler bir uygulama ile sunulmuştur.

**Anahtar kelimeler:** Bland Altman, Deming Regresyonu, Mountain Plot, Passing Bablok regresyon analizi

#### Abstract

**Aim:** The aim of this study was to introduce the graphical (Bland Altman and Mountain Plot) and methodological (Passing-Bablok and Deming Regression analysis) methods which are used to evaluate the rational and absolute agreement between two measurement techniques with the help of an application data set.

**Materials and Methods:** A total of 84 thymus tissue specimens provided by a researcher in the field were included in the study. TUNEL (Method 1) and Caspase 3 immunohistochemistry techniques (Method 2) were applied to the sections taken from the blocks of these tissue samples. The apoptotic cells in the tissue samples were counted using both methods. Bland Altman and Mountain Plot graphical methods and Passing-Bablok and Deming regression analyzes were used to examine the concordance of the two measurement methods.

**Results:** Results showed that there was a systematic constant error (bias) between the two measurement methods and the TUNEL method gave an average of 4.11 units higher than the Caspase 3 immunohistochemistry method. However, it was determined that there was no proportional bias between the two techniques. Also, there was a moderate positive correlation between the two methods ( $\rho_c=0.51$ , 95%CI: 0.41-0.60).

**Conclusion:** Erroneous approaches used in method comparison studies were discussed and alternative methods were presented with an application that can be used to obtain unbiased results.

**Keywords:** Bland Altman, Mountain Plot, Deming regression, Passing Bablok regression analysis

## Giriş

Sağlık bilimleri alanında laboratuvar çalışmalarında yöntem ve cihazın doğrulanması oldukça önemli olup her yeni yöntem rutin laboratuvar çalışmasında kullanılmadan önce onaylanmalıdır (Gasljevic 2010). Yöntemlerin doğruluk ve kesinlik noktasında performansını test etmeye yönelik yapılması gereken farklı deneyler arasında ise genellikle analitik bir yöntemle elde edilen sonuçların yeni geliştirilen yöntemle karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Yöntem karşılaştırmalarında her ne kadar ideal olan, altın standart olarak bilinen bir yöntemin yeni yaklaşım ile test edilmesi olsa da rutin laboratuvar uygulamalarında çoğu zaman altın standardın bilinmediği durumlarla da karşılaşabilmektedir. Bu durumda yeni yöntem, rutin uygulamada kullanılan karşılaştırılabilir yönetime göre istatistiksel açıdan değerlendirilebilmektedir.

Ölçümü yapılan iki veri seti arasındaki farkı incelemek için kullanılan Pearson korelasyon analizi, regresyon analizi gibi klasik istatistik yöntemleri iki ölçüm metodu arasındaki uyumu değerlendirmek sıklıkla hatalı olarak kullanılmaktadır (Ludbrook 2010). Yapılan çalışmalar (Bland ve Altman 1995, Ludbrook 2010, Giavarina 2015) bu yöntemlerin uyumu ölçmede kullanılmasının uygun olmadığını göstermiş ve bunlara alternatif yöntemler önerilmiştir. Bland-Altman yöntemi (Bland ve Altman 1986), Passing-Bablok regresyon analizi (Bablok ve Passing 1983, Bablok ve Passing 1984) ve Deming regresyon analizi (Cornbleet ve Gochman 1979), metot karşılaştırma çalışmalarında sıklıkla kullanılan alternatif yöntemlerden olup, karşılaştırılan metotlar arasındaki mutlak uyumun yanında ilişkisel uyumun da incelenmesine olanak sağlayarak analitik yöntemlerin anlaşılmasının ve aralarındaki olası sistematik yanlılığın tahmin edilmesine olanak tanırlar. Bu yöntemlerden Bland-Altman yöntemi metotlar arasındaki mutlak uyumu; Passing-Bablok regresyon yöntemi ise metotlar arasındaki ilişkisel uyumu değerlendirmektedir (Barnhart 2007).

Literatür incelendiğinde, özellikle Türkiye’de yöntem karşılaştırmalarına ilişkin uygulamaya dönük kısıtlı sayıda çalışma vardır. Genç ve ark (2013), Bland-Altman grafiği üzerinde durmuş, Güllü ve ark (2014) ise nomogramlar ile istatistiksel modellerin yaşam olasılıklarını belirlemedeki performanslarını incelemişlerdir. Saraçlı ve ark (2009), yaptıkları çalışmada, medikal metod karşılaştırma çalışmalarında Deming regresyon tekniği üzerinde durmuştur. Bu çalışma, gerek uygulama alanının veteriner hekimliği olması gerekse Bland Altman ve Deming regresyon tekniklerine ilaveten Passing-Bablok regresyon tekniği ve Mountain Plot grafiğine çalışmada yer vermesi bakımından farklılık göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı, klinik araştırmalarda ölçüm teknikleri arasındaki ilişkisel ve mutlak uyumların incelenmesinde, grafiksel (Bland Altman ve Mountain Plot) ve metodolojik (Passing-Bablok ve Deming regresyon analizleri) yöntemlerin tanıtılması ve bu yöntemlerden yararlanarak, apoptozisin belirlenmesinde

sıklıkla kullanılan TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT)-mediated dUTP nick-end labelling) ve Caspase 3 immunohistokimya yöntemlerinin uyumunun incelenmesidir.

## Gereç ve Yöntem

### Uygulama materyali ve verisi

Uygulama materyalini, Ceylan ve Alabay (2017) 'in yapmış olduğu ve Ankara Üniversitesi Veteriner Fakültesi Eğitim Araştırma Çiftliğinden temin edilen toplam on dört adet sağlıklı Yorkshire domuzunun timusundan alınan 84 adet doku örneği oluşturmaktadır. Uygulama verisi olarak ise, bloklardan alınan kesitlere uygulanan TUNEL ve Caspase 3 immunohistokimya teknikleri sonrası tespiti yapılan, apoptozise uğrayan hücrelerin sayım sonuçları kullanılmıştır. Veri setinin kullanımı için yazarlardan gerekli izin alınmıştır.

### İstatistik analizler

İki yöntem arasında ölçüm yanlılığının ve rastgele hatanın değerlendirilmesinde ise Bland Altman ve Mountain Plot grafiklerinden yararlanılmıştır. Bland Altman grafiğinde x eksenini, her iki tekniğin de referans test olarak değerlendirilmemesinden dolayı gerçek değer en iyi tahmin edicisi olan ve aynı doku üzerinde sayımı iki metot ile gerçekleştirilen ölçümlerin ortalama değerleri oluşturmuş  $(X_1 + X_2) / 2$ ; y eksenini ise iki metot ile elde edilen ölçümler arasındaki fark değerleri  $(d = X_1 - X_2)$  oluşturmuştur (Mantha 2000). Uyum sınırı olarak tanımlanan "precision" (tekrarlanabilirlik), ortalama farkı  $(\bar{d}) \pm 1.96$  Standart Sapma (SS) olarak hesaplanmıştır. Burada standart sapma;

$$SS_d = \sqrt{\frac{1}{n} \sum_{k=1}^n (d_k - \bar{d})^2}$$
 formülü yardımı ile hesaplanmıştır.

Güven aralığı sıfırı içerdiğinde doğruluğun var olduğu kabul edildiğinden, doğruluk; iki yöntem arası %95'lik güven aralığının ortalama farkından yararlanılarak, ortalama farkının sıfır olup olmadığının test edilmesiyle incelenmiştir. İki ölçüm arası yanlılık ise;

$$d = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n d_k$$
 formülü yardımı ile hesaplanmıştır.

Çalışmada mountain plot grafiği, iki yöntem arasındaki her bir sıralı fark için bir yüzdelik hesaplanarak hazırlanmıştır. Grafiği elde etmek için, 50'nin üzerindeki her bir persentil için: persentil=100-persentil işlemi gerçekleştirilmiştir. Persentiller (y eksen) daha sonra farklara veya yüzde farklarına (x eksen) karşı çizdirilmiştir (Krouwer ve Monti, 1995).

Çalışmada yer alan iki yöntem arasındaki ilişkisel uyumu ve sistematik yanlılığı incelemek için Passing-Bablok ve Deming regresyon analizlerinden yararlanılmıştır. Deming re-



Tablo 1. Çalışmada kullanılan veri setine ilişkin tanımlayıcı istatistikler

	Yöntem 1 (TUNEL)	Yöntem 2 (Caspase-3 immunohistokimyası)
Aritmetik Ortalama ( $\bar{X}$ )	9,98	5,88
Standart Hata ( $S_{\bar{X}}$ )	0,38	0,33
Standart Sapma ( $SS$ )	3,53	3,02
Medyan	10	5
Minimum	4	1
Maksimum	18	13
Hata Std. Sapması	2,07	1,18
Hata Varyansı	4,28	1,39
Hata Varyasyon katsayısı	0,207	0,201

gresyonunda çalışmada yer alan her iki yöntemin de hatalı ölçümlere sahip olması durumunda gözlem değerlerine en iyi uyacak doğru denklemi verecek fonksiyon minimize edilmesine çalışılmıştır (Deming 1943, Linnet 1993). Minimize edilmek istenilen hata kareler toplamı (HKT);

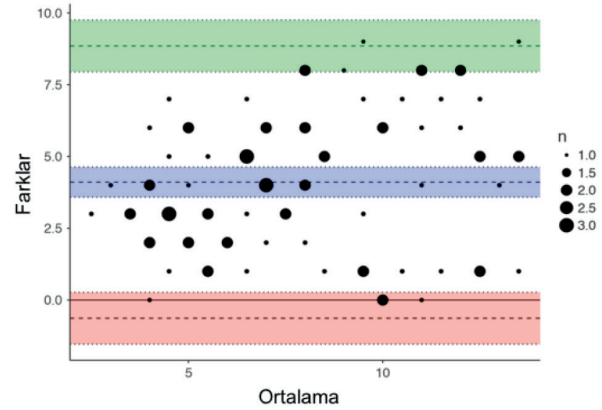
$$HKT = \sum \{ (x_i - X_i)^2 + \lambda (y_i - Y_i)^2 \}$$

şeklinde hesaplanmıştır. Burada  $\lambda$  ;

$$\lambda = \frac{S_{ex}^2}{S_{ey}^2}$$

şeklinde hesaplanmakta olup,  $S_{ex}^2$  ve  $S_{ey}^2$  sırasıyla her iki yönteme ilişkin gözlem değerlerine ait hataların varyansını ifade etmektedir.

Deming tekniğinde tahmin edilmek istenilen regresyon denkleminde ait eğim katsayısı ( $\beta_1$ );



Şekil 1. Bland Altman grafiği (Ortalama ve güven aralıklarının limitleri renkli olarak taranmıştır)

$$\beta_1 = \frac{(\lambda q - u) + \sqrt{(u - \lambda q)^2 + 4\lambda p^2}}{2\lambda p}$$

şeklinde hesaplanmıştır. Bu formülde;

$$u = \sum (x_i - \bar{x})^2$$

$$y = \sum (y_i - \bar{y})^2$$

$$p = \sum (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})$$

olarak elde edilir.

Kesim noktası olan ( $\beta_0$ ) ise;

$$\beta_0 = \bar{y} - \beta_1 \bar{x}$$

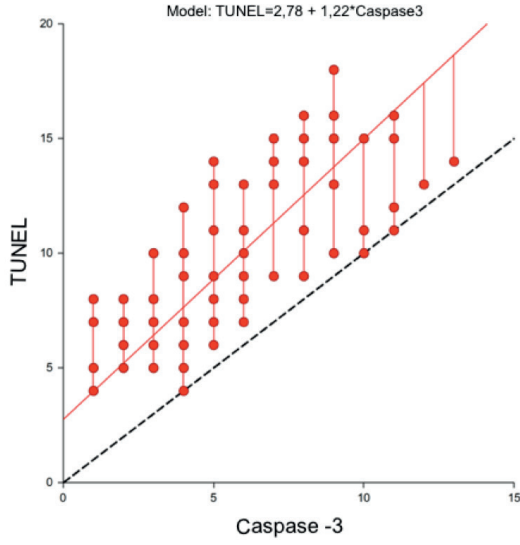
Regresyon katsayılarına ilişkin standart hatalar bilgisayar tabanlı ve n-2 serbestlik derecesi kullanılarak Jackknife (leave-one-out) metoduna göre hesaplanmıştır (Linnet K, 1993). Y(TUNEL) = X(Caspase3) hipotezi iki ayrı hipotez barındırdığından (eğim =1 ve kesim noktası=1), alfa değeri Bonferroni düzeltmesi yapılarak tek bir test için 0,025 olmak üzere iki test için 0.05 alınmıştır.

Tablo 2. TUNEL (Yöntem 1) ve Caspase 3 immunohistokimyası (Yöntem 2) için uyumun limitleri ve bias oranı

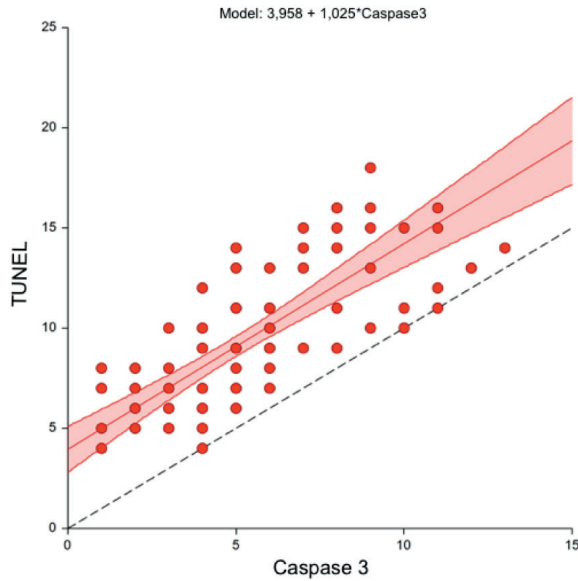
Parametre	n	Değer	Std. Sapma	Std. Hata	Alt sınır	Üst Sınır
Bias (Fark)	84	4,107	2,42	0,264	3,582	4,632
Uyumun alt limiti	84	-0,636	0,45	0,453	-1,537	0,265
Uyumun üst limiti	84	8,85	0,45	8,85	7,949	9,751

Tablo 3. TUNEL (Yöntem 1) ve Caspase 3 immunohistokimya (Yöntem 2) tekniklerine ait ölçüm sonuçlarına ilişkin Passing Bablok regresyon analizi sonuçları

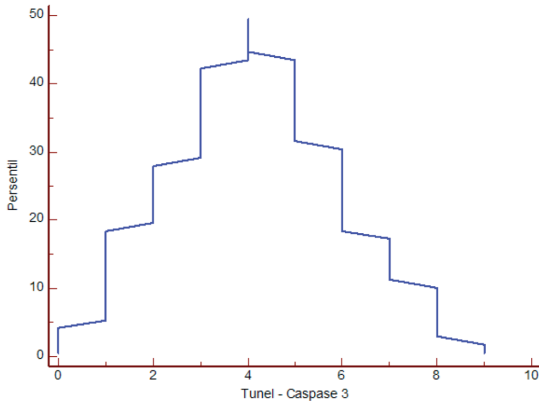
	Katsayı	Alt Limit	Üst Limit	Doğrusallıktan sapma (CUSUM)
a (kesim noktası, $\beta_0$ )	2,778	1,5	4	
b (eğim, $\beta_1$ )	1,222	0,98	1,5	p>0,05



Şekil 2. Passing Bablok regresyon doğrusu grafiği



Şekil 3. Deming Regresyonuna ilişkin grafik



Şekil 4. Mountain Plot grafiği

Passing Bablok regresyon denkleminde, n tane  $(x_i, y_i)$  ölçüm çifti ve  $(X_i, Y_i)$  bu değerlerin beklenen değerleri olduğunda;  $\epsilon$  ve  $\delta$  ise sırasıyla X ve Y metotlarıyla elde edilen ölçüm değerlerinin aynı dağılımdan gelen rastsal hata değerleri olmak üzere denkleme ilişkin eğim katsayısı ve kesim noktasına ilişkin formülasyon aşağıda verilmiştir.

$$b_{ij} = \frac{Y_i - Y_j + \delta_i - \delta_j}{X_i - X_j + \epsilon_i - \epsilon_j}$$

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_i$$

$$d_{ij} = (X_i - X_j)$$

olduğundan;

$$b_{ij} = b \frac{d_{ij} + \frac{(\delta_i - \delta_j)}{b}}{d_{ij} + \frac{(\epsilon_i - \epsilon_j)}{b}} = b \frac{d_{ij} + z_{ij}}{d_{ij} + z'_{ij}}$$

Burada  $Z_{ij}$  ve  $Z'_{ij}$  bağımsız ve aynı dağılımdan gelen hata değerlerini göstermektedir.

Çalışmada, Passing-Bablok tekniğinde tahmin edilmek istenilen regresyon denkleminde ait eğim katsayısı ( $\beta_1$ ); N, örneklem genişliği, K ise  $b_{ij} < -1$  olan  $b_{ij}$  değer sayısı olmak üzere aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanmıştır:

$$\beta_1 = \frac{1}{2} (b_{(\frac{N}{2}+K)} + b_{(\frac{N}{2}+1+K)})$$

Bu yöntem ile elde edilen kesim noktası ( $\beta_0$ ) ise;

$$\beta_0 = med(y_i - \beta_1 x_i)$$

şeklinde hesaplanmıştır.

Çalışmada, Lin'in (1989) uyum korelasyon katsayısı ( $\rho_c$ ) (CKK),

$$\rho_c = \frac{2 \text{cov}(Y_1, Y_2)}{\sigma_1^2 + \sigma_2^2 + (\mu_1 + \mu_2)^2} = \rho C_b$$

formülünden yararlanılmıştır. Bu formülde;  $\sigma_1 = var(Y_1)$ ,  $\sigma_2 = var(Y_2)$ ,  $\mu_1 = E(Y_1)$ ,  $\mu_2 = E(Y_2)$ 'dir.  $C_b$ ; "yan düzeltme faktörü" olarak adlandırılır ve eşitlik doğrusunun regresyon denkleminde elde edilen doğruya uzaklığının ölçüsü olarak tanımlanır.

## Bulgular

İki ölçüm tekniği ile yapılan sayımlara ait tanımlayıcı istatistikler Tablo 1'de sunulmuştur. Tanımlayıcı istatistiklere göre





TUNEL yöntemi ile sayımı yapılan apoptotik hücreler, Caspase 3 immunohistokimya yöntemine göre daha yüksektir. İki yöntem arasındaki mutlak ilişkisel uyum için Bland-Altman analiz sonuçları incelendiğinde, farkların rastgele, homojen bir dağılım gösterdiği ve farklarla ortalamalar arasında açık bir ilişki olmadığı görülmektedir (Şekil 1). TUNEL yönteminin Caspase-3 yöntemine göre apoptozise uğrayan hücre sayısını sistematik olarak ortalama 4,107 birim daha yüksek verdiği görülmektedir. Ortalama hücre sayımının artması ile farklılıklar yönünden trend değişmemektedir. Uyum sınırları -0,6 ile 8,9 olarak hesaplanmış olup, genel olarak verilerin (82/84) kabul edilen uyum sınırları içerisinde kaldığı görülmektedir (Tablo 2, Şekil 1).

Passing Bablok regresyon analizi sonuçları incelendiğinde oluşturulan model,  $Y (TUNEL) = 2,778 + 1,222 * X (Caspase 3)$  olarak bulunmuştur (Tablo 3). Doğrusallık varsayımını araştırmak için yapılan CUSUM testi sonuçlarına göre modelde doğrusallıktan sapma anlamlı bulunmamıştır ( $p > 0,05$ ). Dolayısıyla iki ölçüm arasında doğrusal bir ilişki mevcuttur. Oluşturulan model için  $\beta_0$  (Alt Sınır)  $< 0 < \beta_0$  (Üst Sınır) ve  $\beta_1$  (Alt Sınır)  $< 1 < \beta_1$  (Üst Sınır) şeklinde kurulan  $H_0$  hipotezi  $\beta_0$  için reddedilmiş,  $\beta_1$  için ise kabul edilmiştir. Tablo 3'de modele ait katsayılar ve Şekil 2 incelendiğinde, ölçümler arasında sistematik olarak sabit bir hatanın (yanlılığın) bulunduğu, ancak ölçüm büyüklüğünden bağımsız olarak orantısız bir yanlılığın bulunmadığı görülmektedir. İki yöntem arasındaki farkların dağılımının incelendiği mountain plot grafiğinde dağılımın ortancasının sıfır noktasından uzakta oluşu, yanlılığı göstermekle birlikte, her iki taraftan kuyruğun darlığı yöntemler arası farklılığın az olduğunu göstermektedir (Şekil 4).

İki yöntem arasında uyumun gücünü belirlemek için yapılan Lin's uyum testine (CCK) göre yöntemler arasında pozitif yönlü orta derecede bir uyum olduğu görülmektedir ( $\rho_c = 0,51$  %95GA: 0,41-0,60). Pearson korelasyon katsayısı ( $\rho$ ) (kesinlik) ise 0,738 bulunmuştur ( $p < 0,001$ ). Bu durum iki ölçüm yöntemi arasında pozitif yönlü ve kuvvetli doğrusal bir ilişki olduğunu göstermektedir. Pearson korelasyon katsayısı ve uyum testi sonuçları doğrultusunda, yanlılık düzeltme faktörü ( $C_b$ ) 0,691 olarak hesaplanmıştır. Oluşturulan Deming regresyon modeli ise  $Y (TUNEL) = 3,958 + 1,025 * X (Caspase-3)$  şeklindedir (Tablo 4). Ortalama farkların 0'a eşit olduğuna ilişkin kurulan  $H_0$  hipotezi reddedilmiştir ( $t = 15,55$ ;  $p < 0,001$ ). Ayrıca güven aralıkları, sistematik yanlılığın olduğu ancak orantısız farklılığın bulunmadığını göstermektedir. Bu sonuç aynı zamanda iki yöntemin birbirine denk olmadığına ilişkin Passing Bablok regresyon analizi sonuçları ile paraleldir.

## Tartışma

Bilimsel çalışmalarda elde edilen ölçümler, bazen altın standart tanı yöntemiyle, bazen de altın standart olmayan ancak

güvenilir olduğu kabul edilen daha ucuz veya daha pratik yöntemlerle yapılmaktadır. Ele alınan iki yöntem arasındaki uyumu araştırmada sıklıkla kullanılan yaklaşımlardan biri de en küçük kareler (EKK) yöntemidir. Ancak EKK yöntemi varsayımına göre bağımsız değişkenin herhangi bir ölçüm hatası içermediği ve ortaya çıkan hataların bağımlı değişken olarak seçilen metottan kaynaklandığı varsayılmaktadır. Ayrıca regresyon denklemindeki eğim katsayısı sıfıra karşı sınırlanmaktadır. Ancak uyumu araştırılan her iki metod ile elde edilen ölçümlerin de hata içermesinin mümkün olabileceği düşünüldüğünde EKK yaklaşımının araştırmayı yanlış sonuçlara götürmesi kaçınılmazdır (Cornbleet ve Gochman 1979, Ludbrook 2010). Ayrıca EKK regresyonunun, normallik varsayımı, aykırı değerlerden etkilenme gibi birtakım varsayımlar nedeniyle kısıtlılıkları vardır (Linnet 1998). Bu nedenle bu çalışmada aykırı değerlere karşı hassas olmayan, robust, parametrik olmayan bir regresyon yöntemi olan Passing-Bablok yöntemi tercih edilmiştir. Çalışmada kullanılan bir diğer regresyon yöntemi olan Deming Regresyonu ise, en küçük kareler regresyonunun aksine ölçümü yapılan her iki yöntem için de ölçüm hatalarını dikkate almasından ötürü tercih edilmiştir (Linnet ve Boyd 2012).

Literatürde Deming, Passing Bablok ve EKK regresyonunun performanslarının karşılaştırıldığı kısıtlı sayıda çalışma vardır. Payne (1997), Deming, Passing Bablok ve EKK regresyonunu karşılaştırmak için yaptığı simülasyon çalışmasında analitik doğruluğun arttığı durumlarda Passing Bablok regresyonunun Deming regresyonuna göre daha tutarlı sonuçlar verdiğini ifade etmiştir. Aynı çalışmada EKK regresyonunun ise bu üç regresyon yöntemi içerisinde en kötü performansı ortaya koyduğunu belirtmiştir. Linnet (1993), yapmış olduğu simülasyon çalışmasında varyansların homojen olması durumunda Passing Bablok ve EKK yönteminin Deming regresyonuna göre daha büyük Tip 1 hataya ve yanlılığa neden olduğunu, varyansların heterojen olması durumunda ise tüm regresyon tekniklerinin yansız tahminlerde bulunduğunu ancak ağırlıklandırılmış Deming regresyonunun en etkili sonucu verdiğini ifade etmiştir. Aynı çalışmada aykırı değerlerin olması durumunda ise Passing Bablok regresyon analizinin avantajlı olduğunu belirtmiştir. Hasegawa ve ark (2015) yapmış oldukları simülasyon çalışmasında orantısızlığın tespit edilmesinde Deming ve Passing Bablok regresyonunun EKK yöntemine göre daha başarılı olduğunu, ancak etkinin denek sayısı 10 ve altına düştüğü durumlarda azaldığını belirtmiştir.

Yöntem karşılaştırmalarında sıklıkla kullanılan ancak uygun sonuçlar vermeyen bir diğer istatistiksel yöntem ise Pearson'ın korelasyon analizidir (Altman ve Bland 1983, Giavarina 2015). Korelasyon analizi, iki farklı veri seti arasındaki doğrusal ilişkiyi tanımlayabilir ancak iki yöntem arasındaki sabit veya orantılı bir fark olup olmadığını tespit edemez. Dolayısıyla bu iki veri seti arasındaki uyumu gösteremez. Bu nedenle bu çalışmada korelasyon analizi yerine, sistematik



Tablo 4. Deming Regresyon modeline ilişkin katsayılar (Y=TUNEL)

Parametre	$\beta(i)$	Std. Hata (Jackknife)	%95 GA Alt Limiti	%95 GA Üst Limiti
Kesim noktası	3,958	0,576	2,812	5,104
Eğim ( $X=Caspase 3$ <i>immunohistokimya</i> )	1,025	0,106	0,815	1,234

Hata varyans oranı ( $\lambda$ ) = 0,32496

ve rastgele hataların her ikisini de gösterebilme yeteneği olan Bland Altman grafiksel yöntemi seçilmiştir. Çalışmada ayrıca Lin'in uyum katsayısından yararlanılmıştır. Atkinson ve Nevill (1997) yapmış olduğu çalışmada, metot karşılaştırma ve tekrarlanabilirlik çalışmalarında sistematik yanlılığı ve rastgele hatayı göz önüne alması itibarıyla Pearson moment çarpım korelasyon katsayısına göre üstünlüğünü göstermiştir.

Ölçümü yapılan iki veri seti arasındaki farkın incelenmesi için literatürde kullanılan bağımsız gruplar için t test (student t test) ve eşleştirilmiş t test (paired sample t test) gibi standart istatistiksel yöntemlerde, yöntem karşılaştırma analizleri için uygulanabilir değildirler. Bu tip veriler bağımlı örnekler olarak tanımlanan aynı biyolojik örneklerdeki iki veri kümesinden elde edildiklerinden bağımsızlık varsayımını sağlayamaz, dolayısıyla bağımsız gruplar için t testi kullanılamaz. Eşleştirilmiş t-testi (paired sample t test) ise, ancak iki veri seti arasındaki farkın kabaca tahmini için kullanılabilir. Böyle bir durumda iki örneklem ortalaması karşılaştırılacak ve sonuçlar, iki ölçüm kümesi arasındaki orantılı olmayan ama sabit bir farkı ortaya çıkaracaktır.

Uygulamada gösterilen ve apoptozisin belirlenmesin kullanılan iki ölçüm tekniği arasında sistematik olarak sabit bir hatanın (yanlılığın) bulunduğu, ancak ölçüm büyüklüğünden bağımsız olarak orantısız bir yanlılığın bulunmadığı görülmüştür. Nitekim, apoptozise giden hücrelerin belirlenmesi, değerlendirilmesi ve dağılımının saptanması için sıklıkla kullanılan TUNEL yönteminin apoptotik hücrelerin tespitinde, spesifite ve duyarlılık yönünden düşük olduğu konusunda görüşler bulunmaktadır (Gorczyca ve ark 1993, Huppertz ve ark 1999, Ceylan ve Alabay 2017). Bunun yanı sıra literatürde bu iki tekniğin karşılaştırıldığı bir çalışmada iki tekniğin oldukça yüksek bir korelasyona ve uyuma sahip olduğu belirtilmiştir (Resendes ve ark 2004). Çalışmada uygulanan TUNEL yönteminin anti-caspase-3 antikoruna oranla daha fazla sayıda pozitif reaksiyon göstermesinin literatürlerde bahsedildiği üzere bu yöntemin spesifitesinin ve duyarlılığının düşük olmasına ve iki yöntemin apoptotik hücreleri saptama güçleri arasındaki farklılığa bağlı olduğunu düşündürmektedir.

### Öneriler

Pek çok alanda olduğu gibi araştırmacılar için mevcut yaklaşımları ve alışkanlıkları değiştirmek oldukça zor ola-

bilir. Bununla birlikte, sağlık bilimleri alanında ölçüm kalitesi kadar ölçümlerin uygun istatistiksel yöntemler kullanılarak değerlendirilmesi de oldukça önemlidir. Dolayısıyla yöntem karşılaştırmaları, dikkatlice planlanmış bir çalışmaya dayanmalıdır. İncelenen yöntemin doğruluğunun ve geçerliliğinin belirlenmesinde, uygun şekilde tasarlanmış deney ve seçilecek doğru istatistiksel yöntemler oldukça önemlidir.

Bu çalışma ile, metot karşılaştırılmasında kullanılan hatalı yaklaşımlar ve bunlara alternatif olabilecek ve daha sağlıklı sonuçlar elde edilmesinde kullanılacak yöntemler bir uygulama ile sunulmuştur. Klasik istatistik yöntemleri iki ölçüm metodu arasındaki uyumu değerlendirmenin yeterli olmadığı literatürler doğrultusunda gösterilmiştir. Bu noktada ölçümler arasında herhangi bir sistematik veya orantısız hata bulunmadığı durumlarda Bland Altman ve Mountain plot grafiklerinden yararlanılması tavsiye edilebilir. İncelenen iki yöntem arasında sistematik ve/veya orantısız yanlılığın olması durumunda ise veri setindeki olası aykırı değerler göz önünde bulundurularak Deming regresyon ve/veya Passing Bablok regresyonu ile uyumun incelenmesi daha uygun olacaktır.

### Teşekkür

Uygulama veri setinin temin edilmesinde ve çalışmada yer alan apoptozis konusu ile ilgili bilimsel desteğinden ötürü Dr. Ahmet CEYLAN'a teşekkür ederim.

### Kaynaklar

- Altman DG, Bland JM,1983. Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies. The Statistician, 32, 307-317.
- Atkinson G, Nevill A, 1997. Comment on the use of concordance correlation to assess the agreement between two variables. Biometrics, 53(2), 775-777.
- Bland JM, Altman DG,1986. Statistical method for assessing agreement between two methods of clinical measurement. The Lancet, 307-310.
- Bland JM, Altman DG, 1995. Comparing two methods of clinical measurement: A personal history. International Journal of Epidemiology, 24(1), 7-14.
- Barnhart H, Haber B, Lin L, 2007. An overview on assessing agreement with continuous measurement. J Biopharm Stat., 17, 529-569.



- Ceylan A, Alabay B, 2017. Ultrastructure of apoptotic T lymphocytes and thymicepithelial cells in early postnatal pig thymus. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 41(5), 613-620.
- Cornbleet PJ, Gochman N, 1979. Incorrect least-squares regression coefficients in method-comparison analysis. *Clinical Chemistry*, 25, 432-438.
- Deming WE, 1943. *Statistical adjustment of data*. Wiley, NY, Dover Publications Edition, 1985.
- Gasljevic V, 2010. Method validation and measurement uncertainty. *Biochem Med*, 20, 57-63
- Genç Y, Sertkaya D, Demirtaş S, 2003. Statistical methods for assessing agreement between two measurement technique in clinical research. *Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Mecmuası*, 56(1), 1-6.
- Giavarina D, 2015. Understanding Bland Altman analysis. *Bi-ochemia Medica*, 25, 141-151.
- Gorczyca W, Traganos F, Jesionowska H, Darzynkiewicz Z, 1993. Presence of DNA strand breaks and increased sensitivity of DNA in situ to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. *Exp Cell Res*, 207, 202-205
- Güllü Ö, Tekindal MA, Gökçe İ, Köse SK, Türkölmez K, 2014. Nomogramlar ile istatistiksel modellerin yaşam olasılıklarını belirlemedeki performanslarının metot karşılaştırma yöntemleri ile değerlendirilmesi: mesane kanseri örneği. *Türkiye Klinikleri J Biostat*, 6(1), 42-52
- Hasegawa S, Suzuki N, Sakuramoto K, 2015. Performance of Deming and Passing-Balbok regression analysis in detecting proportionality in the stock recruitment relationship. *Asian Fisheries Science*, 28, 102-116.
- Krouwer JS, Monti KL, 1995. A simple, graphical method to evaluate laboratory assays. *Eur J Clin Chem Clin Biochem*, 33, 525-527
- Linnet K, 1993. Evaluation of regression procedures for methods comparison studies. *Clinical Chemistry*, 39, 424-432
- Linnet K, 1998. Performance of Deming regression analysis in case of misspecified analytical error ratio in method comparison studies. *Clinical Chemistry*, 44, 1024-1031.
- Linnet K, Boyd JC, 2012. Selection and analytical evaluation of methods - with statistical techniques. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds). *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics* (5th edn). Elsevier Saunders, St Louis, MO, pp. 201-228.
- Ludbrook J, 2010. Linear regression analysis for comparing two measures or methods of measurement: but which regression? *Clinical and Experimental Pharmacology & Physiology* 37, 692-699
- Mantha S, Roizen M, Fleisher L, 2000. Comparing methods of clinical measurement: Reporting standards for Bland and Altman analysis. *Anesth Analg*, 90, 593-602.
- Passing H, Bablok W, 1983. 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*, 21, 709-20.
- Passing H, Bablok W, 1984. Comparison of several regression procedures for method comparison studies and determination of sample sizes. Application of linear regression procedures for method comparison studies in *Clinical Chemistry, Part II. Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* 22, 431-445.
- Payne RB, 1997. Method comparison: evaluation of least squares, Deming and Passing/Bablok regression procedures using computer simulation. *Ann Clin Biochem*, 34, 319-320.
- Resendes AR, Majo N, Segales J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M, Domingo M, 2004. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin embedded tissues. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 99, 203-213.
- Saraçlı S, Doğan İ, Doğan N, 2009. Medikal metod karşılaştırma çalışmalarında deming regresyon tekniği. *Türkiye Klinikleri J Biostat*, 1(1), 9-15.