T. C.
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN TEK ANALİZ İLE ÖLÇÜMÜ İÇİN LC/MSMS YÖNTEMİ GELİŞTİRİLMESİ, VALİDASYONU ve ÖRNEK SAKLAMA KOŞULLARININ BELİRLENMESİ

Dr. ALİ YAMAN

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Danışman: Prof. Dr. ÖNDER ŞİRİKÇİ

İSTANBUL-2018

ÖNSÖZ

Tez çalışmam sırasında kıymetli bilgi, birikim ve tecrübeleri ile bana yol gösterici ve destek olan, ilkeli, planlı ve sistematik çalışmayı bana aşılayan, farklı bakış açılarıyla yaptığımız işleri birlikte sorgulamaktan keyif aldığım, değerli danışman hocam Prof. Dr. Önder Şirikçi'ye; ilgisini ve güler yüzünü göstermeyi hiç esirgemeyen, tüm imkanları zorlayarak klinik biyokimya alanında yapılan kurs, sempozyum gibi bilimsel etkinliklere katılmam için beni yüreklendiren ve tez sürecinde karşılaştığımız sorunları kısa zamanda çözüp önümüzü açan; yaşam enerjisine hayranlık duyduğum Prof. Dr. Goncagül Haklar'a sonsuz teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Uzmanlık eğitimime katkılarından dolayı, Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Nesrin Kartal Özer başta olmak üzere; öğretim üyelerimiz Prof. Dr. A. Süha Yalçın, Doç. Dr. Betül Karademir ve Yrd. Doç. Dr. Saime Batırel'e;

Tez çalışmaları süresince verdiği destekten ve ortak ilgi alanlarımızda edindiği bilgileri benimle paylaşmaktan kaçınmadığı için Uzm. Dr. Özgür Baykan'a

Aktardıkları deneyimleriyle eğitimimde yadsınamaz katkıları olan Uzm. Dr. Rana Turkal, Uzm. Dr. Tülay Çevlik, Uzm. Dr. Medeni Arpa ve Uzm. Dr. Tuncay Seyrekel'e; birlikte başladığımız ve yine birlikte bitireceğimiz asistanlık süremizde, her zaman yardımını aldığım Pınar Vatansever'e; tez çalışmalarım süresince fedakârlık yaparak sorumluluklarımı üstlenip çalışmalarıma odaklanmamı sağlayan Erhan Üner'e;

Laboratuvarda verdiği emekle, çalışmaların sürekliliğini sağlamama yardımcı olan Fatma Karakaya ve çalışma arkadaşlarına; başta Güner Ekşi ve Meral Eker olmak üzere asistanlığım boyunca çalışmaktan memnuniyet duyduğum laboratuvarımızın tüm çalışanlarına teşekkürü bir borç bilirim.

Aralık 2017 Dr. Ali Yaman

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ ..... İ
ŞEKİLLER ..... Vİ
TABLOLAR ..... Vİİ
EKLER ..... Vİİİ
1. GİRİŞ VE AMAÇ 11
2. GENEL BİLGİLER 13
2.1 D Vitamini Metabolizması 13
2.2 D Vitamini ve Metabolitlerinin Klinik Önemi 20
2.3 D Vitamini Metabolitlerinin Ölçümünde Kullanılan Yöntemler 24
2.3.1 İmmünokimyasal yöntemler 27
2.3.2 HPLC 28
2.3.3 LC/MSMS 31
3. GEREÇ VE YÖNTEM 36
3.1 Gereç 36
3.2 Yöntem 38
3.2.1 Standartların seyreltilmesi ve kalibratör hazırlığı 38
3.2.2 Internal standart çalışma solüsyonu hazırlığı 39
3.2.3 Türevlendirme 40
3.2.4 Kütle spektrometresi parametreleri 41
3.2.5 HPLC parametreleri 43
3.2.6 Plazma ekstraksiyonu 45
3.2.7 Piklerin değerlendirilmesi 46
3.2.10 Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması 48
3.2.11 Yöntem validasyonu 49
3.2.12 Saklama koşulları 51
4. BULGULAR 53
4.1 Yöntem Geliştirme 53
4.1.1 Kromatogramların değerlendirilmesi 53
4.1.2 İnterferans 56
4.1.3 Matriks etkisinin değerlendirilmesi 58

4.1.4 Carryover 58
4.1.5 Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması 59
4.2 Yöntem Validasyonu ... 62
4.2.1 Ölçüm aralığının alt ve üst limitini belirleme 62
4.2.2 Doğrusallık 63
4.2.3 Kesinlik 66
4.2.4 Doğruluk 67
4.3 Saklama Koşulları ... 69
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR ... 75
6. KAYNAKLAR ... 84

SİMGELER VE KISALTMALAR

%CV	: percent coefficient of variation
%DD	: yüzde değişim değeri
%DDO	: yüzde değişim değerlerinin ortancası
$25(OH)D_3$	: 25-hidroksi kolekalsiferol
$1,25(OH)_2D_3$	: 1α,25-dihidroksi kolekalsiferol
$24R,25(OH)_2D_3$	: (24R)-24,25-dihidroksi kolekalsiferol
$25(OH)D_2$	: 25-hidroksi ergokalsiferol
3-epi-$25(OH)D_3$	: 3-*epi*-25-hidroksi kolekalsiferol
ACL	: acceptable change limit
Amu	: atomic mass unit
CE	: collision energy
CID	: collision-induced dissociation
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute
CRM	: certified reference material
D_2	: ergokalsiferol
D_3	: kolekalsiferol
DAPTAD	: 4-(4′-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione
DBP	: D vitamini bağlayıcı protein (Vitamin D binding protein)
EDTA	: ethylenediaminetetraacetic acid
ESI	: electrospray ionization
GC	: gaz kromatografisi (gas chromatography)
HPLC	: yüksek performanslı sıvı kromatografisi (high-performance liquid chromatography)
IS	: internal standard
LC	: sıvı kromatografisi (liquid chromatography)
LC/MSMS	: sıvı kromatografisi/sıralı kütle spektrometresi (liquid chromatography tandem mass spectrometry)
LLE	: liquid liquid extraction

LOQ	: limit of quantitation
m/z	: mass-to-charge ratio
MBOTAD	: 4-[4-(6-Methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione
MRM	: multiple reaction monitoring
MS	: kütle spektrometresi (mass spectrometry)
NIST	: National Institute of Standards and Technology
NPTAD	: 4-(4-nitrophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione
PFP	: pentafluorophenyl
PTAD	: 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione
PTH	: parathormon
Q1	: quadrupole 1
Q3	: quadrupole 3
RF	: radio frequency
Rs	: çözünürlük (resolution)
RXR	: retinoid X reseptörü
S/N	: sinyal/gürültü oranı (signal-to-noise ratio)
SPE	: solid phase extraction
SRM	: selected reaction monitoring
tr	: kolonda alıkonma zamanı (retention time)
VDRE	: vitamin D response elements

ŞEKİLLER

Şekil 1. 7-dehidrokolesterol ve D_3 (kolekalsiferol) 13
Şekil 2. Ergosterol ve D_2 (ergokalsiferol) 14
Şekil 3. $25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$ 15
Şekil 4. $1,25(OH)_2D_3$ 16
Şekil 5. $24R,25(OH)_2D_3$ 17
Şekil 6. D vitamini metabolizması 198
Şekil 7. $25(OH)D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ 19
Şekil 8. $1,25(OH)_2D_3$'ün DNA'da etkisini göstermesi 22
Şekil 9. HPLC 29
Şekil 10. LC/MSMS 32
Şekil 11. Kromatogram 32
Şekil 12. Türevlendirme sonrası $25(OH)D_3$ 40
Şekil 13. $25(OH)D_3$'ün precursor ve product iyonları 41
Şekil 14. $1,25(OH)_2D_3$'ün precursor ve product iyonları 41
Şekil 15. PFP kolonun partikül yapısı 43
Şekil 16. C18 kolonun partikül yapısı 43
Şekil 17. Mobil faz gradienti 44
Şekil 18. Ekstraksiyon basamakları 45
Şekil 19. $25(OH)D_3$'ün türevlendirilmesi sonrası oluşan R ve S izomerleri 53
Şekil 20. $24R,25(OH)_2D_3$ kromatogramı 54
Şekil 21. $1,25(OH)_2D_3$ kromatogramı 54
Şekil 22. $25(OH)D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ kromatogramları 55
Şekil 23. $25(OH)D_2$ kromatogramı 55
Şekil 24. Plazma içerisinde $24R,25(OH)_2D_3$ 57
Şekil 25. Plazma içerisinde $1,25(OH)_2D_3$ 57
Şekil 26. Kalibrasyon eğrileri ve denklemleri 59
Şekil 27. Ölçüm yöntemlerinin doğrusallık grafikleri 63
Şekil 28. Birinci grup örnek sonuçları 70
Şekil 29. İkinci grup örnek sonuçları 71
Şekil 30. Üçüncü grup örnek sonuçları 72
Şekil 31. Dördüncü grup örnek sonuçları 73

TABLOLAR

Tablo 1. Kalibratör konsantrasyonları....38
Tablo 2. Internal standart çalışma solüsyonu....39
Tablo 3. Kütle spektrometresi parametreleri....42
Tablo 4. Interface parametreleri....42
Tablo 5. Moleküllerin kolonda alıkonma zamanları (rt)....44
Tablo 6. Ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri....62
Tablo 7. Kesinlik çalışması için belirlenen konsantrasyonlar....66
Tablo 8. Kesinlik çalışmasında hesaplanan %CV değerleri....66
Tablo 9. CRM örneklerinden elde edilen %bias değerleri....67
Tablo 10. Geri kazanım....68
Tablo 11. Saklama koşulları....74

EKLER

Ek-1, Etik kurul onamı
Ek-2, Özgeçmiş

ÖZET

D vitamini eksikliği, prevelansının yüksek olması nedeniyle günümüzde önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. 25(OH)D ve diğer D vitamini metabolitlerinin plazma konsantrasyonları, D vitamini depolarının yeterliliği ve fonksiyonel ilişkilerini belirlemek için belirteç olarak kullanılır. Çalışmamızda, D vitamininin önemli metabolitlerinden olan $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$'ü aynı anda ölçecek bir yöntem geliştirmeyi ve alınan örneklerde bu metabolitlerin farklı saklama koşullarından ne kadar etkilendiklerini belirlemeyi amaçladık.

D vitamini metabolitlerinin plazma örneklerinde miktar tayinini yapabilmek için standart ve internal standart çözeltilerini kullanarak bir yüksek performanslı sıvı kromatografisi-sıralı kütle spektrometresi (HPLC-MS/MS) yöntemi geliştirdik. CLSI C62-A kılavuzuna uygun şekilde metot validasyonunu tamamladıktan sonra gönüllülerden elde edilen plazma örneklerinin saklandığı sıcaklık (+25°C, +4°C, -20°C) ve saklanma süresinin (1-10 gün) D vitamini metabolitleri stabilitelerine etkilerini inceledik.

Geliştirdiğimiz yöntem; D vitamini metabolitlerinin klinik karar verdirici düzeylerini belirleyerek oluşturduğumuz ölçüm aralıklarında, kesinlik ve doğrusallık kriterlerini karşıladı. Kesinlik çalışmaları için metabolitlerin farklı konsantrasyonlarında yapılan analizlerde, tüm %CV sınıflamalarında %9,3'ü geçmeyen sonuçlar elde edildi. Doğruluk analizinde, NIST tarafından sertifikalandırılmış referans materyal örnekleri (SRM972a) ölçüldüğünde $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ analizlerinde elde edilen en yüksek %bias değerleri sırasıyla (+%1,3), (-%3,8), (-%8,0) ve (-%8,0) olarak hesaplandı. D vitamini metabolitlerinin test ettiğimiz farklı saklama koşullarına dayanıklı olduğu görüldü.

LC/MSMS cihazı ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek metotlar geliştirilip D vitamini metabolitlerinin çeşitli klinik durumlardaki değişimleri izlenebilir.

Anahtar sözcükler: D vitamini, kütle spektrometresi, saklama koşulları, LC/MSMS, validasyon

ABSTRACT

Vitamin D deficiency has become an important public health problem due to it's high prevalence. Plasma concentrations of 25(OH)D and other vitamin D metabolites are used as biomarkers to detect vitamin D deficiency or to investigate vitamin D metabolism. In our study, we developed a method that can simultaneously measure the frequently investigated vitamin D metabolites ($25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ and 3-epi-$25(OH)D_3$) and determined how different storage conditions affect these metabolites' stability in samples.

We developed a high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry (HPLC-MS/MS) based method by using vitamin D metabolites' standard and internal standard solutions to quantitate the vitamin D metabolites in plasma samples. After validating the method according to CLSI C62-A guideline, we examined the stability of vitamin D metabolites in samples obtained from volunteers at different storage temperatures (+25°C, +4°C, -20°C) and durations (1-10 days).

The method developed met the linearity and imprecision criteria within the measuring ranges chosen in accordance with the clinical decision-making levels of vitamin D metabolites. In imprecision studies; coefficient of variations of metabolites at different concentrations did not exceed 9.3% at all CV% classifications evaluated. The highest bias% results obtained from the measurement of the certified reference materials by NIST (SRM972a) for $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ and 3-epi-$25(OH)D_3$ were (+1,3%), (-3,8%), (-8%) and (-8%), respectively. Vitamin D metabolites were found to be stable in the different storage conditions tested.

LC/MSMS based methods have high sensitivity and specificity and can be used to monitor changes on vitamin D metabolites' concentrations in various clinical situations. Precise and accurate results can be obtained with carefully and accurately validated methods.

Key words: vitamin D, mass spectrometry, storage conditions, LC/MSMS, validation

1. GİRİŞ ve AMAÇ

D vitamini kemik, bağırsak, böbrekler ve paratiroid bezleri üzerindeki etkileriyle, kalsiyum-fosfat metabolizmasının düzenlenmesinde ve kemiklerin mineralizasyonunda önemli rol oynar. D vitamini yetersizliği, prevelansının yüksek olması nedeniyle günümüzde önemli bir halk sağlığı problemi haline gelmiştir. Son yıllarda D vitamini eksikliğinin yalnızca kemik hastalıklarıyla ilişkili değil; otoimmun, metabolik, enfeksiyöz ve kardiyovasküler hastalıklarla da ilişkisinin olabileceğini gösteren çalışmalar yapılmaktadır [1]. D vitamini metabolizmasının açıklığa kavuşturulması, D vitaminin farklı klinik durumlarla ilişkilerinin belirlenmesi için önemli hale gelmiştir.

D vitamini (kolekalsiferol, D_3), insanda ve hayvanlarda güneş ışığının etkisiyle deride bulunan 7-dehidrokolesterolden sentezlenir. Bitkilerde ve mantarlarda ise ergosterolden sentezlenen D vitamini (ergokalsiferol, D_2) bulunur. Besinlerle vücuda alınan ergokalsiferol, kolekalsiferol ile aynı enzimlerle metabolize olup, aynı derecede etki gösterir [2]. D vitamininin dolaşımda en fazla bulunan metaboliti olan 25(OH)D [$25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$], karaciğerde; D vitamininin aktif metaboliti olan $1,25(OH)_2D$ [$1,25(OH)_2D_3$ ve $1,25(OH)_2D_2$] ise böbreklerde sentezlenir. Bu iki metabolitin yanı sıra vücutta 50'nin üzerinde farklı D vitamini metaboliti oluşmaktadır.

D vitamini metabolitlerinden klinik önemi kanıtlanmış olan $25(OH)D_3$, $25(OH)D_2$ ve $1,25(OH)_2D_3$ ölçümü için piyasada farklı yöntemler ve cihazlar bulunmaktadır. D vitaminin diğer metabolitlerinin ölçümü için ise dünyada araştırma laboratuvarlarında geliştirilen yöntemler olsa, da bu metabolitlerin klinik öneminin henüz tam olarak açıklığa kavuşturulmamış olması nedeniyle ticari ürüne dönüştürülmüş bir yöntem bulunmamaktadır.

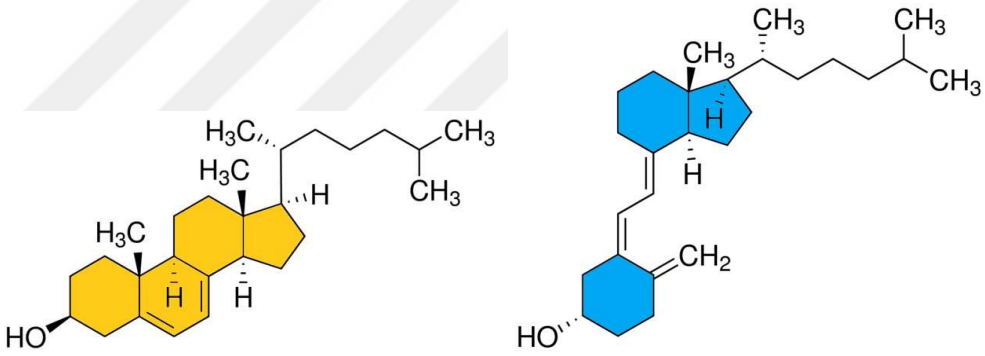
Ülkemizde D vitamini metabolizmasının incelenmesi tüm dünyada olduğu gibi oldukça fazla klinik araştırmaya konu olmaktadır. Ancak D vitamini metabolitlerinden ticari ürüne dönüştürülmüş olanları dışındaki metabolitlerin ölçümünün yapılamaması,

çalışmaların daha ileri düzeye ilerletilmesini olanaksızlaştırmaktadır. Ülkemizde ve üniversitemizde duyulan bu gereksinim göz önünde bulundurularak D vitamini metabolizması için güncel olarak araştırılan $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ metabolitlerinin ölçümünü gerçekleştirmeyi hedefledik. İlerleyen yıllarda daha farklı D vitamini metabolitlerinin ölçümünün de üzerine eklenebileceği bir yöntem altyapısı oluşturmayı amaçladık. Ayrıca bu metabolitlerin analizi için alınan örneklerde değişik koşullarda çalışılması ve saklanmasının örneklerdeki metabolitlerin üzerinde yaratacağı etkileri de değerlendirmeyi hedefledik.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 D Vitamini Metabolizması

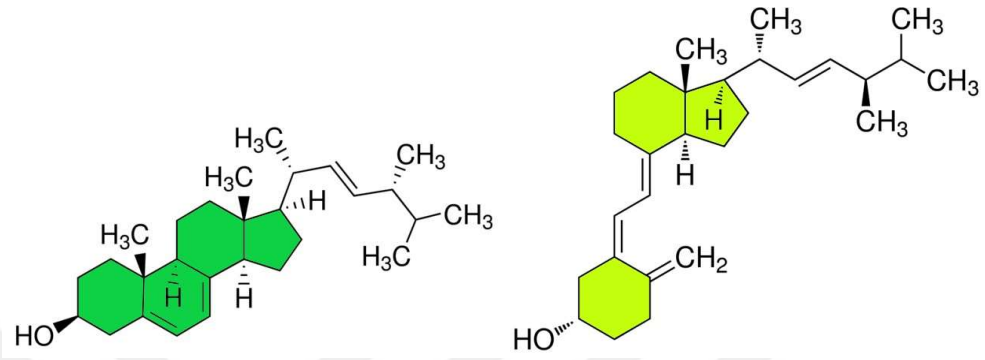
Kolesterol sentezinde bir ara molekül olan 7-dehidrokolesterolün (provitamin D_3) (Şekil 1-a), deri hücrelerinin plazma membranında güneş ışığının etkisiyle fotolizisi ile previtamin D_3 oluşur [3], [4]. Termodinamik olarak stabil olmayan bu molekül, çift bağlarının yeniden düzenlenmesiyle D_3'e (kolekalsiferol) dönüşür (Şekil 1-b) [5]. Ekstraselüler sıvıya geçen D_3, D vitamini bağlayıcı protein (Vitamin D binding protein-DBP) tarafından bağlanır ve deride bulunan kapillerden kana karışır.



(a) (b)

Şekil 1. a) 7-dehidrokolesterol, b) D_3 (kolekalsiferol)

Bitkiler ve mantarlarda bulunan ergosterolün (Şekil 2-a) güneş ışığına maruz kalmasıyla ise D_2 (ergokalsiferol) oluşur (Şekil 2-b).



(a) (b)

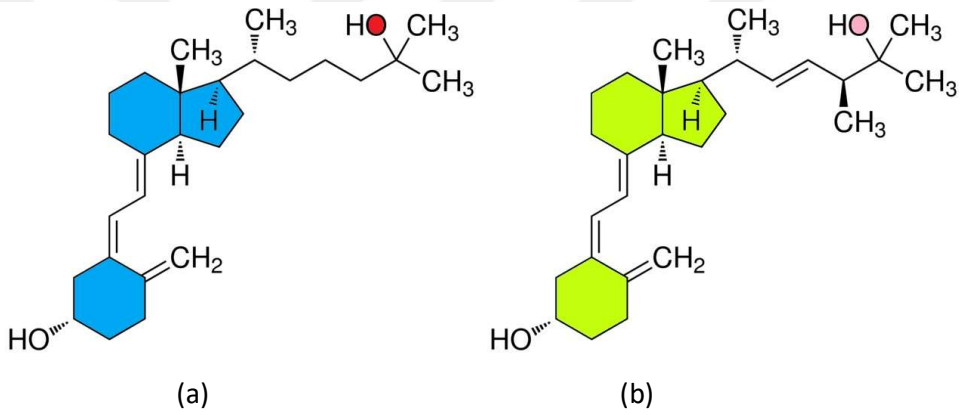
Şekil 2. a) Ergosterol, b) D_2 (ergokalsiferol)

D vitaminin iki farklı formunu oluşturan D_3'ün D_2'den farkı, 22 ve 23. karbonları arasında tek bağ olması ve 24. karbonunda metil grubunun olmamasıdır. D_1 olarak bir form tanımlanmış ise de, daha sonra yapılan çalışmalarda aslında bu formun tachysterol ve D_2'nin bir eklentisi olduğu ve tanımlamanın yanlış yapıldığı anlaşılmıştır [6].

D_3 formu çoğunlukla deride sentezlenmekle birlikte, D_2 gibi besinlerle de alınabilir [7]. D_3 ve D_2 kanda DBP ile taşınır. Her iki D vitamini formu vücutta karaciğer ve yağ dokusunda depolanır [8].

25(OH)D

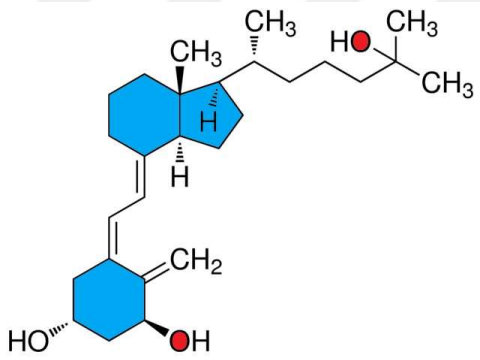
D vitamini formlarının deriden veya yağ dokusundan DBP ile karaciğere taşınması, aktivasyonları için gerekli ilk aşamadır. D_3 ve D_2 karaciğerde, farklı sitokrom P450 enzimleri ile 25. karbonundan hidroksillenerek sırasıyla 25(OH)D_3 ve 25(OH)D_2 oluşur (Şekil 3) [9]. 25 hidroksilaz olarak isimlendirilen bu enzim grubundan olan CYP2R1 ise bu reaksiyonu gerçekleştiren spesifik mikrozomal enzimdir. 25(OH)D_3 dolaşımda en fazla bulunan D vitamini metabolitidir [2].



Şekil 3. a) 25(OH)D_3, b) 25(OH)D_2

1,25(OH)$_2$D$_3$

25(OH)D$_3$ karaciğerden böbreğe yine DBP ile taşınarak; proksimal tübül hücresine, megalin bağımlı ve cubulin aracılı endositozla alınır [10]. Mitokondriyal P450 enzimi olan CYP27B1 (1α hidroksilaz) enzimi, böbreğe gelen 25(OH)D$_3$'ü 1. karbonundan hidroksilleyerek D$_3$ vitaminin aktif formu olan 1,25(OH)$_2$D$_3$'e dönüştürür (Şekil 4). 25(OH)D$_3$, büyük oranda böbreklerde olmakla birlikte; plasenta, kemik ve makrofajlar gibi ekstrarenal dokularda da 1α hidroksilasyona uğrar.

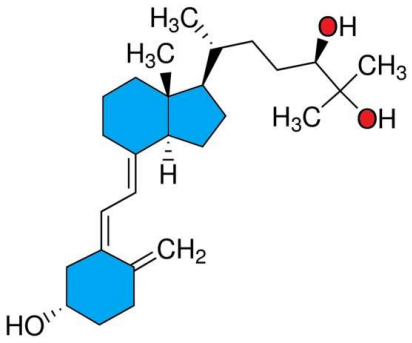


Şekil 4. 1,25(OH)$_2$D$_3$

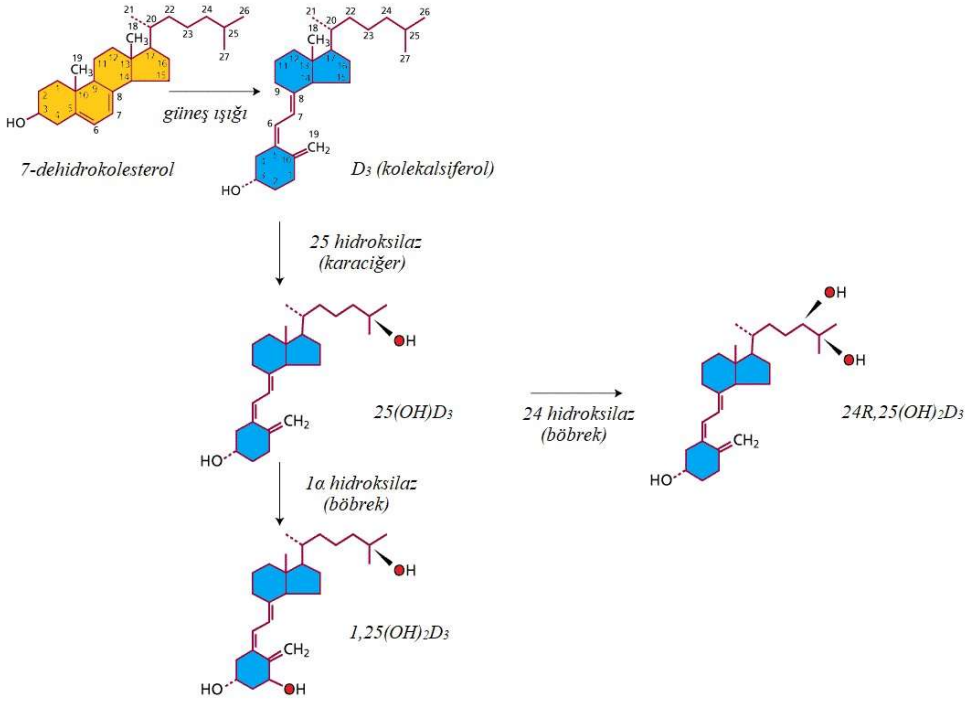
1,25(OH)$_2$D$_3$'ün reseptörüne bağlanması sitokrom P450 enzimi olan CYP24A1 (24 hidroksilaz) ekspresyonun artmasına neden olur. 1,25(OH)$_2$D$_3$, 24 hidroksilaz enzimi ile 23. karbonun laktonizasyonu veya 24. karbonun oksidasyonuyla sırasıyla 1,25(OH)$_2$D$_3$-26,23-lakton ve kalsitroik aside dönüştürülür ve safrayla atılır. Kanda DBP'ye bağlı olarak bulunan 1,25(OH)$_2$D$_3$'ün plazma konsantrasyonu 19,2-67,2 pg/mL ve yarılanma ömrü ise 4-8 saattir [11].

24R,25(OH)$_2$D$_3$

1,25(OH)$_2$D$_3$'ü yıkan 24 hidroksilaz enziminin bir diğer substratı ise 25(OH)D$_3$'dür. 25(OH)D$_3$'ün 24. karbonundan hidroksilasyonu ile böbreklerde, kemikte ve bağırsakta 24R,25(OH)$_2$D$_3$ oluşur (Şekil 5 ve 6) [12]. Kanda DBP'ye bağlı olarak bulunan 24R,25(OH)$_2$D$_3$'ün plazma konsantrasyonu 1-5 ng/mL ve yarılanma ömrü yaklaşık 7 gündür [12].



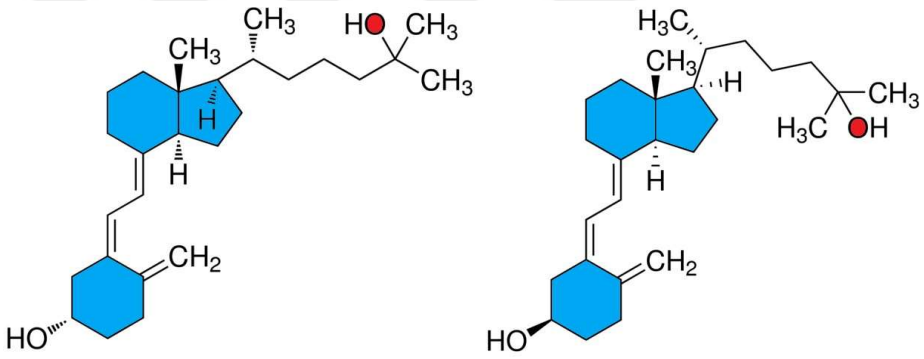
Şekil 5. 24R,25(OH)$_2$D$_3$



Şekil 6. D vitamini metabolizması

3-epi-25(OH)D_3

25(OH)D_3, 1,25(OH)$_2D_3$ ve 24R,25(OH)$_2D_3$ sentezi için substrat olmakla birlikte 3. karbonundaki hidroksil grubunun epimerizasyonu (α→ß) ile de metabolize olabilir. 3-epi-25(OH)D_3'ün 25(OH)D_3'den tek farkı 3. karbondaki hidroksil grubunun bağlanma açısının farklı olmasıdır (Şekil 6). 3-epi-25(OH)D_3, özellikle 1 yaşından küçük çocukların dolaşımında bulunmakta ve yaş arttıkça miktarı azalmaktadır [13]. 1 yaşın altında, kandaki 25(OH)D'nin %9-61'ini oluşturan 3-epi-25(OH)D_3'ün erişkinlerdeki plazma konsantrasyonu 0,1-23,7 ng/mL'dir (ortalaması 1,5 ng/mL) [14].



(a) (b)

Şekil 7. a) 25(OH)D_3, b) 3-epi-25(OH)D_3

2.2 D Vitamini ve Metabolitlerinin Klinik Önemi

D_3 ve D_2, D vitamini metabolizmasının başlangıcında bulunan öncü moleküllerdir. Ancak bu moleküllerin yarı ömürlerinin kısa olması, plazmadaki düzeylerinin beslenmeden veya kısa süreli güneş ışığına maruz kalmaktan etkilenmesi nedeniyle vücudun D vitamini düzeyini değerlendirmede kullanılmamaktadırlar [15].

25(OH)D

25(OH)D, plazma yarılanma ömrünün yaklaşık 2-3 hafta olması sayesinde vücutta D vitamini eksikliğinin belirlenmesi ve D vitamini tedavisi izleminde kullanılır [15]. Vücuttaki D vitamini durumunun değerlendirilmesinde kullanılacak olan plazma 25(OH)D konsantrasyonu kriterleri [1];

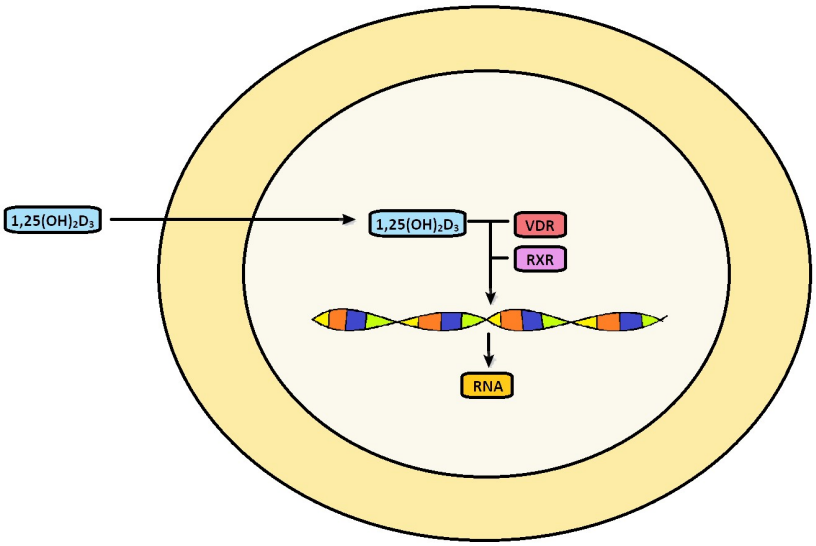
- D vitamini eksikliği, <12 ng/mL, çocuklarda raşitizm erişkinde ise osteomalazi için risk oluşturan konsantrasyon
- D vitamini yetersizliği, 12-20 ng/mL, sağlıklı bireylerde genel sağlık durumu ve kemik sağlığı için yetersiz konsantrasyon
- Yeterli D vitamini, ≥20 ng/mL, sağlıklı bireylerde genel sağlık durumu ve kemik sağlığı için yeterli konsantrasyon
- D vitamini toksisitesi, >50ng/mL, yan etkilerin görülmeye başladığı (özellikle >60 ng/mL) konsantrasyon

$1,25(OH)_2D_3$

Kalsiyum ve fosfat homeostazının düzenlenmesinde aktif rol alan $1,25(OH)_2D_3$'ün plazma konsantrasyonu, kan kalsiyum ve fosforunun azalmasıyla ve parathormon (PTH) etkisiyle artar [16]. D vitamini depolarında azalma olduğunda dahi, artan PTH etkisi ile 1α hidroksilasyon artırılarak plazma $1,25(OH)_2D_3$ düzeyi korunur. $25(OH)D_3$'ün azalmasına rağmen $1,25(OH)_2D_3$ düzeyinin korunması, plazmada $1,25(OH)_2D_3$ ölçümünün D vitamini eksikliğinin belirlenmesinde yararlı olmayacağı anlamına gelir [15]. Bu nedenle, $1,25(OH)_2D_3$'ün ölçülmesi ancak hipo veya hiperkalsemiye yol açan $1,25(OH)_2D_3$ eksikliğinden veya fazlalığından şüphelenildiği durumlarda ve $1,25(OH)_2D_3$ tedavisinin izleminde düşünülmelidir [15].

Plazma $1,25(OH)_2D_3$ konsantrasyonu, böbrek yetmezliği, D vitamini bağımlı raşitizm tip 1 (1α hidroksilaz eksikliği), X-linked hipofosfatemi, hipoparatiroidizm ve hipomagnezemi hastalarında azalır. D vitamini bağımlı raşitizm tip 2 (uç organ direnci), hiperkalsiüri ile giden herediter hipofosfatemik raşitizm, primer hiperparatiroidizm, granülomatöz hastalıklar ve lenfoma gibi hastalıklarda ise plazma $1,25(OH)_2D_3$ konsantrasyonları artabilir.

$1,25(OH)_2D_3$, kalsiyum ve fosfat metabolizmasındaki bilinen etkilerinin yanında farklı hedef dokularda bulunan hücrelerdeki nükleer reseptörüne (VDR) bağlanarak 800'e yakın genin ekspresyonunu düzenler [16]. $1,25(OH)_2D_3$'ün VDR'ye bağlanması sonrası VDR, retinoid X reseptörü (RXR) ile birleşir. Bu yapı DNA'daki Vitamin D response elements (VDRE)'e bağlanarak transkripsiyon faktörlerini oluşturur (Şekil 8). $1,25(OH)_2D_3$ nükleer reseptörüne bağlandığında ostekalsin ve CYP24 gen transkripsiyonlarını artırılması, PTH ekspresyonunu baskılanması gibi önemli etkilerini gösterir [17].



Şekil 8. 1,25(OH)$_2$D$_3$'ün DNA'da etkisini göstermesi

VDR (D vitamini reseptörü), RXR (retinoid X reseptörü)

24R,25(OH)$_2$D$_3$

1,25(OH)$_2$D$_3$'ün D vitamini eksikliğinin belirlenmesinde öneminin olmamasından farklı olarak; 25(OH)D$_3$'ün majör kataboliti olan 24R,25(OH)$_2$D$_3$, plazma 25(OH)D konsantrasyonu ile güçlü bir korelasyon göstermesi nedeniyle D vitamini eksikliğinin belirlenmesinde kullanılabilir [12]. Aynı zamanda 24R,25(OH)$_2$D$_3$ konsantrasyonu, kronik böbrek hastalığı olanlarda anlamlı olarak düşük bulunmuştur [12]. Bu nedenle 24R,25(OH)$_2$D$_3$, kronik böbrek hastalığının değerlendirilmesinde önemli bir biyolojik belirteçtir.

3-epi-25(OH)D$_3$

3-epi-25(OH)D$_3$, 25(OH)D$_3$ gibi benzer enzimlerle hidroksillenerek, 3-epi-1,25(OH)$_2$D$_3$, 3-epi-24R,25(OH)$_2$D$_3$ gibi metabolitleri oluşur. 3-epi-25(OH)D$_3$ metabolizmasının başlıca farklı özellikleri [17];

- 3-epi-25(OH)D$_3$'ün DBP'ye bağlanmasının, 25(OH)D$_3$'e göre daha az olması (%36-46)
- 3-epi-1,25(OH)$_2$D$_3$'ün 1,25(OH)$_2$D$_3$'e göre VDR'ye bağlanmasının oldukça düşük olması (%2-3).
- 3-epi-1,25(OH)$_2$D$_3$'ün, ostekalsin ve CYP24 gen transkripsiyonlarına etkisinin, 1,25(OH)$_2$D$_3$'ün etkisine göre daha az olmasıdır (%15).

Bu farklılıklara rağmen her iki D vitamini aktif metabolitinin PTH ekspresyonu üzerindeki etkileri ise benzerdir.

2.3 D Vitamini Metabolitlerinin Ölçümünde Kullanılan Yöntemler

Günümüzde D vitamini metabolitlerinin ölçümünde değişik formatlarda immünokimyasal, kromatografik ve kütle spektrometrik yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemler moleküllerin kimyasal özelliklerine ve plazma konsantrasyonlarına göre metabolitlerin analizinde tek başına kullanılabileceği gibi duyarlılık ve özgüllüğü artırmak için birlikte de kullanılmaktadırlar. Son yıllarda D vitamini metabolitlerinin ölçümünde, kromatografik yöntemlerin kütle spektrometresi ile birlikte kullanımı yaygınlaşmaktadır.

25(OH)D

D vitaminin dolaşımda en fazla bulunan metabolitleri olan 25(OH)D_3 ve 25(OH)D_2 ölçümünde, yukarıda belirtilen üç yöntem de laboratuvarlarda kullanılmaktadır. Bine yakın laboratuvarın katıldığı DEQAS dış kalite kontrol programının (Vitamin D External Quality Assessment Scheme), 25(OH)D testinin Nisan 2016 ayı raporu incelendiğinde; immünokimyasal, kromatografik ve kütle spektrometrik yöntemlerin kullanım yüzdeleri sırasıyla %75, %5 ve %25'tir. Piyasada çeşitli üreticiler tarafından geliştirilen, D vitamini ölçümünün farklı hormon testleriyle birlikte otomatize cihazlarla gerçekleştirilebildiği immünokimyasal yöntemler bulunmakla birlikte; ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) gibi test protokolünün manuel yapıldığı yöntemler de mevcuttur. İmmünolojik yöntemlerin birçoğu 25(OH)D_3 ve 25(OH)D_2 ayrımını sağlayamamakta ve her iki molekülün de sonuca katkı sağladığı bir toplam 25(OH)D konsantrasyonu sonuç olarak üretilmektedir. HPLC ve LC/MSMS temelli kullanılan yöntemlerde ise, iki molekül hem alıkonma zamanlarının farklı olması nedeni ile kromatografik olarak hem de kütlelerinin farklı olması nedeniyle kütle spektrometresiyle kolayca ayrılıp ölçülmektedir. Özellikle hızlı sonuç üretmeleri, aynı anda hastadan istenilen farklı testlerin birlikte yapılabilmesine olanak tanıması ve çok sayıda hasta örneğinin birlikte analiz edilebilmesi nedeniyle klinik laboratuvarlarda 25(OH)D ölçümünde immünokimyasal yöntemlerin kullanım sıklığı diğer iki yönteme göre daha fazladır.

$1,25(OH)_2D_3$

D vitaminin aktif metaboliti olan $1,25(OH)_2D_3$ ölçümünde, immünokimyasal ve LC/MSMS yöntemleri kullanılmaktadır. $1,25(OH)_2D_3$'ün diğer D vitamini metabolitlerine göre plazma konsantrasyonunun oldukça düşük olması nedeniyle, HPLC ile kullanılan mevcut dedektörler ile ölçüm yapılamamaktadır. HPLC yöntemlerinde genellikle $25(OH)D_3$ için kantitasyon alt limitinin 1 ng/mL düzeylerinde olduğu göz önüne alındığında, yapıca $25(OH)D_3$'e benzer bir molekül olan $1,25(OH)_2$ D_3'ün yalnızca HPLC sistemleri kullanılarak ölçümünün yapılamayacağı açıktır. $1,25(OH)_2D_3$'ün LC/MSMS ile miktarının tayini, yöntemin uygulanmasında gerekli olan molekülün iyonlaştırılmasının zorluğundan kaynaklanan düşük iyonizasyon verimliliği nedeniyle de kolay olmamaktadır. Bu nedenle araştırmacılar çeşitli türevlendirme yöntemleri kullanarak iyonizasyon verimliliğini iyileştirip, yöntem hassasiyetini artırarak LC/MSMS ile $1,25(OH)_2D_3$ ölçümünü sağlamışlardır [18].

$24R,25(OH)_2D_3$

$24R,25(OH)_2D_3$, sabit fazda alıkonma zamanının $25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$'den farklı olması sayesinde HPLC ile, molekül ağırlığının $25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$'den farklı olması sayesinde ise LC/MSMS ile ölçülebilir. Birçok D vitamini metabolitinde olduğu gibi $24R,25(OH)_2D_3$'ün klinik önemi henüz tüm yönleriyle açıklığa kavuşturulmadığından, otomatize cihazlarda uygulanabilen immünokimyasal bir yöntem bulunmamaktadır.

3-epi-25(OH)D_3

3-epi-25(OH)D_3 ve 25(OH)D_3 ayrımı, molekül yapılarının oldukça benzer olması nedeniyle mevcut immünokimyasal yöntemlerde kullanılan antikorlarla yapılamamaktadır. Ancak bu moleküller kromatografiyle, sabit fazda alıkonma zamanlarının farklı olması sayesinde birbirinden ayrılıp ayrı ayrı ölçülebilir. Tek başına kütle spektrometresi, 3-epi-25(OH)D_3 ve 25(OH)D_3 aynı molekül kütlesine sahip oldukları ve parçalandıklarında aynı parçalanma paternini gösterdikleri için de bu metabolitlerin ayrımını sağlayamaz.

Görüldüğü üzere D vitamini metabolitlerinin ölçümünde tek yöntem ve cihaz kullanımı her zaman istenen sonuçları vermemektedir. Ölçümü yapılmak istenen metabolitler tek tek değerlendirilerek; yöntemlerin genel özellikleri, avantajları ve dezavantajları, D vitamini metabolitlerinin ölçümündeki performansları ve yöntemin kullanım amacı düşünülerek laboratuvar için en uygun yöntem seçimi yapılmalıdır.

2.3.1 İmmünokimyasal yöntemler

Teknik özellikleri

İmmünokimyasal yöntemler ölçümü yapılmak istenen moleküle özgü geliştirilen antikorların matriks içerisindeki antijen ile birleşmesi temeline dayanan yöntemlerdir. Hem kalitatif hem de kantitatif sonuçların üretilebildiği çok sayıda immünokimyasal yöntem şekli bulunmaktadır. Bunlardan bazıları pasif jel difüzyonu, immünelektroforez, Western blot, radial immünodifüzyon, turbidometre, nefelometre ve işaretli antikorların kullanıldığı immünokimyasal yöntemler olarak sıralanabilir[19].

D vitamini metabolitlerinin ölçümünde immünokimyasal yöntemlerin kullanımı

D vitamini metabolitlerinin ölçümünde işaretli antikorların kullanıldığı immünokimyasal yöntemler mevcuttur. Çoğunlukla enzimler ve kemilüminesan maddeler antikor işaretleyicisi olarak kullanılmaktadır. D vitamini metabolitlerinin ölçümü için geliştirilen immünokimyasal yöntemlerin diğer tekniklere göre birtakım avantaj ve dezavantajları aşağıda sıralanmıştır [20];

Avantajları

- Yüksek hızda sonuç verme kapasiteleri
- Aynı anda birden fazla örneğin analiz edilebilmesi
- Otomasyon sistemleri ile aynı anda başka testlerin de yapılmasına olanak tanımaları
- Kullanılan örnek hacminin az olması

Dezavantajları

- HPLC veya LC/MSMS test protokollerinde uygulanabilen, DBP'den D vitamini metabolitlerinin ayrılması ve proteinlerin çöktürülmesi için kullanılan asetonitril gibi kimyasalların, kapalı otomasyon sistemlerinde asetonitril eklenmesi sonrası gerekli olan santrifüj işleminin uygulanamamasından dolayı kullanılamaması
- DBP'nin yüksek olduğu hamilelerde geri kazanım oranlarının değişmesi
- $25(OH)D_2$'nin bu yöntemlerdeki antikorlarla verdiği reaksiyonun tutarsız oluşunun, özellikle bu formun gıda katkısı olarak kullanıldığı bölgelerde yanlış sonuçlara neden olması [15]
- Duyarlılığının düşük olması
- Ölçüm aralığının dar olması
- Dolaşımdaki diğer D vitamini metabolitleriyle çapraz reaksiyon verebilmeleri (özellikle $24R,25(OH)_2D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ ile)

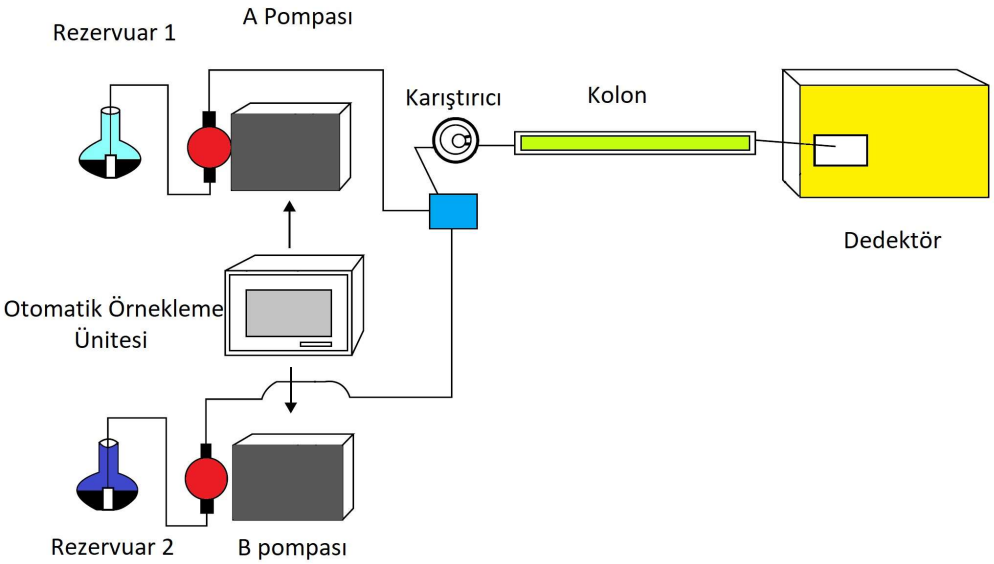
2.3.2 HPLC

Teknik özellikleri

LC, bir karışımdan ayrılıp tespit edilmek istenen analiti karışımdaki maddelerin sabit bir faz (bir kolondaki katı bir destek üzerinde hareketsiz katı veya sıvı moleküller) ile bir mobil faz (kolondan akan solvent) arasındaki tutulma dengesine göre ayıran bir tekniktir.

Pozitif basınçta solvent akışıyla kromatografi kolonuna numuneyi enjekte eden ve kesintisiz mobil faz akışı sağlayan bir pompanın kullanılması ile yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) olarak bilinen yöntem elde edilir.

Klinik laboratuvarlarda kullanılan modern HPLC sistemlerinin temel donanım bileşenleri; mobil faz rezervuarları, mobil faz degazörü, mobil faz pompaları, karıştırıcılar, otomatik örnekleme ünitesi, sıcaklık kontrollü kolon fırını ve mobil faz akışını sağlayan hatlardan ibarettir (Şekil 7). HPLC sistemlerinin laboratuvarda kullanımında yapılan analize göre çeşitli dedektörler kullanılmaktadır. MS (mass spectrometry) ile birlikte kullanımında ise MS dedektör olarak işlev görür.



Şekil 9. HPLC donanım bileşenleri

D vitamini metabolitlerinin ölçümünde HPLC kullanımı

Laboratuvarlarda günümüzde kullanımda olan HPLC cihazları ile D vitamini metabolitlerinden birçoğu; $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, 3-epi-$25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$ birbirinden ayrılabilir ve ölçülebilir. D vitamini metabolitlerinin ölçümünde kullanılan ultraviyole dedektörünün duyarlılığının düşük olması nedeniyle $1,25(OH)_2D_3$ ölçümü ise HPLC yöntemleriyle gerçekleştirilememektedir. HPLC ile birlikte kütle spektrometresi dedektör olarak kullanıldığında yöntem hassasiyeti artmakta ve analiz süresi kısalmaktadır.

İmmünokimyasal ve LC/MSMS teknikleriyle kıyaslandığında HPLC sistemlerinin D vitamini metabolitlerinin ölçümünde avantaj ve dezavantajları aşağıda sıralanmıştır;

Avantajları

- Cihaz maliyetinin LC/MSMS sistemlerine göre oldukça düşük olması
- İmmünokimyasal yöntemlerde yapılamayan $25(OH)D_3$ ve $25(OH)D_2$ ayrımının sağlanabilmesi
- 3-epi-$25(OH)D_3$'ün $25(OH)D_3$'den ayrımının yapılabildiği günümüzde mevcut tek teknik olması

Dezavantajları

- LC/MSMS yöntemlerine göre analiz süresinin daha uzun olması
- Analiz öncesinde, immünokimyasal yöntemlerde yapılmayan örnek hazırlığının gerekli olması
- D vitamini metabolitleri ile aynı dalga boyunda sinyal üreten ve kolonda alıkonma zamanı aynı olan moleküllerin yarattığı interferanslardan etkilenebilmesi
- Bir gün içerisinde çok sayıda örneğin analiz edilmesinin gerektiği laboratuvarlarda, analiz süresinin uzunluğundan dolayı tek cihazın yetersiz kalabilmesi

2.3.3 LC/MSMS

Teknik Özellikleri

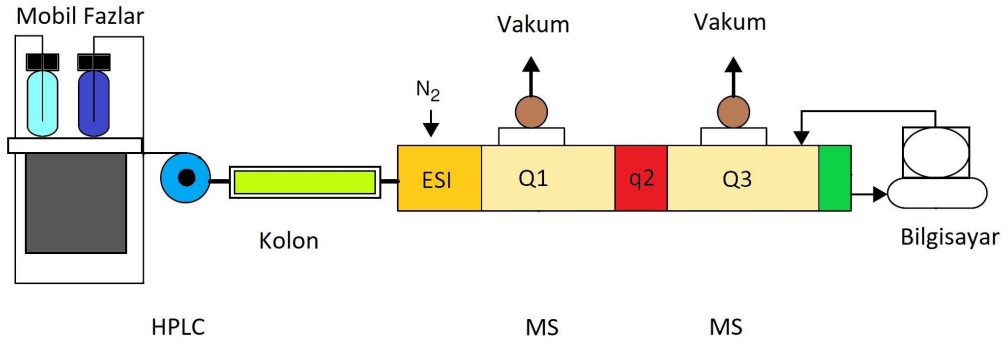
MS, en basit biçiminde; bir iyonu, kütle/yük oranına (m/z) göre diğer iyonlardan ayıran bir tekniktir [21]. MS, bir HPLC veya GC sistemine bağlandığında, iyon dedektörü olarak işlev görür. İlgili analit/analitler, MS'nin iyon kaynağında iyonlaştırıldıktan sonra; iyonların kütle/yük oranlarına (m/z) göre seçildiği, kütle spektrometresinin kütle analizör (quadrupole) birimine girer. Ölçülmek istenen iyon, diğer iyonlardan ayrılarak dedektöre gönderilir.

MS'de analiz yapabilmek için ön şart olan moleküllerin iyonlaştırılması için değişik teknikler kullanılır. ESI (electrospray ionization) klinik laboratuvarlarda MS'de en çok kullanılan, hassas bir iyonizasyon tekniğidir [22]. Bu teknikte, HPLC'den gelen mobil faz ve içerisindeki maddeler yüksek gerilim potansiyelinin uygulandığı çelik bir kapillerden bir gaz (sıklıkla azot) ile püskürtülür. Spreydeki solvent damlacıkları, iyon kaynağına uygulanan yüksek sıcaklıkta buharlaşırken aynı zamanda uygulanan yüksek gerilim sayesinde yüklü hale (negatif veya pozitif) geçer, yani iyonlaşır. Gaz fazına geçen iyonlar analiz edilmek üzere MS içerisine girer.

Küçük molekül yapısına sahip analitlerden (<1000 Amu, atomic mass unit) üretilen iyonlar genelde tek yüke sahiptir; bu nedenle m/z, iyon kütlesine eşdeğerdir. Pozitif iyonlar (protonlanmış) ölçülecek molekülün kütlesinin 1 Amu fazlasına, negatif iyonlar (deprotonize) ise 1 Amu eksiğine sahiptir. İyonlar eğer tek yüke sahipse;

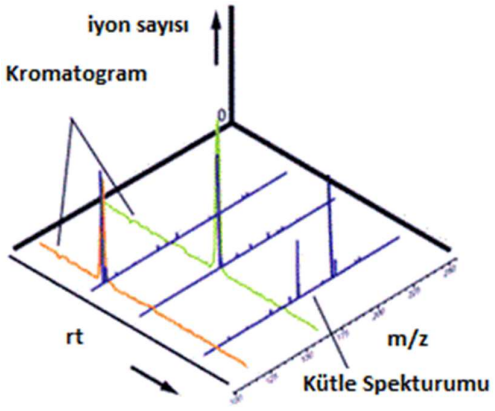
- pozitif iyonlar $[M+H]^+$ (M: molekül kütlesi, H: proton)
- negatif iyonlar $[M-H]^-$ şeklinde gösterilir.

HPLC ile mobil faz aracılığıyla kolandan geçip, iyon kaynağında iyonlaştırılıp, m/z oranına göre bir veya birden fazla quadrupole'de seçilen iyonlar; vakum uygulanan bir yolu takip ederek dedektöre ulaşır (Şekil 8). Dedektörden alınan sinyallerle; x-ekseni üzerinde, iyonun kolonda alıkonma zamanının [retention time (rt)], y ekseni üzerinde ise dedektöre ulaştırılan iyon sayısının gösterildiği grafik (kromatogram), LC/MSMS yazılımı tarafından oluşturulur (Şekil 9).



Şekil 10. LC/MSMS

(HPLC, High Performance Liquid Chromatography); ESI, Electrospray Ionization; N_2, Nitrogen; Q1, quadrupole 1; q2, collision cell; Q3, quadrupole 3; MS, mass spectrometry)



Şekil 11. Farklı kütle spektrumlarındaki kromatogramlar

(rt retention time; m/z, mass to charge ratio)

Quadrupole

Quadrupole, ortasında bir boşluk bulunan, paralel düzenlenmiş dört iletken çubuk setidir. Quadrupole içeren MS cihazları; iyonları, quadrupole'de titreşen bir elektrik alanı vasıtasıyla, iyonların uçuş yörüngelerinin dengeli bir şekilde devam edip etmemesine dayanarak ayırır. Elektriksel alan, bir quadrupole'de karşılıklı duran bir çift çubuk arasında radyo frekans (RF) voltajı uygulandığında üretilir. RF voltajına ek olarak bir doğru akım voltajı da uygulanır. Bu şekilde sadece belli bir m/z'nin iyonları quadrupole boyunca dengeli bir uçuş yoluna sahip olarak dedektöre ulaşırken; diğer iyonlar ise kararsız yörüngeleriyle dedektöre ulaşamazlar. RF ve doğru akım voltajları sabitlenerek, quadrupole'ün belirli bir m/z iyonları için bir kütle filtresi veya analite özel dedektör olarak kullanılması sağlanır. Uygulanan voltajlar sürekli olarak değiştirilerek bir dizi m/z değeri taranabilir.

Kütle spektrometrelerinde bir veya birden fazla quadrupole bulunabilir. Tek quadrupole'e sahip kütle spektrometreleri, iyonlaşan maddeleri sadece ana kütlesine göre filtrelediğinden, madde hakkında fazla yapısal bilgi sağlamaz ve sıralı (tandem) iki quadrupole'e sahip kütle spektrometreleriyle karşılaştırıldığında özgüllüğü sınırlıdır [23]. Tandem quadrupole'e sahip MS, bir çarpışma hücresi ile ayrılmış iki quadrupole (Q1 ve Q3) içerir. Analitlerin ana iyonları, ilk quadrupole'de filtrelenir. Seçilen öncü iyon/iyonlar (precursor ions), daha sonra çarpışma hücresinde (q2); çarpışmayla indüklenmiş ayrışma [collision-induced dissociation (CID)] olarak bilinen bir süreçte, Argon gazı kullanılarak parçalanır. Çarpışma hücresindeki koşullar tutarlı bir şekilde korunursa Q1'de filtrelenen öncü molekülden oluşan ürün iyonları (product ions) ve ürün iyon miktarları tekrarlanabilir. Ölçümü yapılmak istenen maddeye spesifik ürün iyonu daha sonra ikinci bir quadrupole'den (Q3) geçer. Böylece, sadece belirlenmiş bir kütle geçişine (öncü/ürün iyon çifti, iyon geçişi) izin verilip iyonlar dedektöre ulaştırılır. Öncü iyon filtrelenmesine ek olarak ürün iyonları da seçildiğinden, tandem MS yöntemiyle analizde arzulanan yüksek özgüllüğe ulaşılır. Tek analit için birden çok öncü/ürün iyon çifti geçirilmek üzere; miktar tayini için kullanılan bir iyon geçişine (kantitatif) ilaveten bir kalitatif iyon geçişi daha tanımlanırsa yöntem özgüllüğü daha da artırılabilir.

MS dedektörüne ulaşan veriler tek analitin iyon geçişi için toplandığında bu moda "selected reaction monitoring (SRM)" adı verilirken; birden fazla analit aynı anda ölçüldüğünde ise bu moda, "multiple reaction monitoring (MRM)" denilir [24]. SRM kullanımı duyarlılığı ve sinyal tekrarlanabilirliğini artırır, çünkü tüm geçiş zamanlarında cihaz yalnızca tek maddeye odaklanır.

D vitamini metabolitlerinin ölçümünde LC/MSMS kullanımı

D vitamini metabolitlerinin ölçümünde LC/MSMS yöntemleri referans yöntem olarak kabul edilmektedir. LC/MSMS yöntemleri, D vitamini metabolitlerinin ölçümü için 2001 yılından itibaren geliştirilmeye başlanmıştır [15]. Hem kromatografi hem de kütle spektrometresi tekniğinin kombinasyonunun kullanılması analiz duyarlılığı ve özgüllüğünü artırmaktadır. İmmünolojik yöntemlerde olduğu gibi sadece 25(OH)D sonucu değil; $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$ $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$'ün birlikte ölçülüp D vitamini profilinin değerlendirilebileceği sonuçlar üretilebilmektedir [15]. Gelişen kromatografi ve kütle spektrometresi teknolojisiyle daha kısa örnek hazırlığı ve analiz süresi ile miktarı çok düşük olan D vitamini metabolitlerinin dahi tayini mümkün olmaktadır.

LC/MSMS yöntemi, duyarlılığı ve özgüllüğü oldukça yüksek olmasına rağmen interferansların etkisine de açıktır [25]. D vitamini metabolitlerini LCMS/MS ile ölçerken, izomerik ve izobarik bileşiklerden gelen interferanslar dikkate alınmalıdır. İzomerik bileşikler; aynı molekül formülüne ve kütlesine sahip olmakla birlikte, farklı yapıdadırlar ($1(OH)D_3$ ile $25(OH)D_3$ gibi). İzobarik bileşikler ise aynı kütleye sahip, ancak farklı bir molekül formülüne sahiptir (7α-hydroxy-4cholesten-3-one ile $25(OH)D_3$ gibi). Ölçülen maddelerin izomer ve/veya izobarları, LC/MSMS ile analizde kromatografik davranış ve parçalanmalarının farklılıklarından faydalanılarak uzaklaştılabilmekle birlikte, her zaman dikkat edilmesi gereken potansiyel interferans kaynaklarıdır. Günümüzde LC/MSMS yönteminde maruz kalınabilen interferansları uzaklaştırmak için immünokimyasal bir yöntem örnek hazırlığı aşamasına eklenip, özellikle $1,25(OH)_2D_3$ gibi miktarı oldukça düşük olan ve interferanslardan etkilenen metabolitler için, 3 tekniğin birlikte uygulandığı sofistike yöntemler geliştirilmektedir [26].

İmmünokimyasal ve tek başına HPLC tekniğinin kullanımı ile kıyaslandığında LC/MSMS'in avantaj ve dezavantajları aşağıda sıralanmıştır [27];

Avantajları

- Duyarlılığının ve özgüllüğünün yüksek olması
- Tek analizde birden fazla analitin ölçülebilmesi
- Ölçümü yapılabilecek potansiyel analit sayısının fazla olması
- Ölçülecek analitin izotopunun (internal standart) miktar tayini hesabında kullanılması nedeniyle daha doğru sonuçlar elde edilmesi
- Kantitatif analiz için referans ölçüm yöntemi olarak kabul edilmesi
- İnterferansların daha az olması
- İnterferansların tespitinin çoğu zaman yapılabilmesi

Dezavantajları

- Karmaşıklıkları nedeniyle yöntemlerin standardizasyonun daha zor olması
- Otomasyona uygun olmayıp, örneklerin analiz öncesi hazırlanmasının değişkenlik göstermesi
- Sistemlerin karmaşıklığı nedeniyle birçok faktör analiz sonuçlarını etkilediği için daha sıkı yöntem validasyonu yapılması gerekliliği
- Cihazı kullanabilmek için uzun süreli eğitimlerin gerekmesi
- Cihaz ve teknik servis maliyetinin yüksek olması
- Analizlerin doğruluğu için gerekli internal standartların piyasada bulunamayabilmesi, temininin zor olması veya maliyetlerinin yüksek olması
- İzobarik ve izomerik moleküllerin interferansı
- İmmünokimyasal tekniklere göre örnek hazırlığı gerektirmesi

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Gereç

Çalışmada kullanılan malzemeler:

1. Standart ve internal standartlar
- $25(OH)D_3$, Cerillant Corporation, Round Rock/TX/ABD
- $25(OH)D_3$-d3, Cambridge Isotope Laboratories Inc., Tewksbury/MA/ABD
- $1,25(OH)_2D_3$, Cerillant Corporation
- $1,25(OH)_2D_3$-d3, Immuchrom, Heppenheim/Almanya
- $24R,25(OH)_2D_3$, Sigma-Aldrich, St. Louis/MO/ABD
- $24R,25(OH)_2D_3$-d6, Sigma-Aldrich
- 3-epi-$25(OH)D_3$, Sigma-Aldrich
- 3-epi-$25(OH)D_3$-d3, Sigma-Aldrich
- $25(OH)D_2$, Cerillant Corporation
- $25(OH)D_2$-d3, Sigma-Aldrich

2. Inertsil ODS-4 C18, 150 x 3.0 mm, 2 µm kolon, GL Sciences, Tokyo/Japonya
3. Kinetex F5 (PFP (pentafluorophenyl)), 100 x 2.1 mm, 2,6 µm kolon, Phenomenex, Torrance/CA/ABD
4. Guard kolon, Phenomenex
5. Sertifikalı referans materyal (CRM) SRM 972a, National Institute of Standards and Technology (NIST), Gaithersburg/MD/ABD
6. D vitamini içermeyen plazma, Seracon, Seracare Life Sci., Milford/MA/ABD
7. 4-Phenyl-1,2,4-triazoline-3,5-dione (PTAD), Sigma-Aldrich
8. Metilamin solüsyonu, Sigma-Aldrich
9. Su, LC-MS grade, Merck, Darmstadt/Almanya
10. Metanol, LC-MS grade, Merck
11. Asetonitril, LC-MS grade, Merck
12. Etanol, Sigma-Aldrich
13. Formik asit, Sigma-Aldrich
14. Etil asetat, Merck

Çalışmada kullanılan cihaz ve ekipmanlar:

1. LC/MSMS, Shimadzu Nexera XR LC-20AD HPLC ve 8050 Tandem Mass Spectrometer, Kyoto/Japonya
2. Vakum konsantratörlü santrifüj, Univapo 150 H, Uniequip/Dresden/Almanya
3. Pipetler ve pipet uçları, Gilson, Middleton/WI/ABD

Çalışmada kullanılan yazılımlar:

1. Analiz sonuçları Shimadzu, Lab Solutions yazılımı kullanılarak değerlendirildi.
2. Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Microsoft Office Excel 2016 ve Analyse-it programları kullanılarak yapıldı.
3. Şekillerin çizimleri Microsoft Paint programında yapıldı.

3.2 Yöntem

3.2.1 Standartların seyreltilmesi ve kalibratör hazırlığı

$25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ standartları, klinik karar verdirici düzeyler dikkate alınarak etanol ve D vitamini içermeyen plazma ile seyreltilerek; 6 seviyede 5 molekülü de içeren kalibratörler hazırlandı (Tablo 1) [23]. (D vitamini metabolitleri için dönüşün faktörü: 1 ng/mL=2.5 nmol/L)

Tablo 1. Kalibratör konsantrasyonları

Analit ve Birim	**Kalibratör 1**	**Kalibratör 2**	**Kalibratör 3**	**Kalibratör 4**	**Kalibratör 5**	**Kalibratör 6**
$25(OH)D_3$ ng/mL	3,1	6,2	12,5	25	50	100
$1,25(OH)_2D_3$ pg/mL	15,6	31,2	62,5	125	250	500
$24R,25(OH)_2D_3$ ng/mL	0,6	1,2	2,5	5	10	20
$25(OH)D_2$ ng/mL	1,2	2,5	5	10	20	40
3-epi-$25(OH)D_3$ ng/mL	0,6	1,2	2,5	5	10	20

3.2.2 Internal standartların seyreltilmesi ve internal standart çalışma solüsyonu hazırlığı

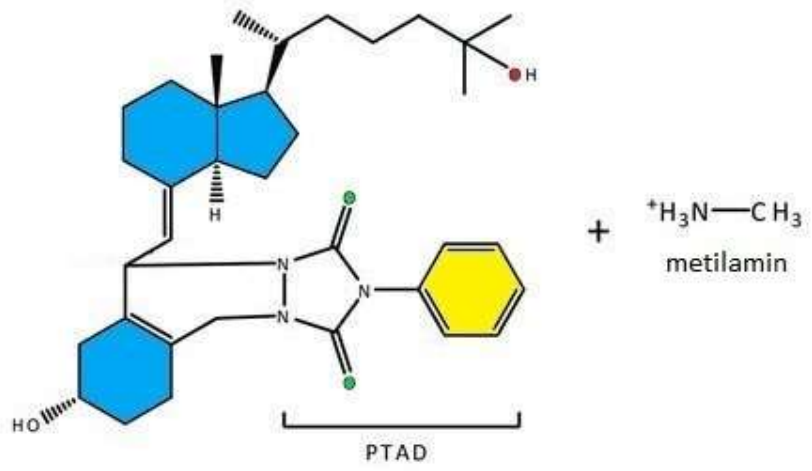
$25(OH)D_3$-d3, $1,25(OH)_2D_3$-d3, $24R,25(OH)_2D_3$-d6, $25(OH)D_2$-d3 ve 3-epi-$25(OH)D_3$-d3 internal standartları, konsantrasyonları ölçülecek maddelerin plazmadaki konsantrasyonlarına yakın olacak şekilde; etanol ile seyreltilip 5 molekülü de içeren "internal standart çalışma solüsyonu" hazırlandı (Tablo 2) [21].

Tablo 2. Internal standart çalışma solüsyonu içeriği

Analit ve Birim	**Konsantrasyon**
$25(OH)D_3$-d3 ng/mL	200
$1,25(OH)_2D_3$-d3 pg/mL	1000
$24R,25(OH)_2D_3$-d6 ng/mL	25
$25(OH)D_2$-d3 ng/mL	50
3-epi-$25(OH)D_3$-d3 ng/mL	25

3.2.3 Türevlendirme

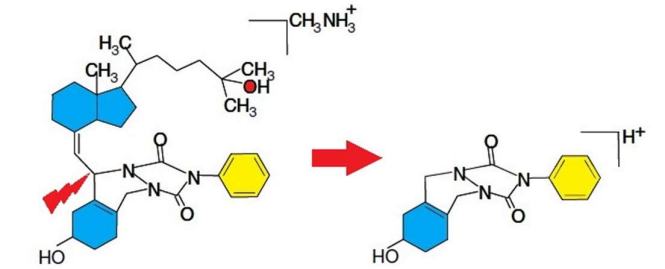
Higashi T. ve arkadaşlarının geliştirdiği D vitamini metabolitlerini türevlendirme işlemi yapıldı [28]. Bunun için asetonitril ile hazırlanan 0,5 mg/mL PTAD solüsyonundan 40 µL, liyofilize edilmiş örneklere eklenerek 1 saat oda sıcaklığında bekletildi. A mobil fazı (su) içerisine eklenen metilamin (5 mM) ile türevlendirme işlemi tamamlandı.



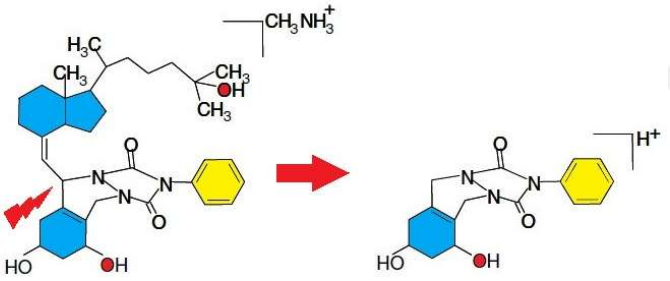
Şekil 12. Türevlendirme sonrası 25(OH)D_3

3.2.4 Kütle spektrometresi parametreleri

Maddelerin precursor ve product iyonları türevlendirme sonrası belirlendi.



Şekil 13. 25(OH)D_3'ün precursor ve product iyonları



Şekil 14. 1,25$(OH)_2D_3$'ün precursor ve product iyonları

Q1 ve Q3 pre bias voltajları, collision energy, dwell time, pause time ve interface parametreleri LC/MSMS cihazının yazılımı kullanılarak optimum hale getirildi. Tüm moleküller için dwell time ve pause time sırasıyla 100 ve 3 milisaniye olarak belirlendi. 3-epi-25(OH)D_3 ve internal standardının sırasıyla 25(OH)D_3 ve internal standardıyla precursor ve product iyonları aynı olup, maddelerin ayrımları kromatografik olarak yapılacağından 3-epi-25(OH)D_3 ve internal standardı için fazladan iyon geçişi tanımlanmadı.

Tablo 3. Kütle spektrometresi parametreleri

Analitler	**Precursor ion (m/z)**	**Product ion (m/z)**	**Q1 pre bias (V)**	**Collision energy (V)**	**Q3 pre bias (V)**
$25(OH)D_3$	607,1	298,2	-24	-23	-22
$25(OH)D_3$-d3	610,0	301,0	-10	-25	-28
$1,25(OH)_2 D_3$	623,2	314,2	-28	-24	-20
$1,25(OH)_2 D_3$-d3	626,3	317,0	-34	-26	-22
$24R,25(OH)_2 D_3$	623,2	298,1	-26	-23	-22
$24R,25(OH)_2 D_3$-d6	629,2	298,1	-26	-23	-22
$25(OH)D_2$	619,0	298,0	-10	-20	-28
$25(OH)D_2$ IS-d3	622,0	301,0	-10	-20	-28

Tablo 4. Interface parametreleri

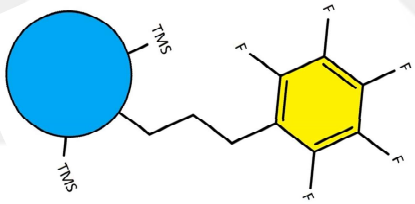
Interface Parametresi	**Değer**
Nebulizer gaz akış miktarı	2,6 L/dakika
Isıtma gazı akış miktarı	13 L/dakika
Interface sıcaklığı	250 °C
DL sıcaklığı	170 °C
Isıtma bloğu sıcaklığı	350 °C
Kurutma gazı akış miktarı	7 L/dakika
CID gaz basıncı	290 kPa

3.2.5 HPLC parametreleri

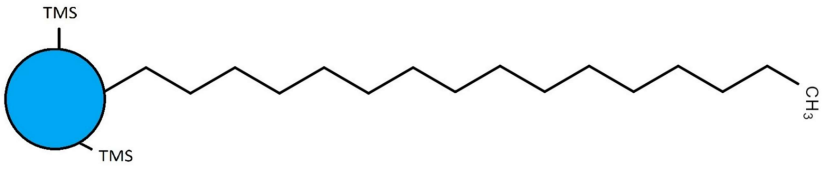
Mobil faz içerikleri aşağıda belirtildiği gibi hazırlandı;

- Mobil Faz (A): su, %0,1 formik asit, 5 mM metilamin
- Mobil Faz (B): metanol, %0,1 formik asit

PFP ve C18 (Şekil 13 ve 14) kolon sırasıyla art arda bağlanıp, iki kolon birlikte kullanılarak analizler gerçekleştirildi. Kolon fırını 30°C olarak sabitlendi.

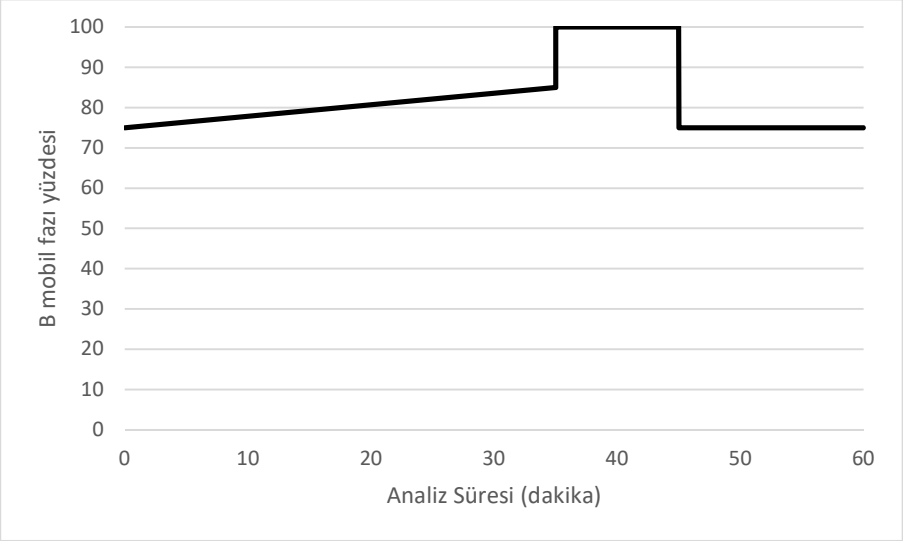


Şekil 15. PFP kolonun partikül yapısı



Şekil 16. C18 kolonun partikül yapısı

Mobil fazların toplam akış miktarı 0,2 mL/dk olarak belirlendi. Mobil faz akış yüzdelerinin değişimleri Şekil 12'deki gibi olacak şekilde tanımlandı.



Şekil 17. Mobil faz gradienti

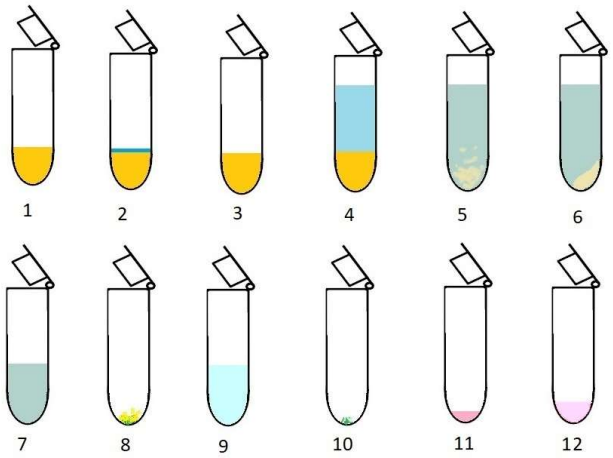
Standart ve internal standartlar analiz edilerek, moleküllerin kolonda alıkonma zamanları (retention time, rt) belirlendi (Tablo 5).

Tablo 5. Moleküllerin kolonda alıkonma zamanları (rt)

Analit	**rt (dakika)**
25(OH)D_3 ve internal standardı (IS)	35,0
1,25$(OH)_2$ D_3 ve IS	25,7
24R,25$(OH)_2$ D_3 ve IS	21,5
25(OH)D_2 ve IS	37,0
3-epi-25(OH)D_3ve IS	34,5

3.2.6 Plazma ekstraksiyonu

Plazma ekstraksiyonu, Ding S. ve arkadaşlarının [29] uyguladığı likit/likit ekstraksiyon (LLE) uyarlanarak aşağıdaki sıralamayla yapıldı;



Şekil 18. Ekstraksiyon basamakları

- Kalibratörler ve analiz edilecek plazma örneklerinden 200'er µL (1) alınarak üzerlerine 20'şer µL internal standart çalışma solüsyonu eklendi (2).
- Tüm örnekler 5 dakika vortekslendikten sonra 1 saat süreyle 37°C'de su banyosunda inkübasyona bırakıldı (3).
- İnkübasyon sonrası 500'er µL asetonitril eklendi (4).
- 5 dakika vortekslendikten sonra 1 saat süreyle +4°C'de bekletildi (5).
- Örnekler 18.405 x g'de 30 dakika santrifüj edilip (6), üst fazdan 400'er µL farklı tüplere alınarak (7) vakum konsantratörlü santrifüjde 2 saat uçuruldu (8).
- 100'er µL su ve 200'er µL etil asetatla çözülen örneklerden etil asetat üst fazı farklı tüplere alınarak (9) 30 dakika uçuruldu (10).
- 40'ar µL 0,5 mg/mL PTAD ile türevlendirilen örneklere (11) 40'ar µL su eklenerek (12), 20 µL enjeksiyon hacmiyle analiz edildi.

3.2.7 Piklerin değerlendirilmesi

Analiz sonucu oluşan kromatogramlar, CLSI C62-A (Clinical & Laboratory Standards Institute: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods, Approved Guideline, 1st Edition) rehberinde tarif edildiği şekilde çizilip, çözünürlük katsayıları ve sinyal gürültü oranları değerlendirildi [23].

3.2.7.1 Çözünürlük

Kolonda alıkonma zamanları yakın olan iki maddenin (A ve B gibi, sırasıyla dedektöre ulaşan) kromatografik çözünürlüğü aşağıdaki formül kullanılarak hesaplandı;

$$\mathrm{Rs} = 2\mathrm{x}\frac{[(\mathrm{rt})\mathrm{B} - (\mathrm{rt})\mathrm{A}]}{[\mathrm{wA} + \mathrm{wB}]}$$

Rs: çözünürlük (resolution) katsayısı, rt: kolonda alıkonma zamanı (retention time), w: pik genişliği (peak width)

3.2.7.2 Sinyal gürültü oranlarının hesaplanması

Her bir maddenin miktar tayini yapılabilecek en düşük konsantrasyonunu belirlemek için kullanılacak olan sinyal/gürültü (S/N) oranı, aşağıdaki formülle hesaplandı;

$$\frac{\mathrm{S}}{\mathrm{N}}\left(\frac{\mathrm{Signal}}{\mathrm{Noise}}\right) = \frac{\text{ilgili analitin kromatografik zirvesinin yüksekliği}}{\text{kromatografik gürültü çizgisinin yüksekliği}}$$

3.2.8 Matriks etkisinin değerlendirilmesi

Ölçtüğümüz her metabolit için matriks etkisi, CLSI 62-A rehberinde önerilen Matuszewski B.K. ve arkadaşlarının yaptığı çalışma şablon olarak kullanılarak değerlendirildi [30]. 5 farklı matriks içerisinde 6 seviye olarak (kalibratör konsantrasyonları) 3 grup halinde örnekler hazırlandı;

- A grubu, etanol içerisinde 6 farklı konsantrasyonda analitler
- B grubu, ekstraksiyon sonrası elde edilen 5 farklı matrikse eklenen 6 farklı konsantrasyonda analitler
- C grubu, ekstraksiyon öncesi 5 farklı matrikse eklenen 6 farklı konsantrasyondaki analitler

Aşağıdaki formüller kullanılarak her seviye için matriksin iyonlaşmaya etkisi (ion suppression), ekstraksiyon geri kazanımı ve süreç verimliliği hesaplandı.

$$\text{Matriksin iyonlaşmaya etkisi} = \text{ME}(\%)(\text{matrix effect}) = 100 \text{ x } \left(\frac{\text{B}}{\text{A}}\right)$$

$$\text{Ekstraksiyon geri kazanımı} = \text{RE}(\%)(\text{recovery of extraction}) = 100 \text{ x } \left(\frac{\text{C}}{\text{B}}\right)$$

$$\text{İşlem verimliliği} = \text{PE}(\%)(\text{process efficiency}) = 100 \text{ x } \left(\frac{\text{C}}{\text{A}}\right)$$

İnternal standartlar için ise 5 farklı matriksте, sadece tek konsantrasyonda yapılan ölçümlerle elde edilen sonuçlar aynı formüller kullanılarak değerlendirildi.

3.2.9 Carryover

CLSI 62-A rehberinde önerildiği üzere; "Carryover" çalışması için yüksek konsantrasyonda D vitamini metabolitlerini içeren örnek analiz edildikten sonra, maddeleri içermeyen örnek analizi yapıldı. Maddeleri içermeyen örnek analizinde bir önceki analizden arta kalan madde olup olmadığı değerlendirildi [23].

3.2.10 Kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

Kalibratörlerde bulunan maddelerin kromatogramda eğri altında kalan alanları, kendi internal standardının eğri altında kalan alanına oranlanarak sonuçlar y eksenine; kalibratör konsantrasyonları da x eksenine yerleştirilerek, kalibrasyon grafikleri ve denklemleri oluşturuldu. Örneklerin içerisindeki D vitamini metabolitlerinin konsantrasyonları, bu denklemler kullanılarak cihaz yazılımı tarafından otomatik olarak hesaplandı.

3.2.11 Yöntem validasyonu

Yöntem validasyonu CLSI 62-A rehberi doğrultusunda yapıldı [23].

3.2.11.1 Ölçüm aralığının alt ve üst sınırlarını belirleme

Ölçüm aralığının alt ve üst sınırlarını belirlemek için; ölçülecek maddelerin, klinik karar verdirici düzeyler göz önünde bulundurularak seçilen 4 farklı düzeyinin, D vitamini metabolitlerini içermeyen plazma içerisine eklenmesiyle hazırlanan örnekler, 20'şer kez analiz edildi. Elde edilen sonuçların %CV (coefficient of variation) değerleri hesaplandı.

$$\%\mathrm{CV} = \left[\frac{\text{Ölçümlerin standart sapması}}{\text{Ölçümlerin ortalaması}} \times 100\right]$$

3.2.11.2 Doğrusallık

Doğrusallık çalışmaları için; ölçülecek maddelerin, klinik karar verdirici düzeyler göz önünde bulundurularak seçilen 7 farklı düzeyinin, D vitamini metabolitlerini içermeyen plazma içerisine eklenmesiyle hazırlanan örnekler, 4'er kez ölçüldü. Sonuçlar polinomial regresyon metoduyla değerlendirildi.

3.2.11.3 Kesinlik

Kesinlik çalışmaları için; ölçülecek maddelerin, klinik karar verdirici düzeyler göz önünde bulundurularak seçilen 2 farklı düzeyinin, D vitamini metabolitlerini içermeyen plazma içerisine eklenmesiyle hazırlanan örnekler kullanıldı. Yöntemin ekstraksiyon, türevlendirme gibi tüm aşamaları baştan sona tekrar edilerek gerçekleştirilen analizlere 20 gün boyunca devam edildi. 2 seviye için her gün ikişer örnek hazırlanıp, aynı örnekten çifter ölçüm yapılarak günde 8 analiz gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçların %CV değerleri hesaplandı.

3.2.11.4 Doğruluk

Doğruluk çalışması için D vitamini metabolitlerini farklı düzeylerde içeren, sonuçları NIST tarafından sertifikalandırılmış standart referans materyal (SRM 972a) örneklerinin analizi yapıldı. $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$'ün ölçülen değerleri ve hedef değerleri arasındaki fark %bias olarak 2 düzey için hesaplandı.

$$\%\text{bias} = \left[\frac{(\text{Ölçülen değer} - \text{Hedef değer})}{\text{Hedef değer}} \text{ X } 100\right]$$

$1,25(OH)_2D_3$ için NIST'nin belirlediği bir değer olmadığı için, $1,25(OH)_2D_3$'ün doğruluğu yalnızca geri kazanım çalışmasıyla değerlendirildi.

Geri kazanım (recovery) çalışması için,

- Gönüllülerden (n=5) alınan plazma örnekleri kullanıldı.
- Ölçülecek maddelerin, klinik karar verdirici düzeyler göz önünde bulundurularak geri kazanım oranı belirlenecek 3 farklı düzeyi seçildi (**hedef değer**).
- Etanol içerisindeki standartlar, belirlenen konsantrasyonları oluşturacak şekilde plazma örneklerine eklendi.
- Ekleme yapılan örnekler ve herhangi bir ekleme yapılmadan hazırlanan plazma örnekleri analiz edilerek D vitamini metabolitlerinin konsantrasyonları ölçüldü.
- Maddelerin eklenmesiyle hazırlanan örneklerin sonuçlarından, herhangi bir ekleme yapılmadan elde edilen sonuçlar çıkarıldı (**geri kazanılan miktar**).
- Her plazma örneği için geri kazanılan miktar ve hedef değerler kullanılarak aşağıdaki formülle % geri kazanım miktarları ayrı ayrı hesaplandı.
- Gönüllü örneklerinden elde edilen; her analit ve her düzey için % geri kazanım ortancaları, yöntemin o madde için % geri kazanımı olarak belirlendi.

$$\%\text{ Geri kazanım} = \left[\frac{(\text{Geri kazanılan miktar} - \text{Hedef değer})}{\text{Hedef değer}} \times 100\right] + 100$$

3.2.12 Saklama koşulları

Saklama koşulları çalışmasını yapmak için, sağlıklı gönüllülerden (10'ar kişilik 2 gönüllü grubu, n=20) 8 saat açlık sonrası sabah 8:00'de, (K_2EDTA) içeren 6 mL'lik tüplere (Becton Dickinson, NJ, ABD) kan alındı. Kan alım işlemi tamamlandıktan 1 saat sonra örnekler, 2500 x g'de 10 dakika süre ile sıcaklık kontrollü santrifüjde +25°C'de santrifüj edildi.

Saklama koşulları çalışması ile plazma örneğinin saklandığı sıcaklığın, saklanma süresinin ve türevlendirilmiş preparatın saklanma süresinin D vitamini metabolitleri düzeylerine etkileri incelendi. Bu amaçla 4 farklı grup oluşturuldu;

1. Grup örnekler (n=10); +25°C'de bekletilip 1. ve 3. günlerde,
2. Grup örnekler (n=10); +4°C'de bekletilip 1. ve 3. günlerde,
3. Grup örnekler (n=20); -20 °C'de bekletilip 10. günde,
4. Grup örnekler (n=10); +4°C'de cihaz üzerinde türevlendirilmiş olarak bekletilip 5. günde analiz edildi.

Elde edilen sonuçların, gönüllülerin ilk gün yapılan analizdeki sonuçlarından farkı yüzde değişim değeri (%DD) olarak hesaplandı.

$$\%\text{DD} = \left[\frac{(\text{Saklandıktan sonraki sonuç} - \text{İlk günkü sonuç})}{\text{İlk günkü sonuç}} \times 100\right]$$

Gruplarda oluşan yüzde değişim değerlerinin ortancaları (% DDO) kabul edilebilen değişim limitleriyle (Acceptable Change Limit, ACL) birlikte değerlendirildi [31].

$$\mathbf{ACL} = \left[\mathbf{Z\sqrt{2} \times \%CV}\right] \rightarrow \left[\mathbf{1,96 \times \sqrt{2} \times \%CV}\right] \rightarrow \left[\mathbf{2,77 \times \%CV}\right]$$

Z=1,96: %95 güven aralığında iki yönlü değişimler için belirlenmiş değer; √2: 2 farklı sonuç aynı %CV ile karşılaştırıldığı için kullanılan katsayı; %CV gruplardaki gönüllülerin ortanca analit konsantrasyonlarındaki kesinlik değerleri

Çalışmaların yapılabilmesi için Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.2016.588 protokol kodlu başvuru yapılarak 02.12.2016 tarihinde onam alınmıştır.

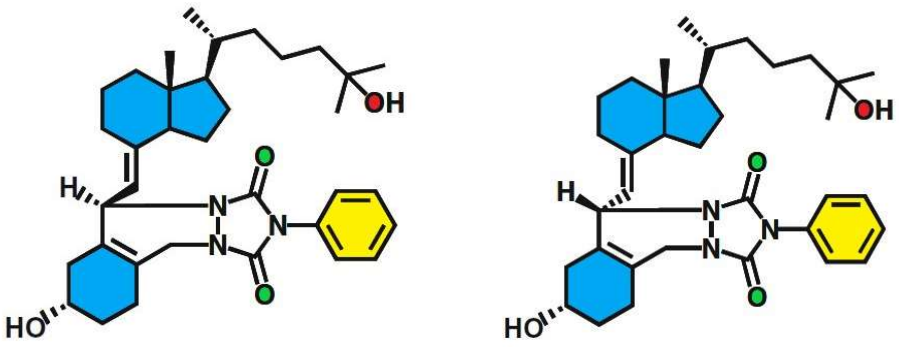
Çalışmamız Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından finansmanı sağlanan, SAG-C-TUP-110117-0006 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

4. BULGULAR

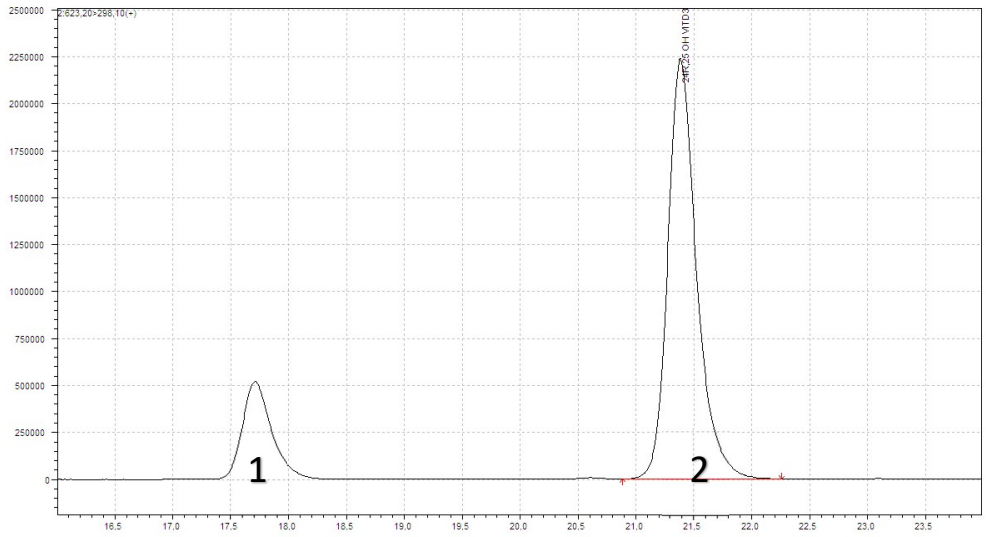
4.1 Yöntem Geliştirme

4.1.1 Kromatogramların değerlendirilmesi

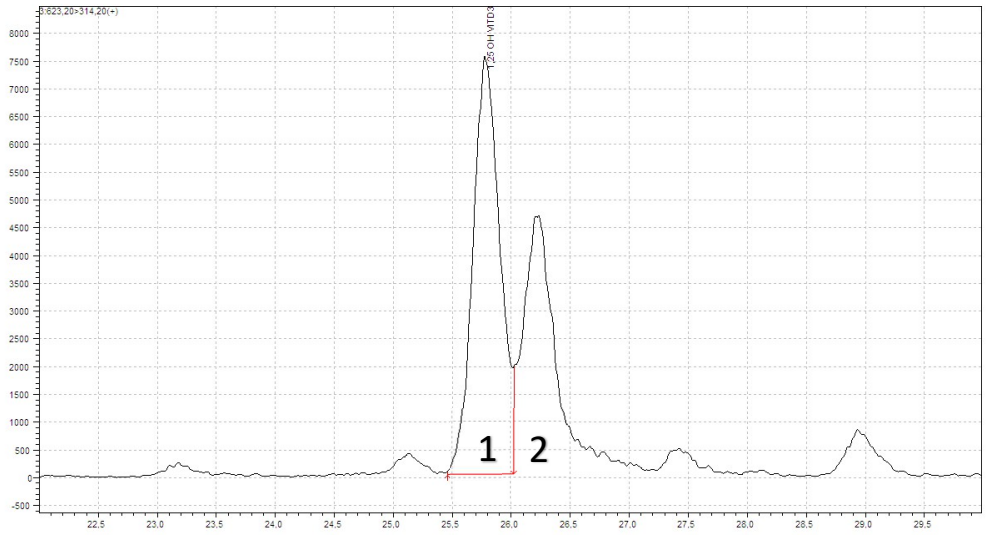
D vitamini metabolitlerinin ölçümü için geliştirdiğimiz yöntemle, tek analizle D vitamini metabolizmasının en önemli metabolitlerinin aynı anda ölçümünü gerçekleştirdik. Plazmadaki konsantrasyonları diğer metabolitlere göre oldukça düşük olan 1,25$(OH)_2$ D_3 ölçümü için türevlendirme işlemi uyguladık. Higashi T. ve arkadaşlarının geliştirdiği türevlendirme işlemi sonrası ölçümünü gerçekleştirdiğimiz D vitamini metabolitleri ve internal standartların PTAD ile bağlanması sonrası R ve S izomerleri oluştu (Şekil 16) [28]. Etanolde çözünmüş ve türevlendirilmiş standartların kromatografik olarak ayrımları yapıldığında bu izomerlerin birbirlerine olan oranları 25$(OH)D_3$, 1,25$(OH)_2D_3$, 24R,25$(OH)_2D_3$, 25$(OH)D_2$ ve 3-epi-25$(OH)D_3$ için sırasıyla (major izomer/minör izomer), 4:1, 3:2, 4:1, 5:2, 7:6 olarak hesaplandı (Şekil 17, 18, 19 ve 20). Kullandığımız internal standartlar için de aynı oranlarda izomerler oluştu. Maddelerin kantitasyonunu sağlamak için majör izomerlerin oluşturduğu piklerin eğri altında kalan alanları kullanıldı. 3-epi-25$(OH)D_3$'ün R ve S izomerleri kromatografik olarak tam olarak ayrılamadığından kantitasyon için her iki izomerin piklerinin eğri altında kalan alanları toplamı kullanıldı.



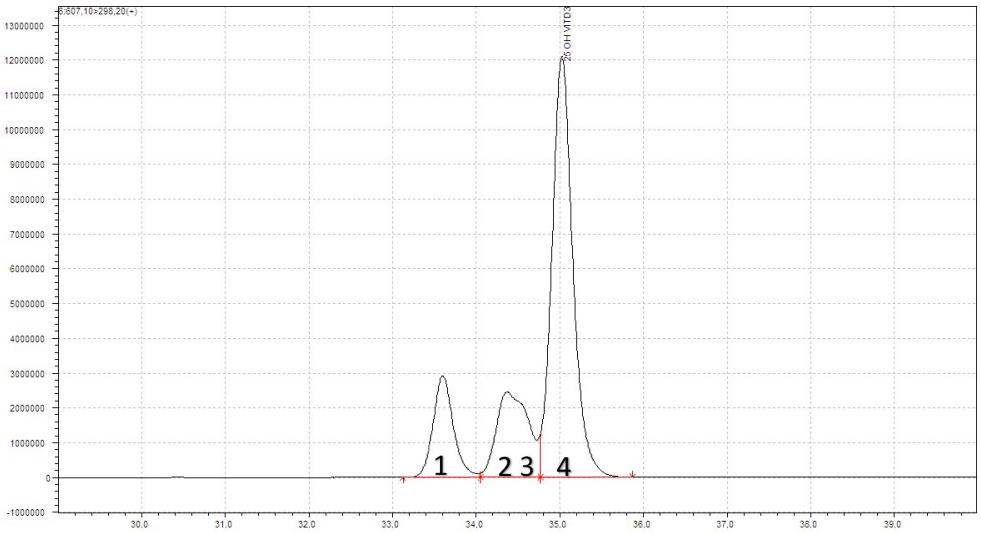
Şekil 19. 25$(OH)D_3$'ün türevlendirilmesi sonrası oluşan R ve S izomerleri (soldan sağa)



Şekil 20. Matriksi etanol olan örnekte 24R,25(OH)$_2$D$_3$ kromatogramı
y ekseni dedektöre ulaşan moleküllerin yoğunluğu, x ekseni rt. 1 ve 2 numaralı pik; 24R,25(OH)$_2$D$_3$'ün türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerleri. 24R,25(OH)$_2$D$_3$ kantitasyonu için 2 numaralı pikin eğri altında kalan alanı kullanıldı.

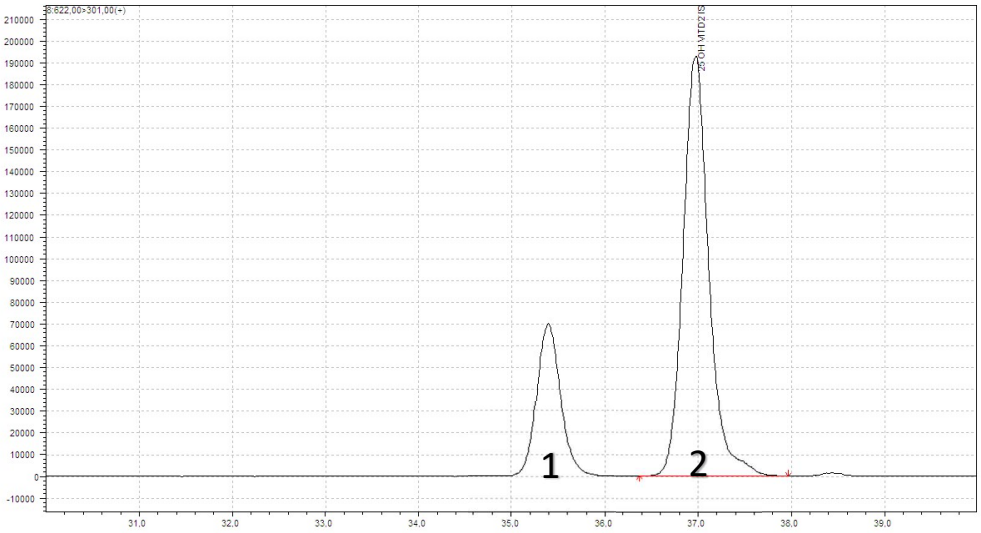


Şekil 21. Matriksi etanol olan örnekte 1,25(OH)$_2$D$_3$ kromatogramı
1 ve 2 numaralı pik; 1,25(OH)$_2$D$_3$'ün türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerleri. 1,25(OH)$_2$D$_3$ kantitasyonu için 1 numaralı pikin eğri altında kalan alanı kullanıldı.



Şekil 22. Matriksi etanol olan örnekte 25(OH)D_3 ve 3-epi-25(OH)D_3 kromatogramları

1 ve 4 numaralı pik; 25(OH)D_3'ün türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerleri. 2 ve 3 numaralı pik; 3-epi-25(OH)D_3'ün türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerleri. 25(OH)D_3 kantitasyonu için 4 numaralı pikin eğri altında kalan alanı kullanıldı. 3-epi-25(OH)D_3 kantitasyonu için 2 ve 3 numaralı piklerin eğri altında kalan alanları toplamı kullanıldı.



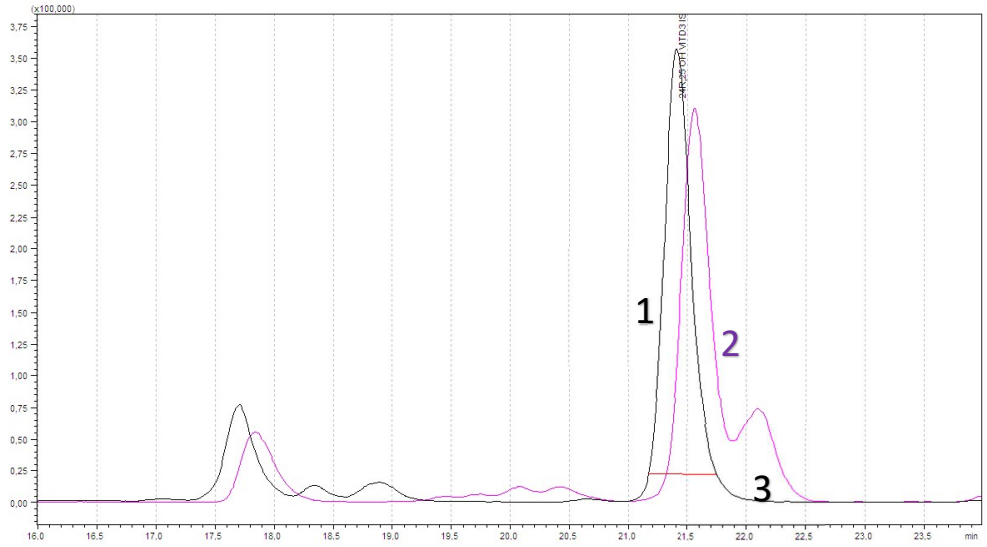
Şekil 23. Matriksi etanol olan örnekte 25(OH)D_2 kromatogramı

1 ve 2 numaralı pik; 25(OH)D_2'nin türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerleri. 25(OH)D_2 kantitasyonu için 2 numaralı pikin eğri altında kalan alanı kullanıldı.

4.1.2 İnterferans

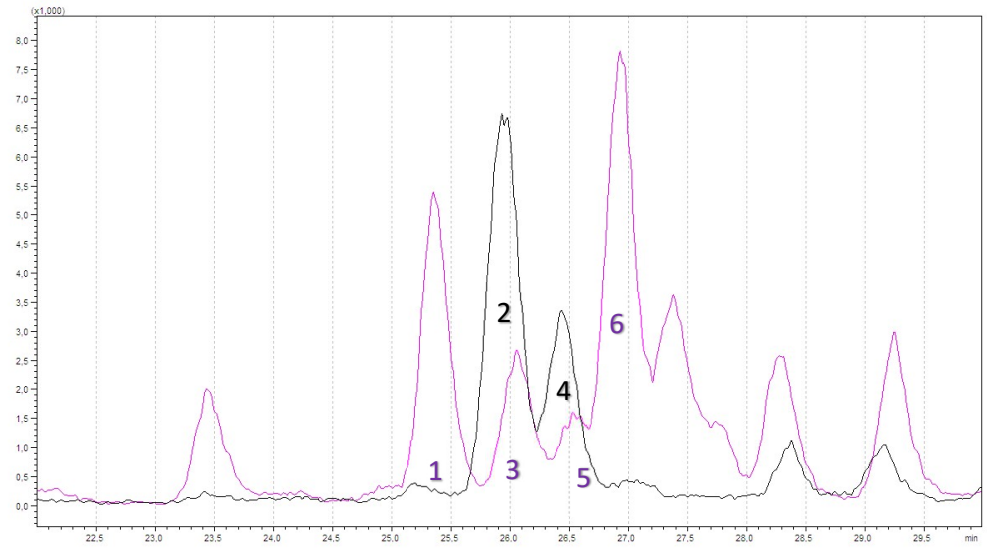
Plazma ekstraksiyonu sonrası elde edilen örneklerde D vitamini metabolitlerinden 24R,25$(OH)_2D_3$ ve 1,25$(OH)_2D_3$'ün ölçümünde interferansa neden olan, plazmadan gelen izomerik ve/veya izobarik bileşikler tespit edildi (Şekil 21 ve 22). 23,25$(OH)_2D_3$ ve 25,26$(OH)_2D_3$ gibi di-hidroksile D vitamini metabolitlerinden kaynaklanıyor olabilecek interferansların ayrımı kromatografik olarak yapıldı. Matriksi etanol olan örneklerin kromatogramlarında görülmeyip (Şekil 17 ve 18) plazmada görülen bu interferansların kromatografik olarak ayrılmasında; türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerlerin birbirlerine olan oranları, moleküllerin internal standartlarının kromatogramlarında bu piklerin görülmemesi ve gönüllülerden alınan örneklerde ölçülen 1,25$(OH)_2D_3$ düzeylerinin referans aralık içerisinde olması yol gösterici oldu.

Yöntem geliştirme safhasında, tek analitik kolon (PFP veya C18) kullanımında türevlendirme sonrası 25(OH)D3 ve 3-epi-25$(OH)D_3$'ün kromatografik olarak ayrımı yapılamadı. 1,25$(OH)_2D_3$ ölçümünde ise, interferanslar nedeniyle türevlendirme sonrası oluşan R ve S izomerlerin oranları değişti. Ayrıca plazmada 1,25$(OH)_2D_3$ ölçümünde elde edilen sonuçların referans aralığın üst limitinin 2-3 katı olduğu görüldü. Bu nedenle, tespit edilen pikler içerisinde, aradığımız maddeden ayrıştırılamayan ve interferansa neden olan maddeler olduğunu düşünüp iki kolonu birlikte kullanarak interferansların ayrımını sağladık. 25$(OH)D_3$, 25$(OH)D_2$ ve 3-epi-25$(OH)D_3$ ölçümünde ise plazmadan kaynaklı interferans gözlenmedi. Türevlendirme sonrası 25$(OH)D_3$ ve 3-epi-25$(OH)D_3$ ayrımı iki kolonun birlikte kullanılmasıyla mümkün oldu.



Şekil 24. Plazma içerisinde 24R,25(OH)$_2$D$_3$ kromatogramı

*1 numaralı pik (siyah); 24R,25(OH)$_2$D$_3$'ün internal standardı. 2 numaralı pik (pembe); 24R,25(OH)$_2$D$_3$. 3 numaralı pik (pembe); 24R,25(OH)$_2$D$_3$ ölçümünde interferansa sebep olan izomerik ve/veya izobarik molekül (2 ve 3 numaralı pikler için çözünürlük katsayısı **(Rs): 0,7**).*



Şekil 25. Plazma içerisinde 1,25(OH)$_2$D$_3$ kromatogramı

*1 ve 6 numaralı pikler (pembe); 1,25(OH)$_2$D$_3$ ölçümünde interferansa sebep olan izomerik ve/veya izobarik moleküller (1 ve 3 numaralı pikler için çözünürlük katsayısı **(Rs): 0,7**). 2 ve 4 numaralı pikler (siyah); 1,25(OH)$_2$D$_3$ internal standardı. 3 ve 5 numaralı pikler (pembe); 1,25(OH)$_2$D$_3$'ün R ve S izomerleri.*

4.1.3 Matriks etkisinin değerlendirilmesi

Matriks etkisi, ekstraksiyon sonrası kalan matriksin maddelerin iyonlaşmasına etkisi, ekstraksiyon geri kazanımı ve süreç verimliliği olmak üzere 3 grupta değerlendirildi;

Matriksin iyonlaşmaya etkisi: Tüm analitler ve internal standartları için farklı konsantrasyonlarda yapılan analizlerde ekstraksiyon sonrası kalan matriksin ortalama %14,6 oranında iyonlaşmayı baskıladığı (ion suppresion) görülmüştür.

Ekstraksiyon verimliliği: Tüm moleküller için farklı konsantrasyonlarda yapılan analizlerde ekstraksiyon geri kazanım miktarı ortalaması %69,7 olarak hesaplanmıştır.

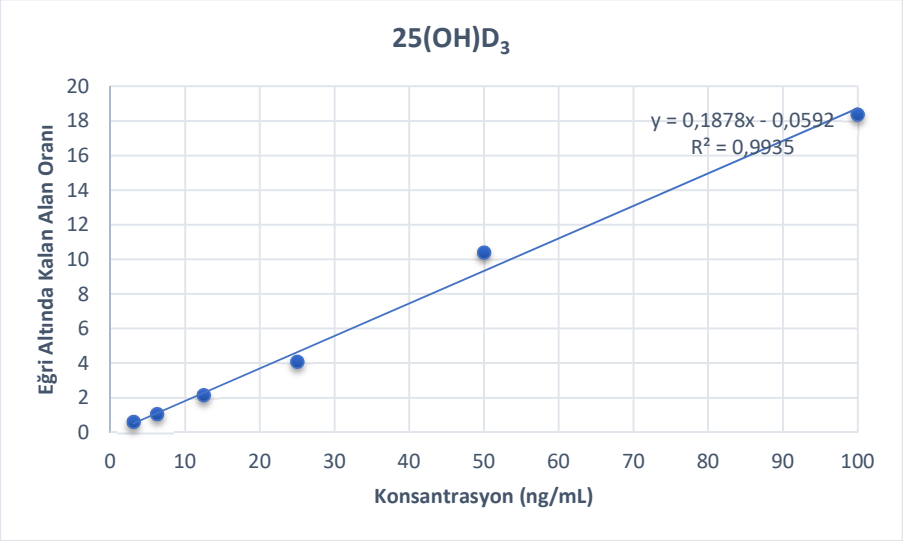
İşlem verimliliği: Matriksin iyonlaşmaya etkisi ve ekstraksiyon geri kazanımı birlikte değerlendirildiğinde tüm moleküller için işlem verimliliği ortalaması %59,5 olarak hesaplanmıştır.

4.1.4 Carryover

Madde konsantrasyonları en yüksek olan kalibratör analizinden sonra yapılan D vitamini metabolitlerini içermeyen örnek (blank) analizinde, tüm analitler için belirlenen rt'ler de pik görülmedi. CLSI C62-A rehberinde belirtilen, blank analizinde sonuçların maddelerin ölçüm aralığının alt limitini geçmemesi koşulu yerine getirildi.

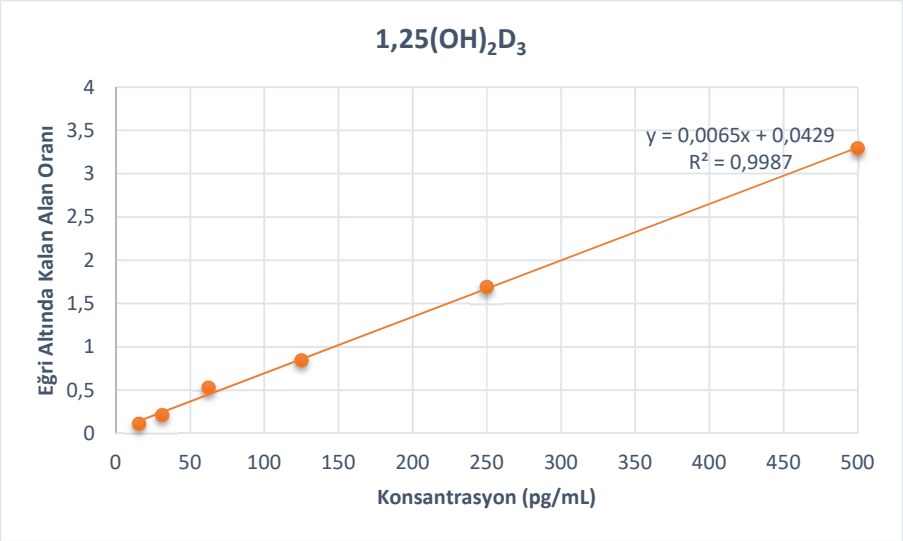
4.1.5 Kalibrasyon Eğrilerinin Oluşturulması

Maddelerin belirlediğimiz konsantrasyonlarında, kromatogramda eğri altında kalan alanının, kendi internal standardının eğri altında kalan alanına oranı (area ratio) kullanılarak elde edilen kalibrasyon eğrileri ve denklemleri Şekil 23 (a-e)'de gösterildi.

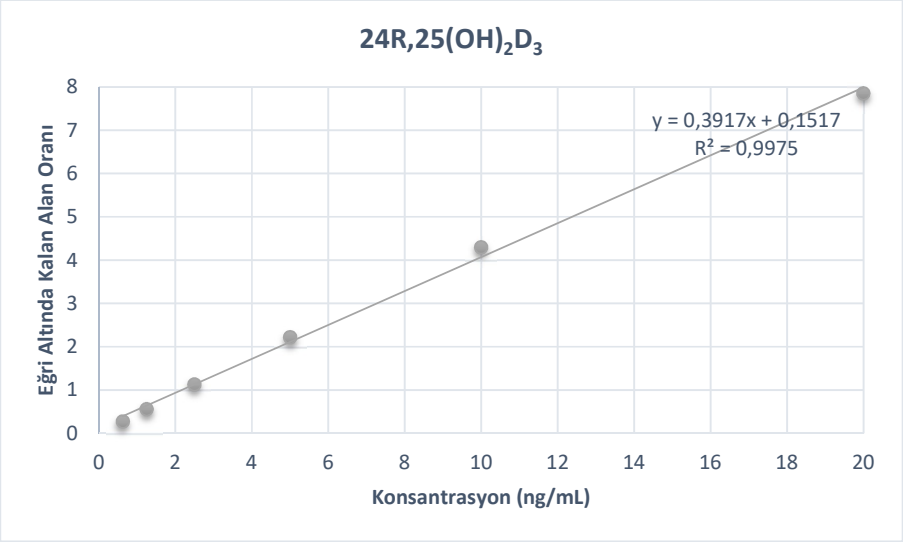


Şekil 26 (a-e) Kalibrasyon eğrileri ve denklemleri

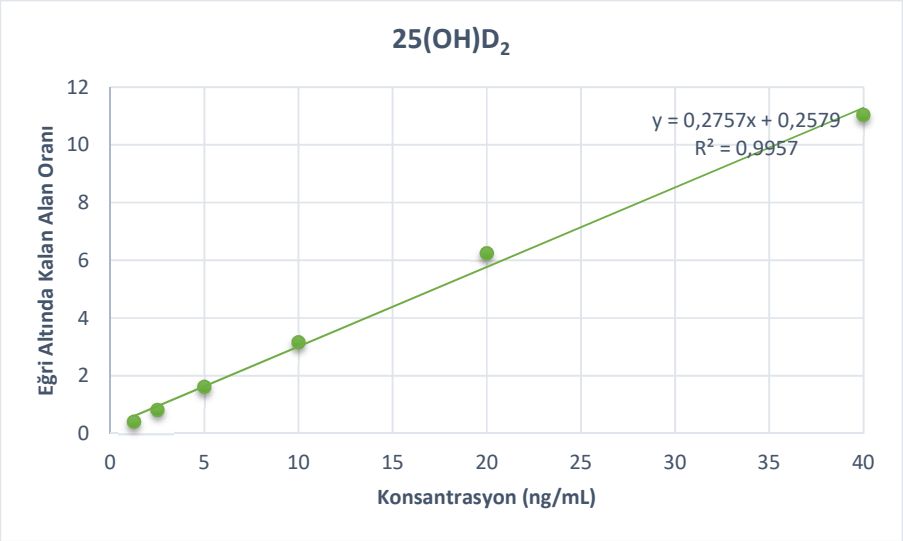
a) 25(OH)D_3 kalibrasyon eğrisi ve denklemi



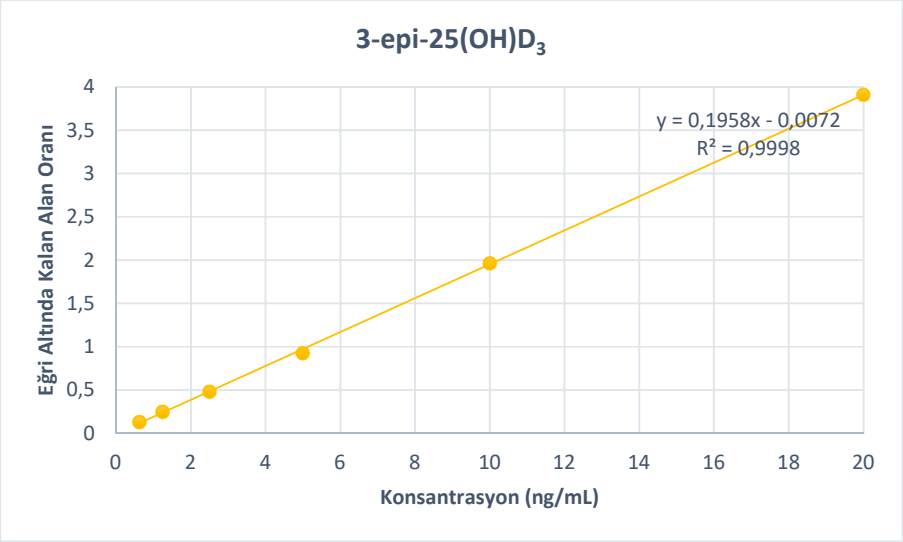
b) 1,25(OH)$_2$D$_3$ kalibrasyon eğrisi ve denklemi



c) 24R,25(OH)$_2$D$_3$ kalibrasyon eğrisi ve denklemi



d) 25(OH)D_2 kalibrasyon eğrisi ve denklemi



e) 3-epi-25(OH)D_3 kalibrasyon eğrisi ve denklemi

4.2 Yöntem Validasyonu

Yöntem validasyonu, CLSI C62-A (Clinical & Laboratory Standards Institute: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods, Approved Guideline, 1st Edition) rehberine göre yapıldı [23].

4.2.1 Ölçüm aralığının alt ve üst limitini belirleme

CLSI C62-A rehberinde belirtilen ölçüm aralığının alt ve üst limiti için istenen performans kriterleri; sinyal gürültü oranının en az 10 (S/N ratio>10:1) ve kesinlik (CV) değerinin %20'nin altında olmasıdır. Limitleri belirlemek için seçtiğimiz 2 düşük ve 2 yüksek düzey örneklerden elde edilen %CV değerleri Tablo 6'da gösterildi. Bu koşulları sağlayan konsantrasyonları ve kesinlik değerleri tabloda gösterilen 1. düzeydeki madde konsantrasyonları, ölçüm aralığının alt limiti olarak; 4. düzeydeki madde konsantrasyonları ise ölçüm aralığının üst limiti olarak belirlendi.

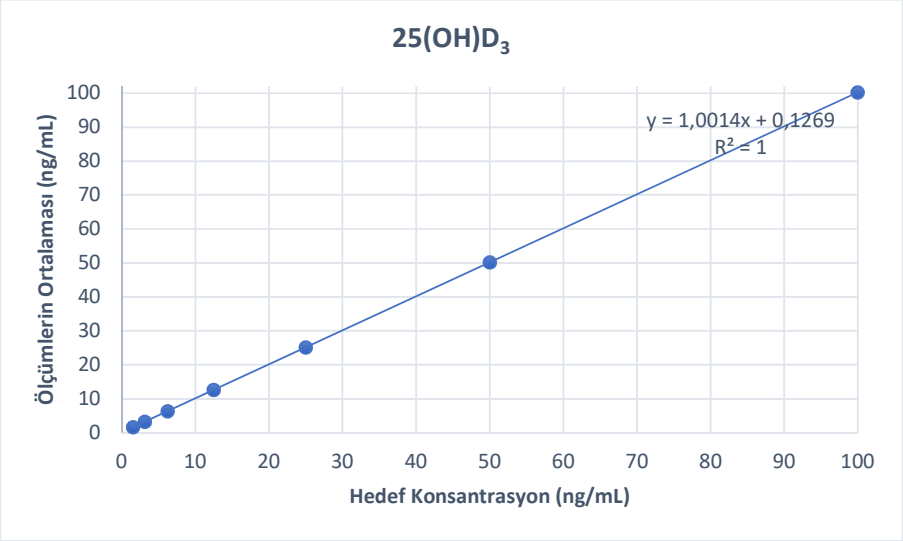
Tablo 6. Ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri

Düzey ve %CV	**25(OH) D_3** (ng/mL)	**1,25$(OH)_2$ D_3** (pg/mL)	**24R,25$(OH)_2$ D_3** (ng/mL)	**25(OH) D_2** (ng/mL)	**3-epi-25(OH) D_3** (ng/mL)
1. Düzey	**3,1**	**15,6**	**0,6**	**1,3**	**0,6**
%CV	4,8	7,2	3,9	3,7	2,5
2. Düzey	6,3	31,3	1,3	2,5	1,3
%CV	7,4	12,4	4,9	5,8	9,2
3. Düzey	50,0	250,0	10,0	20,0	10,0
%CV	7,7	4,0	3,6	4,0	6,6
4. Düzey	**100,0**	**500,0**	**20,0**	**40,0**	**20,0**
%CV	9,6	6,3	3,9	3,6	11,8

Maddelerin kantitasyonu yapılabilecek en düşük konsantrasyonlarını (LOQ) belirlemek için, 1. düzeydeki madde konsantrasyonlarına göre daha düşük konsantrasyonlarda örnekler hazırlandı. LOQ, $1,25(OH)_2D_3$ için 7,8 pg/mL (S/N ratio 12, %CV <10) ve diğer analitler için ise 0,1 ng/mL (S/N ratio >100, %CV <10) olarak belirlendi. Bu konsantrasyonun altında kalan değerler $1,25(OH)_2D_3$ için <7,8 pg/mL ve diğer metabolitler için <0,1 ng/mL olarak sonuçlandırıldı.

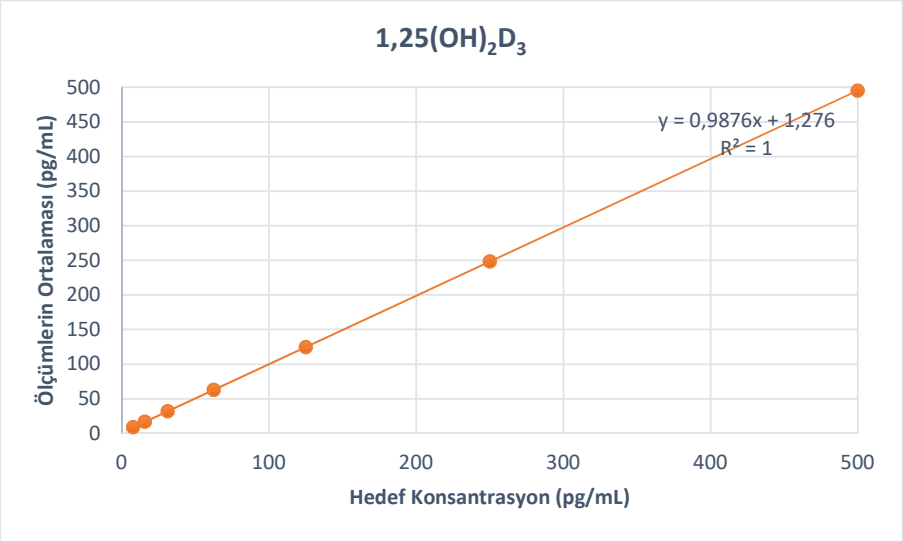
4.2.2 Doğrusallık

Doğrusallık çalışması polinomial regresyon metoduyla değerlendirdiğinde Şekil 23 (a-e)'de gösterilen doğrusal denklemler elde edildi. Her analit için yapılan değerlendirmede, %95 güven aralığı ve %5 anlamlılık düzeyinde, istatistiksel olarak doğru denkleminden daha iyi uyan bir 2. veya 3. polinomial denklem olmadığı için yöntemin tüm analitler için belirtilen konsantrasyon aralığında doğrusal olduğuna karar verildi.

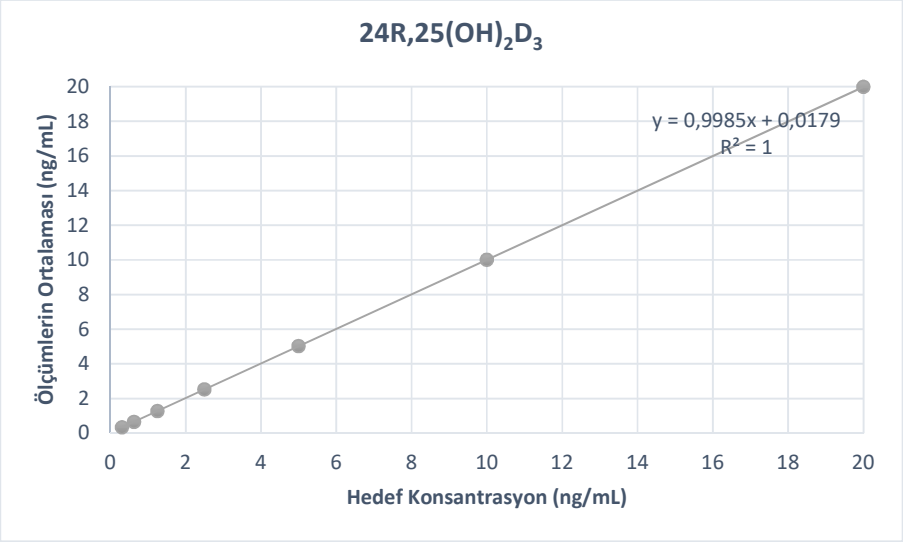


Şekil 27. Ölçüm yöntemlerinin doğrusallık grafikleri

a) $25(OH)D_3$ ölçüm yönteminin doğrusallık grafiği.



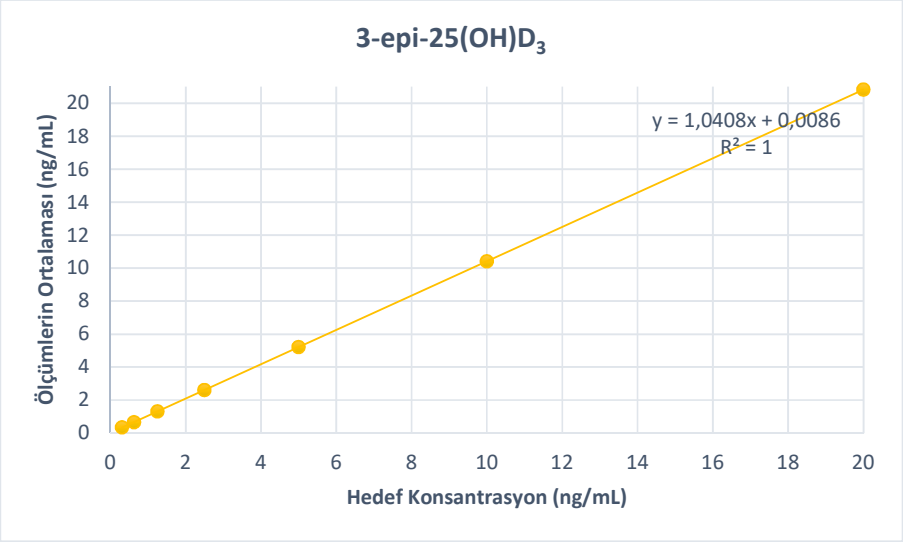
b) 1,25(OH)$_2$D$_3$ ölçüm yönteminin doğrusallık grafiği.



c) 24R,25(OH)$_2$D$_3$ ölçüm yönteminin doğrusallık grafiği.



d) 25(OH)D_2 ölçüm yönteminin doğrusallık grafiği.



e) 3-epi-25(OH)D_3 ölçüm yönteminin doğrusallık grafiği.

4.2.3 Kesinlik

Kesinlik çalışmasında kullanılan 2 düzeydeki örneklerin konsantrasyonları Tablo 7'de gösterildi. Bu konsantrasyonlarda D vitamini metabolitlerini içeren örneklerin 20 gün süren analizleriyle elde edilen çalışma içi, çalışmalar arası, gün içi, günler arası ve toplam %CV değerleri Tablo 8'de gösterildi.

Tablo 7. Kesinlik çalışmasında kullanılan örneklerdeki D vitamini metabolitlerinin konsantrasyonları

Düzey	$25(OH)D_3$ (ng/mL)	$1,25(OH)_2D_3$ (pg/mL)	$24R,25(OH)_2D_3$ (ng/mL)	$25(OH)D_2$ (ng/mL)	3-epi-$25(OH)D_3$ (ng/mL)
1.Düzey	12,5	62,5	2,5	5,0	2,5
2.Düzey	50	250,0	10,0	20,0	10,0

Tablo 8. Kesinlik çalışmasında hesaplanan çalışma içi, çalışmalar arası, gün içi ve toplam %CV değerleri

%CV Sınıflaması	Düzey	$25(OH)D_3$	$1,25(OH)_2D_3$	$24R,25(OH)_2D_3$	$25(OH)D_2$	3-epi-$25(OH)D_3$
Çalışma içi %CV	1	3,8	4,6	0,8	0,8	2,5
	2	2,4	2,3	1,1	1,0	2,3
Çalışmalar arası %CV	1	7,4	7,9	6,6	2,7	5,6
	2	4,5	2,1	4,0	3,4	5,1
Gün içi %CV	1	8,3	9,1	6,6	2,8	6,1
	2	5,1	3,1	4,1	3,5	6,4
Günler arası %CV	1	4,1	9,1	3,8	5,1	7,4
	2	3,2	3,7	4,1	3,5	7,7
Toplam %CV	1	9,3	9,1	7,6	5,8	7,4
	2	6,0	4,8	4,1	3,5	7,7

4.2.4 Doğruluk

Çalışmamızda doğruluk değerlendirmesi için, SRM 972a kodlu D vitamini metabolitlerini farklı düzeylerde içeren, sonuçları NIST tarafından onaylanmış örneklerin analizi (Tablo 9) ve geri kazanım çalışması yapıldı (Tablo 10). SRM örneklerinde $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$'ün %bias değerleri 2 düzey için hesaplandı. $1,25(OH)_2D_3$ için üreticinin onayladığı bir değer olmadığı için $1,25(OH)_2D_3$'ün doğruluğu yalnızca geri kazanım çalışmasıyla değerlendirildi (Tablo 10).

Tablo 9. CRM örneklerinden elde edilen %bias değerleri

Analit	**Hedef (ng/mL)**	**Sonuç (ng/mL)**	**%bias**
$25(OH)D_3$	18,1	18,2	**0,3**
	29,4	29,8	**1,3**
$24R,25(OH)_2D_3$	1,6	1,6	**-3,8**
	2,6	2,6	**-3,0**
$25(OH)D_2$	0,8	0,7	**-8,0**
	13,3	13,8	**4,0**
3-epi-$25(OH)D_3$	1,8	1,7	**-8,0**
	26,0	25,2	**-3,1**

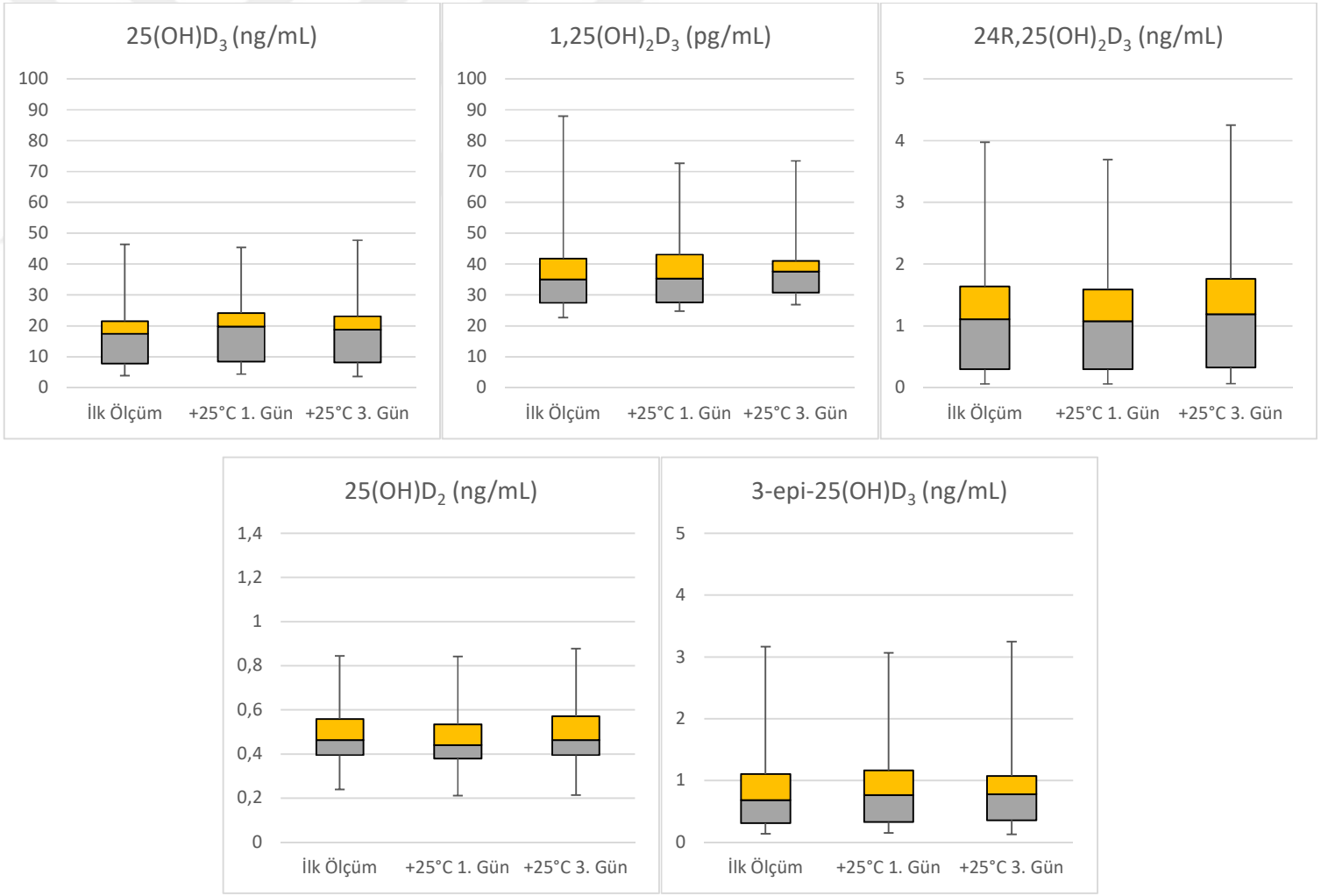
Tablo 10. % Geri kazanım (recovery) sonuçları

Analit	Konsantrasyon	% Geri Kazanım
$25(OH)D_3$ (ng/mL)	3,1	**98,3**
	12,5	**97,0**
	25,0	**106,3**
$1,25(OH)_2D_3$ (pg/mL)	15,6	**102,2**
	31,3	**97,4**
	62,5	**87,6**
$24R,25(OH)_2D_3$ (ng/mL)	0,6	**98,9**
	2,5	**101,8**
	5,0	**95,0**
$25(OH)D_2$ (ng/mL)	0,6	**97,9**
	2,5	**103,7**
	10,0	**102,5**
3-epi-$25(OH)D_3$ (ng/mL)	0,6	**109,6**
	2,5	**103,4**
	5,0	**108,4**

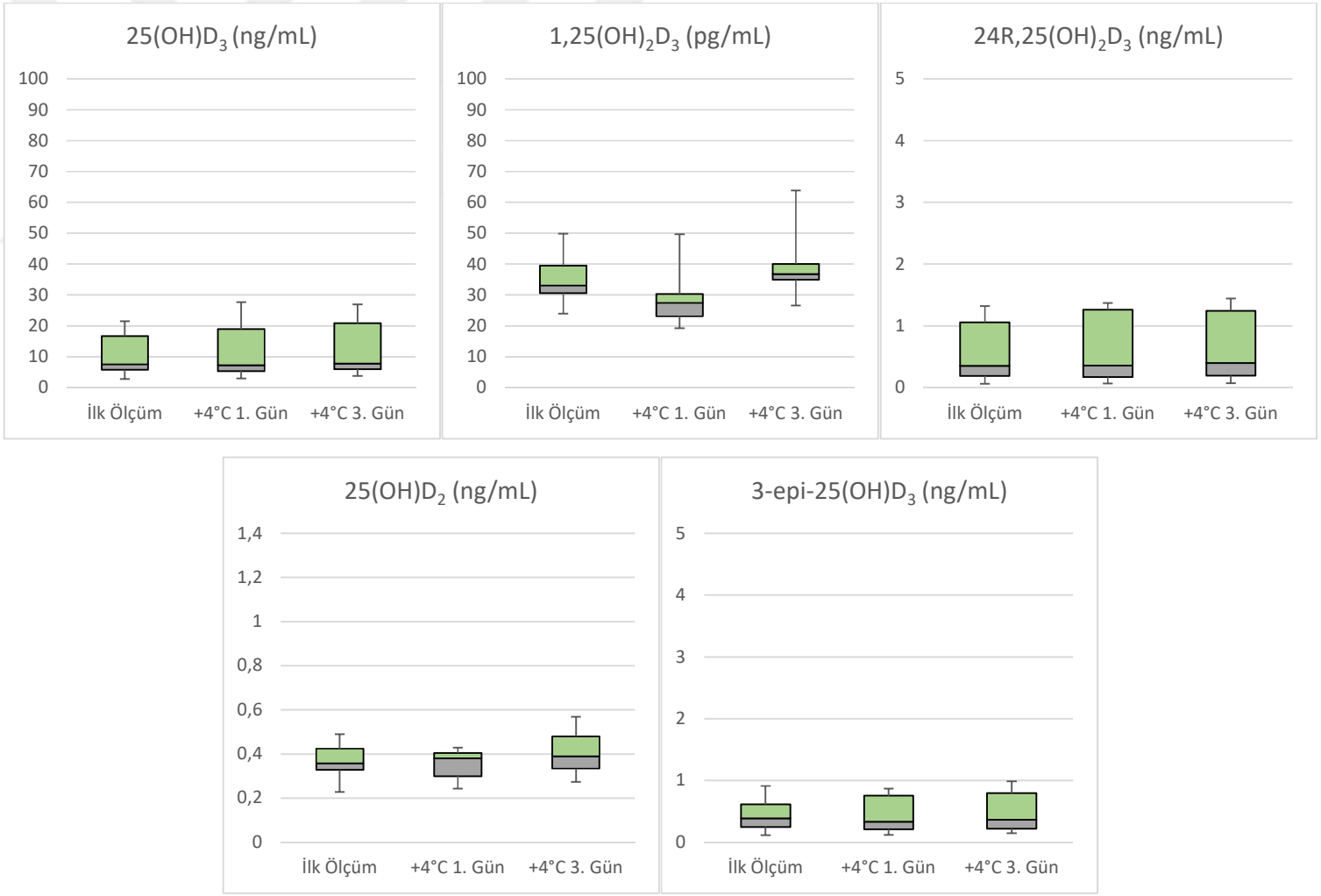
4.3 Saklama Koşulları

D vitamini metabolitlerinin farklı saklama koşullarından ne kadar etkilendiklerini belirlemek için yaptığımız çalışmada; örneklerin ilk gün ve farklı sıcaklıklarda, sürelerde ve şekillerde (plazma veya ekstraksiyon sonrası türevlendirilmiş olarak) bekletilerek, D vitamini metabolitlerinin konsantrasyonları ölçüldü (Şekil 26-29).

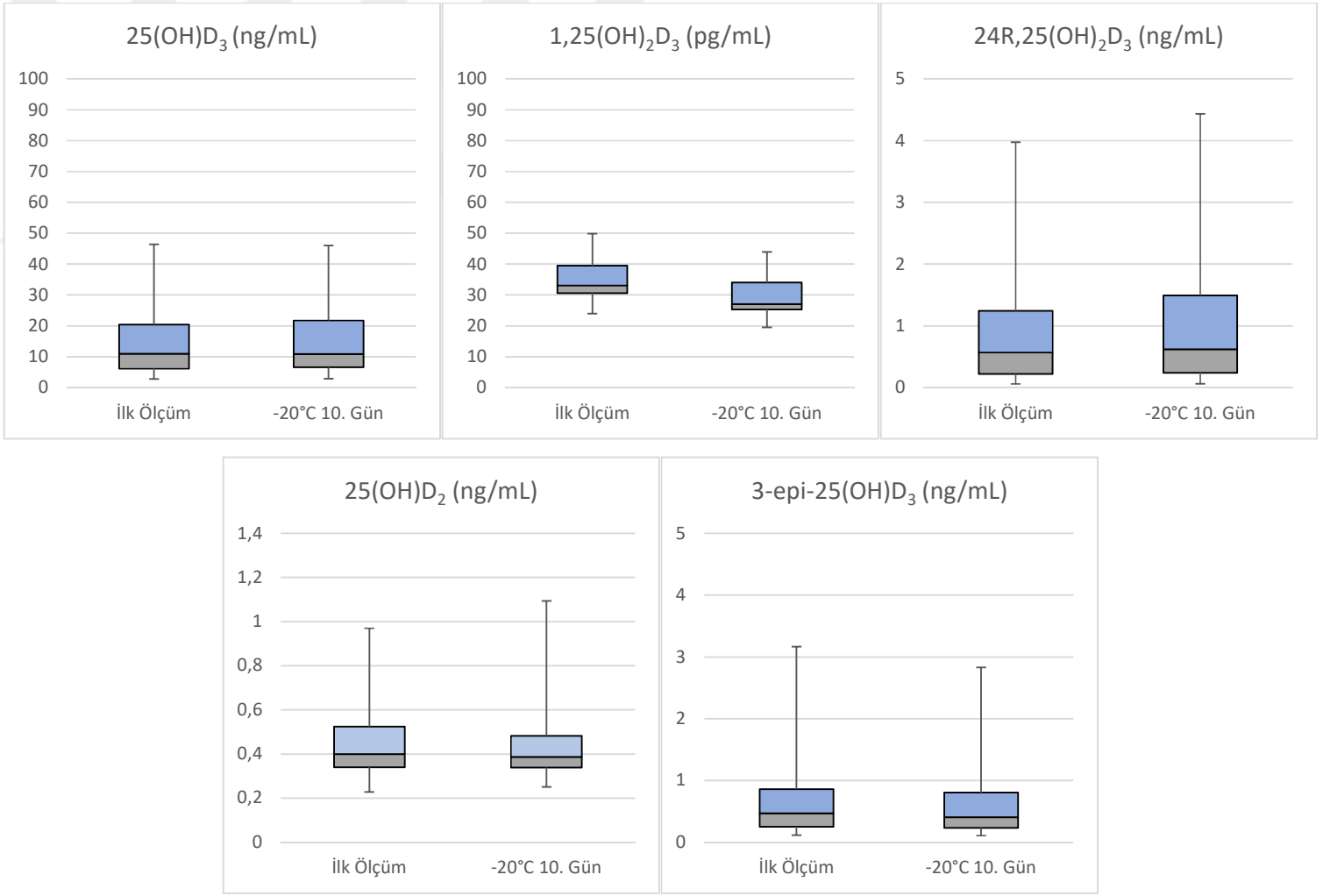
Yapılan ölçümler örneğin alındığı gün yapılan analizde elde edilen sonuçlarla kıyaslanarak, analit ve örnek bazında % değişim değerleri (%DD) ve farklı gruplarda elde edilen %değişim değerlerinin ortancası (%DDO) hesaplandı. Gönüllülerin ilk gün ölçümlerindeki D vitamini metabolitleri konsantrasyonlarındaki %CV değerleri ile hesaplanan %ACL'ye göre %DDO'ları değerlendirildiğinde; D vitamini metabolitlerinin, test edilen koşullardan etkilenmediği görüldü. Ancak örneklerden elde edilen %DD'ler tek tek incelendiğinde ise grupların içerisinde ACL limitinin altına inen veya üzerine çıkan örnekler olduğu saptandı (Tablo 11).



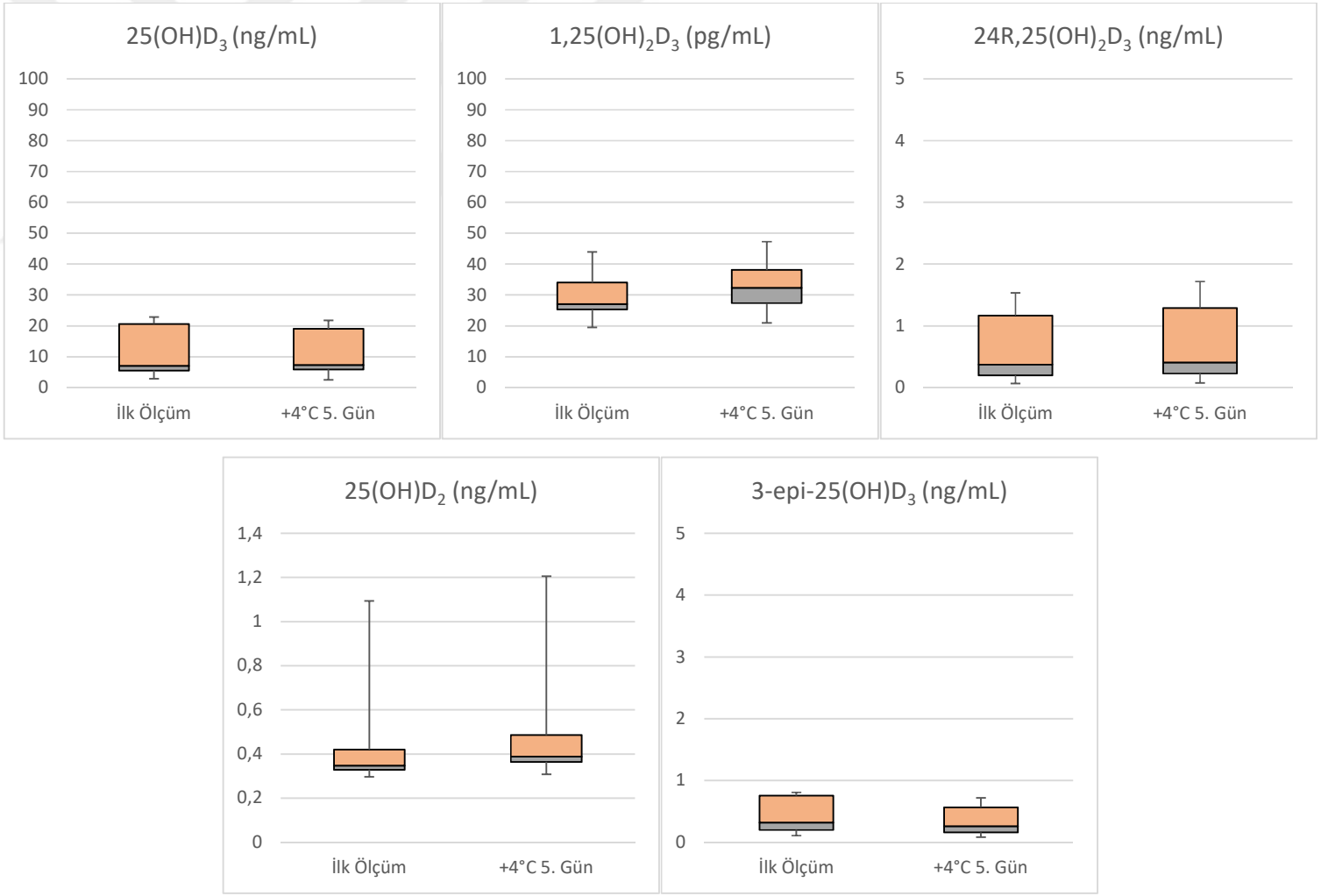
Şekil 28. Birinci grup; örnekler (n=10) +25°C'de plazma olarak bekletilip 1. ve 3. günlerde analizi yapıldı.



Şekil 29. İkinci grup; örnekler (n=10) +4°C'de plazma olarak bekletilip 1. ve 3. günlerde analizi yapıldı.



Şekil 30. Üçüncü grup; örnekler (n=20) -20°C'de plazma olarak bekletilip 10. günde, analizi yapıldı.



Şekil 31. Dördüncü grup; örnekler (n=10) +4°C'de türevlendirilmiş olarak bekletilip 1. ve 3. günlerde analizi yapıldı.

Tablo 11. Saklama koşulları

Analit	**%CV**	**%ACL**	**%Değişim Değerlendirme Kriteri**	+25°C 1.gün plazma (n=10)	+25°C 3.gün plazma (n=10)	+4°C 1.gün plazma (n=10)	+4 °C 3.gün plazma (n=10)	-20°C 10.gün plazma (n=20)	+4°C 5.gün türevlendirilerek (n=10)
25(OH)D_3	9,3	**25,8**	*%DDO*	11,8	2,8	-0,9	8,1	4,1	-0,4
			-ACL/ACL+	0/0	0/**1**	0/**1**	0/**2**	0/**1**	0/0
1,25(OH)$_2$$D_3$	9,1	**25,2**	*%DDO*	4,4	6,1	-19,1	12,7	-15,6	9,4
			-ACL/ACL+	0/**1**	0/**2**	**3**/0	0/**2**	**1**/0	0/**2**
24R,25(OH)$_2$$D_3$	7,6	**21,1**	*%DDO*	-1,2	5,7	5,0	12,5	5,9	11,0
			-ACL/ACL+	0/0	0/0	0/**1**	0/**1**	0/**1**	0/0
25(OH)D_2	5,8	**16,1**	*%DDO*	-4,2	-0,1	-1,9	11,3	-1,4	11,8
			-ACL/ACL+	0/0	0/**1**	**1**/**1**	0/**2**	0/**1**	0/**1**
3-epi-25(OH)D_3	7,4	**20,5**	*%DDO*	9,1	0,5	-6,1	-3,4	-5,4	-18,6
			-ACL/ACL+	0/0	0/0	**2**/**1**	0/**3**	**1**/**1**	**4**/0

%CV, analit konsantrasyonlarındaki kesinlik değeri; %ACL, acceptable change limit; %DDO, % Değişim değerleri ortancası;

-ACL/ACL+, grupların içerisinde sırasıyla ACL limitinin altına inen ve üzerine çıkan örnek sayısı.

5. TARTIŞMA ve SONUÇLAR

Klinik laboratuvarlarda kullanılacak bir testin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılabilmesi, ancak o testin dünyada kabul görmesi ve klinik faydasının tam olarak anlaşılması ile mümkün olmaktadır. Halihazırda ticari olarak sunulan ve rutin olarak kullanılan bir ölçüm yöntemi olmayan metabolitler için LC/MSMS cihazı ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek metotlar geliştirilip bu metabolitlerin çeşitli klinik durumlardaki değişimleri izlenebilir [12], [15], [18], [28]. Laboratuvarda hızla geliştirilip kullanılabilmesine rağmen bu yöntemler ile her laboratuvarın kendi yöntemini farklı şekilde oluşturması, kullanılan kimyasal ve kalibratörlerin çeşitliliği, her laboratuvarın yerine getirmesi gereken ulusal yasal düzenlemelerin farklılık göstermesi gibi nedenlerle standardizasyon zorlaşmaktadır [23]. Dikkatli bir şekilde geliştirilen ve validasyonu yapılan yöntemler ile kesin ve doğru sonuçlar elde edilebilmektedir.

Yöntem geliştirme

D vitamini metabolitlerinin birlikte ölçüldüğü (türevlendirme yapılan veya yapılmayan) LC/MSMS metotları literatürde bulunmaktadır [11]–[13], [15], [18], [20], [28], [32]. LC/MSMS'de metot geliştirmek için öncelikle mevcut LC/MSMS cihazının istenilen analizi gerçekleştirme kapasitesi değerlendirilmelidir. Kullanılan cihazların duyarlılıklarının, yöntemlerdeki ekstraksiyon geri kazanımlarının ve türevlendirme için kullanılan maddelerin farklı olması nedeniyle özellikle $1,25(OH)_2D_3$ gibi plazma konsantrasyonu düşük olan metabolitlerin ölçümünde farklı LOQ değerleri (1-20 pg/mL) bildirilmektedir [15], [29], [33]. Geliştirdiğimiz metotta ise $1,25(OH)_2D_3$ için alt ölçüm limiti 15,6 pg/mL, LOQ ise 7,8 pg/mL olarak belirlenmiştir. Diğer metabolitler için ise LOQ 0,1 ng/mL olarak saptanmış daha düşük konsantrasyonların test edilmesine gerek görülmemiştir. Literatürdeki yöntemler incelendiğinde; HPLC koşullarının farklı olması, özellikle kullanılan kolonların çeşitliliği nedeniyle yine yöntem performansları (analiz süresi, interferansların etkisi gibi) değişmektedir. Analiz süresi, kolon uzunluğu ve mobil faz gradienti ile doğrudan ilişkili olduğu için literatürde D vitamini metabolitlerinin ölçümünde çok farklı analiz

süreleri (3-40 dakika) görülmektedir. Geliştirdiğimiz yöntemde ise PFP ve C18 kolonu birlikte kullandığımız için analiz süresi 60 dakika sürmüştür.

Türevlendirme

Türevlendirme işlemi, $1,25(OH)_2D_3$ ölçümü için günümüzde mevcut LC/MSMS cihazlarının birçoğu için gereklidir. Ancak $1,25(OH)_2D_3$ diğer metabolitlerle ($25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$) birlikte ölçülmek istenildiğinde, türevlendirme sonrası metabolitlerin kromatografide alıkononma zamanları değişir ve birbirinden her zaman ayrılamayabilirler. Burild A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PTAD ile türevlendirme işleminden sonra PFP ve C18 kolonu ayrı ayrı deneyerek $25(OH)D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ ayrımını yapamadıklarını bildirmişlerdir [34]. Böyle bir durumda türevlendirme yapılmadan PFP kolon kullanılarak ayrılabilen $25(OH)D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$ ile aynı anda ölçülmek istenildiğinde, türevlendirme yapılan ve yapılmayan olmak üzere iki ayrı örnek hazırlığı ve metot gerekir. Satoh M. ve arkadaşları ise farklı bir türevlendirme maddesi olan 4-(4′-dimethylaminophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (DAPTAD), ile türevlendirme yaparak C18 kolonla $25(OH)D_3$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ ayrımını sağlamışlar ancak geliştirdikleri metotla $1,25(OH)_2$ D_3 ölçümünü yapmamışlardır [35]. Çalışmamızda bu iki çalışmadan farklı olarak; tek örnek hazırlığıyla türevlendirme yapılıp, PFP ve C18 kolonları birlikte kullanarak 5 metabolitin tek metotla ölçülebileceğini gösterdik.

Türevlendirme sonrası 3-epi-$25(OH)$ D_3 ayrımını yapmakla türevlendirme yapılmadan ulaşılması zor olan LOQ değerlerine (0,1 ng/mL) eriştik. Özellikle erişkinlerde konsantrasyonun çok düşük olduğu durumlarda dahi 3-epi-$25(OH)$ D_3 ölçümünü bu sayede gerçekleştirdik. Ayrıca kromatografik ayrımın iki kolonla güçlü bir şekilde uygulanmasıyla; $24R,25(OH)_2$ D_3 ve $1,25(OH)_2$ D_3 ölçümünde interferansa neden olan izomerik ve/veya izobarik moleküllerin ayrımının yapılmasını da sağladık. Buna karşın iki kolonun birlikte kullanımıyla analiz süresinin uzaması ve kolon maliyetlerinin artması kaçınılmaz oldu.

Higashi T. ve arkadaşları tarafından LC/MSMS'de gerçekleştirilen D vitamini metabolitlerinin ölçümünde, türevlendirmede kullanılan PTAD daha sonra geliştirilen başka metotlarda da sıklıkla analiz hassasiyetini artırmak için kullanılmıştır [28]. Cookson tipi reaktifler olarak adlandırılan bir grup madde için örnek teşkil eden PTAD dışında günümüzde farklı Cookson tipi reaktifler ile D vitamini metabolitleri türevlendirilip ölçülmektedir [36]. Ogawa S. ve arkadaşları PTAD ve DAPTAD'a ek olarak 4-[4-(6-Methoxy-2-benzoxazolyl)phenyl]-1,2,4-triazoline-3,5-dione (MBOTAD) ve 4-(4-nitrophenyl)-1,2,4-triazoline-3,5-dione (NPTAD) maddeleri ile 25(OH)D_3'ü türevlendirmişler ve türevlendirmeden yapılan ölçümlere göre cihaz duyarlılığını ne kadar artırdıklarını test etmişlerdir [36]. Elde ettikleri sonuçlar PTAD, DAPTAD, MBOTAD ve NPTAD ile sırasıyla 15, 30, 15 ve 10 kat 25(OH)D_3 duyarlılıklarının arttığını göstermektedir.

Ding S. ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada PTAD ile türevlendirmeyle beraber mobil faz içerisine eklenen metilaminin D vitamini metabolitlerinin oluşturduğu sinyal seviyesini 2-5 kat artırdıklarını göstermişlerdir [29]. Çalışmamızda PTAD ile türevlendirmeye ek olarak metilamin de kullanılarak LC/MSMS duyarlılığı artırılmıştır.

Türevlendirme yapmadan ölçtüğümüz 25(OH)D_3 analizine göre yaklaşık 80 kat sinyal artışı sağlanmıştır. Literatürde PTAD ve metilaminin etkisi sırasıyla 15 ve 2-5 kat olduğu düşünüldüğünde iki maddenin birlikte kullanımında sinyal seviyesinde 80 kat iyileşme beklenen düzeydedir.

Cookson tipi reaktifler dışında türevlendirme için yeni geliştirilen maddeler de bulunmaktadır. Curtis J.H. ve arkadaşları test ettikleri Amplifex diene (AB Sciex, Redwood City/CA/ABD) türevlendirme maddesini PTAD sonuçları ile kıyaslamışlar ve yöntem duyarlılığının 10 kat daha iyi olduğunu bildirmişleridir [37].

Görüldüğü üzere çeşitli türevlendirme maddeleri ile yapılan örnek hazırlığında cihaz hassasiyeti farklı derecelerde artırılmaktadır. Türevlendirme maddelerinin test başına düşen maliyetleri ve mevcut LC/MSMS cihazının hassasiyeti göz önünde bulundurularak bir seçim yapılmalıdır. 2017 Aralık ayında bakılan ürün kataloğunda, Amplifex diene maddesinin 50 test için maliyeti 313,5€ iken, PTAD için 5000 test maliyeti ise yalnızca 19,2 €'dur. Çalışmamızda yöntem geliştirme, validasyon ve saklama koşulları için yaklaşık bin örneğin analiz edildiği düşünüldüğünde; projemizde Amplifex diene kullanmış olsaydık sadece türevlendirme için 6.270 € bütçe ayırmamız gerekecekti. Proje için kullanabildiğimiz bütçenin 25.000₺ olduğu göz önünde bulundurulduğunda bu maliyetleri karşılamak mümkün olmadığı için türevlendirme için daha ekonomik olan PTAD'ı tercih ettik.

Örnek hazırlığı

Örnek hazırlığında uyguladığımız likit/likit ekstraksiyon (LLE) basit, farklı metotlar için esnek ve ekonomik olması nedeniyle günümüzde klinik laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır [26]. Ancak otomatikleştirilmesinin zorluğu nedeniyle yerini giderek solid faz ekstraksiyon yöntemleri (solid phase extraction, SPE) almaktadır. SPE, interferansları ve matriks etkisini azaltmak için daha etkili olsa da maliyetinin daha yüksek olması dezavantajdır. D vitamini metabolitlerinin ölçümü için yapılan örnek hazırlığında LLE veya SPE yapılabilir. Ding S. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada LLE ve SPE ile $1,25(OH)_2D_3$ için elde edilen ekstraksiyon geri kazanımını benzer bulunmuşlardır (%71-86) [29]. Çalışmamızda ise yaptığımız LLE ile tüm D vitamini metabolitleri için ortalama ekstraksiyon geri kazanımı %69,7 olarak hesaplanmıştır.

LC/MSMS ile $1,25(OH)_2$ D_3 ölçümü için örnek hazırlığı aşamasında immünokimyasal bir saflaştırma yapılarak potansiyel interfaransların etkisinden kurtulunabilir. Biz ise çalışmamızda iki kolonun birlikte kullanımıyla interferansları uzaklaştırmayı tercih ettik.

Validasyon

Kesinlik

CLSI C62-A rehberi, LC/MSMS ile ölçümü gerçekleştirilebilecek tüm maddeler için klinik karar verdirici düzeylerde, %CV değerinin %15'in altında olması kriterinin sağlanmasını önermektedir. D vitamini metabolitleri arasında yalnızca 25(OH)D için klinik laboratuvarlara önerilen %10'luk bir %CV limiti bulunmaktadır [38]. Kesinlik çalışmasında, çalışma içi, çalışmalar arası, gün içi, günler arası ve toplam kesinlik olarak değerlendirildiğinde; ölçümünü gerçekleştirdiğimiz her metabolitin %CV değerleri %10'un altında kalmıştır.

Doğruluk

Doğruluk değerlendirmeleri, içeriğindeki analit konsantrasyonu sertifikalandırılmış materyallerin (certified reference material, CRM) analizi, geri kazanım (recovery) ve metot karşılaştırma çalışmaları ile yapılabilir. Tek yöntem yerine bu 3 yaklaşımdan birkaçının birlikte yapılması C62-A rehberi tarafından önerilmiştir [23]. CRM analizinde elde ettiğimiz sonuçlarda, $25(OH)D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$'ün %bias değerleri tüm düzeylerde %8'i geçmemiştir. 25(OH)D ölçümünde klinik laboratuvarlar için önerilen %bias değeri ≤%5 olarak belirlenmiştir [38]. Oluşturduğumuz yöntemde 25(OH)D sonucu yerine; 25(OH)D sonucuna katkıda bulunan $25(OH)D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ ayrı ayrı ölçülüp sonuçlandırıldığı için bu kritere göre sonuçları değerlendirmek yeterli olmayacaktır. Ancak dolaşımdaki majör D vitamini metaboliti olan ve 25(OH)D sonucuna en fazla katkıda bulunan $25(OH)D_3$'ün CRM analizinde, düşük ve yüksek düzeylerdeki %bias sonuçlarının sırasıyla %0,3 ve %1,4 olması yöntem ile yeterli doğruluk performansının elde edildiğini göstermektedir.

Geri kazanım çalışmasıyla doğruluk analizinde ise, yöntemin örneklere eklenen madde konsantrasyonları için oluşturduğu sinyalin hassasiyeti değerlendirilebilir. $25(OH)D_3$ için elde edilen geri kazanım yüzdeleri ile (3,1 ng/mL, 12,5 ng/mL ve 25,0 ng/mL düzeyleri için sırasıyla %98,3, %97,0 ve %106,3), $25(OH)D_3$ için belirlenmiş eksiklik ve yetersizlik kriterleri doğru bir şekilde ayırt edilebilir. $1,25(OH)_2D_3$ düzeyinin değiştiği, referans aralığın (19,2- 67,2 pg/mL) dışında sonuçlar elde edilebilen klinik durumlarda ise elde edilen geri kazanım yüzdeleri ile (15,6 pg/mL, 31,3 pg/mL ve 62,5 pg/mL için sırasıyla %102,2, %97,4 ve %87,6), doğru bir şekilde değerlendirilebilir. $24R,25(OH)_2D_3$, $25(OH)D_2$ ve 3-epi-$25(OH)D_3$ için farklı düzeylerde elde edilen geri kazanım yüzdeleri ile (%95-110), bu metabolitlerin plazmadaki konsantrasyonlarının değişimlerini saptayabilecek kadar yeterli doğruluk performansı elde edilmiştir.

Doğruluk değerlendirmesi için bir başka yaklaşım olan metot karşılaştırma çalışmaları, D vitamini metabolitlerinin bazıları için piyasada mevcut olan immünokimyasal yöntemlerle yapılabilir. Ancak yapılan metot karşılaştırma çalışması, immünokimyasal yöntemlerin LC/MSMS'e göre yeterli duyarlılık ve özgüllüğe sahip olmaması nedeniyle geliştirilen LC/MSMS yöntemini doğrulamadan ziyade immünokimyasal yöntemler ile belirlenmiş referans aralıkların LC/MSMS'de geliştirilen yöntem için uygulanabilirliğini değerlendirmek için yapılır. Bu nedenle doğruluk değerlendirmesi için yöntem karşılaştırma çalışması yapılmamıştır.

Saklama koşulları

Bu metabolitlerin analizi için kullanılacak örneklerin farklı koşullarda saklamanın etkilerini araştırdığımız çalışmada tüm metabolitlerin %DDO'ları, test edilen grupların hiçbirisinde %ACL değerlerini geçmemiştir. Örnekler araştırılan sıcaklık ve süre gibi etkilere dayanıklı bulunmuştur. Sonuçlarda gözlenen pozitif ve negatif değişimler %ACL içerisinde olduğu için bu değişimler, D vitamini metabolitlerinin test edilen koşullardan etkilendiği şeklinde değerlendirilmemelidir. Müller M.J. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada benzer sıcaklıklarda, fakat serum örneklerinde, D vitamini metabolitlerinin ($25(OH)D_2$ hariç) saklama koşullarından nasıl etkilendiğini test etmişlerdir [33]. D vitamini metabolitlerinde, %6,8'den fazla azalma gözlememişler; ancak bu sonuçları %ACL gibi bir limit değer ile kıyaslamamışlardır. Ayrıca tüm koşullarda yalnızca negatif yönlü sonuçlar görülmüştür.

Plazma örneklerinin saklanıp birkaç gün içerisinde analiz edileceği bir durumda en iyi koşulu belirlemek için örnekler ve metabolitler tek tek incelendiğinde ise; 1.grupta (+25°C) ACL'yi geçen örnek sayısı, 2. gruptaki (+4°C) ACL'yi geçen örnek sayısından hem 1. hem de 3. günlerde daha azdır. Bu nedenle kısa süreli örneklerin saklanması gerektiğinde, oda sıcaklığında plazma örneklerini bekletmek daha uygun olacaktır.

Örneklerin daha uzun süreli (10 gün) saklanmasının gerektiği durumlarda, 3.grup (-20°C) örnekleri değerlendirildiğinde ACL değerinin aşıldığı örnek sayısı $25(OH)D_3$, $1,25(OH)_2D_3$, $24R,25(OH)_2D_3$ ve $25(OH)D_2$ için yalnızca 1, 3-epi-$25(OH)D_3$ için ise 2'dir. En fazla değişimin olduğu analit ise -%15,6 ile $1,25(OH)_2D_3$ olmuştur. $1,25(OH)_2D_3$ ölçümünün mümkünse örnek alındıktan sonra ilk 3 gün içerisinde gerçekleştirilmesi daha uygun olacaktır.

Örnekler türevlendirilmiş olarak cihaz üzerinde +4°C'de bekletildiğinde (4.grup) ise 3-epi-$25(OH)D_3$ için %DDO -%18,6 olarak bulunmuş; bu değer ACL limitini geçmemesine rağmen örnekler tek tek incelendiğinde ise 4 örnekte ACL limitlerinin geçildiği görülmüştür. 3-epi-$25(OH)D_3$ türevlendirilerek ölçülecekse bir analizde gerçekleştirilecek toplam örnek sayısı ve analiz süresi hesaplanarak mümkün olan en kısa sürede analiz tamamlanmalıdır.

Pavel A. ve arkadaşları yaptıkları çalışmada PTAD ile türevlendirdikleri örnekleri -80°C, -20°C, +4°C ve oda sıcaklığında bekletmişler -80°C'de bekletilen örneklere göre oda sıcaklığında bekletilen örneklerde D vitamini metabolitlerinde önemli bir azalmanın olmadığını bildirmişlerdir [39]. Ancak bu çalışmada 3-epi-25(OH)D_3 ölçümü yapılmamıştır.

Çalışmamızın eksik kalan ve iyileştirilmesi gereken yönleri;

- Farklı koşullarda ve daha uzun süreli örnek saklama koşullarının etkilerinin zaman kısıtlılığı nedeniyle araştırılmaması
- Saklama koşulları çalışmasında gruplardaki örnek sayısının, analiz süresinin uzunluğu nedeniyle sınırlandırılması
- Ölçüm aralığının üzerindeki sonuçların miktar tayinlerinin yapılabileceği seyreltme işlemi için gerekli çalışmaların henüz yapılmaması
- Örnek hazırlığının çok sayıda basamaktan oluşması
- Daha iyi sonuçlar verebilecek türevlendirme maddelerinin denenmemiş olması
- Analiz süresinin uzun olması
- Kromatografik ayrımı tek kolonla yapmak için daha farklı kolon türleri ile denemelerin yapılmamış olması

Sonuç olarak çalışmamızda, LC/MSMS cihazı ile duyarlılığı ve özgüllüğü yüksek bir metot geliştirilip D vitamini metabolitlerinin ölçümünü sağladık. Geliştirdiğimiz metot farklı özellikleriyle diğerlerinden ayrılmakla birlikte; elbette çalışmalarımızda, bu alanda uzun yıllar D vitamini metabolitlerinin ölçümü için metot geliştirmekle uğraşan araştırmacıların elde ettiği gelişmelerin rolü büyüktür [28], [40]. LC/MSMS ile uygulanan D vitamini metabolitlerinin ölçüm metotları, hızla ilerleyen laboratuvar teknolojisiyle gelecekte bugünkülerden çok daha iyi performanslara erişecektir. Daha iyi ekstraksiyon, türevlendirme, kromatografik ayrım ve daha duyarlı MS cihazlarıyla geliştirilen metotlarla, örnek hazırlığı otomatikleştirilebilecek ve süresi kısalacak; türevlendirme işlemine gerek duyulmayan ve interferansların etkilerinden arındırılmış yöntemler geliştirilebilecektir. Mevcut imkanlar ve kaynaklarla ulaştığımız performans verileri başlangıç için oldukça tatmin edicidir. İlerde çeşitli düzenlemeler ve eklemelerle geliştirdiğimiz yöntem daha iyi noktalara getirilebilir. Geliştirdiğimiz metot atıl olarak kalmayacak, D vitamini metabolizmasının araştırılmasına duyulan yoğun ilgi neticesinde birçok araştırma projesinde kullanılacaktır.

6. KAYNAKLAR

[1] I. of M. (US) IOM, "Dietary reference intakes for calcium and vitamin d." 2011.

[2] G. Jones, "Metabolism and biomarkers of Vitamin D," Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, vol. 72, no. SUPPL. 243. pp. 7–13, 2012.

[3] R. H. Wasserman and A. N. Taylor, "Vitamin D_3-induced calcium-binding protein in chick intestinal mucosa.," Science, vol. 152, no. 3723, pp. 791–793, 1966.

[4] M. E. Bruns, E. Kleeman, and D. E. Bruns, "Vitamin D-dependent calcium-binding protein of mouse yolk sac. Biochemical and immunochemical properties and responses to 1,25-dihydroxycholecalciferol," J. Biol. Chem., vol. 261, no. 16, pp. 7485–7490, 1986.

[5] M. Warembourg, C. Perret, and M. Thomasset, "Distribution of vitamin D-dependent calcium-binding protein messenger ribonucleic acid in rat placenta and duodenum," Endocrinology, vol. 119, no. 1, pp. 176–184, 1986.

[6] W. B. Rhoten, M. E. Bruns, and S. Christakos, "Presence and localization of two vitamin D-dependent calcium binding proteins in kidneys of higher vertebrates," Endocrinology, vol. 117, no. 2, pp. 674–683, 1985.

[7] L. Tripkovic et al., "Comparison of vitamin D_2 and vitamin D_3 supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis 1–3," Am J Clin Nutr, vol. 95, pp. 1357–64, 2012.

[8] N. F. Barley, S. R. Prathalingam, P. Zhi, S. Legon, a Howard, and J. R. Walters, "Factors involved in the duodenal expression of the human calbindin-D9k gene.," Biochem. J., vol. 341 (Pt 3, pp. 491–500, 1999.

[9] A. K. Hall and A. W. Norman, "Regulation of calbindin D28K gene expression by 1,25 dihydroxyvitamin D_3 in chick kidney," J. Bone Miner. Res., vol. 5, no. 4, pp. 325–330, 1990.

[10] S. Varghese, L. L. Deaven, Y. C. Huang, R. K. Gill, A. M. Iacopino, and S. Christakos, "Transcriptional regulation and chromosomal assignment of the mammalian calbindin-D28k gene," Mol Endocrinol, vol. 3, no. 3, pp. 495–502, 1989.

[11] F. G. Strathmann, T. J. Laha, and A. N. Hoofnagle, “Quantification of 1,25-dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry.,” Clin. Chem., vol. 57, no. 9, pp. 1279–85, Sep. 2011.

[12] S. S.-C. Tai and M. A. Nelson, “Candidate Reference Measurement Procedure for the Determination of (24R),25-Dihydroxyvitamin D_3 in Human Serum Using Isotope-Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry,” Anal. Chem., vol. 87, no. 15, pp. 7964–7970, Aug. 2015.

[13] R. J. Singh, R. L. Taylor, G. S. Reddy, and S. K. G. Grebe, “C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status,” J. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 91, no. 8, pp. 3055–3061, 2006.

[14] G. Lensmeyer, M. Poquette, D. Wiebe, and N. Binkley, “The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D_3 is present in adult serum,” J. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 97, no. 1, pp. 163–168, 2012.

[15] J. M. W. van den Ouweland, M. Vogeser, and S. Bächer, “Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry.,” Rev. Endocr. Metab. Disord., vol. 14, no. 2, pp. 159–84, 2013.

[16] D. Feldman, W. J. Pike, and F. H. Glorieux, Vitamin D, vol. 1–2. 2005.

[17] D. Bailey, K. Veljkovic, M. Yazdanpanah, and K. Adeli, “Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D_3 C3-epimer,” Clinical Biochemistry, vol. 46, no. 3. pp. 190–196, 2013.

[18] T. Higashi et al., “A specific LC/ESI-MS/MS method for determination of 25-hydroxyvitamin D_3 in neonatal dried blood spots containing a potential interfering metabolite, 3-epi-25-hydroxyvitamin D_3,” J. Sep. Sci., vol. 34, no. 7, pp. 725–732, Apr. 2011.

[19] C. Burtis, E. Ashwood, and D. Bruns, Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 2006.

[20] B. Ofenloch-Haehnle, “Approaches to measurement of Vitamin D concentrations - Immunoassays,” Scand. J. Clin. Lab. Invest., vol. 72, no. SUPPL. 243, pp. 50–53, 2012.

[21] Clinical & Laboratory Standards Institute, "C50-A Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principles and Guidance; Approved Guideline," CLSI - Clin. Lab. Stand. Inst., 2007.

[22] M. Wilm, "Principles of electrospray ionization.," Mol. Cell. Proteomics, vol. 10, no. 7, p. M111.009407, Jul. 2011.

[23] Clinical & Laboratory Standards Institute, "C62-A: Liquid Chromatography-Mass Spectrometry Methods; Approved Guideline," CLSI - Clin. Lab. Stand. Inst., 2014.

[24] F. G. Strathmann and A. N. Hoofnagle, "Current and Future Applications of Mass Spectrometry to the Clinical Laboratory," Am. J. Clin. Pathol., vol. 136, no. 4, pp. 609–616, Oct. 2011.

[25] U. Kobold, "Approaches to measurement of Vitamin D concentrations Mass spectrometry," Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, vol. 72, no. SUPPL. 243. pp. 54–59, 2012.

[26] M. L. Musteata and F. M. Musteata, "Overview of extraction methods for analysis of vitamin D and its metabolites in biological samples.," Bioanalysis, vol. 3, no. 17, pp. 1987–2002, 2011.

[27] P. J. Jannetto and R. L. Fitzgerald, "Effective Use of Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory.," Clin. Chem., vol. 62, no. 1, pp. 92–8, Jan. 2016.

[28] T. Higashi, Y. Shibayama, M. Fuji, and K. Shimada, "Liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for the determination of salivary 25-hydroxyvitamin D_3: a noninvasive tool for the assessment of vitamin D status," Anal. Bioanal. Chem., vol. 391, no. 1, pp. 229–238, 2007.

[29] S. Ding, I. Schoenmakers, K. Jones, A. Koulman, A. Prentice, and D. A. Volmer, "Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS," Anal. Bioanal. Chem., vol. 398, no. 2, pp. 779–789, Sep. 2010.

[30] B. K. Matuszewski, M. L. Constanzer, and C. M. Chavez-Eng, "Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-MS/MS," Anal. Chem., vol. 75, no. 13, pp. 3019–3030, 2003.

[31] ISO, "ISO 5725-6:1994 - Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.

[32] C.-J. Farrell and M. Herrmann, “Determination of vitamin D and its metabolites.,” Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab., vol. 27, pp. 675–88, 2013.

[33] M. J. Müller, C. S. Stokes, F. Lammert, and D. A. Volmer, “Chemotyping the distribution of Vitamin D metabolites in human serum,” Sci. Rep., vol. 6, 2016.

[34] A. Burild, H. L. Frandsen, and J. Jakobsen, “Simultaneous quantification of vitamin D_3 , 25-hydroxyvitamin D_3 and 24,25-dihydroxyvitamin D_3 in human serum by LC-MS/MS,” Scand. J. Clin. Lab. Invest., vol. 74, no. 5, pp. 418–423, Aug. 2014.

[35] M. Satoh et al., “Development and validation of the simultaneous measurement of four vitamin D metabolites in serum by LC–MS/MS for clinical laboratory applications,” Anal. Bioanal. Chem., vol. 408, no. 27, pp. 7617–7627, Nov. 2016.

[36] S. Ogawa, S. Ooki, M. Morohashi, K. Yamagata, and T. Higashi, “A novel Cookson-type reagent for enhancing sensitivity and specificity in assessment of infant vitamin D status using liquid chromatography/tandem mass spectrometry,” Rapid Commun. Mass Spectrom., vol. 27, no. 21, pp. 2453–2460, Nov. 2013.

[37] C. J. Hedman, D. A. Wiebe, S. Dey, J. Plath, J. W. Kemnitz, and T. E. Ziegler, “Development of a sensitive LC/MS/MS method for vitamin D metabolites: 1,25 Dihydroxyvitamin $D_{2\&3}$ measurement using a novel derivatization agent,” J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci., vol. 953–954, no. 1, pp. 62–67, 2014.

[38] D. Stöckl, P. M. Sluss, and L. M. Thienpont, “Specifications for trueness and precision of a reference measurement system for serum/plasma 25-hydroxyvitamin D analysis,” Clin. Chim. Acta, vol. 408, no. 1–2, pp. 8–13, Oct. 2009.

[39] P. A. Aronov, L. M. Hall, K. Dettmer, C. B. Stephensen, and B. D. Hammock, “Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry,” Anal. Bioanal. Chem., vol. 391, no. 5, pp. 1917–1930, 2008.

[40] Y. S. Kim, H. J. Kwon, and H. K. Lee, “The comparison of parathyroid hormone degradation effect by various protease inhibitors in blood specimen.,” Korean J. Lab. Med., vol. 29, no. 2, pp. 104–9, 2009.

Ek-1 Etik kurul onamı

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Klinik Araştırmalar Etik Kurulu

BAŞVURU BİLGİLERİ	**PROTOKOL KODU**	**09.2016.588**
	PROJE ADI	D Vitamini ve Metabolitlerinin Tek Analiz İle Ölçümü İçin LC/MSMS Yöntemi Geliştirilmesi, Validasyonu ve Örnek Saklama Koşullarının Belirlenmesi
	SORUMLU ARAŞTIRICI ÜNVANI/ADI	Prof. Dr. Önder ŞİRİKCİ

KARAR BİLGİLERİ	Tarih 02.12.2016 Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve gerçekleştirilmesinde sakınca bulunmadığı için Kurulumuzca onaylanmasına oy birliği ile karar verilmiştir. Onay sonrasında yapılacak her türlü proje değişiklikleri (katılımcılar, başlık vb.) veya protokol değişikliklerinin Etik Kurula bildirilerek proje onayının yenilenmesi gerekmektedir.

ÜYELER

Unvanı / Adı / Soyadı	Uzmanlık Dalı	Kurumu / EK Üyeliği	Onaylanan Proje ile İlişkisi	Toplantıya katılım	İmza
Prof.Dr. Haner DİRESKENELİ	Romatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/ Başkan	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Tülin ERGUN	Dermatoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Başkan Yrd.	Var Yok	Evet Hayır	
Prof. Dr. Şefik GÖRKEY	Tıp Tarihi ve Etik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Handan KAYA	Patoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. M.Bahadır GÜLLÜOĞLU	Genel Cerrahi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Atila KARAALP	Farmakoloji	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	EVET HAYIR	
Prof.Dr. Semra SARDAŞ	Eczacı	M.Ü Eczacılık Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof.Dr. Başak DOĞAN	Diş Hekimi	M.Ü Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Prof. Dr. Beste Melek ATASOY	Radyasyon Onkolojisi	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç. Dr. Elif KARAKOÇ AYDINER	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç.Dr. Meltem KORAY	Diş Hekimi	İstanbul Üniv. Diş Hekimliği Fak./Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Doç. Dr. Gürkan SERT	Hukukçu	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr: Figen DEMİR	Halk Sağlığı	Acıbadem Üniv. Tıp Fak.	Var Yok	Evet Hayır	
Yrd.Doç.Dr. Pınar Mega TİBER	Biyofizik	M.Ü Tıp Fakültesi/Üye	Var Yok	Evet Hayır	
Gözde Aynur MİRZA	Sağlık Mensubu olmayan kişi	Serbest	Var Yok	Evet Hayır	

Ek-2 Özgeçmiş

ali **yaman**

Marmara Üniversitesi Pendik Eğitim ve Araştırma Hastanesi • Pendik, İstanbul • Türkiye

TEL (555) 721-3725 • **E-MAIL** ali.yaman@marmara.edu.tr

Profil

Doğum Tarihi ve Yeri: 11.07.1988 Konya

Medeni Durumu: Evli

Eğitim

Lisans öncesi: Karaman Fen Lisesi (2002 -2006)

Tıp eğitimi: İstanbul Üniversitesi, İstanbul Tıp Fakültesi (2006 - 2012)

Tıpta Uzmanlık: Biyokimya ve Klinik Biyokimya Uzmanlığı Marmara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Biyokimya Ana Bilim Dalı (2012 -2018)

Deneyimler

Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Ana Bilim Dalı

2012-2018 Tıpta Uzmanlık Öğrencisi