



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D VİTAMİNİ ÖLÇÜMÜNDE YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ, KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE
KEMİLUMİNESANS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Ümmü Gülsüm ÇİFTÇİ AKSOY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Gaziantep
2015



T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**D VİTAMİNİ ÖLÇÜMÜNDE YÜKSEK BASINÇLI SIVI
KROMATOĞRAFİSİ, KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE
KEMİLUMİNESANS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Ümmü Gülsüm ÇİFTÇİ AKSOY
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Gaziantep
2015

T.C.
GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

D VİTAMİNİ ÖLÇÜMÜNDE YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ,
KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE KEMİLUMİNESANS YÖNTEMLERİNİN
KARŞILAŞTIRILMASI

Ümmü Gülsüm ÇİFTÇİ AKSOY

Tez Savunma Tarihi: 25.06.2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Onayı

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez çalışmasının bir “Yüksek Lisans” derecesi için uygun ve yeterli bir çalışma olduğunu onaylıyorum.

Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Tez Danışmanı

Bu tez tarafımda okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir “Yüksek Lisans” tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Jürisi

İmzası

Prof. Dr. Seyithan TAYSI

Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Yrd. Doç. Dr. Nurdan ÖZLÜ CEYLAN

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olup tezin planlanması ve yazım aşamasında etik dışı davranışım olmayıp, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurullar içinde elde ettim. Bu tez çalışmasında elde edilen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynak listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edecek herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

18.06.2015

Ümmü Gülsüm ÇİFTÇİ AKSOY

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini benimle paylaşan değerli hocam ve tez danışmanım Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK başta olmak üzere, eğitim sürecim boyunca ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. Mehmet TARAKÇIOĞLU hocama ve tüm eğitim sürecimde bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım Prof. Dr. Ayşe Binnur ERBAĞCI, Prof. Dr. Seyithan TAYSI, Prof. Dr. İclal GEYİKLİ ÇİMENÇİ ve Doç. Dr. Ş. Nur AKSOY'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans tezim için destek aldığım Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesinde yardımcı araştırmacı olan ve yoğun iş temposu içinde bana kıymetli vaktini ayıran değerli hocam Biyoistatistik Anabilim Dalı başkanı Doç. Dr. Seval KUL'a teşekkür ederim.

Yüksek lisans çalışmam boyunca ve tezimin her aşamasında her türlü desteği esirgemeyen Arş. Gör. Hasan ULUSAL'a, Ecz. Mahmut KARAYAĞMURLU'ya, Doç. Dr. Emine S. NAMIDURU'ya ve tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı asistanlarına ve bölüm çalışanlarına teşekkür ederim.

Eğitimim süresince ellerinden gelen maddi ve manevi fedakârlığı karşılıksız gösteren, beni şekillendiren ve bu günlere getiren başta *anne* ve *babam* olmak üzere *abime* ve *kardeşlerime* teşekkür ederim.

Sevgisi ve desteğiyle daima benimle olan ve bilgi ve tecrübelerinden daima yararlanacağım çok sevgili eşim Dr. Ümit AKSOY'a teşekkür ederim.

Bu tez, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Komisyonu Başkanlığı tarafından TF.15.05 numaralı proje ile desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	i
İÇİNDEKİLER	ii
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	iv
TABLO LİSTESİ	vi
ŞEKİL LİSTESİ.....	i
RESİM LİSTESİ.....	ii
ÖZET	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ ve AMAÇ	3
2. GENEL BİLGİLER.....	5
2.1. D Vitamini.....	5
2.1.1. D vitaminin tanımı.....	5
2.1.2. D vitaminin kaynağı	5
2.1.3. D vitaminin tarihçesi	6
2.1.4. D vitaminin kimyasal yapısı	6
2.1.5. D vitaminin metabolizması.....	8
2.1.6. D vitamini düzeyleri	11
2.1.7. D vitamini gereksinimi	14
2.1.8. D vitamini etki mekanizması.....	15
2.1.9. D vitaminin düzenlenmesi	17
2.1.10. D vitaminin sistemler üzerine etkileri	18
2.1.11. D vitamini fazlalığı.....	27
2.1.12. D vitamini eksikliği	28
2.1.13. D vitamini eksikliğinde görülen bulgular	29

2.2. D Vitamini Miktar Tayininde Kullanılan Yöntemler.....	30
2.2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi	30
2.2.2. Kütle spektrometresi.....	36
2.2.3. Kemilüminesans	41
3. GEREÇ ve YÖNTEMLER	44
3.1. Materyal ve Yöntem.....	44
3.2. Dışlama Kriterleri.....	44
3.3. Parametrelerin Ölçülmesi.....	45
3.3.1. D vitaminin HPLC yöntemiyle ölçülmesi	45
3.3.2. D vitaminin LC-MS yöntemiyle ölçülmesi	45
3.3.3. D vitaminin kemilüminesans yöntemiyle ölçülmesi	45
3.4. İstatiksel Analiz.....	46
4.BULGULAR.....	47
4.1. Bulgular.....	47
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	52
6.KAYNAKLAR	55

SİMGELER ve KISALTMALAR

1,24,25(OH) ₃ D	1,24,26 trihidroksi vitamin D
1,25,26(OH) ₃ D	1,25,26 trihidroksi vitamin D
1,25(OH) ₂ D	1,25 dihidroksi vitamin D
24,25(OH) ₂ D	24,25 dihidroksi vitamin D
25,26(OH) ₂ D	25,26 dihidroksi vitamin D
25(OH)D	25 hidroksi vitamin D
25(OH)D ₂	25 hidroksi vitamin D ₂
25(OH)D ₃	25 hidroksi vitamin D ₃
ALP	Alkalen fosfataz
Ca	Kalsiyum
CaCO ₃	Kalsiyum karbonat
cAMP	Siklik adenzin monofosfat
DBP	D vitamini bağlayıcı protein
DM	Diyabetes mellitus
DSÖ	Dünya sağlık örgütü
EKG	Elektrokardiyografi
ELISA	Enzim bağlı immunosorbent yöntem
FGF 23	Fibroblast growth factor
HPLC	Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
ICC	İntraclass korelasyon katsayısı
IFN	İnterferon
IL-2	İnterlökin 2

IL-3	İnterlökin 3
IL-4	İnterlökin 4
IL-5	İnterlökin 5
IL-10	İnterlökin 10
KMY	Kemik mineral yoğunluğu
LC-MS/MS	Sıvı kromatografi tandem kütle spektroskopisi
MAP	Mitojen aktive eden protein
Mg	Magnezyum
MS	Kütle Spektrometresi
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat
NGF	Nerve growth factor
NO	Azot oksit
NO ₂	Azot dioksit
P	Fosfor
PI-3	Fosfoinositit 3-kinaz
PKA	Protein kinaz A
PTH	Parathormon
RIA	Radioimmunoassay
RXR	Retinoik asit reseptörü
SD	Standart sapma
TNF	Tümör nekroz faktör
UV	Ultraviyole
VDR	Vitamin D reseptörleri

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: Bazı gıdalardaki D vitamini miktarları.....	6
Tablo 2: Sitoplazma, nükleus ve membranında VDR bulunduran hücreler.....	11
Tablo 3: D vitamini metabolitlerinin normal değerleri.....	12
Tablo 4: Serum 25(OH)D değerinin yorumu.....	14
Tablo 5: D vitamini eksikliği nedenleri.....	29
Tablo 6: Genel tanımlayıcı istatistikler.....	47
Tablo 7: Yöntemler arası uyumluluk sonuçları.....	48

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1: D vitamininin yapısı ve karbon moleküllerinin numaralandırılması	7
Şekil 2: Vitamin D ₂ ve D ₃ 'ün moleküler yapısı.....	7
Şekil 3: D vitamini sentezlenme ve metabolizması ile Ca, P ve kemik üzerine etkileri.	10
Şekil 4: D vitamini oluşumu ve transkripsiyona etkisi	16
Şekil 5: D vitamini oluşumu ve etki mekanizması.....	18
Şekil 6: Bir HPLC sistemini meydana getiren bölümlerin şematik diyagramı.....	34
Şekil 7: MS cihazının bileşenleri.....	39
Şekil 8: Örneğin aldığı yol.....	39
Şekil 9: Kuadropalde uçan iyonlar.....	40
Şekil 10: İyon tuzağına yakalanan iyonlar.....	41
Şekil 11: Kemilüminesans ve HPLC yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.....	48
Şekil 12: Kemilüminesans ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.....	49
Şekil 13: HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.....	50
Şekil 14: Kemilüminesans, HPLC ve LCMS/MS yöntemleriyle D vitamini düzeyleri.	51

RESİM LİSTESİ

Resim 1: Raşıitizm.....	20
Resim 2: HPLC cihazının bölümlerinin gösterimi.....	34

ÖZET

D VİTAMİNİ ÖLÇÜMÜNDE YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ, KÜTLE SPEKTROMETRESİ VE KEMİLÜMINESANS YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI

Ümmü Gülsüm Çiftçi AKSOY

Yüksek Lisans Tezi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Hülya ÇİÇEK

Haziran 2015, 61 sayfa

Vücuttaki vitamin D düzeylerini belirlemek için 25(OH) vitamin D düzeyleri klinik bir belirteç olarak ölçülmektedir. Bu yüzden 25(OH) vitamin D düzeylerinin ölçülmesi ve standardize edilmesi büyük önem taşır. Bu araştırmada 25(OH) vitamin D düzeylerinin Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi ve kemilüminesans yöntemleriyle ölçülüp elde edilen sonuçların karşılaştırılması amaçlandı. Çalışmaya 13 ü erkek (%22,8), 44 i kadın (%77,2) olmak üzere toplam 57 gönüllü katıldı. Gönüllülerden alınan serum örneklerinde üç farklı yöntemle yapılan ölçümler sonucunda 25(OH) vitamin D düzeyleri; kemilüminesans yöntemiyle $19,73 \pm 11,87$ ng/mL (ort $\pm$ SD), HPLC yöntemiyle $18,87 \pm 12,47$ ng/mL ve sıvı kromatografi tandem kütle spektroskopisi (LC-MS/MS) yöntemiyle $18,40 \pm 10,90$ ng/mL olarak ölçüldü. Bu çalışmada kemilüminesans ve HPLC yöntemleri karşılaştırıldığında ICC değeri 0.911 ($p=0.001$), kemilüminesans ve LC-MS/MS yöntemleri için 0.924 ($p=0.001$), HPLC ve LC-MS/MS yöntem için 0.961 ($p=0.001$) olarak ölçüldü. En yüksek uyumun HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri arasında gözlenmesiyle birlikte her üç yöntemin birbirine uyumlu olduğu bulundu. Çalışmamız her üç yöntemle yapılan D vitamini ölçümünün güvenilir olduğunu göstermektedir. Bu nedenle rutin laboratuvarlarda vitamin D düzeylerini ölçmek için HPLC, kemilüminesans veya LC-MS/MS yöntemlerinin herhangi birinin güvenle kullanılabileceği görülmektedir.

Anahtar Sözcükler: D vitamini, Kemilüminesans, Kütle spektrometrisi, Yöntem karşılaştırılması, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

ABSTRACT

COMPARISON OF HIGH PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPHY, MASS SPECTROMETRY AND CHEMILUMINESCENCE METHODS FOR VITAMIN D MEASUREMENT

Ümmü Gülsüm ÇİFTÇİ AKSOY

Master Thesis, Department of Medical Biochemistry

Supervisor: Associate Professor Dr. Hülya ÇİÇEK

June 2015, 61 pages

The levels of 25(OH) vitamin D is measured as a clinical marker to determine the level of vitamin D in the body. Therefore, it is important to measure and to standardize the levels of 25(OH) vitamin D. In the present study, it was aimed to measure the levels of 25(OH) vitamin D by High Performance Liquid Chromatography (HPLC), mass spectrometry and chemiluminescence methods and to compare the results obtained in three ways. A total of 57 volunteers, including 14 males (23.7%) and 45 females (76.3%), included to the study. As a result of measurements made by three different methods, 25(OH) vitamin D levels were measured as 19.73 ± 11.87 ng / ml (approx. $\pm$ SD) by chemiluminescence method, 18.87 ± 12.47 ng / mL by HPLC method and 18.40 ± 10.90 ng / ml by LC-MS / MS method in the serum samples taken from the volunteers. In the present study, when chemiluminescence and HPLC methods are compared, ICC value was 0.911 ($p=0.001$), it was 0.924 ($p=0.001$) for chemiluminescence and LC-MS / MS methods, and was 0.961 ($p=0.001$) for HPLC and LC-MS/MS methods. The highest correlation was found among HPLC and LC-MS / MS methods, as well as it was observed that in all three methods is harmonious. Our study suggested that the measurement of vitamin D performed by all three methods is reliable. Therefore, HPLC, chemiluminescence or LC-MS / MS methods can be used safely to measure the levels of vitamin D in routine laboratories.

Keywords: Chemiluminescence, High performance liquid chromatography, Mass spectrometry, Method comparison, Vitamin D

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Vitaminler enzim tepkimelerinde kofaktör olarak rol oynayan, insan organizması için vazgeçilmez bileşiklerdir (1-3). D vitamini ise, yağda eriyen, kimyasal yapısı steroid hormonlara benzediğinden ve bir dokuda sentezlenip hedef dokuya etki etmesi için dolaşım sistemine salındığından, hormon olarak da sınıflandırılabilir (2,4). D vitamini insanda; iskelet sistemi, büyüme, gelişme ve korunma gibi birçok mekanizmalarda büyük önem taşır (5).

Biyolojik olarak aktif olmayan D vitaminin en önemli iki şekli Vitamin D₃ (kolekalsiferol) ve Vitamin D₂ (ergokalsiferol) dir. Vitamin D₃, derinin 290-310 nm dalga boyundaki ultraviole (UV) ışınına maruz kalması sonucu endojen sentezlenir (6). Vitamin D₂ ise bitkilerin güneş ışınına maruz kalmaları sonucu üretilir ve vücuda bitkilerle içerikli diyetle alınır (7).

D vitaminin aktif formu olan 1,25 dihidroksi vitamin D [1,25(OH)₂D]'nin kemik hücrelerinin hem osteoblastik hem de osteoklastik serilerinin farklılaşmasında rolü olduğu bilinmektedir (8-10). D vitamini eksikliğine bağlı olarak çocukluk çağında ortaya çıkan raşitizm, gelişmesini tamamlamamış kemik dokusundaki mineralizasyon yetersizliğine bağlıdır. Bu durumdan hem kemik yapımı hem de kemik sağlamlığı etkilenir. D vitamini eksikliği sonucu erişkinlerde ise osteomalazi gelişir. Osteomalazi; epifizler kapandıktan sonra, eskimiş kemik dokusunun tamiri sırasındaki mineralizasyon yetersizliğidir ve bu durumda kemiklerin sağlamlığı etkilenmektedir (9).

Yapılan çalışmalarda bağışıklık sisteminde D vitaminin antienflamatuar etki gösterdiği bilinmektedir. D vitamini yetersizliği veya eksikliği durumunda aktiveleşen proinflamatuar sitokinler Tip I Diabetes Mellitus (DM), multiple skleroz, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıkların ortaya çıkma riskini artırmaktadır (11).

Özellikle vücutta D vitamini eksikliği olduğu durumlarda kardiyovasküler hastalıkların arttığı belirtilmiştir. Kronik böbrek yetmezliği olgularında da D vitamini tedavisi ile erken dönemde kardiyovasküler sisteme ait mortalite riskinin azaldığı gözlenmiştir (12).

1,25(OH)₂D'nin antineoplastik etkisi meme, prostat gibi dokuları içeren birçok kötü huylu hastalıkta bilinmektedir. D vitamini düzeyi olması gerekenden düşük olanlarda kolon, prostat ve meme kanserleri riski ve bu kanserlere bağlı gelişen ölüm oranı yüksektir (11).

D vitaminin aktif formunun 1,25(OH)₂D olmasına rağmen vücuttaki düzeyi hakkında en doğru sonucu veren parametre 25(OH) vitamin D [25(OH)D]'dir. Bunun sebebi; 1,25(OH)₂D'nin yarılanma ömrünün 3-6 saat, 25(OH)D'nin yarılanma ömrünün ise 20 gün olmasıdır. 25(OH)D vücutta daha uzun süre kaldığından D vitamini eksikliği tanısında bu metabolit ölçülmektedir (11).

'Kalsidiol' olarak isimlendirilen 25(OH)D 25-hidroksilaz enzimi ve sitokrom p450 enzimi etkisiyle 25. pozisyonundan bir hidroksil molekülünün eklenmesiyle vitamin D den sentezlenir (13).

Plazma 25(OH)D konsantrasyonu, D vitamini durumunun güvenilir bir biomarkıdır. Fakat ölçümlerin değişkenliği D vitamini durumunun izlenmesini zorlaştırır. Bu yüzden D vitamin konsantrasyonunun ölçümlerindeki değişkenliğini minimuma indirmek gerekir. Bizim bu çalışmadaki amacımız; alınan serum örneklerinde Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), kütle spektrometresi (MS) ve kemiluminesans yöntemleri ile 25(OH)D konsantrasyonunu ölçüp bu ölçümlerden alınan sonuçları kıyaslayarak hangi yöntemin D vitamini ölçümünde daha stabil olduğunu bulmaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamini

2.1.1. D vitaminin tanımı

Vitaminler genel olarak esansiyel olup; vücutta üretilmeyen, besin yoluyla alınması zorunlu bileşiklerdir. Enzim tepkimelerinde koenzim olarak rol oynayan bu bileşikler, insan organizması için vazgeçilmezdir. Bunlar arasında büyük bir öneme sahip olan D vitamini ise diğerlerinden farklı olarak vücutta yapılabilir (1-3).

D vitamini, yağda eriyen bir vitamindir. Kimyasal yapısı steroid hormonlara benzediğinden ve bir dokuda sentezlenip hedef dokuya etki etmesi için dolaşım sistemine salındığından, hormon olarak da sınıflandırılabilir (2,4). D vitamini insanda; iskelet sistemi, büyüme, gelişme ve korunma gibi birçok mekanizmalarda büyük önem taşır (5).

2.1.2. D vitaminin kaynağı

Biyolojik olarak aktif olmayan D vitaminin en önemli iki şekli vitamin D₃ ve vitamin D₂'dir. Vitamin D₃, derinin 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınına maruz kalması sonucu endojen sentezlenir. Bu şekilde vitamin D₃ ün sentezi derinin pigmentasyonu ile ters, ultraviyole ışınına maruz kalma ile doğru orantılıdır (6). Ayrıca coğrafik bölgeler, atmosfer koşulları, ileri yaş, güneş koruyucuların kullanımı, ışığa maruz kalma süresi gibi etkenler de vitamin D₃ sentezini etkiler (14). Vitamin D₂ ise bitkilerin güneş ışınına maruz kalmaları sonucu üretilir ve vücuda bitkilerle içerikli diyetle alınır (7). Vitamin D₂ en çok balıkta olmak üzere et, süt ve yumurta sarısı gibi doğal besinlerde az miktarda bulunur. Bazı gıdalardaki D vitamini miktarları Tablo 1'de verilmiştir (15). Vitamin D'nin bitki dokularındaki ön maddesi ergosterol, hayvan dokularındaki ön maddesi ise 7-dehidrokolesteroldür (16). Vitamin D₂ ve vitamin D₃ ün vücuttaki metabolize olma yolu ve etki potansiyelleri aynı olduğundan ikisine birden vitamin D denmektedir (6,17).

Tablo 1: Bazı gıdalardaki D vitamini miktarları.

Besinler	İçerdiği Vit D (IU/100 gr)	Besinler	İçerdiği Vit D (IU/100 gr)
<i>Hayvansal gıdalar</i>		<i>Balıklar</i>	
Biftek	13	Sardalya	1500
Karaciğer	20-40	Som	220-440
Anne Sütü	0-10	Karides	150
İnek Sütü	0,3-4	Uskumru	120
Tereyağı	35		
Peynir	12	<i>Bitkisel Gıdalar</i>	
Kaymak	50	Pancar	0,2
Yumurta sarısı	25	Lahana	0,2

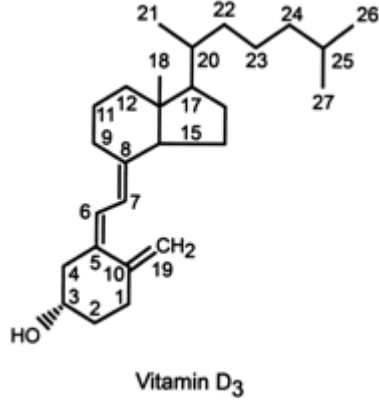
2.1.3. D vitaminin tarihçesi

Vitamin D fotosentezinin 750 milyon yıllık bir geçmişi olmasıyla birlikte vitamin D ilk kez 1919-1920 yılında vitamin olarak tanımlanmıştır (5,18). Köpekler üzerinde yaptığı deneyde Sir Edward Mellanby, bir vitamin eksikliğinden riketsin ortaya çıktığını bulmuştur (18). 1923’de Goldblatt ve Soames, deride vitamin D’nin ön maddesinin güneş ışığına maruz kalması sonucu vitamin D’nin sentezlendiğini bulmuşlardır (19). Almanya’da 1930’da Windaus ve ark., ultraviyole ışınları ile ergosterolden vitamin D₂ ve 7-dehidrokolekalsiferolden vitamin D₃’ün üretildiğini bulmuşlardır (20). 1970’li yıllarda vitamin D’nin sadece kalsiyum ve fosfor metabolizması üzerinde etkili olduğu düşünülürken ilerleyen yıllarda pankreas, meme, bağırsak, akciğer, gonadlar, T ve B lenfositler, mide, deri, beyin, kalp gibi birçok dokuda da etkili olduğu saptanmıştır (5).

2.1.4. D vitaminin kimyasal yapısı

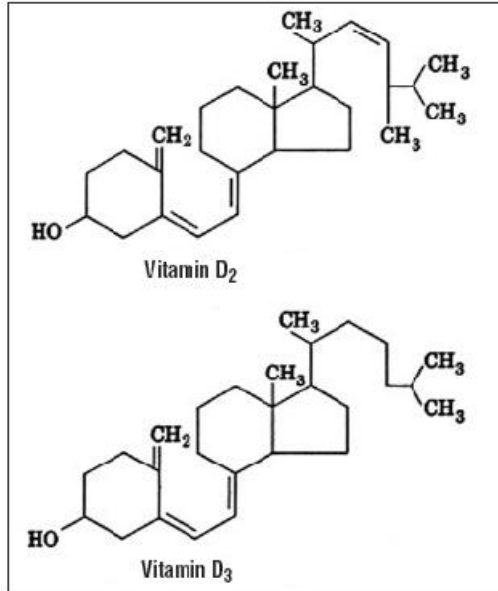
D vitamini sterol yapıya benzer olup siklopentanoperhidrofenantren halkasından türevlenmiş 27 karbonlu bir bileşiktir (3,21). Vitamin D dört halkadan meydana gelir. A, C ve D halkaları doymuşlardır ve 8 ya da 9 karbonlu yan zinciri bulunur. Bileşiğin B halkasında ise 5 ile 6. ve 7 ile 8. karbonları arasında çift bağ bulunur. 9 ile 10. karbon

arasındaki bağ ise açılmıştır. D vitamininin yapısı ve karbon moleküllerinin numaralandırılması Şekil 1’de gösterilmiştir (22).



Şekil 1: D vitamininin yapısı ve karbon moleküllerinin numaralandırılması (22).

Ergokalsiferol ve kolekalsiferol arasındaki fark yan zincirlerinden dolayıdır. Her iki formun da hidroksillenmiş türevleri aynı etkinliğe sahip olup, 22 ve 23. karbonlar arasındaki çift bağ ve 24. karbona bağlanmış bir metil grubu farklılığı oluşturur (21). Vitamin D₂ ve D₃’ün moleküler yapıları Şekil 2’de gösterilmiştir (7).



Şekil 2: Vitamin D₂ ve D₃’ün moleküler yapısı (7).

Kolekalsiferol [$25(\text{OH})\text{D}_3$] 3 adet çift bağı sahiptir. Erime noktası $84-85^\circ\text{C}$ olup, suda çözünme özelliği yoktur. Kimyasal formülü $\text{C}_{27}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 'dir (23).

Ergokalsiferol [$25(\text{OH})\text{D}_2$] 4 adet çift bağı sahiptir. Kaynama noktası 112°C olup kolekalsiferol gibi suda çözünmez (4). Ergokolesterolün kimyasal formülü $\text{C}_{28}\text{H}_{44}\text{O}_3$ 'dir (23).

D vitamininin, birçoğu inaktif olan 37 metabolitinin olduğu bilinmektedir. Bunlar arasında $25,26(\text{OH})_2\text{D}$, $1,24,25(\text{OH})_3\text{D}$, $1,25,26(\text{OH})_3\text{D}$, $25(\text{OH})-26,23$ lakton gibi metabolitler vardır. Bu metabolitlerin biyolojik aktiviteleri henüz saptanmamıştır (23). En aktif şekli $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'dir. D vitamini ısı, ışık, saklama koşullarına duyarlıdır (4).

2.1.5. D vitaminin metabolizması

Karaciğerde sentezlenen kolesterol burada inaktif provitamin D_3 olan 7-dehidrokolesterole çevrilip periferik kan aracılığıyla derinin malphigi tabakasına ulaşır. Derinin güneşle temas etmesi sonucu yüksek enerjili mor ötesi ışınları (290-315 nm) epidermisi geçip 7-dehidrokolesteroldeki çift bağları parçalar ve previtamin D_3 'ü oluşturur (2,24).

Previtamin D_3 biyolojik olarak inerttir ve yaklaşık olarak 2-3 gün süren ve mor ötesi ışın gerektirmeyen termal izomerizasyon ile daha stabil bir izomere dönüşür. Previtamin D_3 yüksek oranda güneş ışığına maruz kaldığında lumistrol veya takisterol gibi iki inert izomerine veya tekrardan 7-dehidrokolesterole dönüşebilir. Bu şekilde fazla D vitamini sentezlenmemiş olur ve intoksikasyon engellenir (25).

Tüm yağda eriyen vitaminler gibi; besinlerle alınan vitamin D_2 , hayvansal besinlerden alınan ve deride sentezlenen vitamin D_3 safra tuzlarının etkisiyle ince barsakta duodenum ve jejunumdan absorpsiyona uğrarlar. Absorbe edildikten sonra şilomikronlar aracılığıyla duktus torasikustan kan dolaşımına geçerler (2,13,24,26). Kanda D vitamini Bağlayıcı Protein (D-binding protein; DBP) olan α -1 globuline bağlanıp karaciğere gelirler. DBP kanda %1-3 serbest halde bulunurken %97-99 oranında bağlı haldedir. DBP ortalama 53 kDa ağırlığında olup DBP geni 4q11-13 kromozomu üzerinde bulunmaktadır. Plazma DBP miktarı, dolaşımda bulunan D vitamini ve metabolitleri miktarlarının yaklaşık 20 katıdır (11,27).

Karaciğere gelen vitamin D'ye, 25-hidroksilaz enzimi aracılığı ile 25. pozisyonundan bir hidroksil molekülü eklenir ve 25-hidroksiergokalsiferol [$25(\text{OH})\text{D}_2$] veya 25-

hidroksikolekalsiferol [$25(\text{OH})\text{D}_3$] oluşur. 25-hidroksilaz enzimi hepatosit mitokondriyal veya mikrozomlarında bulunur. 25-hidroksilaz enziminin tepkimeyi katalizleyebilmesi için moleküler oksijen, NADPH ve Mg'a ihtiyacı vardır. Bu reaksiyon feedback mekanizması ile düzenlenir (11,13,24,26,28).

25-hidroksilaz enzimi ve sitokrom p450 enzimi etkisiyle vitamin D den sentezlenen $25(\text{OH})\text{D}$, 'kalsidiol' olarak isimlendirilir (13). $25(\text{OH})\text{D}$ organizmada D vitamini durumunu yansıtan önemli bir parametre olarak kabul edilir, çünkü D vitaminin başlıca metabolitidir ve dolaşımında yarı ömrü yaklaşık olarak 3 haftadır (13,26).

Kalsidiol dolaşımında DBP'ye bağlı olarak bulunur, total miktarının sadece %1'i dolaşımında serbest haldedir. Bu şekilde vitamin D intoksikasyonuna karşı koruyucu bir mekanizma oluşur (29). Ayrıca yüksek dozda D vitamini alındığında $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'nin plazma seviyesi yükselir, ancak alınan D vitaminin bir kısmı adipoz doku tarafından absorpsiyona uğrar ve böylece hepsi $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'e çevrilmez (30).

Karaciğerde oluşan kalsidiol, dolaşım sisteminde tekrardan DBP'ye bağlanıp D vitamini metabolizmasında ikinci önemli organ olan böbreğe gelir. Böbreğin proksimal tübülüs hücrelerinin membranlarında bulunan megaline bağlanıp hücre içine geçerler. Bu hücrelerin mitokondrileri 1α -hidroksilaz enzimi bakımından zengindirler. Kalsidiol burada birinci karbon atomunun α pozisyonundan ikinci bir hidroksilasyona uğrayarak 1,25 dihidroksikolekalsiferol [$1,25(\text{OH})\text{D}_3$] veya 1,25 dihidroksiergokalsiferol'e [$1,25(\text{OH})\text{D}_2$] dönüşür (Şekil 3). Oluşan yeni molekül $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'kalsitriol' olarak isimlendirilir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$, D vitaminin biyolojik olarak en aktif şeklidir (1,11).

olarak aktif olan 1,25(OH)₂D metabolitinin tercih edilmeyen bir parametre olmasına neden olur (32).

Kalsitriol, parathormon ve kalsitoninle birlikte kalsiyum ve fosfor metabolizmasında önemli rol oynar (Şekil 3). Vitamin D'nin aktif metabolitleri hedef hücrelerde sitoplazma ve nukleus içinde bulunan Vitamin D Reseptörlerine (VDR) bağlanarak etkilerini gösterirler. VDR'lerin hormon bağlayıcı kısmı, DNA bağlayıcı bölgesi ve N-terminal bölgesi bulunur. Bu reseptörler; böbrek, ince bağırsak, paratiroid bezler, kemikte osteoblastlar, pankreasta adacık hücreleri, beyin hücreleri, dolaşımda monositler, aktive T ve B lenfositler, gonadlar ve epitelde bulunurlar (Tablo 2). VDR'ne sahip bu dokular aynı zamanda 1,25(OH)₂D üreten yerlerdir (15,31). VDR, 427 aminoasitten oluşan 50 kD'luk bir protein olup VDR geni 12q13-14 kromozomunda lokalizedir (2).

Tablo 2: Sitoplazma, nukleus ve membranında VDR bulunduran hücreler (33).

Hücre Tipleri	
İntestinal hücreler	Kas hücresi
Osteoblast	Distal renal epiteli
Prostat hücresi	Over hücresi
Paratiroid hücreleri	Pankreas adacık hücreleri
Epidermis hücreleri	Dolaşımdaki monositler
Transforme B hücreleri	Aktif T hücreleri
Nöronlar	Plasental hücreler
Derideki keratositler	Endokrin hücreler, mide
Deri fibroblastları	Kondrositler
Kolon enterositleri	Karaciğer hücresi
Aort endoteli	Hipofiz hücreleri

2.1.6. D vitamini düzeyleri

D vitamini yağda eriyen bir vitamin olduğundan karaciğer ve adipoz dokuda depolanır. Bu yüzden diyetle alımında bir eksiklik veya yokluk olduğunda 6 aya kadar vücut kendi

ihtiyacını karşılayabilir. Buna karşın obez kişilerde artan yağ oranına bağlı olarak depolanan D vitamini oranı da artacağından D vitamini eksikliği görülebilir (34).

Ayrıca VDR polimorfizmi Hashimoto tiroiditi sıklığını artırdığı kaydedilmiştir. Hashimoto tiroiditi hastalarda ise D vitamini eksikliğinin görüldüğü yapılan çalışmalarda saptanmıştır (34).

D vitaminin aktif formunun $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ olmasına rağmen vücuttaki düzeyi hakkında en doğru sonucu veren parametre $25(\text{OH})\text{D}$ 'dir. Bunun sebebi; $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin yarılanma ömrünün 3-6 saat, $25(\text{OH})\text{D}$ 'nin yarılanma ömrünün ise 20 gün olmasıdır. $25(\text{OH})\text{D}$ vücutta daha uzun süre kaldığından D vitamini eksikliği tanısında bu metabolit ölçülmektedir (11). Ayrıca $25(\text{OH})\text{D}$ vücutta $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye oranla 1000 kat daha fazla bulunur. $25(\text{OH})\text{D}$ ve $1,25(\text{OH})\text{D}_2$ ve $1,25(\text{OH})\text{D}_3$ normal değerleri Tablo 3 de verilmiştir (23).

Tablo 3: D vitamini metabolitlerinin normal değerleri (7).

D Vitamini Metabolitlerinin Normal Değerleri		
$25(\text{OH})\text{D}_2$	4-10 ng/mL	
$25(\text{OH})\text{D}_3$	12-40 ng/mL	
TOTAL $25(\text{OH})\text{D}$	15-50 ng/mL	
$24,25(\text{OH})\text{D}_3$	1-4 ng/mL	
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$	İnfant	70 -100 pg/mL
	Çocukluk Dönemi	30-50 pg/mL
	Adolesan	40-80 pg/mL
	Erişkin	20-35 pg/mL

Bebeklerde D vitamini plasental geçiş, anne sütü ve güneş ışığıyla deride sentez şeklinde elde edilir. Yaşamın ilk sekiz haftasında bebeklerin serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeylerinin annelerinkine ile ilişkili olduğu, sonraki aylarda ise güneş ışığı daha belirleyici duruma geçtiği bildirilmektedir (10). Erken bebeklik dönemindeki D vitamini eksikliği ya da yetersizliği açısından en önemli risk faktörünün annedeki D vitamini yetersizliği olduğu düşünülmektedir (9).

Türk Gıda Kodeksi yönetmeliğine göre; bebek formüllerinde 100 mililitrede en az 24 en fazla 70 IU D₃ vitamini, altı ay ile üç yaş arasındaki bebek ve küçük çocuklarda ise 100 mililitrede en az 24 en fazla 85 IU D₃ vitamini bulunmalıdır (Resmi Gazete Tarihi - Sayısı: 04.09.2008- 26987, Değişiklik: 06.02.2009- 27133, Tebliğ No: 2008/52) (5).

D vitamininin referans aralıkları hakkında tam bir fikir birliği yoktur. Çoğu laboratuvar da 25(OH)D düzeyi için üst sınır yaklaşık 50 ng/ml olarak kabul edilmektedir. D vitamini fazlalığı için hiperkalsemi ile ilişkili olarak 25(OH)D düzeyinin 150 ng/ml'den yüksek olması tanı koydurucudur. Ayrıca D vitamininin güneş banyosu ile oluşan 100 ng/ml düzeylerinde bile hayatı tehdit etmediği ve zehirlenmesinin oluşmadığı bilinmektedir (35).

Holick MF ve ark. yaptıkları araştırmada D vitamini düzeyini paratiroid hormon düzeyi ile karşılaştırarak bir normal değer elde etmişlerdir. Bu araştırmada eşik değerdeki paratiroid hormonu dikkate alınmış ve o andaki D vitamini miktarı incelenmiştir. Holick MF ve ark. plato çizen paratiroid hormona karşılık gelen D vitamini miktarını 32 ng/mL olarak ölçmüşler ve bu değeri normal değer olarak kabul etmişlerdir. Buna göre 21 – 29 ng/mL arası çıkan değerler yetersiz, 20 ng/mL altı çıkan değerler ise eksik olarak değerlendirilmişlerdir (36).

Bischoff-Ferrari ve ark. ise; kemik mineral yoğunluğu (KMY), alt ekstremitte fonksiyonları, diş sağlığı, kırık oluşumu ve kolorektal kanser oluşumunu dikkate alarak serum 25(OH)D düzeylerini değerlendirip en iyi sonuçlar 30 ng/ml (75 nmol/L)'nin üstüne çıktığında alınmıştır (37).

Kidney Dialysis Outcomes Quality İnitiativ rehberine göre dolaşımdaki 25(OH)D₃ düzeyi 5 ng/ml'den düşük ise ciddi vitamin D eksikliği, 5 - 15 ng/ml arasında ise hafif vitamin D eksikliği, 15 - 29 ng/ml arasında ise vitamin D yetersizliği, 30 ng/ml'den yüksek ise normal vitamin D düzeyi, 150 ng/ml'den yüksek ise vitamin D intoksikasyonu olarak değerlendirilmektedir (38).

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention CDC)'nin değerlendirmesine göre D vitamini düzeyleri Tablo 4'de verilmiştir (11).

Tablo 4: Serum 25(OH)D değerinin yorumu (11).

D vitamini düzeyi (ng/ml)	D vitamini düzeyi (nmol/L)	Yorum
<12	<30	Bebek ve çocuklarda raşitizmle, erişkinlerde osteomalazi ile ilişkili D vitamini eksikliği
12-20	30-50	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık açısından D vitamini yetersizliği
≥20	50-125	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık açısından D vitamini yeterli düzeyi

T.C. Sağlık Bakanlığı D vitamini düzeyleri konusunda yayınladığı genelgede 25 ng/ml'nin altında olmasını yetersizlik, 10 ng/ml'nin altında olmasını eksiklik olarak kabul etmektedir. Erişkinlerde ise istenilen düzey 40 ng/ml'nin üzerinde olmasıdır (11).

2.1.7. D vitamini gereksinimi

D vitamininin serumdaki düzeylerinde olduğu gibi gereksinimi hakkında da net bir görüş birliği oluşmamıştır. Bu durumun hala tartışılan bir konu olmasında, derinin güneş ışınları ile temas derecesinin değişiklik göstermesinin etkisi vardır. Son yıllarda çocukların D vitamini gereksiniminin genel olarak arttığı görüşüne varılmıştır. Dünya Sağlık Örgütü'ne (DSÖ) göre günlük D vitamini gereksinimi bebekler için 400 ünedir (11,16).

Amerikan Gıda ve Beslenme Kurulu 50 yaşına kadar 200 U/gün, 51-70 yaş arası için 400 U/gün, sonraki yaşlar için 600 U/gün olarak D vitamini alımını önerir (39). Amerikan Pediatri Akademisi Mart 2011'de yayınladığı D vitamini diyet rehberinde 1 yaşına kadar 400 U/gün, 1 yaşından 70 yaşına kadar tüm erkek ve kadınlara 600 U/gün, 70 yaşından büyüklere 800 U/gün D vitamini önermektedir. Kanada Sağlık Bakanlığı bir yaşına kadar tüm çocuklara günlük 400 U, 1-70 yaş arasındakilere, hamilelere ve emziren annelere günlük 600 U, 70 yaşından büyüklere günlük 800 U D vitamini önermektedir (11).

T.C. Sağlık Bakanlığı Bebeklerde D vitamini yetersizliğinin önlenmesi ve kemik sağlığının korunması projesi kapsamında Mayıs 2005 tarihinde alınan kararla doğumun

ilk haftasından itibaren beslenme tarzı ne olursa olsun (formüla veya anne sütü fark etmez) tüm bebeklere en az bir yaşına kadar, tercihen 3 yaşına kadar 400 U/gün D vitamini verilmesini önermektedir (11).

Ayrıca 9 Mayıs 2011’de yayınlanan Sağlık Bakanlığı genelgesine göre 12 haftalıktan itibaren gebelik süresince altı ay ve doğum sonrası altı ay olmak üzere toplam 12 ay süreyle, annelere D Vitamini desteği verilmesi planlandı (11).

Gebelikte ve laktasyonda, optimal D vitamini gereksinimi bilinmez. Ama 200 ile 400 U/gün arasında değişkenlik gösteren referans değerlerinden daha yüksek olduğu görülmektedir. Gebeliğin son trimesterinde 1000 U/gün D vitamini desteği alan ve almayan gebeleri karşılaştırıldığında; D vitamini almayan gebelerden doğan bebeklerde intrauterin büyüme geriliği daha fazla olduğu, bebekler bir yaşına bastığında daha kilo aldıkları ve büyüme hızının daha düşük olduğu görülmüştür (40). Hollis B.W. ve Wagner C.L. emziren annelere 2000 ve 4000 U/gün D vitamini verilmesi ile anne sütü alan bebeklerin D vitamin ihtiyaçlarının karşılanacağını bildirmektedirler (41).

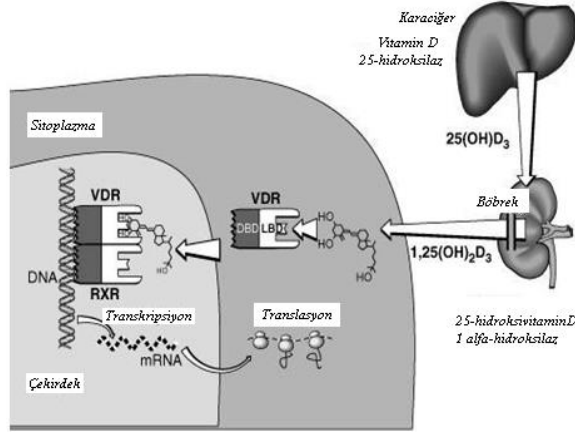
2.1.8. D vitamini etki mekanizması

D vitamini etkisini aktif metaboliti olan 1,25(OH)D ile gösterir. 1,25(OH)₂D, hemen hemen tüm dokularda bulunan intrasellüler reseptör proteinleriyle non-kovalent bağ yapar (42,43).

Reseptörler üzerinde oluşan etki tüm steroid hormonlarda olduğu genomik etki veya genomik olmayan etki şeklindedir (42).

2.1.8.1. Vitamin D’nin genomik etkisi

Genomik etki; doğrudan olarak saatler veya günler içinde gerçekleşen nükleer VDR üzerinden gen transkripsiyonu şeklindedir. D vitamini oluşumu ve transkripsiyona etkisi Şekil 4’de gösterilmiştir. D vitamini 200’den fazla geni kontrolü altında tuttuğu bilinmektedir. D vitaminine ait yapılan gen ekspresyon çalışmalarının hemen hepsi, aktif D vitamininin doğrudan veya dolaylı olarak toplam genomun %0,8-5’ini düzenlediğini vurgulamaktadır. Bu durum aktif D vitamininin hücresel büyümenin düzenlenmesi, DNA onarımı, farklılaşması, apoptozis, membran transportu, hücresel metabolizma, adhezyon ve oksidatif stres gibi birçok olayda görev almasını açıklamaktadır (42).



Şekil 4: D vitamini oluşumu ve transkripsiyona etkisi (4).

D vitamini hücresel düzeydeki etkisini ise VDR reseptörü üzerinden gerçekleştirir. VDR'ün yapısında 427 adet aminoasit bulunur. Bu reseptör membranı geçerek etki edeceği nükleer reseptör ile etkileşime girer ve retinoik asit reseptörüne (RXR) bağlanır. Burada $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -VDR-RXR kompleksini oluşturur. Bu kompleks nükleus kromatinine bağlanır. Reseptörde hem aktif D vitaminini bağlayan bir bölge, hem DNA'ya bağlanmasını sağlayan 2 adet çinko atomu bulunmaktadır. Oluşan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_2$ -VDR-RXR yapısı transkripsiyonu başlatır ve hücredeki genomik etkisi ortaya çıkar (Şekil 4). Böylece bağırsaklardaki kalsiyum kanalları ve kalbindin ekspresyonu gerçekleşerek bağırsaklardan kalsiyum Emilimi sağlanır (5,44).

2.1.8.2. Vitamin D'nin genomik olmayan etkisi

Genomik olmayan etki; dakikalar gibi daha kısa sürede gerçekleşen hücre membranı üzerindeki VDR üzerinden gerçekleşir. Bu genomik olmayan etki genellikle geçici olan iyonların kalsiyum-klorür transmembran geçişini değiştirerek veya hücre içi sinyal yolak aktivitelerini (cAMP, PKA, fosfolipaz C, PI-3 kinaz ve MAP kinaz) etkinleştirerek gerçekleştirmektedir (42).

VDR genindeki genetik değişiklikler protein sekansındaki değişikliklere neden olur ve böylece kalsiyum metabolizması yanında hücre çoğalması ve immün fonksiyonların da etkilendiği önemli sorunlar ortaya çıkabilir. Diğer yandan, aktif D vitamini, plazma membran reseptörüne bağlanmak (non-genomik etki) sureti ile MAP veya cAMP gibi ikincil habercileri aktifleyerek kalsiyum kanalları, pankreasın beta hücreleri, vasküler düz kaslar, barsaklar ve monositler üzerinde de etkili olabilmektedir (29,42).

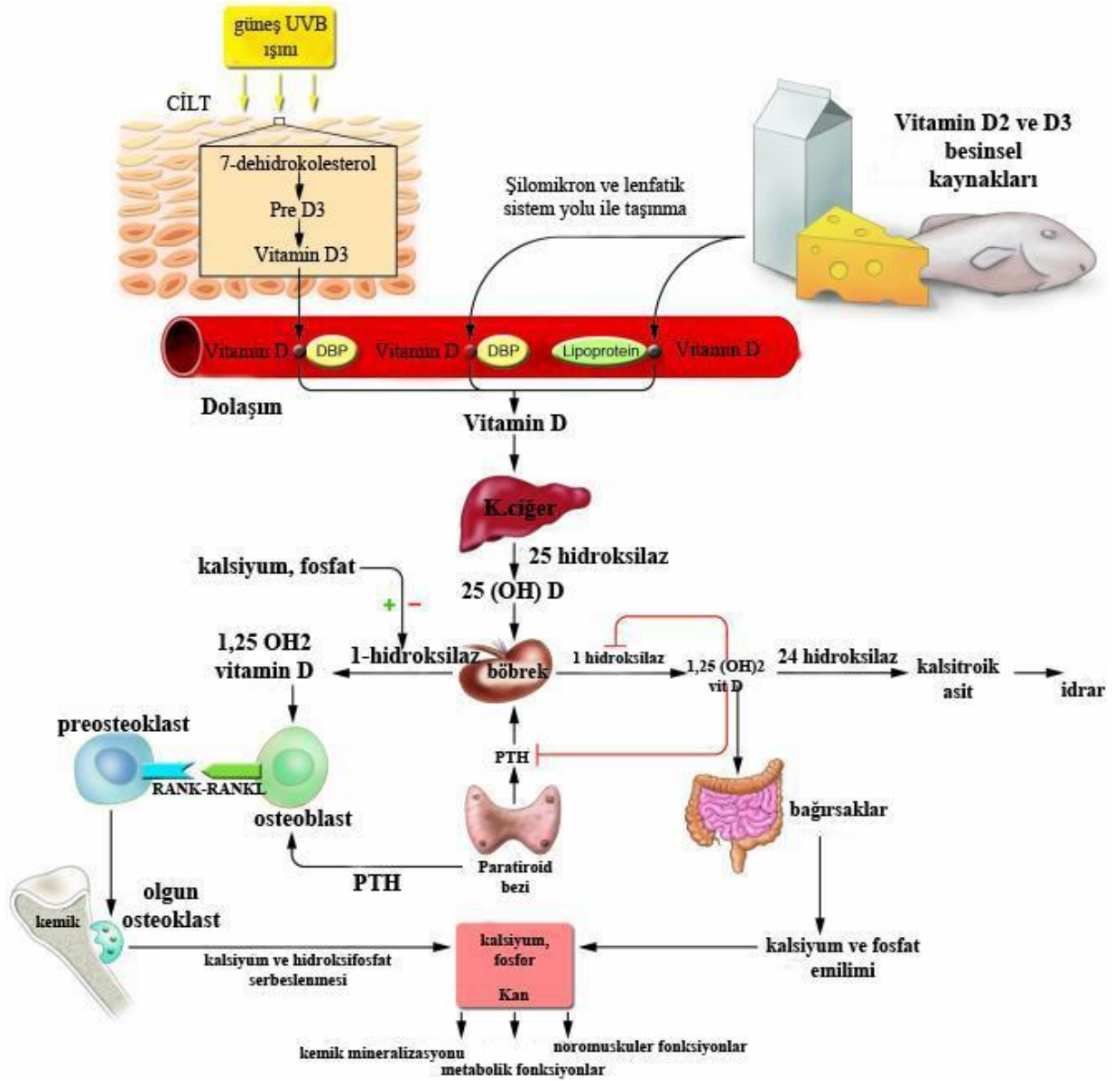
D vitaminin genomik ve non-genomik etkilerinin yanısıra; $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin iskelet kası, immün sistem ve sinir büyüme faktörü (NGF-nerve growth factor) gibi proteinlerin aktifleşmesini ve hücre farklılaşmasında düzenleyici role sahip olduğu, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter gibi hareket ettiği ve D vitamini yetersizliğinin diyabet, koroner kalp hastalığı ve tüberküloz için hazırlayıcı risk faktörü olduğu ileri sürülmektedir (9,45).

2.1.9. D vitaminin düzenlenmesi

D vitamini bir hormon olarak görev yaptığı için organizmadaki düzeyleri feedback mekanizma ile ayarlanır. Ayrıca D vitamini plazma üzerindeki membran reseptörüne bağlanıp cAMP ve MAP olan ikincil habercileri etkileyerek birçok doku ve hücreler üzerinde etkili olabilmektedir. D vitamini oluşumu ve etki mekanizması Şekil 5'de gösterilmiştir. D vitamini mekanizmasındaki anahtar enzim 1α -hidroksilaz enzimidir. 1α -hidroksilaz enziminin düzenlenmesinde ise PTH, fosfor, kalsiyum ve fibroblast growth factor 23 (FGF23) etkin rol oynamaktadırlar (11,23).

D vitaminin düzenlenmesini 4 bölüme ayırırsa;

- 1- Serumda kalsiyum ve fosfor seviyeleri düştüğünde 1α -hidroksilaz enzimi uyarılarak aktifleştirilir ve D vitamini sentezini artırır (23).
- 2- Parathormonu böbrekte tubulus hücrelerindeki 1α -hidroksilaz enzimini uyararak D vitamini sentezini arttırır (23).
- 3- Dokularda D vitaminin aktif metaboliti olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin yeterli seviyelere ulaşması ile 24 -hidroksilaz enzimi aktif duruma geçer ve feedback mekanizması yardımı ile $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye bağlanarak onu inaktive eder. Bu şekilde D vitamini katabolize olur ve oluşan inaktif metabolitin fazlası safra yolu ile atılır. Diğer yandan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ miktarı azaldığında 1α -hidroksilaz enzimi artarken 24 -hidroksilaz enzim aktivitesi azalır (11).
- 4- FGF23 kemikten salgılanır ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ üretimini baskılayan bir mekanizmaya sahiptir. FGF23 bu etkisini $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ yapımını baskıladığı gibi aynı zamanda 24 -hidroksilaz enzimini de aktive ederek gerçekleştirir (23).



Şekil 5: D vitamini oluşumu ve etki mekanizması (23).

2.1.10. D vitaminin sistemler üzerine etkileri

2.1.10.1. İskelet sistemin etkileri

Vücutta fosfor düzeyi böbrekler, kalsiyum düzeyi ise bağırsaklar tarafından düzenlenir. D vitaminin etkisi olmadan fosforun sadece %60'ı, kalsiyumun ise %10-15'i emilirken 1,25(OH)₂D ile VDR etkileşimi sonucunda bu oranlar kalsiyum için %30-40, fosfor için %80'e çıkmaktadır (29).

1,25(OH)₂D'nin kemik hücrelerinin hem osteoblastik hem de osteoklastik serilerin farklılaşmasında rolü olduğu bilinmekle beraber etkisini direkt olarak mı yoksa

mineralizasyon için yeterli kan kalsiyum ve fosfor düzeyini sağlayarak mı olduğu tam olarak bilinmemektedir (8-10).

Yapılan son çalışmalarda D vitamini eksikliği bulunan ratlarda ve D vitamini reseptörü bulunmayan insanlarda, D vitamini sekresyonunun azaldığı veya etkisine rağmen mineralizasyonun normal olarak devam ettiği gözlenmiştir. Bu durum $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin normal kan kalsiyum ve fosfor düzeylerini, kemik mineralizasyonunu doğrudan etkileyerek değil de kemik rezorpsiyonunun yanı sıra kalsiyum ve fosforun barsaktan absorpsiyonunu artırarak sağladığını düşündürmektedir (8).

Organizmada D vitamini kemiklerin mineralizasyonu üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Yani barsaklardan kalsiyum emiliminin yeterli olduğu durumlarda $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ düzeyi de normal seviyede olmakta. Bu aktif metabolitin etkisiyle bir taraftan barsaklardan kalsiyum ve fosfor emilimi sağlanırken diğer taraftan kemik mineralizasyonu devam etmektedir (9,10).

Organizmada D vitamini yetersizliği olduğunda ve/veya barsaklardan kalsiyum emilimi yetersiz olduğu durumlarda PTH düzeyi artar (sekonder hiperparatiroidizm). Artan PTH 1α -hidroksilaz enzimini aktifleştirir ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ düzeyi yükselir. Bu durumda D vitamininin kemiklerden kalsiyum salınımını artırıcı etkisi devreye girmektedir. Organizma için serum kalsiyum düzeyi daha önemli olduğundan, artmış $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ve PTH'nun ortak etkisiyle, bu kez kemiklerden kalsiyum salınımı artarak serum kalsiyum düzeyi normal aralıkta tutulmaya çalışılmakta ve bu süreç boyunca kemiklerin mineralizasyonu daha fazla bozulmaktadır. D vitamini veya kalsiyum yetersizliği sonucu organizmanın kalsiyum dengesinin barsak emilimi yerine, kemiklerden kalsiyum salınımı ile sağlandığı bu süreç nutrisyonel raşitizm gelişme şeklidir (9,10).

D vitamini eksikliğine bağlı olarak ortaya çıkan raşitizm (Resim 1), gelişmesini tamamlamamış kemik dokusundaki mineralizasyon yetersizliğine bağlıdır. Bu durumdan hem kemik yapımı hem de kemik sağlamlığı etkilenir. Raşitizmin belirteçleri arasında düşük kalsiyum, artan paratiroid hormon ve azalan D vitamini seviyeleri sayılabilir (9).



Resim 1: Raşitizm.

Kimyasal olarak raşitizm, kemiğin mineral içeriğinin azalmasıyla karakterizedir. Kalsifiye olmamış osteoid doku ve kırırdağın aşırı miktarda birikmesi histolojik değişiklikleri oluşturur. Raşitizm büyüyen kemiklerin hastalığıdır ve yalnızca çocukluk yaş grubunda görülür (46). Raşitizm iklime, coğrafik koşullara ve toplumun sosyo-ekonomik durumuna göre gelişebilir. Gelişmiş ülkelerde raşitizm sorun olmaktan çıkmasına rağmen ülkemiz gibi gelişmekte olan ülkelere halen çocukluk çağı problemi olarak görülmektedir. Ülkemizde görülme sıklığı %3 ile %19 arasında değişmektedir (5,15).

Parathormon normal veya düşük serum fosfor düzeyi ile sonuçlanan fosfatüriye sebep olurken kemikte preosteoklastları olgun osteoklastlara dönüştüren osteoblastları da aktifler, kemikte bir denge sağlamaya çalışır. Osteoklastlar kemikte mineralize kollajen matriksi çözündürür, osteopeni ve osteoporoza sebep olur ve kırık oluşma riskini artırır. Bütün bu nedenlerle, organizma açısından en fizyolojik durum, serum 25(OH)D düzeyinin PTH yükselmesine neden olmayacak bir değerde bulunması ve alınan/emilen kalsiyum miktarının yeterli olmasıdır. Aksi durumda artmış PTH ve yükselen serum 1,25(OH)₂D düzeyi nedeniyle kemik yapım/yıkımı artmakta ve bu süreç kemik sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bu nedenle henüz raşitizme ait bulguların olmadığı ama PTH yükselmesine neden olan D vitamini düzeyi düşüklüğü başka bir deyişle D vitamini-PTH-kalsiyum dengesinde, PTH yükselmesine neden olmayacak 25(OH) D vitamini düzeyi ‘eşik değer düzeyi’ olarak tanımlanmaktadır (9,37).

Osteomalazi; epifizler kapandıktan sonra, eskimiş kemik dokusunun tamiri sırasındaki mineralizasyon yetersizliğidir ve bu durumda yalnızca kemiklerin sağlamlığı etkilenmektedir (9).

Osteomalazi erişkinlerde görülür ve raşitizmdeki gibi kalsiyum eksikliğinden kaynaklanır. Kalça kemiğinde yalancı kırıklar, ağrı, kas zayıflığı ve yürüme bozukluğu gibi belirtiler görülebilmektedir. Kosta, vertebra korpusu ve uzun kemiklerde kırıklar oluşabilmektedir. Ayrıca bu hastalarda D vitamini ve kalsiyum verilmesiyle tedavi edilebilir kalsiyum ve fosfor metabolizma bozukluğu da oluşur (11,21).

2.1.10.2. Bağışıklık sisteminin düzenlenmesine etkileri

D vitaminin immun sistem üzerindeki etkileri 25 yıl önce 3 önemli buluşla açığa çıkmaya başlamıştır:

1. Organizmadaki inflamatuvar hücreleri üzerinde VDR'nin bulunması
2. D vitaminin aktif metabolitinin T hücre çoğalmasını baskılaması
3. Sarkoidoz gibi bazı hastalıklarda oluşan makrofajların 1α -hidroksilaz etkileyerek $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin üretimini arttırmasıdır (47).

Başlangıçta gözleme dayalı olarak; kış aylarında güneş ışığının D vitamini sentezi için yetersiz olmasına bağlı olarak kuzey yarım kürede Multipl skleroz, inflamatuvar barsak hastalıkları ve tip I DM gibi bazı kronik sistemik hastalıkların ortaya çıktığı gözlenmiştir (48). Yapılan yeni çalışmalarda ise oral yolla yüksek doz D vitamini alımının bu tür hastalıkların oluşma riskini azalttığını desteklemektedir (11).

Timus ve periferik T hücreleri üzerinde D vitamini reseptörü bulunur. Bu reseptörler D vitaminin T hücre fonksiyonu ve gelişimi üzerine etkisi olduğunu kanıtlar. Ayrıca D vitamininaktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ özellikle immunoglobulin üretimini ve B hücrelerinin plazma hücrelerine farklılaşması üzerinde baskılayıcı etkisi vardır (47).

Antijenle uyarılan T hücreleri sitokin üretme durumuna göre Th1 (inflamatuvar T hücreler), Th2 (antienflamatuvar T hücreler) olarak 2 farklı tip T hücreye ayrışır (11). Bu iki tip hücre denge halinde çalışmaktadır. Th2 hücreleri antienflamatuvar sitokinler IL-4 ve IL-5 üretir ve antikor merkezli immun cevaptan sorumludur. D vitamini Th2 hücrelerini uyararak in-vivo ve in-vitro olarak antienflamatuvar etki gösterdiği saptanmıştır (47).

Ayrıca D vitamini proinflamatuvar Th1 hücre üzerinden IFN gamma, IL-2, IL-3 ve TNF alfa salınımını inhibe ederek antienflamatuvar etki gösterebilmektedir. D vitamini yetersizliği veya eksikliği durumunda aktifleşen proinflamatuvar sitokinler Tip I DM,

MS, romatoid artrit ve inflamatuvar barsak hastalıkları gibi otoimmün hastalıkların ortaya çıkma riskini artırmaktadır (11).

Yapılan epidemiyolojik çalışmalarda romatoid artritli hastalarda %60 oranında kan 25(OH)D seviyesi düşük bulunmuştur (49). Yine farklı bir çalışmada ülseratif kolit ve Crohn gibi inflamatuvar barsak hastalıklarında da vitamin D seviyeleri düşük bulunmuştur (50).

2.1.10.3. Solunum sistemine etkileri

D vitamini, solunum sistemindeki epitelium hücreleri tarafından da sentezlenir. Bu şekilde D vitamini, immunomodülatör etkisini solunum sisteminde de göstermiştir (51). Yapılan çalışmalarda, D vitamini uygulanan glukokortikoide dirençli astımlı vakalarda CD4 hücrelerinden IL-10 salınımının arttığı gözlenmiştir. IL-10'un artmasıyla glukokortikoidlerin astıma karşı cevabı iyileşmiştir (52).

2.1.10.4. Kardiyovasküler sisteme etkileri

Yapılan birçok çalışmada D vitamini ve kardiyovasküler sistem arasında güçlü bir ilişkinin olduğu gözlenmiştir. Özellikle vücutta D vitamini eksikliği olduğu durumlarda kardiyovasküler hastalıkların arttığı belirtilmiştir. Kronik böbrek yetmezliği olgularında da D vitamini tedavisi ile erken dönemde kardiyovasküler sisteme ait mortalite riskinin azaldığı gözlenmiştir (12).

Özellikle serum 25(OH)D seviyesinin azaldığı kış mevsiminde kardiyovasküler hastalık sıklığının arttığı gösterilmiş; paradoksal olarak Eskimolar'da ateroskleroz riskinin az olması D vitaminden çok zengin olan deniz ürünleriyle beslenmelerine bağlanmıştır (33).

Kardiyovasküler sistemindeki endotelial hücreler, kardiyomiyositler ve vasküler düz kas hücreleri 1,25(OH)₂D ile yüzeylerinde bulundukları VDR'leri ile etkileşime girerler. Yapılan çalışmalarda kardiyomiyositler D vitamini ile inkübe edilmiş ve hücre çoğalmasının baskılandığı, kardiyomiyosit formasyonunun arttığı, anti-apoptotik etkinin olduğu ve hücre siklusunda görevli genlerin ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (12).

Serum D vitamini düzeyi 15 ng/ml'nin altında olanlarda 26 ng/ml'nin üzerinde olanlara göre hipertansiyon, metabolik sendrom ve kan şekeri yüksekliği oranı 2-4 katı kadar yüksek olduğu 3577 adolesan üzerinde yapılan bir çalışmada görülmüştür (12).

Farklı bir çalışmada 3 ay boyunca haftada 3 defa ultraviyole B ışığına maruz bırakılan hipertansiyon hastası kişilerde D vitamini artışına bağlı olarak kan basıncının normalleştiği gözlenmiştir. Sıçanlarla yapılan çalışmada 1,25(OH)₂D'nin kardiyak kasılmayı arttırdığı ve kardiyak fibrozisi baskıladığı gösterilmiştir (11). D vitamini eksikliğine bağlı gelişen raşitizm vakalarında ortaya çıkan kardiyomiyopatinin tedavi ile düzeltildiği bildirilmiştir (53). VDR bulunmayan farelerde trombosit agregasyonunun ve tromboz riskinin arttığı; yaygın damar içi pıhtılaşma oluşturan farelerde ise D vitaminin trombozu azalttığı gösterilmiştir (11).

Zitterman ve ark. yaptıkları çalışmada kardiyovasküler hastalıkların önlenmesinde yeri olan fiziksel aktivite ile serum 25(OH)D düzeylerinin arttığını göstermişlerdir (54). Worstman ve ark.; hipertansiyon, kardiyovasküler hastalık ve diyabet ile birlikteliği sık olan obez hastalarda 25(OH)D'in seviyelerini düşük bulmuşlar ve bunun sebebinin yağ dokusundaki fazla depolanmaya bağlı olabileceğini düşünmüşlerdir (55).

2.1.10.5. Üreme sistemi üzerinde etkileri

D vitaminin fertilite üzerine olan etkisi doğrudandır. Bunu aromataz enzimini uyararak gerçekleştirir. VDR bulunmayan dişi farelerde fertilite %75 oranında azalır. Bu azalma hipokalsemi düzeldikten sonra da devam eder. Ayrıca uterus hipoplazisi ve over folikülogenezisinde de bozulma görülür. Yapılan deneylerde D vitamini eksikliği erkek farelerde azospermi, hipomobilitate, testiküler morfolojide bozulmaya neden olur (11).

2.1.10.6. Antineoplastik etkileri

1980'li yıllarda kolorektal kanser ve yaşanan enlem arasında ilişki olduğu rapor edilmiştir (48). Ayrıca geçen yüzyılın başlarında kansere bağlı ölümlerin ekvatoradan uzaklaştıkça arttığı öne sürülmüştür (47).

1,25(OH)₂D'nin antineoplastik etkisi meme, prostat gibi dokuları içeren birçok kötü huylu hastalıkta bilinmektedir. D vitamini düzeyi olması gerekenden düşük olanlarda kolon, prostat ve meme kanserleri riski ve bu kanserlere bağlı gelişen ölüm oranı yüksektir (11).

D vitaminini yüksek miktarda alanlarda meme kanseri riski %50 azalmaktadır (56). Malign melanoma geçiren güneş ışığına çok maruz kalan çocuklar ve genç erişkin hastalardaki mortalite, güneş ışığına daha az maruz kalanlar ile karşılaştırıldığında daha

düşük olduğu görülmüştür. Ayrıca güneş ışığına çok maruz kalanlarda Hodgkin Lenfoma riski %40 azalmıştır (11).

2.1.10.7. Beyin dokusuna etkileri

Fare beyninin çoğu bölgelerinde VDR ve D vitamini metabolizmasında görev alan enzimler bulunmaktadır. Yapılan çalışmalarda, farelerde VDR sıfır duruma getirilip bilişsel fonksiyonlarda bozulma olmadan motor hareketlerde değişme olduğu gösterilmiştir. Bu farelere kalsiyum desteği yapıldıktan sonra davranış şekillerinde anormallikler görülmüştür. D vitamini eksikliği olan sıçan yavrularında beyin dokusunun ve ventriküllerin daha büyük olduğu, beyin hücre çoğalmasında artmanın ve korteks kalınlığında azalmanın olduğu görülmüştür (11).

Yapılan farklı çalışmalarda D vitamini yetersizliğine bağlı olarak şizofreni ve depresyon hastalıklarında artış olduğu bildirilmiştir. İntrauterin ve hayatın erken dönemlerinde D vitamini yetersizliği ve VDR'nün transkripsiyonel aktivitesinin doyurmama, hayatın ilerleyen döneminde mental fonksiyonlarında bozukluğa neden olduğu düşünülmektedir (11).

2.1.10.8. Enfeksiyon hastalıkları üzerine etkileri

1900'lü yılların başlarında derinin mikobakteriyel enfeksiyonlarının güneş ışığı ile tedavi edildiği gösterilmiştir. D vitaminin etkisiyle monosit ve makrofajların kemotaktik ve fagositik özellikleri artmaktadır. Buna bağlı olarak monosit ve makrofajların mikrobiyal özellikleri güçlenmektedir (11,57).

Toll Like Reseptör (TLR) mikroorganizmaların liposakkarit komponentinini uyardığında; VDR, 25(OH)D ve 1 α -hidroksilaz enzimi etkin duruma geçmektedir. Serum 25(OH)D düzeyi 30 ng/ml'nin üzerine çıktığında 1 α -hidroksilaz için aktif D vitamini sentezi için yeterli substrat sağlanmış olur. Bu şekilde aktif D vitamini metaboliti nukleusa girerek doğal immüniteyi güçlendiren ve mikroorganizmaların harabiyetine katkı sağlayan etkisini göstermiş olur (11,57).

Son 20 yıldaki yapılan çalışmalarda D vitamini seviyesinin düşmesine bağlı olarak tüberküloz enfeksiyonuna duyarlılığının olduğu saptanmıştır. Kistik fibrozisli vakalarda düşük D vitamini düzeylerine bağlı olarak tekrarlayan akciğer enfeksiyonu geliştiği görülmüştür (11,57).

Yapılan diğerk bir çalışmada sık üst solunum yolu enfeksiyonu geçiren ocukların D vitamini düzeyi incelenip D vitamini yetersizliğı (<32ng/ml) ile sık üst solunum yolu enfeksiyonu geçirme arasında anlamlı bir ilişki olduğı gözlenmiştir (58).

Ayrıca düşük (<9 ng/ml) veya yetersiz (<20 ng/ml) serum D vitamini konsantrasyonunun alt solunum yolu enfeksiyonlarına zemin hazırladığı ve enfeksiyon belirti veya bulgularının iskelet sistemi bulgularından önce ortaya çıktığı belirtilmektedir (11).

Özellikle kış aylarında D vitamini eksikliğıne bağlı olarak yayılmacı pnömokok enfeksiyonları, meningokok enfeksiyonları, A grubu streptokok enfeksiyonları sık görölmektedir. Yapılan çalışmalarda bir yıl süre ile 2000 U vitamin D desteği sağlananlarda soğuk algınlığı ve influenza enfeksiyonun gözlenmediğı rapor edilmiş olup farmakolojik dozda alınan D vitaminin adjuvan olarak birçok enfeksiyonun tedavisinde etkin olabileceğı belirtilmektedir (11,51).

2.1.10.9. Cilt üzerine etkileri

D vitamininin osteoporoz teşhisi konmuş ve uzun süreli sedef hastalığı tedavisi olan kişiler üzerinde etkin olduğı gösterilmiştir. Bu kişilere takviye verilen D vitamini ile hastanın lezyonlarında düzelme saptanmıştır. D vitamini takviye olarak deri hastalıklarından, dev verru, Grover hastalığı, morfea, vitiligo, oral lökoplaki gibi hastalıkların tedavisinde kullanılmaktadır (59).

D vitamini için deri, primer yapım yeri olduğı gibi D vitamini analoglarının inaktivasyonunda görevli olan 24 - hidrosilaz enziminin bulunduğı yerdir. Aynı zamanda deri D vitamininin hormonal etkisi olan otokrin ve parakrin etkinin hedef yeridir. D vitamininin şa derisi üzerinde de olumlu etkilerinin olduğı belirtilmektedir (11,42,47).

2.1.10.10. Obezite üzerine etkileri

D vitamin eksikliğinin vücut kompozisyonu üzerine olan etkisi tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Yağ dokusunda bulunan hücrelerin üzerinde VDR'leri bulunmaktadır. Dolayısıyla yağ hücreleri de D vitamini için hedef hücreler arasındadır. Yapılan çalışmalarda kemik iliğinden elde edilen, VDR bulunmayan mezenkimal hücrelerde adipogeneze ait belirteçlerde artış saptanmıştır. Aktif D vitamini tercihen

mezenkimal hücrelerden osteoblastik hücrelere doğru farklılaşmayı arttırırken, adipogeneziste baskılanmaya neden olduğu bilinmektedir (60).

Araştırmalarda D vitamini düzeyi düşük olanlarda D vitamini düzeyleri normal olanlara göre, vücut kitle indeksi yüksek bulunmuştur. Obezitede artan yağ dokusu D vitamini deposu olarak görev yapacağından kan D vitamini düzeyinin düşmesine yol açabilir. Eşit olarak güneş ışığına maruz bırakılan obez bireyler obez olmayanların yarısı kadar D vitamini üretebilmektedir. Sonuç olarak obezlerde deri altında yağ dokusu birikmesine bağlı olarak deride D vitamini sentezi ve D vitaminin dolaşım sistemine salgılanması azalır. Bu şekilde gelişen D vitamini eksikliğine bağlı hipotoni, obezitenin oluşumuna da katkıda bulunur (57).

2.1.10.11. Ağrı üzerine etkileri

Serum D vitamini düzeyinin 20 ng/ml'nin altında bulunmasının ciddi kas güçsüzlüğü ve ağrı ile karakterize osteomalazik miyopatiye neden olduğu ve bu durumun D vitamini ile düzeldiği bildirilmiştir (29). Kas iskelet sistemine bağlı ağrının osteomalaziye bağlı kemik ağrısından önce ortaya çıktığı gösterilmiştir. Bu nedenle ısrar eden kas ağrılarında D vitamini eksikliği ayırıcı tanıda düşünülmelidir. Tip II DM'lu olgularda da kemik ağrılarının D vitamini takviyesi ile iyileştirildiği gösterilmiştir (42). Bu durumun esas nedeni bilinmemekle birlikte D vitamininin nöronal farklılaşma ve büyüme, nöromusküler işlevleri olumlu etkilemesi üzerinde durulmaktadır. Tüm bu bilgilere rağmen D vitamini ile ağrı arasında kanıta dayalı bilgilerin doğrulanması için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır (42,59).

2.1.10.12. Kas dokusuna etkileri

İnsanlarda sağlıklı bir kas dokusu için D vitamininin rolünü 4 basamakta değerlendirmek mümkündür;

- D vitamini eksikliğine bağlı miyopatinin ilk önemli klinik bulgusu proksimal kas güçsüzlüğüdür (kasların kasılma ve gevşeme zamanlarında uzama). Bunun yanı sıra D vitamini eksikliği durumunda kaslarda yaygın ağrı, paytak yürüme, oturma ve merdiven çıkma hareketlerini yapmada zorlanma diğer sık karşılaşılan patolojik bulgulardır (42).
- Kas hücrelerindeki VDR aktivasyonu kas hücrelerinde protein sentezini, kas hücrelerinde büyüme ve fonksiyonlarındaki düzelmeyi arttırabilmektedir. VDR bulunmayan farelerde erişkin yaşamda kas hücrelerinde immatürite, hacim ve

şekil bozuklukları bildirilmiştir. Bu anormallikler sistemik kalsiyum uygulaması ile kalsiyumu normale getirilen olgularda devam etmiştir (42).

- Yapılan gözleme dayalı çalışmalarda serum D vitamini düzeyi ile kas kuvveti ve alt ekstremitte fonksiyonları arasında pozitif bir ilişki saptanmıştır (42).
- D vitamini uygulamasının kas kuvveti ve dengesini arttırdığı ve böylece düşme riskini azalttığı bildirilmiştir. Hatta D vitamini eksikliğinin kas dokusuna ait bulgularının iskelet sisteminden önce belirdiği bildirilmiştir (42).

Kas dokusunun düzgün çalışabilmesi için gerekli olan D vitamini düzeyleri hakkında farklı görüşler vardır. Bir çalışmada eşik değerin 20 ng/ml olduğu savunulurken farklı bir çalışmadakas fonksiyonlarının daha iyi işlev görmesi için serum D vitamini düzeyinin >32 ng/ml olması gerektiğini savunanlar da vardır (11).

2.1.10.13. Diyabet üzerine etkisi

D vitamini reseptörü, pankreasın beta hücrelerinde de bulunmaktadır. Beta hücrelerinde d vitaminine bağlı kalsiyum bağlayıcı protein olan ‘kalbindin’ bulunur. Kalbindinin beta hücrelerini sitokine bağlı hücre ölümünden koruduğu gözlenmiştir. Yapılan çalışmalara göre 1,25(OH)D’nin tip I DM gelişimini önlediği tip II DM gelişiminde de VDR polimorfizminin rol oynadığı belirtilmiştir. Yapılan çalışmalar doğrultusunda D vitamininin diyabetik sıçanlarda proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir (11).

2.1.11. D vitamini fazlalığı

Genel olarak serum 25(OH)D düzeyinin 300 ng/ml (120 nmol/L) üzerinde olması D vitamini hipervitaminozu olarak kabul edilmektedir (61). Bunun yanı sıra hiperkalsemiyle ilişkili olarak 25(OH)D düzeyinin 150 ng/ml (325 nmol/L)’den yüksek olması tanı koydurucudur. Ayrıca D vitamininin güneş banyosu ile oluşan 100 ng/ml (250 nmol/L) düzeylerinde bile hayatı tehdit etmediği ve D vitamini intoksikasyonunun oluşmadığı bilinmektedir (35).

Bu durumda yağ dokusunda depolanan D vitamini bazen bir yıla kadar uzayabilen yüksek 25(OH)D düzeylerine neden olabilmektedir. 25(OH)D düzeyinin sürekli yüksek olması ince barsaktan Ca Emilimini artırır ve daha önemlisi kemiklerden Ca mobilizasyonu yolu ile şiddetli ve inatçı hiperkalsemiye neden olur (62).

Dışarıdan alınan D vitamini barsaktan Ca Emilimini ve kemiklerden Ca rezorbsiyonunu artırarak hiperkalsemiye neden olur. D vitamini intoksikasyonu olgularında serum

25(OH)D düzeyi yüksek, serum 1,25(OH)₂D düzeyi normal veya yüksek, serum PTH düzeyi düşük seviyelerde olup hiperfosfatemi ve hiperkalsiüri mevcuttur. Hastalarda nefrokalsinozis ve erişkinlerde koroner ateroskleroza neden olabilir (33).

Genellikle hipoparatiroidizm, hipofosfatemik rikets, psödohipoparatiroidizm ve renal osteodistrofisi olan hastaların uzun süreli D vitamini tedavileri esnasında hipervitaminoz görülür. Bunların dışında sağlık personelinin rikets olmadan yüksek doz D vitamini önermesine ya da ailelerin uygunsuz dozda D vitamini vermesine bağlı da hipervitaminoz gelişir. Hiperkalsemi ve buna bağlı gelişen klinik bulgularla D vitamini intoksikasyonun temel bulgusudur (33).

İştahsızlık, kabızlık, bulantı ve kusma hipervitaminozla bağlı gelişen erken belirtilerdir. Bu belirtilerin yanında kas güçsüzlüğü, halsizlik, apati, hipergastrinemi, ülser, pankreatit, bradi aritmiler, EKG bozuklukları, idrar konsantrasyon yeteneğinde bozulma, hipertansiyon, nefrokalsinozis da görülebilir (33).

Hiperkalsemide yapılan acil tedavi için gerekenler, D vitamini intoksikasyonunda da yapılırken en kısa sürede bifosfonat tedavisine başlanmalıdır (33).

2.1.12. D vitamini eksikliği

İnsanlarda D vitamini eksikliği, yetersizliği ya da zehirlenmesinin tanımlanması için dolaşımdaki 25(OH)D düzeyi ölçümü en iyi göstergedir. 25(OH)D'nin dolaşımdaki yarılanma ömrü yaklaşık 2 haftadır. Serum 25(OH)D miktarı başlıca D vitamini alımı ve ultraviyole ışınları aracılığı ile oluşan çevresel etmenlerden geniş ölçüde etkilenirken, 1,25(OH)₂D ise etkilenmez. Bu yüzden 1,25(OH)₂D vücuttaki D vitamini durumunu yansıtmaz (1,63).

Yapılan bir çalışmada aktif metabolit olan 1,25(OH)₂D verilmesiyle 25(OH)D üretiminin baskılandığı gösterilmiştir. D vitamini eksikliği olanlarda 25(OH)D düzeyi düşerken 1,25(OH)₂D düzeyleri değişmemektedir, hatta bazen artmaktadır (63).

D vitamini yetersizliği açısından alt sınır hakkında tam bir fikir birliği yoktur. Bazı laboratuvarlarda PTH düzeyleri 25(OH)D işlevlerinin göstergesi olarak kabul edilir. Bu durumda D vitamini düzeyi 31 ng/ml (78 nmol/L) iken PTH plato yapmaktadır. Yapılan birçok çalışma sonucu D vitamini düzeyinin yeterli olduğunu söyleyebilmek için en az 20 ng/ml (50 nmol/L) ve üzeri olması gerektiği bulunmuştur. Ancak tam yeterlilik için 30 ng/ml (75nmol/L) ve üzerinde olmalıdır (35).

Diğer bir yaklaşım olarak PTH düzeyinde artışın başladığı 36 ng/ml altındaki 25(OH)D değerleri için D vitamini yetersizlik düşünülmüştür. 10-20 ng/ml arasındaki değerler için ise kemik histolojisinde değişimlerin başladığı ve PTH'nun hafif düzeyde (%15) yükseldiği gözlemlendiğinden eksiklik tanımı daha uygun bulunmuştur. Serum 25(OH)D düzeyi 5-10 ng/ml arasında olduğunda PTH düzeyinde orta düzeyde (%15-30) artışla birlikte kemikte yeniden yapılanma sürecinin hızlandığı gözlenmiştir. 5 ng/ml altındaki değerler için ağır eksiklik söylenebilir ve bu değerde PTH düzeyinde %30 artışla birlikte kemikte mineralizasyon kaybı ve osteomalazi gelişir (7).

Toplumun yaklaşık %50'si D vitamini eksikliği riski altında bulunur. Bu yüzden günümüzde D vitamini eksikliği dünya çapında bir epidemi olarak kabul edilmektedir (1).

D vitamini eksikliği için risk faktörleri arasında term dışı doğumlar, koyu cilt, güneş ışığından yetersiz yararlanma, şişmanlık, beslenme bozukluğu ve yaşlılık sayılabilir (7).

D vitamini eksikliğinin nedenleri Tablo 5'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

Tablo 5: D vitamini eksikliği nedenleri (64).

Emilim yetersizliği	25 hidroksilasyonda bozukluk	1,25 hidroksilasyonda bozukluk	Serum vitamin D bağlayıcı protein seviyesinde azalma
Diyetteki yetersizlik	Karaciğer hastalıkları (siroz, alkolik karaciğer hastalığı)	Hipoparatiroidi	Böbrek yetmezliği
Yetersiz güneş ışığı	İlaçlar (antikonvülsanlar ve rifampin)	Böbrek yetmezliği	Nefrotik sendrom
Emilim bozukluğu			

2.1.13. D vitamini eksikliğinde görülen bulgular

D vitamini eksikliğine bağlı çoğu vakalarda bulgu ve belirtiler gelişmez. D vitamini seviyesinin çok düşük saptandığı hastalar için 'D vitamini eksikliği' tanımı kullanılır (7).

Erişkinlerde D vitamini eksikliğine bağlı olarak iskelet sisteminde ağrı ve proksimal kas güçsüzlüğü ile ortaya çıkan osteomalazi ile karmaşık bir hal gelişir. Serum D vitamini, kalsiyum ve fosfor düzeyleri düşük, alkalen fosfataz (ALP) ve PTH seviyeleri ise genellikle yüksektir. Yapılan radyolojik incelemeler ile azalmış kemik yoğunluğu, kırıklar ve yalancı kırıkların (Looser zonu) oluştuğunu gösterir. Kemik biyopsisi ile azalmış mineralizasyon gösterilebilir. Bununla birlikte klinik ve biyokimyasal açıdan kemik biyopsisi gerektiren durumlar nadirdir (7).

Çocuklarda ise D vitamini eksikliğine bağlı olarak her zaman olmasa da; hipokalsemik tetani, kraniyotabes, kosta tesbihleri, kuş göğsü, tibiada eğrilik, kifoskolyoz ve diş çıkmasında gecikme gibi klinik belirtiler görülebilir. Süt çocukluğu döneminde D vitamini eksikliği ile rikets gelişimi arasında her çocuğa göre değişen bir süre vardır ve klasik olarak bilinen evrelerine göre klinik ve biyokimyasal bulgular ortaya çıkar (65).

Bulgular arasında PTH ve kalsitriol gibi osteoporotik hormonların etkisiyle kemik sağlamlığının azalması, serum ve hücre içi kalsiyum ve fosfor düzeyindeki değişiklikler, büyüme plağı gelişiminin bozulması ve mineralizasyon yetersizliği sayılabilir. D vitamini yetersizliği vakalarının bir kısmı belirsiz klinik bulgular oluşturmaya karşın, hipokalsemik nöbet ile gelirken, bir kısmında ise psödohipoparatiroidiyi anımsatan hipokalsemi ile birlikte hiperfosfatemi görülebilmektedir (66).

2.2. D Vitamini Miktar Tayininde Kullanılan Yöntemler

2.2.1. Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi; hareketli bir faz (gaz veya sıvı) ile sabit bir faz (katı veya sıvı) olmak üzere iki faz arasında, kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin tutulma dengelerine dayanarak maddelerin ayrılmasını sağlayan bir ayırma yöntemidir. Bu şekilde bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri yapılır (67).

İlk defa 1892’de Reed, kolon yardımıyla bir karışımın ayrılabilceğini öne sürmüştür. 1906 yılında adsorban olarak CaCO_3 kullanılarak kolon kromatografisiyle klorofil, pigmentlerine Tswett tarafından ayrıştırılmıştır. Bu ayırım ile ilk kez katı-sıvı kromatografisi kullanılmıştır. İnce tabaka kromatografisi, 1938 yılında Türk asıllı Rus araştırmacı olan Izmailov tarafından keşfedilmiştir. 1952’de Nobel ödülüne layık olan

hareketli faz olarak gaz kullanılan gaz-sıvı kromatografisi Martin-James tarafından geliştirilmiştir. 1967 yılında Huber ve Hulsman adlı araştırmacılar kolon teknolojisini geliştirmişlerdir. Duyarlı dedektörler ve yüksek performanslı pompa sistemleri kullanarak yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin temellerini ortaya atmışlardır. 1966-69 yılları arasında ince partiküllü dolgu maddeleri, dar kolonlar ve kolona yüksek basınç uygulayarak sıvı kromatografisi daha da geliştirilmiştir. Sıvı kromatografisinde sabit faz üzerinde ayırım gerçekleşir ve hareketli faz sıvı şeklindedir. 1965'den sonra kolon kromatografisinin yerini analiz için çok kısa sürede tamamlanması, ayırımın yeterince fazla olması ve az miktarda maddeye gereksinim göstermesi gibi özelliklerden dolayı yüksek basınçlı sıvı kromatografisi almıştır (67).

HPLC ile molekül ağırlığı 20-50 milyon arasında olan bütün kompleks organik bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri yüksek bir duyarlılıkla gerçekleştirilebilir. Elde edilen sonuçların kesin ve tekrarlanabilir olması bu yöntemin avantajlarından biridir (67).

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi rutin hastane analizlerinde günümüzde en yaygın olarak kullanılan yöntemdir. HPLC'nin seçilme nedenleri arasında duyarlılığı, doğruluğu, kantitatif tayinlere kolaylıkla uygulanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozulabilen türlerin ayrılmasına uygun olması sayılabilir. Bu yöntemle proteinler, aminoasitler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, terpenoidler, pestisitler, çeşitli organik ve inorganik bileşikler, antibiyotikler, steroidler ve diğer ilaçlar kolaylıkla analiz edilebilir. Ayrıca ilaçların kan düzeylerinin izlenmesinde, farmakokinetik ve metabolizma çalışmalarında da HPLC kullanımı son otuz yılda büyük ölçüde artmıştır (67,68). Ayrıca saflık kontrolü, kalite kontrolü, çevresel ve farmasötik preparatların analizi HPLC cihazıyla yapılabilen diğer analizlerdir (69).

HPLC'nin 4 çeşidi bulunmaktadır:

1. Dağılma (Partition) Sıvı Kromatografisi
 - a) Ters Faz Dağılma Sıvı Kromatografisi
 - b) Normal Faz Dağılma Sıvı Kromatografisi
2. Adsorbsiyon Kromatografisi (sıvı-katı kromatografisi)
3. İyon Değişirme Sıvı Kromatografisi
4. Jel Geçirgenlik veya Moleküler Eleme Sıvı Kromatografisi (69).

HPLC genellikle birbirini tamamlayan ayırma tekniklerini içerir. Ancak her birinin daha çok kullanıldığı farklı alanlar vardır. Örneğin molekül ağırlığı 10000 den büyük olan maddeler için jel kromatografisi, daha küçük kütleli iyon ve moleküller için iyon değiştirme kromatografisi, polar ve iyonik olmayan küçük moleküller için de dağılma kromatografisi kullanılır (70).

2.2.1.1. HPLC’de kullanılan bazı terimler

Sabit Faz:

Katı bir faz veya katı üzerine emdirilmiş sıvı fazdan oluşan, karışımdaki molekülleri adsorblama özelliğine sahip kromatografi bileşenidir. Durağan faz olarak da isimlendirilebilir (69).

Analizi yapılacak molekülün fizikokimyasal özelliği sabit fazı belirlemedeki en önemli etkindir. Polar moleküller iyon değişimi kromatografisiyle ayrılabilirken alkil veya halojen grubu içeren düşük polaritedeki moleküllerin ayrımı için genellikle ters-faz kromatografisi önerilmektedir (71).

Mobil Faz:

Yönteme göre sıvı veya gaz halde olabilen, sabit faz üzerine adsorblanan karışımdaki moleküllerin farklı hızlarla sabit faz üzerinden sürüklenmesini sağlayan kromatografi bileşenidir. Hareketli faz olarak da isimlendirilebilir (69).

Kromatografik koşulları belirlemede bir diğer önemli faktör de mobil faz seçimidir. Bu yöntemde oluşacak küçük farklılıklar (kullanılacak suyun kalitesi, mobil faz için kullanılacak tampon çözeltiyi oluşturan kimyasalların saflığı, mobil fazın pH’sı gibi) sonuçları etkiler. Kullanılan mobil faz sisteme tek başına enjekte edildiğinde, kromatogramda analizi yapılan numune ile aynı yerde pik vermemelidir. Böyle bir durumda mobil faza organik çözücü eklenir ya da pH’sı değiştirilerek bu durum giderilebilir. Mobil faz ile yapılan değişikliklerde sonuç alınamıyor ise, sistemdeki diğer parametrelerde değişiklik yapılmalıdır. Bu noktada örneklerin hazırlanırken içerisinde bulundukları ortamda yer alan protein ve diğer maddelerin uzaklaştırılmasının da büyük önemi vardır (72).

Ölü zaman (to):

Maddelerin alıkonmadan kolonu terk ettikleri zamana karşılık gelir (69).

Alıkonma Zamanı (tr):

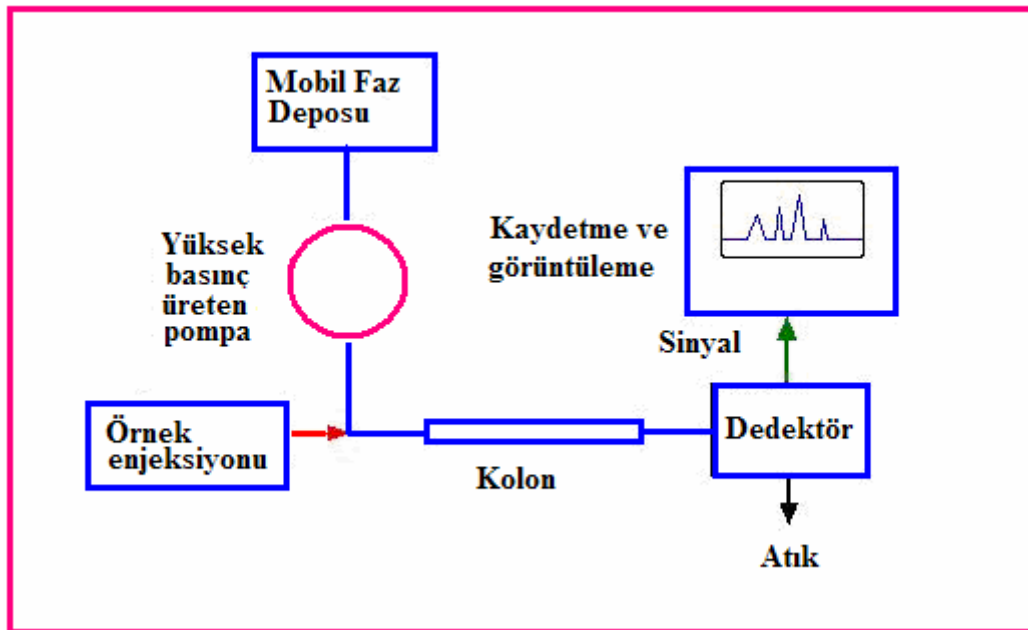
Enjekte edilen örneğin kolonda tutulma zamanını ifade eden bir terimdir. Temel olarak; mobil faz, akış hızı (mL/dk), mobil faz kompozisyonu (çözücü oranları, pH, iyon), kolon sıcaklığı ve kolon kompozisyonu (ters faz, normal faz gibi) gibi faktörlerden etkilenir. Alıkonma zamanı kapasite faktörüyle ifade edilebilir (69).

Sıvı kromatografisinde ayırma mekanizmalarını etkileyen iki faktör bulunur:

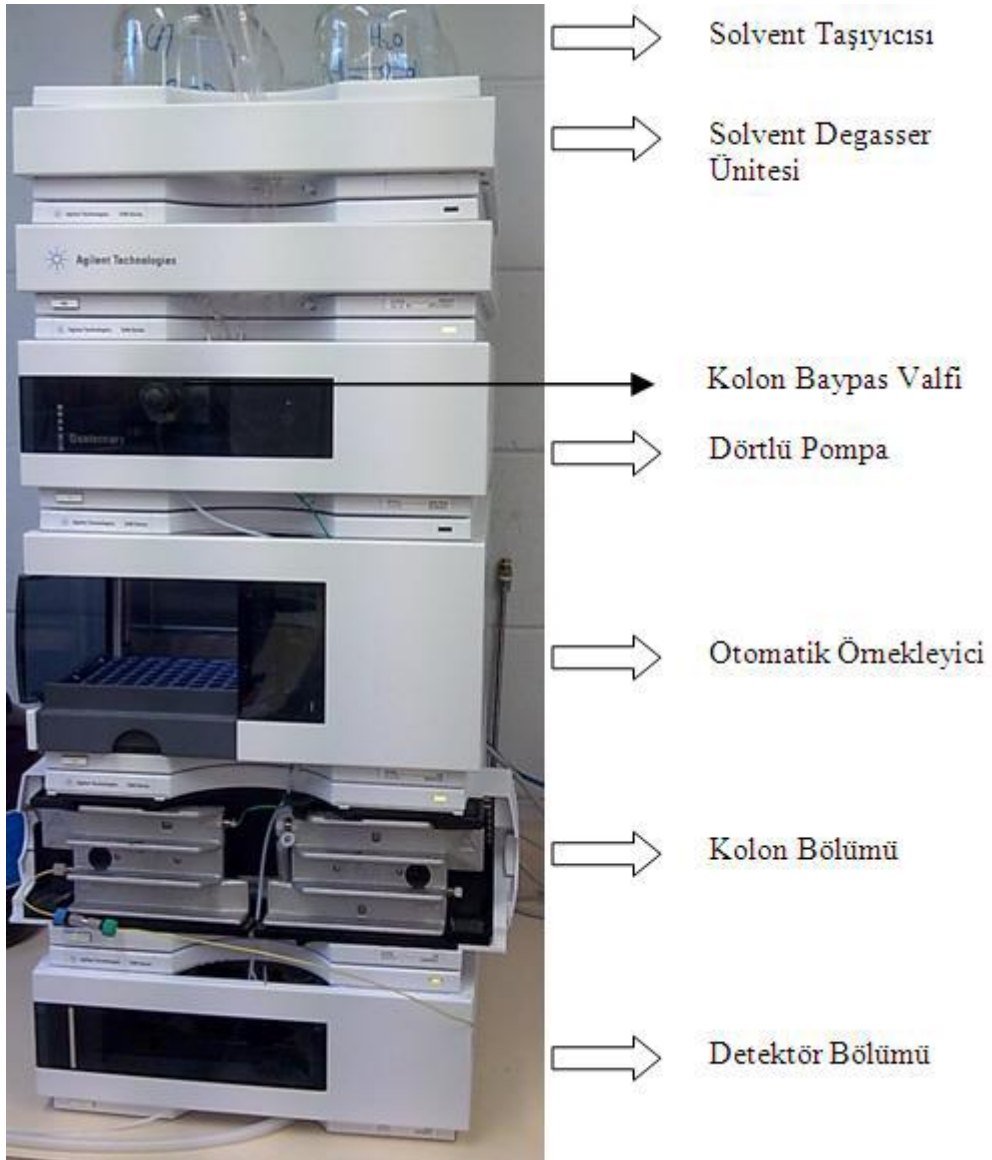
- 1) Hareketli ve sabit fazın polaritesi
- 2) Sabit faz ile gerçekleşen moleküller arası etkileşimler (69).

2.2.1.2. HPLC bölümleri

Küçük organik veya inorganik moleküllerden polimerlere ve proteinlere kadar birçok molekülün ayrılmasında oldukça etkili olan HPLC yönteminde yapılan bir analizde uygun yöntemin belirlenmesine ve optimizasyona dikkat edilmelidir. Bu optimizasyon için sabit fazın bileşimi, kullanılan dedektör, mobil faz seçimi, sıcaklık, akış hızı ve analizi yapılacak numunenin sisteme enjekte edilmeden önce hazır hale getirilmesi önemli parametrelerdir. Şekil 7’de bir HPLC sistemini meydana getiren bölümler şematik olarak gösterilmiştir. Ayrıca Resim 2’de de bir HPLC cihazının bölümleri gösterilmiştir (69,71).



Şekil 6: Bir HPLC sistemini meydana getiren bölümlerin şematik diyagramı.



Resim 2: HPLC cihazının bölümlerinin gösterimi.

HPLC sistemini meydana getiren bölümler;

Mobil Faz Deposu (Solvent Taşıyıcısı): Mobil fazın hazırlandığı ve depolandığı uygun cam şişeleri ve mobil faz akış yollarını içerir. Mobil faz deposu camdan veya paslanmaz çelikten oluşur. Dedektörü olumsuz yönde etkilememesi için hareketli fazda çözünmüş olan oksijen, azot gibi gazları uzaklaştırmak gerekir. Bunun için mobil faz deposu içerisinde ayrıca bir sistem vardır. Gaz uzaklaştırıcı olarak; vakum pompası, destilasyon cihazı, ısıtma sistemi, çözücü karıştırıcı sistem ve çözücünden inert gaz geçiren bir sistem kullanılır. Bazı cihazlar mobil fazda bulunması olası toz ve parçacıklar için süzme sistemini de içerir.

Bir numunenin bileşenlerine ayrılması sadece bir çözücü kullanılarak yapılırsa buna izokratik elüsyon, farklı polaritede iki veya daha fazla çözücü kullanılarak yapılırsa, buna da dereceli (basamaklı) elüsyon denir.

Solvent Degasser Ünitesi: Mobil faz içerisindeki baloncukların kolona girişini engeller.

Dörtlü (Quaternary) Pompa: Mobil fazı uygun oranlarda karıştırır ve kolonun içerisinden geçerek detektöre ulaşmasını sağlamak üzere sabit tanımlı bir akış hızı oluşturur. HPLC’ de genel olarak silindir yollu pompalar kullanılmaktadır.

Otomatik Örnekleyici (Autosampler): Programlı şekilde yerleştirilen vialler içerisindeki örneklerin içerisinden belirli miktar örneğin çekilmesini ve kolona enjeksiyonunu sağlar. Enjekte edilen numune, yüksek basınçta hareket eden hareketli faza karışır ve kolonun üstüne hareketli fazda çözünmüş halde ulaşır.

Kolon: Sisteme gönderilen örnekleri ayıran bölümdür. Bu bölümde prosedürde belirlenen sıcaklıkta kalmasını ve muhafazasını sağlar. Kolonun çapı ve uzunluğu, yapılacak analize göre değişkenlik gösterir. Ancak genelde bir HPLC kolonunun çapı 3-4 mm, uzunluğu ise 10-40 cm dir. Kolonlar paslanmaz çelikten yapılır.

Dedektör: Düzenli aralıklarla belirli dalga boyunda veya belirli dalga boyu aralığında kolonda ayrılan moleküllerin ölçüm alınan kısımdır.

HPLC analizlerinde molekülün özelliklerine göre kullanılmak üzere çeşitli dedektörler geliştirilmiştir. Ultraviyole dedektörü numunenin tek bileşeni belirleneceği zaman lineer ve hızlı kantitatif analiz sağlamaktadır. Ancak bazı durumlarda örneğin daha iyi ayrışması için daha spesifik bir dedektör gerekebilir. Diode array dedektör çoklu dalga boyunda çalışılması gerektiği durumlarda ve pik saflığını görüntüleme açısından kullanışlı bulunmaktadır. Fakat tek dalga boylu dedektörlere göre daha az duyarlıdır. Bunların dışında elektrokimyasal ve floresans dedektörler gibi kullanımı kolay, duyarlı, seçici dedektörler de bulunmaktadır.

Kaydedici: Dedektörden çıkan sinyalleri görüntüleyen ve kaydeden sistemdir.

Kolon Baypas Valfi: Mobil fazın kolona uğramadan geçmesi için tasarlanmış kısımdır (73).

2.2.1.3. Örneklerin hazırlanması

Biyolojik sıvılar kromatografi sistemine enjekte edildiğinde içerdikleri protein ve yağlar gibi moleküller sistemde pompaya, enjektöre ve kolon dolgu maddesine zarar vermektedirler. Bunun yanında bu moleküllerin ortamda bulunmaları karışımların kromatografide iyi ayrılma sağlayamamalarına da neden olmaktadır. Bu yüzden kolona enjeksiyon yapılmadan önce analizi yapılacak örneklerin bazı işlemlerden geçirilerek hazırlanması gerekmektedir. Böylece temiz bir ekstrakt sağlanmış olur ve sistem analiz edilmesini istediği molekülü diğer ilgili maddelerden ayırarak belirginleştirebilir. Bu işlemler; proteinlerin çöktürülmesi, ekstraksiyon ve uygun çözücü veya tampon çözeltide numunenin seyreltilmesi aşamalarıdır (74).

Proteinlerin çöktürülmesi;

Protein çöktürme uygulanması kolay ve sıklıkla başvurulanan bir yöntemdir. Kandaki proteinlerin büyük kısmının ve fibrinin plazmadan uzaklaştırıldığı bu yöntem kolay ve sıklıkla başvurulanan bir uygulamadır. Deproteinizasyon işleminde sıklıkla trikloroasetik asit, perklorik asit, metanol, etanol ve asetonitril kullanılmaktadır. Bu konuda dikkat edilmesi gereken durum, proteinleri çöktürmek amacıyla kullanılacak yüksek alkol içeren çözeltilerin kolona enjeksiyonunda analiz edilecek maddenin tutulmasında değişiklikler oluşturmamasıdır. Bu durum elde edilecek pikin şeklinin bozuk olmasına neden olabilir. Proteinlerin çöktürülmesi yönteminin bir diğer dezavantajı duyarlılıktaki azalmadır. Bu sorun, organik solvent kullanıldığı zaman geri ekstraksiyon yöntemi ile çözülebilir (74).

Numunelerin seyreltilmesi;

Numunelerin seyreltilmesi, idrar ve serebrospinal sıvı gibi düşük miktarlarda protein içeren örneklerle uygulanabilmektedir. Bazı durumlarda serebrospinal sıvı numuneleri doğrudan sisteme enjekte edilmektedir. Dilüsyon uygun bir tampon çözelti veya suyla yapılabilir (74).

2.2.2. Kütle spektrometresi

Elektromanyetik ışımanın belli bir alanında, numunenin farklı dalga boylarında verdiği etkileşimlerle ilgilenen alana spektroskopi denir. Kütle spektrometresi, kompleks bir karışım içerisindeki molekülleri kütle/yük oranlarına göre ayıran spektroskopik bir cihazdır. Bu karışım içerisindeki bileşenler manyetik veya elektriksel alanda hareket

ederek kütle/yük oranlarına ayırarak analitik olarak analiz edilirler. Kütle/yük oranı genel olarak m/z şeklinde gösterilir. Burada m yüklü bir taneciğin kütlesi, z de yüküdür. Kütle spektrometresinin tercih edilme nedenleri arasında yüksek hassaslığı, tayin sınırının düşüklüğü, oldukça hızlı analize olanak sağlaması ve uygulama alanındaki çeşitliliği sayılabilir. Özellikle biyolojik materyallerin yapılarının aydınlatılması olmak üzere proteom, metabolom ve ilaç çalışmaları gibi son gelişmelerin çoğu için de kütle spektrometresi çok kullanılan yöntemlerin arasındadır (70,75).

Kütle spektrometresi ilk olarak 1913 yılında Thomson tarafından kullanılmış ve neonun iki izotopunun olduğu bulunmuştur. 1920'li yıllarda ise geliştirilerek Aston ve Demster tarafından kaydedicisi de olan bir cihaz şekline getirilmiştir (70). 1940'lı yıllarda, petrokimya endüstrisindeki hidrokarbon karışımlarının kantitatif analizleriyle başlamıştır. Önceleri az sayıda hidrokarbon içeren karışımlar fraksiyonlu damıtma ile bileşenlerine ayrılıyordu. Daha sonra ayrılan bileşenlerin kırma indisleri ölçülüyordu. Böyle bir analizin gerçekleştirilmesi için en az 200 saat gerektiriyordu. Benzer bir analiz kütle spektrometresiyle ise birkaç saatte gerçekleştirilebilmektedir. Bu durum, ticari kütle spektrometrelerinin hızla gelişip yaygınlaşmasına neden olmuştur (75).

1950'li yılların başında kimyacılar organik maddelerin teşhisinde ve yapı tayininde kütle spektrometresini kullanılmaya başlamışlardır. Daha sonra nükleer manyetik rezonans ve geliştirilmiş infrared spektrometreleri ile bu yöntem birleştirilerek geliştirilmiştir. Bu şekilde hem madde tanımadada hem de moleküllerin yapılarının aydınlatılmasında kütle spektrometresi organik kimyacılar için günümüzde de hala kullanılan yaygın yöntemlerden biri olmuştur (75).

1980'li yıllarda biyokimyacı ve biyologların yaptıkları çalışmalar sonucu, kütle spektrometrelerinin moleküler uygulamaları, uçucu olmayan ve termal olarak kararsız maddeleri iyonlaştırmak için geliştirilen yöntemler sayesinde önemli ölçüde değişime uğrayarak bu yeni iyonlaştırma yöntemlerinin kullanımı çok fazla artış göstermiştir. Bununla birlikte kütle spektrometresi son 20 yılda en hızlı gelişimini göstermiştir. Bu gelişmelerin başında, atmosferik basınç kaynaklarının gelişimi, analizörlerin hassasiyetinin artması ve cihazların birbirleriyle kombine edilmesi gelmektedir. Bu şekilde teknolojik olarak yeni özellikler cihazlara kazandırılmıştır (75).

Kütle Spektrometresi kullanım alanları genel olarak şu şekilde sıralanabilir;

- Maddelerin elementel bileşenlerinin saptanması
- İnorganik, organik ve biyolojik moleküllerin yapılarının açığa kavuşturulması
- Karışımların kalitatif ve kantitatif analizleri
- Katı yüzeylerin yapılarının ve bileşimlerinin aydınlatılması
- Bir örnekteki atomların izotopik oranlarının bulunması (75).

2.2.2.1. Kütle spektrometresinin bileşenleri

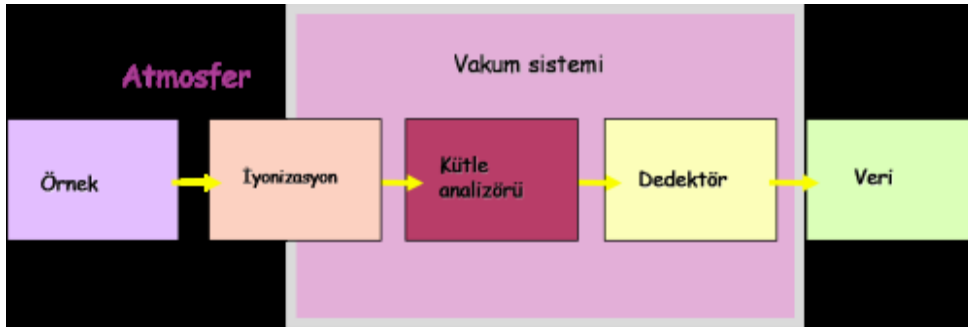
Kütle spektrometresi cihazının ana parçaları;

1. İyonlaştırıcı
2. Kütle analizörü
3. Detektör
4. Veri (spektrum) (75)

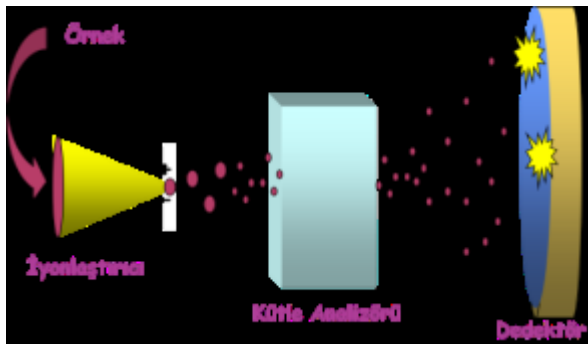
Elektromanyetik ışımanın bir fonksiyonu olarak ölçülen sinyallerin yani absorbanların toplamı spektrum olarak adlandırılır. Dalga boyunun (frekansın ya da enerjinin) bir fonksiyonu olan cevap alanı, yani sinyaller toplamı bir spektrum oluşturur. İyon kaynağı tarafından üretilen her bileşen için farklı kütle/yük oranlarındaki iyon bolluğuna bağlı olarak oluşturulan kütle spektrumuna 'kimyasal parmakizi' de denir (75).

Kütle spektrometresi cihazının çalışma prensibi şu şekildedir; Analiz yapılması istenen örneklerden ilk önce iyonlar elde edilir. Daha sonra elde edilen farklı kütlelerdeki iyonlar birbirinden ayrılır. Birbirinden ayrılan iyonlar kütlelerine bağlı olarak farklı sinyaller oluşturur ve kütle spektrumu şeklinde veriler oluşur (75).

Şekil 7'de bir kütle spektrometresinin bileşenleri ve sıvı haldeki numunenin izlediği yol gösterilmiştir. Şekil 8'de ise örnek iyonlaştırıcıdan iyon buharı olarak çıkıp kütle analizöründe kütlelerine göre filtre edildikten sonra dedektöre iletilip spektrum oluşturması gösterilmiştir (75).



Şekil 7: MS cihazının bileşenleri.



Şekil 8: Örneğin aldığı yol

2.2.2.2. Numune giriş sistemi ve iyonlaştırıcı sistem

Kütle spektrometresi analizlerinde ilk adım olarak gaz fazındaki iyonlar oluşturulur. Numune giriş sisteminden, mikromol düzeyde numune kütle spektrometresinin içine gönderilir. Bu sistem içerisinde katı ve sıvıları buharlaştırmak için bir ünite vardır. İyonizasyon işlemi ile moleküller uyarılarak iyonize hale dönüştürülür. İyonizasyon işlemi elektronlarla, fotonlarla, moleküllerle bombardıman suretiyle, elektrikle ısıtma, veya alevle ısıtma şeklinde yapılır. Bu işlem kütle spektrometresinin girişi ile küçük bir tüpün ucu arasında elektriksel alan uygulanarak gerçekleştirilir. Elektriksel alan, yüklü sıvıyı numune çıkışının sonunda bir koni oluşturması için zorlar. Koninin ucunda damlacıklar oluşur ve kütle spektrometresinin girişine doğru taşınır. Çoğu cihazlarda numune giriş sistemi ile iyon kaynağı oluşturma sistemi birleştirilmiştir. Her iki durumda da pozitif veya negatif iyonlar kütle analizörüne doğru hızlandırılırlar (70,75).

Serbest hale geçen damlacıklar, 200°C'de azot gazının geçtiği buharlaşma hücresine girerler. Burada çözücü kaybolurken damlacıklar üzerlerindeki yük yoğunluğunu azaltmak için daha küçük damlacıklara bölünürler. Böylece analitler gaz fazında kalır.

Ayrıca damlacıklar küçülürken pH değerleri düşer ve analitlerin protonlanması kolaylaşır (75).

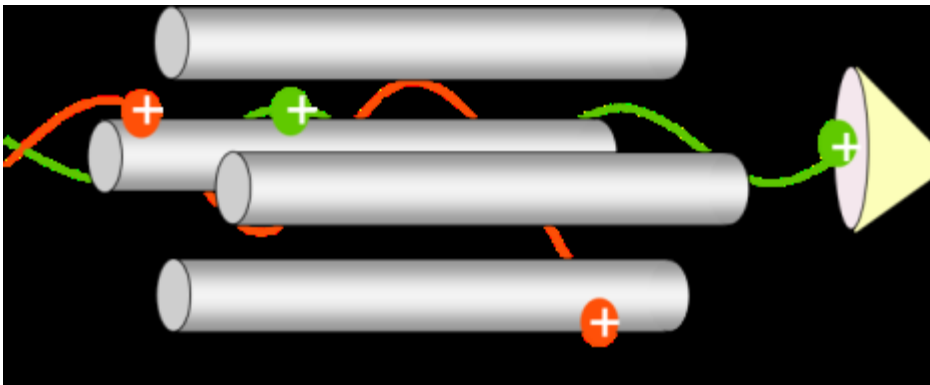
2.2.2.3 Kütle analizörü

Kütle analizöründe yüklü moleküller kütle/yük oranlarına göre ayrılırlar. MS cihazları, kütle analizörünün yapısına bağlı olarak sınıflandırılabilirler (76).

Yüklü moleküller kararlı değildir ve diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman yüklerini kaybedebilirler. Oluşan her bir iyon spesifik moleküler kütle ve yüke sahiptir. Bu değerlerin kütle/yük şeklinde absorbansa karşı grafiğe alındığı bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır. Her bir iyonun absorbansı dedektöre ulaşan miktarı ile doğru orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum, referans spektrumu ile karşılaştırılarak tanımlanma yapılmaya çalışılır (76).

2.2.2.4. Kuadrapol

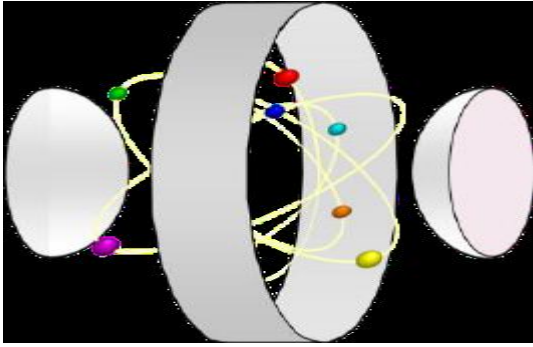
Kuadrapol, iyonların kararlılığını elektrik alanda kullanarak iyonların kütle/yük oranlarına göre ayrılmasını sağlayan cihazdır. Çubuklara yüksek voltaj ve radyo frekansı uygulanır. Şekil 9'de görüldüğü gibi alan çubukları tamamen paralel olmalıdır. Paralel alan çubuklarının arasından geçen pozitif bir iyon, negatif çubuğa doğru yönlendirilir. Eğer potansiyel yük boşalmasından dolayı değişirse, iyonun gidiş yönü de değişir. Burada önemli olan iyonların analizörü geçme süresi ve ardı sıra gelen kütlelerin arasındaki zaman farkının doğru saptanmasıdır. Uygulanan her voltaja karşılık sadece belli bir kütle/yük oranına sahip molekül uçuşunu tamamlayabilir; diğerleri çubuklara çarpar, alandan sapar ve uçuşunu tamamlayamaz (76).



Şekil 9: Kuadrapalde uçan iyonlar.

2.2.2.5. İyon tuzağı

İyon tuzağı ile değişken elektrik alan oluşturularak iyonların tutulması sağlanır. Bu cihaz radyo frekansı ile kuadrapol alan yaratarak iyonları iki ya da üç boyutta hapseder. İki tane halka elektrot içerir. İyonlar bu tuzağa gelir ve sonra dedektöre fırlatılırlar. Tuzağa gelen iyonlar kütle/yük oranlarına bağlı olarak belirli bir yörüngeye sahiptir. Bu yörünge ile iyonlar daha az veya daha fazla boşluk işgal ederler. Yeterli iyon biriktiğinde, halka elektrota uygulanan radyo frekans genişliği değiştirilerek, iyonların seçimli olarak tuzaktan fırlatılması sağlanır (Şekil 10). Yüksek kütle/yük iyonları yüksek radyo frekans genişliğe ihtiyaç duyarken, düşük kütle/yük iyonları daha düşük bir radyo frekans genişliğinde fırlatılırlar (76).



Şekil 10: İyon tuzağına yakalanan iyonlar.

2.2.2.6. Veri

Dedektörde okunan sinyaller, görsel bilgiye spektrum şeklinde dönüştürülür. Bilinmeyen bileşiğin karakterizasyonu bu aşamada toplanan verinin kalitesine ve karşılaştırılabilirliğine bağlıdır. Veri spektrumu elde edildiğinde, araştırmanın başarılı bir şekilde sonuçlandığı düşünülse de, bazı yakın izomerlerin benzer kütle spektrumuna sahip olabileceği de göz önünde bulundurulmalıdır. Nadiren de farklı bileşiklerin spektrumları benzer çıkabilir (76).

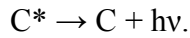
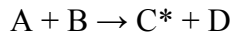
2.2.3. Kemiluminesans

Bir maddenin bir birine yakın; moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesans olmak üzere üç ayrı fiziksel özelliği vardır. Bu özelliğe lüminesans da denir. Her bir özelliğe dayanarak spektroskopi geliştirilmiştir (70).

Moleküler floresans ve fosforesans yöntemlerinde maddenin çözeltisi üzerine ışın gönderilerek madde uyarılır. Uyarılan madde absorpladığı enerjiyi kısa bir süre sonra geri vererek ilk haline döner. İlk haline dönmesi esnasında davranışları incelendiğinde madde hakkında kalitatif ve kantitatif bilgiler elde edilir (70).

Bu iki yöntemden farklı olarak kemilüminesans yönteminde maddeler sadece absorpladıkları ışın enerjisiyle değil, bir reaksiyon sonucu da elektronik olarak uyarılırlar. Elektronik olarak uyarılmış bu maddeler de temel hallerine dönerlerken ışın yayarlar. Yayılan ışına kemilüminesans ışınları, olaya da kemilüminesans denir. Birçok maddenin kemilüminesans özelliğinin olmasına rağmen çoğunun şiddeti zayıf olduğundan analitik amaçlar için kullanılamazlar. Şiddeti ölçülebilen veya analitik önemi olan kemilüminesans veren maddelerin sayısı oldukça azdır (70).

Bir yüzyıldan daha fazla süreden beri kimyasal tepkimelerde ışığın açığa çıktığı bilinmekteydi. Ancak yakın zamana kadar üzerinde fazla durulmamıştı. Günümüzde bu olay şöyle açıklanmaktadır (70).



Burada, A analizi yapılan madde, B ayraç, C* elektronik olarak uyarılmış ürün, D de bir yan ürün olarak gösterildi. Bu tepkimede $h\nu$ görünür ışığı da içeren çeşitli dalga boyundaki ışınları temsil etmektedir. Elektronik olarak uyarılmış olan C* maddesi kısa bir süre sonra ışın ($h\nu$) yayarak ilk haline geri döner. Meydana gelen bu kemilüminesans özelliği ölçmek için tepkimenin gerçekleşebilmesi için bir kaba ve bütün dalga boylarına iyi cevap verecek şekilde dizayn edilmiş iyi bir detektöre ihtiyaç vardır. Kemilüminesans olayı, analizi yapılacak maddeyle ayraç reaksiyona girer girmez başlar. Maksimuma ulaştıktan sonra hızla düşer. Böylece bir sinyal oluşur ve oluşan bu sinyal bilinen sinyallerle karşılaştırılır. Oluşan sinyallerle maddenin konsantrasyonu arasında doğrusal bir bağlantı vardır (70).

2.2.3.1. Kemilüminesans analitik yararlanma

Milyarda birin altındaki konsantrasyonları bile ölçebilen bu yöntem oldukça hassastır. Bununla birlikte bu konuda yeterli çalışmalar halen yapılmamıştır. Bu yüzden böyle tayinlerin kesinliği hakkında tam bir bilgi yoktur (70).

Kemilüminesans yöntemiyle azot oksitleri, kükürtlü bileşikler (SO_2 , SO_3 , H_2S , CH_3SH) ve ozon gibi gazların konsantrasyonları ölçülebilmektedir. Böylece otomobil eksoz gazları içinde bulunan NO ve NO_2 gazlarının konsantrasyonları, sıvı ve katılarda bulunan azot konsantrasyonu tayin edilebilir. Ayrıca kemilüminesans yöntemiyle sıvı fazda bulunan inorganik maddeler ve kemilüminesans özellik gösteren organik maddelerin de analitik tayini yapılabilir. Bu metotla tayin edilebilen başlıca organik maddeler $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$ ve NO_2 süstitüentleri içeren benzen türevleri, amino asitleri naftoller ve bazı insektisitlerdir. Bu yöntemin en önemli uygulaması, kan lekelerinin ve hemoglobinin tayininde kullanılmasıdır (70).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

3.1. Materyal ve Yöntem

Çalışmamız Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında Helsinki Deklarasyonu Kararlarına ve yerel etik kurul olan Gaziantep Üniversitesi Etik Kurulunun 24.02.2014 tarihli ve 24.02.2014/73 nolu onayı ile başlamıştır. Ayrıca çalışma, Gaziantep Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu (TF.15.05) tarafından desteklenmiştir.

Çalışma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez Laboratuvarı Kan Alma birimine 25(OH)D ölçümü için başvuran toplam 57 gönüllü üzerinde yapıldı. Çalışma için hasta ve/veya hasta yakınlarından bilgilendirilmiş onam formu alındı.

Gönüllülerden kan alma Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan alma ünitesinde yapıldı. Gönüllülerden oturur pozisyonda antekübital venden 10 cc kan düz tüplere alındı. Alınan kan 3 porsiyon olacak şekilde ependorf tüplere 1-1,5 cc miktarda ayrılıp etiketlendikten sonra -80 °C’ de saklandı. Hemolizli ve lipemik serumlar çalışma dışı bırakıldı.

Gönüllü grubunun yaş ve cinsiyet bilgileri hasta dosyalarından alındı. Serum örneklerinde 25(OH) vitamin D düzeyleri HPLC, MS ve Kemiluminesans yöntemleriyle ölçüldü. Kemiluminesans yöntemiyle yapılan analizler Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Merkez Laboratuvarında gerçekleşti. HPLC ve MS yöntemleriyle yapılan ölçümler ise hizmet alımı şeklinde gerçekleştirildi.

3.2. Dışlama Kriterleri

1. İleri derecede D vitamini yetersizliği olanlar
2. D vitamini preparatları kullananlar
3. Tramva geçirmiş olan hastalar
4. Diyalize giren hastalar

3.3. Parametrelerin Ölçülmesi

3.3.1. D vitaminin HPLC yöntemiyle ölçülmesi

Bu yöntemde alınan kan örneklerinde 25(OH) vitamin D düzeyleri *Shimadzu prominon model, Japonya* cihazı ile ölçüldü.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemiyle 25(OH) vitamin D tayini yapabilmek için gönüllülerden alınan örnekler bir ön işleminden geçirildi. Bu yüzden çökeltme basamağı ekstraksiyonla kombine edildi. Analiz kit prospektüsünde yer alan prosedüre uygun olarak yapıldı. Numune santrifüje edildikten sonra üst tabaka HPLC sistemine enjekte edildi. HPLC yöntemiyle ayırıştırma bir ters faz kolonuyla 30 °C de izokratik metotla çalışır. Elde edilen kromatogramlar UV dedektörle saptandı. Sonuçlar internal standart metodu ile pik alanları ya da yükseklikleri integrasyonu ile hesaplandı ve serum kalibratörüne teslim edilerek belirlendi.

3.3.2. D vitaminin LC-MS yöntemiyle ölçülmesi

Gönüllü katılımcılardan alınan kan numunelerinde LC-MS yöntemiyle 25(OH) vitamin D düzeyleri *Shimadzu 8030 ve 8040, Japonya* cihazı ile ölçüldü. Analiz prospektüsünde yer alan prosedüre uygun olarak yapıldı.

25(OH) vitamin D tayini için ilk önce yüksek moleküler maddeleri kaldırmak için çökeltme işlemi uygulandı. Sonra santrifüje edildi. Elde edilen süpernatant HPLC sistemine enjekte edildi. HPLC yöntemiyle ayırıştırma bir ters faz kolonuyla 20-25 °C de izokratik metotla çalışıldı. Kromatogramlar MS/MS-dedektörü (AB-Sciex API4000) ile saptandı. Sonuçlar internal standart metodu ile pik alanları ya da yükseklikleri integrasyonu ile hesaplandı ve serum kalibratörüne teslim edilerek belirlendi.

3.3.3. D vitaminin kemilüminesans yöntemiyle ölçülmesi

Çalışmaya katılan gönüllülerden alınan antikoagülansız tüplerdeki kan örneklerinde; 25(OH) vitamin D düzeyi *Roche Hitachi Cobas 800, Almanya* cihazı ile ölçüldü.

Alınan serum numunesi (15 µL) ön işlem reaktifi 1 (Vitamin D-bağlayıcı protein-BPRu, 1 şişe, 9 mL: Rutenyumla işaretli vitamin D bağlayıcı protein (150 µg/L); bis-tris propan tamponu 200 mmol/L; albümin (insan) 25 g/L; pH 7.5; koruyucu madde) ve reaktif 2 (25 hidroksivitamin D~biyotin, 1 şişe, 8.5 mL: Biyotinli vitamin D (25-OH) (14 µg/L); bis-tris propan tamponu 200 mmol/L; pH 8.6; koruyucu madde) ile inkübe

edilerek 25(OH) vitamin D'nin vitamin D bağlayıcı proteinden ayrılması sağlandı. Ön işleme tabi tutulmuş numunenin rutenyumla işaretli vitamin D bağlayıcı protein ile inkübe edilmesiyle 25(OH) vitamin D ile rutenyumla işaretli vitamin D bağlayıcı protein arasında bir kompleks oluşturuldu. 3. inkübasyon işlemi olarak Streptavidin-kaplı mikropartiküller ve biyotin ile işaretli 25(OH) vitamin D eklendikten sonra bağlanmamış rutenyumla işaretlenmiş vitamin D bağlayıcı proteinler dolduruldu. Rutenyumlu vitamin D bağlayıcı protein ve biyotinli 25(OH) vitamin D'den oluşan bir kompleks oluşturuldu ve oluşan bu kompleks biyotin ile streptavidin arasındaki etkileşim aracılığıyla katı faza bağlı hale geldi. Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyinde manyetik olarak tutuldukları ölçüm hücresi içine aspire edildi. Daha sonra bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M (Streptavidin-kaplı mikropartiküller, 1 şişe, 6.5 mL: Streptavidin-kaplı mikropartiküller 0.72 mg/mL; koruyucu madde) ile uzaklaştırıldı. Elektrod üzerine voltaj uygulanması ile kemilüminesans emisyonu oluşturulup, bu bir foton sayıcı (photomultiplier) ile ölçüldü. Sonuçlar, 2-noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edildi.

3.4. İstatiksel Analiz

Yöntemler arasında uyumun karşılaştırılmasında Intraclass korelasyon katsayısı (ICC, Intraclass correlation coefficient) kullanıldı ve yöntemler arasındaki farkın dağılımı Bland Altman grafiklerinde gösterildi. ICC >0.80 olması yöntemler arasında mükemmel bir uyum olduğunu gösterir. Tüm istatistiksel değerlendirmelerde 0.05'den küçük p değeri istatistiksel açıdan anlamlı olarak kabul edildi. Analizlerde SPSS 22 Windows versiyonu ve Medcalc 14 programları kullanıldı.

4.BULGULAR

4.1. Bulgular

Bu çalışmada 13 ü erkek (%22,8), 44 i kadın (%77,2) olmak üzere toplam 57 gönüllü yer aldı. Gönüllülerden alınan serum örneklerinde kemilüminesans, HPLC ve LC-MS/MS yöntemiyle 25(OH) vitamin D düzeyleri ölçüldü. Çalışmaya katılan tüm gönüllülerin yaş ortalaması $46,5 \pm 17,6$ (ortalama $\pm$ SD) yıl idi (Tablo 6). Tablo 6 da üç ayrı yöntemle ölçülen D vitamini düzeyleri ortalama $\pm$ SD olarak verilmiştir.

Tablo 6: Genel tanımlayıcı istatistikler.

	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std Sapma
Yaş	57	18,0	65,0	46,5	17,6
Kemilüminesans (ng/mL)	57	5,93	61,64	19,73	11,87
HPLC (ng/mL)	57	3,66	68,28	18,87	12,47
LC-MS/MS (ng/mL)	57	5,00	58,40	18,40	10,90

Üç farklı yöntemle yapılan ölçümler sonucunda 25(OH) vitamin D düzeyleri; kemilüminesans yöntemiyle $19,73 \pm 11,87$ ng/mL (ort $\pm$ SD), HPLC yöntemiyle $18,87 \pm 12,47$ ng/mL ve LC-MS/MS yöntemiyle $18,40 \pm 10,90$ ng/mL olarak ölçüldü.

Yöntemler arasındaki uyumun test edilmesi amacıyla ICC istatistiksel analiz uygulandı. Yapılan istatistiksel analiz sonucunda her üç yöntem birbirleriyle uyumlu bulundu (ICC >0.80, p<0.05). Yöntemlerin uyumluluk karşılaştırılması Tablo 7’de verilmiştir.

Tablo 7: Yöntemler arası uyumluluk sonuçları.

Yöntemler	ICC	%95 Güven aralığı	P
1-2	0.911	0.848-0.947	0.001
1-3	0.924	0.871-0.955	0.001
2-3	0.961	0.935-0.977	0.001

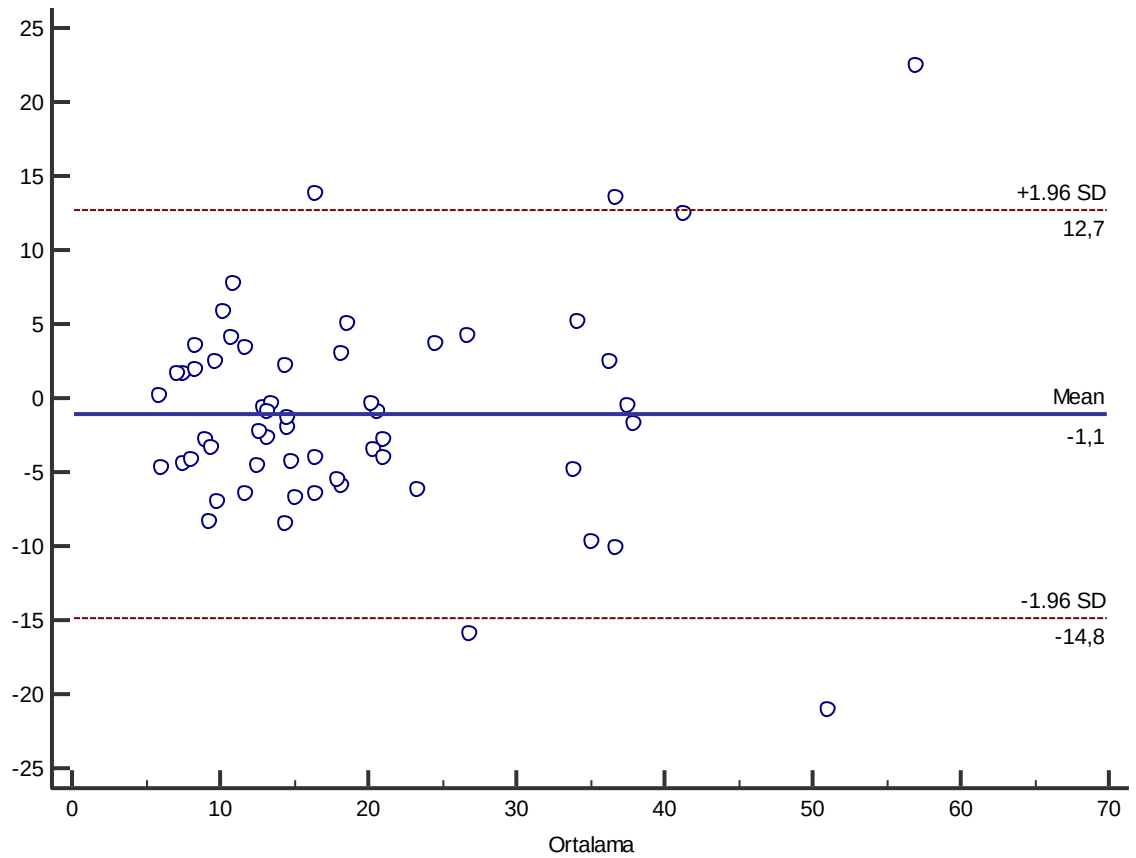
Yöntem 1: Kemilüminesans

Yöntem 2: HPLC

Yöntem 3: LC-MS/MS

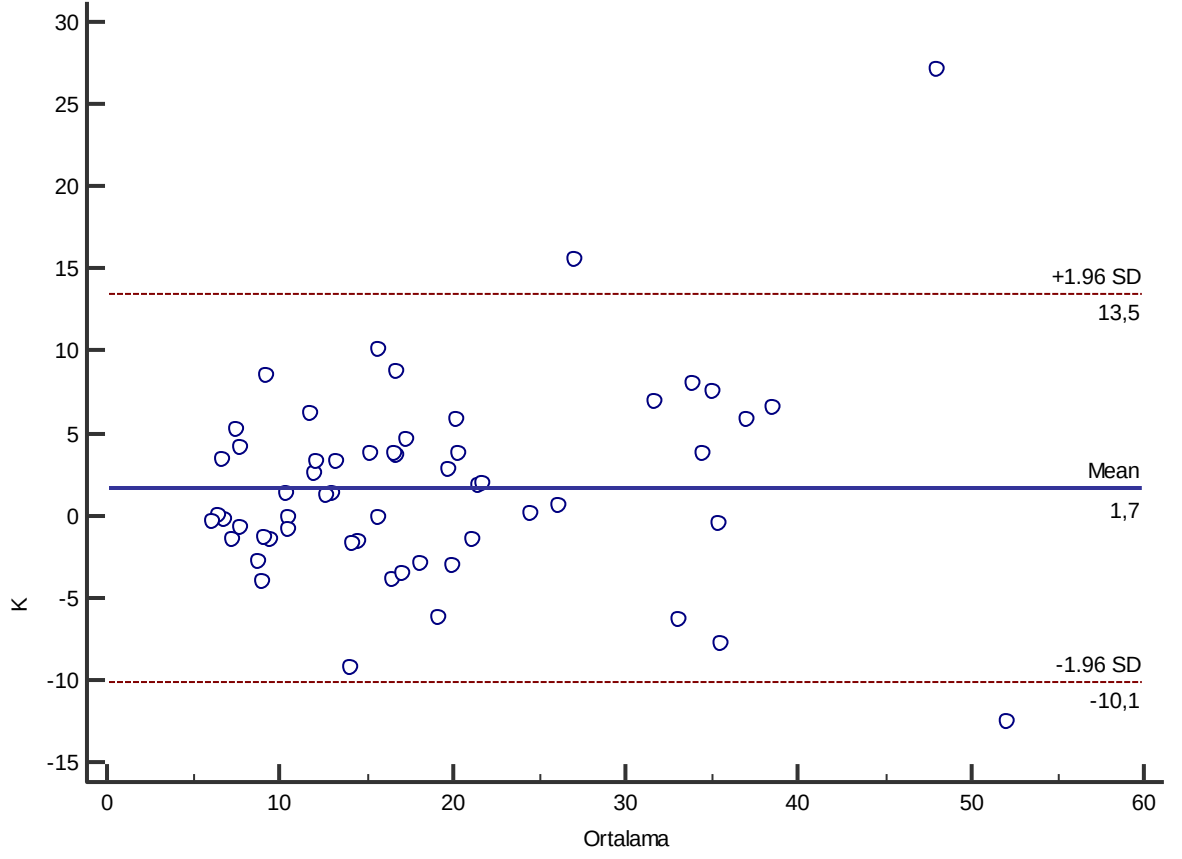
Bu çalışmada yöntem 1-2 için ICC değeri 0.911 ($p=0.001$), yöntem 1-3 için 0.924 ($p=0.001$), yöntem 2-3 için 0.961 ($p=0.001$) olarak ölçüldü. En yüksek uyum 2. ve 3. yöntemler arasında gözlemlendi (ICC=0.961).

Kemilüminesans ve HPLC yöntemleri arasındaki farkın dağılımı Şekil 11’de gösterilmiştir.



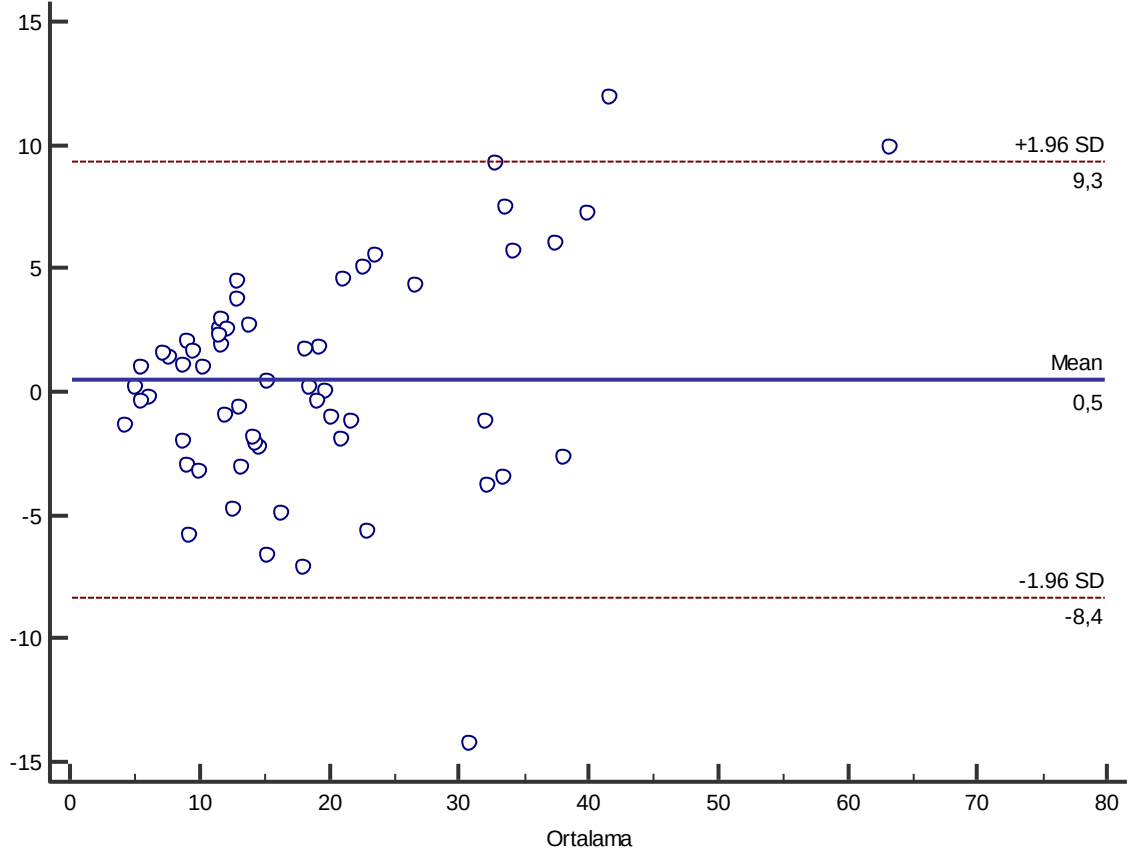
Şekil 11: Kemilüminesans ve HPLC yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.

Kemilüminesans ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı Şekil 12’de gösterilmiştir.



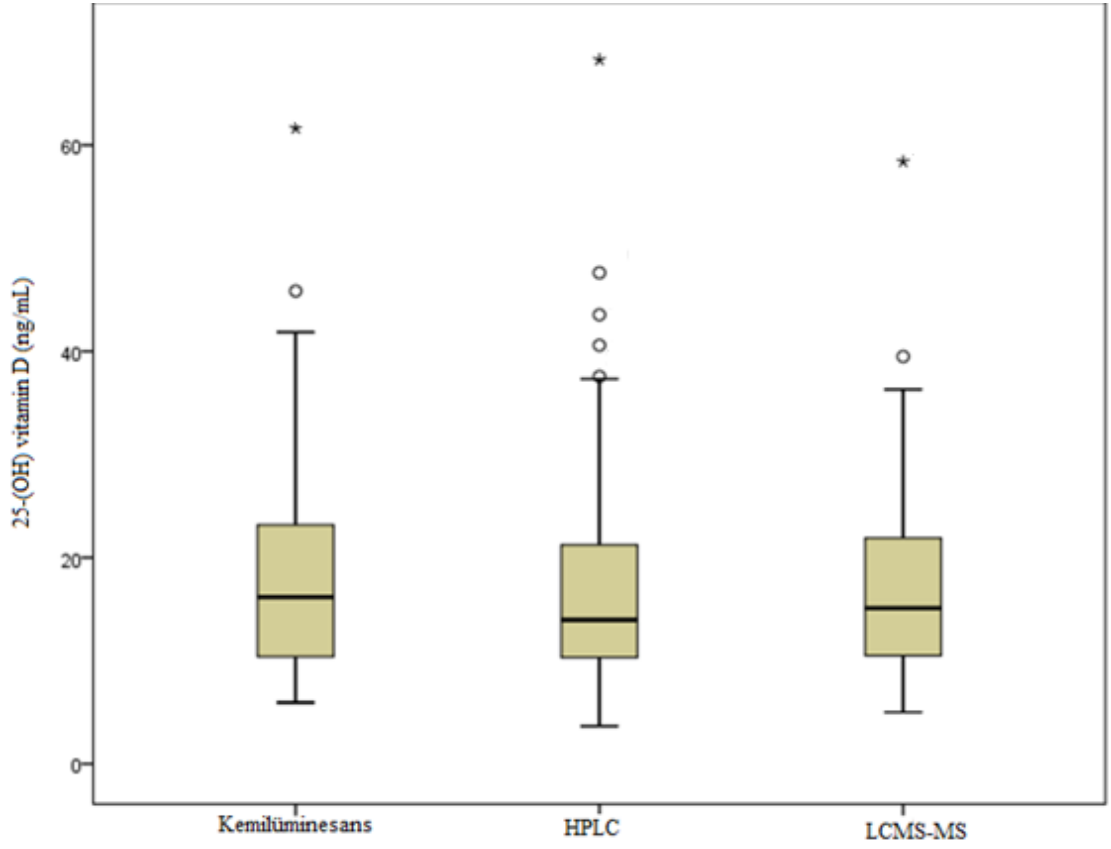
Şekil 12: Kemilüminesans ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı Şekil 13’de gösterilmiştir.



Şekil 13: HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımı.

D vitamini düzeylerinin kemilüminesans, HPLC ve LC-MS/MS yöntemleriyle ölçüm sonuçları Şekil 14’de verilmiştir.



Şekil 14: Kemilüminesans, HPLC ve LC-MS/MS yöntemleriyle D vitamini düzeyleri.

Şekil 14’de dikdörtgeni oluşturan orta, alt ve üst yatay çizgiler sırası ile ortanca, 25. ve 75. persentilleri, dikey çizgiler interkuartil aralığı, “o” uç değerleri ve “*” dışlak değerleri göstermektedir.

5.TARTIŞMA ve SONUÇ

Vücutta birçok fizyolojik ve patolojik olayları açıklayabilmek için son 30 yıldır 25(OH) vitamin D metabolitlerinin ölçülmesi önem kazanmıştır. Hastalıkların prognozunda oldukça önemli olduğundan 25(OH) vitamin D düzeyinin tayininde bir standardizasyon gereği doğmuştur. Bu amaçla 25(OH) Vitamin D ölçümü için birçok metod geliştirilmiştir.

1971 yılında ilk defa 25(OH) vitamin D ölçümü için bir yöntem bildirilmiştir. bu yöntem vitamin D bağlayıcı proteinin bağlayıcı olduğu kompetitif bağlama yöntemidir (77). Bu yöntemde vitamin D bağlayıcı protein 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'e eşit olarak bağlanır. Bu durum bir avantaj olsa da yöntemin ölçümde ölçümde 24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D, 23 lactone gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaması uygulamada kısıtlılık oluşturur. Ayrıca 10 gün gibi uzun inkübasyon süresinin olması da diğer bir dezavantajdır. Ancak bu yöntem silisik asit kromatografisinin kullanıldığı yarışmalı protein bağlama yöntemi olarak geliştirilerek inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür (36,77,78).

1977'de UV absorpsiyon yolu ile ölçüm yapan HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemdeki en önemli avantaj; interferans veren lipidleri ve vitamin D metabolitlerini uzaklaştırarak 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü ölçebilmesini sağlamasıdır. Bununla birlikte yöntemi uygulayabilmek için iyi bir donanım ve deneyim gerektirmektedir (77,78).

1985'te örneğin saflaştırılmasına gerek duyulmayan Radioimmunoassay (RIA) yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin sonuçları HPLC ölçümü ile uyumludur ve uygulaması da kolaydır. RIA yöntemi, yarışmalı protein bağlama ölçümünde olduğu gibi 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü eşit olarak tanımaktadır. Ayrıca diğer polar D vitamini metabolitlerini ölçebilmektedir. Bu yüzden 25(OH) vitamin D ölçümleri bu yöntem uygulandığında %10-20 fazla bulunmaktadır (77-79).

Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) yönteminde kompetitif protein bağlama ve RIA yöntemlerinde olduğu gibi 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ün yanında diğer polar D vitamini metabolitleri de ölçülmektedir. Kemiluminesans yöntemi ise 25(OH)D₂ ile

25(OH)D₃'e eşit miktarda özgündür fakat bu yöntemin maliyeti çok yüksektir (77). Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi (LC-MS/MS) yöntemi ile 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü kantitatif olarak ölçülebilmektedir. Ayrıca duyarlılığı ve özgüllüğünün yüksek olması nedeniyle vitamin D ölçümünde referans yöntem olarak gösterilmektedir (80).

Son zamanlarda 25(OH)D ölçümü için immunolojik tekniklerin ve kromatografik yöntemlerin kullanıldığı laboratuvar yöntemler tekrar değerlendirilmektedir. Birçok araştırmacı 25(OH)D ölçümünde uluslararası bir standartlaştırmanın gerekli olduğunu vurgulamaktadır. Bu yüzden klinik değerlendirme için RIA yöntemini savunmaktadırlar (81). Ancak radyoaktif materyallerin kullanılmadığı LC-MS/MS yöntemi vitamin D ölçümleri için son derece gerçek sonuçlar vermektedir. MS yöntemi rutin laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılmaz, daha çok araştırma amaçlı çalışmalar da kullanılmaktadır. Çalışmalarda GC-MS (Gas chromatography mass spectroscopy) yöntemi plazmadaki vitamin D metabolitlerinin analizi için kullanılsa da günümüzde analizin karmaşıklığı yüzünden tercih edilmemektedir (82).

Yapılan son çalışmalarda LC-MS/MS yönteminin duyarlılık ve özgünlüğünün birçok analit için yüksek olduğu bildirilip bu yöntemin immunassay yöntemine alternatif olabileceği savunulmuştur. Bu sebeple LC-MS/MS yöntemi 25(OH) vitamin D ölçülmesinde referans yöntem olarak gösterilmektedir (80).

Yaptığımız çalışmada 57 gönüllünün vitamin D düzeyleri ölçülüp sonuçlar kemilüminesans, HPLC ve LC-MS yöntemleriyle karşılaştırdı.

Üç yöntemle elde edilen 25(OH) vitamin D ölçüm sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. Her üç ölçüm sisteminden elde edilen değerler ICC istatistiksel analiz, ile değerlendirildi ve üç yöntem arasında uyum saptandı (ICC >0.80, p<0.05). D vitamini ölçüm yöntemleri ikili olarak karşılaştırıldığında birbirlerine en uyumlu yöntemin HPLC ve LC-MS/MS olduğu görüldü (ICC=0.961).

Gary L. ve ark. da vitamin D metabolitlerinin doğru ölçülmesinde LC-MS/MS ve HPLC yöntemlerinin tercih edilmesi gerektiğini savunmaktadır (83). Alan H. Terry ve ark. yaptıkları çalışmada ise referans yöntem olarak kemiluminesans alınmış ve LC/MS/MS ile karşılaştırıldığında sonuçların uyumlu olduğu bulunmuştur (84). Sahillioğlu ve ark. yaptıkları çalışmada da bu iki yöntem karşılaştırıldığında paralel sonuçlar elde edilmiştir (85). Her iki sonuçta da kemiluminesans yönteminin LC-/MS/MS

yönteminden yüksek sonuçlar verdiği görülmektedir. Bu durum kemiluminesans yöntemin total 25(OH) D'yi ölçmesinden kaynaklanmaktadır.

Yaptığımız çalışmada ikili olarak yöntemler arasındaki farkın dağılımını incelediğimizde kemilüminesans ve HPLC yöntemleri arasında 5 örnek dışındaki tüm örneklerin ölçüm sonuçlarının ± 2 SD olduğu görülmektedir (Şekil 11). Kemilüminesans ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımında 1 örnek dışındaki tüm sonuçlar ± 2 SD aralığındadır (Şekil 12). HPLC ve LC-MS/MS yöntemleri arasındaki farkın dağılımında ise üç örnek dışındaki sonuçların ± 2 SD olduğu saptanmıştır (Şekil 13).

Sonuç olarak yaptığımız çalışmada sonuçların birbirinden farklı olmadığı ve her üç yöntemin birbirine uyumlu olduğu bulundu. Bu nedenle her üç yöntemle yapılan D vitamini ölçümünün güvenilir olduğu gösterilmektedir. Çalışmamızda rutin laboratuvarlarda vitamin D ölçümünde her üç yöntemin kullanılabileceği görülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1678S-88S.
2. Jameson JL, Weetman AP. Tiroid bezi hastalıkları. In: Braunwald E, Fauci AS, Kasper DL, et al., eds. *Harrison İç Hastalıkları Prensipleri*. 15 ed. İstanbul: Nobel Matbaacılık, 2004:2060-75.
3. Burnand B, Sloutskis D, Gionali F. Serum 25-hydroxyvitamin D: distribution and determinants in Swiss population. *J Nutr* 1992;56:537-40.
4. Değişli CM. Kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda verilen D vitamini tedavisinin dolaşımdaki hsp-90 ve ck-18 düzeyleri üzerine etkisi [Doktora tezi]. Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, 2010.
5. Gülcü D. Tip 1 diabetes mellitus hastalarında D vitamini düzeyleri [Uzmanlık tezi]. T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, 2011.
6. Koo WWK, Tsang RC. Calcium and Magnesium Homeostasis. In: MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD, eds. *Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott W&W, 2005:847-75.
7. Javorsky BR, Maybee N, Padia SH, Dalkin AC. Vitamin D deficiency in gastrointestinal disease. *Pract Gastroenterol* 2006;36:52-72.
8. Kruse K. Endocrine control of calcium and bone metabolism. In: Brook C, ed. *Clinical Paediatric Endocrinology*. 3. ed. Oxford: Blackwell Science Ltd, 1995:712-43.
9. Hatun Ş, Bereket B, Çalıkoğlu AS, Özkan B. Günümüzde D vitamini yetersizliği ve nutrisyonel rikets. *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi* 2003;46:224-41.
10. Hatun S, Ozkan B, Orbak Z, Doneray H, Cizmecioglu F, Toprak D, Calikoglu AS. Vitamin D deficiency in early infancy. *J Nutr* 2005;135(2):279-82.
11. Buğrul B. Süt çocukluğu dönemindeki bebeklerin annelerine verilen D vitaminin çocuklardaki D vitamini düzeyine etkisi [Uzmanlık tezi]. İstanbul Üniversitesi Çocuk sağlığı Enstitüsü, 2011.

12. Artaza J, Mehrora R, Norris K. Vitamin D and cardiovascular system. Clin J Am Soc Nephrology 2009;4:1515-22.
13. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: are we ignoring the evidence? Br J Nutr 2003;89(5):552-72.
14. Aksoy M. *Beslenme Biyokimyası*. 3. ed. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 2000, Bishop N. Rickets today--children still need milk and sunshine. N Engl J Med 1999;341(8):602-4, Lips P. Vitamin D physiology. Prog Biophys Mol Biol 2006;92(1):4-8.
15. Erçin S. 1-24 ay arası sağlıklı süt çocuklarında serum 25-OHD düzeyi [Uzmanlık Tezi]. T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, 2008.
16. Baysal A. *Beslenme*. 13. ed. Ankara: Hatipoğlu Yayınevi, 2011.
17. Fitzpatrick S, Sheard NF, Clark NG, Ritter ML. Vitamin D-deficient rickets: a multifactorial disease. Nutr Rev 2000;58(7):218-22, Şimşek E, Kocabay K. Calcium, phosphorus and magnesium homeostasis. Türkiye Klinikleri J Pediatr 2002;11:211-20, Nowson CA, Margerison C. Vitamin D intake and vitamin D status of Australians. Med J Aust 2002;177(3):149-52.
18. Hochberg Z. Requirements for vitamin D in an indoors culture. Highlights 2004;12:19-23.
19. Goldblatt H, Soames KN. A study of rats on a normal diet irradiated daily by the mercury vapor quartz lamp or kept in darkness. Biochem J 1923;17:294-7.
20. Windaus A, Linsert O, Luttringhaus A, Weidlinch G. Über das krystallisierte Vitamin D2. LJ Ann Chem 1932;492:226.
21. Tosunbayraktar G. Farklı beden kitle indeksine sahip bireylerde D vitamini ve serum kalsiyum düzeylerinin değerlendirilmesi [Yüksek lisans tezi]. T.C. Başkent Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Beslenme Ve Diyetetik Bilim Dalı, 2013.
22. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. Am J Clin Nutr 2004;80(6 Suppl):1689S-96S.
23. Güleken N. Kanser hastalarında D vitamini, kalsiyum ve fosfor düzeyleri ile D vitamini reseptörü polimorfizmin araştırılması [Yüksek lisans tezi]. T.C. Gaziantep Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Bölümü, 2012.
24. İliçin G, Ünal S, Biberoglu K, Akalın S, Süleymanlar G. *İç Hastalıkları Cilt 2*. 2. ed. Ankara: Güneş Kitapevi, 2003.

25. Arık S. Hashimoto tiroiditinde 25 hidroksi D vitamini ve paratiroid hormon düzeyi [Uzmanlık tezi]. T.C. Sağlık Bakanlığı Göztepe Eğitim ve Araştırma Hastanesi II. Dahiliye Kliniği, 2008.
26. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *Am J Clin Nutr* 1999;69(5):842-56, McKenna MJ, Freaney R. Secondary hyperparathyroidism in the elderly: means to defining hypovitaminosis D. *Osteoporos Int* 1998;8 Suppl 2:S3-6.
27. Barnett E, Klein J. Bacterial infections of the respiratory tract. In: Remington J, Klein J, Wilson C, et al., eds. *Infectious diseases of the fetus and newborn infant*. 6. ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2006:297-316.
28. Koo WWK, Tsang RC. Calcium and Magnesium Homeostasis. In: MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD, eds. *Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn*. 6. ed. Philadelphia: Lippincott W&W, 2005:847- 75.
29. Holick MF, Chen TC. Vitamin D deficiency: a worldwide problem with health consequences. *Am J Clin Nutr* 2008;87(4):1080S-6S.
30. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. *Lancet* 1998;351(9105):805-6.
31. Işık AL. Yaşlı hastalarda D vitamini eksikliğinin total tiroidektomi sonrası hipokalsemi üzerine etkisi [Uzmanlık tezi]. T.C. İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı, 2013.
32. Hansen KE, Jones AN, Lindstrom MJ, Davis LA, Engelke JA, Shafer MM. Vitamin D insufficiency: disease or no disease? *J Bone Miner Res* 2008;23(7):1052-60.
33. Cavuldak Ş. Batı karadeniz bölgesinde mevsimlere göre farklı doz D3 vitaminin kullanımının serum 25 OH kolekalsiferol seviyeleri üzerine etkisi [Uzmanlık tezi]. T.C. Zonguldak Karaelmas Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2007.
34. Kurt A. Üreme çağındaki obez kadınlarda vitamin D düzeyi ve metabolik sendrom ilişkisi [Uzmanlık tezi]. T.C. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 2011.
35. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *Am J Med* 2002;112(8):659-62, Malabanan A, Veronikis I, Holick M. Severe generalized bone pain and osteoporosis in a premenopausal black female: effect of vitamin D replacement. *J Clin Densitometr* 1998;1:201-4.

36. Holick MF. Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol* 2009;19(2):73-8.
37. Bischoff-Ferrari HA, Giovannucci E, Willett WC, Dietrich T, Dawson-Hughes B. Estimation of optimal serum concentrations of 25-hydroxyvitamin D for multiple health outcomes. *Am J Clin Nutr* 2006;84(1):18-28.
38. Block GA, Port FK. Re-evaluation of risks associated with hyperphosphatemia and hyperparathyroidism in dialysis patients: recommendations for a change in management. *Am J Kidney Dis* 2000;35(6):1226-37.
39. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Altern Med Rev* 2005;10(2):94-111, Henderson A. Vitamin D and the breastfed infant. *J Obstet Gynecol Neonatal Nurs* 2005;34(3):367-72.
40. Brooke OG, Brown IR, Bone CD, Carter ND, Cleeve HJ, Maxwell JD, Robinson VP, Winder SM. Vitamin D supplements in pregnant Asian women: effects on calcium status and fetal growth. *Br Med J* 1980;280(6216):751-4.
41. Hollis BW, Wagner CL. Vitamin D requirements during lactation: high-dose maternal supplementation as therapy to prevent hypovitaminosis D for both the mother and the nursing infant. *Am J Clin Nutr* 2004;80(6 Suppl):1752S-8S.
42. Holick MF. Vitamin D: extraskeletal health. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2010;39(2):381-400, table of contents.
43. Küçükali Türkyılmaz A. Fibromiyalji hastalarında kemik mineral yoğunluğu ile serum D vitamini düzeyinin ağrı ve yaşam kalitesi üzerine etkisi [Uzmanlık tezi]. T.C. Sağlık Bakanlığı İstanbul Fizik Tedavi Rehabilitasyon Eğitim ve Araştırma Hastanesi III. Klinik, 2009.
44. Demir S. Türk populasyonunda vitamin D reseptör gen polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki [Yüksek Lisans tezi]. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, 2005.
45. McGrath J, Feron F, Eyles D, Mackay-Sim A. Vitamin D: the neglected neurosteroid? *Trends Neurosci* 2001;24(10):570-2, Hypponen E, Laara E, Reunanen A, Jarvelin MR, Virtanen SM. Intake of vitamin D and risk of type 1 diabetes: a birth-cohort study. *Lancet* 2001;358(9292):1500-3.
46. Kurdoğlu G. *D Vitamini eksikliği (Rahitis)*. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 1993.
47. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2009;94(1):26-34.

48. Misra M, Pacaud D, Petryk A, Collett-Solberg PF, Kappy M, Drug, Therapeutics Committee of the Lawson Wilkins Pediatric Endocrine S. Vitamin D deficiency in children and its management: review of current knowledge and recommendations. *Pediatrics* 2008;122(2):398-417.
49. Aguado P, del Campo MT, Garces MV, Gonzalez-Casaus ML, Bernad M, Gijon-Banos J, Martin Mola E, Torrijos A, Martinez ME. Low vitamin D levels in outpatient postmenopausal women from a rheumatology clinic in Madrid, Spain: their relationship with bone mineral density. *Osteoporos Int* 2000;11(9):739-44.
50. Jahnsen J, Falch JA, Mowinckel P, Aadland E. Vitamin D status, parathyroid hormone and bone mineral density in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol* 2002;37(2):192-9.
51. Cannell JJ, Vieth R, Umhau JC, Holick MF, Grant WB, Madronich S, Garland CF, Giovannucci E. Epidemic influenza and vitamin D. *Epidemiol Infect* 2006;134(6):1129-40.
52. Hughes DA, Norton R. Vitamin D and respiratory health. *Clin Exp Immunol* 2009;158(1):20-5.
53. Olgun H, Ceviz N, Ozkan B. A case of dilated cardiomyopathy due to nutritional vitamin D deficiency rickets. *Turk J Pediatr* 2003;45(2):152-4.
54. Zittermann A, Sabatschus O, Jantzen S, Platen P, Danz A, Dimitriou T, Scheld K, Klein K, Stehle P. Exercise-trained young men have higher calcium absorption rates and plasma calcitriol levels compared with age-matched sedentary controls. *Calcif Tissue Int* 2000;67(3):215-9.
55. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, Lu Z, Holick MF. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr* 2000;72(3):690-3.
56. Garland CF, Garland FC, Gorham ED, Lipkin M, Newmark H, Mohr SB, Holick MF. The role of vitamin D in cancer prevention. *Am J Public Health* 2006;96(2):252-61.
57. Adams JS, Hewison M. Update in vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab* 2010;95(2):471-8.
58. Aydin S, Aslan I, Yildiz I, Agachan B, Toptas B, Toprak S, Deger K, Oktay MF, Unuvar E. Vitamin D levels in children with recurrent tonsillitis. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol* 2011;75(3):364-7.
59. Kulie T, Groff A, Redmer J, Hounshell J, Schrager S. Vitamin D: an evidence-based review. *J Am Board Fam Med* 2009;22(6):698-706.

60. Bouillon R, Carmeliet G, Verlinden L, van Etten E, Verstuyf A, Luderer HF, Lieben L, Mathieu C, Demay M. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. *Endocr Rev* 2008;29(6):726-76.
61. Awumey EM, Mitra DA, Hollis BW, Kumar R, Bell NH. Vitamin D metabolism is altered in Asian Indians in the southern United States: a clinical research center study. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(1):169-73.
62. Morita R, Yamamoto I, Takada M, Ohnaka Y, Yuu I. [Hypervitaminosis D]. *Nihon Rinsho* 1993;51(4):984-8.
63. Bell NH, Shaw S, Turner RT. Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man. *J Clin Invest* 1984;74(4):1540-4.
64. Kurşun ÖS. Şişman çocuklarda D vitamini düzeyleri ve insülin direnci ile ilişkisinin araştırılması [Uzmanlık Tezi]. T.C. Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, 2008.
65. Joiner TA, Foster C, Shope T. The many faces of vitamin D deficiency rickets. *Pediatr Rev* 2000;21(9):296-302.
66. Felner EI, Marks JF, Germak JA. A variation of vitamin D deficiency in children. *J Pediatr Endocrinol Metab* 2001;14(2):203-6.
67. Imızoğlu N. Enalapril/hidroklortiazit ve enalapril/lerkanidipin'in HPLC yöntemi ile aynı anda analizi [Yüksek lisans tezi]. T.C. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı, 2014.
68. El-Shaboury SR, Saleh GA, Mohamed FA, Rageh AH. Analysis of cephalosporin antibiotics. *J Pharm Biomed Anal* 2007;45(1):1-19.
69. Skoog D, Holler FJ, Nieman T. *Principles of Instrumental Analysis*. 5th ed. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998.
70. Gündüz T. *İnstrümental Analiz*. 10. ed. Ankara: Gazi Yayınevi, 2007.
71. Sokolova LI, Chernyaev AP. Reversed-Phase HPLC Determination of Antibiotics of the Cephalosporin Series in Biological Objects. *Pharmaceutical Chemistry Journal* 2002;36:263-69.
72. Jehl F, Gallion C, Monteil H. High-performance liquid chromatography of antibiotics. *J Chromatogr* 1990;531:509-48.
73. Nikolin B, Imamovic B, Medanhodzic-Vuk S, Sober M. High performance liquid chromatography in pharmaceutical analyses. *Bosn J Basic Med Sci* 2004;4(2):5-9.

74. Pehourcq F, Jarry C. Determination of third-generation cephalosporins by high-performance liquid chromatography in connection with pharmacokinetic studies. *J Chromatogr A* 1998;812(1-2):159-78.
75. Doğan F. Peptitlerin Kütle Spektrometresindeki Parçalanmasına Metallerin Etkisi [Yüksek lisans tezi]. T.C. Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2013.
76. Hoffman E, Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications*. 4th ed. England: John Wiley & Sons Ltd, 2007.
77. Zerwekh JE. The measurement of vitamin D: analytical aspects. *Ann Clin Biochem* 2004;41(Pt 4):272-81.
78. Horst RL, Hollis BW. Vitamin D assays and their clinical utility. In: Holick MF, ed. *Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Totowa: NJ: Humana Press Inc, 1999:239-71.
79. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3149-51.
80. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D3 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2004;50(8):1415-7.
81. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, DeLuca HF, Drezner MK. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(7):3152-7.
82. Coldwell RD, Trafford DJ, Varley MJ, Kirk DN, Makin HL. Measurement of 25-hydroxyvitamin D2, 25-hydroxyvitamin D3, 24,25-dihydroxyvitamin D2 and 25,26-dihydroxyvitamin D2 in a single plasma sample by mass fragmentography. *Clin Chim Acta* 1989;180(2):157-68.
83. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clin Chem* 2006;52(6):1120-6.
84. Terry AH, Sandrock T, Meikle AW. Measurement of 25-hydroxyvitamin D by the Nichols ADVANTAGE, DiaSorin LIAISON, DiaSorin RIA, and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2005;51(8):1565-6.
85. Sahillioğlu B, Serdar MA, Erkal N, Erden G, Bakır F, Yıldırımkaaya MM, Işık S, Özüğuz U. 25-OH-Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrometrede Yöntem Geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. *Türk Biyokimya Dergisi* 2011;36(1):73-79.

ÖZGEÇMİŞ

1989 yılında Almanya’da Köln şehrinde doğdu. İlk ve orta eğitimini Almanya’da lise eğitimini ise Şanlıurfa’da olmak üzere çeşitli okullarda bitirdi. 2006 yılında Anadolu Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’ne başladı. 2011 yılında aynı bölümden mezun oldu. 2012 yılında Gaziantep Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı.