



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

**25-OH VİTAMİN D₃'ÜN ANALİTİK STANDARDİZASYONUNDA TEST
PERFORMANS KRİTERLERİNİN HPLC, RIA VE ELISA
YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. SERKAN PİRİNÇÇİ
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

DİYARBAKIR-2012



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

**25-OH VİTAMİN D₃'ÜN ANALİTİK STANDARDİZASYONUNDA TEST
PERFORMANS KRİTERLERİNİN HPLC, RIA VE ELISA
YÖNTEMLERİYLE KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. Serkan PİRİNÇÇİ
(TIPTA UZMANLIK TEZİ)

Prof. Dr. Abdurrahman KAPLAN
(Tez Danışmanı)

DİYARBAKIR-2012

İÇİNDEKİLER

	Sayfalar
İÇİNDEKİLER DİZİNİ	iii
ÖZET	iv
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT)	v
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	vi
TABLolar VE ŞEKİLLER	vii
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. D Vitamini	2
2.1.1. Vitamin D kaynakları	2
2.1.2. Vitamin D biyosentezi	3
2.1.3. Vitamin D sentez ve metabolizmasının düzenlenmesi	7
2.1.4. Vitamin D'nin biyolojik etkileri	9
2.1.5. Vitamin D'nin etki mekanizması	11
2.1.6. Vitamin D katabolizması	12
2.1.7. Vitamin D eksikliği	13
2.1.8. Vitamin D toksisitesi	13
2.2. HPLC	14
2.2.1. Kolonlar	16
2.2.2. Çözücü tankı	17
2.2.3. Pompalar	17
2.2.4. Enjektör	17
2.2.5. Detektör	17
2.2.6. Bilgisayar	18
2.3. ELISA	19
2.4. RIA	24
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	26
4. BULGULAR	29
5. TARTIŞMA	33
6 SONUÇ VE ÖNERİLER	37
7. KAYNAKLAR	38

ÖZET

AMAÇ: Vitamin D düzeyinin belirlenmesinde 25-OH Vitamin D ölçülmesi klinik bir belirleyici olarak kabul edilmiştir. Bu nedenle 25-OH Vitamin D'nin doğru ölçülmesi büyük önem arz etmektedir. Bu çalışmada, HPLC yöntemi için yöntem değerlendirme çalışması yapılmış, HPLC yöntemi geçerli kılınmış ve bu yöntem ELISA ve RIA yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEMLER: 25-OH Vitamin D ölçümünde yöntem geçerli kılma çalışması yapıldıktan sonra HPLC referans yöntem olarak kabul edilmiştir. Daha sonra HPLC yöntemi ELISA ve RIA yöntemleri ile karşılaştırılmıştır.

BULGULAR: 25-OH Vitamin D için HPLC yöntemiyle 2 seviyede gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıldı. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında %CV değerleri 5.93 ve 2.37, günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise 7.00 ve 2.60 bulunmuştur. Geri kazanım çalışması sonucu ortalama %95 (%93-96) bulunmuştur. HPLC yönteminin ELISA yöntemi ile karşılaştırılması sonucunda r değeri 0.36, p değeri ise 0.022, RIA yöntemi ile karşılaştırılması sonucunda ise r değeri 0.22, p değeri ise 0.174 bulunmuştur.

SONUÇ: HPLC yönteminin referans yöntem kabul edildiği çalışmada RIA yönteminin sonuçlarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı ve klinik çalışmalarda doğruluğunun yeterli olmadığı, ELISA yönteminin ise istatistiksel olarak anlamlı ve orta derecede uyumlu olduğu belirlendi.

ANAHTAR KELİMELE: 25-OH Vitamin D, HPLC, ELISA, RIA, Yöntem karşılaştırma

ABSTRACT

Objective: 25-OH Vitamin D measurement is the most common and valuable method when identifying Vitamin D status. On this account precise measurement of 25 OH Vitamin D is highly important. In this study, method evaluation process has been done for HPLC method, the method has been made valid and it is compared with ELISA and RIA methods respectively.

Material and Methods: After doing method validation study for 25-OH Vitamin D, HPLC is regarded as reference method. Then HPLC is compared with ELISA and RIA methods respectively.

Results: Repeatability study has been done in 2 levels, interassay and intraassay %CV values, for 25-OH Vitamin D. for interassay repeatability process, levels of %CV are found as 5.93 and 2.37. For intraassay repeatability process, levels of %CV are found as 7.00 and 2.60. Result of recovery assay is found as mean of %95 (%93-96). When comparing HPLC to ELISA, R value is found 0.36 and p value is found 0.022; when comparing HPLC to RIA, R value is found 0.22 and p value is found 0.174.

Conclusions: In this study which regards HPLC method as reference, it is found that RIA method is statistically differs significant from HPLC method and lacks precision in clinic studies while ELISA method is statistically insignificant from HPLC method but half precise.

Keywords: 25-OH Vitamin D, HPLC, ELISA, RIA, Method Comparison

SİMGELER VE KISALTMALAR

Ca: Kalsiyum
CBP: Kalsiyum bağlayıcı protein
CEDIA: Cloned enzyme donor immunoassay
CV: Coefficient of variation
CYP27A1: Cytochrome P450, family 27, subfamily A, polypeptide 1
DNA: Deoksi ribonükleik asit
EIA: Enzyme immunoassay
ELISA: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EMIT: Enzyme –multiplied immunoassay technique
GC: Gaz Kromatografisi
HPLC: High Performance Liquid Chromatography
HT: Hipertansiyon
LC: Likit Kromatografisi
P: Fosfat
PTH: Parathormon
RIA: Radioimmunoassay
RNA: Ribonükleik asit
RXR: Retinoid X reseptör
TLC: İnce Tabaka Kromatografisi
UV: Ultraviyole
VDBP: Vitamin D bağlayıcı proteine
VDR: Vitamin D reseptör
VDRE: Vitamin D yanıt elemanı

TABLolar VE ŞEKİLLER

Tablo 1. Vitamin D ve plazma metabolitleri

Tablo 2. 1,25(OH)₂D₃'ün Sentezini Arttıran ve Azaltan Etkenler

Tablo 3. HPLC'de kullanılan detektörlere örnekler

Tablo 4. ELISA protokolleri

Tablo 5. Gün-içi tekrarlanabilirlik deneyinde elde edilen 25-OH Vitamin D değerleri

Tablo 6. Günler-arası tekrarlanabilirlik deneyinde elde edilen 25-OH Vitamin D değerleri

Tablo 7. Geri kazanım çalışması sonuçları

Tablo 8. HPLC, ELISA ve RIA yöntemleriyle çalışılan örneklere ait veriler

Şekil 1. Kolekalsiferol ve ergokalsiferol

Şekil 2. Kolekalsiferol ve ergokalsiferol sentezi

Şekil 3. 7-dehidrokolesterol ve ergosterol

Şekil 4. 1,25 (OH)₂ Vitamin D sentezi

Şekil 5. Vitamin D metabolizması ve etkileri

Şekil 6. Hipokalsemi ve vit D sentezi

Şekil 7. Vitamin D'nin VDR aracılı etki mekanizması

Şekil 8. Kromatografi türleri

Şekil 9. Grafikselsel olarak ayırma işlemi

Şekil 10. HPLC sisteminin basit şematik gösterimi

Şekil 11. Kolon iç yapısı

Şekil 12. Sıvı kromatograflarda bilgisayarların fonksiyonları

Şekil 13. CEDIA

Şekil 14. EMIT

Şekil 15. Yarışmalı ELISA

Şekil 16. Yarışmasız ELISA (Sandviç yöntemi)

Şekil 17. RIA'da reaksiyon şekli

Şekil 18. A. 25-OH Vitamin D için 3.75-480 ng/ml için lineerite grafiğı

B. 25-OH Vitamin D için 3.75- 60 ng/ml için lineerite grafiğı

Şekil 19. A. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve ELISA yöntemleri arasındaki dağılımı. B. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği.

Şekil 20. A. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve RIA yöntemleri arasındaki dağılımı. B. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve RIA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği.

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ortalama yaşam süresinin uzaması ile birlikte ileri yaş popülasyonu ve bununla beraber ortaya çıkan sağlık sorunları önem kazanmaktadır. Uzayan yaşam süresi sebebiyle Osteoporoz dünyanın birçok yerinde major halk sağlığı problemlerinden biri olarak kabul edilmektedir (1). D vitamini eksikliğinin Osteoporoz için bir risk faktörü olduğu bilinmektedir. İleri yaşta olduğu gibi çocukluk çağı döneminde de Vitamin D'nin rolü önemlidir. Rikets, çocukluk çağında görülen büyümekte olan organizmanın, kalsifikasyona hazır iskelet sistemindeki mineralizasyonun gecikmesi sonucu ortaya çıkan patolojik bir durumdur. Besinlere D vitamini eklenmesi ve sosyo-ekonomik koşulların düzelmesiyle ekzojen rikets görülme sıklığı belirgin ölçüde azalmıştır (2).

Bu bilgiler ışığında Vitamin D'nin yaşamın her döneminde önemli role sahip olduğu görülmektedir. Bu nedenle Vitamin D'nin doğru ölçümü hem hastalıkların tanısında, hem de tedavi ve takipte büyük önem arz etmektedir.

Bu amaçla laboratuarlarda yeni bir yöntem kurulacağı zaman yöntem değerlendirme çalışması yapılır. Yöntem değerlendirme çalışmasındaki temel amaç, kurulacak yöntemin sebep olacağı analitik hataların oranını belirlemek ve bunların izin verilebilen hata oranıyla karşılaştırmaktır. Bir yöntemi uygularken ortaya çıkabilecek hatalar rastgele hata (RE), sistematik hata (SE) ve toplam hata (TE)'dir. Bu hataları saptamak için birtakım deney protokolleri vardır. Bu protokoller uygulanarak hata miktarı belirlenir. Rastgele hata için; tekrarlanabilirlik deneyleri, sistematik hata için; interferans, geri kazanım ve yöntem karşılaştırma deneyleri yapılarak hata düzeyi tespit edilir. Bu deneysel çalışmalar sonucunda saptanan hata düzeyi, o derişimde izin verilebilen hata düzeyinden küçük bulunduğu takdirde yeni yöntemin performansının yeterli olduğuna karar verilir (3, 4).

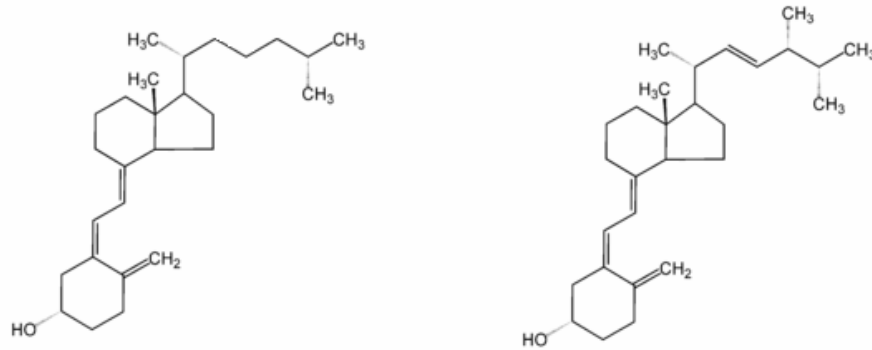
Çalışmamızda HPLC yöntemiyle 25-OH Vitamin D için yöntem değerlendirme ve geçerli kılma çalışması yapılmış ve HPLC yöntemi ELISA ve RIA yöntemleriyle karşılaştırılmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. D Vitamini

Kalsiyum, fosfor ve kemik metabolizmasının en önemli fizyolojik düzenleyicilerinden olan D vitamini, serum kalsiyum düzeyinin düzenlenmesinde PTH (Parathormon) ile sinerjik etki göstermekte ve kemik mineralizasyonuna katkıda bulunmaktadır. D vitamininin biyolojik etkileri, steroid hormonlara benzer şekilde oluşmaktadır (5).

Bir ön hormon olan D vitamininin, kolekalsiferol (vitamin D3) ve ergokalsiferol (vitamin D2) olmak üzere iki kaynağı vardır. Bu iki bileşik arasındaki tek fark ergosterolün yan zincirindedir, bu yan zincir doymamış (21. ve 22. karbonlar arasında) olup fazladan metil grubu içerir (5, 6) (Şekil 1). Vitamin D2 ve D3'un her ikisi de benzer yolla metabolize olduklarından dolayı ortak bir isimle, D vitamini olarak adlandırılırlar (7).



Şekil 1. Kolekalsiferol ve ergokalsiferol (8).

2.1.1. Vitamin D kaynakları

Vitamin D diyetle alınabildiği gibi vücutta da sentezlenebilmektedir. Bitkilerde ergokalsiferol, hayvan dokularında ise kolekalsiferol vitamin D kaynaklarıdır (12). Genel olarak sardalya, uskumru, somon ve ton balığı gibi yağlı balık ürünleri,

yumurta sarısı, süt, yeşil soğan, brokoli, maydanoz ve su teresi D vitamini yönünden zengindir (9).

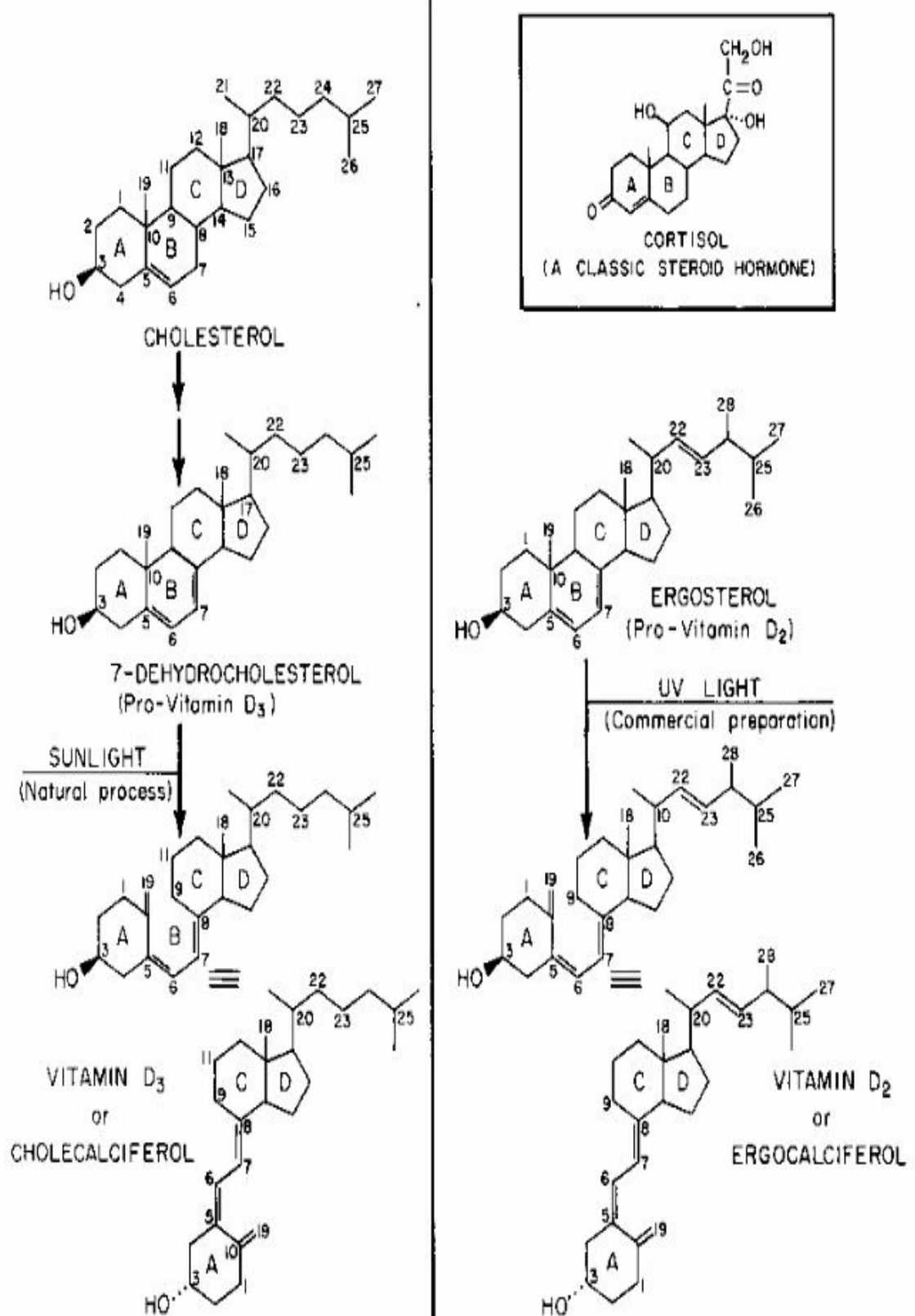
Vitamin D diyetle alınması dışında, deride kolesterol metabolizmasında bir ara ürün olan 7-dehidrokolesterolün güneş ışığı tarafından fotoliziyle de oluşur (10, 11). Normal koşullar altında insan vücudundaki D vitamininin %90-95'i güneş ışınlarının etkisiyle sentezlenir. Özellikle besinlere katılmadıkça diyetle alınan vitamin D'nin büyük bir önemi yoktur. Bu sebeple güneş ışığı temel kaynaktır ve güneş ışığından yeterince faydalanılırsa ilave D vitamini almaya gerek yoktur (9, 12).

2.1.2. Vitamin D biyosentezi

D vitamininin biyosentezi temel olarak 3 yerde gerçekleşmektedir. Deride başlayan D vitamini sentezi daha sonra karaciğer ve böbrekte hidroksilasyon reaksiyonlarıyla devam eder ve aktif vitamin D oluşur (8, 11).

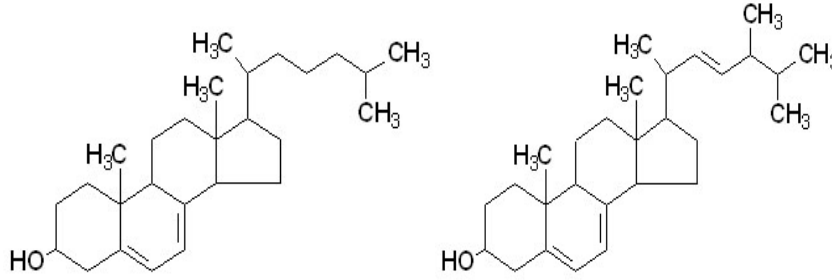
D2 vitamini (Ergokalsiferol), mayada bulunan ergosterolün UV ışığına maruz tutulmasıyla oluşturulan ticari bir üründür. D2 vitamini yapısal olarak D3'e benzer, sterol halkasına bağlı zincirde ufak değişiklikler vardır ve D2 genelde besinsel destekleyici olarak süt ve tereyağı gibi besin maddelerine eklenir (8, 10).

D3 vitamininin sentezinde ise öncelikle 290-310 nm dalga boyundaki ışınların etkisiyle epidermiste 7-dehidrokolesterolün (proD3 vitamini) non-enzimatik fotolizi sonucu previtamin D3 sentezlenir (4). Güneşe bir süre maruz kalındıktan sonra previtamin D3 uzunca bir süre termal izomerizasyona uğrar ve vitamin D3 sentezlenir (Şekil 2). Deride previtamin D3 oluştuğundan sonra ya vitamin D3 oluşur yada inaktif metabolitlere dönüşür. Bu durum gereksiz vitamin D sentezini önleyerek organizmayı intoksikasyondan koruyan fizyolojik bir kontrol mekanizmasıdır (12, 13)



Şekil 2. Kolekalsiferol ve ergokalsiferol sentezi (14).

Ergosterolün 7-dehidrokolesterolden farkı ergosterolün fazladan bir çift bağının ve metil grubunun bulunmasıdır (5, 6) (Şekil 3).



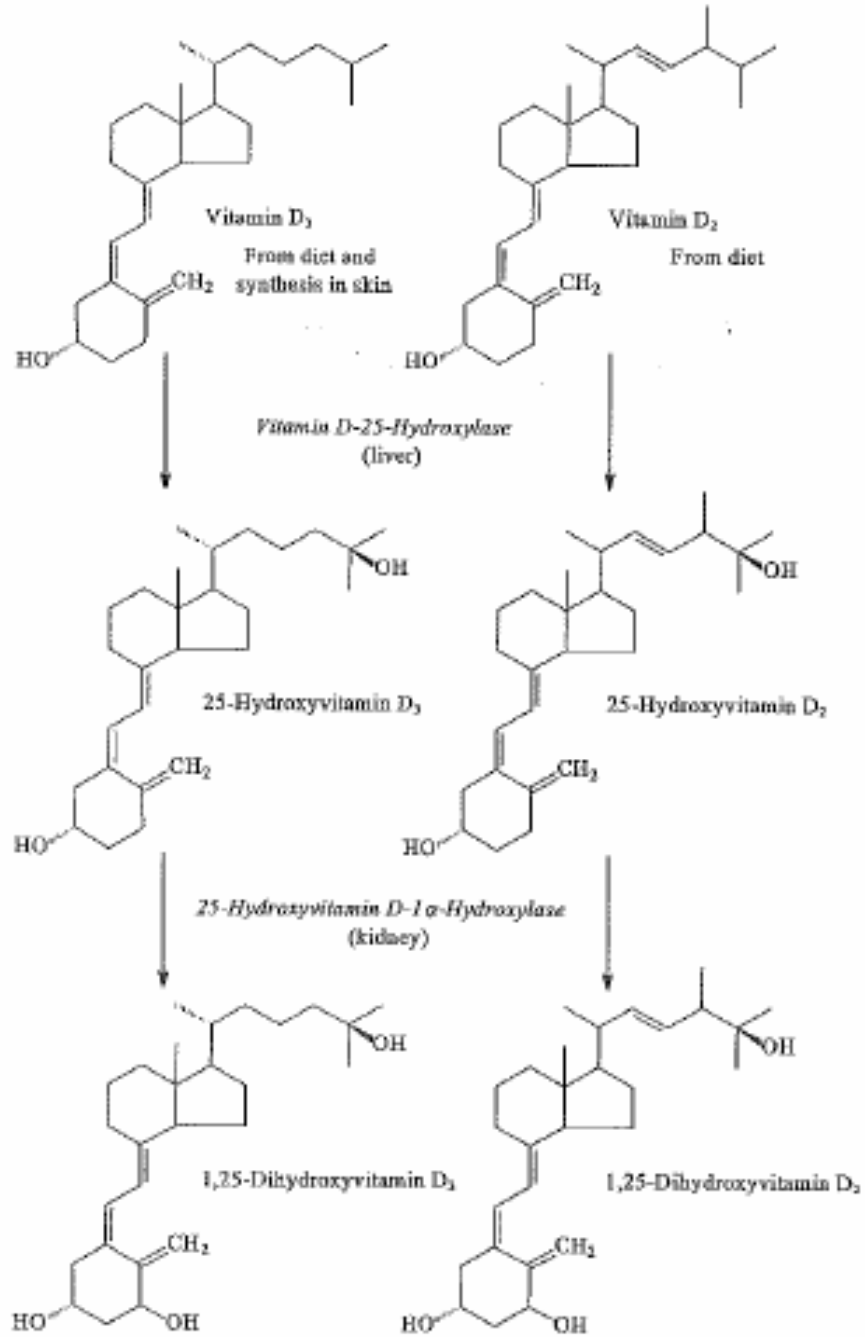
Şekil 3. 7-dehidrokolesterol ve . ergosterol (8).

Vitamin D deride sentezlendikten sonra hidroksilasyon için karaciğere taşınmalıdır. Vitamin D'nin tüm formları %85-88 oranında transkalsiferin adı da verilen vitamin D bağlayıcı proteine (VDBP), %12-15 oranında da albumine bağlanmakta ve genel dolaşıma katılarak karaciğere gelmektedir (5, 9, 13). VDBP α -globülin yapısında olup karaciğerde sentezlenir (9). VDBP, D vitamini metabolitlerine karşı yüksek afiniteye sahiptir, öyleki normal durumlarda yaklaşık olarak 25OH-D ve 24,25(OH)₂-D'nin %0.03'ü ve 1,25(OH)₂-D'nin %0.4'ü serbesttir (8, 13). Ayrıca D vitamini gastrointestinal sistemden etkin bir şekilde emilmektedir. Emilim sonrası Vitamin D doğrudan şilomikronlara bağlanır ve başlangıçta lenfatik yolla taşınır. Buda aynı şekilde VDBP ile karaciğere taşınır (6, 8, 9, 12).

7-dehidrokolesterol ve ergosterolden sentezlenen kolekalsiferol (vitamin D3) ve ergokalsiferol (vitamin D2) biyolojik olarak aktif değildirler. Biyolojik aktivitelerini gösterebilmeleri için metabolik olarak değişikliğe uğrarlar. Önce karaciğerde sonra böbrekte hidroksilasyon reaksiyonu ile aktif vitamin D şekline çevrilirler (8, 11). Bu aktivasyon olayının ilk basamağında kolekalsiferol ve ergokalsiferolün 25. karbonu karaciğerde özel bir hidroksilaz tarafından 25-hidroksikolekalsiferol (kalsidiol) yapmak üzere hidroksillenir (5, 6, 11, 15). 25-hidroksilasyonun %90'ı karaciğerde (CYP27A1, CYP2C11) gerçekleşirken %10'u fibroblast, böbrek, duodenum ve kemik gibi diğer dokularda (CYPA1) gerçekleşir (9).

Karaciğerde oluşan 25-OH D etkili bir bileşik değil, zayıf bir agonisttir. Tam bir biyolojik etkinlik için, halka yapısının (A halkasının) 1. karbonu bir hidroksilasyona

daha uğratılarak 1,25-dihidroksikolekalsiferol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$)'e dönüşmesi gerekir. Bu reaksiyon böbrekte proksimal tüp hücrelerinin mitokondrilerinde bulunan ve kompleks bir monooksijenaz sistemi olan 1- α hidroksilaz (CYP27B1) ile katalizlenmektedir (5, 6, 11). Bu basamak aktif hormon üretilmesi için hız kısıtlayıcı basamaktır (15).



Şekil 4. $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D sentezi (8).

Böbreklerde 1,25(OH)₂D₃'ün yanı sıra D vitamininin diğer bazı hidroksilasyon ürünleri de oluşmaktadır. Böbreklerde bulunan 24-hidroksilaz ile 25-hidroksikolekalsiferol 24,25-dihidroksikolekalsiferole, 1,25(OH)₂D₃ ise 1,24,25 trihidroksikolekalsiferole dönüştürülmektedir (5).

25(OH)D₃ dolaşımdaki D vitamininin büyük kısmını oluşturur ve karaciğerde depo edilen inaktif formdur (9, 12). Kas ve yağ dokusunda depolanmış olan vitamin D ile bir denge halindedir (4). 1,25(OH)₂D₃ etki yönünden 25(OH)D₃'ten 100 kat daha güçlü iken, 25(OH)D₃ konsantrasyonu 1,25(OH)₂D₃ konsantrasyonunun yaklaşık olarak 1000 katıdır (6, 8, 16). 1,25(OH)₂D₃'ün fonksiyonu serum kalsiyum ve fosfor konsantrasyonlarını, kemik hücre farklılaşmasını ve proliferasyonunu düzenlemektir (17).

25(OH)D₃, vücudun vitamin D havuzu hakkında en iyi bilgiyi veren parametredir ve 15-20 günlük bir yarı ömre sahiptir (7, 17) (Tablo 1). 25(OH)D₃'ün bir kısmı ise 24-hidroksilaz aktivitesi ile 24,25 dihidroksivitamin D'ye dönüşerek inaktive olur (8).

Tablo 1. Vitamin D ve plazma metabolitleri (8).

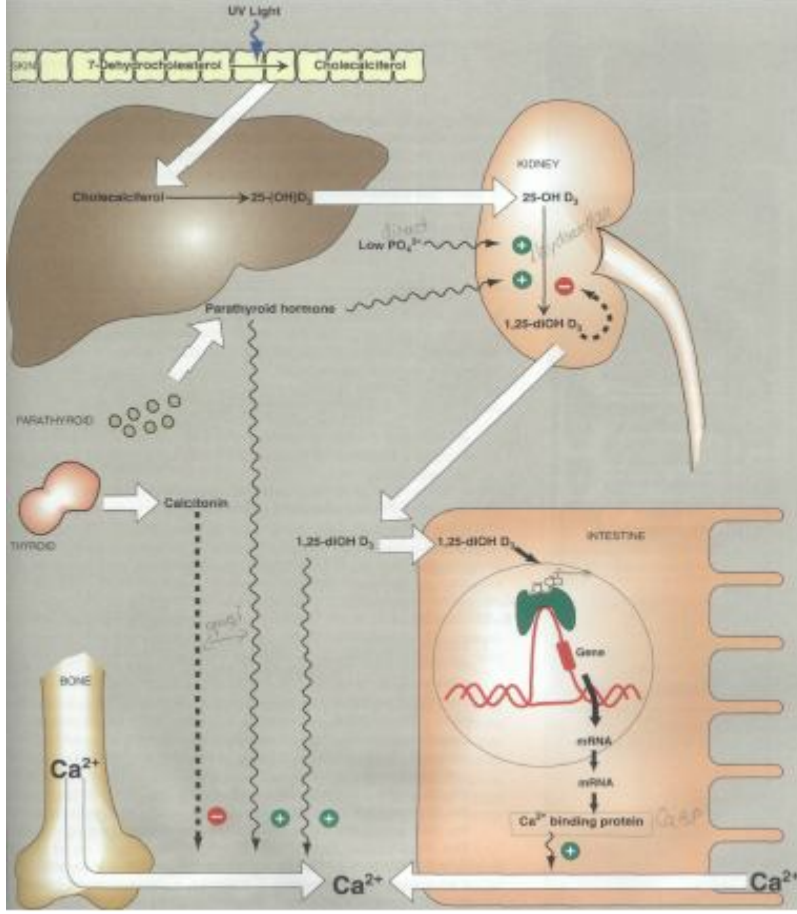
Bileşik	Konsantrasyon	Serbest Form(%)	Yarılanma Ömrü
Vitamin D (ng/mL) (nmol/L)	< 0.2 - 20 <0.5 - 52	---	1-2 gün
25-OH Vit. D (ng/mL) (nmol/L)	10 – 65 25 – 162	0.03	2-3 hafta
1,25-OH Vit D (pg/mL) (pmol/L)	15 – 60 36 – 144	0.4	4-6 saat

2.1.3. Vitamin D sentez ve metabolizmasının düzenlenmesi

Diğer steroid hormonlarda olduğu gibi 1,25(OH)₂D₃ de feed-back mekanizmalar ile sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (5, 6) (Şekil 5).

1,25(OH)₂D₃ üretimini düzenleyen temel faktörler; serum kalsiyum ve fosfor düzeyi, PTH ve 1,25(OH)₂D₃ düzeyidir. Bunların yanında hücre içi kalsiyum ve fosfor düzeyleri ile de ilgilidir. Düşük serum Ca ve P düzeyleri 1,25(OH)₂D₃ sentezini artırırken, serum P düzeyi yükseldiğinde 1,25(OH)₂D₃ sentezi durmakta, 24,25(OH)₂D₃ sentezi artmaktadır. 1,25(OH)₂D₃ miktarı yüksekse negatif feed-back

ile kendi sentezini durdurmaktadır. Kan Ca düzeyi düştüğünde ise PTH üretimi artarak böbrekte $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ üretimi artırılmaktadır (Şekil 6). $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezini arttıran ve azaltan etkenler Tablo 2’de gösterilmektedir.

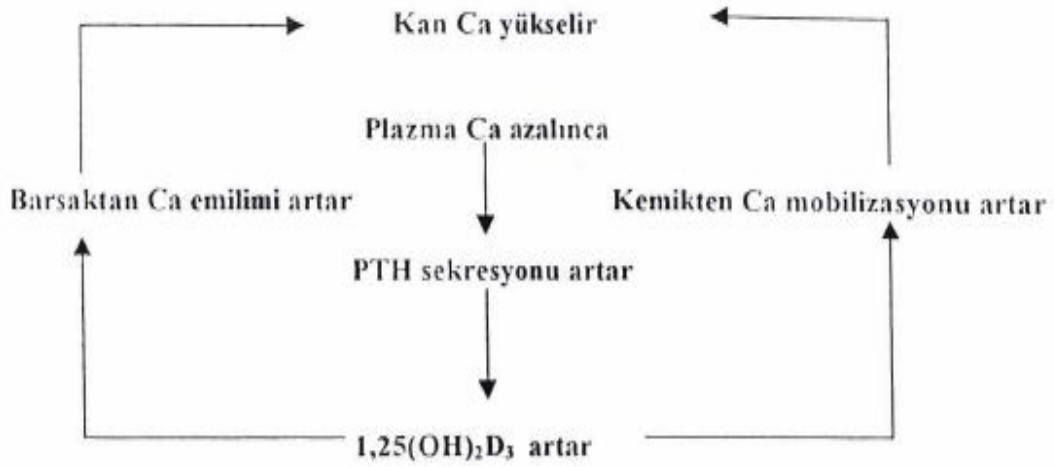


Şekil 5. Vitamin D metabolizması ve etkileri (11).

Tablo 2. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ ün Sentezini Arttıran ve Azaltan Etkenler (18)

Arttıran faktörler	Azaltan faktörler
Parathormon	Kan Ca yüksekliği
Kalsitonin	Kan P yüksekliği
Büyüme hormonu	Kan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ yüksekliği
Östrojen	Stronsiyum
Gebelik	Alüminyum
Laktasyon	Kadmiyum
Proksimal tübülde Ca ve P düşüklüğü	Kurşun

Aktif D vitamini olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ sentezlenmesinde temel kontrol noktası böbreklerdeki $1-\alpha$ hidroksilaz enziminin aktivitesidir (5). $1-\alpha$ hidroksilaz , D vitamini düzeyi ile PTH ve kalsitonin ile kontrol edilen kalsiyum/fosfor oranı tarafından düzenlenir (8). Enzimatik aktivitenin artışına yol açan hipokalsemi gibi durumlarda serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyi artmaktadır (Şekil 6). Bu etki, hipokalsemiye yanıt olarak ortaya çıkan PTH'a ihtiyaç duyar. Ayrıca hipofosfatemide de $1-\alpha$ hidroksilaz etkinliği uyarılsa da bu etki hipokalseminin sağladığından daha düşüktür (5, 6, 11).



Şekil 6. Hipokalsemi ve vit D sentezi (18).

D vitamini alımı arttıkça 25 hidroksilasyon hızı azalmaktadır. Yüksek dozda D vitamini alındığında $25(\text{OH})\text{D}_3$ sentezindeki bu hız regülasyonu yeterli olmamakta ve D vitamini toksisitesi meydana gelebilmektedir (12).

Serum Ca, P, PTH düzeyleri normal olduğunda $25(\text{OH})\text{D}_3$ ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $24-\alpha$ hidroksilaz enzimi ile biyolojik olarak inaktif formlara metabolize olmaktadır (12).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kendi üretiminin önemli bir düzenleyicisidir. Yüksek $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyleri renal $1-\alpha$ hidroksilazı inhibe ederek $24-\alpha$ hidroksilazı uyarır. Bu enzim etkin olmadığı düşünülen $24,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ oluşumuna yol açar (5, 6).

2.1.4. Vitamin D'nin biyolojik etkileri

D vitamininin vücuttaki etkisi temel olarak kemik, barsak ve böbrekte görülür.

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ kemik dokusunda, kemik mineralizasyonunun oluşması ve devamlılığı için gereken serum Ca ve P düzeylerini düzenlemektir (8). Kemik

mineralizasyonu ile ilgili fonksiyonlarını ince barsaklardan Ca emilimini arttırarak, böbrekten Ca kaybını azaltarak, gerek duyulduğunda kemik rezorbsiyonunu uyararak sağlar (5, 11, 19). Vitamin D yokluğunda Ca emilimi %10-15 dolayındayken, D vitamini etkisiyle bu oran %30-80'e çıkar (7).

Vitamin D'nin hem osteoklast hem de osteoblastik serinin farklılaşmasında rolü olduğu bilinmektedir (7). D vitamininin osteoblastları uyarıcı etkisi vardır. Ayrıca IL-6 sekresyonunu baskılayarak osteoklast aktivitesini yavaşlatır (17). Kan Ca düzeyi yükselip, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ sentezi azaldığında $24,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ artar ve buda kemikte hidroksiapatit kristallerinin çökmesini yani kalsifikasyonunu sağlayarak plazma Ca homeostazında ve kalsifikasyonun oluşmasında rol oynar (18).

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ kemik dokusunda Ca bağlayıcı bir protein olan osteokalsinin üretimini de uyarmaktadır. Osteokalsin, Ca iyonunu kemik matriksine bağlayan bir protein olduğundan ve hidroksiapatit oluşumunu etkili olarak kısıtladığından dolayı kemiğin aşırı mineralizasyonunu önleyebilmektedir (5, 20).

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ duodenumda Ca, ileumda ise P absorpsiyonda rol oynar (8). Barsaklarda, aktif taşıma mekanizmalarıyla Ca ve P'un emilimini uyarmaktadır. Ca'a eşlik eden P, bağımsız bir aktif taşınım olayıyla emilime uğramaktadır. Ca ve P'un barsak mukozasında taşınımı; mikrovilluslarından yakalama, mukoza hücre zarından taşınma, bazal lateral zar üzerinden hücre dışı sıvıya akışı gerektirir. $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'ün bu basamaklardan bir veya daha fazlasını uyardığı açık ise de kesin mekanizma henüz belirlenememiştir (18).

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, barsak mukoza hücresinde sentezlenen CBP (kalsiyum bağlayıcı protein)'nin sentezini arttırır (15). Ayrıca CBP'nin Ca'un vena portaya geçişini düzenlediği de kabul edilmektedir (18).

$1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$, kemik dokusunda mineral ve matriks mobilizasyonuna yol açmaktadır. İn vivo çalışmalar, $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ tarafından kemikten Ca mobilizasyonunda PTH gerekliliğini ortaya koymuştur (5, 11).

Böbreklerde kalsitriol, Ca ve P'un renal atılımlarını kısıtlayıcı bir etki göstermektedir (5). Kanda $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ artınca böbrek tubülü hücrelerinden P reabsorpsiyonu artar (18). $1,25(\text{OH})_2 \text{D}_3$ 'nin iyonize Ca'u yükselterek PTH sekresyonunu azalttığı bunun yanında kan düzeyi yüksek olduğunda PTH geni üzerine doğrudan etki ederek PTH yapımını azaltabileceği de gösterilmiştir (8,18).

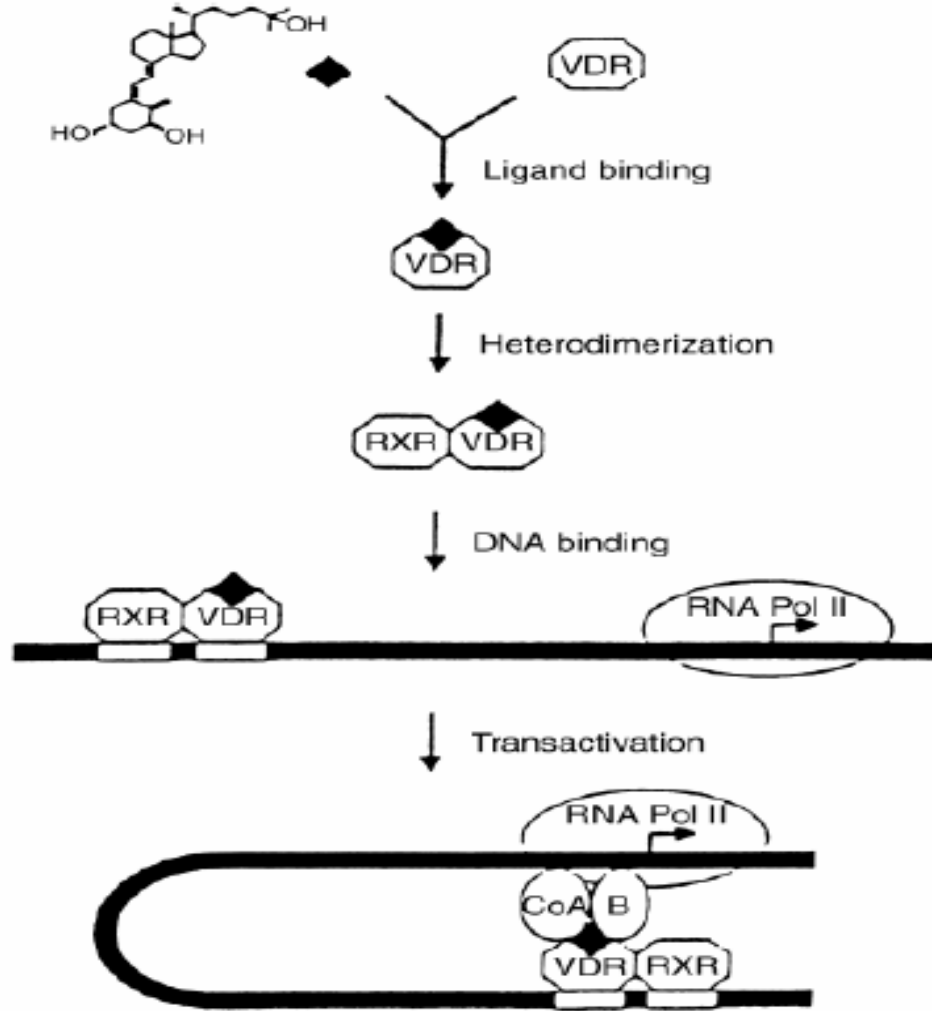
2.1.5.Vitamin D'nin etki mekanizması

Aktif D vitaminine ait reseptörler vücutta çok yaygın olarak bulunmaktadır. Bunlardan bazıları hipofiz, ovaryum, derinin stratum bazale tabakası, kıl folikülleri, mide, pankreas, timüs, meme, böbrek, paratiroid bezleri, periferik lökositler, normal ve tümör hücre serileri, miyokard düz kası ve iskelet myoblastlarıdır (5, 6, 12, 15, 21, 22). D vitamininin aktif formu olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün çoğu biyolojik etkisi, yüksek afiniteli Vitamin D reseptör (VDR) varlığını gerektirir. Vitamin D, hücrel reseptörüne bağlandıktan sonra, bu biyolojik etkilere aracılık edecek genlerin transkripsiyonlarını regüle eder. VDR'ler nükleer reseptör süper ailesine üyedir ve ligandla aktive olan bir transkripsiyon faktörü gibi görev yaparlar (23).

$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ hedef hücreye girdikten sonra ilk olarak sitozolik reseptörüne bağlanarak reseptör aktivasyonunu gerçekleştirir (5). Bu reseptörün ligand bağlayıcı bölgesi $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ü yüksek afiniteyle düşük kapasitede bağlar. Bu bağlanma doyurulabilir, geri dönüşümlü ve özgüdür (6). Ligand ile bağlanma sonucunda VDR'de yapısal değişiklik meydana gelir ve retinoid X reseptör (RXR) ile bağlanıp heterodimer oluşturur. Sonuç olarak, nükleusta “ $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -VDR-RXR” birimlerinden oluşan bir kompleks meydana gelir ve bu kompleks daha sonra nükleus kromatinine bağlanır. Reseptör, diğer steroid reseptörleri için de karakteristik olan çinko parmak motifine benzer bir DNA bağlanma bölgesi içerir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ -reseptör kompleksi, DNA üzerindeki AGGTCANNAGGTCA dizisine sahip bir Vitamin D yanıt elemanına (responsive element, VDRE) bağlanır. VDRE, liganda bağlı olarak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ reseptörü PTH geninin promotor bölgesinde bulunur ve transkripsiyonu bastırıcı düzenleme uygular (4, 6, 23).

Çekirdeğe transloke olan hormon-reseptör kompleksi, çekirdekte kompleks kromatine bağlanarak $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün gen transkripsiyonu, özgül mRNA'ların oluşumu ve RNA polimeraz aktivitesinin artmasına yol açar (5, 6). Buna bağlı olarak barsaklarda Ca-ATPaz ve spesifik kalsiyum bağlayıcı protein (CBP, kalbindin) sentezi hızlanmaktadır. Ayrıca, aktif vitamin D'nin ince barsaklardan fosfor emilimini arttırdığı bilinmektedir (4, 5, 6). Yani hormon-reseptör kompleksi aktif D vitamininin etkisine aracılık eden proteinleri şifreleyen genleri aktive eder. Örneğin, barsak mukoza hücrelerinde, kalsiyum taşıyan proteinleri şifreleyen genlerin

transkripsiyonunu aktive eder. Bu proteinler barsak lümeninden hücrenin üzerinden geçerek emilen Ca ve P'u taşıyabilir ve bunun sonunda dolaşıma geçmesine olanak sağlar(14). 1,25(OH)₂D₃'ün kemik ve böbrekler üzerindeki etki mekanizmasının barsaklardakine benzer olduğu düşünülmektedir (5).



Şekil 7. Vitamin D'nin VDR aracılı etki mekanizması (22).

2.1.6. Vitamin D katabolizması

D vitamininin hem karaciğerde hem de böbrekte katabolize olma yolu 24-hidroksilasyondur. 24,25-dihidroksivitamin D daha polardır. Hızlı olarak böbrekten atılır. 1,25-dihidroksivitamin D ise 24-hidroksilasyonla “calcitroik asid”e dönüşür ve safra yolu ile atılır (9).

2.1.7.Vitamin D eksikliği

D vitamini yeterliliği, Ca ve PTH arasındaki hassas denge nedeniyle PTH yükselmesine sebep olmayacak 25-OH Vitamin D düzeyi saptanarak değerlendirilmektedir. Erişkinlerde yapılan çalışmalarda 25-OH Vitamin D düzeyi 15 ng/ml'nin altına indiğinde PTH düzeyinin yükseldiği gösterilmiştir, dolayısıyla 15 ng/ml değeri erişkinlerde 25-OH Vitamin D için 'eşik değer' kabul edilmektedir. 25-OH Vitamin D düzeyi 11 ng/dl'nin altına indiğinde 1,25 (OH)₂ Vitamin D düzeyi artmakta ve bu artışın etkisiyle kemiklerden Ca mobilizasyonu sağlanarak kompanseasyon sağlanmakta, ancak serum Ca düzeyi normale dönerken kemik mineralizasyonu bozulmaktadır (7). 25-OH Vitamin D eksikliği çocuklarda raşitizm, yetişkinde osteomalaziye yol açan kemik demineralizasyonuna sebep olur. Dünyada 1 milyar kişide D vitamini eksikliği yada yetersizliği olduğu düşünülmektedir (24-36).

Organizmadaki Vitamin D'nin büyük bir kısmı güneş ışığı tarafından fotolizle oluştuğundan kuzey bölgelerinde yaşayanlar, koyu tenli kişiler, geleneksel kapalı giyinen toplumlar, kapalı alanlarda bulunanlarda Vitamin D eksikliği daha sık görülür. Ayrıca 70 yaş üstü erişkinler, vitamin D metabolizmasını etkileyen ilaç kullananlar ve obezlerde risk daha fazladır. Obezlerde vitamin D adipoz dokuda depolanmakta ve bu nedenle sistemik olarak kullanılmamaktadır (37).

2.1.8.Vitamin D toksisitesi

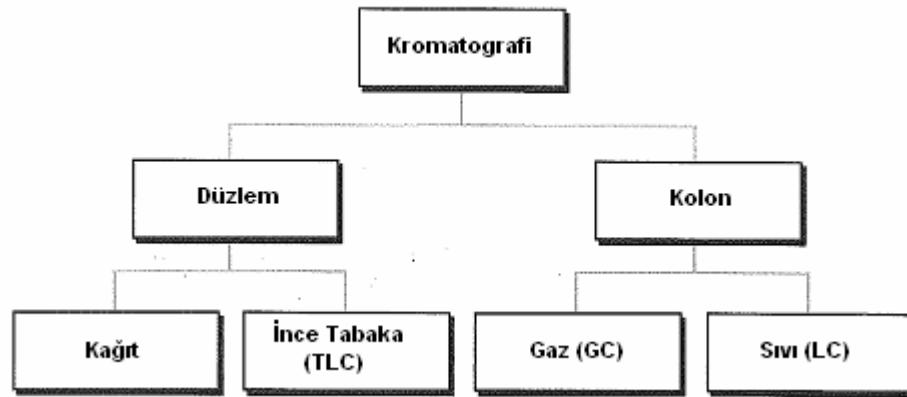
25-OH Vitamin D düzeyi 150 ng/ml'nin üstünde olduğunda Vitamin D intoksikasyonu görülmektedir. Fakat bu durum çok nadir olarak gözlenir. D Vitamini infantlarda günde 40.000IU 1-4 ay, erişkinlerde ise günde 100.000 IU birkaç ay kullanılırsa intoksikasyon görülebilmektedir (8).

Bu hastalarda intoksikasyona bağlı olarak iştahsızlık, kusma, baş ağrısı, aritmi, HT, poliüri, hiperkalsemi, hiperfosfatemi, hiperkalsiüri, damar kalsifikasyonu, nefrokalsinoz ve böbrek yetmezliği gelişebilmektedir (8, 38, 39).

2.2.HPLC

Kromatografi, bir örnek karışımındaki çözünmüş yapıların iki fazda (sabit ve hareketli) farklı dağılımlarına dayanan fiziksel bir ayırma yöntemidir. Kromatografik ayırma yönteminde hareketli faz, örneği sabit (hareketsiz) fazı içeren yatak, düzlem yada kolon boyunca taşımaktadır. Hareketli faz, sabit fazın içinden geçtikçe çözünmüş moleküller iki faz arasında dağılırlar. Sabit faza daha az ilgisi olan çözünmüş yapılar, daha çok ilgisi olanlara oranla, hareketli fazda daha uzun süre kalırlar. Düşük afiniteli çözünmüş moleküller daha hızlı göç ederek, sabit faza daha çok ilgisi olan çözünmüş moleküllerden ayrılırlar. Daha sonra, hareketli fazın fiziksel veya kimyasal özelliklerinin değiştirilmesi ile, sabit faza kuvvetli bir şekilde bağlanmış olan çözünmüş moleküller de yerlerinden ayrılırlar (8).

Kromatografinin 2 temel formu düzlem ve kolon kromatografisidir (Şekil 8). Düzlem kromatografisinde sabit faz bir kağıt tabaka üzerindedir veya cam veya plastik bir tabaka üzerine bağlıdır. Kolon kromatografisinde ise üzeri sabit fazla kaplanmış veya kimyasal olarak bağlanmış olan destek partikülleri bir tüp içinde paketlenmiştir veya sabit faz kolonun/tüpün iç yüzeyine kaplanmıştır. Teknik, hareketli fazın gaz yada sıvı oluşuna göre gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) olarak adlandırılır. LC'deki sabit faz küçük çaplı partiküllerden oluştuğunda, teknik yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'dir (8).

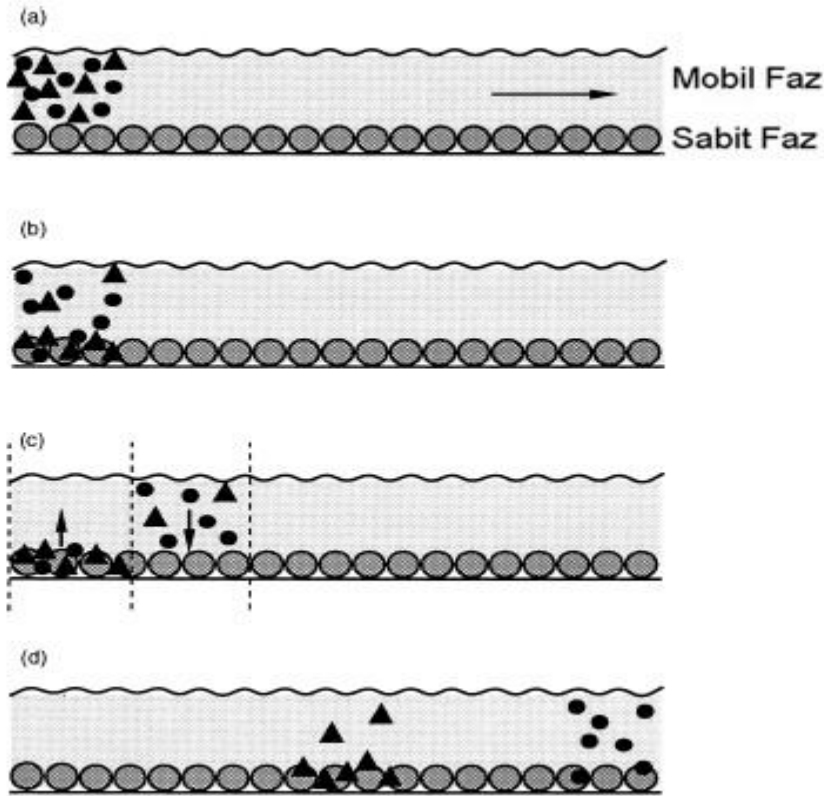


Şekil 8. Kromatografi türleri (8).

Kromatografik yöntemle ayırma işlemini grafikte açıklayacak olursak,

- a- ● ve ▲ gibi iki farklı molekülden oluşan karışım kromatografik sisteme verilir.

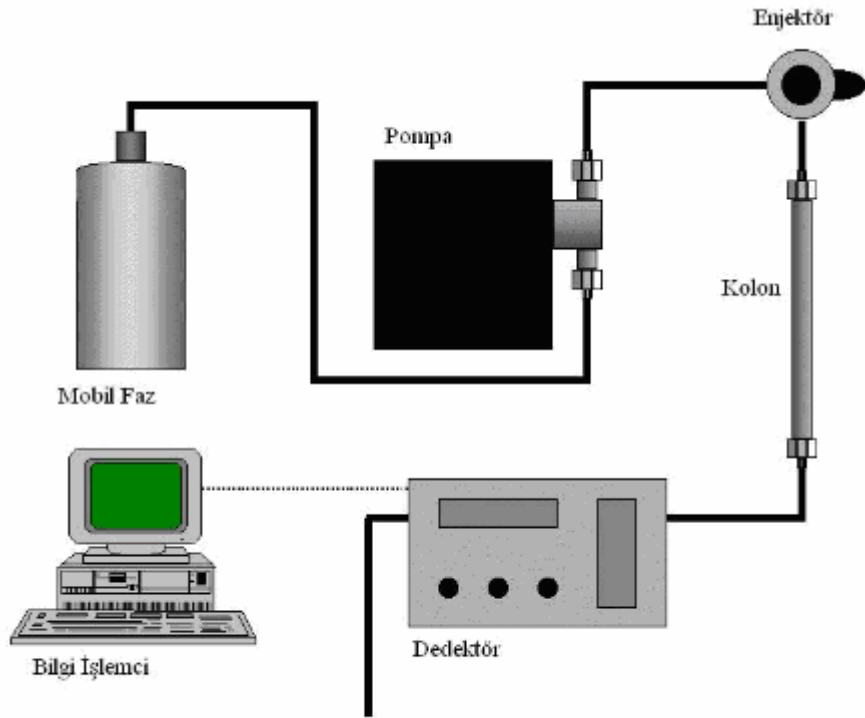
- b- ▲ bileşiği sabit fazda kalma eğiliminde iken ● bileşiği daha çok hareketli fazı tercih eder.
- c- Mobil fazda bulunan örnek moleküller dağılma katsayılarına göre sabit fazdaki açık uçlara bağlanma eğilimi göstereceklerdir.
- d- İşlem defalarca tekrarlandığında iki bileşik sonunda birbirinden ayrılır. ● bileşiği mobil fazı tercih ettiğinden kolon içersinden daha hızlı geçecektir. ▲ bileşiği ise sabit faza daha fazla eğilim içinde olduğundan kolonu geç terk edecektir .



Şekil 9. Grafiksel olarak ayırma işlemi (40).

Temel bir sıvı kromatograf şu elemanlardan oluşmalıdır (Şekil 10).

1. Çözülmüş moleküllerin ayrılması için kromatografik kolon
2. Hareketli fazın saklandığı çözücü tankı
3. Hareketli sıvı fazı sisteme vermek için bir veya daha fazla pompa
4. Örneğin bir miktarını kolona vermek için enjektör
5. Kolondan çıkışları esnasında ayrılmış analitleri saptamak için sistem üzerinde dedektör
6. Sistemi kontrol eden, verileri işleyen bilgisayar

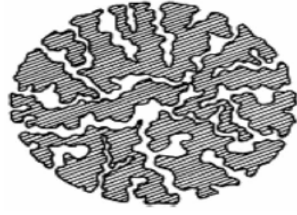


Şekil 10. HPLC sisteminin basit şematik gösterimi (41).

2.2.1.Kolonlar

HPLC kolonlarının çoğu içinden geçen mobil faza karşı korozyona dayanıklı, HPLC basıncına dayanabilen krom-nikel-molibden karışımı paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bu kolonların iç çapları 0.3 mm'den 5 mm'ye; uzunlukları 500mm'den 250 mm'ye kadar değişmektedir (8). Kolon uç bağlantıları, girişte kolonun enjektöre bağlanmasında, çıkışta ise dedektöre bağlanmasında kullanılır (Şekil 10).

Kolonlar küçük, homojen, gözenekli partiküllerle doldurulur. Bu partiküllerin yüzeyleri sabit fazla kaplanmıştır. Bu yapı sayesinde kolonlar madde geçişini zorlaştıracak bir yapı kazanırlar (Şekil 11). Kolondan geçen maddeler kolon içyapısı materyalinin özelliğine bağlı olarak tutulma ve alıkonmalara maruz kalarak istenilen ayırma gerçekleştirilmiş olur (42).



Şekil 11. Kolon iç yapısı.

HPLC sistemlerinde analitik kolonun dışında enjektör ile analitik kolon arasına yerleştirilen bir koruma kolonu bulunur. Analitik kolonun proteinleri geriye dönüşümsüz olarak absorbe ederek, çözümleme gücü ve kolon ömrünün kısılmasını önlemek amacıyla yerleştirilir. Analitik kolondaki sabit fazla aynı yada benzer dolgu maddesiyle doldurulur. Önceden belirlenmiş ayırım sayısına ulaşınca koruma kolonu değiştirilir.

Analitik kolonlar çok çeşitli sabit fazlarla doldurulurlar. Bu maddeler; bağlı, polimerik, şiral ve kısıtlı geçiren paketler gibi dolgulardan oluşurlar. Uygun dolgu maddesi seçilerek çok sayıda ayırım işlemi gerçekleştirilmektedir (8).

2.2.2.Çözücü tankı

Hareketli faz (mobil faz) olarak kullanılan çözücüler, çözücü tankında tutulmaktadır (Şekil 10). Bu tanklar, içlerine pompalara yollanacak besleyici hatların yerleştirildiği cam şişelerdir.

2.2.3.Pompalar

Pompa, çözücü tankından hareketli fazı çekerek (aspire ederek), bu çözücüyü kromatografik sisteme dağıtır. Farklı pompa türleri kullanılıyor olsa da bir pompada temel olarak iki özellik bulunmalıdır. Birincisi yüksek basınçlara dayanıklı sağlam bir yapıda olması; diğeri ise buna ilaveten kullanıcı tarafından seçilen yüksek akış doğruluğu ve akış hızı hassasiyeti sağlamasıdır (42). Akış hızı pompa başlık boyutu ve şekline bağımlı olarak 0.01 mL/dk'dan 20mL/dk'ya kadar olabilir (8).

2.2.4.Enjektör

Örneğin bir kısmı sıvı kromatografina enjektör aracılığı ile verilir (Şekil 10).

2.2.5.Detektör

Detektörlerin ana komponenti kromatografik kolondan çıkan elüatın geçtiği akış hücresidir. Akış hücresinden geçen çözünmüş analitler saptanarak elektronik sinyal alınır. Bu amaçla birçok detektör geliştirilmiştir (Tablo 3). En yaygın kullanılanlar;

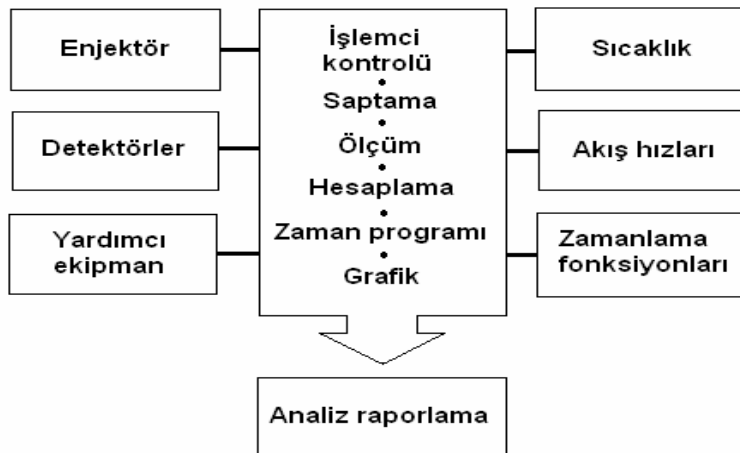
fotometrik, florometrik ve elektrokimyasal detektörlerdir. İdeal bir detektör mobil fazdaki değişimi fark edebilmeli, bunu elektrik sinyaline dönüştürebilmeli ve baselinedan farklı sapmayı hesaplamalı ve göstermelidir.

Tablo 3. HPLC’de kullanılan Detektörlere Örnekler (8).

Detektör Türü	Çalışma ilkesi	Uygulama aralığı	Saptama limiti
UV fotometre (sabit dalga boyu)	UV ışığının absorbansını ölçer	Seçici	< 1 ng
UV fotometre (değişken dalga boyu)	UV ışığının absorbansını ölçer	Seçici	< 1 ng
Diyod dizini	Işık absorbansını ölçer	Seçici	< 1 ng
Florometre	Floresans ölçer	Çok seçici	pg – ng
Refraktometre	Refraktif indeks değişimi ölçer	Evrensel	1 µg
Elektrokimyasal	Yükseltgenmiş/ indirgenmiş analiti elektrokimyasal ölçer	Seçici	pg – ng

2.2.6.Bilgisayar

Bilgisayar teknolojisinin kromatografi cihazlarında uygulanmasıyla; maliyet-etkili, kolay kullanımlı, analitik performansı artmış otomatik sistemler ortaya çıkmıştır. Bu sistemlerin hem sistem kontrolü, hem de veri işleme fonksiyonları vardır (Şekil 12).

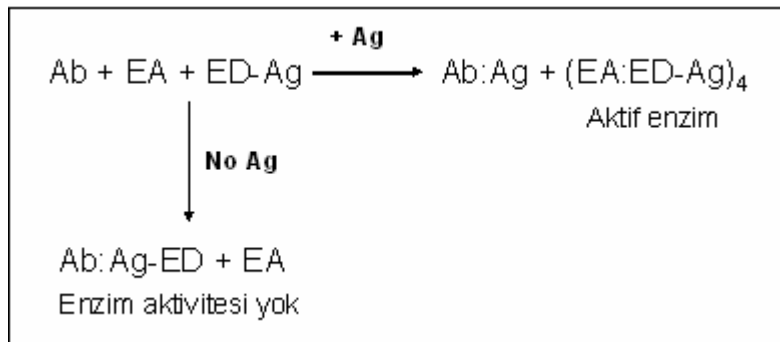


Şekil 12. Sıvı kromatografilerde bilgisayarların fonksiyonları (8).

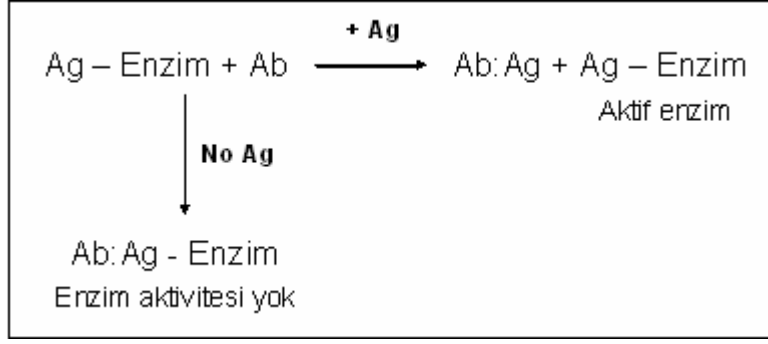
2.3.ELISA

Antijen-antikor reaksiyonlarını gösterebilmek için enzim kullanılan tüm tekniklere genel olarak enzim immunotest (enzyme immunoassay, EIA) denir. Belirteç olarak en sık kullanılan enzimler alkalen fosfataz, yaban turpu “horseradish” peroksidaz, glukoz-6 dehidrogenaz ve beta galaktozidazdır. ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay), EMIT (Enzyme –multiplied immunoassay technique) ve CEDIA (Cloned enzyme donor immunoassay) EIA’ya örnek verilebilir (8).

EIA olarak isimlendirilen yöntemler, işaretli immunokimyasal ölçümler olarak adlandırılan grubun üyeleridir ve bu gruba bağlı ölçüm yöntemleri genel olarak homojen ve heterojen olarak isimlendirilen iki alt gruba ayrılırlar. Serbest işaretleyicinin bağlı işaretleyiciden ayrılmasını gerektiren immunokimyasal ölçümler heterojen, gerektirmeyenler ise homojen olarak adlandırılır. Homojen ölçümlerde, serbest ve işaretli antikorun (veya antijenin) birbirinden ayrılmasına gerek yoktur. Bu tip ölçümlerde antijene bağlı işaretleyicinin aktivitesi direkt olarak bağlanan antikor miktarı ile değişiklik gösterir. Bu değişikliğin düzeyi, ölçülmek istenen antijen (veya antikor) düzeyi ile orantılıdır. EMIT ve CEDIA homojen EIA’ya örnektir (Şekil 13 ve 14). Heterojen ölçümlerde ise serbest ve işaretli antikorun (veya antijenin) birbirinden ayrılması gerekir. Bu ayrım adsorbsiyon, çöktürme yada katı faz kullanılarak yapılabilir. Katı faz ayrımında, çözünmeyen bir matrikse kovalent olarak bağlanmış veya adsorbe edilmiş antikor veya bağlayıcı proteinler kullanılır. Plastik tüplerin iç yüzeyi veya mikrotitrasyon kuyucukları ve selüloz veya magnetik lateks bilya veya partikülleri gibi çözünmez maddelerin dış yüzeyini içeren birkaç farklı tip katı faz kullanılmaktadır. ELISA heterojen EIA’ya örnektir (8).

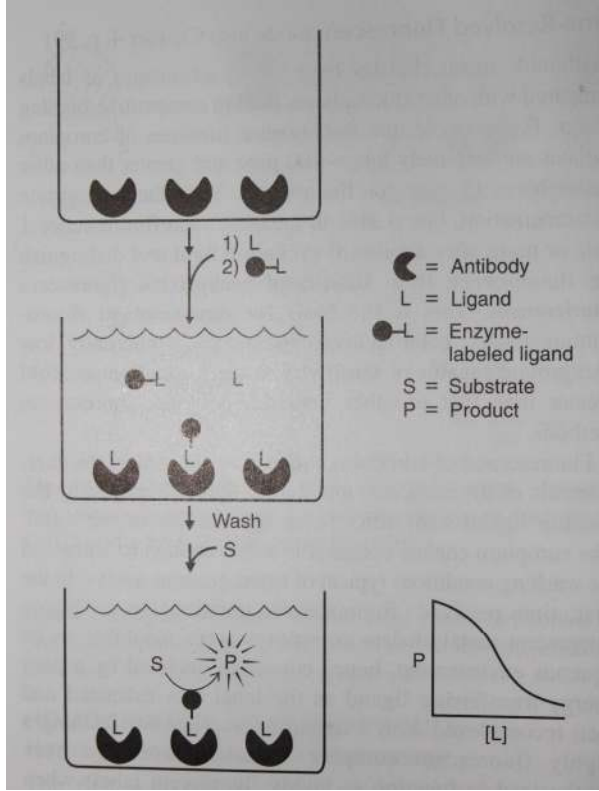


Şekil 13. CEDIA (EA: Enzim alıcısı, ED: Enzim vericisi) (8).

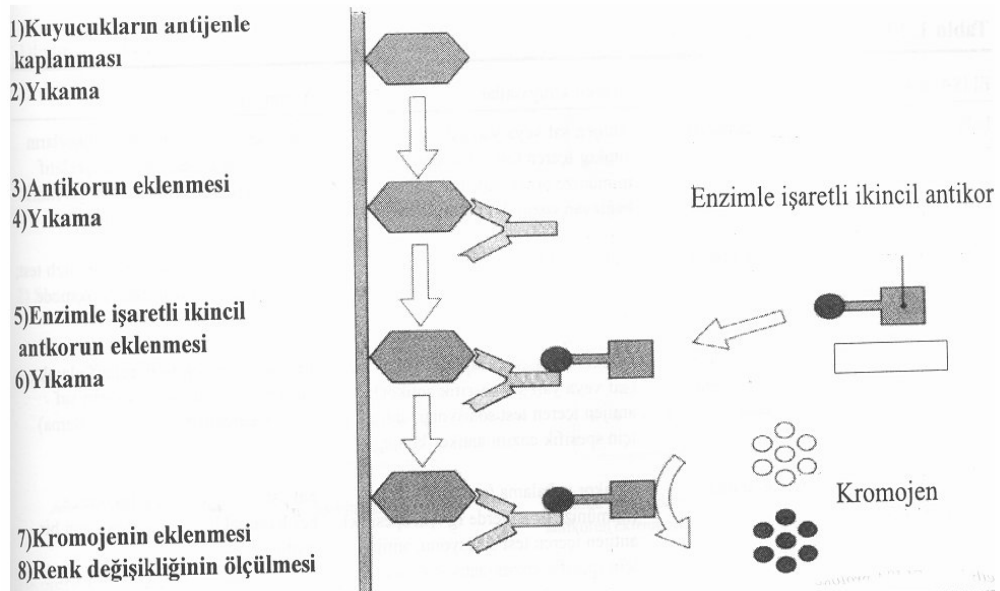


Şekil 14. EMIT (8).

İmmunokimyasal ölçümler genel olarak reaksiyonun tipine göre yarışmalı ve yarışmasız olarak ikiye ayrılırlar. Yarışmalı immunokimyasal ölçümlerde işaretli antijen (klinik örnek) ve işaretli antijen aynı anda ortama eklenir ve antikora (sabit faz) bağlanabilmek için yarışır. Bu koşullarda antikorun işaretli antijene bağlanma olasılığı, işaretli antijen konsantrasyonu ile ters orantılıdır. Yarışmalı ELISA yönteminde bu aşamadan sonra antikora bağlanmayan antijenleri uzaklaştırmak için yıkama yapılır. Daha sonra ortama işaretli antijendeki enzimle reaksiyona girecek substrat eklenir. Enzim substratla reaksiyona girerek renk oluşturur ve spektrofotometrede absorbans okunur. Standart grafiğinden yararlanılarak absorbansa karşılık gelen işaretli antijen miktarı belirlenir. İşaretsiz antijen miktarı absorbans miktarıyla ters orantılıdır (Şekil 15). Yarışmasız immunokimyasal ölçümlerde de ilk aşama antikorun katı faz yüzeyine adsorbsiyonudur. İkinci aşamada örnekteki antijenin katı faz antikoruyla reaksiyona girmesi sağlanır. Daha sonra diğer proteinleri uzaklaştırmak için yıkama yapılır ve işaretli antikor eklenir. İkinci antikor, bağlı antijendeki ikinci ve farklı bir epitop ile reaksiyona girer. Bağlı olmayan işaretli antikorlar yıkama ile uzaklaştırıldıktan sonra bağlı işaretleyici saptanır. Elde edilen aktivite örnekteki işaretli antijen konsantrasyonu ile doğru orantılıdır (Şekil 16).



Şekil 15. Yarışmalı ELISA (43).



Şekil 16. Yarışmasız ELISA (Sandviç yöntemi) (44).

ELISA’da bir enzimle konjuge edilmiş antikor (veya antijen), substratı ile reaksiyona girerek renkli bir ürün oluşturur (Şekil 15 ve 16). ELISA testleri antijeni veya antikoru (sınıfa özgül antikor da olabilir) ölçmek için kullanılabilir (45-56).

ELISA’da reaksiyon kompenentlerinden biri katı faz yüzeyine bağlanır. Bu katı faz, mikrotitrasyon kuyucuğu olabilir. Bu bağlama nonspesifik adsorbsiyon, kimyasal veya immünokimyasal bağlama olabilir ve serbest işaretli reaktifi bağlı olandan ayırma işlemini kolaylaştırır. Tipik olarak ELISA tekniği kullanımında, ölçülecek antijeni içeren kalibratör veya bir örnek, katı faz antikoruyla bağlanması için bir süre inkübe edilir. Katı faz yıkandıktan sonra, bağlı antikordan farklı enzim işaretli antikor eklenir ve Ab-Ag-Ab-enzim sandviç kompleksi oluşur. Ortamda bulunan bağlı olmayan fazla antikor yıkama ile uzaklaştırılır ve özgül kromojenik enzim substratı eklenir. Bağlı enzim substratla reaksiyona girerek renk değişikliğine neden olur. Ürün miktarı örnekteki antijen miktarıyla doğru orantılıdır (8, 46-49). Bu metod yarışmacı olmayan (non-kompetitif) ELISA sandviç tekniği olarak isimlendirilir. Diğer bazı ELISA protokolleri Tablo-4’de gösterilmiştir.

Tablo 4. ELISA protokolleri (49).

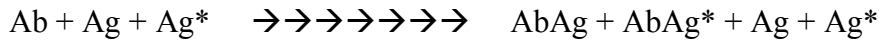
ELISA protokolü	Kullanımları	Gerekli kimyasallar	Yorumlar
İndirekt	Antikor aramada	Antijen saf ve yarı saf; Antikor içeren test solusyonu; immünize örneklerde Ig'ı bağlayan enzim konjugatı	Önceden varolan spesifik antikorların kullanımına gerek duyulmaz; relatif olarak fazla miktarda antijen gerektirir.
Direkt kompetitif (yarışmacı)	Antikor aramada, çözünür antijeni saptamada	Antijen saf ve yarı saf; antijen içeren test solusyonu; spesifik antijen için enzim-antikor konjugatı	Sadece 2 basamaktan oluşan hızlı test; antijenik çapraz reaksiyonu ölçmede çok kullanışlı
Antikor-sandviç yöntemi	Antikor aramada, çözünür antijeni saptamada	Antikor yakalama (capture) (saf veya yarı saf spesifik antikor); antijen içeren test solusyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	En hassas antijen testi; relatif olarak fazla miktarlarda saf veya yarı saf antikor gerektirir (antikor yakalama)
Çift antikor-sandviç yöntemi	Antikor arama	Antikor yakalama (capture) (İmmünize örneklerde Ig için spesifik); antijen içeren test solusyonu, antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı	Saflaştırılmış antijen gerektirmez. Beş basamaklı, relatif olarak uzun bir testtir.
Direkt hücresel yöntem	Antijen ekspresse eden hücrelerin aranmasında, hücresel antijen ekspresyonunun ölçülmesi	İlgili antijeni ekspresse eden hücreler; hücresel antijen için spesifik enzim-antikor konjugatı.	Fazla miktarda taramalarda hassas bir testtir; heterojen karışık hücre gruplarında hassas değildir.
İndirekt hücresel yöntem	Hücresel antijenlere karşı oluşan antikorların aranmasında	İmmünizasyonda kullanılan hücreler; antikor içeren test solusyonları; immünize örneklerde Ig bağlayan enzim konjugatı	Düşük miktarlarda ekspresse edilen hücresel antijenler için spesifik antikorları saptayamayabilir

2.4.RIA

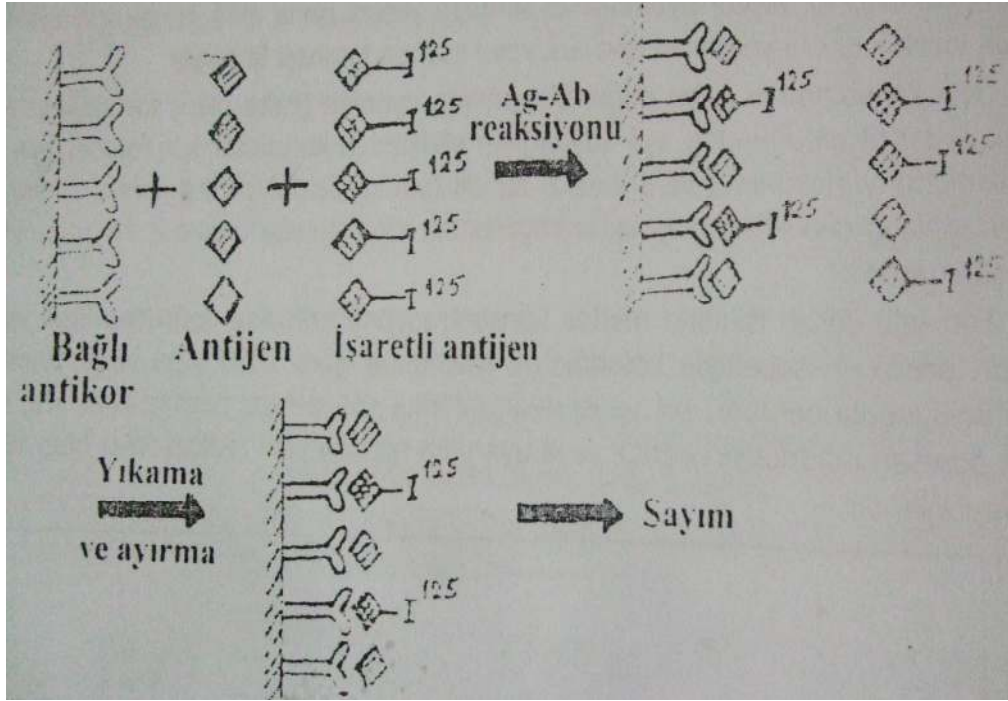
Radioimmunoassay (RIA) 1959-1960 yıllarında Solomon Aaron Berson ve Rosalyn Sussman Yalow tarafından geliştirilmiştir ve bu buluş 1977 yılında Yalow'a Nobel ödülü kazandırmıştır (55).

RIA'da, radyoaktif işaretli antijen (yada antikoru) kullanılarak duyarlı ve özgün ölçüm yapılmaktadır. Analitik olarak, işaretli antijen (yada antikor) konsantrasyonunu saptamak için antijen-antikor reaksiyonunda, radyoaktif işaretli ve işaretli antijen (yada antikor) arasındaki yarışma kullanılmaktadır (8). İlk geliştirildiği yıllarda işaretleyici olarak ^{125}I , ^{131}I ve trityum (^3H) gibi radyoaktif işaretleyiciler kullanılmıştır. ^{57}Co ve ^{125}I gibi işaretleyici kombinasyonları, eş zamanlı ölçümlerde kullanılmıştır (örneğin, B_{12} vit, folat) (56). Günümüzde ise en sık ^{125}I kullanılmaktadır.

RIA'da ölçülmek istenen molekülün antikoru genellikle tüpe bağlı halde bulunur. Ölçülmek istenen molekülün miktarını belirlemek için, öncelikle tüpe işaretli (ölçülmek istenen molekül) ve radyoaktif işaretli antijen eklenir. İşaretli antijen (Ag^*) ve işaretli antijen (Ag), antikora (Ab) bağlanmak için yarışır. Bu yarışma sonucunda tüpe bağlı bulunan antikorların bir kısmı işaretli antijenle bağlanırken bir kısmında işaretli antijenle bağlanır. Ortamda işaretli antijen miktarı ne kadar çoksa antikora bağlanma oranı da o kadar fazla olur.



Bağlanma tamamlandıktan sonra yıkama yapılarak antikora bağlanmamış antijenler ortamdan uzaklaştırılır. Tüpte sadece Ab-Ag ve Ab-Ag^* kompleksleri kalır. Ab-Ag^* kompleksinin yaymış olduğu ışınlar sayılarak standart eğri yardımıyla işaretli antijen miktarı belirlenir (Şekil 17). Elde edilen sayım, işaretli antijen miktarı ile ters orantılıdır (57).



Şekil 17. RIA'da reaksiyon şekli (57).

3. GEREÇ ve YÖNTEMLER

Gereç

Bu çalışma Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Merkez Laboratuvarı ve Turhan Özden Laboratuvarı'nda yürütüldü. Çalışmamıza 40 sağlıklı gönüllü dahil edildi. Gönüllülerden Kasım 2011 - Aralık 2011 tarihleri arasında örnekler toplandı. Gönüllülere çalışma hakkında bilgi verilip Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu imzalatılmış, çalışma için Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu'ndan onay alınmıştır (02.11.2011/307).

Örneklerin alınması ve ön işlemler

Gönüllülerden EDTA'lı (Etilendiamintetraasetikasit) tüplere alınan kanlar aynı gün içerisinde 4000 rpm'de 5 dk. santrifüj edilerek plazmalar ayrıldı. Plazmalar 2 ml'lik eppendorf tüplerine alınarak çalışma gününe kadar -80°C'de saklandı.

Yöntem

HPLC:

Plazma 25-OH Vitamin D düzeyleri Shimadzu marka HPLC cihazında ImmuChrom marka kitler kullanılarak belirlendi. Analiz kit prospektüsünde yer alan prosedüre uygun olarak yapıldı. Öncelikle örneklerden 400 µl 1,5 ml'lik eppendorf tüplerine konulup, üstüne 400 µl IS (internal standart) eklendi. Karışım 30 saniye vortexlendikten sonra üzerine 500 µl PREC (çöktürme reaktifi) çözeltisi eklendi. 2 dk vortexlenip 2-8°C'de 15 dakika bekletildi. 15 dakika sonunda çözelti 10.000 rpm'de 5 dk. santrifüj edildi. Ayrılan süpernatandan 50 µl alınarak HPLC sistemine verildi.

Kolon materyali: ImmuChrom column (IC3401rp)

Kolon boyutu: 125mm x 4 mm

Akış hızı: 1.0 ml/dk

UV dalga boyu: 264 nm

Enjeksiyon hacmi: 50 µl

Çalışma zamanı: 15 dk

Sıcaklık: 30°C

ELISA:

Plazma 25-OH Vitamin D düzeyleri DYNEX marka ELISA cihazında EUROIMMUN 25-OH Vitamin D ELISA kitiyle çalışıldı (Lot No: E110506AL).

Reaktiflerin hazırlanması

Biotin sample buffer ile 1/100 oranında (1 cc biotin – 99 cc sample buffer) sulandırıldı. Wash buffer distile su ile 1/10 oranında (100 cc wash buffer – 900 cc distile su) sulandırıldı.

Çalışma prensibi

Örnekler, kalibratörler ve kontroller hazırlanan biotin solüsyonu ile 1/51 (5 µl örnek–250 µl biotin solüsyonu) oranında dilüe edildi. Hazırlanan dilüe kontrol, kalibratör ve örnekler sırasıyla plakta bulunan kuyucuklara konuldu. 18–25°C’de 2 saat inkübe edildi. Hazırlanan wash solüsyonu ile her bir kuyucuğa 300 µl bırakılarak 3 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl enzim konjugatı (streptavidin-peroksidaz) konularak 18–25°C’de 1 saat inkübe edildi. Hazırlanan wash solüsyonu ile her bir kuyucuğa 300 µl bırakılarak 3 kez yıkama yapıldı. Tüm kuyucuklara 100 µl kromojen / substrat solüsyonu konularak 18–25°C’de 15 dk. bekletildi. Bu aşamada yıkama işlemi yapılmadı. Tüm kuyucuklara 100 µl stop solüsyonu konularak 450 nm’de cihazda okutma yapıldı.

RIA

Plazma 25-OH Vitamin D düzeyleri Berthold LB2111 marka RIA cihazında DIA Source marka 25-OH Vitamin D RIA kitiyle çalışıldı (Lot No: 113106/E).

Reaktiflerin hazırlanması

Kalibratörler (0-6) ve kontroller (1-2) 0.5 ml distile su ile sulandırıldı. Wash solüsyonu distile su ile 1/70 oranında (10 ml wash solüsyonu – 690 ml distile su) dilüe edildi. Ag – I¹²⁵ 25-OH Vitamin D 6 ml tracer buffer ile sulandırıldı.

Çalışma prensibi

1.Extraction adımı: 6 kalibratör, 2 kontrol ve 40 örnek çifti için 12x75 mm ebatlarındaki tüpler hazırlandı. Tüplere 100 µl kalibratör, kontrol ve örnekler eklendi. Hemen arkasından her tüpe 500 µl asetonitril ekledi. Asetonitril ekledikten sonra 7 sn vorteksle karıştırılıp oda ısısında 1150 rpm’de 5 dk. santrifüj edildi.

2.İnkübasyon adımı: Santrifüjden sonra elde edilen süpernatandan 100 µl alınarak kitle beraber verilen işaretli tüplere eklendi. Pipet uçlarının doymuş olmasına dikkat edildi. Her tüpe 400 µl inkübasyon buffer ve 50 µl tracer eklendikten sonra 2 saat oda ısısında 300 rpm’de karıştırıldı. 2 saatin sonunda tüplerdeki içerik aspire edildi. 2 kere tüplere 2 ml. Wash solusyonu eklenerek aspirasyon işlemi tekrarlandı. Tekrar wash solusyonu eklendi. Köpük oluşmamasına dikkat edildi. Wash solusyonu eklendikten sonra 2 dk. beklendi ve tüplerde sıvı kalmayacak şekilde aspire edildi. Gamma sayacında 60 saniyede okutuldu.

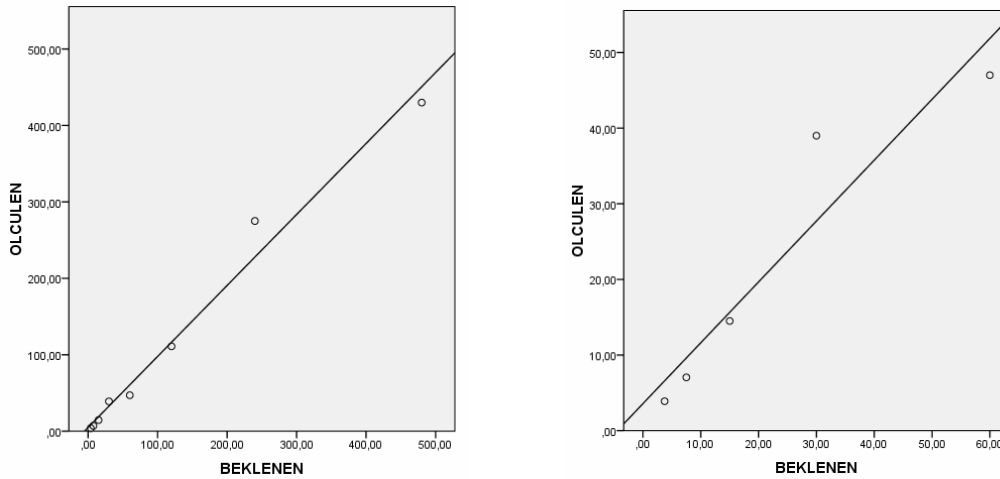
İstatistiksel Analiz

Verilerin aritmetik ortalama, standart sapma ve %CV değerleri bulundu. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Kolmogorov Smirnov testi ile yapıldı ve $p>0.05$ olduğu gözlemlendi. Regresyon analizi yapıldı. Grafikler ve formüller regresyon formülünden hesaplandı. Korelasyon için Pearson korelasyon analizi yöntemi uygulandı. Bland Altman yöntemi testlerin uyumluluğu noktasında karşılaştırma metodu olarak uygulandı. Çalışmada elde edilen verilerin istatistiksel analizlerinde “SPSS (Statistical Package for Social Sciences) for Windows 17,0 programı kullanıldı. Bu testler için p değerinin 0,05’den küçük olması anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışma, yöntem performansını değerlendirme ve yöntem karşılaştırma olarak iki bölüme ayrıldı. Bu amaçla HPLC yöntemi için yöntem performansı değerlendirilip, ELISA ve RIA yöntemi ile karşılaştırıldı.

Yöntem performansının değerlendirme çalışması için ilk aşamada doğrusallık çalışması yapıldı. Üretici firma tarafından sağlanan ve içinde 480 ng/ml 25OH Vitamin D içeren standart çözeltisi kullanıldı. 480 ng/ml'lik çözeltiden 240, 120, 60, 30, 15, 7.5 ve 3.75 ng/ml'lik çözeltiler hazırlandı. Her örnek çift çalışıldı ve sonuçların ortalaması alınarak doğrusallık denklemi oluşturuldu. Doğrusal aralık 3.75-480 ng/ml arasında bulundu ve denklemi $y = -3.113 + 1.058x$ ($R^2 = 0.982$) olarak hesaplandı. Ayrıca aynı işlem klinik olarak önemli olan 3.75-60 ng/ml aralığı için de uygulandı. 3.75-60 ng/ml aralığı için doğrusallık denklemi $y = -1.427 + 1.107x$ ($R^2 = 0.891$) bulundu (Şekil 18.A ve B).



Şekil 18. A. 25-OH Vitamin D için 3.75-480 ng/ml için linearite grafiği
B. 25-OH Vitamin D için 3.75- 60 ng/ml için linearite grafiği

Kesinlik (tekrarlanabilirlik) çalışması için önce gün içi , daha sonra da günler arası tekrarlanabilirlik çalışması yapıp değerlendirildi. Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için 2 seviyede kontrol serumları (level 1: 11.8-24.8 ng/ml, level 2: 41.2-68.6 ng/ml) kullanıldı. Kontrol serumları 20 örnek kabına ayrıldı ve ardı ardına çalışıldı. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için 2 seviyede kontrol serumları 20 örnek kabına ayrıldı ve -20°C 'de saklandı. 20 gün boyunca her gün 2 seviyede

kontrol serumları çalışıldı. HPLC yönteminin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışması sonucu bulunan aritmetik ortalama, standart sapma ve %CV (değişkenlik katsayısı) değerleri Tablo 5 ve 6’da gösterilmiştir.

Tablo 5. Gün içi tekrarlanabilirlik deneyinde elde edilen 25-OH Vitamin D değerleri

	Örnek	Minimum değer (ng/ml)	Maksimum değer (ng/ml)	Aritmetik ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	%CV
Level 1	20	17.62	21.96	19.57	1.16	5.93
Level 2	20	58.05	62.77	60.55	1.43	2.37

Tablo 6. Günler arası tekrarlanabilirlik deneyinde elde edilen 25-OH Vitamin D değerleri

	Örnek	Minimum değer (ng/ml)	Maksimum değer (ng/ml)	Aritmetik ortalama (ng/ml)	Standart Sapma	%CV
Level 1	20	17.25	22.42	20.02	1.40	7.00
Level 2	20	57.06	62.97	60.68	1.58	2.60

Geri kazanım (recovery) çalışması için 4.76 ng/ml 25-OH Vitamin D içeren serum havuzundan 4 örnek hazırlandı. Bu örneklerle değişik derişimlerde 25-OH Vitamin D eklendi. Her bir örnek 2 kez çalışıldıktan sonra ortalamaları alındı. Eklenen 25-OH Vitamin derişimleri matris yapısının bozulmaması için örnek hacminin %10’unu geçmeyecek şekilde hazırlandı. Serum havuzundan 1900 µl, 25-OH Vitamin D derişiminden 100 µl alınarak toplam hacim 2 ml’ye tamamlandı. 20, 30 ve 60 ng/ml’lik derişimler kullanıldı. İlk örneğe 25-OH Vitamin D derişimi eklenmeyerek baseline kabul edildi. 25-OH Vitamin D derişimleri 1/20 oranında eklendiği için beklenen geri elde değerleri 1, 1.5 ve 3 ng/ml olarak hesaplandı. Geri kazanım çalışması sonuçları Tablo 7’de gösterilmektedir.

Tablo 7. Geri kazanım çalışması sonuçları (ng/ml)

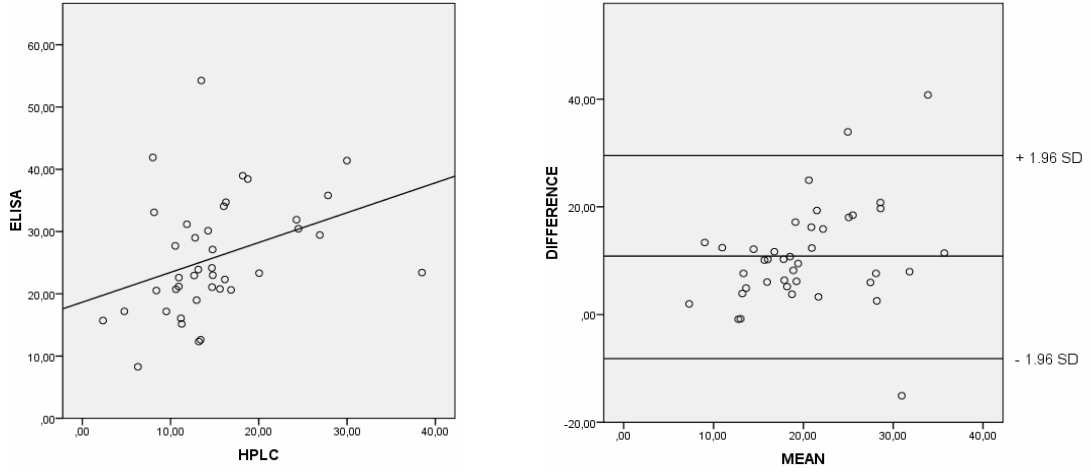
	1. tüp (baseline)	2. tüp	3. tüp	4. tüp
Eklenen	----	1	1.5	3
Okunan	4.76	5.72	6.15	7.61
Geri elde	----	0.96	1.39	2.85
% geri elde	----	96	93	95

HPLC yönteminin performansı değerlendirildikten sonra ELISA ve RIA yöntemleriyle karşılaştırıldı. 3 yöntemle elde edilen 25-OH Vitamin D sonuçları istatistiksel olarak değerlendirildi. HPLC, ELISA ve RIA yöntemleriyle çalışılan örneklerle ait veriler Tablo 8’de gösterilmiştir.

Tablo 8. HPLC, ELISA ve RIA yöntemleriyle çalışılan örneklerle ait veriler

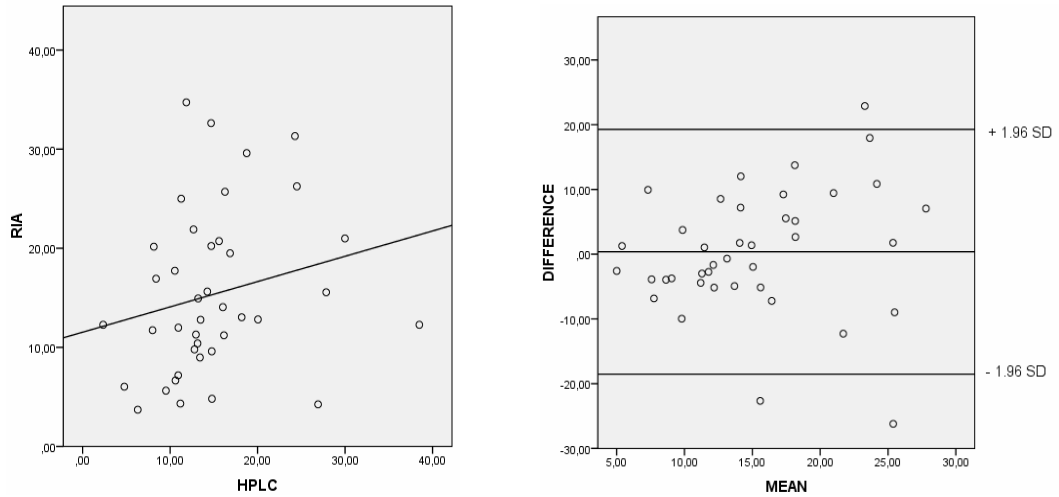
	Örnek	Minimum değer (ng/ml)	Maksimum değer (ng/ml)	Aritmetik ortalama (ng/ml)	Standart Sapma
HPLC	40	2.34	38.49	14.98	7.10
ELISA	40	8.28	54.26	25.84	9.41
RIA	40	3.71	34.73	15.36	8.27

25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC yöntemi ile ELISA yöntemi arasındaki dağılımı Şekil 19.A’da gösterildiği gibidir. İki yöntem arasında yapılan regresyon analizi sonucu $R^2 = 0.131$, $a = 7.941$, $b = 0.273$ bulundu. Eğrinin denklemi ise $y = 0.273x + 7.941$ olarak hesaplandı. $p = 0.022$ olarak bulundu. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC yöntemi ile ELISA yöntemi arasındaki ilişkisi Bland Altman grafiği ile Şekil 19.B’de gösterilmektedir (Mean= (HPLC+ELISA)/2 , Difference= ELISA – HPLC).



Şekil 19. A. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve ELISA yöntemleri arasındaki dağılımı. B. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve ELISA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği. (A.O: 10.86 ng/ml, SD: 9.52).

25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC yöntemi ile RIA yöntemi arasındaki dağılımı Şekil 20.A’da görülmektedir. İki yöntem arasında yapılan regresyon analizi sonucu $r = 0.219$, $R^2 = 0.048$, $a = 12.095$, $b = 0.188$ bulundu. Eğrinin denklemi ise $y = 0.188x + 12.095$ olarak hesaplandı. $p = 0.174$ olarak bulundu. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC yöntemi ile RIA yöntemi arasındaki ilişki Bland Altman grafiği şekil 20.B’de gösterilmektedir (Mean= (HPLC+RIA)/2 , Difference= RIA – HPLC).



Şekil 20. A. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve RIA yöntemleri arasındaki dağılımı. B. 25-OH Vitamin D sonuçlarının HPLC ve RIA yöntemleri arasındaki Bland Altman grafiği. (A.O: 0.38 ng/ml, SD: 9.95).

5. TARTIŞMA

Günümüzde ortalama yaşam süresinin uzaması ve geriatric yaş grubunun artmasıyla beraber yaşlılarda görülen kronik hastalıklarda büyük bir artış gözlenmektedir. Osteoporoz en sık görülen kemik metabolizması hastalığı olmakla beraber aynı zamanda yaşlı popülasyonda en sık karşılaşılan problemlerden birisidir. 25-OH Vitamin D düzeyinin belirlenmesi osteoporoz prognozunda önemli bir yere sahiptir. Bu yüzden 25-OH Vitamin D düzeyinin tayininde bir standardizasyon gereği doğmuştur. Bu amaçla 25-OH Vitamin D ölçümü için birçok metod geliştirilmiştir.

25-OH Vitamin D ölçümünde ilk kullanılan yöntem 1971 yılında bildirilmiştir ve bu yöntem Vitamin D bağlayıcı proteinin bağlayıcı olduğu kompetitif bağlama yöntemidir (58). 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü eşit olarak tanınması avantaj olsa da diğer polar D vitamini metabolitlerini de ölçmesi ve 10 gün gibi bir inkübasyon süresinin olması dezavantajlarıdır. Ancak, Silisik asit kromatografisinin kullanıldığı kompetitif protein bağlama yöntemi ile bu süre 1 saate düşürülmüştür (58, 59).

HPLC yöntemi 1977 yılında geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV absorpsiyon yoluyla ölçüm yapılmaktadır. İnterferans veren lipidleri ve Vitamin D metabolitlerini uzaklaştırması, 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü ölçebilmesi en büyük avantajlarıdır. Ancak HPLC yönteminin uygulanması iyi bir donanım ve deneyim gerektirmektedir (58, 59).

1985'te RIA yöntemi geliştirilmiştir ve bu yöntem için örnek saflaştırmasına gerek olmamaktadır. RIA yöntemi, kompetitif protein bağlama yöntemi gibi 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü eşit olarak tanımakta ve diğer polar D vitamini metabolitlerini ölçebilmektedir. Bu nedenle RIA yöntemi ile çalışılan 25-OH Vitamin D ölçümleri %10-20 fazla bulunmaktadır (58, 59, 60).

ELISA yöntemi kompetitif protein bağlama ve RIA yöntemi gibi diğer polar D vitamini metabolitlerini ölçmektedir (58). Kemiluminesans yöntemi ise 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'e eşit miktarda özgündür fakat bu yöntemin maliyeti çok yüksektir (58).

Sıvı Kromatografi Tandem Kütle Spektroskopisi (LC/MS/MS) 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃'ü kantitatif olarak ölçen bir yöntemdir. Ayrıca duyarlılığı ve

özgüllüğünün yüksek olması sebebiyle Vitamin D ölçümünde referans yöntem olarak gösterilmektedir (61).

HPLC yöntemi için yapmış olduğumuz yöntem geçerli kılma çalışmasında 25-OH Vitamin D için doğrusallık aralığını 3.75-480 ng/ml arasında bulduk. Bunun yanında klinik olarak değerli olan 3.75-60 ng/ml aralığı içinde doğrusal bir eğri elde ettik. Sahillioğlu ve arkadaşları LC/MS/MS ile yapmış oldukları yöntem geçerli kılma çalışmasında doğrusallık aralığını 1.8-480 ng/ml aralığında bulmuş olup, klinik olarak değerli olan 1.8-15 ng/ml aralığında da doğrusal bir eğri elde etmişlerdir (62). Amy K. ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada doğrusal aralık 1.0-100.0 ng/ml olarak bulunmuştur (63). Zoe ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada ise doğrusal aralık 1.6 -102.5 ng/ml olarak bulunmuştur (64). Yöntemimizin doğrusallık çalışmasında 3.75–480 ng/ml aralığı için r değeri 0.991, determinasyon katsayısı (R^2) 0,982, 3.75–60 ng/ml aralığı için ise r değeri 0.944 ve R^2 değeri 0,891 bulundu. Sahillioğlu ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada 1.8–480 ng/ml aralığı için R^2 değerini 0.9991 ve 1.8–15 ng/ml aralığı içinse 0.9997 bulunmuştur (62). Michael V. ve arkadaşları ise R^2 değerini 0.9996 olarak bulmuşlardır (65). Doğrusallık çalışması sonucu bulduğumuz r ve R^2 değerleri yöntemimizin sonuçlarının kabul edilebilir sınırlarda ve uygulanabilir olduğunu göstermiştir.

Yöntemimizin geri kazanım çalışmasında değerimizi ortalama %95 olarak bulundu (%93-96). Geri kazanım deneyini Sahillioğlu ve arkadaşları %94-96 arasında (62), Zoe ve arkadaşları %91-%110 arasında (64), Amy K. ve arkadaşları %86-%92 arasında (63) bulurken, Naoko T ve arkadaşları ise %103.8 olarak bulmuşlardır (66). Lensmeyer ve arkadaşları ise HPLC yöntemi ile yaptıkları geri kazanım deneyi sonucunun ortalamasını %95.1 olarak bulmuşlardır (67). Yöntemimizin geri kazanım çalışmasında elde edilen değerler diğer çalışmalardaki değerlerle paralellik göstermektedir ve kabul edilebilir sınırlarda yer almaktadır.

Yöntemimizin kesinlik (tekrarlanabilirlik) çalışmasında 2 farklı derişimde örnek çalışıldı. Bunlara karşılık gelen %CV değerleri sırasıyla gün-içi tekrarlanabilirlik çalışması için 5.93 ve 2.37, günler-arası tekrarlanabilirlik çalışması için ise 7.00 ve 2.60 olarak bulundu. Lensmeyer ve arkadaşları yaptıkları gün-içi kesinlik çalışması sonucunda 11.54, 14.26, 24.56, 45.03 ve 82.22 ng/ml derişimleri için CV değerlerini sırasıyla %8,5, %3.9, %5.0, %2.6 ve %3.3 olarak bulmuşlardır

(67). Sahillioğlu ve arkadaşlarının yaptığı kesinlik çalışmasında 6.5, 24.45 ve 43.42 ng/ml derişimleri için gün-içi CV değerleri sırasıyla %5.3, % 5.5 ve %5.6 bulunurken, günler-arası CV değerleri sırasıyla %3.2, %4.6, %2.8 bulunmuştur (62). Amy K. ve arkadaşları gün-içi CV değerlerini %6.0-%8.0 bulurken, günler-arası CV değerlerini ise %7.7 ve %9.8 olarak bulmuşlardır (63). Michael V. ve arkadaşları ise gün-içi CV değerlerini 5.8 ve 26.5 ng/ml derişimleri için sırasıyla %12 ve %7.8 bulmuşlardır (65). Naoko T. Ve arkadaşları çalışmalarında gün-içi CV değerini %5.7, günler-arası CV değerini ise %2.5 bulmuşlardır (66). Zoe ve arkadaşları ise yapmış oldukları kesinlik çalışmasında gün-içi CV değerlerini 6.4, 14 ve 30 ng/ml değerleri için sırasıyla %6.2, %3.5 ve %5.2 olarak bulurken, günler-arası CV değerlerini ise 22 ve 35 ng/ml derişimleri için sırasıyla %5.1 ve %5.6 bulmuşlardır (64). Yöntemimizin gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları sonucu elde edilen değerler diğer çalışmalardaki değerlerle paralellik göstermektedir ve kabul edilebilir sınırlarda yer almaktadır.

RIA yöntemini HPLC yöntemiyle karşılaştırdığımızda y-kestirim değerini 12.095, eğimini ise 0.188 bulundu ($y = 0.188x + 12.095$). Çalışmamızda r değeri 0.219, R² değeri ise 0.048 bulundu. Lensmeyer ve arkadaşları yaptıkları çalışmada y-kestirim değerini -5.86, eğimi ise 0.709 ($y = 0.709x - 5.86$) bulmuşlardır. Aynı çalışmada r değeri 0.7509, R² ise 0.5639 bulunmuştur (67). Jafri L ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise regresyon analizi sonucunda y- kesişim değeri -1.13 ve eğimi 1.01 ($y = 1.01x - 1.13$) bulunmuştur. Ayrıca bu çalışmada R² değeri 0.9 olarak bulunmuştur (68). Sahillioğlu ve arkadaşları RIA yöntemini LC/MS/MS ile karşılaştırdığında y- kestirim değerini 6.25, eğim değerini 0.59 ($y = 0.59x + 6.25$) bulmuşlardır (62). Michael V. ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ise y- kestirim değeri -4.0, eğim değeri 1.25 ($y = 1.25x - 4$) bulunmuştur (65). RIA yönteminin R² değeri düşük olduğu için bu yöntemin sonuçlarının HPLC yönteminin sonuçları ile uyumlu olmadığı görüldü. Her ne kadar Lensmeyer ve arkadaşları R² değerini 0.56 bulmuş ise de bu değerler iki yöntem arasındaki uyumun çok kuvvetli olmadığını göstermekle beraber bizim çalışmamızdaki kişiye ve kite bağlı sorunlardan kaynaklanan bir sıkıntı olabileceğini düşündürmektedir. Ama yöntemin ekstraksiyon basamağı gerektirmesinin de HPLC ile uyumu azalttığını söyleyebiliriz. LC/MS/MS ile yapılan çalışmalarda R² değerinin yüksek olması kullanılan kit kalitesinden

kaynaklanabilir. Ayrıca LC/MS/MS ile yapılan çalışmalarda karşılaştırılan RIA yönteminde kullanılan kitin ekstraksiyon basamağının olmaması da uyumu arttırmış olabilir.

ELISA yöntemini HPLC yöntemiyle karşılaştırdığımızda y-kestirim değerini 7.941, eğimini ise 0.273 bulundu ($y = 0.273x + 7.941$). Çalışmamızda r değeri 0.361, R² değeri ise 0.131 bulundu. Li Bo ve arkadaşları yaptıkları çalışmada y-kestirim değerini -4.4, eğimi ise 1.1 bulmuşlardır ($y = 1.1x - 4.4$)(69). ELISA yönteminin R² değeri 0.131, p değeri 0.022 bulunmuş olup, HPLC yöntemi ile orta derecede korelasyon saptanmıştır ve p değeri anlamlı olduğu için sonuçların korele olduğunu söyleyebiliriz. ELISA yöntemiyle çalışılan örneklerin sonuçlarının HPLC yönteminin sonuçlarından yaklaşık olarak 2 kat yüksek bulunması, korelasyon anlamlı olsa da yöntemin kendi kontrollerinin çalışılmasını zorunlu kılmaktadır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Rutin kullanımda klinik laboratuvarlarda HPLC yönteminin 25-OH Vitamin D ölçümünde test performansı incelenerek en iyi yöntem olduğu kabul edilmiştir.

ELISA yöntemi tarama amaçlı, imkanların yetersiz olduğu yerlerde kullanılabilir. Daha geniş örnek grubuyla yapılacak çalışmalarda daha doğru ve güvenilir değerlendirme yapmak ELISA yönteminin kullanılabilirliğini ölçmek bakımından yararlı olacaktır.

Yaptığımız çalışmada, RIA yöntemi sonuçlarının HPLC yöntemi sonuçları ile uyumlu olmadığı ve istatistiksel olarak anlamlı bulunmadığı için ile tarama amaçlı yada tanısal olarak kullanılamayacağı düşünülmektedir.

7. KAYNAKLAR

- 1.Holick MF. (2004) Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. Am J Clin Nutr. 80(6): 1678S-88S.
- 2.Holick MF. (2006) Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. J Clin Invest. 116:2062-2072.
- 3.Lenchik, L. and Sartoris, D.J. Orthopedic aspects of metabolic bone disease Orthopedic Clinics of North America 1998; 29: 103-34.
- 4.Chesney, W.R.: Bone Disease. Nelson, W.E., Behrman, R.E., Kliegman, R.M., Arvin, A.M.: in Nelson Textbook of Pediatrics. 15 eds., Pennsylvania, WB Saunders Co., 1996, p. 1984- 1990.
- 5.Onat T., Emerk K., Sözmen E.Y. İnsan Biyokimyası. Ankara. Palme Yayıncılık. 2002
- 6.Murray R.K., Granner D.K., Mayes P.A., et al. Harper Biyokimya. Dikmen N., Özgünen T. 25. baskı. İstanbul. Nobel Tıp Kitabevleri. 2004
- 7.Hatun S., Bereket A.,Çalıkoğlu A.H. Günümüzde D Vitamini Yetersizliği ve Nutrisyonel Rikets. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Dergisi. 2003; 46: 224–241
- 8.Burtis C.A., Ashwood E.R., Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler. Aslan D. 5. Baskı. Ankara. Palme Yayıncılık. 2005.
- 9.Atas A., Çakmak A., Soran M., D Vitamin Metabolizması ve Rikets Hastalığı. Bakırköy Tıp Dergisi. 2008; 4: 1–7
- 10.Lenhninger Biyokimyanın İlkeleri 3. baskı syf:892 ve syf: 380
- 11.Champe P.C., Harvey R.A. Lippincott's Illustrated Reviews Serisinden Biyokimya. Toklugil A., Dirican M., Ulukaya E. 2.Baskı.İstanbul. Nobel Tıp Kitabevi. 1997.
- 12.Özkan B. Rikets. Güncel Pediatri. 2007; 5 (1): 34–41
- 13.Bikle D. D. Vitamin D: Production, Metabolism, and Mechanisms of Action. Singer F. Diseases of Bone and Mineral Metabolism. www.endotext.org (www.endotext.org/parathyroid/parathyroid3/parathyroidframe3.htm). 12.08.2008
- 14.Chemistry of Vitamin D. vitamind.ucr.edu/chem.html. 10.08.2008

- 15.Smith C., Marks A.D., Lieberman M. Marks Temel Tıbbi Biyokimyası Klinik Yaklaşım. İnal M.E., Atik U., Aksoy N. ve ark. 2. Baskı. Ankara. Güneş Tıp Kitabevleri. 2007
- 16.Janssen H.C.J.P., Samson M.M, Verhaar H.J.J., Vitamin D Deficiency, Muscle Function, And Falls in Elderly People. Am J Clin Nutr. 2002; 75: 611–5.
- 17.Kokino S., Pekindil Y., Hakgüder A. Postmenopozal Kadınlarda Kemik Mineral Yoğunluğu ile D Vitamini ve Diğer Laboratuvar Değerlerin Karşılaştırılması. Osteoporoz Dünyasından. 2004; 10 (2): 70–73.
- 18.Özsoylu S. D vitamini Metabolizması. Katkı Pediatri Dergisi. Rikets. 1990; 11 (4): 359– 366
- 19.DeLuca H.F., Plum L.A., Clagett-Dame M. Selective Analogs of 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D3 for the Study of Specific Functions of Vitamin D. Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology. 2007; 103: 263–268
- 20.Haspolat K, Soker M. Kemiğe Ait Biyokimyasal Değerler ve Onkoloji. Dicle Tıp Dergisi (Journal Of Medical School). 2002; 29 (3): 83–90
- 21.Karadavut K.İ., Başaran A., Çakıcı A. Osteoporoz Tedavisinde Vitamin D'nin Yeri. Turkish Journal of Geriatrics. 2002; 5 (3): 115–122
- 22.Transcriptional control of gene expression by 1,25(OH)2D3.
www.nature.com/.../n73s/fig_tab/4491279f1.html. 10.08.2008
- 23.Ardeniz Ö. Vitamin D ve İmmün Sistem. Türkiye Klinikleri J. Med. Sci. 2008; 28: 198– 205
- 24.Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. Lancet 1998; 351: 805-6.
- 25.Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clin Proc 2006; 81: 353-73.
- 26.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: 18-28. [Erratum, Am J Clin Nutr 2006; 84: 1253.]

27. Thomas KK, Lloyd-Jones DM, Thadhani RI, et al. Hypovitaminosis D in medical inpatients. *N Engl J Med* 1998; 338: 777-83.
28. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporos Int* 1997; 7: 439-4.
29. Holick MF, Siris ES, Binkley N, et al. Prevalence of vitamin D inadequacy among postmenopausal North American women receiving osteoporosis therapy. *J Clin Endocrinol Metab* 2005; 90: 3215-24.
30. Heaney RP, Dowell MS, Hale CA, Bendich A. Calcium absorption varies within the reference range for serum 25-hydroxyvitamin D. *J Am Coll Nutr* 2003; 22: 142-6.
31. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporos Int* 2005; 16: 713-6.
32. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, et al. Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *J Intern Med* 2000; 247: 260-8.
33. Boonen S, Bischoff-Ferrari HA, Cooper C, et al. Addressing the musculoskeletal components of fracture risk with calcium and vitamin D: a review of the evidence. *Calcif Tissue Int* 2006; 78: 257-70.
34. Lips P. Vitamin D deficiency and secondary hyperparathyroidism in the elderly: consequences for bone loss and fractures and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2001; 22: 477-501.
35. Bakhtiyarova S, Lesnyak O, Kyznesova N, Blankenstein MA, Lips P. Vitamin D status among patients with hip fracture and elderly control subjects in Yekaterinburg, Russia. *Osteoporos Int* 2006; 17: 441-6.
36. McKenna MJ. Differences in vitamin D status between countries in young adults and the elderly. *Am J Med* 1992; 93: 69-77.
37. The ABC of vitamin D a primer for physicians Susie Langley. Medical post. Toronto: Dec4, 2007. vol43, Iss. Pg. 23, 1pgs.
38. İç hastalıkları İçin, Biberoglu 2. baskı 2003 Cilt 2 Sayfa 2478-2484.
39. Nelson Essentials of Pediatrics 3. baskı, 2001 Sayfa 79-81.
40. Sert, F., 2007. Karideslerde Melanosis İnhibisyonu ve 4-Hexylresorcinol Kalıntılarının Tespiti. E.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 90

s., İzmir.

41. www.lcresources.com/resources/getstart/generic%20HPLC.gif
42. Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., 1994. Analitik Kimya Temelleri-II. 373.
43. Kaplan LA, Pesce AJ, Kazmierczak SC. Clinical Chemistry Theory, Analysis, Correlation. 4. Edition. 2003
44. Roitt I, Brostoff J, Male D: Immunological Techniques. In: Immunology, 5th edition, Mosby, London: 1998: 386.
45. Babacan F. İnfeksiyon Hastalıklarının İmmüno-serolojisi. Topçu AW, Söyletir G, Doğanay M ed. İnfeksiyon Hastalıkları. Ankara: Nobel Tıp Kitabevleri 1996: 98-9.
46. Baron JE, Peterson LR, Finegold SM. Nontraditional Methods for Identification and detection of pathogens or their products. In: Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 9th ed. Missouri: Mosby-Year Book, 1994: 125-7.
47. Hendry DI. Identification of viral isolates by enzyme immunoassay. In: Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington: American Society for Microbiology, 1992: 2: 8.1.1-8.1.9.
48. Bilgehan H. Klinik Mikrobiyolojik Tanı, İkinci baskı. İzmir: Barış Yayınları Fakülteler Kitapevi, 1995: 224-8.
49. Coligan JE, Kruisbeek AM, Margulies DH, Shevach EM, Strober W. Antibody Detection and Preparation. In: Current Protocols in Immunology. Vol 1., New York: John Wiley & Sons, 1994: 2.1.1-2.1.4.
50. Kubly J. Antigen-Antibody Interactions. In: Immunology. New York: WH Freeman and Company, 1997: 156-8.
51. Gülmezoğlu E, Ergüven S. İmmünoloji. Ankara: Hacettepe -Taş Kitapçılık, 1994: 287-9.
52. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC: Current rapid techniques and emerging Technologies in diagnosis. In: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology, 4th edition, Philadelphia: JB Lippincott Company, 1992 :1086-87.
53. Engvall E, Perlman P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). Immunochemistry 1971; 8: 871-9.

54. Abbas KA, Lichtman AH, Pober JS: Quantitation of antigen. In: Cellular and Molecular Immunology, 3rd edition, Philadelphia: WB Saunders Company, 1997: 59-60.
55. Ronald Kahn C, Roth Jesse. Berson, Yalow, and the JCI: the agony and the ecstasy. The Journal of Clinical Investigation. 2004; 114(8): 1051-1054.
56. Yalow RS, Berson SA: Assay of plasma insulin in human subjects by immunological methods. Nature 1959; 184: 1648-1669.
57. Mehmetoğlu İ, Çağlayan O, Koçyiğit A. Klinik Biyokimya laboratuvarı El Kitabı. 2007. Nobel Tıp Kitabevi.
58. The Measurement of vitamin D: analytical aspects Joseph E. Zerwekh Annals of Clinical Biochemistry; Jul 2004, Health & Medical Complete pg.272.
59. 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: 239-271.
60. Malabanan A, Veronikis IE, Holick MF. Redefining vitamin D insufficiency. Lancet 1998; 351: 805-6.
61. Vogeser M, Kyriatsoulis A, Huber E, Kobold U. (2004). Candidate reference method for the quantification of circulating 25-hydroxyvitamin D3 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 50:1415-7.
62. Sahillioğlu B, Serdar MA, Erkan N, Erden G, Bakır F, Yıldırım kaya MM, Işık S, Özügöz U. 25-OH Vitamin D Hormon için Tandem Kütle Spektrofotometrede Yöntem geçerli Kılma Çalışması ve Bu Yöntemin Farklı Yöntemlerle Karşılaştırılması. Türk Biyokimya Derneği. 2011; 36 (1); 73-79.
63. Amy KS, Thomas JL, Deborah EB, Sayed MHS. (2006) Quantification of Serum 25-Hydroxyvitamin D2 and D3 Using HPLC– Tandem Mass Spectrometry and Examination of Reference Intervals for Diagnosis of Vitamin D Deficiency. Am J Clin Pathol. 125:914-920.
64. Zoe M, Dennis JW, Sandra JR. (2005) Routine Isotope Dilution Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry Assay for Simultaneous Measurement of the 25-Hydroxy Metabolites of Vitamins D2 and D3. Clin Chem. 51:9, 1683-1690.

65. Michael V, Apostolos K, Erasmus H, Uwe K. (2004) Candidate Reference Method for the Quantification of Circulating 25-Hydroxyvitamin D3 by Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Clin Chem*. 50:8, 1414-1417.
66. Naoko T, Yoshitomo S, Maya K, and Toshio O. (2005) Determination of 25-Hydroxyvitamin D in Human Plasma Using High-Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Anal Chem*. 77:3001-7.
67. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC Method for 25-Hydroxyvitamin D Measurement: Comparison with Contemporary Assays. *Clinical Chemistry* 52:6 1120 –1126 (2006)
68. Jafri L, Khan AH, Siddiqui AA, Mushtaq S, Iqbal R, Ghani F, Siddiqui I. Comparison of high performance liquid chromatography, radio immunoassay and electrochemiluminescence immunoassay for quantification of serum 25 hydroxy vitamin D. *Clinical Biochemistry* 44 (2011) 864–868.
69. Li B, Byrjalsen I, Glendenning P, Henriksen DB, Hoeck HC, Taranto M, Vasikaran S, Fraser WD, Christiansen C, Qvist P. Selective monitoring of vitamin D2 and D3 supplementation with a highly specific 25-hydroxyvitamin D3 immunoassay with negligible cross-reactivity to 25-hydroxyvitamin D2 . *Clinica Chimica Acta* 404 (2009) 144–148.