

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

RENAL TRANSPLANTASYON VE 1, 25-(OH)₂-VİTAMİN D₃

Bilge KARATOY ERDEM

Yüksek Lisans Tezi

Antalya, 2015

**T.C.
AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı**

RENAL TRANSPLANTASYON VE 1, 25-(OH)₂-VİTAMİN D₃

Bilge KARATOY ERDEM

Yüksek Lisans Tezi

**Tez Danışmanı
Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ**

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi
Tarafından Desteklenmiştir. (Proje No: 2014.02.0122.005)

“Kaynakça Gösterilerek Tezimden Yararlanılabilir”

Antalya, 2015

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Programında yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 18/06/2015

Tez Danışmanı

: Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



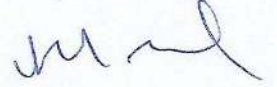
Üye

: Prof. Dr. S. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Ash BAYKAL ATAMAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



Üye

: Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR
Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi
Nefroloji Bilim Dalı



ONAY:

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Özgül ALPER

Enstitü Müdürü

ÖZET

Renal transplantasyon sonrası greft yaşam süresinin uzaması nedeni ile metabolik komplikasyonlarla daha sık oranda karşılaşılmaya başlanmıştır. Bunlar arasında kemik ve mineral metabolizması hastalıkları önemli yer tutar. Kronik böbrek yetmezlikli hastaların büyük bir kısmında vitamin D yetersizliği ve eksikliği bildirilmektedir. Bu hasta grubunda D vitamininin sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) gibi güvenilir ve referans bir yöntemle ölçülmesi önemlidir. Bu çalışmanın amacı renal transplant alıcılarında D vitamini, kalsiyum, fosfor metabolizması ile greft fonksiyonları arasındaki ilişkiyi ortaya koymak ve 1,25(OH)₂D₃'ün LC-MS/MS yöntemiyle ölçümünü yapabilmektir.

Bu çalışmaya, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi'nde, canlı vericiden böbrek nakli yapılmış ortalama yaşı 40.30±12.86 olan, 30 (10 kadın-20 erkek) hasta dahil edilmiştir. Hastaların nakil öncesinde (NÖ) ve nakil sonrası (NS) 6.ayda alınan serum örneklerinde kreatinin, BUN, kalsiyum, fosfor, alkalen fosfataz, glukoz, albumin, PTH, 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri ölçülmüştür. Ayrıca Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü ile eGFR değerleri hesaplanmış ve elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır. Plazma 1,25(OH)₂D₃ analizi elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynaklı LCMS-8040 triple kuadrupol ardışık kütle spektrometresinde (Shimadzu Corporation, Japan) çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi ile yapılmıştır. İstatistiksel analizler için SPSS 20.0 programı kullanılmıştır.

Hastaların 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinde NS 6. ayda NÖ'ye göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p=0.0001$), 25(OH)D düzeylerinde anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.102$). NS 6. ayda kalsiyum ve GFR düzeylerinde artış gözlenirken ($p=0.0001$), fosfor, PTH, kreatinin, BUN ve ALP düzeylerinde azalma gözlenmiştir ($p=0.0001$, ALP için $p=0.011$). Hastaların D vitamini değerlendirmelerinde, NÖ'de %13.3 yetersizlik, %36.7 eksiklik ve %50 ciddi eksiklik; NS 6. ayda ise %26.7 yetersizlik, %50 eksiklik ve %23.3 ciddi eksiklik tespit edilmiştir.

Ülkemizde böbrek nakli yapılmış hastalarda vitamin D yetersizliği veya eksikliği görülme sıklığını gösteren çalışmalar yeterli değildir. Çalışmamızda D vitamini eksikliği ve yetersizliği oranları literatür verilerinden daha fazla bulunmuştur. Greft fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebilecek D vitamini eksikliğinin belirlenmesi, renal transplant alıcılarında greft ömrünü korumaya yönelik D vitamini takviyesi gibi tedavilerin kullanımına öncülük ederek transplantasyon hastalarının yaşam süreleri ve yaşam kaliteleri üzerinde olumlu bir artış sağlayabilir.

Anahtar Kelimeler: Renal transplantasyon, 1,25(OH)₂D₃, D vitamini, LC-MS/MS

ABSTRACT

Although overall survival after kidney transplantation has strongly improved, stable renal transplant recipients remain at a strongly increased risk of metabolic complications. These complications are more related with bone and mineral metabolism diseases. Since vitamin D deficiency and insufficiency are common in chronic renal failure patients, the measurement of vitamin D with a reliable method is very important. Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry (LC-MS/MS) is a gold standard method for the measurement of vitamin D. The purpose of this study was to demonstrate the relationship between vitamin D, calcium, phosphorus metabolism with graft function and to measure 1,25(OH)₂D₃ levels with LC-MS/MS in renal transplant recipients.

This study included 30 renal transplant recipients (10 female, 20 male; mean age: 40.30±12.86) from living related donors which were transplanted in Akdeniz University, Faculty of Medicine. Blood samples were collected immediately before and after transplantation at month 6. Serum creatinine, BUN, calcium, phosphorus, alkaline phosphatase, glucose, albumin, PTH, 25(OH)D and 1,25(OH)₂D₃ levels were measured. GFR values were estimated by Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI). Plasma 1,25(OH)₂D₃ levels were determined in a LCMS-8040 triple quadrupole tandem mass spectrometer (Shimadzu Corporation, Japan) by multiple reaction monitoring (MRM). SPSS 20.0 software was used for statistical analysis.

Although plasma 1,25(OH)₂D₃ levels significantly increased ($p=0.0001$), we did not find any significant differences for serum 25(OH)D levels after transplantation. When posttransplant levels of serum phosphorus, PTH, creatinin, BUN and ALP levels were found to be significantly decreased ($p=0.0001$, $p=0.011$ for ALP), we observed significantly higher calcium and GFR values ($p=0.0001$). Vitamin D insufficiency was present 13.3%, deficiency 36.7%, severe deficiency 50% before transplantation, insufficiency was also seen 26.7%, deficiency 50%, severe deficiency 23.3% after transplantation at month 6.

There are limited studies that assess the incidence of vitamin D deficiency and insufficiency in our country after transplantation. In our study, vitamin D deficiency and insufficiency incidences were higher than the literature data. Determination of vitamin D deficiency and consequently treatment with vitamin D supplements could lead to better graft surveys and ultimately improve the outcome of renal transplantation.

Key Words: Renal transplantation, 1,25(OH)₂D₃, vitamine D, LC-MS/MS

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamı yapabilmem için bana tüm olanakları sağlayan ve desteğini esirgemeyen değerli danışman hocam Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ'a;

Tez çalışmamın planlanmasında bana yol gösteren ve yardımlarını esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Aslı BAYKAL ATAMAN'a;

Akdeniz Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'ndaki eğitimim süresince yetişmemde emeği geçen başta bölüm başkanımız Prof. Dr. Gültekin YÜCEL olmak üzere tüm hocalarıma;

Tez çalışmam esnasında katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Gültekin SÜLEYMANLAR ve Uzm. Dr. Vural Taner YILMAZ'a;

Hasta örneklerimi toplamamda bana yardımcı olan tüm Organ Nakli Ünitesi çalışanlarına;

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm Merkez Laboratuvarı çalışanlarına;

Beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum tüm asistan arkadaşlarıma;

Hayatımın her aşamasında yanımda olan ve beni destekleyen başta babam olmak üzere tüm aileme;

İyi ve kötü günde yanımda olan ve beni daima başaracağıma inandıran sevgili eşime,

Ve varlığıyla hayatımı anlamlandıran biricik kızıma;

en içten teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
SİMGELER VE KISALTMALAR	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	xi
GİRİŞ	1
GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)	3
2.2. Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Renal Replasman Tedavileri	4
2.3. Renal Transplantasyon	5
2.3.1. Renal Transplantasyonun Komplikasyonları	5
2.4. Renal Osteodistrofi	6
2.4.1. Sekonder Hiperparatiroidizmin Patogenezi	7
2.5. D Vitamini	10
2.5.1. D Vitamininin Tanımı	10
2.5.2. D Vitamininin Genel Özellikleri	10
2.5.3. D Vitamininin Oluşumuna Etki Eden Faktörler	10
2.5.4. D Vitamini Oluşumu	12
2.5.5. D Vitamininin Oluşum Mekanizması	13
2.5.6. Kandaki D Vitamini Miktarı	15
2.5.7. D Vitamininin Hormonal Kontrolü	16
2.5.8. D Vitamininin Biyokimyasal Yapısı	17
2.5.9. D Vitamininin Etki Mekanizması	18
2.5.10. D Vitamininin Çeşitli Sistemlerle İlişkisi	19

2.6.	D Vitamini ve Metabolitlerinin Ölçümü	21
2.6.1.	25(OH)D Ölçümü	21
2.6.2.	1,25(OH)2D Ölçümü	23
2.6.3.	3-Epi-25-Hidroksivitamin D ₃ Ölçümü	24
2.6.4.	24R,25-Dihidroksivitamin D ₃ Ölçümü	25
2.6.4.	Diğer Metabolitlerin Ölçümü	25
2.7.	D Vitamini Analizinin Standardizasyonu	26
BİREYLER VE YÖNTEM		27
3.1.	Hasta Seçimi ve İzlemi	27
3.1.1.	Çalışmaya Alınmama Kriterleri	27
3.2.	Laboratuvar Çalışmaları	27
3.2.1.	Kullanılan Cihaz, Kit ve Sarf Malzemeleri	27
3.2.2.	Hasta Örnekleri	28
3.3.	Ayrıntılı Yöntemler	29
3.3.1.	Serum Kreatinin Analizi	29
3.3.2.	Serum BUN Analizi	29
3.3.3.	Serum Kalsiyum Analizi	29
3.3.4.	Serum Fosfor Analizi	29
3.3.5.	Serum Albümin Analizi	30
3.3.6.	Serum Glukoz Analizi	30
3.3.7.	Serum ALP Analizi	30
3.3.8.	Serum PTH Analizi	30
3.3.9.	Serum 25(OH)D (Total Vitamin D) Analizi	31
3.3.10.	Plazma 1,25(OH) ₂ D ₃ Analizi	32
3.4.	İstatistiksel Analiz	38
		39
BULGULAR		
4.1.	Hasta Gruplarından Elde Edilen Veriler	40
4.2.	Parametrelere Ait Verilerin Grafikleri	42
4.3.	Nakil Öncesi Döneme Ait Parametrelerin Korelasyonları	46
4.4.	NS 6. Aya Ait Parametrelerin Korelasyonları	48
4.5.	NÖ ve NS 6. Aya Ait Parametrelerin Korelasyonları	48
		51
TARTIŞMA		
SONUÇLAR		57
KAYNAKLAR		59
ÖZGEÇMİŞ		70

SİMGELER VE KISALTMALAR

ALP	: Alkalen fosfataz
APCI	: Atmospheric Pressure Chemical Ionization
BUN	: Kan üre azotu
cAMP	: Siklik adenozin monofosfat
Ca	: Kalsiyum
CaR	: Kalsiyuma duyarlı resöptör
CKD-EPI	: The Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration
cpm	: Count per minute
CTRL1	: Kontrol 1
CTRL2	: Kontrol 2
CYP24A1	: 24-hidroksilaz enzimi
DM	: Diabetes Mellitus
DNA	: Deoksiribonükleik asit
FGF	: Fibroblast Growth Faktör
ECLIA	: Elektrokemilüminesans immunassay
ELISA	: Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
GC-MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
GFR	: Glomerüler filtrasyon hızı
HD	: Hemodiyaliz
HLA	: Human Leucocyte Antigen
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
IFN	: Interferon
IL-2	: Interleukin-2
IL-3	: Interleukin-3
KBY	: Kronik Böbrek Yetmezliği
KBH	: Kronik Böbrek Hastalığı
LC-MS	: Sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi

LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi
LLOQ	: Ölçülebilme alt sınırı
LOD	: Saptanabilme alt sınırı
m/z	: Kütle/yük oranı
MAP	: Mitojen aktive eden protein
MRM	: Çoklu reaksiyon izlemi
NKF	: National Kidney Foundation
NÖ	: Nakil Öncesi
NS	: Nakil Sonrası
P	: Fosfor
PD	: Periton diyalizi
PI-3 kinaz	: Fosfoinozitid-3 kinaz
PKA	: Protein kinaz A
PLC	: Fosfolipaz C
PTH	: Paratiroid hormon
RAAS	: Renin anjiyotensin aldosteron sistemi
RIA	: Radioimmunoassay
RNA	: Ribonükleik asit
RRT	: Renal replasman tedavisi
RXR	: Retinoik asit reseptörü
SD	: Standart sapma
SDBY	: Son dönem böbrek yetmezliği
SPSS	: Statistical Package for Social Sciences
TNF	: Tümör Nekroz Faktör
Th1	: İnflamatuar T hücre
Th2	: Anti-inflamatuar T hücre
VDR	: Vitamin D reseptörü
VKİ	: Vücut Kitle İndeksi
VUR	: Veziko üretral reflü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil		Sayfa
2.1	Mevsimsel serum 25(OH)D seviyeleri	11
2.2	D vitamini oluşumu ve etkileri	14
2.3	C ₂₈ H ₄₄ O ₃ (ergokalsiferol), C ₂₇ H ₄₄ O ₃ (kolekalsiferol), C ₂₇ H ₄₄ O ₃ (kalsitriol)	17
2.4	D vitamini oluşumu ve transkripsiyona etkisi	19
3.1	1,25(OH) ₂ D ₃ için lineer regresyon eğrisi	33
3.2	1 µg/mL 1,25(OH) ₂ D ₃ içeren optimizasyon çözeltisinin kromatogramı	33
3.3	ImmuTube	35
3.4	Kalibrasyon eğrisi	35
3.5	LC zamana göre pompa akış diagramının ekran görüntüsü	36
3.6	Kontrol 1 kromatogramı	36
3.7	Kontrol 2 kromatogramı	37
3.8	Örnek hasta kromatogramları	37
4.1	Çalışmaya katılan hastaların renal transplantasyon öncesi tedavileri (%)	40
4.2	K-DOQI rehberine göre hastaların nakil öncesinde D vitamini değerlendirmeleri	41
4.3	K-DOQI rehberine göre hastaların nakil sonrası 6. ayda D vitamini değerlendirme	41

4.4	NÖ ve NS 6. ay plazma 1,25(OH) ₂ D ₃ düzeyleri	42
4.5	NÖ ve NS 6. ay serum 25(OH)D ₃ düzeyleri	43
4.6	NÖ, NS 6. ay serum kalsiyum ve fosfor düzeyleri	43
4.7	NÖ, NS 6. ay serum Kreatinin ve BUN düzeyleri	44
4.8	NÖ ve NS 6. ay serum CaxP değerleri	44
4.9	NÖ ve NS 6. ay eGFR değerleri	45
4.10	NÖ ve NS 6. ay PTH düzeyleri	45
4.11	NÖ ve NS 6. ay ALP düzeyleri	45

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo		Sayfa
2.1	Kronik böbrek yetmezliğinin evreleri	4
2.2	Ülkemizdeki renal transplantasyon yapılmış olan hastalarda KBH nedenleri (%)	4
2.3	Böbrek nakli sonrası ortaya çıkan kemik hastalığının nedenleri	7
2.4	D vitamini metabolitlerinin normal değerleri	15
2.5	Serum 25(OH)D değerinin yorumu	16
4.1	Çalışmaya katılan hastaların KBH nedenleri (%)	39
4.2	Hastaların NÖ ve NS serum/plazma değerleri (ortalama $\pm$ SD)	40
4.3	Diyaliz grubu ile preemtif grubun NÖ değerleri (ortalama $\pm$ SD)	42
4.4	Hastaların nakil öncesi parametreleri arasındaki anlamlı korelasyonlar	47
4.5	Hastaların nakilden 6 ay sonraki serum ve plazma parametreleri arasındaki korelasyonlar	49
4.6	Hastaların nakil öncesi ve nakilden 6 ay sonraki serum ve plazma parametreleri arasındaki korelasyonlar	50

GİRİŞ

Kronik böbrek hastalığı (KBH) renal ve kardiyovasküler morbiditesi ve mortalitesi yüksek olan, yaşam kalitesini olumsuz yönde etkileyen ve görülme sıklığı son yıllarda önemli artış gösteren bir hastalıktır [1]. Kronik böbrek hastalarına diyaliz ve renal transplantasyon gibi renal replasman tedavileri uygulanmaktadır. Renal transplantasyon yapılan hastalarda yaşam süresi ve kalitesi diyaliz hastalarına göre belirgin düzelmekte ve daha az kardiyovasküler hastalık gözlenmektedir [2]. Ancak renal transplantasyonda akut rejeksiyon ve kronik allograft nefropatisi halen büyük risk oluşturmaktadır [3, 4]. Renal transplantasyonun önemi giderek arttığından greft yetmezliğinde rol alan düzeltilebilir risk faktörlerini tespit edebilmek çok önemlidir.

D vitamini, kalsiyum, fosfor ve kemik metabolizmasının düzenlenmesinde rol alan steroid bir hormondur. Beslenme ve güneş ışınları ile elde edilen D vitaminin fizyolojik olarak aktif formuna (1,25-dihidroksivitamin D, kalsitriol) dönüşmesi için iki hidroksilasyon basamağı gereklidir. İkinci hidroksilasyon basamağı, ağırlıklı olarak böbrekte bulunan 1α -hidroksilaz enzimi ile gerçekleşir [5]. Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) 30 mL/dk'dan daha düşük olan hastalarda, hiperfosfatemisi ile ilişkili 1α -hidroksilaz enzim inhibisyonu nedeniyle kalsitriol düzeyleri sıklıkla yetersizdir [6]. Kronik böbrek yetmezlikli (KBH) hastaların büyük bir kısmında vitamin D yetersizliği ve eksikliği bildirilmektedir [7]. Renal transplantasyonda hastaların immunsupressif tedavi nedeniyle güneşten kaçınmaları ve kullanılan glukokortikoidler tarafından hızlandırılan D vitamini katabolizması nedeniyle durum benzerdir. KBH hastalarında D vitamini takviyesi rehberlerde yer almasına rağmen, hiperkalsemi, hiperfosfatemisi ve hipoparatiroidizm gibi durumları tetikleyebileceği düşünüldüğünden çoğunlukla kullanılmamaktadır [8, 9]. Renal transplantasyon hastaları için ise D vitamini takviyesine yönelik spesifik bir rehber bilgisi yoktur [1].

D vitamininin renal koruyucu özellikleri nedeniyle eksikliğinde böbrek greft fonksiyonu etkilenebilir. D vitamini renin-anjiyotensin-aldosteron sistemini negatif olarak düzenler. İnsan ve hayvan modellerinde D vitamini takviyesinin, progresif renal yetmezlik için tanımlanmış bir risk faktörü olan proteinüriyi azalttığı gösterilmiştir [10, 11]. Renal transplant alıcılarında D vitamini yetmezliği ve proteinüri arasında nedeni tam açıklanamayan anlamlı bir ilişki gösterilmiştir [12]. D vitamininin immun düzenleyici etkileri de renal transplantasyonda önemli bir rol üstlenmektedir. T, B hücreleri, monositler ve antijen sunan hücreler gibi çeşitli immun hücrelerde kalsitriol reseptörleri bulunmaktadır. Kalsitriol, yardımcı T hücre

proliferasyonunu ve dendritik hücre differansiyasyonunu baskıladığından transplantasyonda koruyucu olabilir [13, 14].

D vitamininin klinik olarak doğru ölçülmesi çok önemlidir. Bunun için bir standardizasyon gerekmektedir ve sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometri (LC-MS/MS) dışındaki yöntemler daha az duyarlıdır. LC-MS/MS, D vitamini ölçümünde altın standart bir yöntemdir [15].

Renal transplant alıcılarında D vitamini, kalsiyum, fosfor metabolizması ve greft fonksiyonları arasındaki ilişkiyi ortaya koymak, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'ün LC-MS/MS yöntemiyle ölçümünü yapabilmek amacıyla yaptığımız bu çalışmada transplantasyon öncesi (NÖ) ve transplantasyon sonrası 6. ayda (NS 6.ay) alınan hasta serumlarında $25(\text{OH})\text{D}$, kalsiyum, fosfor, paratiroid hormon (PTH), alkalen fosfataz (ALP), kreatinin, BUN, albumin, glukoz ve plazmada $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ölçüldü. Ayrıca, Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü kullanılarak hastalara ait “Glomerüler Filtrasyon Hızı (GFR)” değerleri hesaplandı.

Araştırmanın, renal transplant alıcılarında transplantasyon öncesi ve sonrasında D vitamini düzeyleri ve greft fonksiyonlarıyla olan ilişkinin değerlendirilmesinde yarar sağlayabileceği beklenmektedir. Greft fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebilecek D vitamini eksikliğinin belirlenmesi, renal transplant alıcılarında greft ömrünü korumaya yönelik D vitamini takviyesi gibi tedavilerin kullanımına öncülük ederek transplantasyon hastalarının yaşam süreleri ve yaşam kaliteleri üzerinde olumlu bir artış sağlayabilir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeylerinin LC-MS/MS yöntemi ile ölçümü konusunda yapılmış araştırma sayısı çok sınırlıdır. Ayrıca, Türk renal transplant alıcılarında yapılmış benzer bir çalışma bulunmadığından araştırmamızın literatüre katkıda bulunması da beklenmektedir.

GENEL BİLGİLER

2.1. Kronik Böbrek Hastalığı (KBH)

KBH, nefronların çeşitli nedenlerden dolayı ilerleyici ve geri dönüşü olmayan kaybı ile karakterize bir hastalıktır. Böbreklerin fonksiyonlarını kaybetmesi çeşitli nedenlerle meydana gelebilir. Böbreklerin fonksiyonlarının kaybı sonucunda vücutta metabolik atıklar birikir, vücuttan sıvı atılımı azalır ve vücut sıvılarında çözünmüş olan maddelerin konsantrasyonları değişir. Metabolik ve endokrin fonksiyonların kaybına bağlı hastalıklar meydana gelir. GFR ölçümü işlevsel değişimlerin en duyarlı ve özgül belirteçidir [16, 17]. GFR, genellikle aylar veya yıllar içinde giderek azalır ve bu azalma altta yatan nedene göre değişkenlik gösterir. KBH, insidansı ve prevalansı bütün dünyada giderek artan önemli bir halk sağlığı sorunudur [18, 19].

Böbrek yetmezliği gelişen kişide; anemi, hiperfosfatemi, hipokalsemi, idrar sedimentinde geniş silindirler, üç ay veya daha uzun süren azotemi, uzun süreli üremik belirti ve bulgular ve radyolojik incelemelerde bilateral küçük böbrekler olması kronik hastalığın göstergesidir [20]. Kronik böbrek hastalığının en sık nedeni hipertansiyon ve Diabetes mellitus olduğundan, devamlılık gösteren proteinüri, hasarın temel göstergelerinden birisidir. Diğer hasar bulguları arasında idrar sediment anormallikleri, kan ve idrar biyokimyasal ölçümlerindeki bozukluklar sayılabilir. Bunun yanı sıra, kardiyovasküler sistem, gastrointestinal sistem, nörolojik, immünolojik, hematolojik ve endokrin sisteme ait çeşitli patolojiler de bu hasarın oluşmasında rol alır [21, 22].

KBH'nin erken evresinde böbreğin fonksiyonel kapasitesinde azalma vardır, klinik belirti veya bulgu yoktur. Orta evrede azotemi oluşur ve bazı klinik belirtiler ortaya çıkabilir. İleri evre böbrek yetmezliğinde ise, GFR 30 mL/dk'nın altına düşmüştür. Böbreğin atım, biyosentez ve regülasyon fonksiyonlarının büyük ölçüde bozulması klinik belirti ve bulguların ortaya çıkmasına neden olur [17, 22-24]. KBH, değişen süreler içerisinde ilerleyici nefron kaybı sonucu, son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) ilerleyebilir. Fonksiyon kaybının oranına göre klinik ve laboratuvar bulgular ortaya çıkar [25, 26].

KBH, NKF (National Kidney Foundation) sınıflamasına göre, böbrek fonksiyonlarının derecesi baz alınarak evrelerine ayrılmıştır (Tablo 2.1) [21, 27].

Tablo 2.1. Kronik böbrek hastalığının evreleri.

GFH Evreleri	GFH(ml/dk/1.73 m2)	Tanımlar
G1	≥90	Normal veya yüksek
G2	60-89	Hafif azalmış
G3a	45-59	Hafif / orta derecede azalmış
G3b	30-44	Orta / ciddi derecede azalmış
G4	15-29	Ciddi derecede azalmış
G5	<15 (veya diyaliz)	Böbrek yetmezliği (Eğer diyalizle tedavi ediliyorsa D eklenir)

Ülkemizde SDBY'nin etyolojisinde; kronik hemodiyaliz programında izlenmekte olan hastalarda; diyabet %30'luk oranla birinci sırada, hipertansiyon %27.2'lik oranla ikinci sırada yer almaktadır. Renal transplantasyon yapılan hastalarda da, SDBY nedeni olarak %19.4'lük oranla hipertansiyon birinci sırada, %14.7'lik oranla glomerülonefrit ikinci sırada ve %8.6'lık oranla Diabetes Mellitus üçüncü sıradadır. 2010 yılı içinde transplantasyon yapılan hastalarda etiyolojik nedenlere göre dağılım Tablo 2.2'de gösterilmiştir [28].

Tablo 2.2. Ülkemizdeki renal transplantasyon yapılmış olan hastalarda KBH nedenleri (%).

	Sayı	%
Hipertansiyon	226	19,4
Glomerülonefrit	171	14,7
Diabetes Mellitus	100	8,6
Tip 1 DM	34	2,9
Tip 2 DM	66	5,7
Piyelonefrit	59	5,1
Polikistik Böbrek Hastalıkları	45	3,9
Amiloidoz	33	2,8
Renal Vasküler Hastalık	1	0,1
Diğer	219	18,8
Etiyoloji Bilinmiyor	300	25,8
Kayıp (Bilgi yok)	10	0,9
Toplam	1164	100

2.2. Son Dönem Böbrek Yetmezliğinde Renal Replasman Tedavileri

Son dönem böbrek yetmezliğinde eksik olanı yerine koyma tedavileri renal replasman tedavisi (RRT) olarak tanımlanır. RRT seçenekleri ise diyaliz ve böbrek transplantasyonudur [29]. Serum kreatinin düzeyi 4 mg/dL'ye yaklaşmaya başlayınca, hasta renal replasman tedavisi açısından değerlendirilmelidir [30, 31].

Tedaviye başlama zamanını; üremiye bağlı ağır anemi, egzersiz intoleransı, halsizlik, aşırı iştahsızlık, kaşıntı, ağır asidoz, volüm fazlalığına bağlı hipertansiyon, üremik perikardit, semptomatik hiponatremi gibi mutlak diyaliz endikasyonları tayin eder [32]. Bu aşamada tedavide üç ana seçenek bulunmaktadır. Bunlar; hemodiyaliz (HD), periton diyalizi (PD) ve böbrek naklidir. SDBY bulunan hastalar her üç tedaviden de zaman içerisinde yararlanmak durumunda kalabilirler [33].

2.3. Renal Transplantasyon

Kronik böbrek yetmezliğinin en ileri aşaması olan son dönem böbrek yetmezliği, üremik sendrom da denilen, azotlu madde ve diğer yıkım ürünlerinin toksik etkilerine bağlı belirti ve bulguların tespit edilebilir bir hale geldiği klinik durumdur. Üremik sendrom renal klirensin yaklaşık olarak 10 mL/dk civarına düştüğü sırada meydana gelir. Bu noktaya ulaşmış bir hastada uygun bir donör var ise ya da kadavra donörü temini mümkün ise seçkin bir tedavi şekli olan transplantasyon uygulanabilir [35].

Renal transplantasyon, renal replasman tedavisi olarak SDBY olan hastaların çoğunda tercih edilen bir tedavidir [36]. Bu hastalarda fonksiyon gören transplante böbrek, diyalizden daha iyi fizyolojik, sosyal ve fiziksel rehabilitasyon ve yüksek yaşam kalitesi sağlar [35]. Ayrıca diğer tedavi seçenekleri ile karşılaştırıldığında böbrek nakli, hem daha ucuz, hem de hasta mortalite ve morbiditesi daha düşüktür. Ülkemizde böbrek naklinin maliyeti hemodiyaliz ve periton diyalizine göre daha uygundur [33].

Renal transplantasyon kadavra veya canlı vericiden yapılabilir. Renal transplantasyon ile 1 yıllık greft yaşamı canlı vericide %70-95 ve kadavra vericide %50-80'dir. Beş yıllık greft yaşamı canlı vericide %60-90 ve kadavra vericide %40-60'dır [37, 38]. Canlı donör transplantasyonu kadavra transplantasyonundan daha iyi bir greft yaşam ömrüne sahiptir [39]. Ülkemizde yapılan renal transplantasyonda vericilerin yaklaşık %20-30'u kadavra iken bu oran Batı ülkelerinde yaklaşık %80'dir. Yüksek kalitede yaşam yılları sağlayan böbrek nakli tedavisi, modern tıptaki önemli bir ilerleme olarak kabul edilmektedir.

Yaşlı popülasyonun, diyabet ve hipertansiyon prevalansının giderek artması, gelecek yıllarda SDBY prevalansının da artacağını düşündürmektedir. Transplantasyon ve diyaliz, yeni bir yöntem bulunana kadar, tüm dünyada giderek daha sık uygulanan tedavi seçeneği olmaya devam edecektir [35].

Böbrek naklinde en başarılı sonuç, doku uygunluk antijenlerinde tam uyum olan vericilerden yapılan nakillerde olmaktadır [40, 41]. Günümüzde, böbrek naklinin en önemli dezavantajı, organ reddinin önlenmesi için verilen immün baskılayıcı ilaçların neden olduğu yan etkiler ve komplikasyonlardır [42].

2.3.1. Renal Transplantasyonun Komplikasyonları

Renal transplantasyon, böbrek yetmezliğinin son döneminde olan hastalar için önemli ve hayat kurtarıcı bir tedavi yöntemi olmakla birlikte, transplantasyonu takip eden dönemlerde erken ya da geç komplikasyonlar ortaya çıkabilmektedir. Transplantasyondan sonraki ilk iki ayda ortaya çıkan komplikasyonlar genellikle

erken komplikasyonlar olarak kabul edilmektedir. Transplantasyon sonrası erken komplikasyonlar, alt gruplara ayrılabilir. Bunlar, greft yaşamı ve fonksiyonu ile ilişkili olanlar (greft trombozu, renal arter daralması, infeksiyonlar, operasyon sonrası kanamalar, idrar kaçırma, üreteral obstrüksiyon, greftin akut rejeksiyonu) ve cerrahi yaralara bağlı gelişenler (yara infeksiyonu ya da yara açılması ve lenfosit) şeklindedir [43]. Geç komplikasyonlar ise, kardiyovasküler hastalıklar, kronik allogreft nefropatisi, kilo artışı, infeksiyonlar, hipertansiyon, hiperlipidemi ile tümörler, osteoporoz ve yara iyileşmesinde gecikme gibi cerrahi problemleri içermektedir [44].

2.4. Renal Osteodistrofi

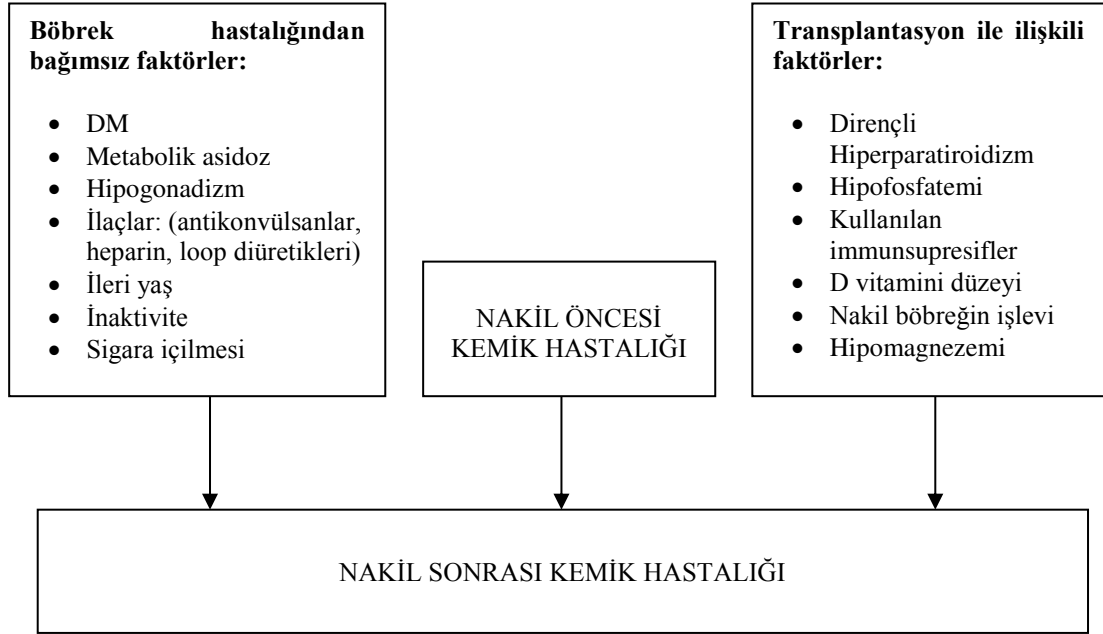
Böbrek naklinden sonra saptanan kemik hastalığı böbrek yetmezliği döneminde başlayıp, nakil sonrası kullanılan immüsupresifler ve bazı bağımsız risk faktörleri ile daha da ağırlaşabilmektedir. Bağımsız risk faktörleri olarak sigara ve inaktiviteyi sayabiliriz. Başarılı bir böbrek naklinden sonra böbrek fonksiyonlarının hızlı düzelmesi ve serum kalsitriol düzeyinin normal değerlere ulaşmasına rağmen mineral-metabolizma bozukluğu devam edebilir. Bu durum kemik hastalığı ile sonuçlanabilir. Böbrek nakli sonrası serum parathormon (PTH) düzeyi birçok hastada iki hafta içinde normal düzeye gelmektedir.

Nakil sonrası ortaya çıkan kemik hastalığı hayat kalitesini bozmaktadır. Normal toplumla karşılaştırıldığında bu olgularda kırık riski 4 kat artmaktadır [45]. Nakil yapılan olgularda ağırlık taşıyan kemiklerde avasküler nekroz sıklığı artmaktadır. Böbrek nakli sonrası ortaya çıkan kemik hastalığı diğer solid organ naklinden sonra ortaya çıkan kemik hastalığından farklıdır. Böbrek dışı organ nakli sonrası ortaya çıkan kemik hastalığı, kortikosteroidlerin sebep olduğu kemik hastalığına benzemektedir. Böbrek nakli sonrası ortaya çıkan kemik hastalığı ise nakil öncesi böbrek yetmezliği ve diyaliz süresince ortaya çıkan kemik hastalığıyla ilişkilidir. Ayrıca böbrek nakli öncesinde varolan hiperparatiroidizm, metabolik asidoz, hiperfosfatemi ve diğer metabolik ve hormonal faktörler, nakil sonrası kemik kaybına katkıda bulunabilir [46-48]. Nakil sonrasında iskelet sistemi düzelen metabolik durumdan yararlı olsa da bazı faktörler nedeniyle yeni kemik hastalığı oluşabilir veya varolan renal osteodistrofi şiddetlenebilir [49]. Böbrek nakli sonrası kemik kaybına sebep olan faktörler Tablo 2.3' de gösterilmiştir [50]. Böbrek nakli sonrası kemik kaybına bir çok faktörün katkısı olmasına rağmen, en önemli risk faktörleri immüsupressif ilaçlar, dirençli hiperparatiroidizm, elektrolit bozukluğu ve D vitamini sentezindeki yetersizliktir [46, 51].

Renal osteodistrofi hastalarında gelişen spesifik kemik değişiklikleri 3 genel sınıfta toplanırlar:

- 1) Normal veya yüksek döngülü (turnoverli) üremik kemik hastalıkları
 - a) Hafif hiperparatiroidizm
 - b) Ciddi hiperparatiroidizm
- 2) Düşük döngülü üremik kemik hastalıkları
 - a) Osteomalazi
 - b) Adinamik veya aplastik üremik kemik hastalığı
- 3) Mikst üremik kemik hastalığı [52]

Tablo 2.3. Böbrek nakli sonrası ortaya çıkan kemik hastalığının nedenleri



Sekonder hiperparatiroidizm, son dönem kronik böbrek yetmezliği bulunan hastaların hemen hemen hepsinde değişik derecelerde bulunmakta, hasta morbidite ve mortalitesinde önemli rol oynamaktadır. Diyet ve medikal tedavi ile kontrol altına alınmadığı zaman ciddi sekonder hiperparatiroidizm tablosu oluşmakta, uzun süreli ve kontrolsüz PTH artışı ile üremik kardiyomiyopati, üremik ensefalopati, nöropati, karbonhidrat intoleransı, empotans, hipertansiyon ve aneminin kontrolsüzlüğü gibi üremik komplikasyonların gelişimine neden olmaktadır [52, 53].

2.4.1. Sekonder Hiperparatiroidizmin Patogenezi

Kronik böbrek yetmezlikli hastaların kalsiyum ve fosfor homeostazisinin bozulmasına bağlı çeşitli derecelerde PTH artışı, kemik mineral metabolizmasındaki değişiklikler ve paratiroid bezinin hiperplazisi görülür. Bu durum sekonder hiperparatiroidizm olarak adlandırılır. Kronik böbrek yetmezliğinde sekonder hiperparatiroidizmin nedenleri :

- 1) Fosfat retansiyonu,
- 2) Hipokalsemi,
- 3) Değişmiş vitamin D metabolizması ve kalsitriole direnç,
- 4) Parathormonun kalsemik etkisine iskelet rezistansı,
- 5) Otonom paratiroid hücre proliferasyonu,
- 6) Azalmış parathormon yıkımı,
- 7) Kalsiyum kontrollü PTH salınımının regülasyonundaki anormallik ve
- 8) Kalsitonin'dir [52-54].

Günümüzde sekonder hiperparatiroidizmin patogenezinin sorumlu tutulan en önemli faktörler; fosfat retansiyonu, hipokalsemi ve serum kalsitriol ($1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$) seviyelerindeki azalmadır.

Fosfat Retansiyonu

Son 20 yıldan beri yapılan çalışmalar, sekonder hiperparatiroidizmin patogeneğinde hiperfosfateminin büyük bir rol oynadığını göstermiştir [55]. Bu etkinin oluşumunda ileri sürülen mekanizmalar;

- 1) $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ seviyelerinde fosfora bağlı azalma,
- 2) Fosfora bağlı hipokalsemi,
- 3) Serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ ve iyonize kalsiyum düzeylerindeki değişikliklerden bağımsız olarak, fosforun direkt paratiroid bezdeki etkisine bağlı gelişen hiperparatiroidizm şeklinde özetlenebilir [55, 56].

Son yıllarda böbrek yetmezliğinin erken döneminde, serum PTH ve fosfor seviyeleri normal olsa bile geride kalan nefron başına düşen fosfor yükünün arttığı kabul edilmektedir [56]. Bu fosfor yükü, 1α -hidroksilaz enzim aktivitesini azaltır ve sonuçta azalan kalsitriol düzeyleri ise paratiroid bezlerde PTH salınımını artırırlar.

Fosfor retansiyonu, sekonder hiperparatiroidizmi çeşitli mekanizmalarla uyarır. Yüksek fosforun PTH' a kalsemik cevabı azalttığı ve renal yetmezliği olan hastalarda hipokalsemiye yol açtığı bilinmektedir. Yapılan in vitro çalışmalarda, yüksek serum fosforunun paratiroid bezlerde direkt olarak posttranskripsiyonel PTH sentez ve sekresyonunu arttırdığı gösterilmiştir [57]. Fosfor paratiroid hücre membranının fosfolipid içeriğini, kalsiyum akışını ve vitamin D reseptörlerini (VDR) ve muhtemelen paratiroid hücre membranındaki kalsiyum reseptörlerini de etkileyebilir [58].

Hipokalsemi

Sekonder hiperparatiroidizme yol açan çoğu faktör hipokalsemiye neden olabilir ve böylece PTH üretimini arttırabilir. Bu faktörlerden en önemlileri, serum kalsitriol yetersizliği ve fosfat retansiyonudur [52, 56]. Ekstraselüler sıvıdaki iyonize kalsiyum konsantrasyonu PTH sekresyonu arasında bir ilişki vardır [54]. Sekonder hiperparatiroidizmde normal serum kalsiyumu, aşırı PTH sentez ve sekresyonunu önlemede yeterli değildir. Paratiroid bezin ekstrasellüler kalsiyuma olan duyarlılığı, serum PTH ve kalsiyum konsantrasyonlarıyla birlikte değerlendirilmelidir. İnsanlarda paratiroid bezlerde kalsiyuma duyarlı reseptörlerin varlığına rağmen, sekonder hiperparatiroidizmde kalsiyuma anormal duyarlılık ile kalsiyuma duyarlı reseptörler (CaR) arasındaki ilişki önemlidir. Sekonder hiperparatiroidili hastalarda, CaR' nin ve mRNA ekspresyonunun azalmasıyla paratiroid bezin proliferasyonu arasında güçlü bir ilişki vardır. Bu azalmanın bir nedeni de, vitamin D eksikliği ve vitamin D'ye rezistans olabilir.

Değişmiş Vitamin D Metabolizması ve Kalsitriole Direnç

Anormal kalsitriol metabolizması sekonder hiperparatiroidinin patofizyolojisinde önemli bir role sahiptir. Bu durum anormal immün, kardiyak ve iskelet kası fonksiyonları gibi renal yetmezlikte görülen diğer bozukluklarda da rol oynayabilir [56]. Renal yetmezlikte kalsitriol metabolizmasındaki değişiklikler konusunda 3 temel nokta üzerinde durulmaktadır:

- 1) Kalsitriol üretiminin azalması,
 - 2) Kalsitriol reseptör yoğunluğunun azalması,
 - 3) Reseptör-hormon kompleksinin nükleer kromatin ile ilişkisinin bozulması
- olup bu durum muhtemelen artmış üremik toksinlere bağlıdır. Bu değişiklikler, kalsitriole end-organ cevapsızlığına yol açarlar [52, 54, 56].

Kronik böbrek yetmezliğinde kalsitriolün serum seviyesi azalmıştır. Renal yetmezliğin erken dönemlerinde dahi serum kalsitriol seviyesinde azalma olduğu tespit edilmiştir [52, 54]. Renal yetmezlikte düşük serum kalsitriol seviyesinin esas nedeni böbrekteki yapımının azalmasıdır. Bu duruma renal kitlerde azalma, fosfat retansiyonu ve metabolik asidoz gibi faktörler de katkıda bulunurlar. Burada azalmış renal kitlenin büyük önemi vardır. İleri dönem böbrek yetmezliği olan hastalarda, GFR' nin azalmasıyla birlikte artan fosfor yükü 1α -hidroksilaz enzim aktivitesini azaltarak kalsitriolün böbrekteki yapımını azaltır [56]. Ancak, diyetle fosfor kısıtlaması yapıldığında, normal bireylerde ve renal yetmezliği olan hastalarda serum kalsitriol seviyesinin arttığı görülmüştür. Yine renal yetmezlikte akut metabolik asidozun kalsitriol üretimini azalttığı, kronik asidozun ise azaltmadığı bilinir. Asidoz bu etkisini, indirekt olarak 1α -hidroksilaz enzim aktivitesini azaltarak gösterir. Kalsitriol üretimini üremik toksinler de azaltır. Renal yetmezlikli hastalarda azalmış kalsitriol üretimi, hipokalsemiye katkıda bulunan kalsiyumun barsak emiliminin ve iskelet üzerinde PTH' a kalsemik cevabın azalmasına neden olur. Düşük serum kalsitriol seviyeleri, PTH sentez ve salgılanmasını da arttırabilir [52].

Kalsitriol, PTH salgılanması üzerine major etkisini DNA transkripsiyonunu engelleyerek sentezini azaltması şeklinde gösterir. PTH sentez ve salınımında kalsitriolün baskılayıcı etkisinin yokluğu sekonder hiperparatiroidinin gelişmesine neden olabilir [52, 56].

Kalsitriol, diğer steroid hormonlar gibi biyolojik etkisini bir hormon-sitoplazmik reseptör kompleksi üzerinden gerçekleştirir. Aktif hormon-reseptör kompleksi, nükleer kromatinle etkileşmekte ve etkilenen genlerin spesifik bölgesi olan 5' ucuna bağlanarak prekürsör mRNA moleküllerine DNA'nın transkripsiyonunu değiştirmektedir [52]. VDR, başta barsak ve paratiroid bezi olmak üzere değişik dokularda vardır. Kronik böbrek yetmezlikli hastaların paratiroid bezlerindeki VDR sayısında azalma vardır [58, 59]. Kalsitriole biyolojik cevabın hücre içindeki VDR yoğunluğuyla orantılı olmasından dolayı, VDR sayısındaki azalma DNA ile etkileşerek kalsitriole biyolojik cevabı azaltabilir [58].

Strom ve arkadaşları, vitamin D eksikliği olan ratlarda kalsitriol tedavisiyle VDR mRNA sentezinin ve reseptör sayısının arttığını bildirmişlerdir [60]. Kalsitriolün ratların paratiroid bezlerindeki, CaR' lerin düzenlenmesinde de önemli rol oynadığı ve bezlerdeki CaR mRNA düzeylerini arttırdığı gösterilmiştir [61, 62].

2.5. D Vitamini

2.5.1. D Vitamininin Tanımı

D vitamini, A, E, ve K vitaminleri ile birlikte yağda eriyen vitaminler grubuna girmekte olup, aynı zamanda bir dokuda sentezlenip, hedef dokuya etki etmesi için dolaşım sistemine salınan, miktarı feedback mekanizması ile düzenlendiği için vitamin özelliği yanında hormon olarak da görev yapan bir metabolittir [63]. D vitamini anne karnındaki yaşamdan ölüme kadar, insanın iskelet sistemi, büyüme, gelişme ve korunma gibi birçok fonksiyonlar için gereklidir [64].

2.5.2. D Vitamininin Genel Özellikleri

D vitamininin, insan vücudunda güneş ışınlarının etkisi ile üretildiği ve bitkiler aracılığı ile hazır alındığı gibi 750 milyon yıl öncesinden beri okyanuslarda yaşayan planktonlar tarafından da üretildiği belirtilmiştir [64].

İlk kez 1919 - 1920'li yıllarda vitamin olarak adlandırılan D vitamininin, insanlarda eksikliğinin ilk olarak Endüstri Devriminin ortaya çıkması ile gündeme geldiği belirtilmiştir [65]. Çocuklarda D vitamini eksikliğinden kaynaklanan bir hastalık olan raşitizm 17.yy'da ciddi bir sorun haline gelmiş, bu süreç 19.yy sonlarına kadar sürmüştür. 19.yy sonlarında Kuzey Amerika ve Avrupa'da endüstrisi ilerleyen ülkelerde yaşayan çocukların % 90'ının raşitizm olduğu tahmin edilmiştir [64].

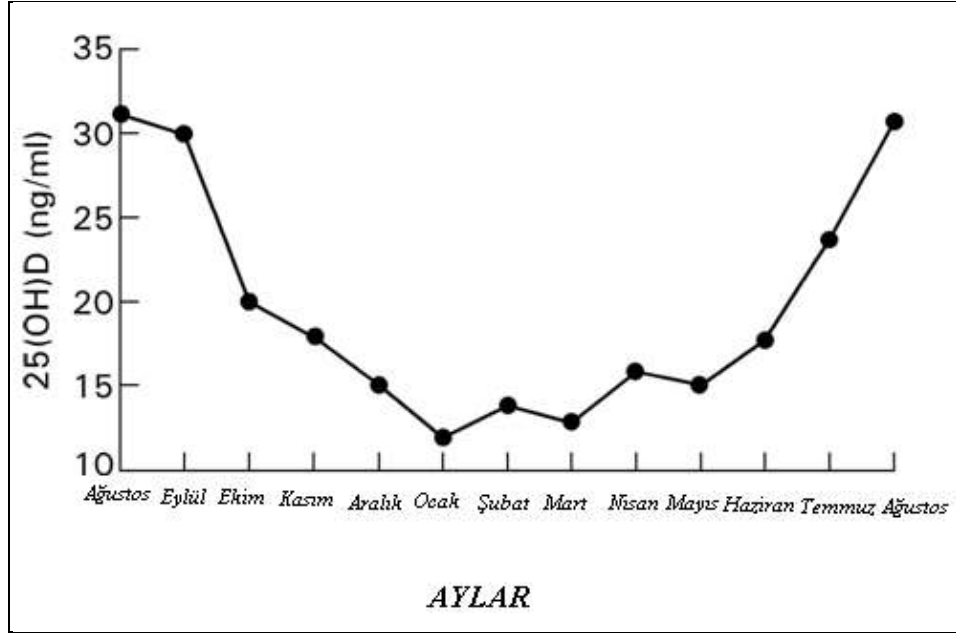
D vitamininin öneminin anlaşılması ile raşitizm tedavisinde önemli sonuçlar elde edilmiştir. Birçok gıda maddesinin D vitamini yönünden zenginleştirilmesi ile 1930 - 1940'lı yıllarda raşitizmin önüne geçilmiştir. 1970'li yılların sonlarında, kandaki D vitamini seviyesinin sadece kalsiyum ve fosfor metabolizması üzerinde etkili olduğu sanılmaktaydı. Ancak ilerleyen yıllarda birçok dokuda (pankreas, meme, bağırsak, akciğer, gonadlar, T ve B lenfositler, mide, deri, beyin, kalp) VDR'nin varlığı saptanınca D vitamininin sadece kalsiyum ve fosfor metabolizması değil de birçok dokuda etkili olduğu anlaşılmıştır [64].

2.5.3. D Vitamininin Oluşumuna Etki Eden Faktörler

İnsanlarda güneş ışığı vitamini olarak bilinen vitamininin ortalama % 90 - 95'i güneş ışığı yardımı ile oluştuğu gibi hazır olarak da alınabilir. Cilde ulaşan güneş miktarını ve 7-dehidroksikolesterolün oluşum miktarını etkileyen faktörler aynı zamanda ciltte D vitamininin yapımını da etkilemiş olur. Bu sentezi birçok faktör etkileyebilir. Bunlar arasında, yaşanan bölgenin enlemi, güneş koruyucu kremler, mevsimler, deri pigmenti, güneşlenme saati ve süresi, beden kitle indeksi olarak sıralanabilir [66].

Yaşanılan bölgenin enlemi

Ülkemiz 36 - 42 derece kuzey enlemleri ve bol güneş alan jeopolitik bir alanda bulunduğu için yılın sadece 4 ayı D vitamini üretimine yetersiz güneş ışığı almaktadır. Yılın geri kalan aylarında gelen güneş ışığı, D vitamini yapımı açısından yeterli düzeydedir [64]. Yapılan çalışmalarda, serum D vitamini seviyesinin ilkbahar ve kış aylarında daha düşük olduğu saptanmıştır [63] (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Mevsimsel serum 25(OH)D seviyeleri (6)

Yaşanılan bölgeye gelen güneş açısı (Zenith Açısı)

Zenith Açısı, D vitamini sentezi için gerekli güneş ışını açısıdır. Bu açının büyümesi, güneş ışığındaki fotonların daha uzun yol kat etmelerine neden olmaktadır. Bu da bize neden 35 derece enleminden daha büyük enlemlerde yaşayanların D vitamini sentezi açısından yetersiz olduğunu açıklamaktadır [64].

Güneşlenme saati ve süresi

Yapılan araştırmalara göre, eller ve yüzün haftada en az 2 saat veya günde en az 20 dk olmak üzere direk güneş ışığı alması gerektiğini belirtmişlerdir. D vitamini sentezi için derideki sınır değer cm² başına 18 - 20 mJ (UVB) olarak belirlenmiştir. D vitamini sentezi için en uygun saatin saat 1100 ile 1500 arası olduğu belirtilmiştir. D vitamini sentezi için pencere camı arkasından güneşlenmek yeterli değildir nedeni, pencere camından 320 nm düşük güneş ışınları geçirmediği için cam arkasından güneşlenmenin D vitamini sentezinde etkisinin olmadığı belirtilmiştir [66].

Deri pigmenti (Melanin)

Melanin, D vitamini sentezini etkileyen bir filtre olup 290 - 310 nm dalga boyunda UVB ışınlarını absorbe eder. Başka bir deyişle derideki ultraviyole ışınların emilimini azaltarak D vitamini oluşumunu % 99 oranında azaltabileceği belirtilmiştir. Melanin, bir filtre görevi gördüğü ve koyu tenli kişilerdeki melanin oranı açık tenlilere oranla daha fazla olduğundan, koyu tenlilerin D vitamini sentezi için açık tenlilere göre güneş ışığında daha fazla kalması gerekmektedir. Çünkü melanin, D vitamini sentezi için proD3 vitamini denilen 7-dehidroksikolesterol ve güneş ışığı ile yarışma halindedir. Açık tenli birinin kol ve bacaklarının ortalama 10-20 dak güneşte kalması ile yeterli D vitamini miktarının yarısını alabilir bu da oral

yoldan alınan 3000 IU 'ye eşittir. Ancak koyu tenli bir kişinin yeterli D vitamini alması için açık tenli birine oranla 3 - 6 kat daha fazla güneşte kalması gerektiği belirtilmiştir [64, 66].

Cilde sürülen güneş koruyucu kremlerin etkisi

Güneş koruyucu kremlerin, D vitamini sentezi ile aralarında ters bir kolerasyon vardır. Güneş koruyucu kremler, güneş ışınlarının etkisini belirgin derecede azaltır. Örneğin, koruyucu krem eğer 8 faktör değerinde ise D vitamini üretimini % 92.5, 15 faktör değerinde ise % 99 oranında azalttığı belirtilmiştir [64].

Beden kitle indeksi

Beden kitle indeksi ile 25(OH)D arasında ters kolerasyon vardır. D vitamini yağda eriyen bir vitamin olduğu için kilolu kişilerde artan yağ dokusu ile orantılı olarak depolama oranı da artar. Böylelikle dolaşımdaki miktarı azalır. Fazla miktarda sentezlenen D vitamininin toksik etkisi yoktur. Nedeni ise güneş ışığına maruz kalındığında UVB ışınları öncül molekül olan preD vitamini, D vitaminine dönüştürdüğü gibi vücuttaki D vitamini inaktif metabolitlere çevirir. Bu durum neden fazla güneşlenmenin D vitamini toksisitesine yol açmadığını açıklanmıştır [64].

2.5.4. D Vitamini Oluşumu

Organizmaya bitkisel ve hayvansal yollarla alınan D vitamini, sterol türevi olup kolesterolden endojen olarak sentezlenerek, pro vitamin (7-dehidroksikolesterol) şeklinde bulunur. 7-dehidroksikolesterol, D vitamini yapımında öncül maddedir, karaciğerde sentezlenerek dolaşım sistemi aracılığı ile derideki malpighi tabakasına gelir.

7-dehidroksikolesterol, derinin malpighi tabakasındaki, keratinositlerin plazma membranında bulunur ve pro-D₃ vitamini olarak adlandırılır. Güneş ışınları, derinin malpighi tabakasına etki ederek pro-D₃ vitamini, pre-D₃ vitaminine çevirir [66].

D vitamini Türevleri: D vitamininin 2 çeşidi bulunmaktadır.

- Kolekalsiferol
- Ergokalsiferol

Kolekalsiferol

25(OH)D₃ veya D₃ vitamini olarak adlandırılan kolekalsiferol, kolesterolün oksitlenme ürünü olan 7-dehidroksikolesterolden sentezlenmektedir. Genellikle balık yağı, somon, morino, sardalya, ringa, uskumru, alabalık, ton, hamsi gibi birçok balık türü, yumurta sarısı, balık karaciğerinde bulunmaktadır [66].

Ergokalsiferol

25(OH)D₂ veya D₂ olarak adlandırılan ergokalsiferol, daima dışarıdan hazır olarak alınmaktadır. D₂ vitamini genellikle yumurta sarısı, süt, brokoli, yeşil soğan, maydanoz, su teresi ve mantarlarda bulunmaktadır [63].

Kolekalsiferol ve ergokalsiferol etki mekanizması açısından aynı etkiyi gösterir. Ancak insan vücudunda yalnız kolekalsiferol sentezlenir, ergokalsiferol dışarıdan hazır alınmaktadır. İnsan vücudu, yeteri kadar 7-dehidroksikolesterol içermektedir. Yaşın ilerlemesine bağlı olarak epidermisteki 7-dehidroksikolesterol miktarı azalır bu nedenle 70 yaşındaki bir kişi ile 20 yaşındaki bir kişi karşılaştırıldığında aynı sürede güneş ışığına maruz kalma durumunda, 70 yaşındaki bir kişinin 20 yaşındakine oranla % 25 daha az D vitamini sentezlediği bilinmektedir. Ancak yeteri miktarda güneş ışığına maruz kalındığında yaşlılarda bu açığın kapandığı bilinmektedir [66, 67].

2.5.5. D Vitamininin Oluşum Mekanizması

D vitamini, deride pre-vitamin olarak sentezlendikten veya diyet ile dışarıdan alındıktan sonra D vitamini bağlayıcı protein (D-binding protein; DBP) olan α -1 globuline bağlanarak karaciğere taşınır. DBP, D vitamininin bütün şekillerini bağlar. Serbest formda bulunan miktarı % 1–3 iken DBP bağlı miktarı % 97-99 oranındadır. Karaciğere gelen D vitamininde ilk hidroksillenme 25-hidroksilaz enzimi (CYP2, CYPA4, CYP2R1, CYP27A1) aracılığı ile mitokondri ve mikrozomlarda 25. pozisyonda gerçekleşir, besinin dışarıdan hazır alınıp alınmamasına bağlı olarak, 25-hidroksiergokalsiferol $25(\text{OH})\text{D}_2$ veya 25 hidroksikolekalsiferol $25(\text{OH})\text{D}_3$ oluşur (47). Deride üretilen ve dışarıdan alınan D vitamini, sitokrom p450 ve 25-hidroksilaz (CYPA27A1) enzimi aracılığı ile $25(\text{OH})\text{D}$ 'ye dönüşür. Bu madde 'kalsidiol' olarak adlandırılmaktadır [66].

Kalsidiol, DBP'ye bağlanarak dolaşım yolu ile böbreğe gelir. Böbrekte proksimal tübül hücrelerinin mitokondrileri, 1α -hidroksilaz enzimi içeriği bakımından zengindir. Kalsidiol, böbrekte 1α -hidroksilaz enzimi (CYP27B1) ile 1. pozisyonda tekrar hidroksillenerek $1,25$ -hidroksikolekalsiferol ($1,25(\text{OH})\text{D}_3$) veya $1,25$ -hidroksiergokalsiferol'e ($1,25(\text{OH})\text{D}_2$) dönüşür ve oluşan madde $1,25(\text{OH})\text{D}$ "kalsitriol" olarak adlandırılır [66].

D vitamini, karaciğerde depolanır, bir hormon olarak görev yaptığı için miktarı feedback mekanizma ile ayarlanır ve plazma membranı üzerindeki reseptörüne bağlanıp ikinci haberciler olan cAMP ve AMP' yi etkileyerek pankreas beta hücreleri, vasküler düz kas, bağırsaklar, monositler, kalsiyum kanalları üzerinde etkili olabilmektedir (Şekil 2.2). Bu mekanizmadaki kilit enzim 1α -hidroksilaz enzimidir ve 1α -hidroksilaz enziminin düzenlenmesinde PTH, fosfor, kalsiyum, fibroblast growth factor 23 (FGF23) etkin rol oynamaktadır [66, 67]. Bu düzenleme 4 kısma ayrılır;

1- Serum kalsiyum ve fosfor düzeyindeki düşüklük, 1α -hidroksilaz enzimini aktifleştirerek D vitamini sentezini artırır [65].

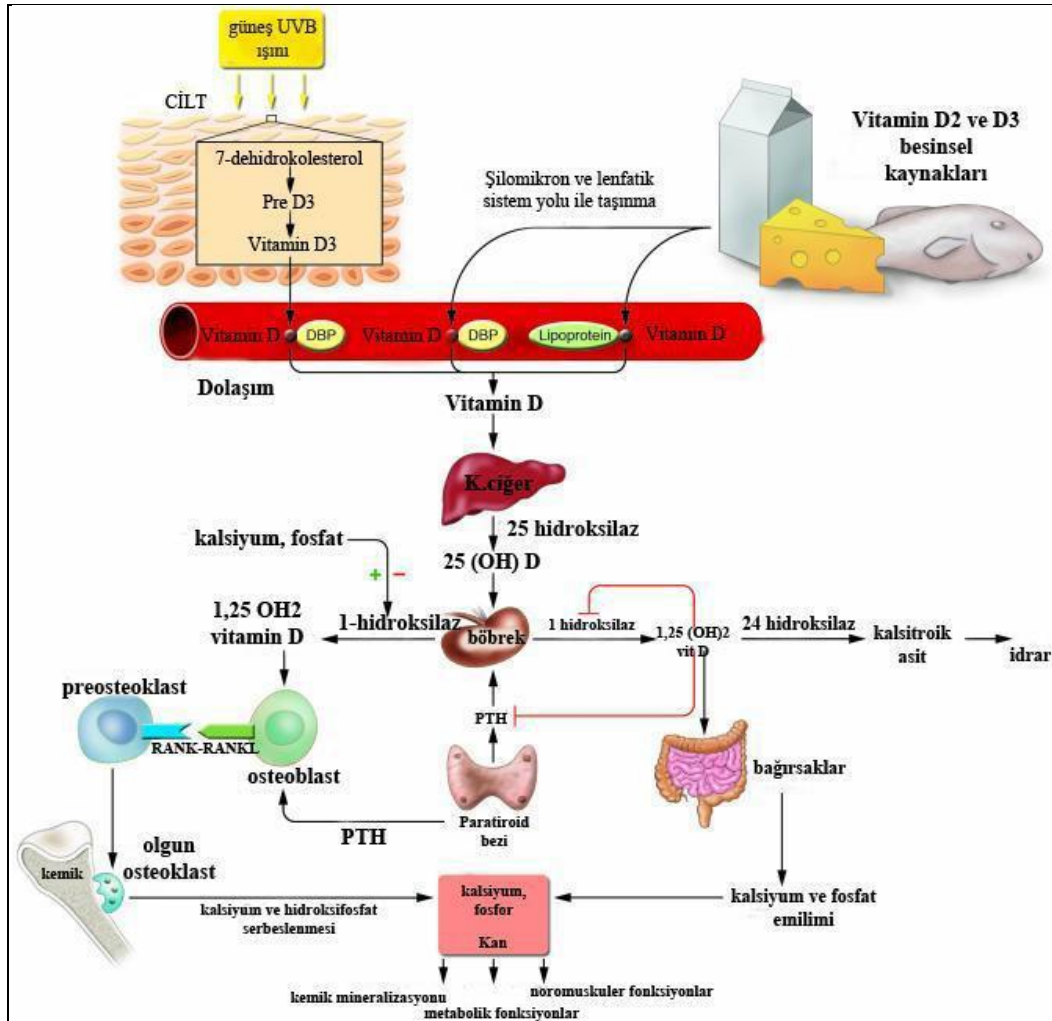
2- PTH böbrek tübülüs hücrelerinin 1α -hidroksilaz enzimini stimüle ederek, D vitamini sentezini artırır [65].

3- D vitamininin katabolize olması 24 -hidroksilaz enzimi aracılığı ile gerçekleşir. 24 -hidroksilaz enzimi dokulardaki aktif olan $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'ye bağlanarak etkisini inaktif hale getirir. $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin yeterli miktara ulaşması, 24 -hidroksilaz enzimini aktif duruma geçirir ve feedback mekanizma yardımı ile inaktif $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ 'nin 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 [66].

4-FGF23 kemikten salgılanan ve $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ yapımını baskılayan bir mekanizmaya sahiptir. FGF23; $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ yapımını baskıladığı gibi aynı zamanda 24 -hidroksilaz enzimini de aktive eder. Böylece $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ inaktif forma dönüşür [65].

Ayrıca meme dokusu, prostat, meme, kolon ve makrofajlarda da $25(\text{OH})\text{D}_3$ 'ün $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 'e dönüşebildiği belirtilmiştir (Şekil 2.2). 25-hidroksilaz ve 1α -hidroksilaz enzimlerinin reaksiyonu gerçekleştirmesi için sitokrom p450, NADPH ve moleküler oksijen varlığına ihtiyaç vardır. Ayrıca bu reaksiyonda gerekli parametrelerden biri ise magnezyumdur. Magnezyum, hem 25-hidroksilaz, hem de 1α -hidroksilaz enzimlerinin aktivasyonu için gereklidir. Magnezyum, aynı zamanda parathormon salgısı ve etkisi için gerekli olan cAMP oluşumu sırasında, adenilat siklaz aktivitesinin artmasını sağlamaktadır. D vitamini oluşumu sırasındaki hız sınırlayıcı basamak, 1α hidroksilaz enzimin hidroksilasyon reaksiyonudur [64, 66, 68].



Şekil 2.2. D vitamini oluşumu ve etkileri [66]

2.5.6. Kandaki D Vitamini Miktarı

D vitamini lipofilik olduğundan, karaciğer ve adipoz dokuda depolanabilir böylece, D vitamini alımında eksiklik veya yokluk durumunda 6 aya kadar vücudun ihtiyacını karşılayabilir [68].

D vitamininin özellikleri arasında, steroid bir hormon ve yağda eriyen vitamin olduğundan ve artan yağ oranına bağlı olarak depolanan miktarı artacağından, obez kişilerde D vitamini eksikliği görülmesi olası bir sonuçtur. Obez kişilerde 25 hidroksi vitamin D'nin düşük olmasının nedeninin, D vitamininin yağ dokusunda sekestrasyonu ve obeziteye bağlı malabsorpsiyonuna bağlı olduğu düşünülmüştür [68].

D vitamininin aktif formu 1,25(OH)D'dir. Ancak vücuttaki miktarı hakkındaki en güvenilir bilgiyi veren parametre 25(OH)D'dir. Çünkü D vitamininin en aktif şekli olan 1,25(OH)2D'nin yarılanma ömrü 3-6 saat, 25(OH)D'nin yarılanma ömrü ise 20 gündür. Bu nedenle D vitamini eksikliği tanısında 25(OH)D ölçütü kullanılmaktadır [66]. Nedeni ise vücutta 1,25(OH)D'ye oranla 1000 kat daha fazla bulunması ve yarılanma ömrünün 1,25(OH)D'ye oranla daha uzun olmasıdır. 25(OH)D ve 1,25(OH)D₂ ve 1,25(OH)D₃ normal değerleri Tablo 2.4' de verilmiştir [65].

Tablo 2.4. D vitamini metabolitlerinin normal değerleri [65]

D VİTAMİNİ METABOLİTLERİNİN NORMAL DEĞERLERİ	
25(OH)D ₂	4-10 ng/mL
25(OH)D ₃	12-40 ng/mL
24,25(OH)D ₃	1-4 ng/mL
1,25(OH) ₂ D ₃	İnfant 70 -100 pg/mL
	Çocukluk Dönemi 30-50 pg/mL
	Adolesan 40-80 pg/mL
	Erişkin 20-35 pg/mL

Holick MF tarafından yapılan ve D vitamini düzeyi ve paratiroid hormon düzeyini karşılaştıran bir çalışmada, plato çizen paratiroid hormona karşılık gelen D vitamini miktarı 32 ng/mL olarak bildirilmiş ve bu değer normal değer olarak kabul edilmiştir. Çalışmada 21 – 29 ng/mL arası çıkan değerler yetersizlik, 20 ng/mL altı çıkan değerler ise eksiklik olarak değerlendirilmiştir [66]. Aynı zamanda sigara, aşırı çay ve kahve tüketen kişilerde D vitamini eksikliği daha fazla görülmektedir [65].

ABD Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention - CDCP)'nin değerlendirmesine göre D vitamini düzeyleri Tablo 2.5'de verilmiştir.

Tablo 2.5. Serum 25(OH)D değerinin yorumu [66]

D vitamini düzeyi (nmol/L)	Yorum
<30	Bebek ve çocuklarda raşitizm ile erişkinlerde osteomalazi ile ilişkili D vitamini eksikliği
30-50	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık açısından D vitamini yetersizliği
50-125	Sağlıklı bireylerde kemik ve genel sağlık açısından yeterli D vitamini düzeyi

Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) rehberine göre ise dolaşımdaki 25(OH)D 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 [106].

2.5.7. D vitamininin Hormonal Kontrolü

Güneş ışınları ile artan ve kimyasal yapısı itibarı ile steroid hormon grubu içerisinde bulunan D vitamini endokrin sistem tarafından kontrol edilir ve bu etkisini otokrin ve parakrin etkilerle gösterir. 1,25(OH)₂D'nin paratiroid hormon, fibroblast büyüme faktörü 23(FGF23), kalsiyum ve fosfor düzeyleri ile sıkı bir bağlantısı vardır [64].

D vitamini eksikliğinde bağırsaklardan kalsiyum ve iyonize kalsiyum emilimi azalır. Buna bağlı olarak paratiroid hormon sentezi artar. Paratiroid hormon sentezi artışına bağlı olarak böbreklerde 1,25(OH)₂D yapımı artar. Bu da kemiklerdeki kalsiyum mobilizasyonu ve paratiroid hormon artışına bağlı olarak serum 1,25(OH)₂D seviyesinin normal sınırlar içerisinde tutulmasını sağlar [66]. Prolaktin, D vitamini oluşumunu stimüle eder, östrojen ise karaciğerde D vitamini bağlayan protein sentezini ve plazma düzeyini arttırarak 1,25(OH)₂D düzeyini arttırır [63, 68].

D vitamini ve parathormon

Paratiroid hormon, paratiroid bezinde sentezlenmekte, kalsitonin ve aktif D vitamini metaboliti ile birlikte kalsiyum ve fosfor metabolizması üzerinde aktif olarak rol oynamaktadır. D vitamininin PTH ile ters korelasyonlu bir ilişkisi vardır. Böbrek proksimal tübül hücrelerindeki D vitamini hidroksilasyonu, parathormon aracılığı ile gerçekleşir. PTH hücre zar reseptörüne bağlanır ve adenilat siklazı uyarak cAMP sentezini arttırır, cAMP ise 1 α -hidroksilazı aktive eder [66]. Böbreklerden kalsiyumun geri emilimi ve fosfat homeostazı üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Serumda artan 1,25(OH)₂D miktarı ile feedback mekanizması sonrasında PTH salınımı inhibe olur [65]. Böylece D vitamini vücudun kalsiyum ve fosfor dengesini sağlar. D vitamini, böbreklerden kalsiyum ve fosfor atılımını azaltır. Primer hiperparatiroidizmde, 25(OH)D metabolizması hızlanır, hızlanan metabolizmaya bağlı olarak serum 25(OH)D düzeyi azalır [64].

D vitamini ve insulin

Hayvan modelleri üzerindeki çalışmalar ışığında, D vitamini eksikliğinin insülin sekresyonunun inhibe ettiği gözlemlenmiştir. Bu nedenle D vitamini yetersizliği bulunan kişilerde, Tip 2 DM riski bulunmaktadır.

Tip 2 DM olan kişiler ve diyabetik olmayan kontrol grubunu karşılaştıran bir çalışmada; D vitamini takviyesi verilmesi ile insülin salınımının düzeldiği belirtilmiştir [65].

2.5.8. D Vitamininin Biyokimyasal Yapısı

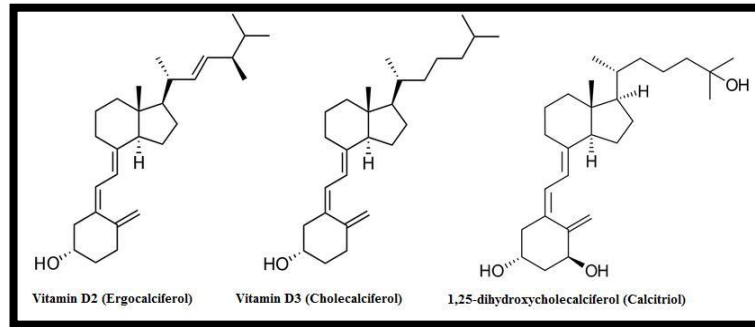
D vitamini biyokimyasal açıdan en büyük steroid yapıdaki hormondur. Aynı zamanda reseptörü olan VDR de sterol türevi olarak görev yapmaktadır [68]. D vitamininin, 37 metabolitinin olduğu bilinmektedir fakat bu metabolitlerin birçoğu inaktiftir. Bunlara örnek verilecek olunursa 25,26(OH)₂D; 1,24,25,(OH)₃D; 1,25,26(OH)₃D; 25(OH)26,23-lakton olup bu metabolitlerin biyolojik aktiviteleri henüz saptanmamıştır [68]. Ancak en aktif şekli 1,25(OH)₂D'dir. D vitamini ısı, ışık, saklama koşullarına duyarlıdır [63].

Kolekalsiferol (25-OH-D₃ vitamini)

- 3 adet çift bağa sahiptir.
- Erime noktası 84-85°C'dir.
- Suda çözünme özelliği yoktur.
- Kolekalsiferolün halkasal yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.3).

Ergokalsiferol (25-OH-D₂ vitamini)

- 4 adet çift bağa sahiptir.
- Kaynama noktası 112°C'dir.
- Suda çözünme özelliği yoktur.
- Ergokalsiferolün halkasal yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 2.3).
- Ergokalsiferol, kolekalsiferolden farklı bir yan zincire sahiptir C₂₄'de bir metil grubu, C₂₂ ve C₂₃ de bir çift bağa sahiptir [68]. Ayrıca 17 nolu karbon atomuna bağlı yan kolda, kolekalsiferolde 8, ergokalsiferolde 9 karbon atomu bulunmaktadır [65].



Şekil 2.3. C₂₈H₄₄O₃ (ergokalsiferol), C₂₇H₄₄O₃ (kolekalsiferol), C₂₇H₄₄O₃ (kalsitriol)

2.5.9. D Vitamininin Etki Mekanizması

Organizmadaki fosfor düzeyi böbrekler, kalsiyum düzeyi ise bağırsaklar üzerinden düzenlenir. D vitamini olmadığında, fosforun % 60'ı, kalsiyumun % 10-15'i emilmektedir. 1,25(OH)₂D ile VDR etkileşimi sonucunda kalsiyum Emilimi % 30- 40, fosfor Emilimi % 80'e çıkmaktadır [66].

D vitamininin eksik olduğu durumlarda paratiroid hormon düzeyi artar, artan PTH'a bağlı olarak 1 α -hidroksilaz enzimi aktiflenir, aktiflenen 1 α -hidroksilaz 1,25(OH)₂D miktarının artmasına neden olur. PTH ve 1,25(OH)₂D etkileri ile kemiklerden kalsiyum salınımı başlayarak, serum kalsiyum düzeyi normal sınırlara ulaşınca kadar olay devam eder ve serum kalsiyum düzeyinin sabit kalması sağlanır. Ancak bu şekilde kemik mineralizasyonu bozulur. Nutrisyonel raşitizm denilen olay serum kalsiyum ve D vitamini yetersizliği sonucu, bağırsaklardan kalsiyum Emilimini arttırmak yerine kemiklerden kalsiyum salınımının artmasına bağlı olarak olarak gelişir [66]. D vitamininin genomik ve non genomik etkileri vardır.

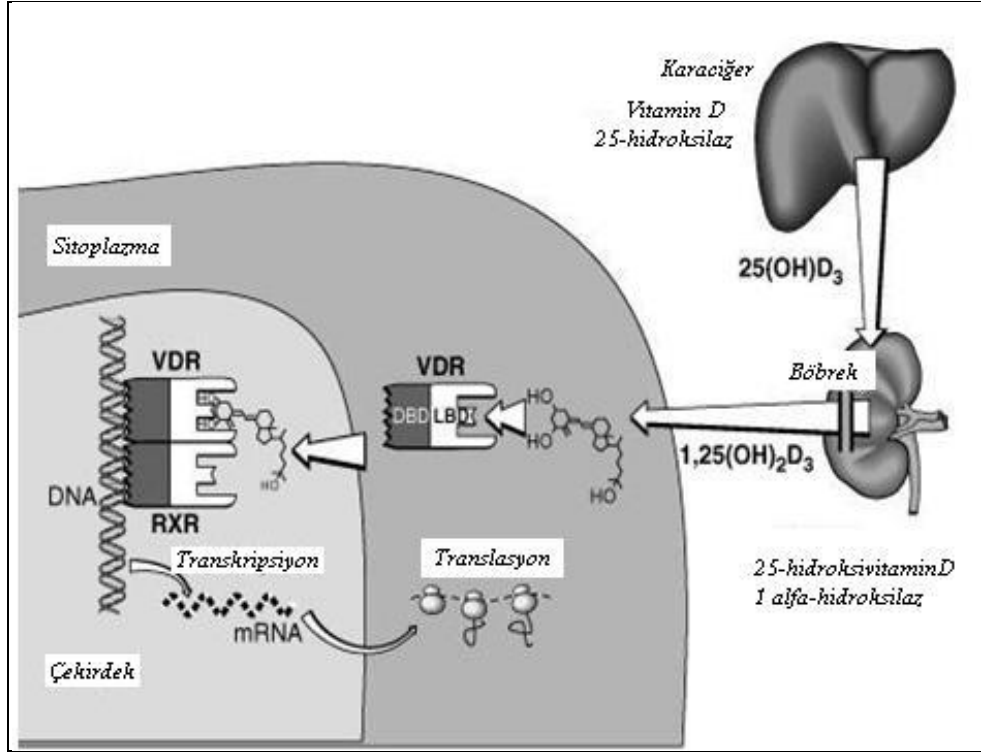
D vitamininin genomik etki mekanizması

D vitamini, genomik etkisini transkripsiyon üzerinde göstermektedir ve (Şekil 2.4) 200'den fazla geni kontrol etmektedir. Bu genler, hücrede apoptoz, anjiyogenez, diferansiasyon, proliferasyon mekanizmaları ile ilgilidir [66].

D vitamininin etkileri;

- 1-Hücre sel büyümenin düzenlenmesi
- 2-Apoptoz
- 3-Diferansiasyon
- 4-DNA onarımı
- 5-Membran transportu
- 6-Adezyon
- 7-Hücre sel metabolizma
- 8-Oksidatif stres

D vitamini hücre sel düzeydeki etkilerini VDR reseptörünün aktifleşmesi ile sağlamaktadır. Yapısında 427 adet aminoasit içeren VDR, membranı geçer ve etki edeceği nükleer reseptör ile etkileşime girerek retinoik asit reseptörüne bağlanır. 1,25(OH)₂D₂-VDR-RXR kompleksini oluşturur. Bu kompleks nükleus kromatinine bağlanır. Reseptörde hem aktif D vitaminini bağlayan bir bölge, hem de DNA'ya bağlanmasını sağlayan 2 adet çinko atomu bulunmaktadır. Oluşan 1,25(OH)₂D₂-VDR-RXR yapısı transkripsiyonu başlatır ve hücredeki genomik etkisi ortaya çıkar. Böylece bağırsaklardaki kalsiyum kanalları açılır ve kalbindin ekspresyonu gerçekleşerek bağırsaklardan kalsiyum Emilimi sağlanır [64, 66, 69].



Şekil 2.4. D vitamini oluşumu ve transkripsiyona etkisi [66]

D vitamininin non genomik etki mekanizması

D vitamini, hücre membranında bulunan VDR'ye bağlanarak kısa bir süre içerisinde etkisini gösterir. Membrandaki VDR'ne D vitamini bağlanması sonucunda kalsiyum ve klor trans-membran geçişini değiştirebilir veya hücre içi sinyal yolları (cAMP, PKA, PLC, PI-3 kinaz ve MAP kinaz) aktive olabilir. Non-genomik etki bağırsaklar, vasküler düz kas, monositler ve pankreasın beta hücrelerinde etkilidir [66].

D vitamininin, birçok kanser çeşidi üzerinde etkili olduğu, özellikle invazyon, proliferasyon, anjiyogenez, metastaz üzerine azaltıcı, apoptoz ve diferansiasyon üzerine artırıcı genomik etkileri bulunduğu belirtilmektedir [66].

2.5.10. D Vitamininin Çeşitli Sistemlerle İlişkisi

Bağışıklık sistemi üzerine etkisi

D vitamininin sadece kalsiyum ve fosfor metabolizması üzerinde değil bunun dışında birçok dokuda da etkisinin olduğu bilinmektedir [66].

D vitamini, immun sistem üzerinde düzenleyici etki göstermektedir. Özellikle makrofaj, dendritik hücre ve aktive T lenfositler üzerinde VDR bulunması, D vitamininin immünomodülatör etkisini kanıtlamaktadır. 1,25(OH)₂D₃ dendritik hücrelerin ve makrofajların antijen sunma kapasitelerini baskılayarak makrofajların

aktivitelerini ve bakteri ölümlerinin stimülasyonunu sağlar [66]. D vitamini reseptörü, timus ve periferik T hücrelerinde bulunmaktadır. D vitamininin T hücrelerinin çoğalmasını engellediği ve kazanılmış immun cevap üzerinde baskılayıcı özelliğe sahip olduğu belirtilmiştir. T hücreleri antijen ile uyarıldıktan sonra sitokin üretimine bağlı olarak Th1 ve Th2 olmak üzere 2 farklı T hücrelerine ayrılır. Bu iki hücre bir denge halinde çalışmaktadır. Bu iki hücre arasındaki dengenin bozulması, immun cevabın hangi yönde çalışacağını belirtilir [65, 66].

D vitamini aynı zamanda proinflamatuvar Th1 aracılığı ile antiinflamatuvar etki göstermektedir. Bu etkiyi IFN gamma, IL-2, IL-3, TNF alfa salınımını inhibe ederek yapmaktadır. 1,25(OH)₂D, B hücrelerinin plazma hücrelerine dönüşümünü engeller. D vitamini eksikliği durumunda, artmış Th1 cevabına bağlı olarak, immun yanıt bozulur ve enfeksiyon eğilimi artar [66].

Kas- İskelet sistemi üzerine etkisi

D vitamini, osteoklastik, osteoblastik aktivite ve kemik mineralizasyonu üzerinde etkilidir. Eğer bağırsaklardan kalsiyum emilimi yeterli düzeyde ise 1,25(OH)₂D miktarı normal sınırlar içerisinde olur, buna bağlı olarak kalsiyum ve fosfor emilimi devam ederken kemik mineralizasyonu sağlanmaktadır. Organizma açısından serum kalsiyum miktarı, kemik kalsiyum miktarına oranla daha önemli olduğundan, D vitamini kemik mineralizasyonu yerine kemik mobilizasyonunu sağlamaktadır. 1,25(OH)₂D ve PTH hormonun ortak etkileşimi ile kemiklerden kalsiyum salınımı artar [66].

Normal D vitamini düzeyi iyi bir kas fonksiyonu için gereklidir. Kas dokusunda da VDR bulunmaktadır. Eğer D vitamini eksikliği var ise kronik yorgunluk ve kas güçsüzlüğü görülmektedir.

Sinir sistemi üzerine etkisi

D vitamini, sinir sisteminde nörotransmitter gibi hareket etmektedir. D vitamini eksikliği görülen çocukların, ileriki yaşlarında şizofreni görülme riskinin arttığı belirtilmiştir. D vitamini eksikliğin uzun dönemde kalıcı öğrenme ve hafıza kaybına neden olduğu bildirilmektedir. D vitamininin beyin hücrelerini koruyucu etkisi gözlemlenmiştir. Yine yaşlılarda, Alzheimer ve çocuklarda otizmin, D vitamini eksikliği ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir [66].

Dolaşım sistemi üzerine etkisi

D vitamininin iskelet ve nörolojik sistemlerin yanı sıra kardiyovasküler sistem üzerinde de etkili olduğu belirtilmiştir. Yapılan bir araştırmaya göre, hipertansiyon hastalarının 3 ay süre ile haftada 3 kez güneş ışığına maruz kalması ile D vitamini miktarı %80 oranında artmış ve kan basınçları düzelmiştir [66].

D vitamininin kalp ve damar hastalıklarına karşı koruyucu etkisi vardır. Yapılan araştırmalarda Kuzey ülkelerinde kalp hastalıklarının oranının yüksek olduğu, kalp krizinin özellikle kış aylarında % 53 oranında arttığı belirtilmiştir. D vitamini miyokard dokusunun kasılma yeteneğini arttırmaktadır. D vitamini düzeyi yüksek olan kardiyovasküler hastaların mortalite oranlarının, D vitamini düzeyi düşük olan kardiyovasküler hastaların mortalite oranlarından daha düşük olduğu

gözlenmiştir. Bu etki özellikle D vitamini düzeyi 20-25 ng/mL altında olan kardiyovasküler hastalarda belirgindir [66].

3.577 kişi üzerinde yapılan bir araştırmada; yüksek tansiyon, yüksek kan şekeri, metabolik sendromla birlikte, D vitamini eksikliği bulunan kişiler seçilmiş, yaş, cinsiyet, ırk, yaşanan yer ve fiziksel aktivite gibi etkiler göz ardı edilerek yapılan karşılaştırmalarda, ortalama D vitamini düzeyi 15 ng/mL olanlarda, 26 ng/mL olanlara oranla yüksek tansiyon, yüksek kan şekeri ve metabolik sendromun 2 – 4 kat daha fazla olduğu gözlenmiştir [66].

Transplantasyon ile ilişkisi

Yapılan çalışmalara göre kalp, böbrek, karaciğer, pankreas, bağırsak, akciğer doku transplantasyonu sonrasında yeni dokunun uyum sağlamasının, D vitamini miktarını % 10 - 13 arttırdığı gözlemlenmiştir [66].

2.6. D Vitamini ve Metabolitlerinin Ölçümü

2.6.1. 25(OH)D Ölçümü

25(OH)D ölçümünde ilk kullanılan ölçüm 1971’de bildirilen vitamin D bağlayıcı protein (DBP)’in bağlayıcı olarak kullanıldığı kompetitif protein bağlama yöntemidir [70]. Yöntemin avantajı DBP’nin 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃ ’ü eşit olarak tanınmasıdır. Yöntemin kısıtlılığı ise ölçümün 24, 25(OH)₂D; 25, 26(OH)₂D; 23-lactone gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamı ve 10 gün gibi uzun inkübasyon süresinin olmasıdır. Ancak sonradan silisik asit kromatografisinin kullanıldığı yarışmalı protein bağlama yöntemi geliştirilerek inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür [70-72].

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi 1977’de geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV absorpsiyonu ile ölçüm yapılmaktadır. İnterferans veren lipidlerin ve vitamin D metabolitlerinin uzaklaştırılması, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃’ün ölçülebilmesi yöntemin en önemli avantajlarıdır. Ancak bu yöntem iyi bir donanım ve deneyim gerektirmektedir [70, 72].

RIA yöntemi 1985’de geliştirilmiştir. Bu yöntem için örnek saflaştırması gerekli değildir. Bu yöntemin uygulaması kolay ve sonuçları HPLC ile uyumludur. Yarışmalı protein bağlama ölçümdeki gibi 25(OH)D₂ ile 25(OH)D₃ ’ü eşit oranda tanımakta ve diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır. Bu nedenle 25(OH)D ölçümleri %10-20 fazla bulunmaktadır [70, 72, 73].

ELISA yöntemi, RIA ve kompetitif protein bağlama ölçümündeki gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır (24, 25(OH)₂D; 25, 26(OH)₂D; 23-lactone). Kemiluminesans yöntem ise 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃ için eşit oranda spesifiktir, ancak bu yöntemin maliyeti daha yüksektir [70].

Sıvı Kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/ MS) 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃’ü nicel olarak ölçen ve altın standart olarak tanımlanan bir yöntemdir. 25(OH)D ölçümü için immunolojik tekniklerin kullanıldığı laboratuvar yöntemleri ise son zamanlarda tekrar gözden geçirilmektedir.

Bazı yayınlarda 25(OH)D ölçümünde uluslararası bir standardizasyon gerekliliğini savunmakta ve bunun için RIA yöntemi önerilmektedir [74]. Oysa LC/MS/MS yöntemi radyoaktif materyallerin kullanılmadığı bir yöntemdir ve son derece güvenilir sonuçlar vermektedir [75]. LC-MS/MS ile ilgili son değerlendirmeler bu yöntemi immunassay yöntemine alternatif bir teknik olarak önermektedir ve bu yöntemin duyarlılık ve özgüllüğünün bir çok analit için yüksek olduğunu belirtmektedir. Bu nedenle 25(OH)D₃ ölçümünde referans yöntem olarak gösterilmektedir [76].

Günümüzde 25(OH)D ölçümü için sıklıkla kullanılan otomatik immun analizlerin çoğu sınırlı hassasiyete ve ölçüm aralığına sahiptir, standardizasyon yeterli değildir ve dolaşımda bulunan D vitamini metabolitleri ile çapraz reaktivite gösterir (ör. 24R, 25(OH)₂D₃). Otomatize immun analizlerde, organik çözücüsüz ekstraksiyon ve 25(OH)D'nin antikor yapısını bozmadan bağlayıcı proteinden ayrımı hassas bir dengeyle sağlanmaktadır. Bu yöntemler serum örneklerindeki matriks etkisine oldukça duyarlıdır [77, 78]. Kromatografik yöntemler ise immun analizlere göre matriks etkilerine daha az duyarlıdır ve 25(OH)D₃, 25(OH)D₂ ve 3-epi-25(OH)D₃'ü ayrı ayrı ölçebilme avantajlarına sahiptir.

LC-MS/MS, 25(OH)D ölçümü için doğru ve hassas bir referans yöntem olma potansiyeline sahiptir, ancak yöntemlerin dikkatle geliştirilmesi, kalibre edilmesi ve validasyonlarının yapılması gereklidir. Yöntem geliştirme; örnek hazırlığı, kromatografik ayırma, iyonizasyon ve kütle spektrometrik deteksiyon için gereken tüm basamakların optimizasyonunu kapsar. Çoğu LC-MS/MS uygulamasında, 25(OH)D₃ ve D₂ yi ayıramayan yada kısmen ayırabilen hareketsiz faz-C18 kolonu kullanılmaktadır. Özellikle izomerik ve izobarik bileşikler ölçülürken, çoklu reaksiyon izleme (MRM) özelliği yeterince spesifik olmayabilir. Daha kapsamlı kromatografik ayırma için özel kolonlar gereklidir.

LC-MS/MS analizinde elektrosprey iyonizasyon (ESI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) modları en yaygın kullanılan tekniklerdir. Bunların dışında atmosferik basınçlı foto iyonizasyon (APPI) tekniği de kullanılmaktadır. ESI ile yapılan 25(OH)D ölçümlerinin APCI ile yapılanlara göre daha fazla varyasyon gösterdiğini bildirmişlerdir [79]. Çoğu laboratuvar 25(OH)D kantitasyonu için tek geçişli kütle spektrometresini kullanmakta ve daha hassas ölçüm sağlayan ürün iyon (product ion) oranlarını kullanmamaktadır [80].

LC-MS/MS yönteminin önemli bir avantajı da ekstraksiyon kayıplarının ve iyon baskılanmasının etkilerini gidermek için gerekli olan internal standardın kullanımıdır. Internal standart için izotop işaretli ve ölçülecek analite kimyasal olarak benzeyen bileşikler seçilir.

Döteryumlu standartlar, ¹³C işaretli internal standartlara göre daha düşük maliyetlidir ve daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğu laboratuvar 6-döteryumlu 25(OH)D₃ kullanmaktadır. Internal standart olarak 6-döteryumlu 25(OH)D₂ kullanıldığında 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃ için kromatografik ayırma gereklidir. Bunun nedeni, internal standardın sinyalinin analitlerle oluşturduğu sinyal ile üst üste gelmesidir. 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂'nin kromatografik ayırımının yapılmadığı

yöntemlerde 25(OH)D₂ kantitasyonu için 3-döteryumlu 25(OH)D₂ internal standart olarak tercih edilir [80].

25(OH)D ölçümünde başka bir önemli konu da kalibrasyondur. Kalibratör matriksi olarak analit içermeyen serum örneklerinin kullanımı idealdir. Ancak bunu elde etmek zordur. Kalibratör olarak, kömür ile muamele edilen insan serumu, sığır serumu albumini, etanolik kalibratörler ya da ticari olarak bulunan insan serumu bazlı kalibratörler kullanılmaktadır [81].

25(OH)D'nin LCMS/MS ile analizi için bazı türevlendirme teknikleri geliştirilmiştir. Türevlendirme, D vitamini metabolitlerinin zayıf iyonizasyon verimliliğini artırır, daha yüksek duyarlılık ve daha spesifik bir deteksiyon sağlar. Dezavantajı ise numune hazırlama aşamasının daha zahmetli olmasıdır [82].

2.6.2. 1,25(OH)₂D Ölçümü

Tüm steroid hormonlar gibi 1,25(OH)₂D'nin de kantitatif analizi oldukça zordur. Dolaşımda çok düşük konsantrasyonlarda bulunur (20.16-70.56 pg/mL), oldukça lipofilik ve nispeten kararsızdır [83].

Günümüzde 1,25(OH)₂D analizlerinde RIA, ELISA, HPLC-UV ve LC-MS/MS kullanılmaktadır. Ancak geleneksel yöntemler yeterince duyarlı değildir. RIA yöntemi 26, 23-lactone; 1,24,25(OH)₃D₃; 1,25,26(OH)₃D₃ gibi vitamin D metabolitleri ile interferans vermektedir [76, 84-86]. Radyoreseptör analizleri ya da RIA 1,25-Dihidroksi vitamin D'nin iki izoformunu ayıramaz. Benzer şekilde HPLC-UV de 1,25-Dihidroksi vitamin D₂ ve D₃'ün düşük seviyeleri için duyarlılıktan yoksundur.

1,25(OH)₂D'nin LC-MS/MS ile kantitasyonu, serumdaki düşük konsantrasyonları ve interferans veren maddelerin varlığı nedeniyle genellikle zordur. İyonize olabilen polar grupların eksikliği nedeniyle ESI ve APCI'da iyonlaşma verimi düşüktür. İyonlaşma verimliliğini artırmak için bazı araştırmacılar, amonyum yada lityum katılma ürünü kullanmışlardır [15, 87, 88]. 1,25(OH)₂D'nin LCMS/MS ile ilk ölçümü sıçan (rat) ve domuz serumunda, Kissmeyer ve ark. tarafından rapor edilmiştir. Bu çalışmada 48 pmol/L'den daha düşük bir kantitasyon alt sınırı (LLOQ) elde etmek için amonyum kullanılmıştır. Ancak bu çalışmada insan serumu ile ilgili veriler bulunmamaktadır [87].

2010 yılında, Casetta ve ark. stabil lityum katılım ürünleri ile insan serumunda 1,25(OH)₂D'nin kantitasyonu için bir metod geliştirmişlerdir. Bu çalışmada bir perfüzyon kolonu ile online ekstraksiyon yapılmış ve sonrasında iki ayrı kolon kullanılarak 1,25(OH)₂D₃ izobarik interferanslarından uzaklaştırılarak ölçülebilmıştır. Bu çalışmada fizyolojik konsantrasyon düzeylerinde, %5-15'lik varyasyon katsayıları (CV) ile 36 pmol/L 'lik LLOQ elde edilmiştir [88].

Günümüzde LC-MS/MS, duyarlılığı ve tekrar edilebilirliği nedeniyle 1,25-dihidroksi vitamin D analizi için tercih edilen bir yöntem haline gelmiştir. Ancak iyonize olabilen polar grupların eksikliği dolayısıyla iyonizasyon verimliliğinin zayıf olması LC-MS/MS'in kullanımında bir sorun olmaya devam etmektedir.

İyonizasyon verimliliğini geliştirmek için başka bir yol da Diels-Alder türevlendirmesidir. Bu türevlendirme ile daha düşük LLOQ değerlerine ulaşılmıştır [83, 89-92]. 2011 yılında Dey ve Ark.'nın kuarternar aminli bir Cookson reaktifi kullanarak 1,25(OH)₂D ölçümünde 10 pmol/L kantitasyon alt sınırı (LLOQ)'na ulaştıkları bildirilmiştir [80].

D vitamini ölçümlerinde kullanılan çeşitli türevlendirme ajanları olmasına rağmen sadece 4-fenil-1,2,4-triazol-3-5-dion (PTAD) reaktifi; 1,25(OH)₂D₂ ve D₃ analizi için kanıtlanmış ve ticari olarak piyasaya sürülmüştür. PTAD türevlendirmesine ek olarak çoklu katı faz ekstraksiyon teknikleri büyük ölçüde duyarlılığın artmasına, kantitasyon ve deteksiyon limitlerinin alt sınırının düşürülmesine ve örnek miktarının azalmasına katkı sağlamaktadır.

2014 yılında yayınlanan bir çalışmada 1,25(OH)₂D₂ ve D₃'ün analizlerinde kullanılmak üzere yeni bir türevlendirme ajanı denenmiştir: Amplifex diene (AB SCIEX). Diğer reaktiflerin aksine Amplifex, pozitif yüklü uç kısmı ve aktive edilmiş dienofil kısmı nedeniyle MS/MS analizi için optimize edilmiştir. Bu reaktifin gelişmiş iyonizasyon kabiliyeti nedeniyle duyarlılığın ve seçiciliğin artmasını sağladığı düşünülmektedir [93].

Son yıllarda, ölçüm duyarlılığını artırmak için MS koşullarını optimize etme çabası, yerini örnek hazırlığında iyileştirmelere bırakmıştır. İmmunoaffinite saflaştırma yöntemi analit zenginleştirme için iyi bir yoldur. İmmunoaffinite ekstrasyonu izobarik interferansları ve hasta serumunda bulunan matriksin etkilerini ortadan kaldırır. Böylece immunoaffinite saflaştırma yöntemi kullanılarak LLOQ değerleri 1,25(OH)₂D₃ için 8.2 pmol/L, 1,25(OH)₂D₂ için 9.1 pmol/L bulunmuştur [15].

1,25(OH)₂D ölçümünde, RIA ile LC-MS/MS yöntemleri karşılaştırıldığında sistematik olarak LC-MS/MS ile daha düşük sonuçlar gözlenmektedir (%27.1). Bunun sebebinin de RIA yöntemindeki örnek hazırlığında, çapraz reaksiyon gösteren maddelerin uzaklaştırılamaması olduğu düşünülmektedir [15].

Bu yüzden, immunoaffinite saflaştırma, lityum katılma ürünü oluşturma veya türevlendirme teknikleri 1,25(OH)₂D' nin düşük konsantrasyonlarının LC-MS/MS ile ölçümünde önerilmektedir.

2.6.3. 3-Epi-25-Hidroksivitamin D₃ Ölçümü

Son zamanlarda 25(OH)D₃'ün 1,25(OH)₂D₃ ve 24,25(OH)₂D₃ gibi C-3 epimerizasyon yolu ile metabolize olduğu gösterilmiştir [94, 95]. Halen 3-epi-25(OH)D'nin biyolojik önemi aydınlatılamamıştır. C3- epimeri, özellikle 1 yaşından küçük bebeklerin %23'ünün serumlarında tespit edilerek dikkat çekmiştir [96].

LC-MS/MS yöntemi ile tespit edilen total 25(OH)D'nin %9-61'i oranında 3-epi-25(OH)D bulunmaktadır. 3-epi-25(OH)D metabolitinin kimyasal yapısı 3 numaralı karbona bağlı OH grubunun konumu dışında 25(OH)D ile aynıdır. Her iki formu da kütle spektrometresinde MRM modunda aynı kütle geçişlerine sahiptir. Bu

nedenle C3 epimerinin yeterli ayrılammaması 25(OH)D₃'ün daha yüksek ölçülmesine yol açar [80].

C3-epimerizasyon yolunun fizyolojik rolü henüz açıklanmamış olsada 3-epi(OH)D'nin rutin ölçümü gelecekte önemli hale gelebilir [98]. Günümüzde, 25(OH)D ölçümü için protein bağlama analizleri kullanılarak olası C3-epimeri katkısı ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

2.6.4. 24 R,25- Dihidroksivitamin D₃ Ölçümü

24R,25-dihidroksivitamin D₃, dolaşımındaki dihidroksivitamin D₃'ün önemli bir metabolitidir. Sitokrom p450 tarafından 24-hidroksilaz enzimi (CYP24A1) ile 25(OH)D₃'ün C24 hidroksilasyonu yoluyla oluşturulmaktadır. 24. karbondaki hidroksilasyon, 25(OH)D₃'ün deaktivasyondaki ilk basamağıdır. 25(OH)D₃'ün inaktif kataboliti olmasının yanı sıra 24R,25(OH)₂D₃'ün kendi biyolojik foksiyonuna sahip olup olmadığı konusunda kararsızlıklar mevcuttur. Farmakolojik olarak uygulandığında, hayvanlarda 24R,25(OH)₂D₃'ün kemik hacminde ve mekanik güçte artışa neden olduğu gösterilmiştir. Son zamanlarda 24R,25(OH)₂D₃'ün ölçümü önerilmekte, 25(OH)D₃ katabolizmasında yeni bir belirteç olarak ümit vaat ettiği ve vitamin D₃ takviyesiyle serum 25(OH)D₃ yanıtının belirleyicisi olabileceği düşünülmektedir [80].

24R,25(OH)₂D₃; 25(OH)₂D'den sonra dolaşımda en bol bulunan D vitamini metabolitidir. İnsan serumundaki konsantrasyonları 0,7-24 nmol/L arasındadır [80]. Serum 24R,25(OH)₂D düzeyleri serum 25(OH)₂D₃ seviyeleri ile koreledir. Bu analitin ESI ve APCI ile kantitasyonu, düşük serum düzeyleri ve iyonlaşma verimi nedeniyle zordur [89, 98].

2.6.4. Diğer Metabolitlerin Ölçümü

D vitamini metabolitlerinin LC-MS/MS ile ölçümünde izomerik ve izobarik bileşenlerden gelen interferansların farkında olunmalıdır. İzomerik bileşikler özdeş bir moleküler formüle ve nominal kütleyle sahiptir ancak farklı bir yapı gösterirler. Epimerler, aynı zamanda diastomerlerdir, sadece tek bir stereojenik merkezin konfigürasyonu farklıdır. İzobarik bileşikler aynı nominal kütleyle fakat farklı bir moleküler formüle sahiptirler. İzomer ve izobarların ayırt edilmesi MS'deki kromatografik davranışlarının ve parçalanmalarının farklılığıyla mümkün olabilir.

Kimyasal olarak sentezlenmiş analogları dışında D vitaminin 40-50 adet metaboliti tespit edilmiştir [99, 100]. 1,25(OH)₂D₃'ün LC-MS/MS analizinde doğal olarak dolaşımda bulunan dihidroksillenmiş D vitamini bileşiklerinin kromatografik olarak ayrılabilmesi gerekir, 23,25(OH)₂D; 25,26(OH)₂D; 24,25(OH)₂D, 4β,25(OH)₂D gibi metabolitler aynı moleküler ağırlığa ve m/z oranlarına sahiptirler.

1,25(OH)₂D için kullanılan bazı immünoanalizlerin 25(OH)D₃-26,23-laktonla çapraz reaksiyonu nedeniyle 1,25(OH)₂D konsantrasyonlarını olduğundan fazla ölçtüğü bilinmektedir. 25(OH)D₃-26,23-laktonun moleküler ağırlığı 1,25(OH)₂D₃'den farklıdır. Bu nedenle 1,25(OH)₂D₃'ün LC-MS/MS ile analizinde interferansa sebep olmaz.

2.7. D Vitamini Analizinin Standardizasyonu

Klinik kimyada amaç, gelişmiş yöntemlerle ölçülen hedef analit konsantrasyonlarına yakın değerleri rutin tanı testleri ile elde etmektir. Steroid hormonları için GC-MS tabanlı referans yöntemlerin kullanıma geçmesi 1980'li yıllarda gerçekleşmiştir. Klasik steroid hormonların aksine serum 25(OH)D analizi için GS-MS tabanlı güvenilir ve pratik yöntemler mevcut değildir. LC-MS/MS teknolojisinin kullanılmaya başlamasıyla izotop dilüsyonlu kütle spektrometrik yöntemler geliştirilmiştir. Kütle spektrometrik yöntemler kararlı izotop işaretli internal standart kullanımına olanak sağlamaktadır. Bu izotop dilüsyon teknolojisi, bir hedef analit ve onun kararlı izotop işaretli muadilinin benzer fiziksel ve kimyasal davranışlar göstermesi nedeniyle yüksek analitik güvenilirlik sağlayabilir.

25(OH)D'nin yarışmalı ligand bağlama yöntemi ile yapılan analizlerinde analit, protein bağlarından tamamen ayrılmaktadır. Bu da, manuel RIA yöntemlerini kullanırken asetonitril gibi çözücüler ile elde edilebilir. 2003'den bu yana geliştirilen otomatize test sistemlerinde ise protein bağlarının ayrımı çok zordur.

25(OH)D'nin rutin testlerinde analiz standardizasyonu ile ilgili önemli sorunlar ortaya çıkmıştır [72]. Bu nedenle D vitamini testlerinin kalitesini artırmak için 2010 yılında ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından bir program başlatılmıştır. D Vitamini Standardizasyon Programının (VDSP) amacı Amerikan Hastalık ve Önleme Merkezinin çalışmalarını koordine etmek ve dünya çapında sağlık araştırmalarında D vitamini düzeylerinin laboratuvar değerlendirmesini standardize etmektir [101].

LC-MS/MS ile serum 25(OH)D kantitasyonu için birçok klinik laboratuvar kendi geliştirdiği (in-house) yöntemleri kullanmaktadır ancak son zamanlarda farklı LC-MS/MS kitleri ticari olarak piyasaya sürülmüştür. Bu kitler, kalibrasyon ve kalite kontrol için liyofilize materyalleri, kararlı izotop işaretli internal standart bileşikler, örnek hazırlama materyallerini, mobil fazları ve analitik kolonları içermektedir. Bu kitler hem 25(OH)D₃ hem de 25(OH)D₂ analizi yapabilmektedir.

Piyasada LC-MS/MS ile 1,25(OH)₂D kantitasyonu için ticari olarak temin edilebilir tek bir kit mevcuttur. Bu test, immün affinite mikro kolonları kullanarak örnek ekstraksiyonuna dayanır. Bu kit çok düşük konsantrasyon aralıklarını ölçebilme potansiyeline sahiptir ancak kullanımı yüksek duyarlılıktaki LC-MS/MS cihazları ile sınırlıdır.

BİREYLER VE YÖNTEM

3.1. Hasta Seçimi ve İzlemi

Bu çalışmaya, Mart 2013-Mart 2015 tarihleri arasında Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi'nde, canlı vericiden böbrek transplantasyonu yapılmış olan, yerel etik kurul (Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu, Karar Numarası: 225) ve hasta onayı alınan 18 yaş üstü 35 (12 kadın-23 erkek) hasta alındı. Hastalarla ilgili yaş, cinsiyet, primer hastalığı ve diyaliz süresi gibi demografik bilgiler toplanarak kaydedildi. Bu hastaların yaş ortalaması (ortalama±SD) 40.30±12.85 yıl olarak bulundu. Vücut Kitle İndeksi (VKİ) = Ağırlık (kg)/ boy² (m²) formülü kullanılarak hesaplandı. Hastaların transplantasyon öncesi (NÖ) dönemde ve transplantasyon sonrası 6.ayda (NS 6.ay) alınan örneklerinde ölçümler yapılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırıldı.

Hastalara immunsupresif tedavi protokolü olarak kalsinörin inhibitörü (Tacrolimus), Mikofenolat Mofetil, Basiliksimab/Everolimus/Sirolimus uygulanmıştır.

3.1.1. Çalışmaya Alınmama Kriterleri

1. Kadavra donörden nakil
2. Daha önce böbrek nakli öyküsünün olması
3. Başka organ yetmezliğinin olması
4. Remisyonda malignitesi olması
5. Ayrıca NS böbrek dışı organ nakil gerekliliği tespit edilen, immunsupresif tedavi protokolü değiştirilen, greft kaybı ve/veya nefrektomi olan hastalar çalışma dışı bırakıldı.

Operasyondan sonra greft reddi gelişen 2 hasta, ex olan 1 hasta ve nakil sonrası kontrollerine gelmeyen 2 hasta bu kriterler nedeniyle çalışmadan çıkarılmıştır.

3.2. Laboratuvar Çalışmaları

3.2.1. Kullanılan Cihaz, Kit ve Sarf Malzemeleri

1. Roche-COBAS-8000 otoanalizörü
2. Santrifüj (Hettich Rotina 35)
3. Vorteks (Rx3 Velp-Scientifica)
4. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5403)
5. LC-MS/MS cihazı (Shimadzu 8040)
6. Disposibl enjektör 10 ml'lik

7. Mavi pipet ucu
8. Sarı pipet ucu
9. Mikro pipet ucu
10. Otomatik pipet (10 µL, 200 µL, 1000 µL)
11. 10 ml'lik disposibl plastik tüp (santrifüj edilebilir)
12. Sarı veya kırmızı kapaklı jelli tüp
13. Ependorf (1.5 mL, 2 mL)
14. 12 x 75 polisteren tüp
15. Labor-İldam Sanyo (-80°) derin dondurucu
16. Balon Joje
17. Heidolph-Rotamax 120 (Rotator shaker) karıştırıcı
18. Kreatinin kolorimetrik kit
19. Kalsiyum kolorimetrik kit
20. Fosfor kolorimetrik kit
21. BUN kolorimetrik kit
22. Albumin kolorimetrik kit
23. Glukoz enzimatik kit
24. Alkalen fosfataz (ALP) kolorimetrik kit
25. PTH immunassay kiti
26. 25(OH)D immunassay kiti
27. 1,25(OH)₂D₃ LC-MS/MS kiti
28. 1,25(OH)₂D₃ ekstraksiyon kiti
29. 1,25(OH)₂D₃ optimizasyon kiti
30. Roche-Cobas 602 immunassay analizörü
31. Raptor™ ARC-18 (100x2.1 mm; 2.7 µm particle size) kolon
32. LC-MS/MS vial, mikro vial

3.2.2. Hasta Örnekleri

Çalışma kapsamına alınan kişilerden, 10-12 saatlik açlık sonrasında venöz kan örnekleri jelli biyokimya tüpüne ve EDTA-K3 içeren mor kapaklı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri santrifüj edilip, elde edilen serum ve plazmalar, alikuatlandıktan sonra analiz zamanına kadar -80°C'de saklandı. Analiz zamanında örnekler çözdürülerek ilgili parametreler çalışıldı. Çalışmada NÖ ve NS 6. ayda 30 hastaya ait (n=30) serum örneklerinde kreatinin, BUN, kalsiyum, fosfor, alkalen fosfataz, glukoz, albumin, PTH, 25(OH)D ve plazma örneklerinde 1,25(OH)₂D₃ ölçümleri yapıldı.

Hastaların serum kreatinin değerleri kullanılarak aşağıda verilen Chronic Kidney Disease Epidemiology Collaboration (CKD-EPI) formülü ile glomerüler filtrasyon hızı (GFR) hesaplandı.

$$\text{GFR}_{\text{CKD-EPI}} (\text{mL/dk/1.73 m}^2) = [141 \times \min(\text{Serum Kreatinin}/\kappa, 1)^a \times \max(\text{Serum Kreatinin} / \kappa, 1)^{-1.209} \times 0.993^{\text{yaş}}] \times 1.018 [\text{kadın ise}] \times 1.159 [\text{siyah ırk}], (\text{K: kadın için } 0.7, \text{ erkek için } 0.9; a: \text{kadın için } -0.329, \text{ erkek için } -0.411) [19].$$

3.3. Ayrıntılı Yöntemler

3.3.1. Serum Kreatinin Analizi

Serum kreatinin düzeyleri, Roche-CREJ2 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler mg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 0.50-1.20 mg/dL, Ölçüm aralığı: 0.17-24.9 mg/dL, LOD: 0.17 mg/dL'dir.

Test prensibi

Kreatinin; alkali solüsyonda pikrat ile sarı-turuncu renkte bir kompleks oluşturur. Boya oluşumunun oranı örnek içindeki kreatinin konsantrasyonu ile orantılıdır. Testte, bilirubin interferansının en aza indirgenmesi için "rate-blanking" kullanılır. Proteinler ve ketonlar dahil olmak üzere serum/plazma psödo-kreatinin kromojenlerin neden olduğu spesifik olmayan reaksiyonu düzeltmek için, serum veya plazma sonuçları -0.3 mg/dL ile düzeltilir.

3.3.2. Serum BUN Analizi

Serum BUN düzeyleri, Roche-UREAL ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler mg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: <50 mg/dL, Ölçüm aralığı: 3.0-240 mg/dL, LOD: 3.0 mg/dL'dir.

Test prensibi

Üreaz ve glutamat dehidrogenazın kinetik testine dayanır. Üre, amonyum ve karbonat oluşturmak üzere üreaz ile hidrolize edilir. İkinci reaksiyonda 2-oxoglutarat, L-glutamat üretmek için glutamat dehidrojenaz ve koenzim NADH mevcudiyetinde amonyum ile reaksiyona girer. Bu reaksiyonda hidrolize olan her mol üre için 2 mol NADH, NAD⁺'ya oksitlenir. NADH konsantrasyonundaki azalma hızı, numunedeki üre konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.3.3. Serum Kalsiyum Analizi

Serum kalsiyum düzeyleri, Roche-CA2 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler mg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 8.6-10.2 mg/dL, Ölçüm aralığı: 0.8-20.1 mg/dL, LOD: 0.8 mg/dL'dir.

Test prensibi

Kalsiyum iyonları, alkalın koşullar altında 5-nitro-5'-metil-BAPTA (NM-BAPTA) ile reaksiyona girerek bir kompleks oluşturur. Bu kompleks, ikinci adımda EDTA ile reaksiyona girer. Absorbansdaki değişim, kalsiyum konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.3.4. Serum Fosfor Analizi

Serum fosfor düzeyleri, Roche-PHOS2 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler mg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 2.5-4.5 mg/dL, Ölçüm aralığı: 0.31-20.0 mg/dL, LOD: 0.31 mg/dL'dir.

Test prensibi

İnorganik fosfat, sülfirik asit varlığında amonyum molibdat ile $(\text{NH}_4)_3[\text{PO}_4(\text{MoO}_3)_2]$ formülüne sahip bir amonyum fosfomolibdat kompleksi oluşturur. Oluşan fosfomolibdatın konsantrasyonu, inorganik fosfat konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.3.5. Serum Albümin Analizi

Serum albümin düzeyleri, Roche-ALB2 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler g/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 3.5-5.2 g/dL, Ölçüm aralığı: 0.2-6 g/dL, LOD: 0.2 g/dLdir.

Test prensibi

4.1 pH değerinde albümin, mavi-yeşil bir kompleks oluşturmak üzere anyonik bir boya olan bromokrezol yeşiliyle (BCG) bağlanmak için yeterli bir katyonik karakter sergiler. Oluşan mavi-yeşil rengin renk yoğunluğu numunede albümin konsantrasyonu ile doğru orantılıdır ve fotometrik olarak ölçülür.

3.3.6. Serum Glukoz Analizi

Serum glukoz düzeyleri, Roche-GLUC3 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe enzimatik yöntemle ölçülmüştür. Birimler mg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 74-106 mg/dL, Ölçüm aralığı: 2-750 mg/dL, LOD: 2 mg/dLdir.

Test prensibi

Bu analiz için heksokinaz ile birlikte enzimatik referans yöntemi kullanılır. 4,5 Heksokinaz (HK) glikozun fosforilasyonunu ATP ile katalize eder ve glukoz-6-fosfat ile ADP oluşur. Reaksiyonun ardından ikinci bir enzim glukoz-6-fosfat dehidrojenaz (G6PDH), glikoz-6-fosfatın yükseltgenmesinin NADP^+ ile katalize edilmesinde kullanılır ve NADPH oluşur. Oluşan NADPH'nin konsantrasyonu glukoz konsantrasyonu ile doğru orantılıdır. Absorbanstaki artış 340 nm'de ölçülerek tayin edilir.

3.3.7. Serum ALP Analizi

Serum ALP düzeyleri, Roche-ALP2 ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS 8000 otoanalizöründe kolorimetrik yöntemle ölçülmüştür. Birimler U/L olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: Erkekler 40-130 U/L; Kadınlar 35-105 U/L, Ölçüm aralığı: 5-1200 U/L, LOD: 5 U/L'dir.

Test prensibi

Magnezyum ve çinko iyonları varlığında p-nitrofenil fosfat, fosfatazlar tarafından fosfat ve p-nitrofenole bölünür. Serbest kalan p-nitrofenol, katalitik ALP aktivitesiyle doğru orantılıdır. Absorbanstaki artış ölçülerek tayin edilir.

3.3.8. Serum PTH Analizi

Serum PTH düzeyleri, Roche-PTH ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS E-602 otoanalizöründe Elektrokemiluminesans immünassay (ECLIA) yöntemle

ölçülmüştür. Birimler pg/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: 15-65 pg/mL, Ölçüm aralığı: 1.20-5000 pg/mL, Alt Ölçüm Sınırı: 1.20 pg/mL'dir.

Test prensibi

Sandviç prensibi ile ölçüm yapılır. Toplam test süresi: 18 dakikadır.

1. İnkübasyon: 50 µL numune, biotinlenmiş monoklonal PTH'ye özgü antikor ve rutenyum kompleksi ile işaretlenmiş monoklonal PTH'ye özgü antikor, bir sandviç kompleksi oluşturur.

2. İnkübasyon: Streptavidin-kaplı mikropartiküller eklendikten sonra biyotin ile streptavidinin etkileşimi aracılığıyla kompleks katı faza bağlanmış hale gelir.

Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Bundan sonra bağlanmamış maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir fotoçoğaltıcı ile ölçülür.

Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edilir.

3.3.9. Serum 25(OH)D (Total Vitamin D) Analizi

Serum 25(OH)D düzeyleri, Roche-Vitamin D Total ticari kiti kullanılarak Roche-COBAS E-602 otoanalizöründe Elektrokemiluminesans immünassay (ECLIA) yöntemiyle ölçülmüştür. Birimler ng/dL olarak ifade edilmiştir. Referans aralığı: ≥ 30 ng/mL, Ölçüm aralığı: 3.00-70.0 ng/mL, Alt Ölçüm Sınırı: 3.00 ng/mL'dir.

Test prensibi

Bu analiz yarışmalı kemiluminesans immünassay yöntemiyle yapılmaktadır. Toplam analiz süresi 27 dakikadır.

1. İnkübasyon: D vitamini bağlayıcı proteine bağlanmış halde bulunan örnekteki D vitamini ön işlem reaktifi 1 ve 2 ile enkübe edilerek bağlayıcı proteinden ayrılır.

2. İnkübasyon: Örnekteki D vitamini ve reaktiflerdeki rutenyumlanmış D vitamini bağlayıcı protein arasında bir kompleks oluşturulur.

3. İnkübasyon: Streptavidin kaplı mikropartiküller ve biotinle işaretlenmiş D vitamini eklenir. Rutenyumlanmış D vitamini bağlayıcı protein ve biotinlenmiş D vitamininden oluşan bir kompleks oluşur ve biotin ve streptavidinin etkileşimi aracılığıyla katı faza bağlanmış hale gelir.

Reaksiyon karışımı, mikropartiküllerin elektrodun yüzeyine manyetik olarak yakalandıkları ölçüm hücresi içine aspire edilir. Bundan sonra bağlanmamış

maddeler ProCell/ProCell M ile uzaklaştırılır. Elektrot üzerine voltaj uygulanması kemilüminesans emisyonunu indükler, bu da bir fotoçoğaltıcı ile ölçülür.

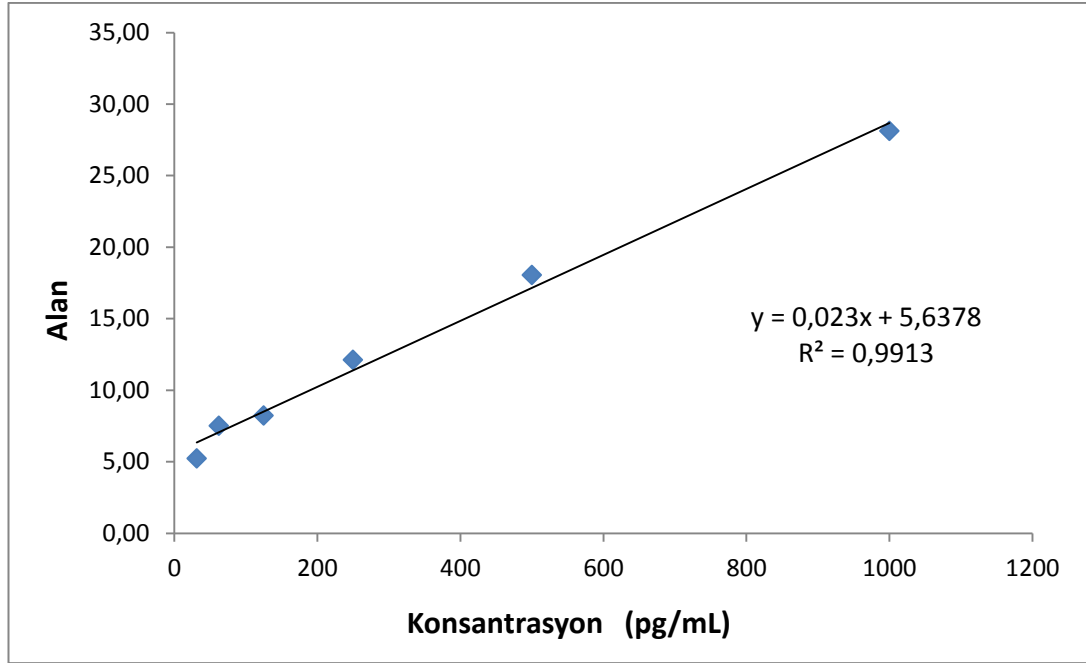
Sonuçlar, 2 noktalı kalibrasyon ile cihaza özel olarak oluşturulmuş bir kalibrasyon eğrisi ve reaktif barkodu aracılığıyla edinilen bir ana eğri (master) ile tayin edilir.

3.3.10. Plazma 1,25(OH)₂D₃ Analizi

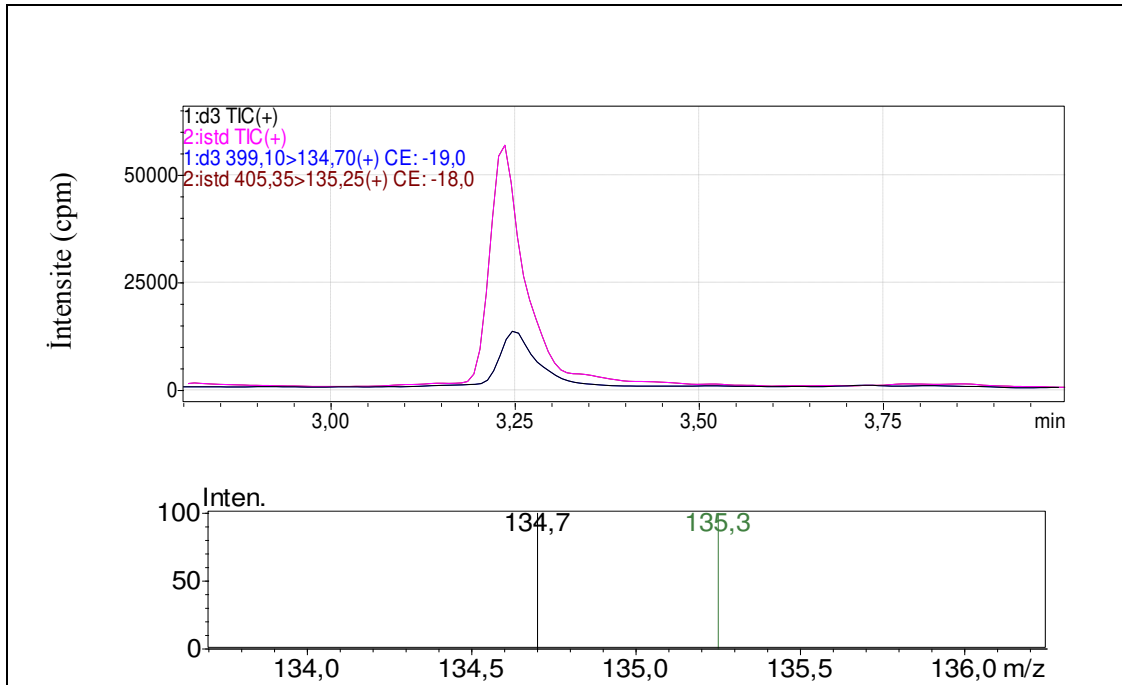
1,25(OH)₂ Vitamin D₃'ün analizi için ticari kit (1,25(OH)₂D₃/D₂ ImmuTube LC/MS/MS Kit, Immundiagnostik AG, Katalog no: KM1000, Bensheim, Germany) kullanılmıştır. Bu yöntem 1,25(OH)₂D₃'ün serum veya plazmada ekstraksiyonundan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. 1,25(OH)₂D₃ analizi elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynaklı ultra hızlı sıvı kromatografisi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan) ile kombine LCMS-8040 triple kuadropol tandem kütle spektrometresinde (Shimadzu Corporation, Japan) optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Cihaz, ESI (+) pozitif modda kullanılmıştır.

Optimizasyon Çalışmaları

Analizler öncesinde cihazın optimizasyonu için Immundiagnostik AG marka 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ LC-MS/MS Tuning Kit kullanılmıştır. Kite bulunan, yüksek saflıkta 1 µg/mL konsantrasyonda izotop işaretli 1,25(OH)₂ Vitamin D₃-d₆ içeren optimizasyon çözeltileri ile 0, 31.25, 62.5, 125, 250, 500, 1000 pg/mL konsantrasyonlarında dilüsyon serileri hazırlanmıştır. Mobil faz A'nın akış hızı 0.2 mL/dk., şırınga pompasının 1,25(OH)₂D₃ içeren solüsyonla akış hızı 20 µL/dk. olarak ayarlanmıştır. ESI pozitif modda MRM geçişleri gözlenmiştir. Prekürsör ve yavru iyonların m/z değerleri 1,25(OH)₂D₃ için sırasıyla 399.11, 134.58 Da; d₆ işaretli internal standart için sırasıyla 405.21, 134.68 Da olarak belirlenmiştir. 50 µL enjeksiyon yapılarak, bilinen konsantrasyonlara karşılık elde edilen alanlar için lineer regresyon eğrisi çizilmiştir (Şekil 3.1). 1 µg/mL konsantrasyondaki optimizasyon çözeltilisinin kromatogramı Şekil 3.2'de verilmiştir. Analiz süresi toplam 6 dakikadır.



Şekil 3.1. 1,25(OH)₂D₃ için lineer regresyon eğrisi



Şekil 3.2. 1 µg/mL 1,25(OH)₂D₃ içeren optimizasyon çözeltisinin kromatogramı

Örneklerin Ekstraksiyonu ve LC-MS/MS ile Analizi

Örnekler cihaza verilmeden önce ekstraksiyon aşamalarından geçirilmiştir. Ekstraksiyon için kullanılan özel aparatlar (ImmuTube) Şekil 3.3'de gösterilmiştir.

a) Örneklerin Ekstraksiyonu

1. Analiz öncesinde tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirilmiştir.
2. Plazma örnekleri, kalibratörler ve kontroller 10,000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir.
3. ImmuTube'ler 2 mL'lik eppendorflara konularak dikkatlice vortekslenmiştir.
4. ImmuTube'lerin kapakları açılarak her birine kalibratör, kontrol ya da örnekler hızlı bir şekilde eklenmiştir. Her bir ImmuTube içine 10 µL internal standart eklenerek kapakları kapatılmıştır.
5. ImmuTube'ler 1 saat süresince çalkalayıcıda (shaker) döndürülmüştür.
6. Daha sonra ImmuTube'ler 2 mL'lik eppendorflara konularak 1 dk süresince 550 g'de santrifüj edilmiştir.
7. ImmuTube'lerin alt uçları kırılıp kapakları açılmıştır. Tekrar 2 mL'lik eppendorflara konularak 2 dk süresince 550 g'de santrifüj edilmiştir. ImmuTube'lerden süzülen kısım atılmıştır.
8. 500 µL WASHSOL (yıkama solüsyonu) eklenmiş ve yine 2 mL'lik eppendorflara konularak 2 dk süresince 550 g'de santrifüj edilmiştir. ImmuTube'lerden süzülen kısım atılmış ve bu basamak 2 kez tekrarlanmıştır.
9. ImmuTube'ler temiz cam tüplere konulmuştur.
10. ImmuTube'lere 250 µL ELUREAG (elüsyon çözeltisi) eklenmiştir. 2 dk 550 g'de santrifüj edilmiş, cam tüplerdeki 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ elüatları toplanmıştır.
11. Cam tüplerdeki elüatlar 37°C'de azot gazı ile uçurulmuştur.
12. Her bir tüpe 100 µL aktif Solüsyon A konularak vortekslelendikten sonra örnekler viallere aktararak 50 µL'lik enjeksiyonla LC-MS/MS'e verilmiştir.

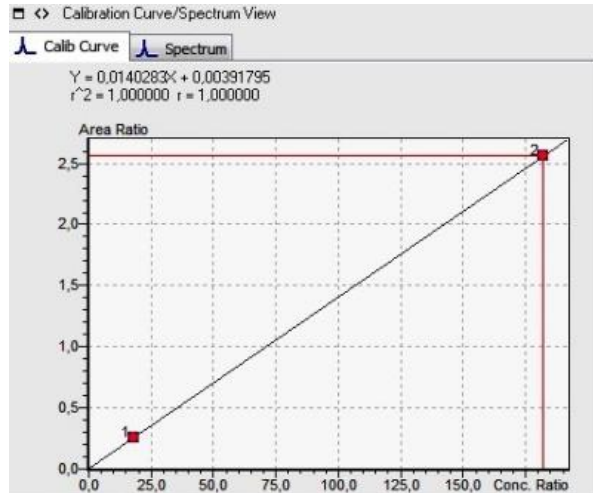


Şekil 3.3. ImmuTube

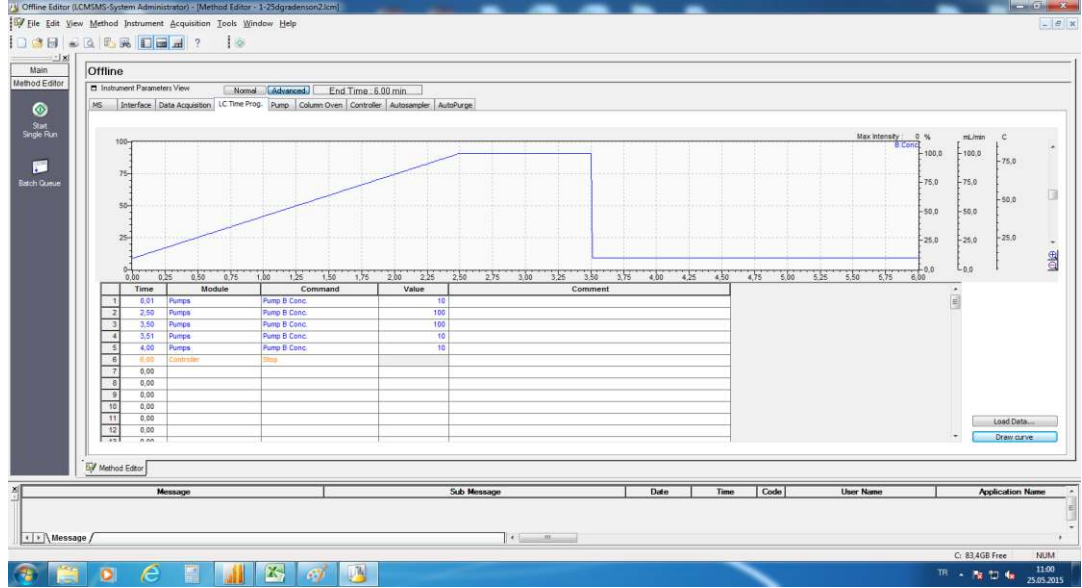
b) Örneklerin LC-MS/MS ile Analizi

Örnek analizi için Immundiagnostik AG marka 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ ImmuTube LC-MS/MS Kiti kullanılmıştır. Kitin içerisinde konsantrasyonları 18.1 pg/mL ve 182.3 pg/mL olan iki adet ticari kalibratör ve hedef aralığı 28-46.6 pg/mL ve 57.7-96.1 pg/mL olan iki adet kontrol (CTRL1 ve CTRL2) bulunmaktadır. Kalibrasyon eğrisi Şekil 3.4'de, CTRL1 ve CTRL2'ye ait kromatografik piklerin görüntüleri ise Şekil 3.6 ve Şekil 3.7'de gösterilmiştir.

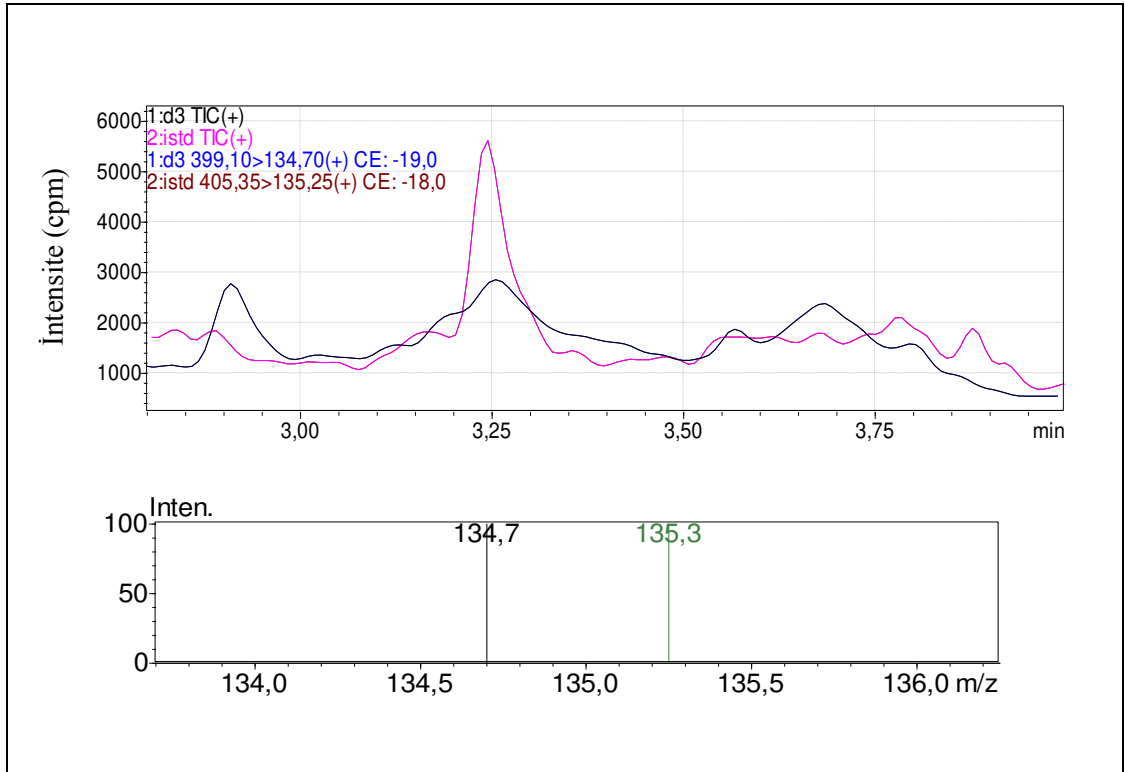
Hareketli faz için Mobil Faz A ve Mobil Faz B olmak üzere iki farklı çözücü, internal standart için de izotop işaretli 1,25(OH)₂ Vitamin D₃-d6 kullanılmıştır. Her analit için bir MRM (multiple-reaction monitoring) geçişi ve internal standart verileri elde edilmiştir. m/z değerleri 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ için 399.11/134.58; 1,25(OH)₂ Vitamin D₃-d6 (internal standart) için 405.21/134.68 olarak bulunmuştur. Kromatografik ayırma işlemi için Raptor™ ARC-18 (100x2.1 mm; 2.7 µm particle size) kolonu kullanılmıştır. Cihazın akış hızı 0,3 mL/dk., kolon sıcaklığı 45°C ve enjeksiyon hacmi 50 µL, gradient programı solvent B, 10% (0.01-2.49 dk.), 100% (2.5-3.5 dk.), 10% (3.51-6 dk.) olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.5). Her bir numune için analiz ve kolonun temizlenme süresi 6 dk. olarak belirlenmiştir.



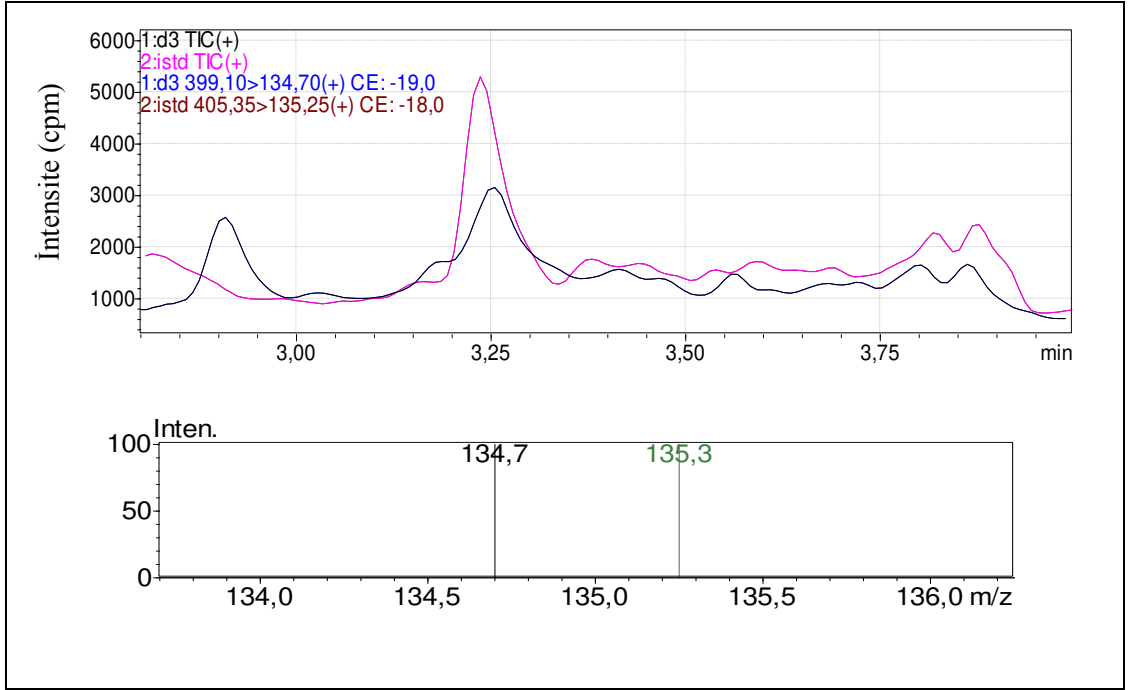
Şekil 3.4. Kalibrasyon eğrisi



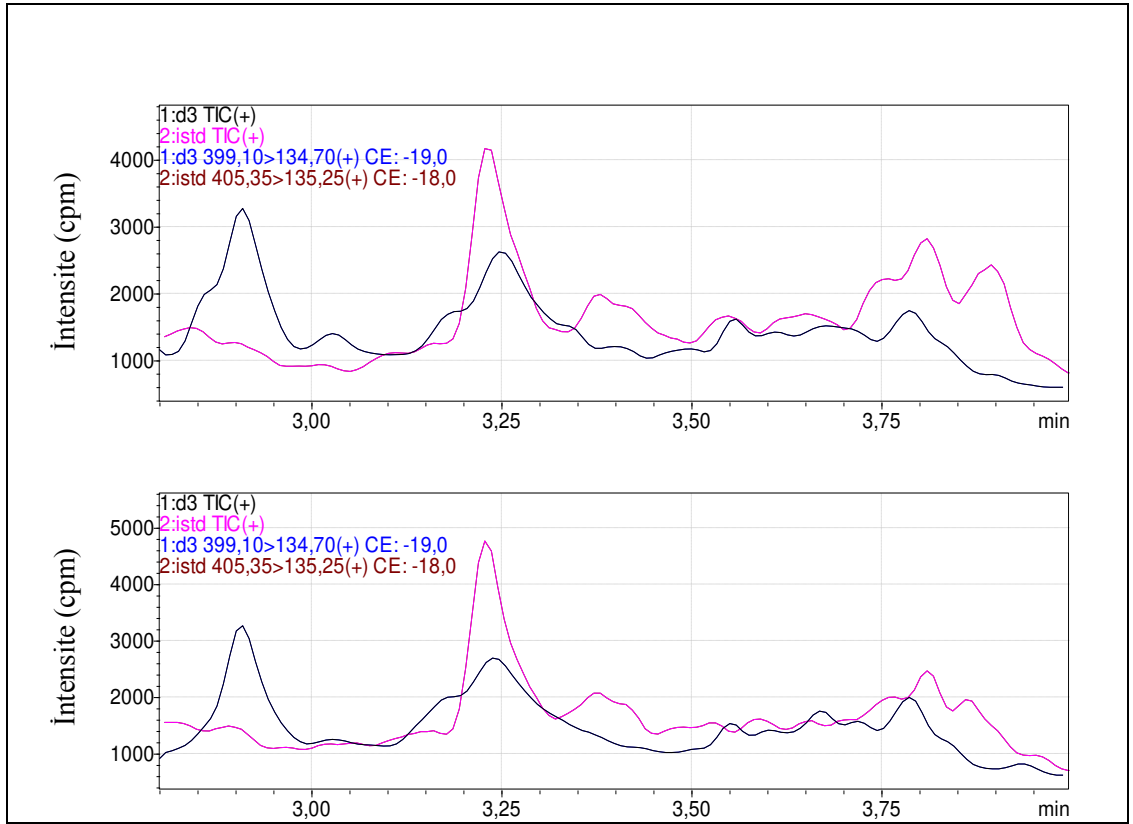
Şekil 3.5. LC zamana göre pompa akış diagramının ekran görüntüsü



Şekil 3.6. Kontrol 1 kromatogramı



Şekil 3.7. Kontrol 2 kromatogramı



Şekil 3.8. Örnek hasta kromatogramları

3.4. İstatistiksel Analiz

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 20.0 programı kullanılmıştır. Örneklemi tanımlamak için yüzde, ortalama (mean), standart sapma (SD) gibi tanımlayıcı istatistiklerden yararlanılmıştır. NÖ ve NS 6. ay olmak üzere iki grup oluşturularak tüm parametrelerin normal dağılıma uyup uymadığı Kolmogorov-Smirnov testi ile kontrol edilmiştir. Normal dağılıma uyan parametrelerin zamana göre değişimlerinin analizinde iki ortalama arası fark testi (Students' *t*-test), normal dağılıma uymayan parametreler için "Wilcoxon Signed Ranks Test" kullanılmıştır. Gruplar arası sürekli değişkenlerin karşılaştırılmasında, dağılım varsayımlarına göre iki ortalama arası fark testi (Students' *t*-test) ya da Mann-Whitney U testi uygulanmıştır. Sürekli değişkenler arasındaki ilişki dağılım varsayımına göre Spearman ya da Pearson Korelasyon analizi kullanılarak belirlenmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

BULGULAR

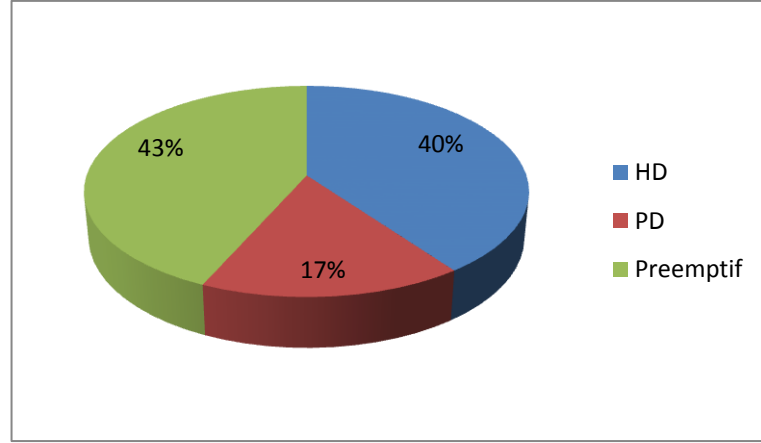
Çalışma kapsamına Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Organ Nakli Merkezi'nde, SDBY tanısıyla canlı vericiden böbrek transplantasyonu yapılmış olan 30 hasta alındı. Hastaların yaş ortalaması 40.30 ± 12.86 yıldır (ortalama $\pm$ SD, yaş aralığı: 19-70). Bu hastaların 20'si (%66.7) erkek, 10'u (%33.3) kadındır. Donörlerin yaş ortalamaları 41.43 ± 12.82 yıldır (ortalama $\pm$ SD, yaş aralığı: 24-70). Çalışmaya dahil edilen hastaların vücut kitle indeksi ortalaması 23.74 ± 4.76 kg/m² olarak bulundu.

Bu hastaların KBH etiyolojileri; Glomerülonefritler 5 (%16.67), Diabetes mellitus (DM) 4 (%13.33), Hipertansiyon 3 (%10), Veziko Üretral Reflü (VUR) 3 (%10), Polikistik Böbrek Hastalığı (PKBH) 3 (%10), Etiyolojisi bilinmeyen 9 (%30), diğer nedenler 3 (%10) olarak kaydedilmiştir. Buna göre çalışmamızda gözlenen en sık KBH nedenleri; etiyolojisi bilinmeyen, glomerülonefritler ve DM'dur (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Çalışmaya katılan hastaların KBH nedenleri (%).

	Sayı	%
Glomerülonefritler	5	16.67
Diabetes Mellitus (DM)	4	13.33
Hipertansiyon	3	10
VUR	3	10
PKBH	3	10
Etiyolojisi Bilinmeyen	9	30
Diğer	3	10
Toplam	30	100

Transplantasyon öncesinde çalışmaya katılan hastaların 12'si hemodiyaliz (HD), 5'i periton diyalizi (PD) tedavisi almıştır. 13 hastaya ise preemptif böbrek nakli yapılmıştır (Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Çalışmaya katılan hastaların renal transplantasyon öncesi tedavileri (%).

4.1. Hasta Gruplarından Elde Edilen Veriler

Hastaların nakil öncesi (NÖ) ve nakil sonrası 6.ay serum (NS 6.ay) örneklerinde ölçülen $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$, $25(\text{OH})\text{D}$, kalsiyum, fosfor, CaxP, PTH, Kreatinin, BUN, Albumin, ALP, Glukoz, eGFR parametrelerinin ortalama±standart sapma değerleri ve belirtilen parametreler için gözlenen istatistiksel farklılıklara ait “*p*” değerleri Tablo 4.2.’de gösterilmiştir.

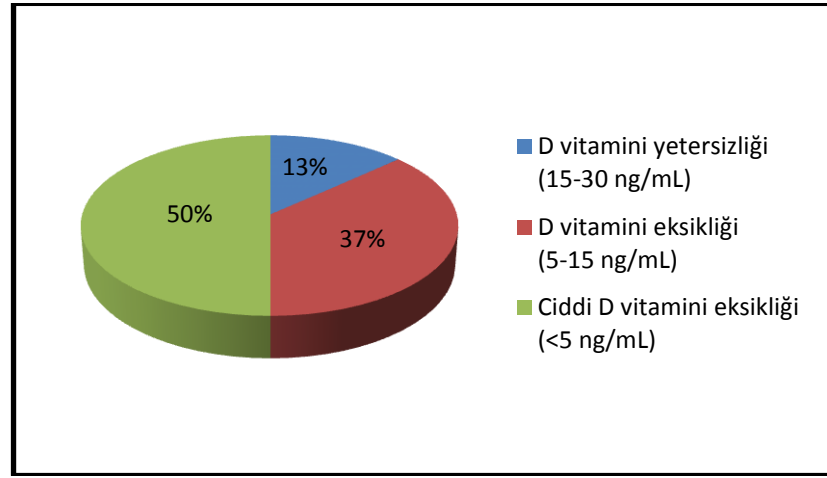
Tablo 4.2. Hastaların NÖ ve NS serum/plazma değerleri (ortalama±SD).

Parametreler	n	NÖ	NS 6. ay	<i>P</i>
$1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ (pg/mL)	30	43,70±14,15	68,48±18,35	0.0001
$25(\text{OH})\text{D}$ (ng/mL)	30	7,74±6,59	10,46±5,79	0.102
Ca (mg/dL)	30	8,38±0,87	9,08±0,50	0.0001
P (mg/dL)	30	4,78±1,10	2,90±0,62	0.0001
CaxP	30	39,89±9,88	26,38±6,26	0.0001
PTH (pg/mL)	30	424,04±399,30	116,59±82,30	0.0001
Kreatinin (mg/dL)	30	8,94±2,85	1,21±0,29	0.0001
BUN (mg/dL)	30	66,97±22,98	16,77±6,63	0.0001
eGFR (mL/dk)	30	6,80±2,55	73,17±20,10	0.0001
Albumin (g/dL)	30	4,30±0,60	4,50±0,32	0.141
ALP (U/L)	30	112,63±40,45	90,77±23,42	0.011
Glukoz (mg/dL)	30	97,60±15,96	98,93±23,74	0.959

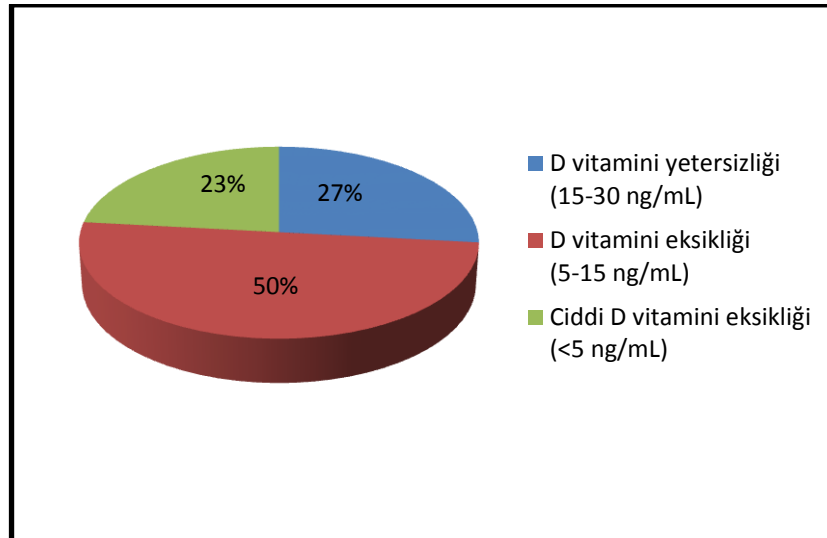
* $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4.2'de görüldüğü gibi, hastaların NS 6. ayda plazma 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenirken ($p=0.0001$), serum 25(OH)D düzeylerinde ise anlamlı bir fark bulunamamıştır ($p=0.102$).

Nakil öncesinde Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative (KDOQI) rehberine göre değerlendirilen hastaların %13.3'ünde D vitamini yetersizliği (15-30 ng/mL), %36.7'inde D vitamini eksikliği (5-15 ng/mL) ve %50'inde ciddi D vitamini eksikliği (<5 ng/mL); nakil sonrasında ise hastaların %26.7'inde D vitamini yetersizliği (15-30 ng/mL), %50'inde D vitamini eksikliği (5-15 ng/mL) ve %23.3'ünde ciddi D vitamini eksikliği (<5 ng/mL) tespit edilmiştir.



Şekil 4.2. K-DOQI rehberine göre hastaların nakil öncesinde D vitamini değerlendirmeleri



Şekil 4.3. K-DOQI rehberine göre hastaların nakil sonrası 6. ayda D vitamini değerlendirmeleri

NÖ ve NS 6. ayda serum kalsiyum ve GFR düzeylerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış ($p=0.0001$), serum fosfor, CaxP, PTH, kreatinin ve BUN düzeylerinde ise istatistiksel olarak anlamlı bir azalma gözlenmiştir ($p=0.0001$). ALP düzeylerindeki azalma da istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p=0.011$). Albumin ve glukoz düzeylerindeki artış ise istatistiksel olarak anlamlı bulunamamıştır (sırasıyla $p=0.141$, $p=0.959$).

Hastalar, diyaliz grubu ve preemtif grup olmak üzere ikiye ayrılmış ve NÖ ve NS 6. ayda tüm parametrelerin farkları değerlendirilmiştir. Bu gruplarda NS 6. aya ait parametreler arasında anlamlı bir fark gözlenememiştir. NÖ döneminde preemtif grupta kreatinin düzeylerinin daha düşük, GFR değerlerinin ise daha yüksek olduğu gözlenmiş ve bu farklar Tablo 4.3'de gösterilmiştir.

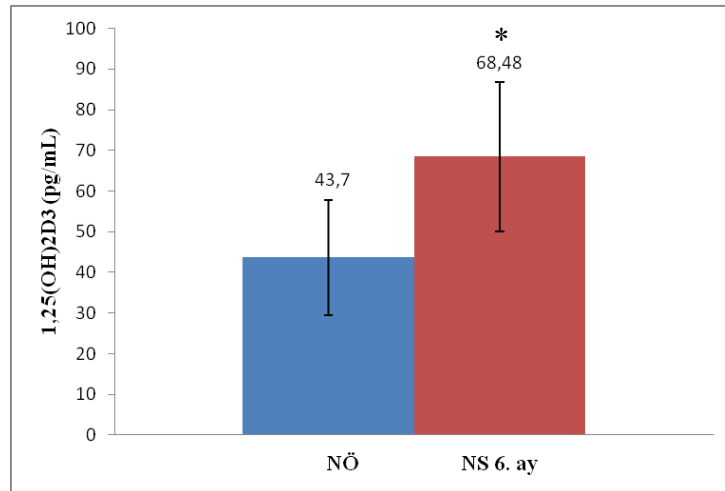
Tablo 4.3. Diyaliz grubu ile preemtif grubun NÖ değerleri (ortalama $\pm$ SD).

Parametreler	Diyaliz Grubu (HD+PD)	Preemtif Grup	P
Kreatinin	10.22 $\pm$ 2.86	7.27 $\pm$ 1.83	0.007
BUN	58.12 $\pm$ 22.18	78.54 $\pm$ 19.09	0.005
eGFR	5.69 $\pm$ 2.24	8.24 $\pm$ 2.24	0.003
Glukoz	91.59 $\pm$ 11.43	105.46 $\pm$ 17.98	0.015

* $p<0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

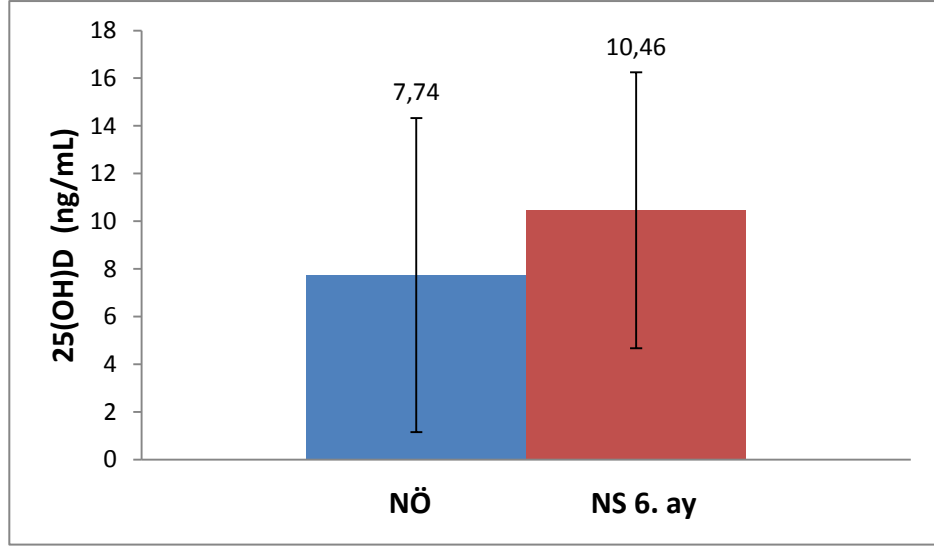
4.2. Parametrelere Ait Verilerin Grafikleri

NÖ ve NS 6. ayda istatistiksel olarak anlamlı farklılık gösteren parametrelere ait grafikler aşağıda yer almaktadır (Ortalama $\pm$ SD).

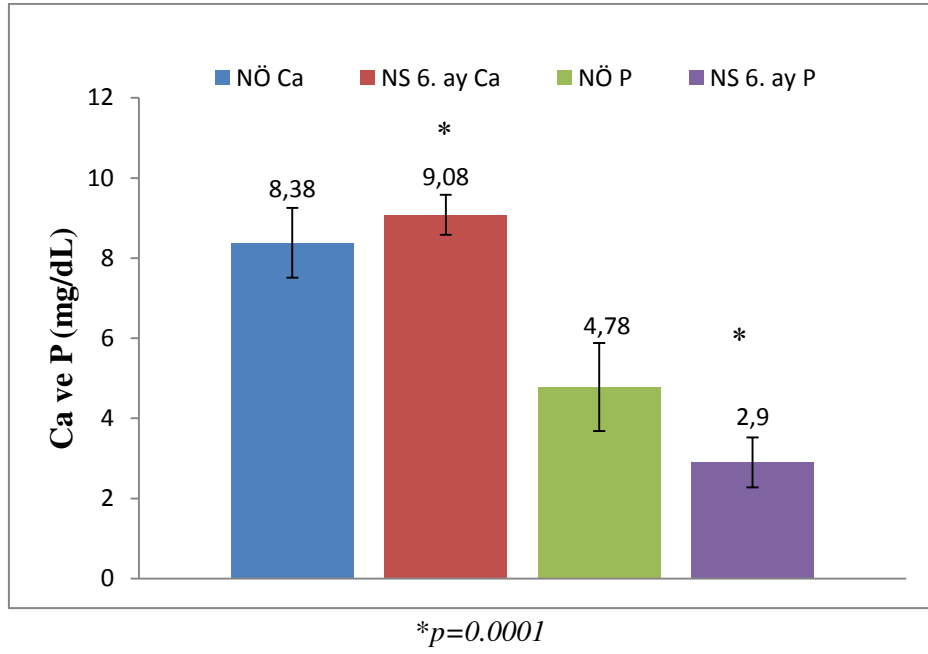


* $p=0.0001$

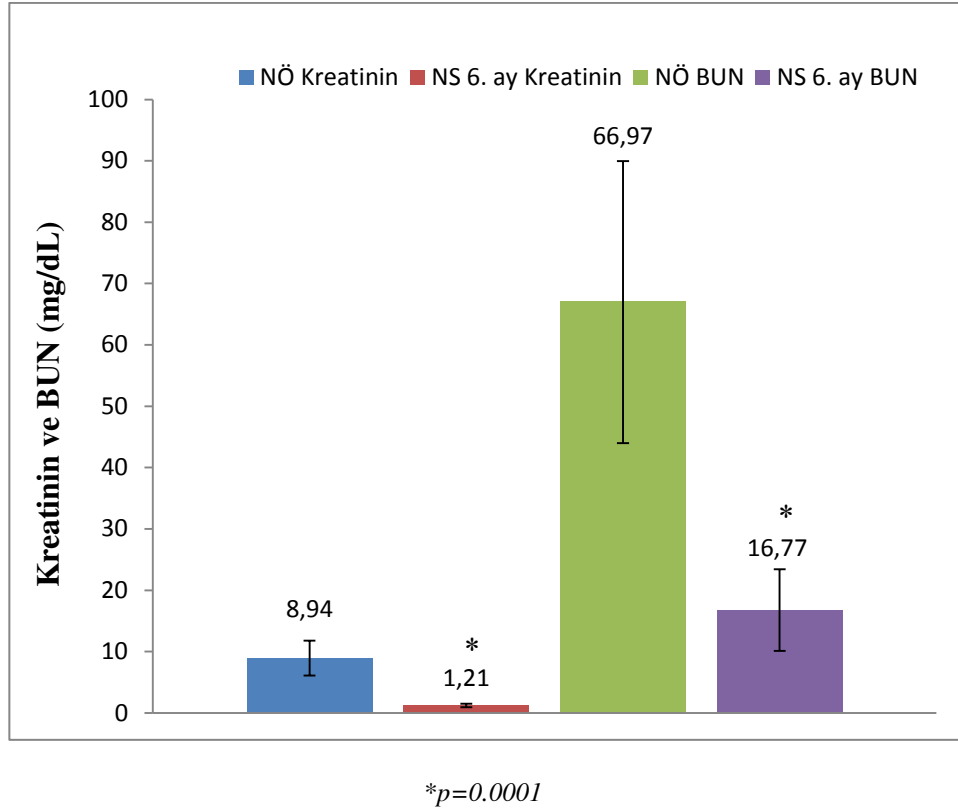
Şekil 4.4. NÖ ve NS 6. ay plazma 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri.



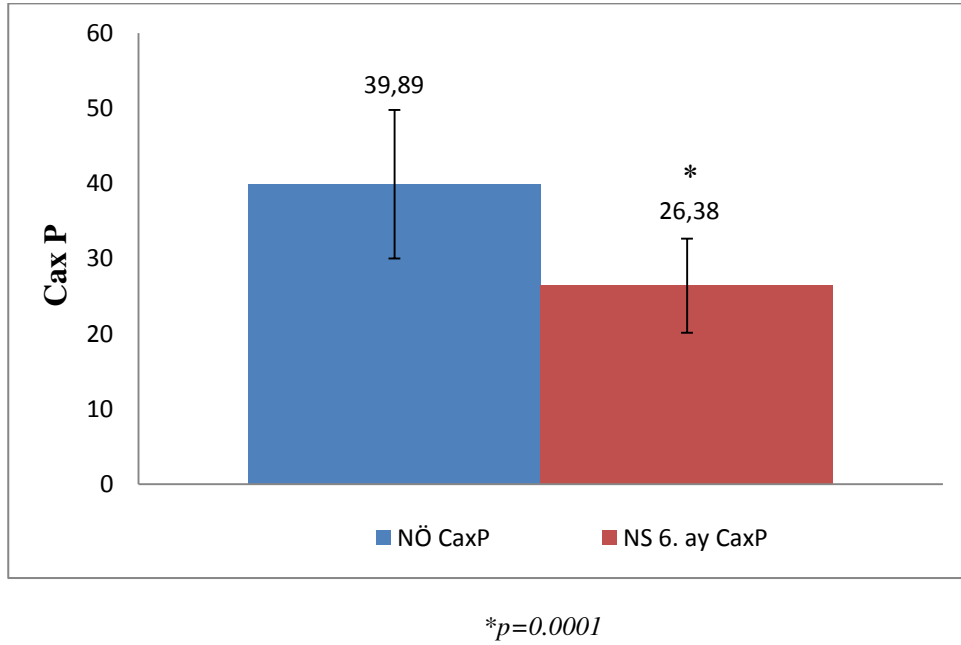
Şekil 4.5. NÖ ve NS 6. ay serum 25(OH)D düzeyleri.



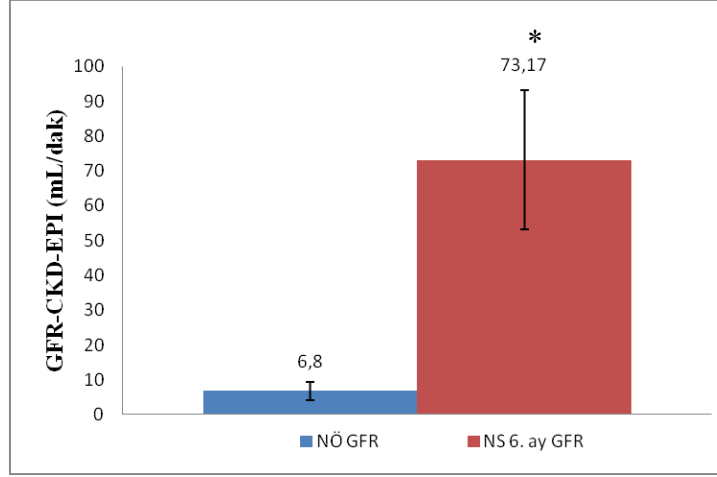
Şekil 4.6. NÖ, NS 6. ay serum kalsiyum ve fosfor düzeyleri.



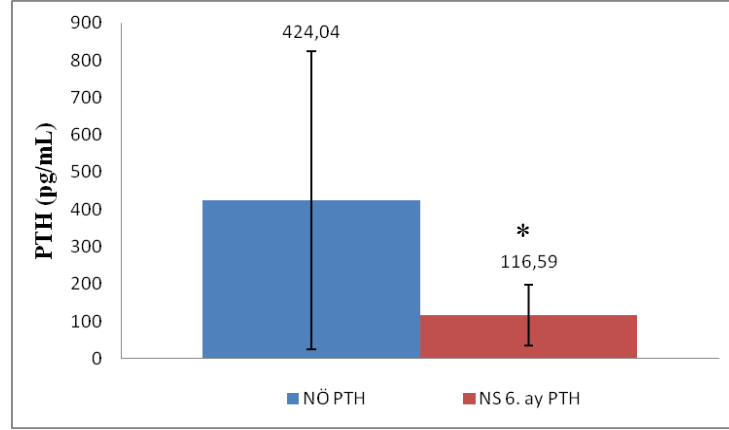
Şekil 4.7. NÖ, NS 6. ay serum Kreatinin ve BUN düzeyleri.



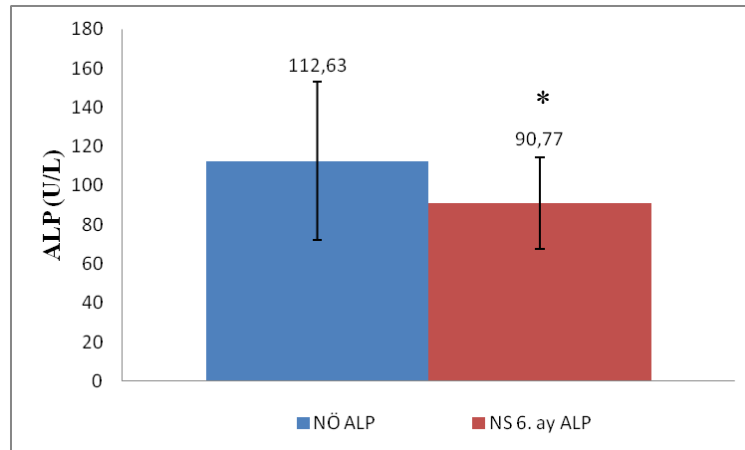
Şekil 4.8. NÖ ve NS 6. ay serum CaxP değerleri.



**p=0.0001*
Şekil 4.9. NÖ ve NS 6. ay eGFR değerleri.



**p=0.0001*
Şekil 4.10. NÖ ve NS 6. ay PTH düzeyleri.



**p=0.011*
Şekil 4.11. NÖ ve NS 6. ay ALP düzeyleri.

4.3. Nakil Öncesi Döneme Ait Parametrelerin Korelasyonları

Hastalara ait NÖ dönemde ölçülen serum/plazma parametre düzeyleri ile hesaplanan GFR ve CaxP değerleri arasındaki ilişki Tablo 4.4'te gösterilmektedir. NÖ dönemde plazma 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri ile diğer parametreler arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır.

Hastaların NÖ serum 25(OH)D düzeyleri ile kalsiyum düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.447$, $p = 0.013$). NÖ serum kalsiyum düzeyleri ile PTH ve ALP düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki bulunurken (sırasıyla $r = -0.467$, $p = 0.009$; $r = -0.431$, $p = 0.017$), NÖ PTH düzeyleri ile ALP düzeyleri arasında ise güçlü bir pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r = 0.843$, $p = 0.0001$).

NÖ serum GFR değerleri ile PTH ve ALP düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir korelasyon bulunmuştur (sırasıyla $r = -0.395$, $p = 0.031$; $r = -0.421$, $p = 0.021$). NÖ serum BUN düzeyleri ile glukoz düzeyleri arasında ise orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunurken ($r = 0.489$, $p = 0.006$), beklendiği gibi NÖ serum kreatinin düzeyleri ile GFR değerleri arasında da güçlü bir negatif korelasyon gözlenmiştir ($r = -0.892$, $p = 0.0001$).

Tablo 4.4. Hastaların nakil öncesi parametreleri arasındaki anlamlı korelasyonlar

	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D	Ca	P	CaxP	PTH	ALP	Kreatinin	BUN	GFR	Albumin	Glukoz
1,25(OH) ₂ D ₃												
25(OH)D			0.447*									
Ca		0.447*				-0.467**	-0.431*					
P												
CaxP												
PTH			-0.467*				0.843***			-0.395*		
ALP			-0.431*			0.843**				-0.421*		
Kreatinin										-0.892***		
BUN												0.489*
GFR						-0.395*	-0.421*	-0.892**				
Albumin												
Glukoz									0.489**			

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$

4.4. NS 6. Aya Ait Parametrelerin Korelasyonları

Hastalara ait NS 6. ayda ölçülen serum/plazma parametre düzeyleri ile hesaplanan GFR ve CaxP değerleri arasındaki ilişki Tablo 4.5.'te gösterilmektedir. Hastaların NS 6. ay serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyleri ile kreatinin düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.378, p=0.039$).

NS 6. ay serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyleri ile PTH düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki gözlenmiştir ($r = -0.365, p=0.047$). NS 6. ay serum PTH düzeyleri ile fosfor düzeyleri ve CaxP değerleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki bulunmuştur (sırasıyla $r = -0.403, p= 0.027$; $r = -0.440, p= 0.015$). NS 6. ay serum kalsiyum ve albümin düzeyleri arasında da güçlü bir pozitif korelasyon gözlenmiştir ($r = -0.588, p=0.001$).

Beklendiği gibi NS 6. ay serum kreatinin düzeyleri ile GFR değerleri arasında güçlü bir negatif korelasyon, BUN düzeyleri arasında da güçlü bir pozitif korelasyon bulunmuştur (sırasıyla $r = -0.809, p= 0.0001$; $r = 0.665, p= 0.0001$). Bununla birlikte NS 6. ay serum GFR değerleri ile BUN düzeyleri arasında da güçlü bir negatif korelasyon mevcuttu. ($r = -0.790, p=0.0001$).

4.5. NÖ ve NS 6. Aya Ait Parametrelerin Korelasyonları

Hastalara ait NÖ ve NS 6. ayda ölçülen serum/plazma parametre düzeyleri ile hesaplanan GFR ve CaxP değerleri arasındaki ilişki Tablo 4.6.'da gösterilmektedir. Hastaların NÖ serum $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyleri ile NS 6. ay PTH düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki bulunmuştur ($r = -0.413, p=0.023$).

NÖ serum $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyleri ile NS 6. ay kalsiyum düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki gözlenmiştir ($r = 0.458, p=0.011$). NÖ serum fosfor düzeyleri ve CaxP değerleri ile NS 6. ay $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunurken (sırasıyla $r = 0.375, p= 0.041$; $r = -0.391, p= 0.032$), NÖ serum PTH düzeyleri ile NS 6. ay kalsiyum düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki gözlenmiştir ($r = -0.419, p= 0.021$).

NÖ serum ALP düzeyleri ile NS 6. ay kreatinin ve BUN düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir korelasyon gözlenmiştir (sırasıyla $r = 0.411, p=0.024$; $r = -0.378, p= 0.04$). NÖ serum glukoz düzeyleri ile NS 6. ay $25(\text{OH})\text{D}$ düzeyleri ve GFR değerleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki bulunurken, BUN düzeyleri ile de orta düzeyde pozitif bir ilişki gözlenmiştir (sırasıyla $r = -0.438, p= 0.016$; $r = -0.464, p= 0.01$; $r = 0.417, p= 0.022$).

Tablo 4.5. Hastaların nakilden 6 ay sonraki parametreleri arasındaki korelasyonlar

NS 6. ay	1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D	Ca	P	CaxP	PTH	ALP	Kreatinin	BUN	GFR	Albumin	Glukoz
1,25(OH) ₂ D ₃								0.378*				
25(OH)D						-0.365*						
Ca											0.588**	
P						-0.403*						
CaxP						-0.440*						
PTH		-0.365*		-0.403*	-0.440*							
ALP												
Kreatinin	0.378*								0.665***	-0.809***		
BUN								0.665***		-0.790***		
GFR								-0.809***	-0.790***			
Albumin			0.588**									
Glukoz												

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$

Tablo 4.6. Hastaların nakil öncesi ve nakilden 6 ay sonraki serum ve plazma parametreleri arasındaki korelasyonlar

	NS 6. ay												
NÖ		1,25(OH) ₂ D ₃	25(OH)D	Ca	P	CaxP	PTH	ALP	Kreatinin	BUN	GFR	Albumin	Glukoz
1,25(OH) ₂ D ₃							-0.413*						
25(OH)D				0.458*									
Ca													
P		0.375*											
CaxP		0.391*											
PTH				-0.419*									
ALP									-0.411*	-0.378*			
Kreatinin													
BUN													
GFR													
Albumin													
Glukoz			-0.438*							0.417*	-0.464**		

* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.0001$

TARTIŞMA

Kronik böbrek yetmezliği (KBH); nefron sayı ve fonksiyonlarında ilerleyici ve geri dönüşümsüz azalma ile karakterize, birçok hastalığa bağlı olarak gelişebilen ve son dönem böbrek yetmezliğine (SDBY) götüren patofizyolojik bir süreçtir. Glomerüler filtrasyon hızı (GFR) genellikle aylar veya yıllar içinde giderek azalmakta ve bu azalmanın sonucu olarak böbrekler, sıvı-elektrolit, metabolik ve endokrin dengeleri düzenleme fonksiyonunu kaybetmektedir [102]. SDBY hastalarına hemodiyaliz, periton diyalizi ve transplantasyon tedavileri uygulanmaktadır. Yapılan metaanalizlerde renal transplantasyonun diyaliz tedavisiyle karşılaştırıldığında yüksek yaşam kalitesi, düşük morbidite ve mortalite oranları ile SDBY hastalarında başlıca ve en önemli tedavi şekli olduğu ortaya konmuştur. Bu çalışmanın temel amacı 25(OH)D ve 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinin stabil renal transplant alıcılarında transplant öncesi ve sonrasındaki değişimi ortaya ymaktır.

Böbrek nakli sonrası greft yaşam süresinin uzaması nedeni ile metabolik komplikasyonlarla daha sık oranda karşılaşmaya başlanmıştır. Bunlar arasında kemik ve mineral metabolizması hastalıkları önemli yer tutar. Böbrek nakli alıcılarında görülen kemik hastalıkları; kemik mineral yoğunluğunda azalma, osteoporoz, avasküler nekroz ve kırıklar olarak sayılabilir. Bu hastalarda kemik mineral yoğunluğunda azalma 1. ayda çok fazladır, 6. ayda ortalama % 4,1 olarak bildirilmekte, 1. yılın sonunda ise düşmektedir. Erken dönemde görülen bu yoğun kemik kaybının en önemli nedeni yüksek doz kortikosteroid kullanımıdır [103]. Bunların dışında dirençli sekonder hiperparatiroidizmin devam etmesi, osteomalazi, hipofosfatemi, renal tübüler asidoz ve glomerüler filtrasyon hızının 70 ml/dk altında olması da nakil sonrası kemik hastalıkları için önemli risk faktörleridir. Çalışmamızda bütçe yetersizliği nedeniyle kemik mineral yoğunluğu ölçme imkanı bulunamamıştır. Bu nedenle renal transplant alıcılarında, transplantasyondan önce ve sonra sadece D vitamini ve mineral metabolizması değerlendirilebilmiştir.

D vitamini kalsiyum ve fosforun intestinal emilimini uyarak ve renal kalsiyum geri emilimini artırarak serum kalsiyum ve fosfat düzeylerini düzenleyen bir hormondur. D vitamini eksikliği sekonder hiperparatiroidi, mineral ve kemik bozukluklarına yol açmaktadır. Ayrıca hipertansiyon, insülin direnci, renal fonksiyon kaybı, konjestif kalp yetmezliği ve mortalite artışı gibi iskelet dışı bozukluklarda da rol almaktadır. D vitamini, önce karaciğerde 25-hidroksivitamin D'ye daha sonra böbreklerde 1,25-dihidroksivitamin D'ye dönüşür. Aktif olan molekül 1,25(OH)₂D' dir. 1 α -hidroksilaz enzimi büyük ölçüde renal tübüler epitel hücrelerinde bulunmaktadır. Böbrek hastalıklarında böbrekteki 1 α -hidroksilaz aktivitesinin azalması nedeniyle progressif olarak böbrekte 1,25(OH)₂D oluşumu azalır. Aktif D vitamini, vücutta sentez edilmesi, bir yerde sentez edildikten sonra uzaktaki

dokularda reseptörler aracılığıyla etki göstermesi ve 'Feed-back' kontrolünün olması gibi özellikleri nedeniyle bir vitamin olmaktan çok bir steroid hormon gibi davranmaktadır. 25(OH)D'nin yarı ömrü aktif D vitamininden daha uzun ve yaklaşık 20 gündür, bu nedenle organizmadaki D vitamin durumunu en iyi yansıtan parametre olarak kabul edilmektedir [104].

Çeşitli çalışmalarda renal transplantasyondan sonra yaygın 25(OH)D eksikliği olduğu bildirilmiştir. Bunun en önemli nedeninin immunsupresif tedavi ile ilişkili non-melanom deri kanseri riskinin artması nedeniyle hastaların güneşten korunmaları olduğu düşünülmektedir. Güncel bir çalışmada transplantasyondan sonra 3. ayda düşük bulunan 25(OH)D düzeylerinin, 1 yıl sonrasında ortaya çıkan renal fibrozis, renal tübüler atrofi ve düşük glomerüler filtrasyon hızı ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Ancak bu çalışmada 1,25(OH)₂D ve yukarıdaki parametreler arasında bir ilişki bulunamamıştır [105].

Kidney Dialysis Outcomes Quality Initiative (K-DOQI) rehberine göre dolaşımdaki 25(OH)D 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. 25(OH)D₃ düzeyleri 30 ng/mL'nin altında ise vitamin D₂ (ergokalsiferol) yerine koyma tedavisi başlanması önerilmektedir [106]. Kidney Disease Improving Global Outcomes (KDIGO) kılavuzu da , evre 1-5 kronik böbrek hastalarında 25(OH)D düzeylerinin ölçülmesini ve vitamin D eksikliğinin genel toplumdaki gibi tedavi edilmesini önermektedir [107]. Çalışmamızda 25(OH)D düzeyi nakil öncesinde ortalama 7,74±6,59 ng/mL olarak bulunmuş, nakil sonrasında ise bu değer 10,46±5,79 ng/mL'ye yükselmiştir. Ancak bu yükselme istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır. Çalışmamızda hem nakil öncesinde hem de nakil sonrasında D vitamini düzeyi ≥30 ng/mL üzerinde olan hasta bulunamamıştır. Nakil öncesinde hastaların %13.3'ünde D vitamini yetersizliği (15-30 ng/mL), %36.7'inde D vitamini eksikliği (5-15 ng/mL) ve %50'inde ciddi D vitamini eksikliği (<5 ng/mL); nakil sonrasında ise hastaların %26.7'inde D vitamini yetersizliği (15-30 ng/mL), %50'inde D vitamini eksikliği (5-15 ng/mL) ve %23.3'ünde ciddi D vitamini eksikliği (<5 ng/mL) tespit edilmiştir. Transplantasyon sonrasında ciddi D vitamini eksikliği (<5 ng/mL) gözlenen hasta sayısında bir miktar azalma gözlenmiş ancak D vitamini eksikliği (5-15 ng/mL) olan hastaların oranı artmış olarak bulunmuştur. Bu farklılıkların örnek alma zamanı ile ilgili mevsimsel nedenlerden kaynaklandığı düşünülmektedir.

Aktif D vitaminin temel görevi intestinal kalsiyum ve fosfor emilimini sağlayarak PTH ile birlikte organizmanın kalsiyum/fosfor dengesini korumaktır. D vitamini yokluğunda kalsiyum emilimi % 10-15 dolayındayken, D vitamini etkisiyle % 30-80'e çıkar. D vitamini böbreklerden kalsiyum ve fosfor geri emilimini artırmakla birlikte, böbrekler asıl olarak PTH'in hedef dokusudur. D vitamininin hem osteoblast hem de osteoklastik serinin farklılaşmasında rolü olduğu bilinmektedir. Organizmada kalsiyum dengesi bağırsaklar, fosfor dengesi ise böbrekler üzerinden düzenlenmektedir.

Organizmadaki 25(OH)D düzeyinin normal olduğu durumlarda D vitamini kemiklerin mineralizasyonu üzerinde pozitif etkiye sahiptir. Bir başka deyişle, bağırsaklardan kalsiyum emiliminin yeterli olduğu durumlarda 1,25(OH)₂D düzeyi de normal olmakta ve bu aktif hormonun etkisiyle bir taraftan bağırsaklardan kalsiyum ve fosfor emilimi sağlanırken, öte yanda kemik mineralizasyonu devam etmektedir.

Organizmada 25(OH)D düzeyi kritik bir düzeyin altına indiğinde ya da bağırsaklardan kalsiyum emilimi yetersiz olduğunda PTH düzeyi artmakta (sekonder hiperparatiroidizm), PTH etkisiyle 1 α -hidroksilaz enzimi aktive olmakta ve 1,25(OH)₂D düzeyi yükselmektedir. Bu durumda D vitamininin kemiklerden kalsiyum mobilize edici etkisi devreye girmektedir. Organizma için serum kalsiyum düzeyi daha önemli olduğundan, artmış 1,25(OH)₂D ve PTH aktivitesinin ortak etkisiyle, bu kez kemiklerden kalsiyum mobilize edilerek serum kalsiyum düzeyi normal aralıkta tutulmaya çalışılmakta ve bu süreç boyunca kemiklerin mineralizasyonu daha fazla bozulmaktadır. İşte osteodistrofi de, D vitamini ya da kalsiyum yetersizliği sonucu organizmanın kalsiyum dengesinin intestinal emilim yerine, kemiklerden kalsiyum mobilizasyonu ile sağlandığı bu süreç sonunda gelişmektedir.

Erişkinlerdeki çalışmalar 25(OH)D düzeyinin 37.5 nmol/L (15 ng/mL) altına indiğinde PTH düzeyinin yükseldiğini göstermekte, dolayısıyla 15 ng/mL değeri, erişkinlerde 25(OH)D yeterliliği için 'eşik değer' olarak kabul edilmektedir. Organizma, 25 (OH)D düzeyi 15 ng/mL' nin altına indiğinde 1,25(OH)₂D düzeyini yükseltmekte; artan aktif D vitamini etkisiyle kemiklerden kalsiyum mobilize edilerek bir kompanzasyon sağlanmakta, ancak serum kalsiyum düzeyini normal değerlere yaklaştıran bu süreç kemik mineralizasyonunu bozmaktadır. Bu nedenle, sekonder hiperparatiroidizmlı hastalarda PTH ve 1,25(OH)₂D düzeyi yüksek bulunmaktadır. Bu durum, yani serum 1,25(OH)₂D düzeyi yüksekken osteodistrofi varlığı ilk bakışta bir paradoks olarak görünse de, aslında, artmış 1,25(OH)₂D, kemiklerden kalsiyumu mobilize ederek mineralizasyonu olumsuz etkilemektedir.

Bütün bu nedenlerle, organizma açısından en fizyolojik durum, serum 25 (OH)D düzeyinin PTH yükselmesine neden olmayacak bir değerde bulunması ve alınan ya da emilen kalsiyum miktarının yeterli olmasıdır. Bu nedenle, subklinik D vitamini yetersizliği, bir başka deyişle henüz osteodistrofiye ait bulguların olmadığı ama PTH yükselmesine neden olan 25(OH)D düşüklüğünün böbrek hastalarında tespit edilmesi önem kazanmaktadır.

25(OH)D düzey düşüklüğü yalnızca basit bir biyokimyasal bozukluk olmayıp; beraberinde PTH salınımında artma, kemik yapım-yıkım hızında artma, osteoporoz, hafif osteomalazi ve kalça ya da diğer kemiklerdeki kırık olasılığında artma gibi fizyolojik, klinik ve patolojik bulgulara yol açmaktadır. Örneğin, kışın kalın giyinme nedeniyle 25(OH)D düzeyleri çok düşen ve D vitamini almayan kişilerin kemikleri PTH ve 1,25(OH)₂D gibi osteotropik hormonların saldırısına maruz kalmakta, yazın D vitamini düzeyleri normale dönse de, bu süreç kemik sağlığını olumsuz etkilemektedir. Bir başka söyleyişle osteodistrofi geliştirmeyen ama PTH yükselmesine neden olacak şiddetteki subklinik D vitamini yetersizliği halk sağlığı

açısından önemli bir sorun konumuna gelmektedir. Bizim çalışmamızda da hastaların nakil öncesi ortalama PTH düzeyleri SDBY'de beklenildiği gibi yüksek bulunmuştur. Transplantasyon sonrası 6. ayda PTH düzeylerinde anlamlı ve belirgin bir azalma gözlenmiş olsa da PTH düzeyleri referans aralıkların üstünde bulunmuştur. Hastalarımızda renal fonksiyonlar normale dönmüş olsa bile 25(OH)D düzeylerinin halen ciddi düşüklüğü nedeniyle hiperparatiroidinin devam ettiği görülmektedir. Ayrıca, hastalarımızda 25(OH)D düzeyleri düşükken 1,25(OH)₂D düzeylerinin transplantasyon sonrasında anlamlı artış göstermesi osteodistrofi varlığını düşündürmektedir. Ancak bu durumu kemik mineral yoğunluğundaki değişiklikleri göstererek desteklemek mümkün olmamıştır. NKF/KDOQI' ya göre de PTH düzeyleri renal transplantasyonu izleyen ilk yıl içerisinde renal fonksiyonun düzelmesi ve takip eden 1,25(OH)₂D üretimi nedeniyle sıklıkla düşmesine rağmen alıcıların yaklaşık % 50' sinde çeşitli derecelerde hiperparatiroidi devam etmektedir [8, 108].

Torres ve ark., yaptıkları bir çalışmada nakil sırasında serum PTH düzeyi 250 pg/mL üzerinde olan olgularda nakilden sonraki 3 ay içerisinde vertebral kemik kaybının bu değerin altında olan olgulara oranla daha hızlı olduğunu göstermişlerdir [109]. Benzer bir çalışmayı Torregrosa ve arkadaşları yapmışlar ve nakilden sonraki 6 ay içerisinde serum PTH düzeyi 240 pg/mL üzerinde olan olgularda kemik mineral yoğunluğu kaybının bu değerin altında olan olgulara oranla daha fazla olduğunu göstermişlerdir [110]. Bir başka çalışmada ise Heaf ve ark., 3 yıllık takipte PTH düzeyinin 150 pg/mL üzerinde olmasının nakil sonrası osteoporoz için önemli risk faktörü olduğunu bildirmişleridir [111].

Bütün bunların yanı sıra, son yıllarda 1,25(OH)₂D'nin iskelet kası, immün sistem ve 'nerve growth factor' gibi proteinlerin indüksiyonu ve hücre farklılaşmasında düzenleyici role sahip olduğu, merkezi sinir sisteminde nörotransmitter gibi hareket ettiği ve D vitamini yetersizliğinin diyabet, koroner kalp hastalığı, diyabet ve tüberküloz için hazırlayıcı risk etmeni olabileceği ileri sürülmektedir. Yine vitamin D reseptör polimorfizmi ile çeşitli hastalıklar (tüberküloz, psöriazis, osteoporoz, prostat kanseri, Alzheimer ve multipl skleroz gibi) arasında ilişki kurulmaktadır. Bütün bunlar yaşam boyunca D vitamini yetersizliğinin kemik hastalıkları ile birlikte diğer olumsuz sonuçlarına dikkat etmemiz gerektiğini göstermektedir.

Literatürde D vitamininin greft fonksiyonlarında düzelme sağladığı ve greft fonksiyonlarını koruduğuna dair çalışmalar yer almaktadır. Keyzer ve ark., 435 hastada yaptıkları son çalışmalarında, renal transplantasyon sonrası uzun dönemde 25(OH)D düzeylerinin 12 ng/mL'nin altında olmasının renal fonksiyondaki yıllık azalmada gözlenen anlamlı artışla bağlantılı olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca 25(OH)D'nin transplantasyon zamanından bağımsız olarak tüm mortalite nedenleri ve renal fonksiyon azalması ile ilişkisi bu çalışmada bildirilmektedir [114]. Bizim çalışmamızda ise D vitamininin greft fonksiyonları üzerindeki etkisi araştırıldığında nakil öncesinde ve nakil sonrası 6. ayda 25(OH)D düzeyi ile kreatinin ve GFR arasında anlamlı bir korelasyon bulunamamıştır. Transplantasyon sonrası uzun dönemi kapsayacak bir çalışmada 25(OH)D ile renal fonksiyonlar arasındaki ilişkinin ortaya konabilmesi daha mümkün görünmektedir. Çalışmamızda transplantasyondan

sonra 6. ayda 1,25(OH)₂D₃ ile kreatinin düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuştur ($r = 0.378$, $p=0.039$). Keyzer ve ark., 1,25(OH)₂D düzeylerini bizim çalışmamıza benzer konsantrasyonlarda bulmuşlardır ve 1,25(OH)₂D ile mortalite ve greft yetmezliği arasındaki negatif ilişkiyi göstermişlerdir. Ancak bu ilişkinin tamamen renal fonksiyona bağlı olduğunu bildirmişlerdir.

Serum 25(OH)D konsantrasyonlarının 1,25(OH)₂D' den yaklaşık 1000 kat fazla olması nedeniyle D vitamini durumunu yansıtmada en iyi parametre olduğu düşünülmektedir. 1 α -hidroksilaz ekspresyonu gösteren 1,25(OH)₂D'nin çeşitli doku ve hücrelerde lokal üretimi D vitamininin otokrin/parakrin etkileri için önemlidir. Bizim çalışmamızda hastalarımızın nakil öncesi plazma 1,25(OH)₂D düzeylerinde belirgin bir eksiklik gözlenmemiştir. Bunun nedeni olarak da 1,25(OH)₂D' nin böbrek dışı dokularda da sentezinin yapılabilmesi gösterilebilir.

Çalışmamızda renal transplantasyon ile 25(OH)D düzeyleri arasında anlamlı bir değişiklik gözlenmemiştir ancak 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinde gözlenen anlamlı artışlar, renal transplantasyon sonrasında hastaların kemik hastalığı açısından takibinde 1,25(OH)₂D₃ ve PTH'nın daha yararlı parametreler olabileceğini desteklemektedir. Ancak 1,25(OH)₂D₃ ölçümü rutin laboratuvarlarda çok yaygın kullanılamamaktadır. Son yıllarda serum 25(OH)D ölçümleri ise rutin laboratuvarlarda sıklıkla kullanılmaktadır. D vitamininin dolaşımdaki majör metaboliti olan ve klinik olarak ölçümü daha çok tercih edilen formu 25(OH)D olmasına rağmen, bağırsaktan kalsiyum emilimi, kemik rezorpsiyonu ve paratiroid hormon supresyonu gibi biyolojik etkilerden sorumlu olan formu 1,25(OH)₂D' dir. Genel popülasyonda 1,25(OH)₂D' nin ölçümünün klinik yararı tam olarak anlaşılamamıştır ancak özellikle böbrek yetmezliği hastalarında D vitamininin aktif metabolitinin LC-MS/MS gibi güvenilir bir yöntemle ölçümü çok önemlidir.

Serum referans aralığı 15-60 pg/mL (36-144 pmol/L) olarak bildirilen 1,25(OH)₂D'nin ölçümünü herhangi bir ön işlem yapmadan LC-MS/MS'de yapmak şimdiki koşullarda mümkün değildir. Düşük konsantrasyonlardaki 1,25(OH)₂D' nin ölçümü için mümkün olan en yüksek spesifiteye sahip, ileri deteksiyon limitlerine ulaşan çok gelişmiş cihazlara ihtiyaç vardır. Bizim çalışmamızda kullandığımız LC-MS/MS'de gerekli olan performansı elde etmek için, örneklerde immunoaffinite temelli bir ekstraksiyon yönteminin kullanılması gerekmiştir. Çalışmamızda 1,25(OH)₂D' yi metabolitlerinden ve matriks bileşenlerinden ayırmak için enjeksiyon hacmi ve pompanın akış hızlarının değiştirilmesi, farklı konsantrasyonda internal standart eklenmesi, iyonizasyon sıcaklığının artırılması gibi yaklaşımlar denenmiştir. İmmunoekstraksiyon ile kombine edilmiş kromatografi optimize edilmiş ve testin analiz süresi kolon temizliği ile birlikte toplam 6 dakika olarak belirlenmiştir. Düşük konsantrasyonlardaki analitlerin immunoaffinite ekstraksiyonu yapılarak ölçülmesi, RIA ve ELISA gibi diğer immün analizlere göre doğruluk ve tekrarlanabilirlik açısından daha başarılı sonuçlar vermektedir. Kullandığımız yöntemle renal transplantasyonun 1,25(OH)₂D düzeyleri üzerindeki etkisini göstermek mümkün olabilmektedir. Ancak D vitamini durumunu en iyi yansıtan parametre olarak kabul edilen ve immünassay ile ölçülen 25(OH)D düzeyleri üzerinde bu etkiyi görmek mümkün olmamıştır. 25(OH)D düzeylerinin renal transplantasyon sonrasında artış gösterdiği gözlenmiş ancak bu artış anlamlı bulunamamıştır. Bunun nedeni

kullanılan yöntemin duyarlılığı ile ilgili olabilir. Çalışmamızda 25(OH)D düzeylerinin, bütçe yetersizliği nedeniyle daha güvenilir olan LC-MS/MS ile ölçümü yapılamamıştır.

Ülkemizde böbrek nakli yapılmış hastalarda vitamin D yetersizliği veya eksikliği görülme sıklığını gösteren çalışmalar yeterli sayıda değildir. Çalışmamızda D vitamini eksikliği ve yetersizliği oranları literatür verilerinden daha fazla bulunmuştur. Hastalarımızın tamamında D vitamini eksikliği ve yetersizliği gözlenmiştir. Böbrek nakli yapılmış hastalarda vitamin D eksikliğinin yüksek oranlarda gözlenmesinin nedenleri arasında diyaliz sürecinde ve nakil sonrasında D vitamini desteğinin verilmemesi, immünsupressif tedavi sonucunda vitamin D katabolizmasının artması, deri kanserinden koruma amaçlı güneşe çıkmanın az tavsiye edilmesi yer almaktadır. Genel populasyonda ve kronik böbrek hastalarında besinsel desteklerle 25(OH)D düzeylerinin düzeltilmesinin mortalite riskini azaltacağı kısıtlı sayıdaki çalışmada bildirilmektedir. Greft fonksiyonunu olumsuz yönde etkileyebilecek D vitamini eksikliğinin belirlenmesi, renal transplant alıcılarında greft ömrünü korumaya yönelik D vitamini takviyesi gibi tedavilerin kullanımına öncülük ederek transplantasyon hastalarının yaşam süreleri ve yaşam kaliteleri üzerinde olumlu bir artış sağlayabilir.

SONUÇLAR

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Çalışmamızda renal transplantasyon yapılmış hastaların KBH etiyolojilerinin, Glomerülonefritler 5 (%16.67), Diabetes mellitus (DM) 4 (%13.33), Hipertansiyon 3 (%10), Veziko Üretral Reflü (VUR) 3 (%10), Polikistik Böbrek Hastalığı (PKBH) 3 (%10), Etiyolojisi bilinmeyen 9 (%30), diğer nedenler 3 (%10) hasta olduğu görülmüştür.
2. Renal transplantasyon öncesi hastalarımızın 12'si hemodiyaliz (HD), 5'i periton diyalizi (PD) tedavisi almıştır, 13 hasta ise preemptiftir.
3. Hem nakil öncesinde hem de nakil sonrasında hastaların tamamında D vitamini düzeyleri 30 ng/mL'nin altındadır.
4. Nakil öncesinde hastaların %13.3'ünde D vitamini yetersizliği, %36.7'inde D vitamini eksikliği ve %50'inde ciddi D vitamini eksikliği tespit edilmiştir.
5. Nakil sonrası 6. ayda hastaların %26.7'inde D vitamini yetersizliği, %50'inde D vitamini eksikliği ve %23.3'ünde ciddi D vitamini eksikliği tespit edilmiştir.
6. NS 6. ayda hastaların plazma 1,25(OH)₂D₃ düzeylerinde nakil öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlenmiştir.
7. NS 6. ayda hastaların serum 25(OH)D düzeylerinde nakil öncesine göre anlamlı bir fark bulunamamıştır.
8. NS 6. ayda hastaların serum fosfor, CaxP, PTH, kreatinin, BUN ve ALP düzeylerinde nakil öncesine göre istatistiksel olarak anlamlı bir azalma, kalsiyum ve GFR düzeylerinde anlamlı bir artış görülmüştür.
9. Diyaliz grubu ile preemptif gruba ait parametreler arasında NS 6. ayda anlamlı bir fark gözlenememiştir. NÖ dönemde preemptif grupta kreatinin düzeylerinin daha düşük, GFR değerlerinin ise daha yüksek olduğu görülmüştür.
10. NÖ dönemde plazma 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri ile diğer parametreler arasında

anlamalı bir korelasyon bulunamamıştır.

11. Hastaların NÖ serum 25(OH)D düzeyleri ile kalsiyum düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuştur.
12. Hastaların NS 6. ay serum 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri ile kreatinin düzeyleri arasında orta düzeyde pozitif bir ilişki bulunmuştur.
13. NS 6. ay serum 25(OH)D düzeyleri ile PTH düzeyleri arasında orta düzeyde negatif bir ilişki gözlenmiştir.

Sonuç olarak, çalışmaya dahil ettiğimiz hastaların tamamında 25(OH)D düzeyleri 30 ng/mL'nin altında bulunmuştur. 1,25(OH)₂D₃ düzeyleri transplantasyondan sonra böbrek fonksiyonlarının düzelmesine bağlı olarak anlamlı bir artış göstermiştir. PTH düzeylerinin, transplantasyon sonrasında düşmesine rağmen hala referans aralıkların üzerinde olduğu görülmüştür. Bu da hastalarda 25(OH)D eksikliği sebebiyle oluşan hiperparatiroidinin transplantasyon sonrasında da devam ettiğini düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. Hesketh CC, Knoll GA, Molnar AO, Tsampalieros A, Zimmerman DL, Vitamin D and kidney transplant outcomes: a protocol for a systematic review and meta-analysis. *Systematic Reviews* 2014; 3:64.
2. Tonelli M, Wiebe N, Knoll G, Bello A, Browne S, Jadhav D, Klarenbach S, Gill J: Systematic review: kidney transplantation compared with dialysis in clinically relevant outcomes. *Am J Transplant* 2011; 11(10):2093–2109.
3. Pallardó Mateu LM, Sancho Calabuig A, Capdevila Plaza L, Franco Esteve A: Acute rejection and late renal transplant failure: risk factors and prognosis. *Nephrol Dial Transplant* 2004, 19:38–42.
4. Knoll G, Muirhead N, Trpeski L, Zhu N, Badovinac K: Patient survival following renal transplant failure in Canada. *Am J Transplant* 2005, 5(7):1719–1724.
5. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med* 2007, 357(3):266–281.
6. Holick MF. Vitamin D for health and in chronic kidney disease. *Semin Dial* 2005, 18(4):266–275.
7. Gonzalez EA, Sachdeva A, Oliver DA, Martin KJ: Vitamin D insufficiency and deficiency in chronic kidney disease: a single center observational study. *Am J Nephrol* 2004, 24(5):503–510.
8. Stavroulopoulos A, Cassidy MJ, Porter CJ, Hosking DJ, Roe SD: Vitamin D status in renal transplant recipients. *Am J Transplant* 2007, 7(11):2546–2552.
9. National Kidney Foundation: K/DOQI clinical practice guidelines for bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003, 42(4 Suppl 3):S1–S201.
10. Li YC, Kong J, Wei M, Chen ZF, Liu SQ, Cao LP: 1,25-dihydroxyvitamin D(3) is a negative endocrine regulator of the renin-angiotensin system. *J Clin Invest* 2002, 110(2):229–238.

11. Zhang Y, Kong J, Deb DK, Chang A, Li YC: Vitamin D receptor attenuates renal fibrosis by suppressing the renin-angiotensin system. *J Am Soc Nephrol* 2010, 21(6):966–973.
12. Lee DR, Kong JM, Cho KI, Chan L: Impact of vitamin D on proteinuria, insulin resistance, and cardiovascular parameters in kidney transplant recipients. *Transplant Proc* 2011, 43(10):3723–3729.
13. Prietl B, Treiber G, Pieber TR, Amrein K: Vitamin D and immune function. *Nutrients* 2013, 5(7):2502–2521.
14. Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O’Garra A: 1 α ,25-dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4+ T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol* 2001, 167(9):4974–4980.
15. Yuan C, Kosewick J, He X, Kozak M, Wang S, Sensitive measurement of serum 1 α ,25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011, 25(9):1241–1249.
16. Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE. *Kidney Function and Disease. Tietz Fundamentals of Clinical Chemistry*, Sixth edition 2008; 631-54.
17. İşlekel H. Böbrek fonksiyonları ve bozuklukları. In: Onat T, Emerk K, Sözen EY. *İnsan Biyokimyası*. Palme Yayıncılık 2002; 37-42.
18. Bakır F, Yıldırımkaş M. Kronik Böbrek Hastalığında Laboratuvar. *Türk Klinik Laboratuvar Dergisi* 2010; 1(1): 27-31.
19. Bevc S, Hojs R, Ekart R, Gorenjak M, Puklavec L. Simple cystatin C formula compared to sophisticated CKD-EPI formulas for estimation of glomerular filtration rate in the elderly. *Ther Apher Dial* 2011; 15(3): 261-8.
20. Aljama P, Cruz JM. Martin de Francisco AL. New insights in ESRD. *Kidney Int* 2002; 80: 1-2.
21. Courtney AE, Maxwell AP, Fogarty DG. Using estimated glomerular filtration rate (eGFR) to help manage patients with chronic kidney disease. *Ulster Med J* 2007; 76(3): 154-6.
22. Krause MW, Shah SV, Çeviri: Sipahioğlu. Böbrek Hastalığı Olan Hastaya Yaklaşım. Andreoli TE, Carpenter CJC, Griggs RC, Benjamin IJ. Andreoli and Carpenter’s *Cecil Essentials of Medicine* 7 th Edition. Çeviri Editörü: Selçuk Mısıklı 2008; 278-84.

23. Lively A, Coresh J, Bolton K. Clinical practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation classification and stratification. *Kidney Dis* 2002; 39 (1): 46-76.
24. Newman DJ (eds). Tietz basic prenciples in clinical chemistry. Çev Ed. Aslan D. Klinik kimyada temel ilkeler. Türkiye, Palme Yayıncılık 2005; 308-722.
25. Levey AS, Coresh J, Balk E, Kausz AT, Levin A, Steffes MW, Hogg RJ, Perrone RD, Lau J, Eknoyan G. National kidney foundation practice guidelines for chronic kidney disease: Evaluation, classification and stratification. *Ann Intern Med* 2003; 139: 137-47.
26. Jacobson HR. Chronic renal failure; Pathophysiology. *Lancet* 1991; 338: 419-23.
27. KDIGO 2012 Clinical Practice Guideline for the Evaluation and Management of Chronic Kidney Disease. *Kidney Int Suppl* 2013; 3(1): 19-62.
28. www.tsn.org.tr/registry/registry 2010
29. Akpolat T, Utaş C. Böbrek Yetmezliği: Genel Bilgiler. Akpolat T, Utaş C. Hemodiyaliz Hekimi El Kitabı. Kayseri: Anadolu Yayıncılık 2001; 1-10.
30. Hsueh WA, Moore L, Bryer-Ash M:Contemporary Diagnosis and Management of Type 2 Diabetes. Second edition. Pennsylvania, USA, Handbooks in health Care Co. Türkçe çeviri editörleri: Karpuz H, Karpuz V. Tıp 2 Diyabet Güncel Tanı ve Tedavi. İstanbul, Avrupa Tıp Kitapçılık 2004; 264-85.
31. Daniels BS, Goetz FC. Diabetes and the kidney. In Davidson JK, ed: Clinical Diabetes Mellitus: A Problem-Oriented Approach. New York: Thieme Medical Publishers Inc 2000; 529-37.
32. Varela Lema L, Ruano Ravina A. Effectiveness and safety of different hemodialysis modalities: a review. *J Nephrol* 2007; 20(5): 525-42.
33. Erek E, Süleymanlar G, Serdengeçti K. Nephrology, dialysis and transplantation in Turkey. *Nephrol Dial Transplant* 2002; 17(12): 2087-93.
34. Davran F. Renal Transplant Alıcılarında İnterlökin-18(IL-18)-607 A/C ve -137 C/G Polimorfizmlerinin Erken Dönem Graft Fonksiyonları ile İlişkisi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Antalya 2012.
35. Uçar H. Renal transplant alıcılarında greft fonksiyon belirteci olarak serum ve

idrarda ıl-18 (interleukın-18), scd30 (soluble cd30), ngal (neutrophıl gelatinase-associated lipocalın), sistatin c ve kreatinin düzeylerinin karşılaştırılması, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Antalya 2012.

36. Budak D. Renal Transplant Alıcılarında Greft Fonksiyon Belirteci Olarak Serumda TNF- α , sTNFR I, sTNFR II, IL-18, IL-6, sVCAM-1, sICAM-1, CRP, Sistatin C ve Kreatinin Düzeylerinin Karşılaştırılması, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakóltesi, Antalya 2012.
37. Garcia GG, Harden P, Chapman J. The Global Role of Kidney Transplantation. *Turk Neph Dial Transpl* 2012; 21 (1): 1-6.
38. Malho A, Malheiro J, Fonseca I, Martins LS, Pedroso S, Almeida M, Dias L, Castro Henriques A, Cabrita A. Advantages of Kidney Transplant Precocity in Graft Long-Term Survival. *Transplant Proc* 2012; 44(8): 2344-7.
39. Wolfe RA, Ashby VB, Milford EL, Ojo AO, Ettenger RE, Agodoa LY, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant. *N Engl J Med* 1999; 341(23): 1725-30.
40. Arık N, Sungur C, Ersoy F, Süleymanlar G. Son Dönem Böbrek Yetmezliğı Tedavisi. İliçin G, Biberoğılu K, Süleymanlar G, Ünal S. İç Hastalıkları Cilt 1, 2. Baskı 2005; 1308-40.
41. Ecder T, Akpolat T. Renal Replasman Tedavisi-Renal Transplantasyon. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. *Nefroloji El Kitabı*, 4. Baskı 2007; 349-64.
42. Halloran PF. Immunosuppressive Drugs for Kidney Transplantation. *N Engl J Med* 2004; 351: 2715–29.
43. Freitas C, Fructuso M, Rocha MJ, Almeida M, Pedroso S, Martins LS, et al. Late venous thrombosis of renal allograft: two cases with different treatment and outcome. *Nefrologia* 2011; 31(1): 115-7.
44. Dreno B, Mansat E, Legoux B and Litoux P. Skin cancers in transplant patients. *Nephrol Dial Transplant* 1998; 13: 1374–9.
45. Rojas E, Carlini RG, Clesca P et al. The pathogenesis of osteodystrophy after renal transplantation as detected by early alterations in bone remodeling. *Kidney Int* 2003; 63: 1915–1923.

46. Cunningham J. Posttransplantation bone disease. *Transplantation* 2005;79:629-34.
47. Grotz WH, Mundinger FA, Gugel B, Exner VM, Kirste G, Schollmeyer PJ. Bone mineral density after kidney transplantation. A cross-sectional study in 190 graft recipients up to 20 years after transplantation. *Transplantation*. 1995;59:982-6.
48. Durieux S, Mercadal L, Orcel P, et al: Bone mineral density and fracture prevalence in long-term kidney graft recipients. *Transplantation*. 2002;74:496.
49. O'Shaughnessy EA, Dahl DC, Smith CL, et al: Risk factors for fractures in kidney transplantation. *Transplantation*. 2002; 74:362.
50. Ball AM, Gillen DL, Sherrard D *et al*. Risk of hip fracture among dialysis and renal transplant recipients. *JAMA*. 2002; 288: 3014-3018.
51. Heaf JG. Bone disease after renal transplantation. *Transplantation* 2003;75:315-25.
52. Gonzalez EA, Martin KJ. Bone and mineral metabolism in chronic renal failure. In:Johnson RJ, Feehally J. *Comprehensive Clinical Nephrology*. 2nd Ed, Elsevier, Philadelphia, 2003, p 873-885.
53. Sherrard DJ, Hercz G, Pei Y, et al. The spectrum of bone disease in end-stage renal failure- an evolving disorder. *Kidney Int* 1993;43:436-42.
54. Sherrard DJ. Renal osteodistrofi. In: Henrich WL. *Diyaliz Prensipleri ve Uygulaması*. Lippincott Williams & Wilkins, Eczacıbaşı (çeviri), 3. Baskı, Maryland, 2004, s 381- 92.
55. Chertow GM, Burke SK, Lazarus JM, et al. Poly(allylamine hydrochloride) (RenaGel): a noncalcemic phosphate binder for the treatment of hyperphosphatemia in CRF. *Am J Kidney Dis* 1997;29:66-71.
56. Drueke HB, Ritz E. Skeletal disorders. In: Davison AM, Ritz E. *Textbook of Clinical Nephrology*. 3rd Ed, Vol 3, Oxford, 2005, p 1827-61.
57. Denda M, Finch J, Slatopolsky E. Phosphorus accelerates the development of parathyroid hyperplasia and secondary hyperparathyroidism in rats with renal failure. *Am J Kidney Dis* 1996;28.

58. Fukuda N, Tanaka H, Tominaga Y, et al. Decreased 1,25-dihydroxy-vitaminD3 receptor density is associated with a more severe form of parathyroid hyperplasia in chronic uremic patients. *J Clin Invest* 1993;92:1436-43.
59. Dusso AS, Thadhani R, Slatopolsky E. Vitamin D receptor and analogs. *Semin Nephrol* 2004;24:10-6.
60. Strom M, Sandgren ME, Brown TA, et al. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 up-regulates the 1,25-dihydroxyvitamin D3 receptor in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:9770-3.
61. Brown AJ, Zhong M, Finch J, et al. Rat calcium-sensing receptor is regulated by vitamin D but not by calcium. *Am J Physiol* 1996;270:454-60.
62. Rogers KV, Dunn CK, Conklin RL, et al. Calcium receptor messenger ribonucleic acid levels in the parathyroid glands and kidney of vitamin D-deficient rats are not regulated by plasma calcium or 1,25-dihydroxyvitamin D3. *Endocrinology* 1995;136:499-504.
63. Değişli CM. Kemik metastazı olan meme kanserli hastalarda verilen D vitamini tedavisinin dolaşımdaki hsp-90 ve ck-18 düzeyleri üzerine etkisi. Selçuk Üniversitesi Sağlık bilimleri enstitüsü, Doktora tezi, Konya 2010.
64. Gülcü D. Tip 1 diabetes mellitus hastalarında D vitamini düzeyleri. T.C. Sağlık Bakanlığı Bakırköy Kadın Doğum ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastanesi Çocuk Kliniği, Uzmanlık tezi, İstanbul 2011.
65. Türken M. Tip 1 ve Tip 2 diyabetes mellitus hastalıklarının patogeneğinde D vitamini eksikliğinin rolünün araştırılması. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalı, Uzmanlık tezi, Diyarbakır 2011.
66. Buğrul F. Süt çocukluğu dönemindeki bebeklerin annelerine verilen D vitamininin çocuklardaki D vitamini düzeyine etkisi. İstanbul Üniversitesi Çocuk sağlığı Enstitüsü, Uzmanlık tezi, İstanbul 2011.
67. Yumrutepe T. Evre 1-3 koah hastalarında D vitamini düzeyi ile solunum fonksiyonları, fiziksel performans ve denge arasındaki ilişki. İnönü Üniversitesi Tıp fakültesi, Uzmanlık tezi, Malatya 2011.
68. Kurt A. Üreme çağındaki obez kadınlarda vitamin D düzeyi ve metabolik sendrom ilişkisi. Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Mersin 2011.

69. Demir S. Türk populasyonunda vitamin D reseptör gen polimorfizmleri ile prostat kanseri arasındaki ilişki. Eskişehir Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Genetik Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Eskişehir 2005.
70. Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr.* 2008;87(4):1087S–91S.
71. Wang TJ, Zhang F, Richards JB, Kestenbaum B, van Meurs JB, Berry D, et al. Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study. *Lancet.* 2010;376(9736):180–8.
72. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(7):3152–7.
73. Higashi T, Awada D, Shimada K. Simultaneous determination of 25-hydroxyvitamin D2 and 25-hydroxyvitamin D3 in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry employing derivatization with a Cookson-type reagent. *Biol Pharm Bull.* 2001;24(7):738–43.
74. 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.
75. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem.* 2011;57(3):441–8.
76. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(5):1942–8.
77. van den Ouweland JM, Beijers AM, Demacker PN, van Daal H. Measurement of 25-OH-vitamin D in human serum using liquid chromatography tandem-mass spectrometry with comparison to radioimmunoassay and automated immunoassay. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci.* 2010;878(15–16):1163–8.
78. Farrell C-JL, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-Art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clin Chem.* 2012;58(3):531–42

79. Couchman L, Benton CM, Moniz CF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the devil is in the detail. *Clin Chim Acta*. 2012;413(15–16):1239–43.
80. van den Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S. Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013; 14:159–184.
81. Knox S, Harris J, Calton L, Wallace AM. A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D3 and D2 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 3):226–30.
82. Higashi T, Shimada K, Toyo'oka T. Advances in determination of vitamin D related compounds in biological samples using liquid chromatography-mass spectrometry: a review. [Review]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*. 2010;878(20):1654–61.
83. Strathmann FG, Laha TJ, Hoofnagle AN. Quantification of 1 α ,25-dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57(9):1279–85.
84. Thienpont LM, Stepan HCM, Vesper HW. Standardization of measurements of 25-Hydroxyvitamin D3 and D2. *Scand J Clin Lab Invest*. 2012; 72:41–9.
85. Vieth R. The pharmacology of vitamin D. In: Feldman D, Pike JW, Adams JS, editors. *Vitamin D*. 3rd ed., Vol. Volume I. Academic Press, London, UK; 2011. pp. 1041–1066.
86. Robinson PD, Högl W, Craig ME, Verge CF, Walker JL, Piper AC, et al. The re-emerging burden of rickets: a decade of experience from Sydney. *Arch Dis Child*. 2006;91(7):564–8.
87. Kissmeyer A-M, Sonne K. Sensitive analysis of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2001;935(1–2):93–103.
88. Casetta B, Jans I, Billen J, Vanderschueren D, Bouillon R. Development of a method for the quantification of 1 α ,25(OH)₂-vitamin D3 in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Eur J Mass Spectrom* (Chichester, Eng). 2010;16(1):81–9.
89. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and

ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem.* 2008;391(5):1917–30.

90. Wang Z, Senn T, Kalhorn T, Zheng XE, Zheng S, Davis CL, et al. Simultaneous measurement of plasma vitamin D(3) metabolites, including 4beta,25-dihydroxyvitamin D(3), using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem.* 2011;418(1):126–33.
91. Duan X, Weinstock-Guttman B, Wang H, Bang E, Li J, Ramanathan M, et al. Ultrasensitive quantification of serum vitamin D metabolites using selective solid-phase extraction coupled to microflow liquid chromatography and isotopedilution mass spectrometry. *Anal Chem.* 2010;82(6):2488–97.
92. Ding S, Schoenmakers I, Jones K, Koulman A, Prentice A, Volmer DA. Quantitative determination of vitamin D metabolites in plasma using UHPLC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem.* 2010;398(2):779–89.
93. [Hedman CJ](#), [Wiebe DA](#), [Dey S](#), [Plath J](#), [Kemnitz JW](#), [Ziegler TE](#). Development of a sensitive LC/MS/MS method for vitamin D metabolites: 1,25 Dihydroxyvitamin D2&3 measurement using a novel derivatization agent. [J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.](#) 2014; 953-954:62-67.
94. Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, et al. C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers. *J Biol Chem.* 2004;279(16):15897–907.
95. Brown AJ, Ritter C, Slatopolsky E, Muralidharan KR, Okamura WH, Reddy GS. 1 α ,25-Dihydroxy-3-Epi-vitamin D3, a natural metabolite of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, is a potent suppressor of parathyroid hormone secretion. *J Cell Biochem.* 1999; 73(1):106–13.
96. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab.* 2006;91(8):3055–61.
97. Stepman HC, Vanderroost A, Stockl D, Thienpont LM. Full-scan mass spectral evidence for 3-epi-25-hydroxyvitamin D in serum of infants and adults. *Clin Chem Lab Med.* 2011;49(2):253–6.

98. Higashi T, Awada D, Shimada K. Determination of 24,25-dihydroxyvitamin D(3) in human plasma using liquid chromatography-mass spectrometry after derivatization with a Cookson-type reagent. *Biomed Chromatogr.* 2001;15(2):133–40.
99. Bouillon R, Okamura WH, Norman AW. Structure-function relationships in the vitamin D endocrine system. *Endocr Rev.* 1995;16(2):200–57.
100. Brown AJ, Slatopolsky E. Vitamin D analogs: therapeutic applications and mechanisms for selectivity. *Mol Asp Med.* 2008;29(6):433–52.
101. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012; 243:32–40.
102. Akpolat T, Utaş C, Süleymanlar G. *Nefroloji El Kitabı*, İstanbul Nobel Tıp Kitabevleri Ltd Şti 1996; 1-5.
103. Şıkgenç M. Renal Transplant alıcılarında kalsitriolün postrenal transplant dönemde kemik dansitometresi ve biyokimyasal parametreler üzerindeki etkileri. Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Uzmanlık Tezi, Adana 2011.
104. Zittermann A. Vitamin D in preventive medicine: Are we ignoring the evidence? *Br J Nutr* 2003; 89: 552–572.
105. Bienaimé F, Girard D, Anglicheau D, et al. Vitamin D status and outcomes after renal transplantation. *J Am Soc Nephrol.* 2013; 24(5):831– 841.
106. 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: 1226-1237.
107. Moe SM, Drüeke TB, Block GA, Cannata-Andía JB, Elder GJ, Fukagawa M, Jorgetti V, Ketteler M, Langman CB, Levin A, MacLeod AM, McCann L, McCullough PA, Ott SM, Wang AY, Weisinger JR, Wheeler DC, Persson R, Earley A, Moorthi R, Uhlig K: KDIGO clinical practice guideline for the

diagnosis, evaluation, prevention and treatment of Chronic Kidney Disease-Mineral and Bone Disorder (CKD-MBD). *Kidney Int Suppl* 2009; 113: 1-130.

108. National Kidney Foundation/KDOQI clinical practice guidelines. Guideline 16 in bone metabolism and disease in chronic kidney disease. *Am J Kidney Dis* 2003; 42(4 Suppl 3): S1–S201.
109. Torres A, Machado M, Concepcion MT, et al. Influence of vitamin D receptor genotype on bone mass changes after renal transplantation. *Kidney Int.* 1996; 50: 1726.
110. Torregrosa JV, Campistol JM, Montesinos M, Pons F, Martinez de Osaba MJ. Evolution of bone mineral density after renal transplantation: related factors. *Nephrol Dial Transplant* 1995; 10(Suppl. 6): 111.
111. Heaf J, Tvedegaard E, Kanstrup IL, Fogh-Andersen N. Hyperparathyroidism and long-term bone loss after renal transplantation. *Clin Transplant* 2003; 17: 268.
112. Keyzer CA, Riphagen IJ, Joosten MM, Navis G, Muller Kobold AC, Kema IP, Bakker S, de Borst MH et al. Associations of 25(OH) and 1,25(OH)₂ Vitamin D With Long-Term Outcomes in Stable Renal Transplant Recipients. *J Clin Endocrinol Metab* 2015; 100(1):81– 89.

ÖZGEÇMİŞ

Bilge KARATOY ERDEM, 11.06.1985 yılında Antalya'da doğdu. İlkokulu Namık Kemal İlköğretim Okulu'nda okudu. Ortaokul ve lise öğrenimini gördüğü Antalya Anadolu Lisesi'nden 2003 yılında mezun oldu. Lisans eğitimini 2008 yılında Gazi Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü'nde tamamladı. 2012 yılında Akdeniz Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans eğitimine başladı. Yabancı dili İngilizcedir. Evli ve bir çocuk annesidir.