



**T.C.
SAĞLIK BİLİMLERİ ÜNİVERSİTESİ
GÜLHANE SAĞLIK BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ**

**YAĞDA ZNEN VİTAMİNLERİN YÜKSEK
PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE
SPEKTROMETRİSİ METODU İLE EŞ ZAMANLI TAYİN
METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE OPTİMİZASYONU**

Meryem Sebla ERTUĞRUL

Tez DanıŐmanı: Prof. Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ

**TİBBİ BİYOKİMYA
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

Ankara/2019

TEZ KABUL ONAYI

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Tıbbi Biyokimya Ana Bilim Dalında/Programında Meryem Sebla ERTUĞRUL tarafından
hazırlanan

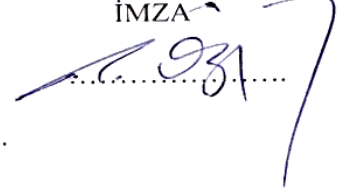
“Yağda Çözünen Vitaminlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle
Spektrometrisi Metodu ile Eş Zamanlı Tayin Metodunun Geliştirilmesi ve Optimizasyonu”
Başlıklı tez çalışması aşağıdaki jüri tarafından OY BİRLİĞİ / OY ÇOKLUĞU ile YÜKSEK
LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Danışman/Başkan Prof. Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ

SBU Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İMZA

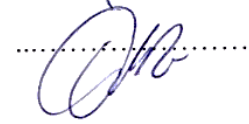


Üye: Prof. Dr. Özlem GÜLBAHAR

Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İMZA

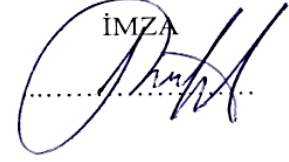


Üye: Doç. Dr. Erdim SERTOĞLU

SBU Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İMZA




Üye: Prof. Dr. Özlem YAVUZ

SBU Gülhane Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İMZA

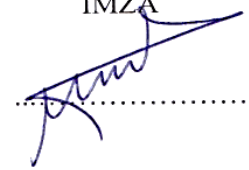


Üye: Doç. Dr. Nilüfer BAYRAKTAR

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Bu tezin Yüksek Lisans Tezi olduğunu onaylıyorum/onaylamıyorum.

İMZA



Tez Savunma Sınavı Tarihi: 15/03/2019
Jüri üyeleri tarafından YÜKSEK LİSANS/DOKTORA tezi olarak uygun görülmüş olan bu
tez Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararı
ile onaylanmıştır

Gülhane/Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

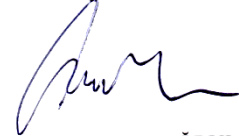
Prof. Dr. Ömer AZAL
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü



BEYAN

Sağlık Bilimleri Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmasında;

- Mevcut tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu,
- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- Tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
- Mevcut tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını,
- Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı, bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.



Meryem Sebla ERTUĞRUL

15.03.2019

YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRİSİ METODU İLE EŞ ZAMANLI TAYİN METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE OPTİMİZASYONU

ÖZET

Amaç: Yağda çözünen vitaminler (A, D, E ve K) izopren türevi apolar moleküllerdir. Enzim aktivitesinde koenzim olarak (biyokatalizör) görev alırlar. Metabolizmayı düzenlerler, karbonhidrat, yağ ve proteinlerin enerjiye dönüşümüne yardım ederler. Vücut yapılarına katılmazlar. Yerleri başka maddelerle doldurulamaz. Eksik ya da yüksek seviyelerine bağlı bazı hastalıklar ve semptomlar gözlemlenebilir. Bu nedenle, yağda çözünen vitamin seviyelerinin ölçümleri önemlidir. Bu tez çalışmasında, yağda çözünen vitaminlerin eş zamanlı analizine imkân sağlayan, hassas ve seçici bir LC-MS/MS metodunun geliştirilmesi ve valide edilmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Serum örnekleri metanol ile deproteinize edildi ve analitlerin kromatografik ayırımı LC-MS/MS sistemi (Agilent Technologies 6420 TripleQuadrupole LC-MS), Agilent Pursuit PFP kolon (100mm×3,0mm; 3,0 µm), gradient modunda Mobil faz A (H₂O+%0,1 formik asit) ve Mobil faz B (Metanol+%0,1 formik asit) kullanılarak gerçekleştirildi. İyon taraması MRM (multiple reaksiyon izleme) modunda, ESI iyon kaynağında pozitif iyon seçiciliği ile yapıldı.

Bulgular: Vitaminlerin alıkonma süreleri vitamin 25-OHD₃ için 7,52 dakika, vitamin A için 7,56 dakika ve vitamin E için 9,65 dakikadır. Metot vitamin A, vitamin E ve 25-OHD₃ için sırasıyla 3,0-90,0 µg/dL, 3,0-90,0 µg/mL ve 5,0-150,0 ng/mL arasında lineerdir. Gün içi CV% değerleri vitamin A, vitamin E ve 25-OHD₃ için sırasıyla %9,38, %10,23 ve %3,27; günler arası CV% değerleri sırasıyla %3,69, %6,19 ve %4,11'dir. Tespit sınırı ve tayin sınırına S/N oranı ile karar verildi. LOD ve LOQ sırasıyla S/N ≥ 3 ve S/N ≥ 10'dur.

Sonuç: Bu çalışmada, yağda çözünen vitaminlerin seviyelerini 13 dakikada analiz edebilecek bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu metot, düşük hassasiyete sahip immünoassay yöntemleri ve eş zamanlı analize olanak sağlayamayan HPLC yöntemlerine

göre çok daha kısa sürede ve birlikte tespitine imkân sağlayabilecek güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilmiştir.

Anahtar Kelimeler: LC-MS/MS, Metot Geliştirme, Validasyon, Yağda Çözünen Vitaminler



DEVELOPMENT AND OPTIMIZATION OF SIMULTANEOUS DETERMINATION OF FAT SOLUBLE VITAMINS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY TANDEM MASS SPECTROMETRY

ABSTRACT

Objective: Fat-soluble vitamins (A, D, E and K) are isoprene derived apolar molecules. For absorption of vitamins, the fat absorption metabolism must be functioning properly. Steatorrhea and biliary obstruction, such as fat absorption is impaired in cases where fat-soluble vitamins cause malabsorption. Deficiencies have been associated with various diseases such as Type 2 Diabetes and cancer. In addition, taking high doses of Vitamin A and vitamin D can cause toxic effects. Therefore, in this thesis study, it is aimed to develop and validate a sensitive and specific LC-MS / MS method that allows simultaneous analysis of fat-soluble vitamins.

Materials and Methods: Serum samples were deproteinized with methanol and chromatographic separation of analytes were performed by LC-MS/MS system (Agilent Technologies 6420 Triple Quadrupole LC-MS), Agilent Pursuit PFP column (100mm×3,0mm; 3,0 μ m), in gradient mode using Mobile phase A (H₂O+0,1% formic acid) and Mobile phase B (Methanol+0,1% formic acid). Ion scan was performed in MRM (multiple reaction monitoring) mode with positive ion selectivity in ESI ion source.

Results: The retention times of the vitamins are 25-OHD₃ 7,52 min, Vitamin A 7,56 min and Vitamin E 9,65 min. The method is linear between 3,0-90,0 μ g /dL, 3,0-90,0 μ g/mL and 5,0-150,0 ng/ml for Vitamin A, Vitamin E and 25-OHD₃; respectively. Intra-day CV% values for Vitamin A, Vitamin E and 25-OHD₃ are; 9,38%, 10,23% and 3,27% and inter-day CV% values are; 3,79%, 4,19% and 4,11%. The limit of determination and the limit of quantitation were determined by the S/N ratio. The LOD and LOQ are $S/N \geq 3$ and $S/N \geq 10$ respectively.

Conclusion: In this study, a LC-MS/MS method that can analyze fat soluble vitamins in 13 minutes was developed and validated. This method will be useful for clinical purposes by replacing low sensitivity immunoassay methods and HPLC methods that can not allow

simultaneous analysis.

Keywords: LC-MS/MS, Method Development, Validation, Fat-Soluble Vitamins



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim süresince hiçbir konuda benden yardımını esirgemeyen, desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım ve değerli hocam, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı başkanı Prof. Dr. Taner ÖZGÜRTAŞ'a şükran ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimimde ve tez çalışmamın her aşamasında bilgi ve deneyimlerinden yararlandığım, kendisinden çok şey öğrendiğim değerli hocam Doç. Dr. Erdim SERTOĞLU'na şükran ve saygılarımı sunarım.

Yüksek lisans eğitimime katkılarından dolayı değerli hocam Prof. Dr. Özlem YAVUZ'a yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

Çalışmalarım sırasında yardımlarını esirgemeyen tüm Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı personeline ilgilerinden dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmam süresince bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım, desteğini her zaman hissettiğim babam Prof. Dr. Özcan UZUN'a, hayatım boyunca hiçbir fedakârlıktan kaçınmayan beni bugünlere getiren annem Nuran UZUN'a, kardeşim Eymen'e ve hep yanımda olan sevgili eşim Eren'e sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

Meryem Sebla ERTUĞRUL

Mart/2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
TEŞEKKÜR	viii
İÇİNDEKİLER	ix
ÇİZELGELER LİSTESİ	xi
ŞEKİL LİSTESİ	xii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xiii
1.GİRİŞ VE AMAÇ	1
2.GENEL BİLGİLER	3
2.1.YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLER	3
2.1.1. A Vitamini	3
2.1.2. D Vitamini	11
2.1.3. E Vitamini	18
2.2.YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN BİRBİRİYLE ETKİLEŞİMLERİ	23
2.3. YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN KAN DÜZEYİNİN KANTİTASYONU	24
2.4. YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER	27
2.4.1. Likit Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)	28
3.GEREÇ VE YÖNTEMLER	31
3.1.KULLANILAN KİMYASAL MADDELER	31
3.2.KULLANILAN ALET VE CİHAZLAR	31
3.3.LİKİT KROMATOĞRAFI İÇİN KULLANILACAK ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI	32
3.4.ÇALIŞMA İÇİN GEREKLİ KİMYASAL VE REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI	33
3.5.ÇALIŞMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI	35

3.6.HPLC ŞARTLARI	35
3.7.MS/MS ŞARTLARI	36
3.8.İSTATİSTİKSEL ANALİZİ	37
4.BULGULAR	38
4.1.KROMATOGRAMLAR	38
4.2.KALİBRASYON EĞRİLERİ	40
4.3.METOD VALİDASYONU	42
5.TARTIŞMA	47
6.SONUÇLAR	51
7.KAYNAKLAR	52
8. ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ	60

ÇİZELGELER LİSTESİ

Tablo 2.1. A vitamini için yaş gruplarına göre tahmini ortalama gereksinim ve güvenli alım seviyesi	6
Tablo 2.2. D vitamini için yaş gruplarına göre tahmini günlük ortalama gereksinim miktarları	13
Tablo 3.1. In-house kalibratör konsantrasyonları	35
Tablo 3.2.1. Optimum HPLC şartları	36
Tablo 3.2.2. Optimum HPLC şartları, akış gradienti	36
Tablo 3.3. Optimum MS/MS şartları	37
Tablo 3.4. MS/MS taramasında her analit ve internal standart için MRM geçişleri, CE ve RT değerleri	37
Tablo 4.1. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OH D ₃ 'e ait gün içi kesinlik verileri	42
Tablo 4.2. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OH D ₃ 'e ait günler arası kesinlik verileri	43
Tablo 4.3. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OHD ₃ için hesaplanmış bias değerleri	43
Tablo 4.4. Doğrusallık çalışmasının sonuçları	44
Tablo 4.5. Geri kazanım çalışması sonuçları	46

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 2.1. A vitamininin formları	4
Şekil-2.2. A vitamini metabolizması	8
Şekil 2.3. D vitamini metabolitlerinin kimyasal şekilleri	12
Şekil 2.4. Vitamin D metabolizması	15
Şekil 2.5. γ -Tokoferol ve α -Tokoferolun kimyasal şekilleri	19
Şekil 2.6. E vitamini metabolizması	21
Şekil 2.7. LC-MS/MS sisteminin şematik gösterimi	30
Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazı	32
Şekil 4.1. Vitamin A kromatogram örneği	38
Şekil 4.2. Vitamin E kromatogram örneği	39
Şekil 4.3. 25-OHD ₃ kromatogram örneği	39
Şekil 4.4. 25-OHD ₆ kromatogram örneği	39
Şekil 4.5. Vitamin A kalibrasyon eğrisi	40
Şekil 4.6. Vitamin E kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 4.7. 25-OHD ₃ kalibrasyon eğrisi	41
Şekil 4.8. Vitamin A doğrusallık grafiği	44
Şekil 4.9. Vitamin E doğrusallık grafiği	45
Şekil 4.10. 25-OHD ₃ doğrusallık grafiği	45

SİMGELER VE KISALTMALAR

1,25-dihidroksivitamin D	1,25- (OH) ₂ D
24,25- (OH) ₂D	24, 25-dihidroksivitamin
25-OHD₃	25-hidroksivitamin D ₃
25-OHD₆	25-hidroksivitamin D ₆ (D vitamini internal standartı)
Açıl-KoA	Açıl Koenzim A
AIDS	Acquired Immuno Deficiency Syndrome (Edinilmiş Yetersiz Bağışıklık Sistemi Sendromu)
ARAT	Açıl KoA: Retinol Açiltrensferaz
BB-REH	Brush-border Retinil Ester Hidrolaz
BCMO	β-Karoten 15,15' Monooksijenaz
C18	Karbon Oktadekasilan
CE	Collision Energy (Çarpışma Enerjisi)
CRABP-1	Sellüler Retinoik Asit Bağlayıcı Protein Tip-1
CRABP-2	Sellüler Retinoik Asit Bağlayıcı Protein Tip-2
CRALBP	Sellüler Retinal Bağlayıcı Protein
CRBP-1	Sellüler Retinol Bağlayıcı Protein Tip-1
CRBP-2	Sellüler Retinol Bağlayıcı Protein Tip-2.
CV	Varyasyon Katsayısı
CYP24A1	25-OHD-24-hidroksilaz
CYP27B1	25-hidroksivitamin D-1α-hidroksilaz
DBP	D Vitamini Bağlayıcı Protein
DNA	Deoksiribo Nükleik Asit
ESI	Elektron Sprey İyonizasyonu
HIV	Human Immunodeficiency Virus (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

IL-1	İnterlökin- 1
IL-6	İnterlökin- 6
IL-8	İnterlökin- 8
IS	Internal Standart
IU	Uluslararası Birim
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry (Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği)
LC	Sıvı Kromatografi
LC-MS/MS	Likit Kromatografi Kütle Spektrometresi
LDL	Düşük Dansiteli Lipoprotein
LOD	Limit of Detection (Tespit Limiti)
LOQ	Limit of Quantitation (Tayin Limiti)
LRAT	Lesitin:Retinol Açıl Transferaz
m/z	Kütle/Yük oranı
MRM	Multiple Reaction Monitoring (Multiple Reaksiyon Takibi)
MS	Kütle Dedektörü
NO₂	Nitrojen Dioksit
PFP	Pentafloro Fenil
PP	Protein Presipitasyonu
PTH	Paratiroid Hormonu
RALDH	Retinal Dehidrogenaz
RALR	Retinal Redüktaz
RBP	Retinol Bağlayıcı Protein
RDH	Retinol Ddehidrogenaz
REH	Retinil Ester Hidrolaz
RMP	Referans Ölçüm Prosedürü
ROS	Reaktif Oksijen Türleri
RT	Retention Time (Alıkonma Zamanı)
RXR	Retinoid X Reseptörü
S/N	Signal/Noise Ratio (Sinyal /Gürültü Oranı)
TNF-α	Tümör Nekroz Faktör Alfa
TTR	Tirozin Bağlayıcı Protein Transtretin

UV	Ultraviyole
VDR- D	Vitamini Reseptörü
VLDL	Çok Düşük Dansiteli Lipoprotein
YÇV	Yağda Çözünen Vitaminler
α-TTP	α -tokoferol Transfer Proteini



1.GİRİŞ VE AMAÇ

Vitaminler, organizmanın gelişimi ve devamlılığı için küçük miktarlarda alınması zorunlu olan organik maddelerdir. Enzim aktivitesinde koenzim olarak (biyokatalizör) görev alırlar. Metabolizmayı düzenlerler, karbonhidrat, yağ ve proteinlerin enerjiye dönüşümüne yardım ederler. Vücut yapılarına katılmazlar. Yerleri başka maddelerle doldurulamaz. Vitamin eksikliklerine ya da yüksek seviyelerine bağlı bazı hastalıklar ve semptomlar gözlemlenebilir. Bu hastalıklar ve semptomların tedavisi ancak spesifik vitamin takviyesiyle mümkündür (1).

Vitaminlerin keşfi 20. yüzyıla dayanır. 1906 yılında, ilk kez İngiliz Biyokimyacı Sir Frederick Hopkins gıdaların protein, karbonhidrat, yağ, mineral ve suya ek olarak bazı faktörler içerdiğini keşfetmiştir. Vitamin kavramı ise ilk kez Funk tarafından ortaya atılmıştır. Funk, pirinç kabuğundaki anti-beriberi maddesinin, nitrojen içeren bileşik olan amin olduğunu göstermiştir. Aminin azotlu bir bileşik olması sebebiyle bu maddeye hayat veren azotlu madde anlamına gelen 'vitamine' adını verdi. 1912 yılında Hopkins ve Funk vitaminlerin eksikliğine bağlı olarak beriberi ve iskorbit gibi hastalıkların ortaya çıktığına dair hipotezlerini ortaya atmıştır. 1920'de Drummond 'vitamine' kelimesinin sonundaki 'e' harfinin atılmasını önermiş ve sonuç olarak bu organik madde vitamin olarak adlandırılmaya başlanmıştır. Daha sonra farklı vitaminlerin farklı kimyasal özellikleri olduğu ve fazla alınması durumunda zararlı etkilerinin oluşabileceği keşfedilmiştir (1).

Vitaminler organizma için oldukça önemli maddelerdir. Birçok organizma (bitki ve mikroorganizmalar) vitamin sentezi yapabilir, ancak D, K ve biotin vitamini dışındakiler insan vücudunda sentezlenemezler. D vitaminin sentezi sterollerin UV ışığını absorplaması ile olur. Dolayısıyla insanlar bu vitaminleri diyet yoluyla bitkisel ve hayvansal takviyelerle alırlar. Hücrelerin metabolik reaksiyonlarında katalitik bir rol oynamaları, koenzim veya enzim sistemlerinin bir parçası olarak hareket etmeleri için vitaminlerin küçük miktarlarda alınması yeterlidir. A ve D gibi bazı vitaminler hücre içi reseptörlere bağlanarak hormon gibi işlev gösterirler (2).

1915 yılında, McCollum ve Davis vitaminleri yağda çözünen ve suda çözünen olarak iki sınıfa ayırdılar. Vitamin C ve B kompleksi suda çözünen vitaminlerken; A, D, E ve K yağda çözünen vitaminlerdir (1,2).

Son çalışmalar, yağda çözünen vitaminlerin (özellikle A ve D vitamini) farklı klinik etkilerini ortaya koymuştur (2,3). Yağda çözünen vitaminlerin bağırsakta gerçekleşir. Bu vitaminlerin emilim ya da diğer sebeplere bağlı eksikliklerinde gece körlüğü (A vitamini), osteomalazi (D vitamini), oksidatif stres (E vitamini) ve hemoraji (K vitamini) gibi klinik bulgular gelişebilir (3). Ayrıca, eksiklikleri kanser, tip-2 diyabet, bazı bağışıklık sistemi bozuklukları gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (2,4). Buna bağlı olarak, laboratuvarlarda yağda çözünen vitaminlerin ölçümü için geliştirilecek yöntemlere yönelim oldukça artmıştır.

Günümüzde, yağda çözünen vitaminlerin tayini için en çok kullanılan yöntemler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve immünoassaydir. İmmünoassay sistemler, hızlı analiz süresi ve kolay kullanım özelliklerine sahip olmasına rağmen birçok otomatik immünoassay sisteminde doğruluk ve prezisyon ile ilgili problemler olduğu bildirilmiştir. HPLC, yağda çözünen vitaminlerin ölçümü yapılabilir, fakat aynı anda elüe olan vitaminleri HPLC ile eş zamanlı ölçmek mümkün değildir (5). Bu durum hassasiyeti ve seçiciliği daha yüksek metotların araştırılması ve geliştirilmesine olan ihtiyacı doğurmuştur.

Bu çalışmanın amacı yağda çözünen vitaminleri eş zamanlı ölçebilecek bir LC-MS/MS metodunun geliştirilmesi ve valide edilmesidir.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLER

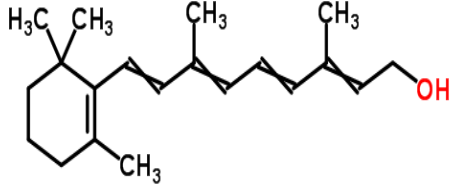
Vitaminler, sağlıklı beslenme için küçük miktarlarda alınmaları zorunlu olan, herhangi birinin eksikliği spesifik bir bozukluk ve hastalık meydana getiren organik maddelerdir (1). Bilinen on üç vitamin, su ve yağdaki çözünürlüklerine göre iki sınıfa ayrılır. Yağda çözünen vitaminler A, D, E ve K vitaminleridir ve emilimleri bağırsakta gerçekleşir (1-3).

Son çalışmalar yağda çözünen vitaminlerin (özellikle A ve D vitamini) farklı etkilerini ortaya koymuştur. Bu vitaminlerin beslenme ya da emilim bozukluklarına bağlı eksikliklerinde gece körlüğü (A vitamini), osteomalazi (D vitamini), oksidatif stres (E vitamini) ve hemoraji (K vitamini) gibi klinik bulgulara rastlanır. Ayrıca, bu vitaminlerin eksiklikleri kanser, tip-2 diyabet, bazı bağışıklık sistemi bozuklukları gibi birçok hastalıkla ilişkilendirilmiştir (2,4). Bu sebeplerle laboratuvarlarda yağda çözünen vitaminlerin ölçümü için geliştirilecek yöntemlere yönelim de oldukça artmıştır.

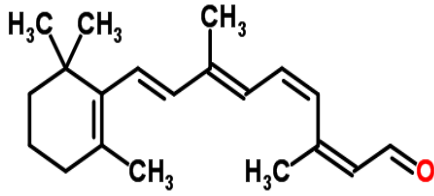
2.1.1. A Vitamini

A vitamini kavramı 1915 yılında Mc Collum ve Davis tarafından ortaya atılmış ve ilk kez 1931 yılında, ratlardan izole edilmiştir. A vitaminin biyolojik ve IUPAC adı alkol formundaki retinoldür. Aldehit formuna retinal, asit formuna ise retinoik asit adı verilir. Retinol, retinal ve retinoik asit A vitaminin aktif formuyken, retinil palmitat karaciğerde depo edilen formudur (6). Üç aktif formun her biri farklı biyolojik etkiye sahiptir. Bu formlar; all-trans retinol, ana depo formu olan uzun zincirli yağ açıl esteri retinol ve retinadaki aktif formu olan retinaldır (7). Retinolun prekürsörü veya provitamini, havuçta bol miktarda bulunan β -karotendir (8). β -karotenin A vitaminine dönüşümü, bağırsak mukozasında demir içeren oksijenaz ve alkol dehidrogenaz enzimleriyle katalizlenir (9). A vitamininin temel olarak, A₁ ve A₂ olmak üzere iki çeşidi vardır. Vitamin terimi A₁ formuyla ilişkilendirilir. A vitamini, canlı bir organizmanın sağlıklı gelişimi için küçük miktarlarda alınması

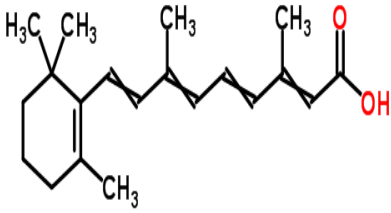
gereken organik bir bileşiktir. Yapısını beş konjuge çift bağ içeren β -iyonon halkası oluşturur (9).



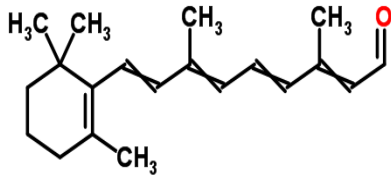
All-trans-Retinol



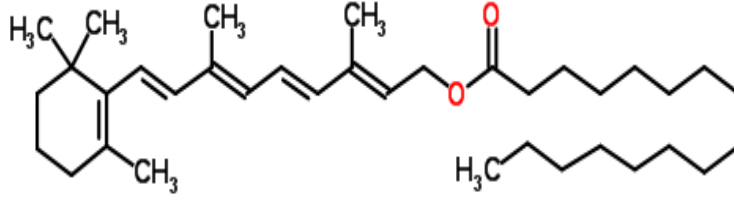
11-cis Retinal



Retinoik Asit



All-Trans Retinal



Retinal Palmitat

Şekil 2.1. A vitamininin formları

2.1.1.1 A Vitamininin Kaynakları:

β –karoten koyu yeşil yapraklı sebzeler, ıspanak, brokoli, havuç, lahana, kabak, tatlı patates, koyu portakal meyveleri, mango, kayısı, domates, papaya ve karpuz, amarant, kantalup gibi bitkilerde ve süt, tereyağı, peynir, krema, yumurta, morina karaciğeri yağı, böbrek gibi hayvansal besinlerde bulunur. Preformed A vitamini et, karaciğer, balık karaciğer yağları, yumurta sarısı ile kırmızı palmiye yağı (provitamin A açısından zengin), tahıl, çeşni ve katı yağ içeren işlenmiş gıdalar gibi besinlerde bulunur (10). Yaş gruplarına göre günlük A vitamini ihtiyacı Tablo 2.1’de gösterilmiştir (1).

Tablo 2.1. A vitamini için yaş gruplarına göre tahmini ortalama gereksinim ve güvenli alım seviyesi

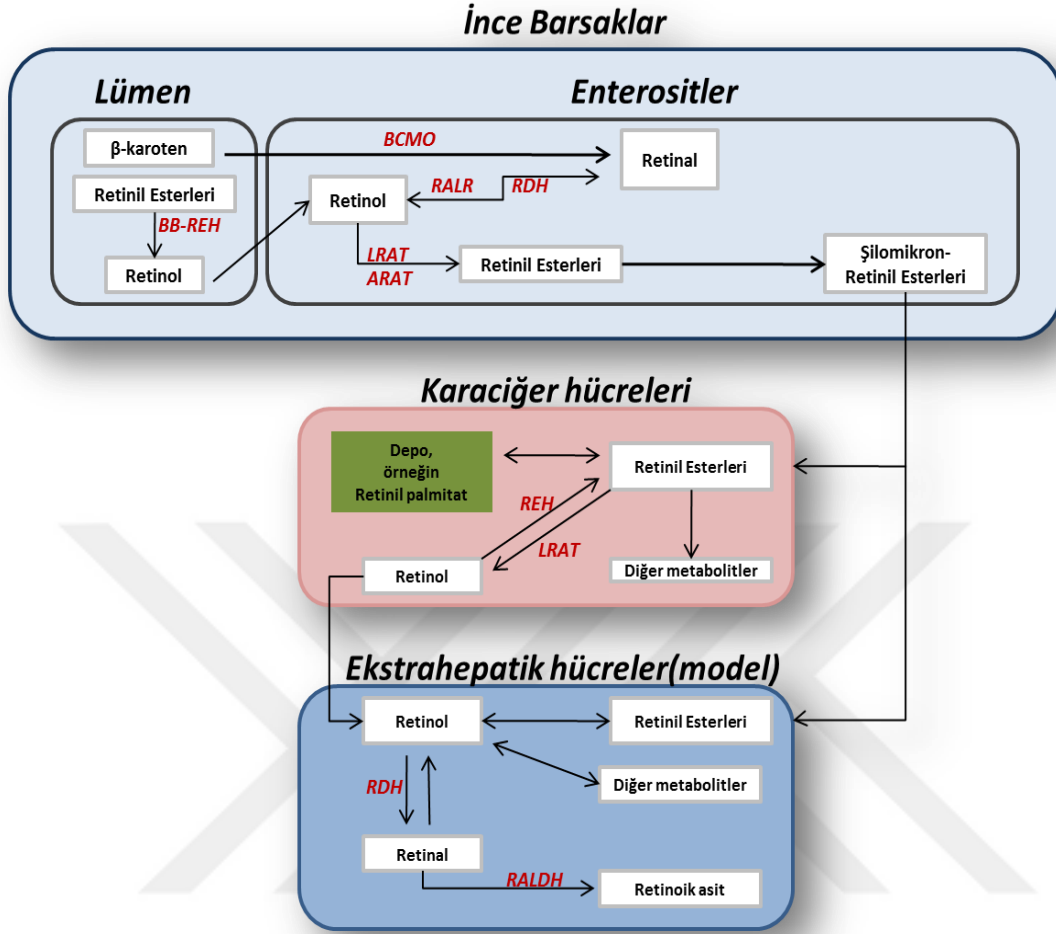
Yaş Grubu	Yaş	Ortalama gereksinimi (µg/gün)	Önerilen güvenli alım miktarı (µg/gün)
Bebekler ve çocuklar	0-6 ay	180	375
	6-12 ay	190	400
	1-3 yaş	200	400
	4-6 yaş	200	450
	7-9 yaş	250	500
Ergenler	10-18 yaş	330-400	600
Yetişkinler	19-65 yaş	270	500
	65 yaş +	300	600
Hamile kadınlar	-	370	800
Emziren kadınlar	-	450	850

2.1.1.2. A Vitaminin Metabolizması:

Bağırsak lümeninde retinal esterler, enterositler (ince bağırsak emici hücreler) tarafından alınmadan önce fırçamsı-kenarlı retinil ester hidrolaz enzimi varlığında retinol ve serbest yağ asitlerine hidrolize edilir (11). β -karoten, pasif difüzyonla enterositlere geçer ve ne kadarının absorbe edileceği diyetle alınan yağ miktarı ile ilişkilidir (12). Enterositlerde, β -karotenler 15,15'- monooksijenaz enzimi ile simetrik iki retinala parçalanır ve daha sonra retinal redüktaz enzim aktivitesiyle retinola dönüştürülür (13). Enterosit içindeki retinollerin çoğu retinoidlerden elde edilir. Karotenoidler ise lesitin: retinol açiltransferaz veya açil-KoA: retinol açiltransferaz enzimleri ile retinil esterlere esterifiye olurlar (14). Daha sonra retinil esterler şilomikronlar aracılığıyla lenfatik sisteme salgılanır (15). (Şekil 2.2) Az miktarda bulunan diyetel retinoidler retinoik asite çevrilir ve direkt olarak kan dolaşımına katılır (16).

Diyetsel retinoidin yaklaşık %70'i karaciğer, özellikle parankimal hücreler, tarafından alınır ve daha sonra hepatik stellat hücrelerinde retinil palmitat formunda depolanır (17). Parankimal hücrelerde retinil esterler retinal ester hidrolaz enzimi de dahil olmak üzere bir dizi enzim tarafından tekrar retinola hidrolize olur. Retinil esterler stellat hücrelerine taşınır ve burada tekrar esterifiye edilerek depolanır (17). Karaciğerden salınan retinol hücreler aracılığıyla farklı fizyolojik işlevleri için diğer formlarına (retinal ve retinoik asit gibi) metabolize edilebilir (18). (Şekil 2.2)

A vitaminin hidrofobik yapısı sebebiyle taşınması için özel taşıyıcılara ihtiyaç vardır. A vitaminin ekstrasellüler taşınması retinol bağlayıcı protein (RBP) ve tirozin bağlayıcı protein transtretin (TTR) aracılığıyla gerçekleşir. Retinol-RBP-TTR kompleksi A vitaminin hidrofobik yapısı sebebiyle taşınmasına yardımcı olmasının yanı sıra taşınma sırasında oksidasyonu ve esterifikasyonunun önlenmesi açısından da oldukça önemlidir (19,20). İntrasellüler unesterifiye retinol, sellüler RBP Tip-1 (CRBP-1) ve sellüler RBP Tip-2 (CRBP-2) proteinlere bağlanarak taşınır. Diğer intrasellüler proteinlerden sellüler retinoik asit bağlayıcı protein (CRABP-1 ve CRABP-2) ve sellüler retinal bağlayıcı protein (CRALBP) retinal taşınmasında görevlidir (20).



Şekil 2.2. A vitamini metabolizması

A vitamini metabolizmasını gösteren genel bir şemadır. DiyetSEL Vitamin A (örn, Retinil esterler ve β -karoten) intestinal enterositler aracılığıyla farklı mekanizmalarla sindirilir ve absorbe edilir. Enterositlerde retinol re-esterifiye olarak retinil esterlere dönüştürülür ve şilomikronlar aracılığıyla lenfatik sisteme salgılanır. Lenfatiklerden kan dolaşımına geçip karaciğer hücrelerine (parankimal hücreler) gelen retinil esterler tekrar retinol formuna dönüştürülür. Buradan hedef hücrelere aktarılır veya karaciğerde depolanır. Vitamin A ekstrasellüler taşınmasında retinol bağlayıcı protein (RBP) ve tirozin bağlayıcı protein transtretine (TTR) bağlanarak taşınırken, intrasellüler retinol RBP ve CRBP'lere bağlanarak taşınır (20).

2.1.1.3. A Vitaminin Fonksiyonları:

HücreSEL farklılaşma için oldukça önemli olan retinoik asit, embriyo gelişimi ve gen ekspresyonunda önemli rol oynar. Retinoik asit epitel hücrelerin üretimi ve

fonksiyonunu yerine getirebilmesi için gerekli olmasının yanı sıra vücutta mukus formundaki hücrelerin eksternal kanallarının bütünlüğünü de sağlar (20).

Retinol, aldehit formu olan retinala yükseltgenir. Retinal, görme pigmenti rodopsinin gerekli ön maddesidir. Retinalda gözde kompleks hale gelerek opsin molekülüne dönüşür. Retinanın çomak hücre adı verilen fotoreseptör hücreleri ışığa ve harekete duyarlı yapıdadır. Koni hücreleri de parlak ışıkta görmeyi sağlayan yapılardır. Koni ve çomak hücreleri, yüksek miktarda rodopsin ve iodopsin içeren özel katmanlı disklere sahiptir. Foton bu komplekslere çarptığı zaman retinal 11-cis formundan All-trans formuna dönüşür. Bunlar impulsun optik sinire iletilmesini sağlayan yolakların başlangıç reaksiyonlarıdır. Bu moleküllere 'vizuel pigmentler' de denir. Fotoreseptör hücreleri ışığı algıladıktan sonra bir dizi reaksiyon sonucunda sinyalin beyine iletilmesin ve görüntünün oluşmasına yardımcı olurlar (21).

A vitaminin bir diğer önemli işlevi hormon gibi etki göstermesidir. Retinoik asit, retinoik asit reseptörlerine bağlanarak DNA'nın spesifik nükleotid zincirleri ile etkileşir. Bu etkileşim direkt olarak hücresel gelişim ve hayatsal olayları etkileyen gen ekspresyonu ve transkripsiyonuyla ilişkilidir. Örneğin, epitel hücrelerin bütünlüğünün korunması ve fonksiyonlarını gerçekleştirebilmesi için retinoik asit oldukça önemlidir. Ayrıca, kalp sağlığı, akciğer, göz ve kulak gelişiminde de retinoik asitin varlığına ihtiyaç duyulmaktadır (22). A vitamini glikoprotein sentezinde de rol oynamaktadır. Glikoprotein sentezi iletişim, tanıma, adezyon ve agregasyon gibi hücresel işlevler için önem teşkil etmektedir. Retinoidler cilt hastalıklarının akne ve cilt kanseri gibi hastalıkların tedavisinde de kullanılır. β -karotenin pro-oksidant etkisi yanında, A vitamini antioksidan olarak da kullanılır (20,22). A vitamininin hasarlı dokuların onarılmasına yardımcı olduğu bilinmektedir ve bu nedenle serbest radikal hasarına karşı kullanılması da yararlı olabilir (1,22).

2.1.1.4. A Vitamini Eksikliği:

A vitamini eksikliği vücutta iki şekilde karşımıza çıkabilir. Birincisi, diyete bağlı eksikliklerdir. İkincisi ise safra asiti ya da pankreatik enzimlerin eksikliklerine bağlı olarak oluşan malabsorpsiyon, protein malnutrisyonu, çinko eksikliği, karaciğer

sorunları ve abetaliproteinemi gibi emilim, depolama ve vitamininin taşınmasına bağlı ortaya çıkabilecek eksikliklerdir (22).

A vitamini bağışıklığın korunmasında önemli bir role sahiptir. A vitamini eksikliği cildin, solunum yollarının, gastrointestinal ve ürogenital kanalların epitel hücrelerinde kuruluğa ve keratinizasyona sebep olur. Tüm bu sistemler enfeksiyonlara karşı birincil koruma sistemleridir (19). Ayrıca, A vitamini eksikliği nötrofil gelişimini bozarak makrofajlardan salınan inflamatuvar sitokinleri artırır. Natürel killer hücrelerin sayısını ve onların litik aktivitesini azaltır. Bu bozulmalar ve değişiklikler vücudun enfeksiyöz ajanları ortadan kaldırma kabiliyetinde azalmaya neden olur (2). Sonuç olarak, A vitamini eksikliği yaygın görülen toplumların enfeksiyon prevalansı yüksek olabilir (22). Klasik olarak, A vitamini eksikliği gece körlüğü ve kseroftalmiyle ilişkilidir. Yapılan son çalışmalarla, bu eksiklik tekrarlayan enfeksiyonlar ve kanser dahil olmak üzere çeşitli sağlık sorunları ile ilişkilendirilmiştir (20,23). Dünya Sağlık Örgütü, düşük sosyoekonomik düzeye sahip topluluklarda yüksek prevalanslı A vitamini eksikliğinin ciddi bir halk sağlığı sorunu olduğunu düşünmektedir (23). Buna göre, dünya çapında okul öncesi çağıdaki çocukların yaklaşık yüzde ellisi ile gebe kadınlar risk grubunu oluşturmaktadır. Okul öncesi çağıdaki çocuklar ve gebe kadınlar arasında global vitamin A eksikliği (<0,7 µmol/L serum retinol konsantrasyonu) tahminleri, 1995 ve 2005 yılları arasında sırasıyla 190 milyon ve 19,1 milyon olarak tespit edilmiştir. A vitamini eksikliği olan hastaların çoğu, kronik yetersiz beslenmeye bağlı komplikasyonlardan muzdariptirler (23).

2.1.1.5. A Vitamini Toksikitesi:

Yüksek miktarda A vitamini tüketilmesi karaciğer hasarı, kemik anormallikleri, eklem ağrısı, alopesi, kusma ve cilt deskuamasyonu gibi toksik semptomlarla sonuçlanabilir. Hipervitaminoz A (deride dermatit-kuruma ve kızarıklık, uzun kemiklerin dekalsifikasyonu ve hassasiyeti, kilo kaybı, saç dökülmesi, karaciğer büyümesi, artmış kafa içi basıncına bağlı eklem ağrıları, sinirlilik), A vitamininin ve retinoidin anormal taşınması ve dağılımından kaynaklanmaktadır. Hipervitaminoz A'nın akut ve kronik olmak üzere iki tip vardır.

Akut hipervitaminoz A kısa bir sürede çok miktarda A vitamini tüketmekten; kronik hipervitaminoz A ise uzun bir süreç sonucunda vücutta A vitamini birikmesinden kaynaklanır. Akut hipervitaminoz bebeklerde fontanel kabarıklık, çocuklarda ve yetişkinlerde baş ağrısı ve kusma ile tüm yaş gruplarında sinirlilik gibi geçici semptomlara sebep olabilir. Kronik hipervitaminoz A durumunda, özellikle kemiklerin epifiz sonundaki kıkırdak büyümesinde yavaşlama olur ve epifiz yarığı erken kapanır. Osteoklast aktivitesinin kuvvetle uyarılmış olması sonucu olarak bütün iskelet sisteminde kendiliğinden kırılmaya eğilim göze çarpar (18,20).

2.1.2. D Vitamini

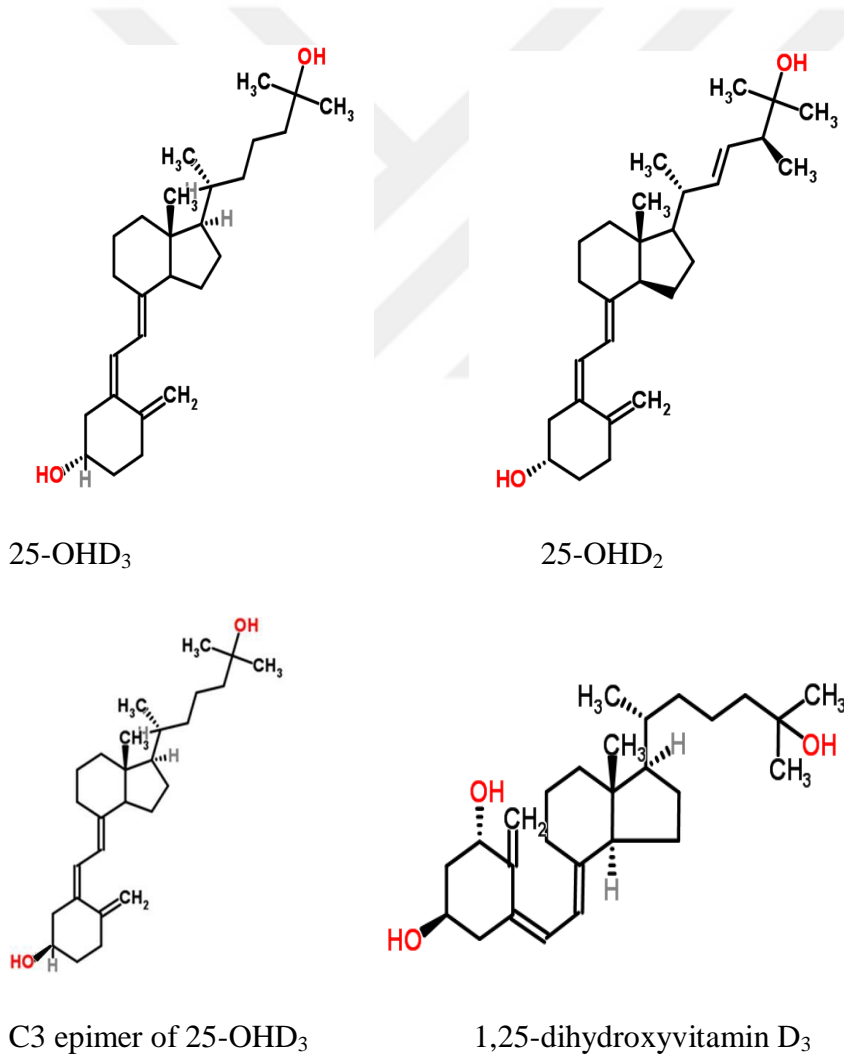
Vitamin D, mayada ve mantarlarda ergosterolden (provitamin D₂) UV ışık etkisiyle türemiş ergokalsiferol (Vitamin D₂) ile hayvanlarda deri altındaki yağ dokusunda 7-dehidrokolesterolden (provitamin D₃) UV ışık etkisiyle türemiş kolekalsiferolün (Vitamin D₃) ortak adıdır (1,2).

Vitamin D, renksiz ve kokusuz, suda çözünmemekle birlikte, lipitlerde ve organik çözücülerde çözünebilir özelliktedir. Ayrıca, ısıya ve havadaki oksijene karşı duyarlı değildir. Kimyasal yapısı steroid hormonlara benzediğinden ve bir dokuda sentezlenip hedef dokuya etki etmesi için dolaşıma salındığından, hormon olarak da sınıflandırılmaktadır (2,3,24). D vitamininin organizmada en çok bulunan formu 25-hidroksivitamin D (ve türevleri) iken, aktif formu 1,25-dihidroksivitamin D₃'tür (Şekil 2.3).

Tarihsel olarak, D vitamini çocuklarda raşitizm, erişkinlerde osteomalazi ile ilişkilidir (25). Kemik kırıkları ve çeşitli klinik bulgular da düşük Vitamin D seviyesi ile ilişkilendirilebilir (26,27). Son yirmi yılda, D vitamininin biyolojik rollerine odaklanan çok sayıda çalışma yapılmıştır (24,25,27). Kanda D vitamininin optimum seviyesi kemik, deri, kardiyovasküler ve immün sistemlerin genel sağlığı ile ilişkili bulunmuştur (3). Buna ek olarak, solunum yolu enfeksiyonları ve HIV hastalarında düşük D vitamini düzeyleri gözlenmiştir (28). Düşük D vitamini düzeyinin meme kanseri gelişimini de etkileyebileceği düşünülmektedir (29). D vitamininin aktif formu (1,25-(OH)₂D) ve vitamin D reseptörleri (VDR'ler) meme hücresi gelişimi ve farklılaşması üzerinde düzenleyici bir etkiye sahiptir (29,30). Ayrıca, 1,25-

(OH)₂D'nin meme kanseri hücresi apoptozu uyaran TNF- α ekspresyonunda rol oynadığı görülmüştür (31,32).

D vitamini eksikliği birçok ülkede halk sağlığı sorunu haline gelmiştir (33). Önceleri bu eksikliğin sadece güneşli iklime sahip olmayan ülkelerde yaygın olduğu düşünülse de, daha sonraki araştırmalar dünya genelinde olduğu hatta bazı ülkelerde ve bazı coğrafi bölgelerde daha yüksek prevalansla ortaya çıktığını göstermiştir. Örneğin, ülkemiz tüm yıl boyunca güneş gören bir kuşakta yer almasına rağmen, yapılan birçok araştırmada D vitamini eksikliği veya yetersizliği saptanmaktadır (34).



Şekil 2.3. D vitamini metabolitlerinin kimyasal şekilleri

2.1.2.1. D Vitamini Kaynakları:

Vitamin D genellikle doğal kaynaklardan alınır. Ekmek, kahvaltılık gevrek, margarin, süt, yoğurt gibi gıdalarla da takviye edilebilir. Morina karaciğeri yağı, kedi balığı, yılan balığı, uskumru, somon, sardalye, ton balığı ve mantarları doğal D vitamini kaynaklarıdır. Vitamin D₂, D vitamininin bitki kökenli formudur; ergot ve mayada bulunan ergosterolün UV ışığı ile etkileşmesi sonucu oluşur (35). Elde edilen ergosterol provitamin olarak adlandırılır. D₃ vitamini ise yalnızca hayvansal kaynaklardan, provitaminin UV ışığıyla etkileşmesi sonucu elde edilir. Yaş gruplarına göre günlük D vitamini ihtiyacı Tablo 2.2’de gösterilmiştir (1).

Tablo 2.2. D vitamini için yaş gruplarına göre tahmini günlük ortalama gereksinim miktarları

Yaş Grubu	Yaş	Ortalama Gereksinim (mg/gün)
	0-6 ay	5
	6-12 ay	5
Bebekler ve çocuklar	1-3 yıl	5
	4-6 yıl	5
	7-9 yıl	5
	10-18 yıl	5
Ergenler	10-18 yıl	5
Yetişkinler	19-50 yıl	5
Daha yaşlı yetişkinler	51-65 yıl	10
Yaşlı yetişkinler	65+ yıl	15
Hamile kadınlar	-	5
Emziren kadınlar	-	5

2.1.2.2. D Vitamini Metabolizması:

Vitamin D’nin ergokalsiferol (Vitamin D₂) ve kolekalsiferol (Vitamin D₃) olmak üzere iki ana formu bulunmaktadır (1,2). Vitamin D₂ UV ışığı ile etkileşmiş bitkisel kaynaklardan ya da diyetel takviyelerden elde edilir. Hayvansal gıdalardan

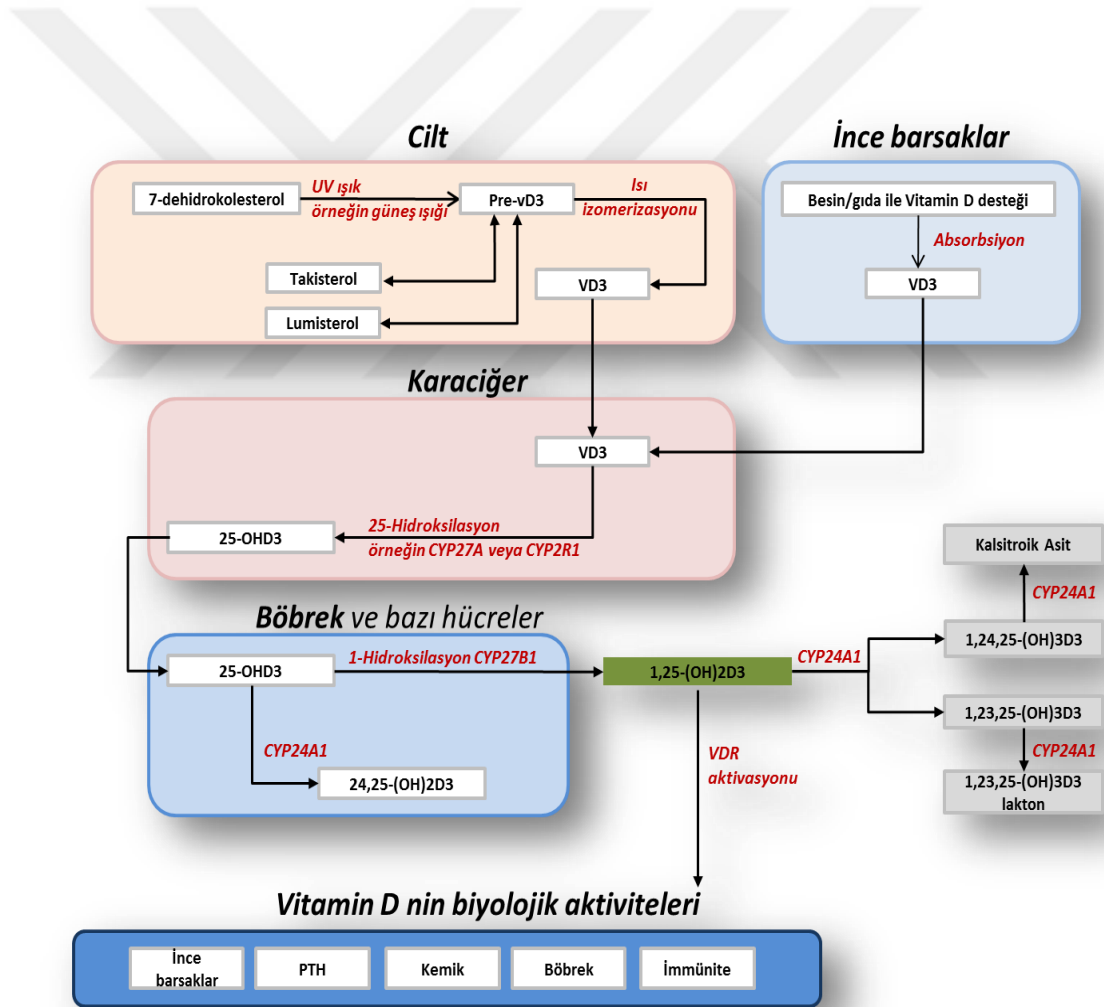
elde edilen D₃ vitamininin miktarı oldukça azdır. Bu vitaminin en büyük kaynağı güneş ışığına maruz kalma ile gerçekleştirilen endojen sentezdir (36). Endojen sentezi cilt rengi, güneş ışığına maruz kalınan periyod ve mevsime göre değişiklik gösterir (4,36,37). 7-dehidrokolesterol (provitamin D₃), ince bağırsakta diyetel kolesterolden mukozal dehidrojenaz enzimi varlığında oluşur (38). Derinin malpighi tabakasında pre-Vitamin D₃ oluşturmak için pro-Vitamin D₃'ün C9-C10 bağları, UV ışığın 280 ile 315 nm dalga boyları arasında endojen D vitamini sentezlemek için kırılır. Diyetel kaynakların aksine, UV ışığı ile elde edilen D vitamini toksisiteye sebep olmaz, çünkü pre-Vitamin D₃ ün fazlası lumisterol ve taşisterole dönüştürülür (39). Bu reversibl bir prosestir. Bu aşamadan sonra pre-Vitamin D₃, Vitamin D₃'e spontane bir şekilde izomerize olur (38,40).

D vitamini sentezlendikten sonra, D vitamini bağlayıcı proteine (DBP) bağlanarak kan dolaşımıyla karaciğere ulaşır (38-40). (Şekil 2.4) Karaciğerde D vitamini, kalsidiol olarak da bilinen 25-hidroksivitamin D'ye (25-OHD₃) bir dizi sitokrom P450 enzimi, özellikle CYP27A ve CYP2R1, tarafından metabolize edilir (40). 25-OH D₃ daha sonra tekrar hidrosillenmek üzere kan yoluyla böbreğe taşınır. Böbreklerdeki CYP27B1 (25-hidroksivitamin D-1 α -hidroksilaz) kalsitriolü, kalsitriol olarak da adlandırılan biyolojik aktif metabolit 1,25-dihidroksivitamin D'ye (1,25-(OH)₂D) dönüştürür (41). Ayrıca, CYP24A1 (25-OHD-24-hidroksilaz) enzim aktivitesi ile böbreklerde 24,25-dihidroksivitamin (24,25-(OH)₂D) oluşturulabilir (42). (Şekil 2.4)

1,25-(OH)₂D, vitamin D reseptörüne (VDR) bağlanarak birçok biyolojik yolakta görev alır (42). Kandaki konsantrasyonu 25-OH D₃'ye göre düşük olmasına rağmen, intestinal kalsiyum absorpsiyonu, hücre farklılaşması, insülin sekresyonu gibi metabolik olayları stimule eder. 1,25-(OH)₂D'nin VDR bağlanması bağırsak hücrelerinde ve osteoblastogeneizde kalsiyum emilimi için oldukça önemlidir (43). 1,25-(OH)₂D, preosteoklastların osteoklastlara maturasyonunu indükler. Bu da kanla kemik arasındaki kalsiyum ve fosfor dengesinin sağlanmasında rol oynar (41). Ayrıca, 1,25-(OH)₂D bazı hücrelerde VDR'ye bağlanarak, yolağın yukarı akışını sağlayarak protein sentezinin gen ekspresyonunu (osteokalsin ve 24-hidroksilaz); aşağı akışını sağlayarak inflamatuvar markerların (IL-2 ve IL-12 gibi) etkilerini

düzenler (42). 1,25-(OH)₂ D böbreklerde paratiroid hormonun (PTH) stimule olması ile sentezlenmesine rağmen, paratiroid bezinin hormonal üretiminin ve sekresyonunun azalmasına sebep olur (39,42).

1,25-(OH)₂ D'nin kandaki düzeyi arttığında, üretimini azaltmak ve 1,25-(OH)₂ D'yi inaktif formu olan kalsitroik asite dönüştürmek için negatif feedback ile CYP24A1 sentezini artırılır. Daha sonra suda çözünebilir kalsitroik asit safraya gelerek burada elimine edilir (41). Serum fosfor, kalsiyum ve fibroblast büyüme faktörü 23 gibi birçok faktörün böbreklerde 1,25-(OH)₂ D sentezi üzerinde negatif ve pozitif etkisi bulunmaktadır (44).



Şekil 2.4. Vitamin D metabolizması

Deride 7-dehidrokolesterol, güneş ultraviyole Beta ışınlarının etkisi ile pre-Vitamin D₃ dönüşür. Pre-Vitamin D₃ de Vitamin D₃ (VD₃)'e izomerize olur. Pre-vitamin D₃'ün fazlası

hipervitaminozu önlemek için lumisterol ve taşisterole dönüştürülür. VD_3 , karaciğerde sitokrom P450 enzimleri (örn, CYP27A ve CYP2R1) ile hidroksile edilir ve 25-hidroksivitamin D_3 ($25-OHD_3$)'e dönüştürülür. $25-OHD_3$, D_3 'ün inaktif şeklidir ve depolanma formudur. $25-OHD_3$ böbreklerde CYP27B1 aracılığıyla tekrar hidroksillenerek D_3 'ün aktif formu olan 1,25-dihidroksi vitamin D ($1,25-(OH)_2D$)'ye dönüştürür. D_3 'ün birçok biyolojik aktivitesi $1,25-(OH)_2D$ 'nin vitamin D reseptörlerine bağlanması ile sağlanır. $1,25-(OH)_2D_3$ düzeyi, kalsitrik asit ve $1,23,25-(OH)_3D_3$ gibi diğer metabolitlerine dönüşümüyle regüle edilebilir. Vitamin D_2 'de benzer şekilde metabolize olur (44,45).

2.1.2.3. D Vitaminin Fonksiyonları:

D vitamini parathormon ve kalsitonin ile birlikte vücut sıvıları ve dokular arasındaki kalsiyum ve fosfor homeostazisini sağlar (44). Kalsitriol reseptör kompleksi, bağırsakta kalsiyum emilimini arttıran kalsitriol ve sitosolik reseptörlerin birleşimiyle oluşur. Kalsitriol reseptör kompleksi kalsiyum bağlayıcı proteinlerin sentezine sağlar, bu da bağırsağa kalsiyum alımını arttırarak emilimini hızlandırır. Kalsitriol kemiklerdeki mobilitayı arttırarak plazmadaki kalsiyum ve fosfor düzeyini de yükseltir. Distal tübüllerden kalsiyum iyonlarının emilimini arttırarak ekskresyonunu azaltır (45,47).

D vitamini takviyesinin, tip-2 diyabet hastalarında glisemi ve insülin sekresyonunu üzerinde de iyileştirici etkisinden bahsedilmektedir (47). Vitamin D kalsiyum ve fosfor homeostazisinde pivotal rol oynar. Plazma kalsiyum seviyesini düzenleyerek insülin sentezi ve sekresyonunu regüle eder. Etkinliği pankreatik β hücreleri ile direk etkileşerek de gerçekleştirebilir. Bir hormon olarak, mineral metabolizmasında ve kemik gelişiminde rol oynar. Kalsiyumun bağırsakta emilimini kolaylaştırmakla birlikte, magnezyum ve fosfor iyonlarının emilimini stimule eder. Bağırsak lümeninden epitel hücrelere ve kana kalsiyum taşınmasını sağlayan proteinlerin ekspresyonunu stimule eder (44).

2.1.2.4. D Vitamin Eksikliği:

Vücutta sentezlenmesine rağmen, D vitamini eksikliği çok sık rastlanan bir tablodur. D vitamininin yetersiz miktarlarda alınması hiperparatiroidiye neden olur

(48). D vitamini eksikliği, bebeklerde ve yeterince güneş ışığına maruz kalmamış çocuklarda ve erişkenlerde kemiklerin yetersiz kalsifikasyonu bağlı raşitizme yol açabilir (35,49,50). Bazı vakalarda kalsiyum seviyesinin hızla düşüşü tetaniye sebep olabilir. Bazı araştırmacılara göre, grip ve soğuk algınlığı gibi hastalıkların kış mevsiminde daha sık görülmesinin sebebi, kışın azalan güneş ışığına bağlı D vitamini düzeyinin düşmesidir (45). Düşük D vitamini düzeyi semptomları arasında düşük kemik mineral yoğunluğu, kaslarda gerginlik ve sonucunda osteoporoz ve kemik kırılmaları sayılabilir (48). Ayrıca, D vitamini eksikliği olduğu durumlarda kardiyovasküler hastalık riskinin arttığı belirtilmiştir. Kronik böbrek yetmezliği olgularında D vitamini tedavisi ile erken dönemde kardiyovasküler sisteme ait mortalite riskinin azaldığı gözlenmiştir (51). $1,25(\text{OH})_2 \text{D}$ 'nin antineoplastik etkisi meme, prostat gibi dokuları içeren birçok kötü huylu hastalıkta bilinmektedir. D vitamini düzeyi olması gerekenden düşük olanlarda kolon, prostat ve meme kanserleri riski ve bu kanserlere bağlı gelişen ölüm oranı yüksektir (52).

2.1.2.5. D Vitamini Toksisitesi:

D vitamini toksisitesi genellikle D vitaminin uygunsuz alımı sonucu ortaya çıkar. D vitamini replasman tedavisi alan malabsorbsiyon, renal osteodistrofi, osteoporoz ya da sedef hastalığı olan ya da hızlı fakat sağlıklı kilo kaybettiren fad diyetleriyle birlikte mega doz supplementler kullanan hastalarda görülebilir. Vitamin D zehirlenmesinin, D vitaminini günde 60 000 IU/gün 'den fazla alan yetişkinlerde görüldüğü kanıtlanmıştır (53). Vaka raporları, D vitamini hipervitaminozunun süt dahil olmak üzere birçok gıdada üretim, formülasyon ve reçete hatalarından dolayı ortaya çıktığı belirtilmiştir (54,55). Akut zehirlenme belirtileri hiperkalsemiye bağlı olup, konfüzyon, poliüri, polidipsi, anoreksi, kusma ve kas güçsüzlüğü olarak ortaya çıkar. Kronik zehirlenme nefrokalsinoza, kemik demineralizasyonuna ve ağrıya neden olabilir (54-57).

Karaciğerde 25-(OH) D_3 'ü inaktif metabolitlerine metabolize etme kapasitesine sahip, hepatik 25-hidroksilazın regüle ettiği bir feedback sistemi vardır. Bu P450 sistemi ile gerçekleştirilir ve alkol, barbitüratlar ve fenitoin ile güçlendirilir. D vitamini toksisitesi önlemek için D vitamini alımını kesmek yeterli çözüm değildir. Çünkü karaciğer D vitamini depolar. Çok miktarda D vitamini alındığında,

fazla D vitamini adipoz dokuda depolanır (56). Burada doyumluğa ulaşınca, D vitamini serumda kalır ve 25 (OH) D₃ toksik seviyeye ulaşır (57).

2.1.3. E Vitamini

E vitamini, yağda çözünen bir antioksidan metabolit olmakla birlikte önemli bir diyet faktörüdür (1). E vitamininin sağlık açısından önemi çoğunlukla antioksidan özellikleriyle ilişkilendirilse de son yıllarda yapılan çalışmalar non-antioksidan özelliklerinin de önemini vurgulamıştır (58-60). E vitamini, eritrositlerin normal morfolojisi ve yaşlanma sürecini yavaşlatmak için önemlidir. Çünkü hücre yıkımında yer alan reaktif oksijen türlerini (ROS) elimine eder (61). Ayrıca, trombosit agregasyonlarını inhibe ederek aterosklerotik süreç ve kardiyovasküler hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynar (62-64). Uygun E vitamini düzeyi artrit, katarakt, nörolojik ve immünolojik hastalıklara karşı koruyucu bir rol oynayabilir (61,65). E vitamininin, anti-oksidasyon, anti-proliferasyon ve anti-inflamasyon aktiviteleri olduğu için kansere karşı koruyucu etkisi olduğu düşünülmektedir. E vitamini membran poliansature yağ asitleri ve plazma lipoproteinlerini serbest radikal ataklarından korumak için antioksidan rol oynar (66). Ayrıca, özellikle γ -tokoferol NO₂ detoksifikasyonun da önemli görev alır (38). Bu vitamin, TNF, IL-1, IL-6 ve IL-8'in sentezlerinde supresif aktiviteleri ile bağlantılıdır. Meme kanseri hücre dizilerinde, E vitamini belirgin apoptotik ve büyüme engelleyici etkiler göstermiştir (67,68).

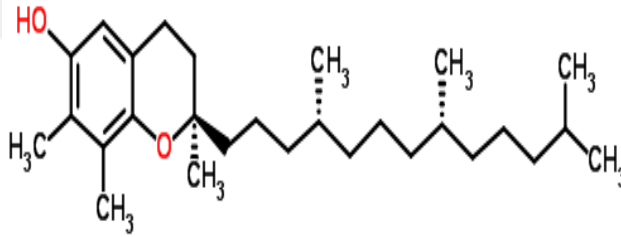
E vitamini tokoferol ve tokotrienoller olmak üzere iki grupta oluşur. Her birinin kromanol halkasındaki metil gruplarının pozisyonuna ve sayısına göre dört izomeri (α , β , γ ve δ) vardır. γ -tokoferol diyetle en çok alınan form olmasına rağmen, insanlarda ve hayvanlarda birçok biyolojik aktivitede yer alan ve kan dolaşımındaki baskın formu α -tokoferoldur (38,69). (Şekil 2.5)

Çoğu besin kaynağı E vitamini içerdiğinden, E vitamini eksikliği insanlarda nadir görülür. Eksikliğin kistik fibroz, kronik hepatit ve gastrointestinal bozukluklar gibi genetik veya malabsorpsiyon bozukluklarına bağlı olma olasılığı daha yüksektir (38,65). Buna rağmen, epidemiyolojik olarak E vitamini eksikliği, gelişmekte olan ülkelerde yetersiz vitamin alımı, sıtma ve AIDS gibi oksidatif stres süreçleri ile ilgili

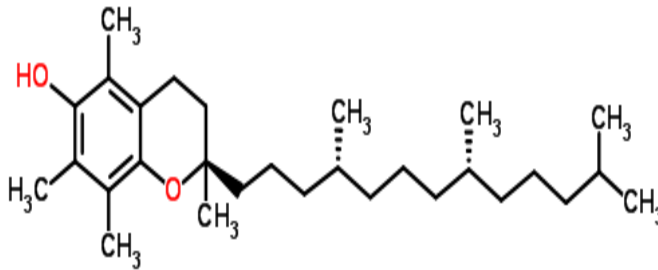
bulaşıcı hastalıkların yüksek prevalansı nedeniyle, sanayileşmiş ülkelerde olduğundan daha yaygındır (65).

2.1.3.1. E Vitamininin Kaynakları:

E vitamini, ıspanak gibi yeşil yapraklı sebzeler, şalgam, domates ürünleri, balkabağı, tatlı patates, mavi yengeç, kaya balığı, mango, kuşkonmaz, brokoli, papaya, ayçiçeği tohumu ve yağı ile çeşitli tahıllarda vardır. At ve sığır karaciğerinde yüksek miktarda bulunurken; kalp, böbrek, plasenta, yumurta, hardal, şalgam, pazı, maydanoz, lahana, zeytin, dolma biber, brüksel lahanası, kivi ve mavi meyvelerde az miktarda bulunur. Ayrıca balık yağı, multigrain kayısı, hardal ve kümes hayvanları, pamuk tohumu yağı, soya fasulyesi ve fındık, bitkisel yağlar, mısır, kanola, susam, yer fıstığı, pirinç kepeği, palmye yağı ve badem yağı gibi gıdalarda da bulunur. Baklagiller ve tam tahıllar, mercimek, buğday, pirinç, kuzey fasulyesi, nohut, arpa ve yulaf da A vitamini açısından zengin besin kaynaklarıdır (1,2).



γ-Tokoferol



α-Tokoferol

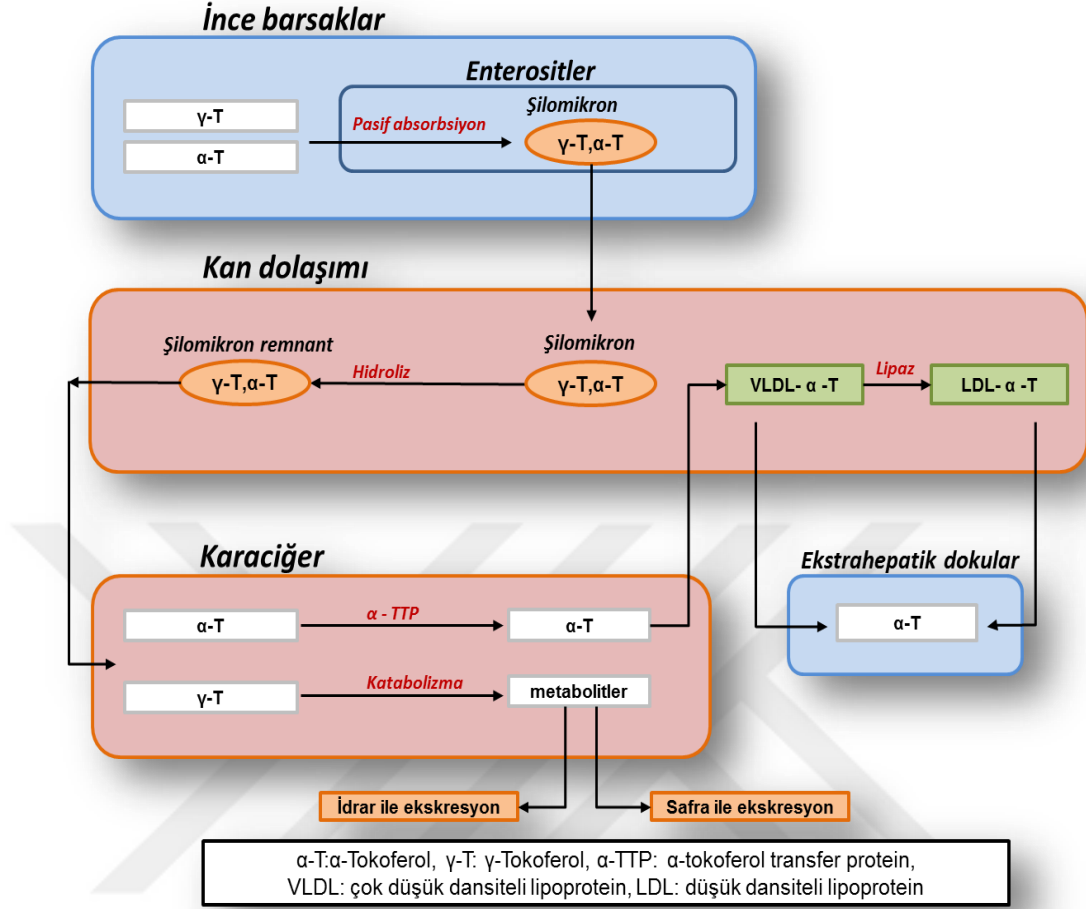
Şekil 2.5. γ-Tokoferol ve α-Tokoferolün kimyasal şekilleri

2.1.3.2. E Vitamininin Metabolizması:

E vitamini insanlarda ince bağırsaktan emilir (71). E vitaminin intestinal emiliminin gerçekleşmesi için, safra ve pankreatik salgular yardımıyla çözünür hale gelip miçel oluşturması gerekir. Sonuç olarak enterositler, şilomikronlarla entegre olan miçelleri absorbe eder ve lenf sistemine salgular (38,62,69). Şilomikronlar, kolesterol, α -tokoferol ve γ -tokoferol gibi farklı E vitamini türleri ile zenginleştirilmiştir (72). Dolaşım sisteminde şilomikronlar, beyin ve kas gibi bazı hedef dokulara E vitamini taşımak için lipoprotein lipaz tarafından hidrolize edilir. Şilomikronların hidrolizi sonucu yapısında hala E vitamini bulunduran şilomikron kalıntıları oluşur (62).

E vitamini, hepatik α -tokoferol transfer proteininin (α -TTP) katalizinde, α -tokoferolün kan dolaşımına yeniden salgılanmasıyla karaciğere taşınır. Bu protein, kandaki α -tokoferol konsantrasyonunun düzenlenmesini sağlar. Bu nedenle E vitamini eksikliği α -TTP gen defektleri ile ilişkilidir (38, 69).

Kandaki α -tokoferol, hedef dokulara çok düşük dansiteli lipoprotein (VLDL) ve düşük dansiteli lipoproteinler (LDL'ler) gibi lipoproteinler ile transfer edilir (73). (Şekil 2.6)



Şekil 2.6. E vitamini metabolizması

Diyetsel vitamin E (genellikle α -tokoferol ve γ -tokoferol) intestinal enterositler tarafından emilir. Enterositlerde α -tokoferol , γ -tokoferol ve E vitamininin diğer formları şilomikronlar olarak paketlenir ve lenfatik sisteme salgılanır. Kan dolaşımında şilomikronlar hidrolize olarak şilomikron kalıntılarına dönüşür. Hem α -tokoferol hem de γ -tokoferol karaciğere taşınmalarına rağmen, α -tokoferole spesifik bir hepatic α -tokoferol transfer proteini olduğu için, yalnızca α -tokoferol tekrar kan dolaşımına salgılanır. Kandaki α -tokoferol hedef dokulara VLDL ve LDL aracılığıyla taşınır (72).

2.1.3.3. E Vitaminin Fonksiyonları:

E vitamini antioksidan özelliği sayesinde vücut hücrelerini, unsature yağların okside olması ve bozulmasıyla oluşan ve oldukça yıkıcı etkileri olan serbest radikallere karşı korur. Sigara içmek ve yüksek miktarda UV ışınına maruz kalmak,

vücutta serbest radikallerin oluşumunu tetikler (1-3). Tokoferol, antioksidan özelliğiyle serbest radikalleri yakalayarak, serbest radikal zincir reaksiyonlarını durdurur. E vitamini antioksidan özelliğini yapısındaki serbest hidroksil grubu sayesinde kazanır. Hidroksil grubundaki hidrojeni serbest radikale vererek, vitaminin daha stabil bir formunu oluşturur. Bir nöroprotektör olarak rol oynayan E vitamini, kaslarda protein sentezi, C vitamini oksidasyonunu engelleme, A vitamini stabilize etme gibi olayları regüle ederek hücrel metabolizmaya katkı sağlar (61). E vitamini ve C vitamininin kombinasyonu Alzheimer hastalığında profilaktik bir önlem olarak kullanılır (74). Ayrıca kırmızı kan hücrelerinin korunmasında, yağların ve amino asitlerin stabilizasyonunda ve nükleik asitlerin ve steroidlerin metabolizmasında önem teşkil etmektedir (73).

2.1.3.4. E Vitamini Eksikliği:

E vitamini eksikliği kalp hastalıkları, anjina, kanser, multipl skleroz, kas güçsüzlüğü, diyabet, solunum yolu enfeksiyonları, Alzheimer ve Parkinson gibi nörolojik problemler, sinir iletim bozuklukları, katarakt, amfizem, yüksek kolesterol, infertilite, erektil disfonksiyon, genital herpes, yatak yaraları, bacak krampları, kas ağrısı, flebit, menopoz rahatsızlıkları, HIV, osteoartrit, lupus, romatoid artrit gibi kronik inflamatuvar hastalıklar ve bebeklerde düşük doğum ağırlığı gibi sağlık problemlerine neden olur. E vitamini eksikliği ayrıca retina dejenerasyonuna bağlı körlük ile betalipoproteinemi olarak bilinen yağ metabolizması bozukluğuna sebep olur (63,73,75-77).

2.1.3.5. E Vitamini Toksisitesi:

Yüksek dozlarda alımı bulantı, kusma ve ishale neden olur. E vitamini eksikliği olan bireyler tokoferol almamalıdır (72). E vitamini yüksek dozda hemorajiye neden olabilir. E vitamini bazı insanlarda ciltte irritasyona sebep olabilir. Bulantı, baş ağrısı ve bulanık görme yüksek düzey E vitamini alımının olası diğer yan etkileridir. Yapılan çalışmalar, günde 400 IU'den fazla doz alan insanlarda ölüm riskini artırdığını ortaya koymaktadır (72,73).

2.2. YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN BİRBİRİYLE ETKİLEŞİMLERİ

İnsanlar ve hayvanlarda yapılan çalışmalarda A vitamininin D vitamini fonksiyonları üzerinde interfere edici etkisi olduğu gözlemlenmiştir (7,78). Ratlarda yapılan bir çalışmada ise, hipervitamin D'nin toksik etkisinin A vitamini takviyesiyle azaldığı saptanmıştır (7). Jenab ve ark. larının yaptığı vaka kontrol çalışmasına göre, retinol alımını düşük olan kolorektal kanserli bireyler ile 25-OHD₃'ün kan düzeyleri arasında ters orantılı bir ilişki olduğu bulunmuştur (79).

D vitamini eksikliği (<50 nmol/L) ve yüksek düzey retinol (>2,8 µmol/L) osteoporotik kırık oluşma riski ile ilişkilendirilmiştir (80).

Yağda çözünen vitaminlerin herhangi birinin eksikliği sonucunda dışarıdan takviye edilmesinin, diğer yağda çözünen vitaminlerin kandaki düzeyleri üzerinde etkili olduğu düşünülmektedir. D₃ vitamini takviyesi (6 ay boyunca 800 IU/gün) tek başına veya kalsiyumla (6 ay boyunca 2 g/gün) birlikte kullanıldığında kan 25-OHD₃ düzeyini %48 oranında artırırken, α-tokoferol düzeyini %14 azalttığı gözlemlenmiştir. Serum 25-OHD₃ düzeyi ise vitamin D₃ takviyesi ile birlikte %48 oranında azalmıştır. Bununla birlikte, 85 birey üzerinde yapılan bir çalışmaya göre D₃ vitamini takviyesinin retinol düzeyi üzerinde sabit bir etkiye sahip olmadığı gösterilmiştir (81).

Yağda çözünen vitaminler ince bağırsakta farklı mekanizmalarla emilmelerine rağmen, emilim etkinlikleri birbirleri tarafından interfere edilebilir (82). Goncalves ve ark.larının yaptığı bir in-vitro hücre hattı (Caco-2 TC72) çalışmasına göre, E vitaminin A vitamini emilimini önemli ölçüde artırdığını, fakat bununla birlikte D vitamini emilimini anlamlı ölçüde azalttığını gözlemlenmiştir. Buna karşılık, hem A hem de D vitaminlerinin, E vitamini emilimi üzerinde olumsuz etkileri saptanmıştır. Ayrıca, A vitamininin hem D vitamini hem de E alımını önemli ölçüde azalttığı bildirilmiştir (82).

Bağırsakta emilimi süresince, E vitamininin antioksidan görevi görerek A vitamini üzerinde koruyucu etkisi bulunduğu ve A ve E vitamini birlikte tüketildiklerinde, A vitamininin E vitamini emilimi arttırdığı varsayılmaktadır (82).

Rutinde genellikle A ve E vitaminleri birlikte ölçülüyor olsa da, son zamanlarda gen ekspresyonundaki regülatör rollerinden dolayı A ve D vitaminlerinin moleküler düzeydeki etkileşimleri ile ilgili araştırmalar dikkat çekici olmaya başlamıştır (83). D vitamininin aktif formu D vitamini reseptörü (VDR) ile bir kompleks meydana getirerek, gen ekspresyon işlemini tetikleyen retinoid X reseptörü (RXR) ile heterodimer oluşturur. Ayrıca, gen ekspresyonunun regüle edilmesi için A vitamininin aktif formunun da RXR ile heterodimer oluşturması gerekmektedir. Tiroid hormon reseptörleri dahil olmak üzere birkaç nükleer reseptörün de RXR ile heterodimer oluşturabildiği bilinmektedir. Yüksek A vitamini dozu, D vitamini reseptörü ve RXR arasında heterodimer oluşumunu azaltabilir. Yapılan bir in vitro çalışmada, VDR ve RXR'nin heteromerik etkileşiminin 1,25-(OH)₂-D₃'ün (D3 vitamini aktif formu) varlığından etkilendiği ve yüksek konsantrasyonlardaki retinoid tarafından inhibe edildiği bulunmuştur (83).

2.3.YAĞDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN KAN DÜZEYLERİNİN KANTİTASYONU

Yağda çözünen vitaminlerin ölçümü için klinik laboratuvara yapılan talepler, özellikle D vitamini (25-OHD₃), son on yılda önemli ölçüde artmıştır. Bu artış, yağda çözünen vitaminlerin eksiklikleri ile ilişkilendirilmiş sağlık problemleri ile ilgili araştırma bulgularından kaynaklanmaktadır. Yağda çözünen vitaminlerin analizine olan bu talep, özellikle D vitamini için mevcut yağda çözünen vitaminlerin miktar tayin yöntemlerinin sınırlılıklarını ve yağda çözünen vitaminlerin ölçümündeki sınırlı standardizasyon başarısını vurgulamaktadır (84).

2.3.1. Zorlukları

Yağda çözünen vitaminlerin klinik laboratuvarlarda doğru ve kesin olarak eş zamanlı ölçümü oldukça zordur. Bu zorluk, yağda çözünen vitaminler moleküllerinin ve metabolitlerinin yapısal özellikleri, referans materyallerin ulaşılabilirliği, referans ölçüm yöntemleri ve referans laboratuvarlardan kaynaklanmaktadır. Laboratuvarlarda aynı kantitasyon metotları kullanılmasına rağmen elde edilen sonuçlarda ciddi farklılıklar saptanmıştır (84-86).

Sonuç olarak, sağlıklı bir birey için önerilen vitamin ve metabolit düzeyi için ortak bir karara varılamamıştır. Vitamin yetersizliği, eksiklik ve ciddi eksiklik tanımları bu nedenle belirsizliğini korumaktadır. Kullanılan analitik tekniklerin, yağda çözünen vitaminlerin eksikliği ile ilişkili patolojileri teşhis etmek ve izlemek için yeterince doğru ve kesin olup olmadığı konusunda çok fazla tartışma mevcuttur (85,86).

2.3.1.1. Yağda Çözünen Vitaminlerin Özellikleri:

Yağda çözünen vitaminlerin ve metabolitlerinin kimyasal ve fiziksel özellikleri klinik laboratuvarlardaki analitik ölçüm yöntemlerinde karşılaşılan zorluklardandır. Yağda çözünen vitaminler küçük moleküllerdir (<500 Da). Her birinin aktif ve inaktif metabolitleri bulunmaktadır. Yağda çözünen vitaminlerin kandaki konsantrasyonları nispeten düşük ve değişkendir. A ve E vitaminleri için $\mu\text{mol/L}$ düzeyindeyken D vitamini için nmol/L düzeyindedir (87,88). Başka bir zorluk da metabolitleri arasındaki konsantrasyon farklılıklarıdır. Örneğin, kandaki $1,25\text{-(OH)}_2\text{D}_3$ düzeyi, 25-OHD_3 düzeyinden 1000 kat düşüktür. Sonuç olarak, bu metabolitlerin tayininde kullanılan yöntemlerin seçici ve hassas olması doğru ve kesin ölçüm yapılabilmesi için oldukça önemlidir. İlgili bir diğer problem, bu metabolitlerin çoğunun hidrofobik moleküller olması ve kanda nispeten büyük proteinlerle bağlanarak taşınmasıdır (örneğin, VDBP yaklaşık 50 kDa'dır). Bu nedenle, vitamin ölçümünden önce vitaminin bağlayıcı proteininden ayrılması gerekmektedir. Bu basamak, yöntemin duyarlılığına ve özgüllüğüne önemli ölçüde etkide bulunabilmektedir (84,89).

2.3.1.2. Stabilite:

Yağda çözünen vitaminlerin kandaki stabilitesi, özellikle A vitamini (retinol) ve E vitamini (α -tokoferol), ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Numune saklanması ve taşınması gibi çeşitli faktörlerin vitamin stabilitesini etkilediği bilinse de, stabiliteyi tam olarak nasıl etkiledikleri açık değildir. Kan numunelerindeki yağda çözünen vitaminler, özellikle retinol ve α -tokoferol, kararsız analitler olarak kabul edilmektedir. Sonuç olarak, laboratuvarlarda numunenin toplanması, taşınması ve saklanması ile ilgili ışığa maruz kalma, sıcaklık, saklama koşulları ve zaman gibi faktörleri içeren özel bir protokol uygulanmaktadır (90-92).

Yağda çözünen vitaminlerin stabilitesi hakkındaki veriler sınırlıdır ve bazı çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişmektedir. Örneğin, bir çalışma oda sıcaklığında retinol ve α -tokoferol düzeylerinin tam kandaki değişikliklerin 72 saat boyunca sırasıyla %-9,8 ve %-1,0 olduğunu gösterilmiştir (93). Başka bir çalışmada ise, 1 hafta sonra oda sıcaklığında retinol ve α -tokoferol düzeylerinin tam kanda meydana gelen değişikliklerin sırasıyla %1,8 ve %4,8 olduğunu bildirmiştir (92). Yağda çözünen vitaminlerin stabilite verilerinin sınırlılığı nedeniyle, her bir klinik laboratuvarın örnek toplama, analiz ve saklama koşulları ile ilgili ayrı prosedürü bulunmaktadır. Bu da klinik laboratuvarların sonuçlarında varyasyona neden olmaktadır (92,93).

2.3.1.3. Standardizasyon:

Laboratuvarlarda Yağda çözünen vitaminler dahil olmak üzere metabolit analizinin standardizasyonu klinik kararlar ve sağlık hizmetlerinin iyileştirilmesi için önemli hale gelmiştir. Hasta örneklerinden elde edilen güncel analitik sonuçların, hastaların varsa önceki sonuçlarıyla karşılaştırılması, teşhis veya tedavi için verilen klinik kararlar için önemlidir. Pratikte, aynı hasta numunesi için aynı ölçüm tekniğini kullanarak elde edilen sonuçlar arasında bile farklılıklar vardır (65,86).

Yöntemlerin standardize edilememesinden kaynaklı sonuçlar arasındaki bu ölçüm farklılıkları yalnızca günlük hasta bakımında değil, popülasyon bazlı vitamin eksikliklerinin değerlendirmesinde ve referans aralık belirlenmesi ile ilgili yapılan

çalışmalarda da karşımıza çıkmaktadır (94). Ek olarak, standardizasyondaki bu başarısızlık, farklı coğrafi bölgelerde ve / veya farklı zamanlarda yapılan çalışmaların sonuçlarının yanlış yorumlanmasına veya ortaya çelişkili sonuçlar çıkmasına neden olabilir. Bu nedenle standardizasyon, zaman, lokasyon veya ölçüm yöntemi ne olursa olsun analitik sonuçların değerlendirilmesine önemli ölçüde yardımcı olacaktır (95) .

Bir analit ölçümünün standardizasyonu referans ölçüm prosedürü (RMP) (referans metodu), referans materyalleri, referans laboratuvarları, referans aralıkları ve dış kalite programları olmak üzere beş ana temele dayanmaktadır. RMP, referans materyale primer kalibratör (saf analit) veya sekonder kalibratör (insan örneklerindeki analit) olarak değer vermek ve sertifikalandırmak için kullanılan prosedürdür (94).

Endüstriyel bağlamda, bu sertifikalı referans materyali ticari bir kalibratör olarak kullanılabilir. Klinik laboratuvarlar, insan örneklerindeki analitleri ölçmek için onaylanmış ticari kalibratörleri kullanırlar. Sonuç olarak, rutin laboratuvar testlerinden elde edilen analitik sonuçlar sertifikalı materyale göre değerlendirilebilir (94,96). Bu konu ile bir takım çalışmalar sürdürülmesine rağmen, yağda çözünen vitaminlerin ölçümünün standardizasyonu için gerekli esaslar hala tamamlanmıştır.

Mevcut ticari kontrol ve kalibratör örneklerinde kullanılan matrikslerin nasıl hazırlandığına dair bilgiler üreticiler tarafından kullanıcılara tam olarak verilmemekte, dolayısıyla kullanılan kontrol ve kalibratörlerin güvenilirliği de hala bir tartışma konusu olarak karşımızda durmaktadır (97-103).

2.4. YAğDA ÇÖZÜNEN VİTAMİNLERİN ÖLÇÜMÜ İÇİN KULLANILAN YÖNTEMLER

Günümüzde, yağda çözünen vitaminlerin tayini için en çok kullanılan yöntemler Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) ve immünoassaydır (104-107). HPLC ve Likit Kromatografi Kütle Spektrometre (LC-MS/MS) daha doğru sonuçlar vermesine rağmen, klinik laboratuvarlarda D vitamini ölçümü için en sık kullanılan yöntem farklı üreticiler tarafından geliştirilmiş otomatik immünoassay

sistemleridir (85). Otomasyon sistemleri yüksek verimlilik, hızlı analiz süresi ve kolay kullanım ve onarım özelliklerine sahiptir. Fakat birçok otomatik immünoassay sisteminde doğruluk ve prezisyon ile ilgili problemler olduğu bildirilmiştir (108). Ayrıca, çoğu immünoassay sistemi 25-OHD₂ ve 25-OHD₃ konsantrasyonlarını ayrı ayrı tayin edememektedir (84). Bu problem serum matriksinde küçük molekülleri (vitamin gibi) daha büyük moleküllere (vitamin bağlayıcı proteinler) bağlayan antibodilerin düşük seçicilik ve hassasiyetinden kaynaklanmaktadır. HPLC, yağda çözünen vitaminlerin tayini için kullanılabilmesine rağmen, aynı anda elue olan vitaminleri HPLC ile eş zamanlı ölçmek mümkün değildir. Likit Kromatografi Kütle Spektrometre ise tüm bu vitaminleri eş zamanlı olarak yüksek seçicilik ve hassasiyetle ölçebilmektedir (106).

2.4.1. Likit Kromatografi Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometresi 1990'ların sonlarında ortaya çıkan bir kromatografik analiz teknolojisidir. Son zamanlarda, klinik laboratuvarlarda sıkça kullanılan immünoassay gibi yöntemlere rakip olarak düşünülmektedir (84).

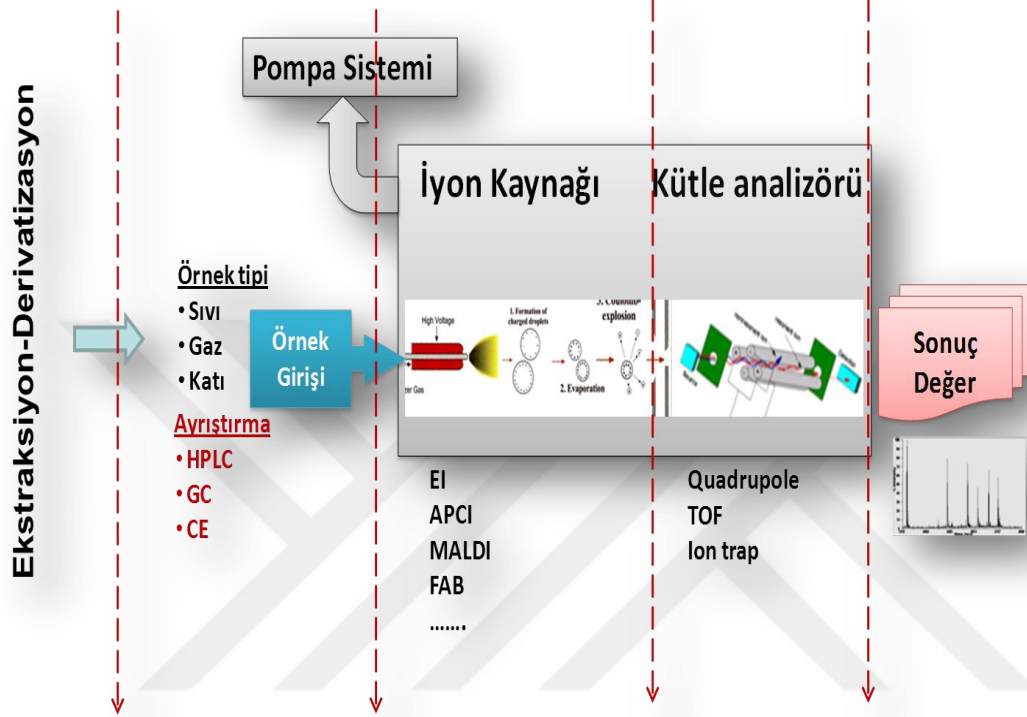
LC-MS/MS sistemi, analitleri fiziksel özelliklerine göre ayıran sıvı kromatografi (LC) ile metabolit selektivitesine sahip kütle detektörünün (MS) birleşmesiyle oluşur. Günümüzde klinik laboratuvarlar, ilaç analizleri, yeni doğan tarama, endokrinoloji ve metabolizma gibi testler için LC-MS/MS sistemini kullanmaya başlamışlardır (104).

Sıvı kromatografi- Kütle spektrometresi (LC-MS/MS), dörtlü kuadrapol spektrometre sistemini kullanır (105). Pratikte, LC'de örnek matriksinden ayrılan analitler, MS detektörüne ulaşmadan önce iyonize edilerek yüklü moleküller haline getirilir. MS detektörünün birinci kuadrapolünde (Q1), yüklü moleküller (prekürsör/parent iyon) kütle-yük oranına (m/z oranı) göre tayin edilirler. Prekürsör iyonlar, kolizyon hücresinde (Q2) azot gazı ve kolizyon enerjisi ile parçalanırlar. Parçalanmış iyonlar (product iyonlar) ikinci kuadrapolde (Q3) tayin edilirler. LC-MS/MS'in yüksek seçicilik ve hassasiyete sahip olması; hedef analitin konsantrasyonuyla doğru orantılı olan prekürsör iyonun product iyona geçiş

konsantrasyonunu çok hassas bir şekilde ölçebilmesinden kaynaklanmaktadır (104). (Şekil 2.7)

Gelişen teknolojiyle birlikte, LC-MS/MS ile yağda çözünen vitaminleri hasta örneğinden yüksek hassasiyet ve seçicilikle ölçmek mümkündür. Bu, hasta yönetimi ve sonuçlarında bir iyileşme sağlamanın yanı sıra, kan vitamin düzeyleri arasındaki ilişkileri anlama konusunda daha fazla fırsat sağlamaktadır. LC-MS/MS sisteminin birçok avantajı olmasına rağmen, LC’de iyonların birbirinden ayrılmasında mobil faz (kompozisyon, akış hızı, gradient/izokratik mod vb.) ve kolon (kolonun türü, çapı, sıcaklığı ve basıncı vb.) seçimi gibi birçok parametrenin çalışmaya göre standardize edilmesi gerekmektedir (104,105). Ayrıca, kuadrapollere ve kolizyon hücrelerine uygulanan voltaj MS analizini etkileyen değişkenlerdendir. Sonuç olarak efektif bir çalışma yapabilmek için bu parametrelerin her analit için optimize edilmesi gerekmektedir (106).

Kütle Spektrometrelerinin Temel Unsurları



Şekil 2.7. LC-MS/MS sisteminin şematik gösterimi

3.GEREÇ VE YÖNTEMLER

3.1. KULLANILAN KİMYASAL MADDELER

- 25-Hydroxyvitamin D₃ solution (Cerillant H-083)
- D₆-25-Hydroxyvitamin D₃ (26,26,26,27,27,27-D₆) solution (Sigma-Aldrich H-074)
- Alpha tocopherol (Supelco 47783)
- Retinol bioextra, »= 99.0% (HPLC) activity: -3100 units/mg (Sigma-Aldrich 95144)
- Metanol HPLC grade (CH₃OH) (Sigma-Aldrich)
- Acetonitrile HPLC grade (C₂H₃N) (Sigma-Aldrich)
- Formic Acid 100 % (CH₂O₂) (Sigma-Aldrich)

3.2. KULLANILAN ALET VE CİHAZLAR

- Likit Kromatografi –Kütle Spektrometresi (Agilent Technologies 6420 Triple Quadrapole LC-MS)
- HPLC kolonu (Agilent Pursuit Phosphophenyl 3,0 µM ×100×3,0 mm)
- Otomatik pipetler (değişken hacimli, tek kanallı) ve pipet uçları, dereceli cam silindirler ve muhtelif cam kaplar, ependorf, vial vb.
- Hassas terazi (Ohaus Adventurer Pro)
- Vorteks (Nüve NM10)
- Santrifüj (Nüve NF200) ve Ependorf Santrifüjü (Hettich Zentrifugen Mikro 120)
- Ultrasonik Banyo (Bandelin Sonorex)
- Buzdolapları (Arçelik), Derin dondurucu (Sanyo)
- Distile su cihazı (Merck Millipore)



Şekil 3.1. Çalışmada kullanılan LC-MS/MS cihazı

3.3.LİKİT KROMATOĞRAFI İÇİN GEREKEN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI

3.3.1. Mobil Fazlar

Ters-faz likit kromatografi sisteminin temel çalışma prensiplerinden biri de iki adet mobil faz kullanılmasıdır. Mobil faz A (H_2O +%0,1 formik asit) ve Mobil faz B (Metanol+%0,1 formik asit) haftalık olarak 1 litre hacminde hazırlanmıştır.

Mobil Faz A; distile su içine iyonizasyonu arttırmak için eklenmiş %0,1 formik asit çözeltisinden oluşmaktadır. 500 mL'lik mezür içine, 499 mL distile su ve 1 mL formik asit çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik banyoda bir dakika boyunca karıştırıldıktan sonra, 1 L'lik cam mobil faz şişesine aktarılarak, üzerine 500 mL distile su daha eklenmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dk. boyunca karıştırılmıştır.

Mobil Faz B; metanol içine iyonizasyonu arttırmak için eklenmiş %0,1 formik asit çözeltisinden oluşmaktadır. 500 mL'lik mezür içine, 499 mL metanol ve 1 mL formik asit çözeltisi eklenmiştir. Ultrasonik banyoda 1 dakika boyunca

kariştırıldıktan sonra 1 L'lik cam mobil faz şişesine aktarılarak, üzerine 500 mL metanol su daha eklenmiştir. Ultrasonik banyoda 5 dk. boyunca kariştırılmıştır.

3.3.2.HPLC Kolonu Yıkama Solüsyonu:

Her çalışma sonunda HPLC kolonu 0,3 mL/dk akış hızında 30 dk. boyunca, Asetonitril: H₂O (65:35) (v:v) çözeltilisi ile yıkanmıştır. Asetonitril: H₂O (65:35) (v:v) çözeltilisi haftalık olarak, 1L hacminde 650 ml asetonitril üzerine 350 mL H₂O eklenip ultasonik banyoda 5 dk. boyunca kariştırılması ile hazırlanmıştır.

3.4.ÇALIşMA İÇİN GEREKLİ KİMYASAL VE REAKTİFLERİN HAZIRLANMASI

3.4.1.Çöktürme Reaktifi

Örnek hazırlama aşamasında protein presipitasyonu (PP) metodu uygulanmıştır. Çöktürme reaktifi olarak metanol kullanılmıştır.

3.4.2. 25-Hydroxyvitamin D₃ Standart Çözeltilisinin Hazırlanması

1mL hacmindeki metanolde çözünmüş 100 µg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltilisi, 100µL olarak ependorflara porsiyonlanmıştır. Porsiyonlar, ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve çalışma gününe kadar -30°C de saklanmıştır.

3.4.3. D₆-25-Hydroxyvitamin D₃ (26,26,26,27,27,27-D₆) İnternal Standart Çözeltilisinin Hazırlanması

1mL hacmindeki 50 µg/mL konsantrasyonundaki stok çözeltiliden 20µL alınıp hacim 10 mL'ye metanol ile tamamlanarak 1000 ng/mL stok çözeltilisi hazırlanmıştır. Çözelti, ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve çalışma gününe kadar -30°C'de saklanmıştır.

3.4.4. Alpha Tocopherol Standart Çözeltisinin Hazırlanması

0,950 g/mL konsantrasyonundaki ana stok çözelti metanol içinde 1:100 oranında dilüe edilmiştir. Elde edilen çözeltinin konsantrasyonu 9,5 mg/mL'dir. Çözelti, ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve çalışma gününe kadar -30°C de saklanmıştır.

3.4.5. Retinol Standart Çözeltisinin Hazırlanması

1.5 mg standart 1 mL metanol içinde çözünmüş ve 1,5 mg/mL konsantrasyonundaki ana stok çözelti elde edilmiştir. Daha sonra yine metanol içinde 1:100 oranında dilüe edilerek 15 µg/mL konsantrasyonundaki ara stok çözeltisi hazırlanmıştır. Çözelti, ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve çalışma gününe kadar -30°C'de saklanmıştır.

3.4.6. Yağda Çözünen Vitamin Miks Çözeltisinin Hazırlanması

Yağda çözünen vitaminlerin miks çözeltisi; 250 µL 100 µg/mL 25-OHD₃, 1,5 mL D₆-25-Hydroxyvitamin D₃ (26,26,26,27,27,27-D₆) internal standart, 174 µL 9,5 mg/mL alpha tocopherol, 1 mL 15 µg/mL retinol çözeltilerinin karıştırılıp, hacmin 10 mL'ye metanol ile tamamlanması ile elde edilmiştir. Miks çözeltinin içindeki vitaminlerin konsantrasyonları sırasıyla 25-OHD₃ → 250 ng/mL, D₆-25-Hydroxyvitamin D₃ → 150 ng/mL, Vitamin E → 150 µg/mL, Vitamin A → 150 µg/dL'dir.

3.4.7. In-House Kalibratör Örneklerinin Hazırlanması

In-house kalibratör örnekleri stok miks çözeltisinden dilüsyon yöntemi ile metanol içerisinde 1 mL hacminde 7 seviye olacak şekilde hazırlanmıştır. Daha sonra "Çalışma Örneklerinin Hazırlanması" bölümünde anlatılacak metoda göre hazırlanmış ve Tablo 3.1'de verilen konsantrasyonlar elde edilmiştir. Kalibratörler, ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyo ile sarılmış ve çalışma gününe kadar -30°C'de saklanmıştır.

Tablo 3.1. In-house kalibratör konsantrasyonları

Seviye	Vitamin A ($\mu\text{g}/\text{dL}$)	Vitamin E ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	25-OHD ₃ (ng/mL)
Seviye 1	3,0	3,0	5,0
Seviye 2	6,0	6,0	10,0
Seviye 3	12,0	12,0	20,0
Seviye 4	18,0	18,0	30,0
Seviye 5	30,0	30,0	50,0
Seviye 6	48,0	48,0	80,0
Seviye 7	90,0	90,0	150,0

3.4.8. Gerçeklik (Trueness) Çalışması için Kullanılan Kalibratör Örneklerinin Hazırlanması

In-house hazırlanmış kalibratör örneklerinden Seviye 5 in konsantrasyonu Vitamin A, Vitamin E ve 25-OHD₃ için sırasıyla 30,0 $\mu\text{g}/\text{dL}$, 30,0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 50,0 ng/mL kabul edilerek gerçeklik çalışması için kullanılmıştır.

3.5. ÇALIŞMA ÖRNEKLERİNİN HAZIRLANMASI

Tüm çalışma örnekleri PP yöntemi ile hazırlanmıştır. Buna göre; endorfa önce 200 μL serum örneği ardından 300 μL metanol eklenerek 1 dakika boyunca vortekslenir. Üzerine 100 μL 1000 ng/mL konsantrasyonundaki internal standart çözeltisi eklenerek ve 30 saniye vortekslenmenin ardından 12000 rpm de 15 dakika boyunca santrifüj edilir. 300 μL üst faz insert yerleştirilmiş vialle alınarak LC-MS/MS sistemine 10 μL hacminde enjekte edilir.

3.6. HPLC ŞARTLARI

En iyi ayırım ve en yüksek intensiteye sahip pikleri elde etmek için denemeler yapılmış ve HPLC için optimum şartlar belirlenmiştir. (Tablo 3.2) Agilent Pursuit

HPLC Kolon, Fosföfenil seçiciliği, ters faz, 100x3,0mm partikül büyüklüğü 3,0 µm olan analitik kolon kullanılmıştır.

Tablo. 3.2.1. Optimum HPLC şartları

HPLC şARTLARI	
Enjeksiyon hacmi	10 µL
Örnekleyici sıcaklığı	4 °C
Kolon akış hızı	0,5 mL/dk
Kolon fırını sıcaklığı	25 °C
Analiz süresi	13 dk

Tablo. 3.2.2. Optimum HPLC şartları, akış gradienti

HPLC şARTLARI			
	Zaman (dk)	Mobil Faz A (%)	Mobil Faz B (%)
Akış gradienti	0	30	70
	3	30	70
	5	10	90
	8	0	100
	13	30	70

3.7. MS/MS şARTLARI

Çalışmada kullanılan optimum MS/MS şartları Tablo 3.3'de verilmiştir. MS taraması Multiple Reaksiyon Takibi (Multiple Reaction Monitoring) modunda yapılmıştır. Metottaki tüm vitaminler ve IS için kütle/yük (m/z) oranlarına göre prekürsör (parent) ve ürün (product) ürün iyonları içeren MRM geçişleri, çarpışma enerjileri (CE: Collision Energy) ve kolondaki alıkonma zamanları (RT: Retention Time) Tablo 3.4'de gösterilmiştir. MS/MS taraması tüm analitler için pozitif ve negatif iyon taraması modunda yapılmış, en iyi ayırım ve yüksek intensite pozitif iyon modunda bulunmuştur.

Tablo 3.3. Optimum MS/MS şartları

MS/MS ŞARTLARI	
İyon kaynağı	ESI
MS1 sıcaklığı	100 °C
MS2 sıcaklığı	100 °C
Rough vacuum	$1,49 \times 10^9$ Torr
High vacuum	$1,96 \times 10^{-9}$ Torr
Collision gaz sıcaklığı	300 °C
Collision gaz akışı	6,0 L/dk
Nebulizer basıncı	15 psi
Cycle time	525 s
Analiz süresi	13 dk

Tablo 3.4. MS/MS taramasında her analit ve internal standart için MRM geçişleri, CE ve RT değerleri

Molekül	Prekürsör		MRM geçişi	Fragmentor	CE (eV)	RT (dk)
	İyon	Ürün İyon				
Vitamin A	269,3	93,1	269,3→93,1	116	18	7,56
Vitamin E	431,2	165,1	431,2→165,1	135	20	9,65
Vitamin D ₃	401,3	383,1	401,3→383,1	100	5	7,52
Vitamin D ₆	407,4	389,3	407,4→389,3	100	5	7,52

3.8. İSTATİSTİK ANALİZİ

İstatistik analizler Microsoft Office Excel 2010 (Seattle, Washington, ABD) programı kullanarak yapılmıştır.

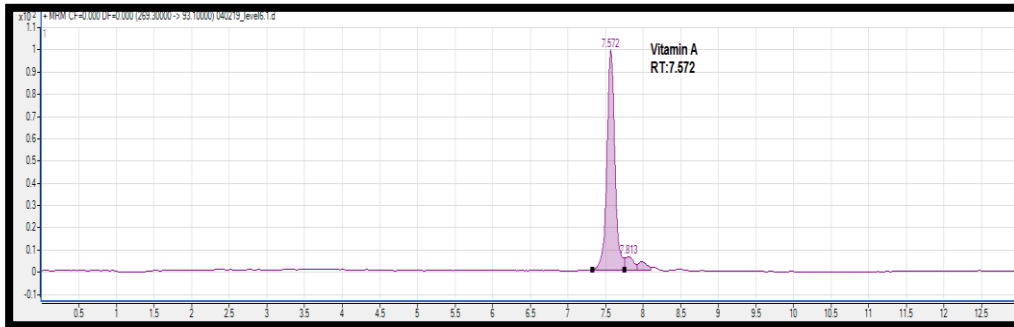
4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, yağda eriyen A, D ve E vitaminlerinin eş zamanlı analizine imkân sağlayan LC-MS/MS metodu kullanılarak yeni bir yöntem geliştirilmiş ve validasyonu yapılmıştır. İyon kaynağı olarak ESI probu, MS/MS taraması için Multiple Reaksiyon Takibi (MRM: Multiple Reaction Monitoring) modunun kullanılmıştır. Bu yöntemde her bir vitamene ve internal standarta ait prekürsör ve ürün iyonlar, çeşitli denemeler sonucu elde edilmiş optimum fragmentor ve çarpışma enerjileri (CE), alıkonma zamanları (RT) Tablo 3.4'de gösterilmiştir. Tüm MS/MS taramaları negatif ve pozitif iyon tarama modlarında ayrı ayrı yapılmış en iyi ayırım ve yüksek intensite pozitif iyon modunda bulunmuştur.

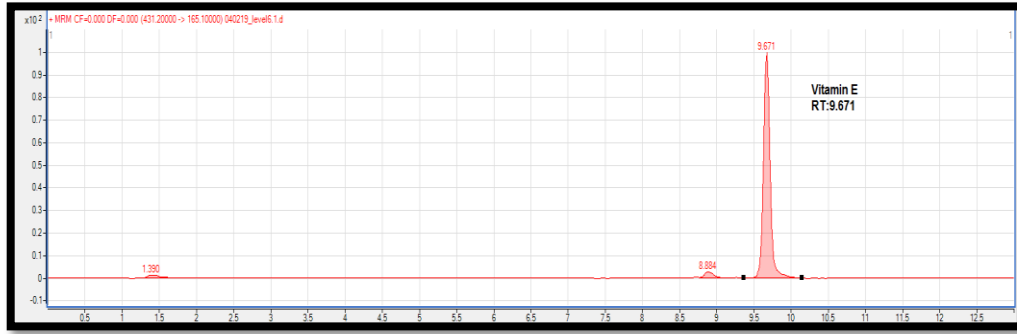
Kolondaki vitaminlerin alıkonma süreleri sırasıyla vitamin 25-OHD₃ 7,52 dakika, Vitamin A 7,56 dakika ve Vitamin E 9,65 dakikadır. MS/MS analizi 9,65inci dakikadan itibaren bitmesine rağmen kolon temizliği ve şartlanması için toplam analiz süresi 13 dakika olarak tasarlanmıştır.

4.1. KROMATOGRAMLAR

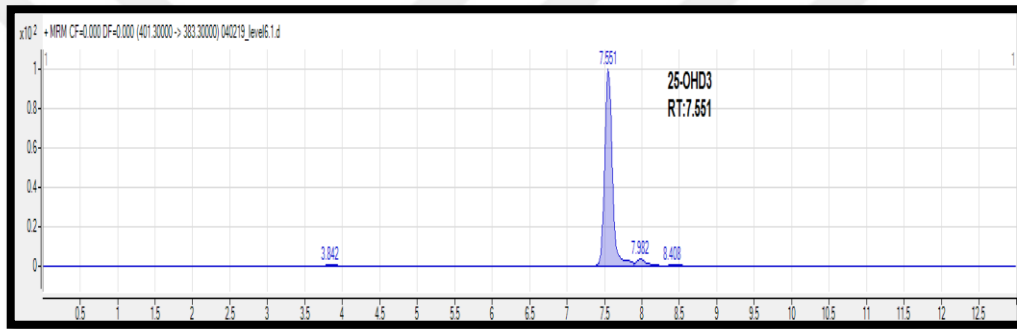
Şekil 4.1 ile Şekil 4.4'de Kalibratör 6'ya ait Vitamin A, Vitamin E, 25-OHD₃ ve 25-OHD₆ ya ait kromatogramlar gösterilmiştir. Şekil 4.5 ile Şekil 4.7'de Vitamin A, Vitamin E, 25-OHD₃ ve 25-OHD₆ya ait MRM geçişleri için örnek spektrumlar gösterilmiştir. MRM modunun yüksek seçicilik özelliği sayesinde alıkonma zamanları birbirine yakın analitler kolayca ayırt edilebilmiştir.



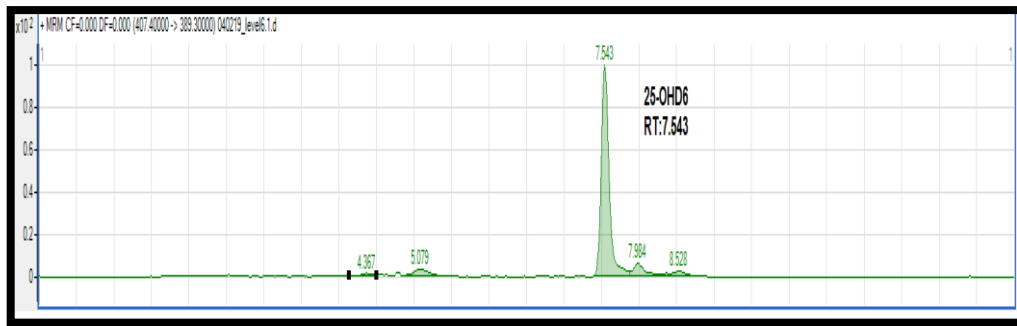
Şekil 4.1. Vitamin A kromatogram örneği



Şekil 4.2. Vitamin E kromatogram örneği



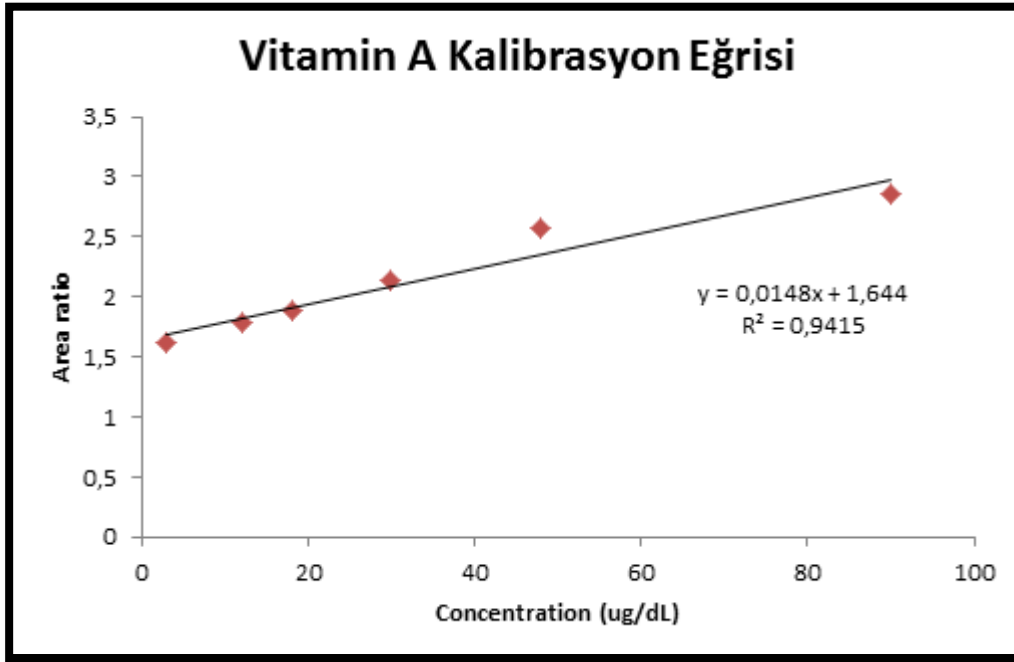
Şekil 4.3. 25-OHD₃ kromatogram örneği



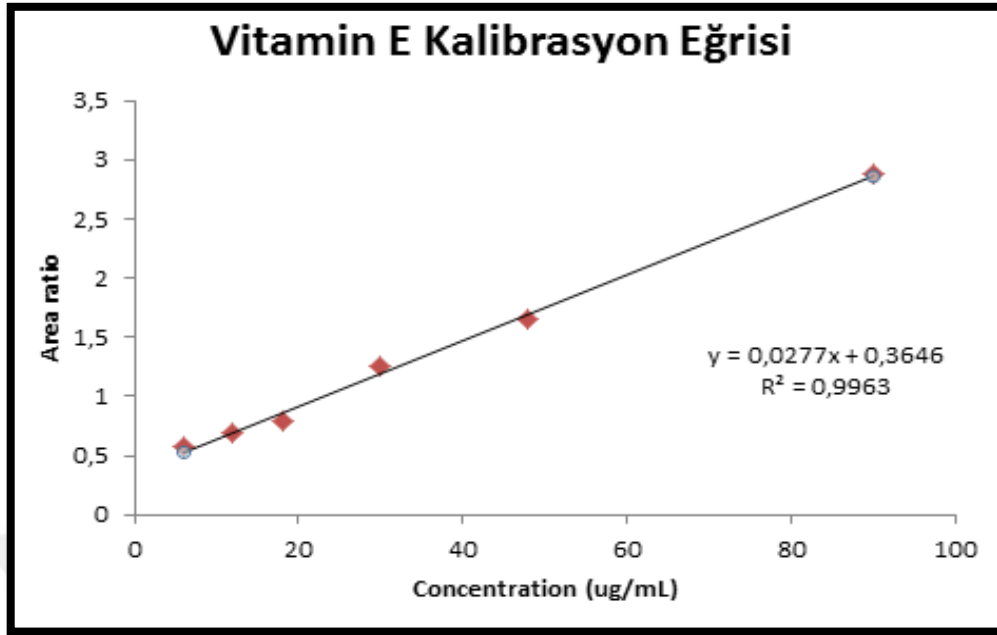
Şekil 4.4. 25-OH D₆ kromatogram örneği

4.2.KALİBRASYON EĞRİLERİ

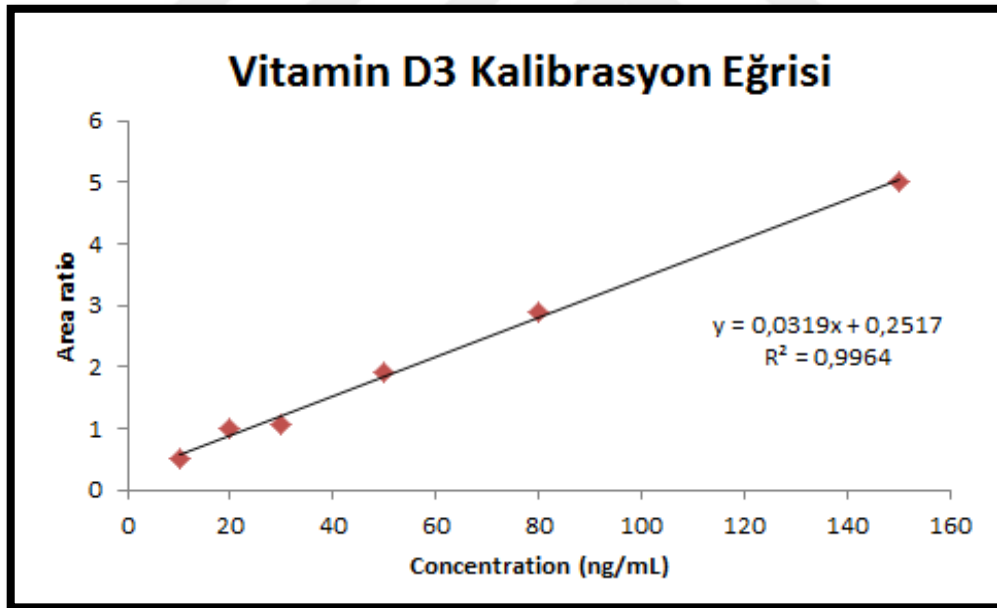
Tüm vitaminler için in-house hazırlanmış 7 seviyeli kalibrasyon eğrileri çizilmiştir. Tüm analitler için internal standart olarak 25-OHD₆ kullanılmıştır.



Şekil 4.5. Vitamin A kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.6. Vitamin E kalibrasyon eğrisi



Şekil 4.7. Vitamin D₃ kalibrasyon eğrisi

4.3. METOT VALİDASYONU

4.3.1. Tekrarlanabilirlik (Precision)

Gün içi ve günler arası kesinlik için, in-house yöntemle hazırlanmış kalibratörlerden 3'üncü ve 6'ncı seviyeler kullanılmıştır.

4.3.1.1. Gün içi tekrarlanabilirlik:

Üçüncü seviye kalibratör ön hazırlık işlemlerinden geçirildikten sonra art arda 20 kez analiz edilmiştir. Aynı işlem 6. seviye kalibratör için de yapılmıştır. Elde edilen sonuçlara göre ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (CV) değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 4.1)

Tablo 4.1. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OH D₃'e ait gün içi kesinlik verileri

	Seviye 3			Seviye 6		
	Ortalama	SD	CV%	Ortalama	SD	CV%
Vitamin A (µg/dL)	9,62	0,82	9,52	49,9	4,68	9,38
Vitamin E (µg/mL)	12,9	0,71	5,49	47,16	4,82	10,23
25-OHD ₃ (ng/mL)	22,14	1,16	5,24	79,75	2,61	3,27

4.3.1.2. Günler arası tekrarlanabilirlik:

Kullanılan kalibratörler -30 °C'de saklanmış ve 20 gün boyunca ayrı ayrı analiz edilmiştir. Elde edilen sonuçlara göre ortalama, standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (CV) değerleri hesaplanmıştır. (Tablo 4.2)

Tablo 4.2. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OH D₃'e ait günler arası kesinlik verileri

	Seviye 3			Seviye 6		
	Ortalama	SD	CV%	Ortalama	SD	CV%
Vitamin A (µg/dL)	9,88	0,49	4,98	49,38	1,82	3,69
Vitamin E (µg/mL)	12,86	1,19	8,75	45,00	1,16	6,19
25-OHD ₃ (ng/mL)	22,90	1,65	7,21	80,81	3,32	4,11

4.3.2. Gerçeklik (Trueness)

Analitik gerçeklik, ölçülen değerlerin gerçek değere yakınlığıdır. Ölçülen değerle gerçek değer arasındaki fark bias olarak tanımlanır. Her bir vitamene ait bias değerlendirmesi göreceli hata (relative error) formülüyle hesaplanmış [$\%Bias = (\text{Ölçülen değer} - \text{Gerçek değer}) / \text{Gerçek değer} \times 100$] ve Tablo 4.3'de gösterilmiştir. (Bias hesaplaması için kullanılan kalibratör örneklerinin hazırlanmış şekli gereç ve yöntemler bölümünde anlatılmıştır.)

Tablo 4.3. Vitamin A, Vitamin E ve 25-OHD₃ için hesaplanmış bias değerleri

	Gerçek Değer	Ölçülen Değer	Gerçeklik (%)	Bias (%)
Vitamin A (µg/dL)	30,00	35,15	117,17	17,20
Vitamin E (µg/mL)	30,00	31,88	106,27	3,54
25-OHD ₃ (ng/mL)	50,0	51,83	103,66	2,07

4.3.3. Tespit Limiti (LOD) ve Tayin Limiti (LOQ)

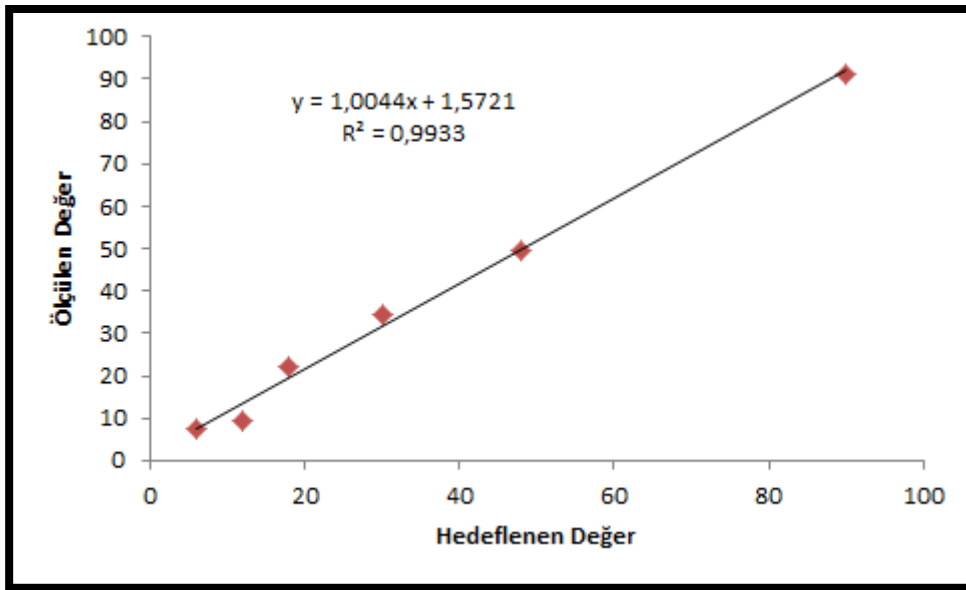
En düşük standart çözeltisi metanolde dilüe edilmiştir. LOD ve LOQ değerlerine Sinyal/Gürültü oranı (Signal/Noise ratio- S/N) ile karar verildi. LOD ve LOQ sırasıyla $S/N \geq 3$ ve $S/N \geq 10$ 'dur.

4.3.4. Doğrusallık (Linearity)

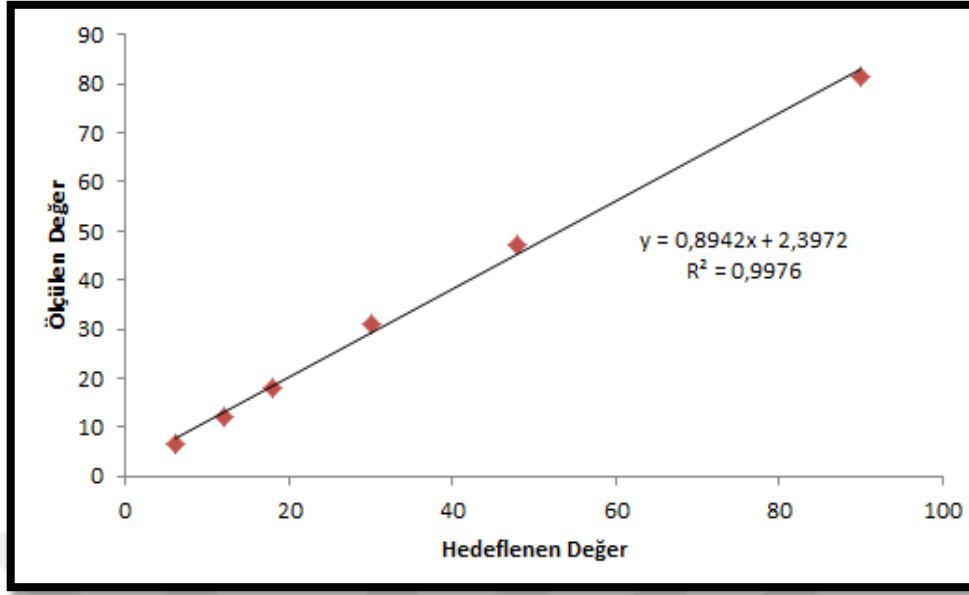
Her bir vitamin için referans değerlere göre belirlenmiş 7 seviyeden oluşan lineer aralık oluşturulmuştur. Her seviye ardışık 4 kez ölçülerek hedeflenen değerler (x) ve ölçülen değerler(y) arasındaki regresyon denklemi çıkarılmıştır. Doğrusallık çalışmasına ait sonuçlar Tablo 4.4'de ve r Şekil 4.8 ile Şekil 4.10'da verilmiştir.

Tablo 4.4. Doğrusallık çalışmasının sonuçları

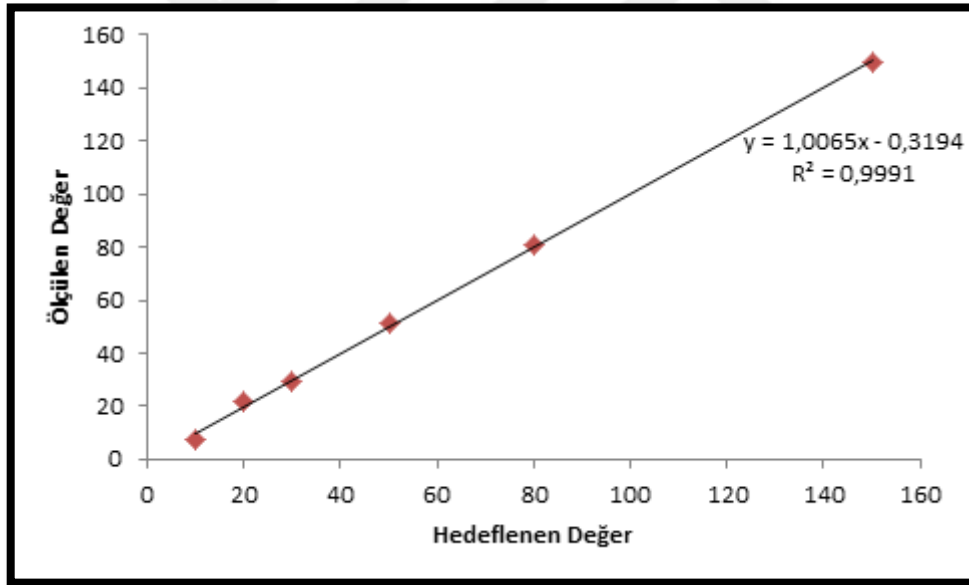
	Lineer Aralık	Eğim (Slope)	Kesim Noktası (Intercept)
Vitamin A ($\mu\text{g/dL}$)	3,0-90,0	1,0044	1,5721
Vitamin E ($\mu\text{g/mL}$)	3,0-90,0	0,8942	2,3972
25-OHD ₃ (ng/mL)	5,0-150,0	1,0065	-0,3194



Şekil 4.8. Vitamin A doğrusallık grafiği



Şekil 4.9. Vitamin E doğrusallık grafiği



Şekil 4.10. 25-OHD₃ doğrusallık grafiği

4.3.5. Geri Kazanım (Recovery)

Kör seruma (Vitamin A konsantrasyonu = 5,0 µg/dL, Vitamin E konsantrasyonu= 1,70 µg/mL ve 25-OHD₃ konsantrasyonu=1,0 ng/mL'dir). Kalibratör 2 ve kalibratör 5 eklenerek elde edilen örnekler, ön hazırlık işleminden geçirildikten sonra 3'er defa analiz edilerek geri kazanım (Recovery: R) oranları

belirlenmiştir. Bu işlem %R formülüyle hesaplanmış [%R (Ölçülen vitamin konsantrasyonu/Eklenen vitamin konsantrasyonu)X100] ve sonuçlar Tablo 4.5’de gösterilmiştir.

Tablo 4.5. Geri kazanım çalışması sonuçları

		Ölçülen Değer		
		Eklenen Değer	Ortalaması	Geri Kazanım (%)
Vitamin A	Level 2	11,0	11,09	101,15
	Level 5	35,0	35,52	101,60
Vitamin E	Level 2	7,7	7,67	99,61
	Level 5	31,7	32,38	102,15
25-OHD ₃	Level 2	11,0	10,4	94,55
	Level 5	51,0	49,1	96,28

5. TARTIŞMA

Yağda çözünen vitaminler A, D ve E birçok fizyolojik fonksiyonun devamlılığı için gerekli moleküllerdir. Bu vitaminlerin eksikliklerinin kanser ve tip-2 diyabet gibi hastalıklara yakalanma riskini arttırdıkları bildirilmiştir (2,4). Ayrıca A ve D vitaminlerini yüksek konsantrasyonlarının yol açtığı toksisite sebebiyle, klinisyenlerin bu vitamin seviyelerinin ölçümüne ilişkin talepleri son yıllarda artış göstermiştir.

Yağda çözünen vitaminleri klinik laboratuvarlarda doğru ve kesin olarak eş zamanlı ölçmek oldukça zordur. Bu zorluk, yağda çözünen vitaminler moleküllerinin ve metabolitlerinin yapısal özellikleri, referans materyallerin ulaşılabilirliği, referans ölçüm yöntemleri ve referans laboratuvarlardan kaynaklanmaktadır. Yağda çözünen vitaminler oldukça küçük moleküllerdir ve kandaki konsantrasyonları nispeten düşük ve değişkendir (87,88). Ayrıca özellikle A ve E vitaminin kandaki stabiliteleri ile ilgili kesin bir bilgi bulunmamaktadır. Yapılan çalışmaların sonuçları birbiriyle çelişmektedir. Örneğin, Drammeh ve ark.ları yaptığı çalışmada, oda sıcaklığında retinol ve a-tokoferol düzeylerinin tam kandaki değişikliklerin 72 saat boyunca sırasıyla %-9,8 ve % -1,0 olduğunu gösterilmesine rağmen (93), Clark ve ark.ları bir hafta sonra oda sıcaklığında retinol ve a-tokoferol düzeylerinin tam kanda meydana gelen değişikliklerin sırasıyla %1,8 ve % 4,8 olduğunu bildirmiştir (92). Dolayısıyla açık bir stabilite verisi mevcut olmadığı için her laboratuvar aynı metodu kullansa bile kendi stabilite protokolünü oluşturmuş, bu da sonuçlarda varyasyona sebep olmuştur.

Klinik laboratuvarlarda D vitamini ölçümü için en çok kullanılan yöntem immünoassaydir (107). Buna karşılık, birçok otomatik immünoassay sisteminde doğruluk ve prezisyon ile ilgili problemler olduğu bildirilmiştir. Bu problem, serum matriksinde küçük molekülleri (vitamin gibi) daha büyük moleküllere (vitamin bağlayıcı proteinler) bağlayan antibodilerin düşük seçicilik ve hassasiyetinden kaynaklanmaktadır (108).

A ve E vitamini ölçümü için en sık kullanılan yöntem UV/Vis veya fotodiyotarray detektörleri kullanılarak yapılan HPLC metotlarıdır (109,110). Fakat aynı anda elüe olan molekülleri HPLC ile ayırt etmek mümkün olmadığı için yağda çözünen vitaminleri bu yöntemle eş zamanlı ölçmek mümkün değildir.

Yağda çözünen vitaminler hidrofobik moleküllerdir ve kanda proteinlere bağlanarak taşınırlar. Bu vitaminler doğru ve hassas ölçümünün en önemli kriteri proteinlerle arasındaki bu bağı koparmaktır. Ayrıca, yağda çözünen vitaminler sadece bir ya da iki hidroksil grubu olan oldukça küçük moleküllerdir (<500 Da). Bu da iyonize olmalarını zorlaştırır. MS analizindeki en kritik basamaklardan bir tanesi de iyonizasyonu sağlamaktır (107).

LC-MS/MS, immünoassay ve HPLC yöntemlerine göre oldukça hassas bir metottur (104,105). Likit kromatografi sisteminin ayırım gücü ile kütle detektörünün seçiciliğini birleştirerek, yağda çözünen vitaminler gibi küçük molekülleri bile hassas bir şekilde analizleme imkânı sunar. Bu amaçla, tez çalışmasında yağda çözünen vitaminlerin eş zamanlı analizine olanak sağlayan hassas ve seçici bir LC-MS/MS bazlı metot geliştirilmiş ve valide edilmiştir.

Biyolojik sıvılarda düşük konsantrasyonda bulunan yağda çözünen vitaminlerin analizini yapmak matrikste yüksek konsantrasyonda bulunan inorganik tuzlar, proteinler ve lipidlerin varlığında oldukça zordur. Efektif bir analiz yapabilmek için bu moleküllerin vitaminler üzerindeki interfere etkisini ortadan kaldıracak uygun ekstraksiyon prosedürüne karar vermek gerekmektedir. Var olan birçok metot, bu matriks etkisini ortadan kaldırmak için saponifikasyon, sıvı-sıvı ekstraksiyonu ya da katı-faz ekstraksiyonu gibi uzun örnek hazırlama basamaklarını içeren HPLC metotlarıdır (111-115). Mevcut LC-MS/MS metotlarında ise ya sadece A ve E vitaminine ya da D vitamini metabolitleriyle birlikte bakılmıştır (116,117). Andreoli ve ark.larının geliştirdiği LC-MS/MS metodu sadece A, E ve A vitaminin prekürsörü olan β -karotenin analizine imkân sağlamaktadır (118). Capote ve ark.larının (119) geliştirdiği metotta, yağda çözünen vitaminler LC-MS/MS ile eş zamanlı şekilde ölçülmüştür, fakat hem örnek hacmi (1000 μ L) hem de ekstraksiyon prosedürü (katı-faz ekstraksiyonu) rutin klinik kullanımı için uygun değildir.

Midttun ve ark.larının hızlı analiz süresine ve uygun örnek hacmine sahip bir metodu olmasına rağmen ekstraksiyon basamağında kullandıkları kloroform kanserojen etkilere sahiptir (120). Albaharani ve ark.larının metodu (107) düşük örnek hacmi ve hızlı analiz süresine sahip olmasına rağmen, uzun örnek hazırlama prosedürü (sıvı-sıvı ekstraksiyonu) sebebiyle bizim tez çalışmamızda kullandığımız protein presipitasyonu yöntemine göre daha uzun süreçli bir hazırlık aşaması gerektirmektedir.

Bu tez çalışmasında 200µL gibi düşük örnek hacminde çalışmaya uygun hızlı, hassas ve seçici bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiştir. Örnek hazırlama yöntemi olarak protein presipitasyonu kullanılmıştır. Kullanılan çöktürücü solvent metanoldür. Ayrıca, in-house hazırlanmış stok solüsyonlar ve mobil fazda da organik solvent olarak metanol kullanılmıştır.

APCI iyon modu yağda çözünen vitaminlerin analizinde daha çok kullanılmasına rağmen, bu çalışmada en iyi ayırım ve en yüksek intensiteye sahip pikler ESI pozitif iyon modunda bulunmuştur.

Vitaminlerin analizinde karşılaşılabilecek zorluklardan diğeri kolon seçimidir. Bu çalışmada, yağda çözünen vitaminlerin ayırımı için ters-faz kromatografi kullanılmıştır. Bu amaçla en iyi ayırımı sağlamak için çeşitli kolonlar denenmiştir. Karbon oktadekasilan (C18) kolonlar özellikle A ve E vitaminin analizinde sıkça kullanılan kolonlardır (110,119-122). Fakat çalışmamızda C18 kolon ile 25-OHD₃ vitaminin ayırımı gerçekleştirilememiştir. Phenyl, phenyl-hexyl kolon seçicilikleri ve farklı partikül büyüklükleri de denenmiş, fakat en iyi ayırım Agilent Pursuit PFP (100× 3,00mm × 3µM) analitik kolonu ile sağlanmıştır.

Ayrıca, çeşitli mobil fazlar ve akış hızları test edilmiştir. H₂O içerisinde hazırlanmış %0,1 formik asit (Mobil Faz A) ve metanol içerisinde hazırlanmış %0,1 formik asit (Mobil Faz B) çözeltisi mobil faz olarak seçilmiş, akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Daha iyi ayırım ve daha hızlı analiz için gradient elüsyon programı kullanılmıştır. Gradient modunda elde edilen piklerin şekillerinin daha düzgün ve rezolüsyonlarının izokratik moda göre daha yüksek olduğu gözlemlenmiştir.

Vitamin A, Vitamin E ve 25-OHD₃ için total analiz süresi 13 dakikadır. MS/MS analizi 9,65'inci dakikadan itibaren tamamlanmasına rağmen, kolon temizliği ve şartlanması için metot 13 dakika olarak dizayn edilmiştir.

Bu metot dizayn edilirken, K vitaminin optimizasyonu için çalışmalar yapılmıştır. Fakat kandaki konsantrasyonu diğer yağda çözünen vitaminlere göre çok düşük olduğundan (A ve E vitamini $\mu\text{mol/L}$, 25-OHD₃ nmol/L , K vitamini pmol/L) analitik açıdan ayırım yapabilmek mümkün olmamış, diğer vitaminler K vitaminini interfere etmişlerdir (107).



6. SONUÇLAR

Bu tez çalışmasında, yağda çözünen vitaminlerin eş zamanlı analizine olanak sağlayan düşük örnek hacmine sahip hassas ve seçici bir LC-MS/MS metodu geliştirilmiş ve valide edilmiştir. Bu metot, düşük hassasiyete sahip immünoassay yöntemleri ve eş zamanlı analize olanak sağlayamayan HPLC yöntemlerine göre çok daha kısa sürede ve birlikte tespitine imkân sağlayabilecek güvenilir bir yöntem olarak değerlendirilebilir.



KAYNAKLAR

1. Ravisankar P, Reddy AA, Nagalakshmi B, Koushik OS, Kumar BV, Anvith PS. The comprehensive review on fat soluble vitamins. *OSRPHR*. 2015;5(11):12-28.
2. Blaner WS. The fat-soluble vitamins 100 years later: where are we now? *J Lipid Res*. 2013; 54(7): 1716-1718.
3. Rosenfeld L. Vitamine—vitamin. The early years of discovery. *Clinical Chemistry*. 1997;43(4):680-685.
4. Maqbool, MA, Aslam M, Akbar W, Iqbal Z. Biological importance of vitamins for human health: A review. *J Agric Basic Sci*. 2017;2(3):50-58.
5. Grebe SK, Singh RJ. LC-MS/MS in the Clinical Laboratory - Where to From Here? *Clin Biochem Rev*. 2011;32:5–31.
6. Ross C. Vitamin A and Carotenoids. In: Shils ME, Shike M, editors. *Modern nutrition in health and disease*. 10th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 305-27.
7. Rohde CM, DeLuca H. Bone resorption activity of all-trans retinoic acid is independent of vitamin D in rats. *J Nutr*. 2003;133(3):777–783.
8. Sowers MF, Wallace RB. Retinol, supplemental vitamin A and bone status. *J Clin Epidemiol*. 1990;43(7):693-9.
9. Omenn GS, Goodman GE, Thornquist MD, Balmes J, Cullen MR, Glass A, Keogh JP, Meyskens FL, Valanis B, Williams JH, Barnhart S, Hammar S. Effects of a combination of beta-carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. 1996; 334(18):1150–1155
10. Longnecker MP, Newcomb PA, Mittendorf R, Greenberg ER, Willett WC. Intake of carrots, spinach, and supplements containing vitamin A in relation to risk of breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6(11):887-92.
11. Rigtrup KM, Ong DE. A retinyl ester hydrolase activity intrinsic to the brush border membrane of rat small intestine. *Biochemistry*. 1992;31(11):2920-6.
12. Erdman JW, Bierer TL, Gugger ET. Absorption and transport of carotenoids. *Ann N Y Acad Sci*. 1993;691(1):76-85.
13. Reboul E. Absorption of vitamin A and carotenoids by the enterocyte: focus on transport proteins. *Nutrients*. 2013;5(9):3563-81.
14. Chen W, Chen G. The Roles of Vitamin A in the regulation of carbohydrate, lipid, and protein metabolism. *J Clin Med*. 2014;3(2):453-79.
15. Nayak N, Harrison EH, Hussain MM. Retinyl ester secretion by intestinal cells: a specific and regulated process dependent on assembly and secretion of chylomicrons. *J Lipid Res*. 2001;42(2):272-80.
16. Ross C. Vitamin A. In: Coates PM, Blackman MR, Cragg GM, Levine M, Moss J, White JD, editors. *Encyclopedia of dietary supplements*. New York: Marcel Dekker; 2005. p. 713.

17. D'Ambrosio DN, Clugston RD, Blaner WS. Vitamin a metabolism: An update. *Nutrients*. 2011;3(1):63-103.
18. O'Byrne SM, Blaner WS. Retinol and retinyl esters: biochemistry and physiology Thematic Review Series: Fat-Soluble Vitamins: Vitamin A. *J Lipid Res*. 2013;54(7):1731-43.
19. Khillan JS. Vitamin A/Retinol and maintenance of pluripotency of stem cells. *Nutrients*. 2014;6(3):1209-22.
20. Blomhoff R, Green MH, Green JB, Berg T, Norum KR. Vitamin A metabolism: new perspectives on absorption, transport, and storage. *Physiol Rev*. 1991;71(4):951-90.
21. Berson EL, Rosner B, Sandberg MA, Hayes KC, Nicholson BW, Weigel-DiFranco C, Willett W. A randomized trial of vitamin A and vitamin E supplementation for retinitis pigmentosa. *Arch Ophthalmol*. 1993; 111(6):761-72.
22. dePee S, Dary O. Biochemical indicators of vitamin A deficiency: serum retinol and serum retinol binding protein. *J Nutr*. 2002;132(9 Suppl):2895-901.
23. WHO. Global prevalence of vitamin A deficiency in populations at risk 1995–2005. WHO global database on vitamin A deficiency. Geneva: World Health Organization. 2009.
24. Velíšek J, Cejpek K. Biosynthesis of Food Constituents: Vitamins. 1. Fat-Soluble Vitamins – a Review. *Czech J Food Sci*. 2017;25: 1–16.
25. Holick MF. Resurrection of vitamin D deficiency and rickets. *J Clin Invest*. 2006;116(8):2062-72.
26. Cranny A, Weiler HA, O'Donnell S, Puil L. Summary of evidence-based review on vitamin D efficacy and safety in relation to bone health. *AJCN*. 2008; 88:513-519.
27. Haroon M, Regan MJ. Vitamin D deficiency: the time to ignore it has passed. *Int J Rheum Dis*. 2010;13(4):318-23.
28. Beard JA, Bearden A, Striker R. Vitamin D and the anti-viral state. *J Clin Virol*. 2011;50(3):194-200.
29. Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models. *Am J Clin Nutr*. 2004;80(6 Suppl):1721S-4S.
30. Van den Bemd GJ, Pols HA, van Leeuwen JP. Anti-tumor effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 and vitamin D analogs. *Curr Pharm Des*. 2000; 6(7):717-32.
31. Rucker D, Ravid A, Liberman UA, Garach-Jehoshua O, Koren R. 1,25-Dihydroxyvitamin D3 potentiates the cytotoxic effect of TNF on human breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1994;106(1-2):157-62.
32. Mathiasen IS, Hansen CM, Foghsgaard L, Jaattela M. Sensitization to TNF-induced apoptosis by 1,25-dihydroxy vitamin D3 involves up-regulation of the TNF receptor 1 and cathepsin B. *Int J Cancer*. 2001;93(2):224-31.
33. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporos Int*. 2009;20(11):1807-20.

34. Bozkaya G, Örmən M, Bilgili S, Aksit M. D Vitamini için güneşten yeterince faydalanıyor muyuz? *Türk Klinik Biyokimya Derg.* 2017;15(1): 24-29.
35. Armas LA, Hollis BW, Heaney RP. Vitamin D2 is much less effective than vitamin D3 in humans. *J Clin Endocrinol Metab.* 2004;89(11):5387-91.
36. Amiot-Carlin MJ. Digestion and absorption of lipophilic food micronutrients. In: McClements DJ, Decker EA, editors. *Designing functional foods: Measuring and controlling food structure breakdown and nutrient absorption*: Elsevier; 2009.
37. Wolpowitz D, Gilchrist BA. The vitamin D questions: how much do you need and how should you get it? *J Am Acad Dermatol.* 2006; 54(2):301-17.
38. Albahrani AA, Greaves RF. Fat-soluble vitamins: Clinical indications and current challenges for chromatographic measurement. *Clin Biochem Rev.* 2016;37(1):27-47.
39. Kochupillai N. The physiology of vitamin D: current concepts. *Indian J Med Res.* 2008;127(3):256-62.
40. Bikle D. Nonclassic actions of vitamin D. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94(1):26-34.
41. Holick MF. Vitamin D deficiency. *N Engl J Med.* 2007;357(3):266-81.
42. Lips P. Vitamin D physiology. *Prog Biophys Mol Biol.* 2006;92(1):4-8.
43. Panda DK, Miao D, Bolivar I, Li J, Huo R, Hendy GN, et al. Inactivation of the 25-hydroxyvitamin D 1alpha-hydroxylase and vitamin D receptor demonstrates independent and interdependent effects of calcium and vitamin D on skeletal and mineral homeostasis. *J Biol Chem.* 2004;279(16):16754-66.
44. Herrmann M. The measurement of 25-hydroxy vitamin D - an analytical challenge. *Clin Chem Lab Med.* 2012;50:1873-5.
45. Jones G. Metabolism and biomarkers of vitamin D. *Scand J Clin Lab Invest Suppl.* 2012;243:7-13.
46. Terry P, Baron JA, Bergkvist L, Holmberg L, Wolk A. Dietary calcium and vitamin D intake and risk of colorectal cancer: a prospective cohort study in women. *Nutr Cancer.* 2002;3(1):39-46.
47. Sigmund CD. Regulation of renin expression and blood pressure by vitamin D3. *J Clin Invest.* 2002;110(2):155-156.
48. Lips P, Hosking D, Lippuner K, Norquist JM, Wehren L, Maalouf G, et al. The prevalence of vitamin D inadequacy amongst women with osteoporosis: an international epidemiological investigation. *J Intern Med.* 2006;260(3):245-254.
49. Houghton LA, Vieth R. The case against ergocalciferol (vitamin D2) as a vitamin supplement. *Am J Clin Nutr.* 2006;4(4): 694-697.
50. Feskanich D, Singh V, Willett WC, Colditz GA. Vitamin A intake and hip fractures among postmenopausal women. *JAMA.* 2002; 287(1): 47-54.
51. Artaza J, Mehrora R, Norris K. Vitamin D and cardiovascular system. *Clin J Am Soc Nephrology.* 2009;4:1515-22.

52. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(Suppl):1678–88.
53. Morgan SL, Weinsier RL. *Fundamentals of clinical nutrition*, Mosby, St. Louis 1998; p.3.
54. Jacobus CH, Holick MF, Shao Q, et al. Hypervitaminosis D associated with drinking milk. *N Engl J Med.* 1992;326:1173.
55. Vogiatzi MG, Jacobson-Dickman E, DeBoer MD. Drugs, and Therapeutics Committee of The Pediatric Endocrine Society. Vitamin D supplementation and risk of toxicity in pediatrics: a review of current literature. *J Clin Endocrinol Metab.* 2014; 99:1132.
56. Wortsman J, Matsuoka LY, Chen TC, et al. Decreased bioavailability of vitamin D in obesity. *Am J Clin Nutr.* 2000;72:690.
57. DeLuca HF. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. *Am J Clin Nutr.* 2004;80(6 Suppl):1689-96.
58. Cook-Mills JM, Avila PC. Vitamin E and D regulation of allergic asthma immunopathogenesis. *Int Immunopharmacol.* 2014; 23(1):364-72.
59. Wassall HJ, Devereux G, Seaton A, Barker RN. Complex effects of vitamin E and vitamin C supplementation on in vitro neonatal mononuclear cell responses to allergens. *Nutrients.* 2013;5(9):3337-51.
60. Nazrun AS, Norazlina M, Norliza M, Nirwana SI. The anti-inflammatory role of vitamin e in prevention of osteoporosis. *Adv Pharmacol Sci.* 2012;2012:142702.
61. Packer L. Protective role of vitamin E in biological systems. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(4 Suppl):1050-5.
62. Clarke MW, Burnett JR, Croft KD. Vitamin E in human health and disease. *Crit Rev Clin Lab Sci.* 2008;45(5):417-50.
63. Alkhenizan A, Hafez K. The role of vitamin E in the prevention of cancer: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Ann Saudi Med.* 2007;27(6):409-14.
64. Kline K, Lawson KA, Yu W, Sanders BG. Vitamin E and breast cancer prevention: current status and future potential. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2003;8(1):91-102.
65. Dror DK, Allen LH. Vitamin E deficiency in developing countries. *Food Nutr Bull.* 2011;32(2):124-43.
66. Burton GW, Traber MG. Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annu Rev Nutr.* 1990;10:357-82.
67. Pierpaoli E, Viola V, Pilolli F, Piroddi M, Galli F, Provinciali M. Gamma- and delta-tocotrienols exert a more potent anticancer effect than alpha-tocopheryl succinate on breast cancer cell lines irrespective of HER-2/neu expression. *Life Sci.* 2010;86(17-18):668-75.
68. Comitato R, Nesaretnam K, Leoni G, Ambra R, Canali R, Bolli A, et al. A novel mechanism of natural vitamin E tocotrienol activity: involvement of ERbeta signal transduction. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2009;297(2):E427-37.

69. Eggermont E. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. *Eur J Pediatr*. 2006;165(7):429-34.
70. Combs GF. *The vitamins: Fundamental aspects in nutrition and health*. Academic Press, USA. 2012;4:3-6.
71. Jeanes YM, Hall WL, Ellard S, Lee E, Lodge JK. The absorption of vitamin E is influenced by the amount of fat in a meal and the food matrix. *Br J Nutr*. 2004;92(04):575-9.
72. Kayden HJ, Traber MG. Absorption, lipoprotein transport, and regulation of plasma concentrations of vitamin E in humans. *J Lipid Res*. 1993;34(3):343-58.
73. Mardones P, Rigotti A. Cellular mechanisms of vitamin E uptake: relevance in α -tocopherol metabolism and potential implications for disease. *J Nutr Biochem*. 2004;15(5):252-60.
74. Maas AH, van der Schouw YT, Beijerinck D, Deurenberg JJ, Mali WP, Grobbee DE, et al. Vitamin K intake and calcifications in breast arteries. *Maturitas*. 2007; 56(3):273–279.
75. Neuzil J, Weber T, Schröder A, Lu M, Ostermann G, Gellert N, Mayne GC, et al. Induction of cancer cell apoptosis by α -tocopheryl succinate: molecular pathways and structural requirements. *FASEB J*. 2001;15(2):403-15.
76. Mamede AC, Tavares SD, Abrantes AM, Trindade J, Maia JM, Botelho MF. The role of vitamins in cancer: a review. *Nutr Cancer*. 2011;63(4):479-94.
77. Masaki KH, Losonczy KG, Izmirlian G, et al. Association of vitamin E and C supplement use with cognitive function and dementia in elderly men. *Neurology*. 2000;54(6):1265–1272.
78. Johansson S, Melhus H. Vitamin A antagonizes calcium response to vitamin D in man. *J Bone Miner Res*. 2001;16(10):1899-905.
79. Jenab M, Bueno-de-Mesquita HB, Ferrari P, van Duijnhoven FJ, Norat T, Pischon T, et al. Association between pre-diagnostic circulating vitamin D concentration and risk of colorectal cancer in European populations: a nested case-control study. *BMJ*. 2010;340:b5500.
80. Mata-Granados JM, Cuenca-Acevedo R, Luque de Castro MD, Sosa M, Quesada-Gomez JM. Vitamin D deficiency and high serum levels of vitamin A increase the risk of osteoporosis evaluated by Quantitative Ultrasound Measurements (QUS) in postmenopausal Spanish women. *Clin Biochem*. 2010;43(13-14):1064-8.
81. Chai W, Bostick RM, Ahearn TU, Franke AA, Custer LJ, Cooney RV. Effects of vitamin D3 and calcium supplementation on serum levels of tocopherols, retinol, and specific vitamin D metabolites. *Nutr Cancer*. 2012;64(1):57-64.
82. Goncalves A, Roi S, Nowicki M, Dhaussy A, Huertas A, Amiot MJ, et al. Fat-soluble vitamin intestinal absorption: Absorption sites in the intestine and interactions for absorption. *Food Chem*. 2015;172:155-60.
83. MacDonald P, Dowd D, Nakajima S, Galligan M, Reeder M, Haussler C, et al. Retinoid X receptors stimulate and 9-cis retinoic acid inhibits 1, 25-dihydroxyvitamin D3-activated expression of the rat osteocalcin gene. *Mol Cell Biol*. 1993;13(9):5907-17.

84. 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.
85. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. 2010;75(7):477-88.
86. Hulshof PJ, Brouwer JT, Burema J, West CE. Bias and random error in retinol measurements of laboratories in countries with populations with mild to severe vitamin A deficiency. *Clin Chem*. 2002;48(11):2061-3.
87. Olmedilla B, Granado F, Gil-Martinez E, Blanco I, Rojas-Hidalgo E. Reference values for retinol, tocopherol, and main carotenoids in serum of control and insulin-dependent diabetic Spanish subjects. *Clin Chem*. 1997;43(6 Pt 1):1066-71.
88. Sadowski JA, Hood SJ, Dallal GE, Garry PJ. Phylloquinone in plasma from elderly and young adults: factors influencing its concentration. *Am J Clin Nutr*. 1989;50(1):100-8.
89. Carter GD. 25-Hydroxyvitamin D: a difficult Analyte. *Clin Chem*. 2012;58(3):486-8.
90. Cuerq C, Peretti N, Chikh K, Mialon A, Guillaumont M, Draï J, et al. Overview of the in vitro stability of commonly measured vitamins and carotenoids in whole blood. *Ann Clin Biochem*. 2015;52(Pt 2):259-69.
91. Greaves RF. Vitamin A – Serum Vitamin A Analysis. In: Preedy VR, editor. *Vitamin A and Carotenoids: Chemistry, Analysis, Function and Effects*: Royal Society of Chemistry; 2012.
92. Clark S, Youngman LD, Chukwurah B, Palmer A, Parish S, Peto R, et al. Effect of temperature and light on the stability of fat-soluble vitamins in whole blood over several days: implications for epidemiological studies. *Int J Epidemiol*. 2004;33(3):518-25.
93. Drammeh BS, Schleicher RL, Pfeiffer CM, Jain RB, Zhang M, Nguyen PH. Effects of delayed sample processing and freezing on serum concentrations of selected nutritional indicators. *Clin Chem*. 2008;54(11):1883-91.
94. Panteghini M, Forest JC. Standardization in laboratory medicine: new challenges. *Clin Chim Acta*. 2005;355(1-2):1-12.
95. Vesper HW, Thienpont LM. Traceability in laboratory medicine. *Clin Chem*. 2009;55(6):1067-75.
96. Panteghini M. Traceability as a unique tool to improve standardization in laboratory medicine. *Clin Biochem*. 2009;42(4-5):236-40.
97. Vesper HW, Miller WG, Myers GL. Reference materials and commutability. *Clin Biochem Rev*. 2007;28(4):139-47.
98. Cattozzo G, Franzini C, Melzi d'Eril GM. Commutability of calibration and control materials for serum lipase. *Clin Chem*. 2001;47(12):2108-13.
99. Miller WG, Myers GL, Rej R. Why commutability matters. *Clin Chem*. 2006;52(4):553-4.

100. Rami L, Roura M, Canalias F. Evaluation of commutability of several materials for harmonization alkaline phosphatase catalytic concentration measurements. *Clin Chim Acta*. 2012;413(15):1249-54.
101. Ricós C, Juvany R, Alvarez V, Jiménez CV, Perich C, Minchinela J, et al. Commutability between stabilized materials and fresh human serum to improve laboratory performance. *Clin Chim Acta*. 1997;263(2):225-38.
102. Ricós C, Juvany R, Simon M, Hernández A, Alvarez V, Jiménez C, et al. Commutability and traceability: their repercussions on analytical bias and inaccuracy. *Clin Chim Acta*. 1999;280(1):135-45.
103. Clark P, Kricka LJ, Whitehead TP. Matrix effects in clinical analysis: commutability of control materials between the Ektachem, Beckman and SMA 1260 glucose and urea methods. *Clin Chim Acta*. 1981;113(3):293-303.
104. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. *Clin Biochem Rev*. 2009;30(1):19-34.
105. Vogeser M, Seger C. Pitfalls associated with the use of liquid chromatography-tandem mass spectrometry in the clinical laboratory. *Clin Chem*. 2010;56(8):1234-44.
106. Ardrey RE. *Liquid Chromatography –Mass Spectrometry: An Introduction*. John Wiley & Sons. 2003.
107. Albahrani AA, Rotarou V, Roche PJ, Greaves RF. A simultaneous quantitative method for vitamins A, D and E in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Steroid Biochem Mol Biol*. 2016;159:41-53.
108. Holick MF. Vitamin D Status: Measurement, interpretation, and clinical application. *Ann Epidemiol*. 2009;19(2):73-78.
109. Greaves RF, Woollard GA, Hoad KE, Walmsley TA, Johnson LA, Briscoe S, et al. Laboratory medicine best practice guideline: vitamins A, E and the carotenoids in blood. *Clin Biochem Rev*. 2014;35(2):81-113.
110. Greaves R, Jolly L, Woollard G, Hoad K. Serum vitamin A and E analysis: comparison of methods between laboratories enrolled in an external quality assurance programme. *Ann Clin Biochem*. 2010;47(Pt 1):78-80.
111. Zhang H, Quan L, Pei P, Lin Y, Feng C, Guan H, et al. Simultaneous determination of Vitamin A, 25-hydroxyl vitamin D₃ α -tocopherol in small biological fluids by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2018;1079:1-8.
112. Alvarez JC, De Mazancourt P. Rapid and sensitive high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human plasma with photodiode-array ultraviolet detection. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl*. 2001;755(1-2):129-35.

113. Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clin Chem.* 2003;49(9):1521-4.
114. Quesada JM, Mata-Granados JM, Luque De Castro MD. Automated method for the determination of fat-soluble vitamins in serum. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;89-90(1-5):473-7.
115. Mata-Granados JM, Luque De Castro MD, Quesada JM. Fully automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ hydroxyvitamins, and vitamins A and E in human serum by HPLC. *J Pharm Biomed Anal.* 2004;35(3):575-82.
116. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clin Chem.* 2006;52(6):1120-6.
117. Tsugawa N, Suhara Y, Kamao M, Okano T. Determination of 25-hydroxyvitamin D in human plasma using high-performance liquid chromatography--tandem mass spectrometry. *Anal Chem.* 2005;77(9):3001-7.
118. Andreoli R, Manini P, Poli D, Bergamaschi E, Mutti A, Niessen WM. Development of a simplified method for the simultaneous determination of retinol, alpha-tocopherol, and beta-carotene in serum by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization. *Anal Bioanal Chem.* 2004;378(4):987-94.
119. PriegoCapote F, Jiménez JR, Granados JM, de Castro MD. Identification and determination of fat-soluble vitamins and metabolites in human serum by liquid chromatography/triple quadrupole mass spectrometry with multiple reaction monitoring. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(11):1745-54.
120. Midttun Ø, Ueland PM. Determination of vitamins A, D and E in a small volume of human plasma by a high-throughput method based on liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2011;25(14):1942-8.
121. Paliakov EM, Crow BS, Bishop MJ, Norton D, George J, Bralley JA. Rapid quantitative determination of fat-soluble vitamins and coenzyme Q-10 in human serum by reversed phase ultra-high pressure liquid chromatography with UV detection. *J Chromatogr B.* 2009;877(1):89-94.
122. Semeraro A, Altieri I, Patriarca M, Menditto A. Evaluation of uncertainty of measurement from method validation data: an application to the simultaneous determination of retinol and alpha-tocopherol in human serum by HPLC. *J Chromatogr B.* 2009;877(11):1209-1215.

ÖZGEÇMİŞ VE İLETİŞİM BİLGİLERİ

I. BİREYSEL BİLGİLER

Adı soyadı **Meryem Sebla Ertuğrul**
Doğum yeri ve tarihi Ankara, 27.08.1992
T.C. Kimlik numarası 55771534254
Telefon 05333156948
E-mail seblauzun@gmail.com
Adres Mehmet Akif Ersoy Mahallesi YDA Park Avenue E:14
Yenimalle/Ankara
Yabancı dil İngilizce (İleri Seviye)

II. EĞİTİM

2017-2019 Sağlık Bilimleri Üniversitesi Gülhane Sağlık Bilimleri
Enstitüsü- Tıbbi Biyokimya Yüksek Lisans
2010-2016 Orta Doğu Teknik Üniversitesi- Kimya Lisans
2006-2010 Ankara Lisesi (Anadolu)- Fen Bilimleri-Lise

III. MESLEKİ DENEYİM

2017- **Gülhane Eğitim ve Araştırma Hastanesi-Tıbbi Biyokimya
Anabilim Dalı Yüksek Lisans Öğrencisi**
LC-MS/MS ve HPLC cihazlarında yapılacak AR-GE
çalışmaları için literatür araştırması yapmak
Literatür araştırması sonucu uygun bulunan metot için
deneme çalışmaları organize etmek
Başarılı olan deneme çalışmalarının validasyon çalışmalarını
gerçekleştirerek, rutin çalışmalara hazır hale getirmek

2017 (Ocak-Kasım) **Düzen Laboratuvarlar Grubu-Özel Kimya Birimi AR-GE
Asistanı**

	Yeni kurulacak metotlar için literatür araştırması yapmak
	Literatür araştırması sonucu uygun bulunan metot için deneme çalışmaları organize etmek
	Başarılı olan deneme çalışmaları için validasyon ve verifikasyon çalışmalarını gerçekleştirmek
	Yeni kurulan testlerin çalışma prosedürlerini yazmak
	Yeni testler için rutin çalışma planı oluşturmak
2015 (Temmuz-Eylül)	Eti Maden İşletmeleri Genel Müdürlüğü-Teknoloji Geliştirme Dairesi Başkanlığı, Stajyer
	X-ray Difraksiyon, İndüktif Eşleşmiş Plazma-Optik Emisyon Spektrometresi ve Atomik Absorpsiyon Spektrometresi kullanarak numune analizi yapmak
	Boraks dekahidroksit ve boraks pentahidroksit kullanarak kristal analizi yapmak
	Titrasyon metodunu kullanarak çeşitli numunelerin analizini yapmak

IV. CİHAZ BECERİLERİ

LC-MS/MS	Homosistein, Metil Malonik Asit ve Metiyonin moleküllerinin tayini Yağda çözünen vitaminlerin tayini Homosistein, Sistein, Metiyonin moleküllerinin tayini İdrarda kortizol molekülünün tayini
GC-MS/MS	Kolesterol, Kolestanol ve 7-Dihidro kolesterol analizi
HPLC	Serum örneğinde Metotreksat tayini için yeni metot dizaynı
Florimetre	Lizozomal Depo Hastalıklarının teşhisinde kullanılan 24 ayrı lizozomal enzim düzeyinin belirlenmesi için yeni metotlar dizayn etmek ve enzim düzeylerini lökosit, serum ve kuru kan örneklerinde tespit etmek
Spektrofotometre	Serumda Biotinidaz aktivitesinin tayini İdrarda total Glikozaminoglikan tayini

V. ESERLER

Uluslararası Hakemli Dergilerde Yayımlanan Makaleler

1. ERTUĞRUL SEBLA, SERTOĞLU ERDİM, ÖZGÜRTAŞ TANER (2018).
Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for Quantitation of Methotrexate in Plasma. Annals of Chromatography and Separation Techniques

Uluslararası Bilimsel Toplantılarda Sunulan ve Bildiri Kitaplarında Basılan

Bildiriler

2. ERTUĞRUL SEBLA, SERTOĞLU ERDİM, ÖZGÜRTAŞ TANER (2018).
Simultaneous Determination of Fat Soluble Vitamins by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry. 5th EFLM-UEMS European Joint Congress in Laboratory Medicine Laboratory Medicine at the Clinical Interface , 243-243, (Özet bildiri)
3. ERTUĞRUL SEBLA, SERTOĞLU ERDİM, ÖZGÜRTAŞ TANER (2018).
Development and Validation of High Performance Liquid Chromatography Method for the Quantitation of Methotrexate in Plasma. KBUD Uluslararası Katılımlı Kongre Lab Expo 2018, (Özet bildiri)

VI. SERTİFİKALAR & KATILINAN EĞİTİMLER

1. Uluslararası Katılımlı Kongre&Lab Expo 2018 ve 1. Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları Sempozyumu-CLSI Doküman Eğitim Kursu (2018)
2. Klinik Tanı Kitleri Eğitimi-Kantitatif Amino Asit Tayini&Kantitatif Organik Asit Tayini- Sağlık Bilimleri Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı (Jasem A.Ş.) (2018)
3. GC-MS/MS Cihaz Eğitimi- Sağlık Bilimleri Üniversitesi (Ant Teknik Pazarlama ve Dış Tic. Ltd. Şti.) (2018)
4. Eppendorf Pipet Semineri- Sağlık Bilimleri Üniversitesi(İncekaralar Tıbbi Cihazlar Ticaret A.Ş.) (2018)
Onur Belgesi -Orta Doğu Teknik Üniversitesi (2014)

VII. ÖDÜLLER

1. Sözlü Sunum Üçüncülük, Klinik Biyokimya Uzmanları Derneği, (2018)

VIII. PROJELER

1. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi Yağda Çözünen Vitaminlerin Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi Yöntemi İle Eşzamanlı Tayin Metodunun Geliştirilmesi ve Optimizasyonu (Yardımcı Araştırmacı) (2018)
2. Sağlık Bilimleri Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projesi, Behçet 2018 üveitli hastalarda vasküler endotelyal growth faktör (VEGF) gen polimorfizmleri ile serum VEGF ve VEGF reseptör (VEGFR) düzeylerinin belirlenmesi (Yardımcı Araştırmacı) (2018)