

# D Vitamini Ve Metabolomik

## *Metabolomics Approach in Vitamin D*

**Bilge Karatoy Erdem Halide Akbas**

Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı, Antalya, Türkiye

**Başvuru Tarihi:** 16 Temmuz 2018

**Kabul Tarihi:** 11 Eylül 2018

### ÖZET

D vitamini, kemik sağlığındaki önemli rolünün yanı sıra diyabet, kanser ve kardiyovasküler hastalıklar gibi pek çok hastalık ile bağlantısı olan ve günümüzde hormon olarak kabul edilen bir moleküldür. D vitamini düzeyinin değerlendirilmesinde, uzun bir yarı ömre sahip olduğundan 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] tercih edilmektedir. Ancak D vitamini metabolitlerinin çeşitli hastalıklardaki patofizyolojik rolünü değerlendirmek için tüm metabolomun incelenmesi gerekmektedir. Bunun için total 25 (OH) D düzeylerinin yanı sıra serbest/biyoyararlanılabilir formlar, D vitamini bağlayıcı protein (DBP), parathormon ve 1, 25 (OH) 2 D<sub>3</sub>, 3-epi-25 (OH) D, 24,25 (OH) 2 D<sub>3</sub> gibi diğer belirteçleri içeren metabolomik bir panele gereksinim vardır. Gelecekte D vitamini metabolomiğinin kapsamlı bir şekilde incelenmesi için kütle spektrometreleri potansiyel vaat etmektedir.

**Anahtar sözcükler:** D vitamini, 25(OH)D, 1,25(OH)2D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D, 24,25(OH)2D<sub>3</sub> vitamin D, 25(OH)D, 1,25(OH)2D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D, 24,25(OH)2D<sub>3</sub>

### ABSTRACT

Vitamin D is a molecule, now seen as a hormone, it plays an important role in bone health, it is also associated with many diseases, such as diabetes, cancer and cardiovascular problems. 25-hydroxyvitamin D [25(OH)D] is used to estimate vitamin D status because its long half-life. However, to understand the pathophysiological role of vitamin D metabolites on various diseases, we need to evaluate all relevant metabolome. For this reason, a metabolomic panel is required to evaluate the vitamin D status that measurement of 25 (OH) D and other vitamin D biomarkers, e.g., 1 $\alpha$ ,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, 3-epi-25 (OH) D, 24,25 (OH)<sub>2</sub> D<sub>3</sub>, vitamin D binding protein (DBP), free/bioavailable 25 (OH) D and parathyroid hormone. Mass spectrometers are promising for comprehensive analysis of vitamin D metabolites in the future.

**Key words:** Vitamine D, 25(OH)D, 1,25(OH)2D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D, 24,25(OH)2D<sub>3</sub> vitamin D, 25(OH)D, 1,25(OH)2D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D, 24,25(OH)2D<sub>3</sub>

**Yazışma adresi:** Halide Akbas

Orcid: <https://orcid.org/0000-0002-7849-6531>

Akdeniz Üniversitesi, Tıbbi Biyokimya, Antalya, Türkiye

e-mail: halideakbas@akdeniz.edu.tr

## GİRİŞ

### D Vitamini

D vitamini, yağda çözünen vitaminler grubunda incelenen ve hormon benzeri görevleri olan geniş bir sekosteroid sınıfını tanımlamaktadır. D vitamini etkisi gösteren bileşikler arasında biyokimyasal açıdan önemlileri kolekalsiferol (vitamin D<sub>3</sub>) ve ergokalsiferol (vitamin D<sub>2</sub>)'dür. Her iki form kimyasal olarak benzer olsalar da, biyolojik kökenleri farklıdır; kolekalsiferol güneş ışınlarının etkisiyle deride endojen olarak sentezlenirken, ergokalsiferol bitkisel kaynaklı olup en çok maya ve mantarlarda bulunan ergosterolün morötesi ışınlarla maruz kalmasıyla oluşur. D vitamini, kalsiyum, fosfor ve parathormon metabolizması, vücudun büyüme ve gelişmesi ve bağışıklıktaki önemli rolleriyle bilinir, ancak diyabet, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, otoimmünite, depresyon ve kardiyovasküler hastalıklar gibi daha geniş bir yelpazede yoğun bir şekilde incelenmektedir (1). Bu derleme, D vitamini metabolitlerinin klinik önemi ve ölçüm teknikleri ile ilgili son gelişmeleri sunmayı amaçlamaktadır.

### D Vitamini Metabolizması

D vitamini sentezinde ilk basamak, 290-315 nm aralığındaki UVB güneş ışınlarının etkisiyle, ciltte bulunan 7-dehidrokolesterolün (Provitamin D) Previtamin D<sub>3</sub> ve vitamin D<sub>3</sub>'e (kolekalsiferol) dönüşmesidir. Deride oluşan veya besinlerle intestinal olarak alınan D vitamini (kolekalsiferol veya ergokalsiferol), karaciğerde 25-hidroksilaz (CYP2R1) enzimi ile 25-hidroksikolekalsiferole [25(OH)D<sub>3</sub>, kalsidiol] dönüşür, 25(OH)D<sub>3</sub> de böbreklerde ve

bir çok dokuda bulunan 1 $\alpha$ -hidroksilaz (CYP27B1) ile aktif vitamin D metaboliti olan 1,25-dihidroksikolekalsiferole [1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, kalsitriol] dönüşür. Böbrekteki 1,25(OH)<sub>2</sub>D üretimi, serum fosfor, kalsiyum, parathormon (PTH) ve fibroblast büyüme faktörü 23 (FGF-23) konsantrasyonları dahil olmak üzere birçok faktörden etkilenir. D vitamini metabolizması, geniş dinamik konsantrasyon aralığında bir dizi farklı metabolit üretir. İnsanda yapılan çalışmalarda dolaşımda 50'den fazla metabolit tanımlanmıştır (2). Gerçek sayının, epimerizasyon ve laktonizasyon gibi çeşitli biyokimyasal süreçler nedeniyle daha yüksek olduğu düşünülmektedir (3). D vitamini metabolitlerinin büyük metabolomik bir ağın parçaları olarak önemli roller üstlendiği düşünülmektedir (Tablo 1). D vitamini bileşikleri dolaşımda yaklaşık %85 oranında D vitamini bağlayıcı proteine (DBP) ve daha az oranda (%14.6) albümine bağlanırlar (1, 4). D vitamini bağlayıcı protein (DBP) dolaşımdaki D vitamininin ana taşıyıcısıdır ve hedef dokularda vitamin D konsantrasyonunu ve biyoyararlanımını düzenlemede önemli bir rol oynar. Son çalışmalar, D vitamini bağlayıcı proteinin (DBP) konsantrasyonunun ve genotipinin kandaki 25(OH)D'nin biyoyararlanımını belirleyen önemli faktörler olduğunu belirtmektedir. Serumda D vitamininin yaklaşık % 0.4-3'ü serbest olarak bulunur. Özellikle gebelerde, hemodiyaliz hastalarında, kronik böbrek hastalığında, karaciğer yetmezliğinde, mesane ve pankreas kanserlerinde, serumda serbest 25(OH)D ölçümünün, toplam 25(OH)D ölçümünden daha iyi tanısal bilgi sağladığı gösterilmiştir.

**Tablo 1.** Önemli D Vitamini Metabolitleri  
**Table 1.** The Important Metabolites of Vitamin D

ÖNEMLİ D VİTAMİNİ METABOLİTLERİ
25(OH)D (25-hidroksivitamin D)
1,25(OH)2D (1,25-dihidroksivitamin D)
24,25(OH)2D (24,25-dihidroksivitamin D)
1,24,25(OH)3D (1,24,25-trihidroksivitamin D)
3-EPI-25(OH)D (3-epi-25-hidroksivitamin D)
25(OH)D-26,23-LAKTON (25-hidroksivitamin D-26,23-lakton)
1,25(OH)2D-23,26-LAKTON (1,25-dihidroksivitamin D-23,26-lakton)
25(OH)DS (Vitamin D-3 $\beta$ -sulfat)

## Klinik Açından D Vitamini

Serumda uzun bir yarı ömrü (yaklaşık 20 gün) olan ve rutin analizler ile kolay tanımlanabilen total 25(OH)D [25(OH)D<sub>3</sub> ve 25(OH)D<sub>2</sub> toplamı], D vitamini durumunun en geçerli belirleyicisi olarak tüm dünyada kabul edilmiştir. Diğer metabolitler genellikle çok daha düşük konsantrasyonlarda bulunan ve patofizyolojik rolleri halen yoğun bir şekilde araştırılan türlerdir. Bununla birlikte, 25(OH)D'nin optimum eşik konsantrasyonu halen tartışılmaktadır. Dünya genelinde D vitamini eksikliği küresel bir salgın olarak kabul edilmekte ve çok yaygın görülmektedir. 25(OH)D<sub>3</sub> düzeylerinde eksiklik <20 ng/mL, yetersizlik 21-29 ng/mL, yeterli düzey ise >30 ng/mL olarak tanımlanmaktadır. Ülkemizde ise sık gözlenen D vitamini eksikliğin oranı, yetersizliğinden daha fazladır. American Ulusal Tıp Enstitüsü (IOM) kemik sağlığı için 50 nmol/L'nin (20 ng/mL) üzerindeki düzeyleri önermektedir (5).

Tüm popülasyonlarda gözlenen D vitamini yetersizliği nedeniyle, D vitamini takviyesi ve hangi formun daha etkili olduğu güncel bir karmaşa yaratmıştır. Bireyler arasında D vitamini desteğine verilen yanıtlar da farklılık gösterebildiğinden bazen tedaviye rağmen dirençli D vitamini yetersizliği gözlenebilir (6). Vitamin D<sub>2</sub>'nin vitamin D<sub>3</sub>'ten biyolojik olarak daha az aktif olduğu çeşitli çalışmalarda bildirilmiştir. Vitamin D<sub>2</sub> takviyesi Avrupa'da daha az kullanılmasına rağmen, Avrupa dışında tercih edilmektedir. Her iki form da dolaşımda hidroksillenmiş olarak; 25(OH)D<sub>2</sub> ve 25(OH)D<sub>3</sub> şeklinde bulunabilir. İki formun biyoeşdeğer olup olmadığı uzun yıllardır tartışılmaktadır. Bir çok çalışma, vitamin D<sub>2</sub>'nin serumdaki total 25(OH)D konsantrasyonunu vitamin D<sub>3</sub> ile aynı düzeyde yükseltmediğini göstermiştir, fakat bu bulgu bazı araştırmacılar tarafından desteklenmemiştir (7). Bazı çalışmalar, D<sub>2</sub> vitamini desteğinden sonra serum 25(OH)D<sub>3</sub>'ün düştüğünü göstermiştir ancak, bu çalışmaların istatistiksel gücü; spesifik popülasyon gruplarında yapılması ve sadece total 25(OH)D ölçülmesi nedeniyle yetersiz bulunmuştur (7). Günde 1000-1600 IU D<sub>2</sub> veya D<sub>3</sub> vitamininin uygulandığı çeşitli çalışmaları değerlendiren bir

meta-analizde, total 25(OH)D düzeylerinde anlamlı bir fark görülmediği bildirilmiştir (8). 7 ayrı çalışmayı içeren bir başka meta-analizde ise vitamin D<sub>3</sub> takviyesinin D<sub>2</sub>'ye göre 25(OH)D düzeylerini daha fazla yükselttiği belirtilmektedir. Ancak bu çalışmaların büyük bir kısmında bolus vitamin uygulaması yapılmıştır (7).

## D Vitamini Metabolitleri

25(OH)D<sub>3</sub> ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> daha fazla metabolize olarak, böbrekte 24-hidroksilaz (CYP24A1) enzimi ile 24,25-dihidroksi vitamin D<sub>3</sub> [24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>] ve 1,24,25-trihidroksivitamin D<sub>3</sub> [1α,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>]’e dönüşmektedir. 24-hidroksilaz genindeki mutasyonlar, kısmi veya total aktivite kaybı sonucunda hiperkalsemik durumlara yol açabilir (6). 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> metabolitinin embriyogenez, kırkardak gelişimi ve kırık onarımında rol oynadığı bilinmekle birlikte, fizyolojik rolü halen araştırılmaktadır.

Günümüzde 24,25(OH)<sub>2</sub>D ve 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D gibi metabolitlerin ölçümünün, D vitamininin sıklıkla tartışılan iki formu (D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub>) konusundaki gerçeklere çok büyük bir katkı sağlayacağı üzerinde durulmaktadır. Ayrıca, dolaşımdaki 25(OH)D<sub>3</sub> konsantrasyonu ile osteoporoz ve kırık riski gibi klinik sonuçlar arasındaki ilişki, tüm popülasyonlarda her zaman aynı oranda gözlenemeyebilir. Bu nedenle serum 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün yanı sıra 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>/25(OH)D<sub>3</sub> oranının, vitamin D katabolizmasının potansiyel belirteçleri ve D vitamini desteğine yanıtın öngörücüsü olarak kullanılabileceği bildirilmektedir (6).

25(OH)D<sub>3</sub> ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün C3 epimerlerinin tanımlanmasıyla, insan vücudunda D vitamini durumunun göstergesi olarak metabolitlerin kullanımı konusu yoğun bir şekilde araştırılmaktadır. Bu epimerlerin bebeklerde ve yenidoğanlarda toplam 25(OH)D<sub>3</sub> konsantrasyonunun yaklaşık %21'ini oluşturduğu, erişkinlerde ise daha düşük konsantrasyonlarda (yaklaşık %6) bulunduğu bildirilmektedir (9). 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub> metaboliti, endojen olarak üretilir ve dolaşımdaki konsantrasyonu D vitamini desteğini takiben artar; ancak bu metabolitin fizyolojik önemi henüz anlaşılammıştır.

Literatürde de optimal D vitamini durumunun belirlenmesinde serum 25(OH)D düzeylerinin yanı sıra metabolitlerin ölçülmesi sıklıkla önerilmektedir. Güncel bir çalışmada, tek ve yüksek doz D<sub>3</sub> vitamini (100.000 IU) uygulamasının serum 25(OH)D<sub>3</sub> ve metabolitleri 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi(OH)D<sub>3</sub>, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün konsantrasyonlarında önemli bir artışa yol açtığı gösterilmiştir (6). Bu çalışmada, D vitamini tedavisine yanıtın izlenmesinde heterojen olduğu için sadece serum 25(OH)D düzeylerinin kullanımının yeterli olmadığı öne sürülmektedir.

### **D Vitamini Metabolitlerinin Ölçüm Yöntemleri**

Günümüzde rutin analizlerin büyük çoğunluğu immunoassay ile gerçekleştirilmektedir (10). Sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) tekniği analitik özgüllüğü ve duyarlılığı nedeniyle ana metabolit olan 25-hidroksivitamin D [25(OH)D] analizi için altın standart yöntem olarak kabul edilmektedir (11). Ancak bu yöntemin deteksiyon limitleri bile, genellikle serum/plazmada düşük fizyolojik konsantrasyonlarda bulunan metabolitleri ölçmekte yetersiz kalmaktadır. D vitamini metabolitlerinin ölçümleri, analitlerin lipofilik doğası, taşıyıcı proteine (DBP) sıkı bağlanması, düşük iyonizasyon verimi gibi birçok nedenden dolayı zorluklar içermektedir (1, 12). Ayrıca izomerik ve izobarik bileşenlerden gelen interferanslar çok zorlayıcıdır. D vitamini metabolitlerinin hastalıklardaki patolojik etkilerini ve işlevlerini tam anlamıyla incelemek için özellikle 25-hidroksivitamin D dışında, az bulunan türlerin de konsantrasyonlarının belirlenmesi gereklidir. Bu nedenle literatürde D vitamini metabolitlerini geniş bir aralıkta, tek veya çoklu olarak ölçebilen kütle spektrometrik yeni yöntemler sıklıkla yer almaya başlamıştır (13).

### **25 (OH)D**

25(OH)D ölçümünde ilk kullanılan yöntem 1971'de bildirilen vitamin D bağlayıcı protein (DBP)'in bağlayıcı olarak kullanıldığı kompetitif protein bağlama yöntemidir. Yöntemin avantajı DBP'nin 25(OH)D<sub>2</sub> ile 25(OH)D<sub>3</sub>'ü eşit

olarak tanınmasıdır. Yöntemin dezavantajları ise ölçümün 24, 25(OH)<sub>2</sub>D; 25, 26(OH)<sub>2</sub>D; 23-lactone gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaması ve 10 gün gibi uzun inkübasyon süresinin olmasıdır (14). Ancak sonradan yarışmalı protein bağlama yöntemi geliştirilerek inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür.

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yöntemi 1977'de geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV dedektör kullanılmaktadır. İnterferans veren lipidlerin ve vitamin D metabolitlerinin uzaklaştırılması, 25(OH)D<sub>2</sub> ve 25(OH)D<sub>3</sub>'ün ikisinin ölçülebilmesi yöntemin en önemli özellikleridir (14, 15).

RIA yöntemi 1985'de geliştirilmiştir. Bu yöntem için örnek saflaştırması gerekli değildir. Bu yöntemin uygulanması kolay ve sonuçları HPLC ile uyumludur. Yarışmalı protein bağlama ölçümündeki gibi 25(OH)D<sub>2</sub> ile 25(OH)D<sub>3</sub>'ü eşit oranda tanımakta ve diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır. Bu nedenle 25(OH)D ölçümleri %10-20 daha yüksek bulunmaktadır (14). ELISA yöntemi de, RIA ve kompetitif protein bağlama ölçümündeki gibi polar vitamin D metabolitlerini [24, 25(OH)<sub>2</sub>D; 25, 26(OH)<sub>2</sub>D; 23-lactone] ölçen bir yöntemdir .

Kemiluminesan immün ölçümler ise 25(OH)D<sub>2</sub> ve 25(OH)D<sub>3</sub> için eşit oranda spesifiktir. İmmün ölçümlerin kullanıldığı otomatize laboratuvar yöntemlerinde duyarlılık ve ölçüm aralığı ile ilgili sınırlamalar, metabolitlerle çapraz reaksiyon gözlenmesi, maliyet gibi sorunlar sık gözlenmektedir (16). Bu yöntemlerde organik çözücüsüz ekstraksiyon kullanılması ve 25(OH)D'nin antikor yapısı bozulmadan bağlayıcı proteinden ayırımın yapılabilmesi avantajdır. Ancak tüm bu aşamalar serum örneklerindeki matriks etkisine oldukça duyarlıdır (17). Kromatografik yöntemler ise immün analizlere göre matriks etkilerine daha az duyarlıdır.

LC-MS/MS yöntemi duyarlılık ve özgüllük açısından immunoassay yöntemine alternatif olarak önerilmektedir. LC-MS/MS ile 25(OH)D ölçümünde dikkat edilmesi gereken faktörler bulunmaktadır. LC-MS/MS ile serum 25(OH)D

kantitasyonu için birçok klinik laboratuvar kendi geliştirdiği (in-house) yöntemleri kullanmaktadır. Reaktiflerin laboratuvarlarda hazırlandığı in-house yöntemlerde; kalibrasyon ve kalite kontrol için liyofilize materyaller, kararlı izotop işaretli internal standart bileşikler, örnek hazırlama materyalleri, mobil fazlar kullanılmakta ve hem 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> hem de 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> analizi yapılabilmektedir. Ancak in-house yöntemlerde örnek hazırlığı, kromatografi kolonunun seçimi, kromatografik ayırım, iyonizasyon ve kütle spektrometrik deteksiyon için gereken tüm basamaklar optimize edilerek validasyon yapılmalıdır.

LC-MS/MS yönteminde atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ve Elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynakları kullanılmaktadır. Bunların dışında atmosferik basınçlı foto iyonizasyon (APPI) tekniği de kullanılmaktadır. ESI ile yapılan 25(OH)<sub>2</sub>D ölçümlerde APCI'ya göre daha fazla varyasyon gözlenmiştir (18). Bazı laboratuvarlarda 25(OH)<sub>2</sub>D kantitasyonu için tek geçişli basit kütle spektrometrik yöntemler kullanılmakta olup, daha duyarlı ölçüm sağlayan çoklu reaksiyon izleme (MRM) ve ürün iyon (product ion) oranları kullanılmamaktadır (19). Bu da kütle spektrometrik ölçümlerde sorun yaratmaktadır.

LC-MS/MS yönteminde önemli başka konu, ekstraksiyon kayıplarının ve iyon baskılanmasının etkilerini gidermek için gerekli olan internal standardın kullanımıdır. Internal standart için izotop işaretli ve ölçülecek analite kimyasal olarak benzeyen bileşikler seçilir. Döteryumlu standartlar, <sup>13</sup>C işaretli internal standartlara göre daha düşük maliyetlidir ve daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Çoğu laboratuvar 3 veya 6-döteryum içeren internal standartlar kullanarak 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ve 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> ölçümünü yapmaktadır (19). LC-MS/MS yönteminde kalibratör matriksi olarak analit içermeyen serum örneklerinin kullanımı idealdir. Ancak bunu elde etmek zordur. Kalibratör olarak, kömür ile muamele edilen insan serumu, siğir serumu albumini, etanolik kalibratörler ya da ticari olarak bulunan insan serumu bazı kalibratörler kullanılmaktadır (20).

25(OH)<sub>2</sub>D'nin LC-MS/MS ile analizi için bazı türevlendirme teknikleri geliştirilmiştir. Türevlendirme, D vitamini metabolitlerinin zayıf iyonizasyon verimliliğini artırır, daha yüksek duyarlılık ve daha spesifik bir deteksiyon sağlar. Dezavantajı ise numune hazırlama aşamasının daha zahmetli olmasıdır.

### 1,25(OH)<sub>2</sub>D

Serum/plazma 1,25(OH)<sub>2</sub>D düzeyleri; kronik granülomatöz bozukluklarla ilişkili hiperkalsemik sendromlar ve renal hastalıkların yanı sıra 25(OH)<sub>2</sub>D metabolizmasının doğuştan ve edinilmiş hastalıklarının tanısında gereklidir. Tüm steroid hormonlar gibi 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin de kantitatif analizi oldukça zordur. Dolaşımında çok düşük konsantrasyonlarda bulunur (20.16-70.56 pg/mL), oldukça lipofilik ve nispeten kararsızdır (21). Günümüzde 1,25(OH)<sub>2</sub>D analizlerinde RIA, ELISA, HPLC-UV ve LC-MS/MS kullanılmaktadır. RIA yöntemi 26, 23-lactone; 1,24,25(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub>; 1,25, 26(OH)<sub>3</sub>D<sub>3</sub> gibi vitamin D metabolitleri ile interferans vermektedir. Ayrıca LC-MS/MS'e göre % 25 daha yüksek sonuçlar elde edilmektedir. HPLC-UV yönteminin ise düşük düzeydeki 1,25-Dihidroksi vitamin D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> için duyarlılığı iyi değildir (21). 1,25(OH)<sub>2</sub>D için kullanılan bazı immünoanalizlerin 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-laktonla çapraz reaksiyonu nedeniyle 1,25(OH)<sub>2</sub>D konsantrasyonlarını olduğundan fazla ölçtüğü bilinmektedir. 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>-26,23-laktonun moleküler ağırlığı 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'den farklıdır. Bu nedenle 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün LC-MS/MS ile analizinde interferansa sebep olmaz.

1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin LC-MS/MS ile kantitasyonu, serumdaki düşük konsantrasyonları ve interferans veren maddelerin varlığı nedeniyle genellikle zordur. Casetta ve ark. serum 1,25(OH)<sub>2</sub>D'nin kantitasyonu için geliştirdikleri yöntemde online ekstraksiyon ve analitik kolon kullanarak izobarik interferanslardan uzak bir ölçümü başarabilmiştir. Bu çalışmada fizyolojik konsantrasyon düzeylerinde, %5-15'lik varyasyon katsayıları (CV) ile 36 pmol/L 'lik düşük kantitasyon limiti (LLOQ) elde edilmiştir (22). İyonizasyon verimliliğini geliştirmek için kullanılan Diels-Alder, kuar-

terner aminli Cookson reaktifleri gibi çeşitli türevlendirme ajanları ile daha düşük (10 pmol/L) LLOQ değerlerine ulaşılmıştır. Kanıtlanmış ve ticari olarak piyasaya sürülmüş diğer türevlendirme ajanları, 4-fenil-1,2,4-triazol-3-5-dion (PTAD) reaktifi ve Amplifex diene (AB SCIEX)'dir (23-25). Ölçüm duyarlılığını artırmak için örneklerin immünaffinite ile saflaştırıldığı, interferans ve matriks etkilerinin ortadan kaldırıldığı yöntemlerde, LLOQ değerleri 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> için 8.2 pmol/L, 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>2</sub> için 9.1 pmol/L olarak bulunmuştur (26). Bir çalışma kapsamında renal transplantasyon alıcılarında LC-MS/MS kullanarak yaptığımız ölçümlerde immunoaffinite mikrokolonları içeren bir kit (ImmuTube LC-MS/MS Ekstraksiyon Kiti-KM1000; Immundiagnostik AG, Besheim, Almanya) ile plazma 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> düzeyleri belirlenmiştir. Bu analiz, ultra hızlı sıvı kromatografisi ile kombine edilmiş, ESI pozitif modda triple quadrupol tandem kütle spektrometresinde (LC-20 AD UFLC XR, LCMS8040 Shimadzu Corp., Kyoto, Japonya) çoklu reaksiyon izleme yöntemi (MRM) kullanılarak optimize edilmiş ve analitik validasyon çalışmaları sonrasında elde edilen sonuçlar ile klinik çalışma gerçekleştirilmiştir. Analiz süresi 6 dakika olan bu yöntemin LLOQ değeri 5.68 pg/mL olarak belirlenmiştir (27).

### 3-Epi-25(OH)D<sub>3</sub>

Son zamanlarda 25(OH)D<sub>3</sub>'ün 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> ve 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gibi C-3 epimerizasyon yolu ile metabolize olduğu gösterilmiştir (28). Halen 3-epi-25(OH)D'nin biyolojik önemi aydınlatılamamıştır. C3-epimeri, özellikle 1 yaşından küçük bebeklerin serumlarında tespit edilmiştir (29). Hepatik immatüritenin epimer üretiminde rol oynayabileceği öne sürülmüştür ancak erişkinlerde de 0.25-59.3 nmol / L arasında değişen 3-epi-25(OH)D konsantrasyonları bulunmuştur (30).

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

spektrometresinde MRM modunda aynı kütle geçişlerine sahiptir. Bu nedenle C3 epimerinin yeterli ayrılabilmesi 25(OH)D<sub>3</sub>'ün daha yüksek ölçülmesine yol açar (19). C3-epimerizasyon yolunun fizyolojik rolü henüz açıklanmamış olsada 3-epi(OH)D'nin rutin ölçümü gelecekte önemli hale gelebilir. Günümüzde, 25(OH)D ölçümlerinde protein bağlama teknikleri kullanılarak olası C3-epimeri katkısı ortadan kaldırılmaya çalışılmaktadır.

### 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>

24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>; 25(OH)<sub>2</sub>D'den sonra dolaşımında en bol bulunan D vitamini metabolitidir. Bir sitokrom p450 enzimi olan 24-hidroksilaz (CYP24A1) ile 25(OH)D<sub>3</sub>'ün 24. karbondaki hidroksilasyonu sonucunda oluşur. 25(OH)D<sub>3</sub>'ün inaktif kataboliti olarak kabul edilir. Farmakolojik olarak uygulandığında, hayvanlarda kemik hacminde ve mekanik güçte artışa neden olduğu gösterilmiştir. İnsan serumundaki konsantrasyonları 0.7-24 nmol/L arasındadır (19). Serum 24,25(OH)<sub>2</sub>D düzeyleri serum 25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> düzeyleri ile korelasyon gösterebilir. Son çalışmalarda 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>'ün; vitamin D<sub>3</sub> tedavisine yanıtın değerlendirilmesinde yeni bir belirteç olabileceği düşünülmektedir. Ancak bu metabolitin kütle spektrometresinde ESI ve APCI iyonizasyon kaynakları ile ölçümü, düşük serum konsantrasyonları ve iyonizasyon verimsizliği nedeniyle zordur (23).

### D Vitamini Analizinin Standardizasyonu

Klinik biyokimya amaç, hedef analit konsantrasyonlarına yakın değerleri gelişmiş yöntemler kullanarak tanısal testler ile elde etmektir. 25(OH)D ölçümlerinde yaşanan önemli standardizasyon ve harmonizasyon sorunları D vitamini eksikliği tanısında mevcut olan karmaşayı artırmaktadır. Bu nedenle D vitamini ölçümlerinin kalitesini artırmak için 2010 yılında ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü tarafından bir program başlatılmıştır. D Vitamini Standardizasyon Programının (VDSP) amacı Amerikan Hastalık ve Önleme Merkezinin çalışmalarını koordine etmek ve dünya çapında sağlık araştırmalarında D vitamini düzeylerinin laboratuvar değerlendirmesini

standardize etmektir (31). Ölçüm yöntemleri arasındaki farklılıklar ve kalibratörlerde standardizasyon eksikliği gibi analitik değişkenlerin yanı sıra biyolojik ve mevsimsel değişkenlerin de var olması 25(OH)D ölçüm belirsizliğine katkıda bulunmaktadır. D vitamini kullanımı birçok hastalık için umut verici olsa da eksiklik ve yetmezlik düzeyleri, cinsiyet ve mevsimsel açıdan farklılığı henüz mevcut olmayan bir eşik değerine (cut-off) göre değerlendirilmektedir. Çalışmalarda tek bir eşik değeri kullanıldığından çeşitli ölçüm yöntemlerine göre farklılıkların olabileceği göz önünde bulundurulmalı ve mümkünse tüm yöntemler için standardizasyon çalışmaları yapılmalıdır.

## SONUÇ

D vitamini metabolitlerinin hastalıklardaki etki ve fonksiyonlarını bilebilmek için bu

metabolitlerin konsantrasyonlarının LC-MS/MS gibi gelişmiş yöntemlerle belirlenmesi gereklidir. Kişilerin D vitamini durumları hakkında doğru klinik yorum yapabilmek için total 25 (OH) D düzeylerinin yanı sıra serbest/biyoyararlanılabilir formlar, D vitamini bağlayıcı protein (DBP), parathormon ve 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D, 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> gibi çeşitli metabolitleri içeren metabolomik bir panele gereksinim vardır. Gelecekte yapılacak metabolomik çalışmalar, kolekalsiferol veya ergokalsiferol ile yapılan tedavi etkinliklerinin değerlendirilmesine daha derin bir bakış açısı kazandıracaktır. İdeal olarak, gerçek bir altın standart yöntem; düşük ve yüksek konsantrasyonlardaki tüm D vitamini metabolitlerini kapsayacak nitelikte, evrensel ve standart bir analitik yöntem olmalıdır.

## KAYNAKLAR

- Müller MJ, Volmer DA, Mass Spectrometric Profiling of Vitamin D Metabolites beyond 25-Hydroxyvitamin D. *Clin Chem* 2015;61(8):1033-1048.
- Prosser DE, Jones G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. *Trend Biochem Sci* 2004;29:664-73.
- Bartoszewicz Z, Kondracka A, Jazwiec R, Popow M, Dadlez M, Bednarczuk T. Can we accurately measure the concentration of clinically relevant vitamin D metabolites in the circulation? The problems and their consequences. *Endokrynol Pol* 2013;64:238-45.
- Bouillon R. The vitamin. The vitamin D binding protein DBP. In: D, Feldman JW, Pike JS, Adams, editors. *Vitamin D*. 3rd ed. London: Academic Press; 2011. p 57-72.
- Ross AC, Manson JE, Abrams SA, Aloia JF, Brannon PM, Clinton SK, et al. The 2011 report on dietary reference intakes for calcium and vitamin D from the Institute of Medicine: what clinicians need to know. *J Clin Endocrinol Metab* 2011;96:53-58.
- Saleh L, Tang J, Gawinecka J, Boesch L, Fraser WD, Eckardstein A, Nowak A. Impact of a single oral dose of 100,000 IU vitamin D<sub>3</sub> on profiles of serum 25(OH)D<sub>3</sub> and its metabolites 24,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub>, 3-epi-25(OH)D<sub>3</sub>, and 1,25(OH)<sub>2</sub>D<sub>3</sub> in adults with vitamin D insufficiency. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(12): 1912-1921.
- Lehmann U, Hirche F, Stangl GI, Hinz K, Westphal S, Dierkes J. Bioavailability of Vitamin D<sub>2</sub> and D<sub>3</sub> in Healthy Volunteers, a Randomized Placebo-Controlled Trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2013, 98(11):4339-4345.
- Tripkovic L, Lambert H, Hart K, et al. Comparison of vitamin D<sub>2</sub> and vitamin D<sub>3</sub> supplementation in raising serum 25-hydroxyvitamin D status: a systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr* 2012;95:1357-1364.
- Bailey D, Veljkovic K, Yazdanpanah M, Adeli K. Analytical measurement and clinical relevance of vitamin D(3) C<sub>3</sub>-epimer. *Clin Biochem* 2013;46: 190-6.
- Heijboer AC, Blankenstein MA, Kema IP, Buijs MM. Accuracy of 6 routine 25-hydroxyvitamin D assays: influence of vitamin D binding protein concentration. *Clin Chem* 2012;58:543-8.
- El-Khoury JM, Reineks EZ, Wang S. Progress of liquid chromatography-mass spectrometry in measurement of vitamin D metabolites and analogues. *Clin Biochem* 2011;44:66-76.
- Volmer DA, Mendes LR, Stokes CS. Analysis of vitamin D metabolic markers by mass spectrometry: current techniques, limitations of the "gold standard" method, and anticipated future directions. *Mass Spectrom Rev* 2015;34:2-23.
- Gathungu RM, Flarakos CC, Satyanarayana Reddy G, Vouros P. The role of mass spectrometry in the analysis of vitamin D compounds. *Mass Spectrom Rev* 2013;32: 72-86.
- Zerwekh JE. Blood biomarkers of vitamin D status. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(4):1087S-91S.
- Herrmann M, Farrell CJL, Pusceddu I, Fabregat-Cabello N, Cavalier E. Assessment of vitamin D status - a changing landscape. *Clin Chem Lab Med* 2017; 55(1): 3-26.

16. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and 25-hydroxyvitamin D<sub>2</sub> by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57(3):441–8.
17. 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
18. Couchman L, Benton CM, Moniz CF. Variability in the analysis of 25-hydroxyvitamin D by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: the devil is in the detail. *Clin Chim Acta*. 2012;413(15–16):1239–43.
19. Ouweland JM, Vogeser M, Bächer S. Vitamin D and metabolites measurement by tandem mass spectrometry. *Rev Endocr Metab Disord*. 2013;14:159–184.
20. Knox S, Harris J, Calton L, Wallace AM. A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub> and D<sub>2</sub> by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ann Clin Biochem*. 2009;46(Pt 3):226–30.
21. Strathmann FG, Laha TJ, Hoofnagle AN. Quantification of 1 $\alpha$ ,25-dihydroxy vitamin D by immunoextraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem*. 2011;57(9):1279–85.
22. Casetta B, Jans I, Billen J, Vanderschueren D, Bouillon R. Development of a method for the quantification of 1 $\alpha$ ,25(OH)<sub>2</sub>-vitamin D<sub>3</sub> in serum by liquid chromatography tandem mass spectrometry without derivatization. *Eur J Mass Spectrom (Chichester, Eng)*. 2010;16(1):81–9.
23. Aronov PA, Hall LM, Dettmer K, Stephensen CB, Hammock BD. Metabolic profiling of major vitamin D metabolites using Diels-Alder derivatization and ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*. 2008;391(5):1917–30.
24. Wang Z, Senn T, Kalhorn T, Zheng XE, Zheng S, Davis CL, et al. Simultaneous measurement of plasma vitamin D(3) metabolites, including 4 $\beta$ ,25-dihydroxyvitamin D(3), using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Biochem*. 2011;418(1):126–33.
25. Hedman CJ, Wiebe DA, Dey S, Plath J, Kemnitz JW, Ziegler TE. Development of a sensitive LC/MS/MS method for vitamin D metabolites: 1,25 Dihydroxyvitamin D<sub>2&3</sub> measurement using a novel derivatization agent. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2014; 953-954:62-67.
26. Yuan C, Kosewick J, He X, Kozak M, Wang S. Sensitive measurement of serum 1 $\alpha$ ,25-dihydroxyvitamin D by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after removing interference with immunoaffinity extraction. *Rapid Commun. Mass Spectrom*. 2011, 25(9):1241–1249.
27. Karatoy Erdem B, Yilmaz VT, Suleymanlar G, Ozcan F, Baykal Ataman A, Akbas H, The relationship between vitamin D status and graft function in renal transplant recipients. *Int J Med Biochem* 2018;1(1):1-5.
28. Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, et al. C-3 epimerization of vitamin D<sub>3</sub> metabolites and further metabolism of C-3 epimers. *J Biol Chem*. 2004;279(16):15897–907.
29. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SK. C-3 epimers can account for a significant proportion of total circulating 25-hydroxyvitamin D in infants, complicating accurate measurement and interpretation of vitamin D status. *J Clin Endocrinol Metab*. 2006;91(8):3055–61.
30. Lensmeyer G, Poquette M, Wiebe D, Binkley N. The C-3 epimer of 25-hydroxyvitamin D(3) is present in adult serum. *J Clin Endocrinol Metab*. 2012; 97(1):163-8.
31. Sempos CT, Vesper HW, Phinney KW, Thienpont LM, Coates PM. Vitamin D status as an international issue: national surveys and the problem of standardization. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*. 2012; 243:32–40.