

D VİTAMİNİ VE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

D vitamini eksikliği küresel bir salgın olarak adlandırılmaktadır. Son yıllardaki çalışmalar Vitamin D'nin mineral metabolizması dışında ikincil etkilerinin önemi üzerinde yoğunlaşmaktadır. Bu nedenle 25-OH-vitamin D (25(OH)D)'nin klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir. Son dönem yeni jenerasyon yöntemler arasında farklılık 25-OH Vitamin D ölçümünün zor olduğunu göstermiştir. LC-MS/MS yöntemi ve metodolojisi üzerine yapılan çalışmalar sonucunda LC-MS/MS ile 25-OH-Vitamin D ölçümü Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) tarafından "referans metod" olarak kabul görmüştür

D VİTAMİNİ VE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

D vitamini; yağda eriyen vitaminler grubunda olup, endojen olarak uygun biyolojik ortamda sentezlenebilmelerinden dolayı hormon ve hormon öncüleri olarak kabul edilen bir grup steroldür. En önemli etkisi kalsiyum ve fosfor metabolizması ile kemik mineralizasyonu üzerinedir. Bununla birlikte son yıllarda, D vitamini eksikliği ile yetersizliğinin yaygın kanser, kardiyovasküler hastalıklar, metabolik sendrom, enfeksiyöz ve otoimmün hastalıklar da dahil olmak üzere bir çok kronik hastalık patogeneziyle ilişkili olduğu saptanmıştır (1,2).

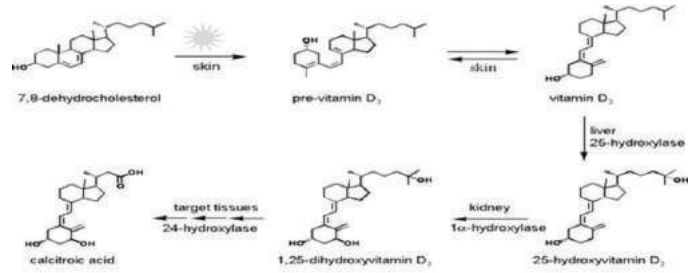
D vitamini eksikliği küresel bir salgın olarak adlandırılmaktadır (3). İngiltere’de yakın zamanda yapılan bir çalışmada; kış ve bahar dönemlerinde erişkin popülasyonun %50’sinden fazlasında D vitamini yetersizliği, %16’sında da ciddi D vitamini eksikliği saptandığı rapor edilmiştir (4). Son yıllarda Uçar ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada; Ankara bölgesinde oldukça yüksek oranda (%51,8) D vitamini eksikliği ve %20,7 oranında D vitamini yetersizliği tespit edilmiştir (5).

Bir ön hormon olan D vitamininin kolekalsiferol (D3 vitamini) ve ergokalsiferol (D2 vitamini) olmak üzere iki kaynağı vardır. Kolekalsiferol 290-310 nm dalga boyundaki ultraviyole ışınlarının etkisiyle deride hayvansal kaynaklı olan 7-dehidrokolesterolden sentezlenir ve vücuttaki bu endojen üretim D vitamininin temel kaynağıdır. Bu dönüşüm deri pigmentasyonu arttıkça azalırken, ultraviyole ışınına maruz kalma miktarı ile doğru orantılı olarak da artar. Ergokalsiferol ise bitkisel sterol olan ergosterolün irradiasyonu ile oluşur ve daha çok süt ürünlerinin güçlendirilmesi amacıyla kullanılır. Vitamin D3 ve D2 benzer yolla metabolize olduklarından ortak bir isimle, D vitamini olarak adlandırılırlar (6).

Deride yapılan veya diyetle alınan D vitamini biyolojik olarak aktif değildir. Dolaşımdaki D vitamini, vitamin D bağlayıcı protein (DBP) ile karaciğere taşınmakta ve karaciğerde 25 hidroksilaz enzimi ile 25 hidroksivitamin D’ye [25(OH)D], daha sonra da böbreklerde 1-alfa hidroksilaz enzimi ile biyolojik olarak aktif form olan ve kalsitriol olarak da bilinen 1,25 dihidroksivitamin D’ye [1,25(OH)₂D] dönüşmektedir. 1-alfa hidroksilaz enzimi D vitamini sentezinde anahtar enzimdir. Bu enzimin düzenlenmesinde parathormon (PTH), kalsiyum (Ca), fosfor ve fibroblast growth faktör 23 (FGF 23) rol oynamaktadır (3,7). 1,25(OH)₂D ince barsak, böbrek ve diğer dokularda bulunan vitamin D reseptörleri üzerinden etkisini gösterir. İnce barsaktan Ca absorpsiyonunu artırarak, böbreklerden de Ca kaybını azaltarak genel fonksiyonu olan kan kalsiyum düzeyini korur. Ayrıca 1,25(OH)₂D vitamininin, hücre proliferasyonunu inhibe edici, terminal

diferansiyasyonu uyarıcı, anjiogenezi inhibe edici, insülin üretimini uyarıcı ve renin üretimini inhibe edici biyolojik etkileri mevcuttur (7,8). D vitamini ve metabolitleri birçok dokuda bulunan 24 hidroksilaz enzimi tarafından inaktive edilerek safra yoluyla atılmaktadır (Şekil 1), (3,9).

Şekil 1: Vitamin D biyosentezi



Bireysel vitamin D düzeylerini değerlendirmek için yarı ömrü 2-3 hafta olan, hem vitamin D alımını hem de endojen yapımı gösteren 25(OH)D düzeyine bakılmalıdır. Biyolojik aktif form 1,25(OH)₂D ideal ölçüm için uygun değildir. Çünkü yarı ömrü 4-6 saat kadar kısa ve dolaşımdaki düzeyleri 25(OH)D’den 1000 kat daha düşüktür. D vitamini eksikliği ve yetersizliğinin tanımlanması ve 25(OH)D düzeyinin normal aralığının saptanması için birçok çalışma yapılmıştır. Bu çalışmaların ışığında, 25(OH)D düzeyi ve yorumu Tablo 1’ de özetlenmiştir (3,8).

Tablo 1: Serum 25(OH)D Düzeyi (ng/mL)

SERUM 25(OH)D DÜZEYİ (ng/mL)	YORUM
<20 ng/mL	Eksiklik
21-29 ng/mL	Yetersizlik
>30 ng/mL	Yeterli (Tercih Edilen 40-60 ng/mL)
>150 ng/mL	İntoksikasyon

D Vitamini Düzeyine Hangi Durumlarda Bakılmalıdır?

- Kemik hastalığı olan kişiler (osteomalazi, osteoporoz, paget vs.).
- D vitamini eksikliğini düşündüren kas-iskelet sistemine ait semptomları olan kişiler
- D vitamini eksikliği ve yetersizliği konusunda risk faktörleri olanlar (koyu tenli kişiler, güneş ışığından yeterince yararlanamayanlar, yaşlılar, obezler, kısa aralıklarla sık hamile olanlar, emziren kadınlar, malabsorbsiyon durumları, antikonvülsan ve glukokortikoid ilaç kullanımı vs.).

Vit D ölçümünde esas olarak iki ana metodoloji kullanılmaktadır. Bunlar; kompetitif immunoassayler (RIA, enzyme immunoassay, chemiluminescent immunoassay (CLIA), electrochemiluminescence immunoassay (ECLIA) ve competitive protein binding assay) ve kimyasal tespit yöntemleridir. Kimyasal tespit yöntemlerinin temelini kromatografik ayırma sonrasında immunolojik olmayan direkt tespit oluşturmaktadır (HPLC ve LC-MS/MS). Her iki yöntemin de avantajları ve dezavantajları olmasının yanı sıra bu yöntemler arasında temel fark HPLC ve LC-MS/MS' in 25OHD₂ ile 25OHD₃ ü ayırabilmeleridir.

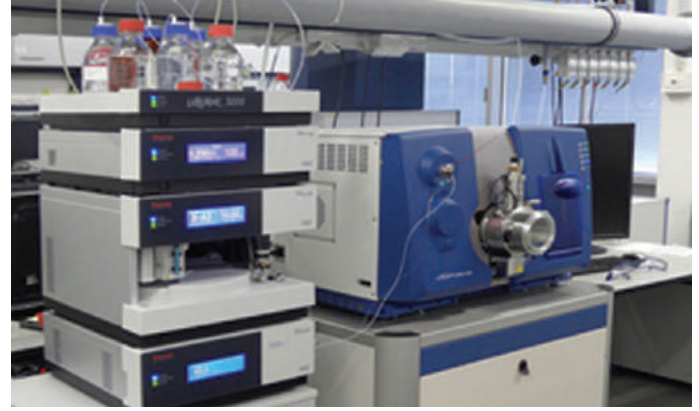
Likit Kromatografi-Kütle Spektrometre (LC-MSMS)

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan cihazlardır. Moleküller normalde yüklü partiküller değildir. Kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil olmayıp, diğer moleküllerle veya bir yüzey ile temas ettikleri zaman fragmentlerine parçalanır ve yüklerini kaybederler. Oluşan her bir iyon, spesifik bir moleküler kütleye ve yüke sahiptir ve m/z değerlerinin yoğunluğa (intensite) karşı gösterildiği bir spektrum ile bileşik tanımlanmaktadır.

Kütle spektrometreleri iyon kaynağına giren bütün bileşikleri ayrıştırır ve iyonlaştırır. Organik bileşiklerin içerisinde çok fazla sayıda molekül mevcuttur ve hepsinin kütle fragmenti izlenir. Bu nedenle iyi bir spektrum elde etmek amacıyla belirli bir sürede sadece saf bir bileşiğin kütle spektrumunu almak gereklidir. Seçimliliği yükseltmek ve deteksiyon limitlerini artırmak için kütle spektrometresinden (MS)'den önce numunenin ekstraksiyon, derivatizasyon, kromatografik ayrıştırılmalar gibi bazı ön muamelelerden geçirilmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi iki veya daha fazla analitik tekniğin art arda (tandem) bağlanmasıdır (Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi: LC-MS).

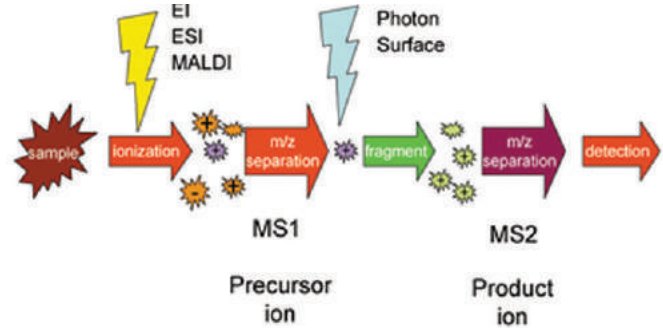
Analiz hızını artırmak, kompleks karışımlarda deteksiyon limitini artırmak, çoğunlukla ön işlemlere gereksinim kalmadan kompleks karışımların hızlı, hassas ve selektif olarak analizini yapmak için iyon yolunda birden fazla MS bulunabilir (Şekil 2).

Şekil 2: LC-MS/MS.



Bu sistemlerde, komponentler arasında "collision chamber" (Çarpışma odası) bulunmaktadır. Birinci kütle analizörde seçilen ana iyon (parent) "collision chamber"da argon gibi inert bir gaz etkisiyle fragmentlerine ayrıştırılmakta (yavru iyon, daughter ion) ve bu fragmentler tekrar ikinci kütle analizörde analizlenmektedirler (10,11), (Şekil 3).

Şekil 3 : Kütle spektrometresinde bölümler



Kütle spektrometresinde kantitatif doğruluk analitik işlemin başlangıcında eklenen uygun internal standart (IS) ile sağlanır. Seçilen IS'in ilgilenilen bileşiğin kimyasal yapısına uygun olması gerekir. Böylece IS'in fiziksel ve kimyasal özelliklerinin, bilinmeyen maddeninki ile uyumlu olması sağlanır. Bu sebeple döteryumla işaretlenmiş bileşiklerin IS olarak kullanımı yaygındır. Bir bileşiğin analizinde kullanılan döteryumlanmış IS'in tek farkı bir veya birkaç hidrojen atomu yerine döteryum atomlarının geçmiş olmasıdır (10,12).

Kütle spektrometrelerinin biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda peptid ve nükleosidlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk defa 1966 yılında Tanaka ve arkadaşlarının gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) ile izovalerik asidemi tanımlamalarıyla birlikte cihaz metabolik hastalıklara

D VİTAMİNİ VE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

rın tanısında kullanılmaya başlamıştır (13). 1980'li yıllarda tandem kütle spektrometresi (TMS) geliştirilmiş ve birçok alanda kullanıma sunulmuştur. Günümüzde LC-MS/MS'in tıp alanında kullanımı gittikçe artan bir öneme sahiptir. Yüksek hassasiyeti ve güvenilirliği, analiz süresinin kısa olması ve bilgisayar kontrollü programlar sayesinde, kütle spektrometreleri artık birçok hastalığın tanısına yaklaşımda son derece kuvvetli bir analitik teknik haline gelmiştir.

25-OH-vitamin D (25(OH)D)'nin klinik olarak doğru ölçülmesi çok büyük önem arz etmektedir. Bunun için bir standartlaştırma gerekmektedir. DEQAS (Vitamin D External Quality Assessment Scheme) sonuçlarına göre; serum 25-OHD düzeylerinde ölçüm metodlarına bağlı olarak laboratuvarlar arası değişkenlikler mevcuttur. Bu değişkenliklerin nedeni; molekülün hidrofobik ve lipofilik yapısının matriks etkisine yol açması, D Vitamini Bağlayıcı Protein (DBP)'e güçlü şekilde bağlanması nedeniyle deproteini-zasyon prosedürleri gerektirmesi, dolaşımda çok düşük konsantrasyonlarda (nanomolar) olmaları ve D₂ ve D₃'ün benzer yapısal özelliklerinin metodolojik problemlere neden olmasıdır (14,15).

Yakın zamana kadar vitamin D ölçümünde kabul edilmiş bir referans yöntem prosedürü (RMP) mevcut değildi. LC-MS/MS yöntemi ve metodolojisi üzerine yapılan çalışmalar ve 2010 yılında Tai ve arkadaşları tarafından geliştirilen aday referans metod çalışması sonucunda, LC-MS/MS ile vit D ölçümü Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM) tarafından "referans metod" olarak kabul görmüştür (16,17). Ayrıca US National Institute of Standards and Technologies (NIST), 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂ içeren etanol bazlı iki kalibratör standard referans materyal (SRM 2972) ve RMP olarak ortaya konan LC-MS/MS ile değerleri belirlenmiş olan dört adet serum bazlı standart referans materyelini de (SRM 972) kullanıma sunmuştur. Bunun sonucunda yöntemler arası uyumu en çok etkileyen sorunlardan biri olan kalibrasyon sorununun ortadan kalkması öngörülmüştür (18,19,20). Referans bir yöntem ve sertifikalı referans malzemelerin kullanımı ölçüm yöntemlerinin standardizasyonu ve karşılaştırılabilirliğini sağlayacaktır. Günümüzde, NIST (National Institute of Standards and Technology) standard referans materyali (SRM) ve referans ölçüm prosedürlerinin kullanıma girmesi ile laboratuvarlar arası ölçüm değişkenliği giderek azalmaktadır.

Vitamin D ölçümünde ilk kullanılan ölçüm yöntemi 1971'de bildirilen Vitamin D binding protein'nin bağlayıcı olduğu kompetitif protein bağlama yöntemidir (21). Yöntemin avantajı DBP'nin 25(OH)D₂ ile 25 (OH)D₃'ü eşit olarak

tanımasıdır. Yöntemin kısıtlılığı ise ölçümde 24,25(OH)₂D, 25,26 (OH)₂D, 23- Lactone gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsaması ve 10 gün gibi uzun inkübasyon süresinin olmasıdır. Ancak Silisik asit kromatografisinin kullanıldığı kompetitif protein bağlama yöntemi geliştirilerek inkübasyon süresi 1 saate düşürülmüştür (21-23).

1977'de High Performance Liquid Chromatography (HPLC) geliştirilmiştir. Bu yöntemde UV absorpsiyon yolu ile ölçüm yapılmaktadır. Yöntemin avantajları; interferans veren lipidlerin ve vitamin D metabolitlerinin uzaklaştırılması, 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃'i ayrı ayrı ölçebilmesi, stabil, spesifik, cost-effective ve tekrarlanabilirliğinin yüksek olmasıdır (21,23). Yöntemin dezavantajları ise iyi bir donanım ve deneyim gerektirmesi, ekipman maliyeti ve numune miktarının fazla olması, hazırlayıcı kromatografi gerektirmesi, interferans yapıcı UV bileşiklerden etkilenebilmesi ve test sonuçlanma süresinin uzun olmasıdır.

1985'te RIA (Diasorin) geliştirilmiştir. Bu yöntem için örnek saflaştırması gerekli olmamaktadır. Bu yöntemin uygulaması kolay ve sonuçları HPLC ölçümü ile koreledir. Hızlı, ucuz ve doğru yöntemlerdir. İnterferansları yoktur ve numune miktarı azdır. Ancak radyoaktif ve kimyasal atık oluşturmaları, 24,25(OH)D₃, 24,25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃-26,23-lactone gibi polar vitamin D metabolitleri ile çapraz reaksiyon vermesi ölçümlerin %10-20 daha yüksek verilmesine neden olmaktadır. RIA (IDS) yöntemi ise 25(OH)D₃'e %100, 25(OH)D₂'ye %75 spesifiktir (21, 23, 24).

ELISA yöntemi RIA ve Kompetitif protein bağlama ölçümdeki gibi diğer polar vitamin D metabolitlerini de kapsamaktadır (24,25(OH)₂D, 25,26(OH)₂D, 23-lactone) (21)

Tüm dünyada artan vitamin D test sayıları laboratuvarları daha basit ve hızlı sonuç veren kemiluminesans yöntemleri kullanmaya yöneltmiş olsa da, bu yöntemlerinde bir takım dezavantajları mevcuttur (Tablo 2);

Tablo 2: Immunoassay -D vitamini ölçümü avantaj ve dezavantajları

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
○ Kullanımı kolay, otomatize sistemler ○ Örnek hazırlığına gerek yok ○ Kolay LIS bağlantısı ○ Ek laboratuvar uzmanlığına gerek yok ○ Ekipman, reaktif temini kolay ○ EQC programlarında diğer kit kullanıcıları ile performans karşılaştırılabilirliği	○ Reaktiflerin yüksek maliyeti ○ Analitik ölçüm aralığına dar olması ○ Standardizasyon sorunları ○ Üretici firma bağımlılığı ○ İnterferansa eğilimli ○ Spesifite problemleri (Hangi metabolit ??) ○ 25(OH)D₂ ve 25(OH)D₃ ayrımı??

Son yıllarda “altın standard yöntem” olarak kabul edilen LC-MS/MS, internal standard kullanılmasından ve metodolojiden dolayı daha doğru ve kesin sonuçlar vermektedir. LC-MS/MS yöntemi, 25-OH-vitamin D₃ (25(OH)D₃) ve 25-OH-vitamin D₂ (25(OH)D₂) vitaminlerinin serum veya plazmada ekstraksiyondan sonra kantitatif olarak ölçülmesine dayanır. Bu da özellikle tedavilerinde D₂ vitamini kullanılan hastalarda doğru sonuç elde etmek ve tedavinin takibi açısından önemlidir.

Ayrıca 2004 yılında Kamao ve arkadaşları tarafından 25-(OH)D'nin izomerizasyon sonrasında 3-epi-25-(OH)D epimerini oluşturduğu tespit edilmiştir (25). Bu epimer bebekler ve özellikle bir yaşından küçük çocuklarda 25-(OH)D düzeyinin önemli bir kısmını oluşturmaktadır (26). Vitamin D düzeylerinin doğru bir şekilde belirlenebilmesi için bu epimerik formların birbirinden ayırılması gerekmektedir. LC-MS/MS kullanılarak bu epimerik formun kromatografik olarak ayrımı mümkündür.

Tablo 3: LC-MS/MS ile vitamin D ölçümünün avantaj ve dezavantajları;

AVANTAJLARI	DEZAVANTAJLARI
○ Bir örnekte birden fazla analit ölçümü ○ 25(OH)D₃ ve 25(OH)D₂'ü ayrı ayrı ölçebilmesi ○ Sensitivitenin yüksek olması ○ Spesifite problemlerinin minimum olması ○ Analitik ölçüm aralığının geniş olması ○ Düşük presizyon ve yüksek performans göstermesi ○ Primer internal standart kullanımı ile yüksek stabilite ○ Interferans ve matris etkisinin minimum olması ○ Numune miktarının az olması	○ Başlangıç cihaz maliyetinin yüksek olması ○ Yüksek deneyimli ve donanımlı personel gerektirmesi ○ Metod geliştirme ve validasyon gerektirmesi ○ Diğer kullanıcılarla karşılaştırma problemleri

2012 Yılında Farrell J. ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada (27), randomize seçilen 170 hasta örneği uygun şartlarda bölünerek saklanmış ve bu örneklerden;

- 2 farklı LC-MS/MS yöntemi
- RIA
- 5 farklı immunoassay (CLIA) kullanılarak
 - Düşük ve yüksek serum havuzu hazırlanmış
 - Her yöntem 5 tekrarlı 5 gün çalışılmıştır.

Çalışmadan elde edilen verilere göre farklı yöntemlerin korelasyon katsayısı, pearson precision ve bias korelasyon açısından değerlendirilmesi sonucu Tablo 3'de, precision çalışması ise Tablo 4'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre LC-MS/MS ile yapılan ölçümlerde gün içi ve günler arası %CV'lerin düşük, presizyonun ise yüksek olduğu görülmektedir.

Tablo 4: Yöntemlerin korelasyon katsayısı, pearson precision ve bias korelasyon açısından değerlendirilmesi.

METOD	KORELASYON KATSAYISI	PEARSON PRECISION	BİAS KORELASYON
RIA	0.968	0.985	0.983
Immunoassay 1	0.848	0.931	0.910
Immunoassay 2	0.898	0.954	0.942
Immunoassay 3	0.949	0.954	0.995
Immunoassay 4	0.908	0.942	0.955
Immunoassay 5	0.657	0.679	0.968
LCMSMS 1	0.995	0.997	0.998
LCMSMS 2	0.994	0.996	0.998

Tablo 5: Precision çalışması

DÜŞÜK SERUM HAVUZU			
METOD	MEAN (nmol/L)	Within Run %CV	Between Run %CV
RIA	28	5.5	7.9
Immunoassay 1	34	5.4	6.3
Immunoassay 2	30	2.0	7.4
Immunoassay 3	25	9.7	18.3
Immunoassay 4	30	10.2	8.8
Immunoassay 5	15	12.1	19.0
LCMSMS 1	30	4.7	2.1
LCMSMS 2	28	2.5	2.2

D VİTAMİNİ VE ÖLÇÜM YÖNTEMLERİ

Sonuç olarak;

- Son yıllardaki çalışmalar Vitamin D'nin mineral metabolizması dışında ikincil etkilerinin önemi üzerinde yoğunlaşmaktadır.
- Vitamin D'nin otoimmün hastalıklar, kanser, enfeksiyon ve kardiyovasküler mekanizmalar üzerinde koruyucu ve önleyici bir etkisi olduğunu düşündürmektedir.
- Günümüzde klinik açıdan 25-OH Vitamin D'nin doğru olarak ölçülmesi önemlidir.
- Son dönem yeni jenerasyon yöntemler arasında farklılık 25-OH Vitamin D ölçümünün zor olduğunu göstermiştir.
- Laboratuvarlar 25-OH vitamin D ölçüm metodlarını

1. Doğruluk (Accuracy)
2. Precision
3. Verimlilik
4. Maliyet
5. İş akışlarına göre

Seçmeliler ve mutlaka çok dikkatli bir şekilde metodlarını valide etmelidirler.

- Şüpheli Immunoassay sonuçları mutlaka LCMSMS ile doğrulanmalıdır.

KAYNAKLAR

1. Holick MF. Vitamin D: a D-lightful health perspective. Nutr Rev 2008;66: 182-94.
2. Hyppönen E, Boucher BJ, Berry DJ, Power C. 25-hydroxyvitamin D, IGF-1, and metabolic syndrom at 45 years of age: a cross-sectional study in the 1958 British Birth Cohort. Diabetes 2008; 57:298-305.
3. Wacker M, Holick MF. Vitamin D-Effects on Skeletal and Extraskkeletal Health and the Need for Supplementation. nNutrients 2013;5:111-48.
4. Pearce SHS, Cheetham TD. Diagnosis and management of vitamin D deficiency. BMJ 2010;340:b5664.
5. Uçar F, Taşlıpınar MY, Soydaş AÖ, Özcan N. Ankara Etlik İhtisas Eğitim Araştırma Hastanesi'ne Başvuran Hastalarda 25-OH Vitamin D Düzeyleri. Eur J Basic Med Sci 2012;2: 12-5.
6. Koo WWK, Tsang RC. Calcium and Magnesium Homeostasis. In: MacDonald MH, Seshia MMK, Mullet MD, eds. (2005) Avery's Neonatology Pathophysiology & Management of the Newborn, 6th edition. Philadelphia: Lippincott W&W. 847-875.
7. Öngen B, Kabaroğlu C, Parıldar Z. D Vitamini'nin Biyokimyasal ve Laboratuvar Değerlendirmesi. Türk Klinik Biyokimya Dergisi 2008;6:23-31.
8. Holick MF, Binkley NC, Bischoff-Ferrari HA, Gordon MC, Hanley DA, Heaney RP et al. Evaluation ,Treatment, and Prevention of Vitamin D Deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. J Clin Endocrinol Metab 2011;96:1911-30.
9. Bringhurst FR, Demay MB, Krane SM, Kronenberg HM. Bone and Mineral Metabolism in Health and Disease. In: Kasper DL, Braunwald E, Fauci AS, Hauser SL, Longo DL, Jameson JL, editors. Harrison's Principles of Internal Medicine. 16th edition. New York:McGraw-Hill Companies; 2005. p. 2238-86.
10. Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry.St. Louis:Mosby Company, 1996; 167-84.
11. Hochstrasser DF, Sanchez JC, Appel RD. Proteomics and its trends facing nature's complexity. Proteomics 2002; 2:807-12.
12. Andersen BD, Wise BL. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company, 1986; 197-208.

13. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56:236-42.
14. Carter GD. Accuracy of 25-hydroxyvitamin D assays: confronting the issues. *Curr Drug Targets* 2011;12(1):19-28.
15. Carter GD. 25-hydroxyvitamin D: a difficult analyte. *Clin Chem* 2012;58(3):486-8.
16. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Chem* 2010;82(5):1942-8.
17. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. Candidate reference – measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D2 by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2011;57(3): 441-8.
18. Phinney KW. Development of a standard reference material for vitamin D in serum. *Am J Clin Nutr* 2008;88:511S–512S.
19. Certificate of analysis, Standard Reference Material 2972: 25-hydroxyvitamin D2 and D3 calibration solutions. Gaithersburg, MD: Standard Reference Materials Program, NIST; 2009.
20. Certificate of analysis, standard reference material 972: Vitamin D in human serum. Gaithersburg, MD: Standard Reference Materials Program, NIST; 2009
21. Joseph E. Zerwekh The Measurement of vitamin D: analytical aspects *Annals of Clinical Biochemistry*; Jul 2004, Health & Medical Complete pg.272.
22. Michael F. Holick. Vitamin D Status: Measurement, Interpretation and Clinical Application *Ann Epidemiol* 2008 mar.
23. Horst RL, Hollis BW. Vitamin D assays and their clinical utility. In: Holick MF, ed. *Physiology, Molecular Biology, and Clinical Applications*. Totowa, NJ: Humana Press Inc.; 1999: 239-271.
24. Hollis B. The determination of circulating 25- hydroxyvitamin D: no easy task. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 3149-51.
25. Kamao M, Tatematsu S, Hatakeyama S, Sakaki T, Sawada N, Inouye K, Ozono K, Kubodera N, Reddy GS, Okano T. C-3 epimerization of vitamin D3 metabolites and further metabolism of C-3 epimers: 25-hydroxyvitamin D3 is metabolized to 3-epi-25-hydroxyvitamin D3 and subsequently metabolized through C-1alpha or C-24 hydroxylation. *J Biol Chem*. 2004 Apr 16;279(16):15897-907.
26. Singh RJ, Taylor RL, Reddy GS, Grebe SKG. (2006). 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*, 91, 3055-3061.
27. Farrell CJ, 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.





Gürsel Mahallesi Kağıthane Caddesi 14/3 34400 Kağıthane - İstanbul
T. 0212 320 64 00 D. 0212 320 64 17

centro@centro.com.tr - www.centro.com.tr