

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**K VİTAMİNİ ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE REFERANS
ARALIĞININ BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

Metin DEMİREL

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

HAZİRAN 2023

**BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**K VİTAMİNİ ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE REFERANS
ARALIĞININ BELİRLENMESİ**

DOKTORA TEZİ

**Metin DEMİREL
185316001**

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıbbi Biyokimya Doktora Programı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Şahabettin SELEK

HAZİRAN 2023

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü'nün 185316001 numaralı Doktora Öğrencisi Metin DEMİREL, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı "K VİTAMİNİ ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE REFERANS ARALIĞININ BELİRLENMESİ" başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Sedat MEYDAN
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Doç. Dr. Birsen ELİBOL
İstanbul Medeniyet Üniversitesi

Doç. Dr. Eray Metin GÜLER
Sağlık Bilimleri Üniversitesi

Teslim Tarihi : 14 Temmuz 2023
Savunma Tarihi : 14 Haziran 2023



Aileme,

ÖNSÖZ

Saygıdeğer Hocalarım, Arkadaşlarım ve Sevdiklerim,

Öncelikle, bugüne kadar üzerimde emeği olan bütün hocalarıma saygılarımı ve minnetimi sunuyorum.

Doktora eğitim sürecim boyunca, bilgi birikimini ve engin tecrübelerini benimle paylaşarak beni destekleyen, sınırsız öğrenme potansiyeline inanmamı sağlayan Prof. Dr. Şahabettin SELEK'e en içten teşekkürlerimi iletiyorum. Verdiğiniz değerli katkılar ve öneriler, tez çalışmamın kalitesini artırdı ve vizyonumu genişletti. Hem akademik hem de sosyal danışmanım olarak her adımda bana ilham veren ve umutsuzluğa düştüğüm anlarda motivasyonumu yükselten kıymetli hocam, size minnettarım.

Anabilim Dalı Başkanımız, kıymetli hocam, Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT'e, huzurlu bir çalışma ortamı sağladığı, öğretme aşkını paylaştığı ve büyük bilgi ve deneyimlerini benimle paylaştığı için en içten teşekkürlerimi sunuyorum.

Değerli hocalarım Prof. Dr. Fahri AKBAŞ, Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER, Dr. Öğr. Üyesi Vildan Betül YENİGÜN ve Dr. Öğr. Üyesi Huri BULUT, çalışmalarına verdiğiniz destek için sizlere teşekkür ediyorum.

Deneyim ve tecrübelerine dayanan fikir ve tavsiyeleri ile yol göstericilik yapan hocam Prof. Dr. Sedat MEYDAN'a teşekkür ediyorum.

Başarılarıyla örnek olan ve olumsuzluklara güler yüzle karşılık vermeyi öğreten hocam Doç. Dr. Birsen ELİBOL'a teşekkür ediyorum.

İşini seven insanın enerjisinin asla tükenmediğine kanıt olan hocam, manevi abim Doç. Dr. Eray Metin GÜLER'e teşekkür ediyorum.

Tez çalışmamda verdiği önemli bilgilerle kilitleri açmamı sağlayan hocam Prof. Dr. Ahmet Ceyhan GÖREN'e de teşekkürlerimi sunuyorum.

Sevgili çalışma arkadaşlarım, Dr. Ayşe Zehra GÜL, Dr. Caner YILDIZ, Öğr. Gör. Ebru KANIMDAN, Arş. Gör. Ezgi BALKAN, Arş. Gör. Fatmanur BABALI BALIBEY, Arş. Gör. Dr. Fatmanur KÖKTAŞOĞLU, Dr. Halime DULUN AĞAÇ, Dr. Öznur YAŞAR, Dr. Tuğçe YILDIZ, Öğr. Gör. Ufuk SARIKAYA ve Arş. Gör. Zeynep ÖZMAN, sizlerin çalışkanlık, yardımseverlik, sabır, başarı ve güler yüzlülüğünüz için teşekkürlerimi sunuyorum.

Laboratuvar teknisyeni Mustafa KARABONCUK'a her konuda yardım elini uzattığı için teşekkür ediyorum.

Tez çalışmalarında sürekli yanımda olan ve sabırla beni destekleyen, kütle spektrometrisi çalışmalarında bana yardımcı olan Şule YALÇIN'a teşekkür ediyorum.

Tıbbi biyokimya ekibi olarak, özellikle Tağı POLAT başta olmak üzere, tez çalışmalarımın büyük bir kısmında bana destek olan herkese teşekkürlerimi sunuyorum.

Muhakemeyi, vicdanı ve azmi öğreten, sonsuz sevgileriyle güç veren, haklarını asla ödeyemeyeceğim, sevgili annem Emire DEMİREL ve babam Mustafa DEMİREL'e en derin duygularıyla şükranlarımı sunmak istiyorum.

Sevgili eşim Cansu YÖRGÜÇ DEMİREL, hayat arkadaşım, sana tüm desteklerin için kalpten teşekkür ediyorum.

Ayrıca, tez çalışmalarım kapsamındaki 20200303 no'lu bilimsel araştırma projeme destek olan Bezmialem Vakıf Üniversitesi'ne teşekkürlerimi sunmak istiyorum.

Sizlerin desteği ve katkıları olmadan bu çalışma gerçekleşmezdi. Her birinize içtenlikle teşekkür ediyorum, sizlerin değerli emekleriniz için minnettarlığımı sunuyorum.

Araştırmayı, sorgulamayı, öğrenmeyi ve paylaşmayı kendine şiar edinen insanlar, bilginin gücüne inanır ve bilgiyi kullanarak daima kendilerini ve çevrelerini geliştirirler.

Sevgi ve saygılarımla,

Mayıs 2023

Metin Demirel

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Metin Demirel
İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
BEYAN.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ.....	1
1.1 Tezin Amacı.....	3
1.2 Literatür Araştırması	3
1.3 Hipotez.....	4
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1 Vitamin K.....	5
2.1.1 Kimyasal yapısı.....	6
2.1.2 Metabolizması.....	7
2.1.3 Vitamin K bağımlı proteinlerin gama karboksilasyonu.....	10
2.1.4 Klinik önemi	13
2.1.5 Besin kaynakları ve emilimi.....	18
2.1.6 Toksikitesi	21
2.2 Tandem Kütle Spektrometresi.....	22
2.2.1 Python ve R ile spektrum analizi	25
2.2.2 Analitik validasyon	27
2.3 Referans Aralık	31
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	38
3.1 Etik Bildirim	38
3.2 Gereç	38
3.3 Yöntem.....	39
3.3.1 Standart ve stok solüsyonlar.....	39
3.3.2 Numune hazırlama	40
3.3.3 Analitik şartlar.....	43
3.3.4 Validasyon çalışmaları	44
3.3.5 Referans aralık çalışmaları.....	44
3.3.6 İstatistiksel analiz.....	45
4. BULGULAR VE TARTIŞMA	46
4.1 Metot Geliştirme Bulguları	46
4.2 Validasyon Bulguları	54
4.2.1 Doğrusallık.....	54

4.2.2 Stabilite	57
4.2.3 Ölçüm ve raporlama sınırı.....	59
4.2.4 Gerçeklik, kesinlik ve doğruluk	59
4.2.5 Yeniden üretilebilirlik ve sağlamlık.....	61
4.3 Referans Aralık Çalışmaları.....	61
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	66
KAYNAKLAR	68
EKLER	81
EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ	82
EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	83
ÖZGEÇMİŞ.....	85



KISALTMALAR

α	: Alfa
ALP	: Alkale fosfataz
ALT	: Alanin aminotransferaz
APCI	: Atmosferik basınçta kimyasal iyonizasyon
Aptt	: Aktif parsiyel tromboplastin zamanı
AST	: Aspartat aminotransferaz
Ca	: Kalsiyum
CCα	: Karar sınırı
CCβ	: Algılama sınırı
CLSI	: Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
γ	: Gama
Gas6	: Growth Arrest-Specific Protein 6
Gla	: Gama-karboksi glutamat
HCT	: Hematokrit
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HGP	: Hemogloblin
HPLC	: Yüksek performanslı likit kromatografi
HRMS	: Yüksek çözünürlüklü kütle spektrometrisi
IFCC	: Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
INR	: Protrombin zamanı
IS	: İç standart
IU	: Uluslararası birim
K	: Potasyum
K₁	: Vitamin K ₁
K₂	: Vitamin K ₂
K₃	: Vitamin K ₃
kDa	: KiLoDalton
L	: Litre
LC	: Likit kromatografi
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
MCH	: Ortalama eritrosit hemoglobini
MCV	: Ortalama eritrosit hacmi
MPV	: Ortalama trombosit hacmi
mg	: Miligram
Mgp	: Matriks Gla proteini
MK	: Menakinon
mL	: Mililitre
MS	: Kütle spektrometrisi
MS/MS	: Tandem kütle spektrometrisi
Na	: Sodyum
ng	: Nanogram

PCT	: Plateletkrit
PDW	: Trombosit dağılım genişliği
PK	: Filokinon
PLT	: Trombosit
ppm	: Milyonda bir (part per million)
Pt	: Protrombin zamanı
%RSD	: Bağıl standart sapma
µg	: Mikrogram
UHPLC	: Ultra yüksek performanslı likit kromatografi
VK	: Vitamin K
WHO	: Dünya sağlık teşkilatı



SEMBOLLER

°C : Derece Santigrat



TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1 Bilim tarihinde Vitamin K ve türevleri ile ilgili yaşanmış önemli gelişmeler.	6
Tablo 2.2 Menakinonların üretiminde görev alan enterik bakteriler ve üretim kapasitelerinin (+) toplam üretime oranı.....	8
Tablo 2.3 Vitamin K aracılığıyla aktifleşen proteinler, görevleri ve spesifik olarak buldukları lokasyonlar.....	12
Tablo 2.4 Vitamin K besin kaynakları ve içerdikleri Vitamin K miktarları.	19
Tablo 2.5 Vitamin K'nın dolaşımdaki dağılımı	20
Tablo 2.6 Kütle spektrometrisi tekniklerinin karşılaştırması	23
Tablo 2.7 Kütle spektrometrisinde kullanılan farklı iyonlaştırma tekniklerinin karşılaştırması.	25
Tablo 2.8 Kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılan bazı R paketleri ve kullanım alanları.....	26
Tablo 2.9 Referans kitle belirlenirken kullanılan dışlama ve gruplama kriterleri [55].	33
Tablo 2.10 Dağılıma göre referans aralık hesaplama yöntemlerinin özet karşılaştırması	34
Tablo 2.11 Sapan değer tespit etmek için kullanılan diğer yöntemlerin kullanım şekilleri ve hesaplama formülleri.....	35
Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar.	38
Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar.	39
Tablo 3.3 Kalibrasyon standartlarının konsantrasyonları.....	40
Tablo 3.4 Vitamin K ölçümünde kullanılacak en uygun metodun belirlenmesi için sınanan alternatif metotlara ait ekstraksiyon basamaklarının detaylı karşılaştırması.	41
Tablo 3.5 Kütle spektrometrisi analitik şartları.....	43
Tablo 3.6 Likit kromatografi mobil faz gradyanı.....	43
Tablo 3.7 Vitamin K ve türevlerinin öncü iyon ve ürün iyonlarına ait kütle yük oranları ve kullanılan iyonlaştırma enerjileri.	44
Tablo 3.8 Referans aralık hesaplamaları için seçilen referans kitleye ait dahil olma ve dışlama kriterleri.	45
Tablo 4.1 Sınanan tayin metotlarında elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait geri kazanım değerleri.....	46
Tablo 4.2 Sınanan tayin metotlarında elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait sinyal değerleri.	47
Tablo 4.3 Farklı sıcaklıklarda bekletilen analitlerin Vitamin K seviyelerindeki değişim.	58
Tablo 4.4 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analitler ile yapılan tekrarlanabilirlik analizi sonuçları.	60
Tablo 4.5 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analitler ile yapılan yeniden üretilebilirlik ve sağlamlık analizleri sonuçları.....	61

Tablo 4.6 Referans kitleye ait demografik veriler.....	62
Tablo 4.7 Referans aralık hesaplaması için Python programlama dili ile yazılan kod dizisi.....	64
Tablo 4.8 Diğer bilimsel çalışmalarda farklı popülasyonlara ilişkin elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait referans aralık sonuçları.....	65



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 Vitamin K türevlerinin kimyasal yapısı.....	7
Şekil 2.2 Filokinonun geranilgeranil yan zinciri ile MK-4'e dönüşümü.....	9
Şekil 2.3 Vitamin K redoks döngüsü	10
Şekil 2.4 Referans aralık hesaplamalarında kullanılacak yol haritası.....	37
Şekil 3.1 Numune hazırlama basamaklarının şematik gösterimi.....	42
Şekil 4.1 Yöntem 2'nin serum analitlerine ait kromatogramı.....	48
Şekil 4.2 Yöntem 12'nin serum analitlerine ait kromatogramı.....	49
Şekil 4.3 Yöntem 12'ye ait standart analitlerinin kromatogramı.....	50
Şekil 4.4 Vitamin K ₁ kromatogramı.	51
Şekil 4.5 Vitamin K ₁ IS kromatogramı.....	52
Şekil 4.6 Vitamin K ₂ -MK-7 kromatogramı.	53
Şekil 4.7 Vitamin K ₁ 'e ait 10 noktalı kalibrasyon eğrisi.	54
Şekil 4.8 Vitamin K ₂ -MK-4'e ait 10 noktalı kalibrasyon eğrisi.	55

K VİTAMİNİ ÖLÇÜM METODUNUN GELİŞTİRİLMESİ VE REFERANS ARALIĞININ BELİRLENMESİ

ÖZET

Vitaminler, yaşam için gerekli olan fizyolojik fonksiyonlarda önemli bir role sahip besin maddeleridir. Enerji sağlamanın yanı sıra yapısal görevlerde de işlev görmektedirler ve diğer besinlerden farklıdırlar. Vitaminler suda çözünen ve yağda çözünen olmak üzere iki gruba ayrılır. Bu gruba Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E ve Vitamin K dahildir. Vitamin K, özellikle bitkiler ve bakteriler tarafından üretilen, lipofilik bir vitamindir ve elektron taşıma ile enerji üretimi gibi temel fonksiyonlarda kullanılır. İnsanlar, protrombin üretimi, glutamik asit rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyonu, kemik kalsifikasyonu, kalsiyum dengesi ve hücre döngüsü düzenlemesi gibi esansiyel metabolik süreçler için Vitamin K'ya ihtiyaç duyarlar. K vitamini üç ana alt tipe ayrılır: K₁ (2-Metil-3-fetil-1,4-naftokinon), K₂ (2-Metil-3-multiprenil-1,4-naftokinon) ve K₃ (2-metil-1,4-naftokinon). K₁ vitamini, yeşil yapraklı bitkiler tarafından sentezlenirken, insanlarda ise kolonda bulunan gram pozitif bağırsak bakterileri tarafından üretilen K₂ vitamini alt türleri olan menakinon (MK) adlı vitamin kullanılır. K₂ vitamini alt türleri, izopren birimlerine göre adlandırılır ve en yaygın olarak MK6-10 arasında bulunur. K₃ vitamini, menadion olarak da bilinir ve doğal olarak bulunmaz, suda çözünebilir bir takviye formudur. Vitamin K seviyesinin belirlenmesi, eksikliğine bağlı komplikasyonların tanısında büyük önem taşır. Bu doktora tez çalışmasında, standartlara uygun analitik performans özelliklerine sahip Vitamin K ve türevlerinin LC-MS/MS ölçüm yöntemi kullanılarak Türk toplumuna ait Vitamin K referans aralığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Aynı zamanda, katı faz ekstraksiyonu olmadan yüksek geri kazanım sağlayan yenilikçi bir ekstraksiyon yöntemi kullanılarak Vitamin K'nın ölçülmesi de hedeflenmektedir. Bu sayede, hastaların serum Vitamin K seviyelerinin belirlenmesi ve Vitamin K eksikliğine bağlı komplikasyonların tanısına katkı sağlanması amaçlanmaktadır.

Metot kalibrasyonu için filokinon ve Vitamin K₂ (MK-4) kimyasalları kullanılarak, 500 ng/mL'den 0.06 ng/mL yoğunluğa kadar standartlar hazırlandı. Bütün standartlar, metanol içinde çözüldü ve her bir kalibrasyon standartına, son yoğunluğu 10 ng/mL olacak şekilde internal standart eklendi. Karışım, vortex ve santrifüj işlemlerinden geçirildi. Üst faz alındı ve konsantratör cihazında uçuruldu. Kalıntı, 2-propanol, asetonitril ve metanol gibi kimyasallar kullanılarak serum numunelerine ait analitlerin hazırlığı yapıldı. Hazırlanan analitler, LC-HRMS/MS cihazında analiz edildi. Kütle spektrometresinde atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon yöntemi iyonizasyon kaynağı olarak kullanıldı. Kromatografik ayırma işlemi, 40 °C'de C18 - 100 x 2 mm - 3 µ boyutlu bir kolon kullanılarak gerçekleştirildi. Mobil faz olarak, su içinde %0.1 formik asit ve 3:1 (v/v) metanol/asetonitril karışımı kullanıldı.

Geliştirilen yöntemin nihai validasyon çalışmaları, ölçüm sınırı, doğruluk, gerçeklik, kesinlik ve sağlamlık testlerini içermektedir. Hazırlanan standartlar, 6 tekrarlı olarak analiz edildi ve kalibrasyon eğrisi oluşturuldu. Elde edilen veriler, regresyon analizi ile değerlendirildi. Türk toplumuna ait Vitamin K referans aralığını belirlemek için, içeri alma ve dışlama kriterlerini sağlayan 64 kadın ve 67 erkek sağlıklı kontrol grubu gönüllüsüne ait serum numuneleri kullanıldı. Bu numuneler, geliştirilen yöntemin nihai numune hazırlama prosedürüne uygun şekilde işlendi ve analiz edildi. Validasyon çalışmalarında istatistiksel analizler R programlama dili kullanılarak gerçekleştirildi. Spektrum analizleri ise açık kaynaklı MZmine 3 yazılımı üzerinde yapıldı. Referans aralık hesaplamaları ise Python programlama dili kullanılarak yapıldı.

Vitamin K tayini için seçilen yöntemde, 250 µL serum numunesi içine 50 µL internal standart (500 ng/mL) ve 250 µL lipaz (1000 IU) enzimi eklenerek 37 °C'de 15 dakika boyunca inkübe edilmektedir. İnkübasyon süresinin ardından protein çöktürülmesi için 250 µL metanol eklenir ve 12000 g'de 5 dakika süreyle santrifüj edilir. Santrifüj sonrası oluşan üst faz, HPLC viallerine alınarak enstrümantal analize tabi tutulur. Vitamin K₁ kalibrasyon standardı 6 kez tekrarlanarak çalışılmış ve elde edilen verilerle korelasyon katsayısı 0.9957 olarak hesaplanmıştır. Vitamin K, MK-4 ve MK-7 analitleri 10 kez tekrarlanarak çalışıldığında, yöntemin LoD (tayin sınırı) ve LoQ (ölçüm sınırı) değerleri sırasıyla 0.02 ng/mL ve 0.09 ng/mL olarak belirlenmiştir. Ortalama bağıl standart sapma ise %2.15 olarak hesaplanmıştır. Geri kazanım testleri sonuçlarına göre ise Vitamin K için %94, MK-4 için %88 ve MK-7 için %85 geri kazanım değerleri elde edilmiştir. Referans aralık çalışmaları için, dahil olma ve dışlama kriterlerine uygun olan 64 kadın ve 67 erkek sağlıklı kontrol grubu referans kitle olarak seçilmiştir. Sonuç olarak referans aralığı, 0.1-1.2 ng/mL olarak hesaplanmıştır.

Bu yöntem, en fazla 30 dakika içinde sonuç verebilme özelliğiyle birlikte ön hazırlık süresi ve ekstraksiyon aşamasında katı faz ekstraksiyon filtrelerine ihtiyaç duymadan diğer literatürdeki yöntemlerden pozitif şekilde ayrılmaktadır. Araştırma amacıyla laboratuvarlarda yöntem doğrulama çalışmaları yapıldıktan sonra kullanılmaya uygun hale gelir. Yöntemin karşılaştırma ve geçerli kılma çalışmaları yapıldıktan sonra rutin kullanıma geçilebilir. Vitamin K, MK-4 ve MK-7'nin referans aralığını belirlemek için Python programlama dilinde kod yazılmıştır. Bu kod, klinik laboratuvarlarda laboratuvar içi referans aralıklarını belirlemek amacıyla bütün parametreler için laboratuvar bilgi sistemlerine entegre edilebilir. Enzim destekli ekstraksiyon, diğer yağda çözünen vitaminlerin miktar tayinini yapmak için geliştirilecek yöntemlerde de kullanılabilir. Bu alanda yeni araştırma çalışmaları yapılabilir.

Anahtar Kelimeler: K Vitamini, filokinon, menakinon, tayin yöntemi, kütle spektrometrisi

DEVELOPMENT OF A METHOD FOR MEASURING VITAMIN K AND DETERMINATION OF REFERENCE RANGE

SUMMARY

Vitamins are necessary for essential physiological functions in living organisms. Unlike other nutrients, they provide functional roles rather than energy supply. Depending on their type and location, vitamins can perform various tasks. Vitamins are classified into two groups: water-soluble and fat-soluble vitamins. Fat-soluble vitamins are molecules that can be synthesized by plants and animals. This group includes Vitamin A, Vitamin D, Vitamin E, and Vitamin K. Vitamin K is a lipophilic vitamin primarily produced by plants and bacteria, used for electron transport and energy production. Humans require Vitamin K for essential metabolic events such as prothrombin production, posttranslational modification of glutamic acid residues, bone calcification, calcium homeostasis, and cell cycle regulation.

Vitamin K is a molecule used for electron transport and energy production. While it is synthesized by plants and bacteria, humans require Vitamin K for important metabolic events such as prothrombin synthesis, bone mineralization, and calcium regulation. There are three main subtypes of Vitamin K: K₁ (2-Methyl-3-phytyl-1,4-naphthoquinone), K₂ (2-Methyl-3-multiprenyl-1,4-naphthoquinone), and K₃ (2-methyl-1,4-naphthoquinone). K₁ vitamin is synthesized by green leafy plants. In humans, subtypes of Vitamin K known as menaquinones (MK), specifically K₂, are produced by gram-positive intestinal bacteria located in the colon. The subtypes of K₂ vitamin are named based on their isoprene units and are most commonly found between MK6-10. K₃ vitamin, also known as menadione, is not naturally occurring and exists as a water-soluble supplement form.

Vitamin K plays a crucial role in essential metabolic processes such as post-transcriptional modification of glutamic acid residues, bone mineralization, calcium homeostasis, and cell cycle regulation in the human body. Therefore, determining the level of vitamin K is of great importance in diagnosing complications related to its deficiency. In this doctoral thesis, the aim is to develop an LC-MS/MS measurement method with analytical performance characteristics compliant with standards for vitamin K and its derivatives, using an innovative extraction method that provides high recovery without solid-phase extraction. Additionally, the goal is to determine the reference range of vitamin K specific to the Turkish population. This will contribute to the determination of serum vitamin K levels in patients and the diagnosis of complications related to vitamin K deficiency.

During the preparation of standards, Vitamin K-d₇ (5,6,7,8-d₄, 2-methyl-d₃) was used as the internal standard. All standards were dissolved in methanol. The internal

standard solution was prepared at a concentration of 500 ng/mL. For method calibration, standards were prepared with phylloquinone and Vitamin K₂ (MK-4) chemicals at concentrations ranging from 500 ng/mL to 0.06 ng/mL. Each calibration standard was supplemented with the internal standard to a final concentration of 10 ng/mL. During the preparation of serum samples, the internal standard prepared with Vitamin K-d₇ (5,6,7,8-d₄, 2-methyl-d₃) was added first. Ethanol, methanol, acetonitrile, chloroform, n-hexane, lipase, and ammonium sulfate solutions were used to precipitate proteins in the serum. Incubation was performed in a hot water bath (37 °C) and a deep freezer (-20 °C) for 15-30 minutes, followed by vortexing and centrifugation. The upper phase was collected and evaporated using a concentrator device. The residue was dissolved in 2-propanol, acetonitrile, and methanol chemicals to prepare analytes for serum samples. The prepared analytes were analyzed using liquid chromatography-high resolution mass spectrometry. Atmospheric pressure chemical ionization (APCI) was used as the ionization source in the mass spectrometer. Chromatographic separation was performed using a C18 - 100 x 2 mm - 3 μ column at 40 °C. The mobile phase consisted of 0.1% formic acid in water and a mixture of methanol/acetonitrile (3:1, v/v).

The developed final method underwent validation studies including tests for limit of detection, linearity, accuracy, precision, and robustness. In the limit of detection tests, analytes of Vitamin K, MK-4, and MK-7 with a concentration of 0.5 ng/mL were analyzed in 10 replicates. The obtained results were multiplied by three times the standard error to determine the detection limit. The standard error was multiplied by ten to establish the quantification limit. For the linearity tests, calibration standards were prepared at 10 different concentrations. The prepared standards were analyzed in six replicates, and a calibration curve was plotted. The results were analyzed through regression analysis. In the accuracy, precision, and robustness tests, Vitamin K analytes at concentrations of 5, 10, and 20 ng/mL were prepared. The analytes were prepared by two different analysts on two separate days and analyzed in 10 replicates. The analysis results were used to calculate intra-day and inter-day average and relative standard deviation. In the recovery tests, a serum pool sample was prepared and divided into two portions. One of the portions was spiked with a 1 ng/mL Vitamin K solution. The analytes were analyzed in 10 replicates. The obtained results were used to calculate percent recovery and bias.

Serum samples from a total of 64 healthy female and 67 healthy male control group volunteers who met the inclusion and exclusion criteria were collected to determine the reference range for Vitamin K in the Turkish population. The collected samples were prepared and analyzed according to the final sample preparation procedure of the developed method. Statistical analyses performed during the validation studies were carried out using the R programming language in the RStudio software, utilizing the dplyr, tidyr, and ggplot2 packages. Spectrum analyses were conducted using the open-source software MZmine 3. Reference range calculations were performed using the Python programming language on the Google Colab platform, employing the pandas, numpy, matplotlib, and seaborn libraries. In the selected method for Vitamin K determination, 250 μL of serum sample is mixed with 50 μL of IS (500 ng/mL) and 250 μL of Lipase (1000 IU), followed by incubation at 37°C for 15 minutes. After incubation, to precipitate proteins, 250 μL of methanol is added and the mixture is centrifuged at 12000 g for 5 minutes. The resulting supernatant is transferred to HPLC vials for instrumental analysis.

The calibration standard for Vitamin K₁ was performed with 6 replicates, resulting in a correlation coefficient of 0.9957. During the intra-day analysis, it was determined that the analytes stored at room temperature and 2-8°C did not pose any issues. However, due to the light sensitivity of Vitamin K and its derivatives, storage conditions should be kept dark. Vitamin K, MK-4, and MK-7 analytes were analyzed with 10 replicates, and the standard error of the results was calculated as 0.009. Based on this, the method's limit of detection (LoD) and limit of quantification (LoQ) were calculated as 0.02 ng/mL and 0.09 ng/mL, respectively. The average relative standard deviation was determined as 2.15%. In the recovery tests, the levels of Vitamin K, MK-4, and MK-7 in the prepared serum pool sample were found to be 1.72 ng/mL, 0.84 ng/mL, and 0.53 ng/mL, respectively. An additional 1 ng/mL of Vitamin K was added to the sample, and after analyzing with 10 replicates, the average percent recovery values for Vitamin K, MK-4, and MK-7 were calculated as 94%, 88%, and 85%, respectively. For the determination of the reference range, a reference population consisting of 64 healthy female and 67 healthy male control group volunteers who met the inclusion and exclusion criteria was included. As a result, the reference range was calculated as 0.1-1.2 ng/mL.

The method can provide results within a maximum of 30 minutes, including the pre-processing steps. Its distinguishing features from other methods in the literature include the absence of solid-phase extraction filters during the pre-processing step and the ability to deliver rapid results. After conducting method validation studies in research laboratories, it can be used for its intended purpose. Once method comparison and method validation studies are completed, it can be implemented for routine use. Python programming language was used to write the code for determining the reference range of Vitamin K, MK-4, and MK-7. To establish laboratory-specific reference ranges, which are recommended in clinical laboratories, this code can be integrated into laboratory information systems for all parameters. Enzyme-assisted extraction can also be utilized in the development of methods for quantifying other fat-soluble vitamins. Further research studies can be conducted in this field.

Keywords: vitamin k, phylloquinone, menaquinones, assay, mass spectrometry

1. GİRİŞ

Vitaminler yaşam için esansiyel fizyolojik fonksiyonlarda gerekli olan besinler arasında yer almaktadır. Vitaminleri suda çözünen yani bir veya daha fazla polar grubu bulunan (karboksil, keto, hidroksil, amino veya fosfat) ve yağda çözünen (lipofilik, apolar) şeklinde 2 gruba ayırabiliriz.

Vitamin K, temel olarak bitkiler ve bakteriler tarafından üretilen, elektron taşıma ve enerji üretimi için kullanılan lipofilik bir vitamindir. İnsanlar, protrombin üretimi, glutamik asit rezidülerinin posttranslasyonel modifikasyonu, kemik kalsifikasyonu, kalsiyum homeostazı ve hücre siklusu regülasyonu gibi esansiyel metabolik olaylar için Vitamin K ihtiyacı duymaktadır. Doğada, vitamin K'nın iki tipi bulunur: Vitamin K₁ (filokinon, PK, VK₁) ve vitamin K₂ (menakinon, VK₂, MK-n, burada n izopren ünitesi sayısını verir) [1].

Filokinon olarak da bilinen K₁ vitamini, yeşil yapraklı bitkilerde sentezlenir. K₂ vitamini, Menakinon (MK) olarak da bilinir ve 13 alt türevi keşfedilmiştir. İnsanlarda, K₂ vitamini kolonda yerleşmiş olan gram pozitif bağırsak bakterileri tarafından enterik mikrobiyal sentezle üretilmektedir. K₂ vitamini alt türevleri, isoprene birimlerindeki yan zincirlere göre adlandırılmaktadır. MK6-10 arası formlar en sık görülenlerdir. K₃ vitamini, doğal olarak bulunmayan, suda çözünebilir ve takviye amaçlı üretilen sentetik bir formdur [2, 3].

Vitamin K, insanların vücutlarında bulunan bazı proteinlerdeki glutamik asit kalıntılarının post-translasyonel modifikasyonu ile γ -karboksiglutamik aside (Gla) dönüştürülmesinde önemli bir rol oynamaktadır [4].

Bu döngü, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda gama-hidrojen yerine karboksil grubunun glutamat rezidüsüne eklenmesiyle gerçekleşmektedir. Bu reaksiyon, gama-glutamil karboksilaz enzimi tarafından katalizlenir. Vitamin K, NADH veya NADPH varlığında aktif formuna (hidrokinon) indirgenmektedir [5-7].

Hidrokinon epoksite, vitamin K'ya oksitlenir. Bu ikinci reaksiyon, Vitamin K bağımlı proteinleri aktive eden karboksilasyon reaksiyonuna bağlıdır. Sonuçta, epoksite vitamin

K, epoksit redüktaz aracılığıyla K vitamini dönüşür. Epoksit redüktaz, ditiyol bağımlıdır ve antikoagülanlar tarafından inhibe edilebilir [8].

Bu döngü sırasında, ilk olarak bulunan gama-karboksi glutamatlanmış protein protrombindir. Ayrıca, çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin (faktör 7, 9, 10, protein C, S, Z, M), inaktif durumdan aktif duruma getirilmesi için bu modifikasyon gereklidir [9-11].

Vitamin K eksikliği, pankreas işlev bozukluğu, safra hastalığı, bağırsak mukozasının atrofisi veya yağ salgısındaki artış nedeniyle oluşabilir. Bunun yanı sıra, antibiyotiklerle kalın bağırsağın steril hale getirilmesi, besinle alımın kısıtlı olması da Vitamin K eksikliğine yol açabilir. Aşırı E vitamini alımı, K vitaminine karşı antagonistik etki gösterebilir [3].

Yenidoğan bebeklerin Vitamin K eksikliği riski, plasentanın vitamini fetüse etkin şekilde aktarmaması ve bağırsağın doğumdan hemen sonra steril olması nedeniyle yüksektir. Yenidoğan ve süt çocukluğu döneminde, karaciğerdeki gama karboksilasyonla aktive edilen pıhtılaşma faktörleri (II, VII, IX ve X) için Vitamin K eksikliği, yenidoğanın hemorajik hastalığına neden olur [11, 12].

Vitamin K eksikliğinden en çok etkilenen protein, protrombindir (Faktör II). Protrombin seviyesi, %10-15 oranında düşerse, küçük travmalarla bile kanama meydana gelebilir. Protrombin seviyesi %10'un altına düştüğünde, ciddi spontan kanamalar belirgin bir neden olmaksızın meydana gelebilir [2].

Vitamin K eksikliğine bağlı kafa içi kanama, genellikle herhangi bir uyarıcı belirti olmadan aniden gelişebilir. Hastalar, şu belirtilerle başvurabilir: solukluk, kasılma nöbetleri, zihin bulanıklığı, kusma veya azalmış emme, ishal, bebeğin ön fontanelinde şişkinlik ve atım hissi gibi semptomlar. Vitamin K eksikliği durumunda protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) uzar [2].

Ayrıca, endojen koagülasyon inhibitörlerinin meydana geldiği hastalıklarda, yağ emilimini engelleyen zayıflama ilaçlarının kullanımında, yanıklarda, radyoterapi, X-RAY ve hemodiyaliz kullanımında Vitamin K eksikliği meydana gelebilir [12, 13]. Vitamin K seviyesinin belirlenmesi, eksikliğine bağlı komplikasyonların tanısında büyük önem arz etmektedir.

1.1 Tezin Amacı

Bu doktora tez çalışmasında katı faz ekstraksiyon kullanılmaksızın yüksek geri kazanım sağlayan yenilikçi bir ekstraksiyon aracılığıyla standartlara uygun analitik performans özelliklerine haiz Vitamin K ve türevlerinin LC-MS/MS ölçüm yönteminin geliştirilmesi ve Türk toplumuna ait Vitamin K referans aralığının belirlenmesi amaçlanmıştır.

1.2 Literatür Araştırması

Serum matrisi içerisinde 0.05-2.2 ng/mL seviyelerindeki düşük miktarlarda bulunan, lipoproteinler ile taşınan apolar bir metabolitin ölçümünü IFCC/CLSI standartlarındaki başarı kriterlerine uygun şekilde yapabilmek için Vitamin K ve türevlerinin yüksek geri kazanımlı ekstraksiyonunun başarımı büyük önem arz etmektedir [14]. LC-MS/MS yöntemi ile ölçümü yapılan metotlarda ölçüm başarısı açısından ekstraksiyon yöntemi ön plana çıkmaktadır. Mevcut literatürde katı faz ekstraksiyonu ile ölçüm gerçekleştirilen metotlar bulunmaktadır [15-18]. Ancak, LoD/LoQ değerleri standartlara göre kabul edilebilir seviyede değildir.

Suhara ve arkadaşları, LC-APCI-MS/MS cihazı ile Vitamin K, MK-4 ve MK-7 miktar tayini yapan bir metot geliştirmeyi amaçlamıştır. Geliştirilen metodun ekstraksiyon basamağında 13 mL n-Hekzan ve katı faz ekstraksiyon filtreleri kullanılmıştır. Analiz süresi 80 dakika ve yıkama ile birlikte toplamda 120 dakika süren metodun Vitamin K, MK-4 ve MK-7 geri kazanım oranlarının sırasıyla %98, %102 ve %102 olduğunu belirtmişlerdir. Vitamin K, MK-4 ve MK-7 LoQ değerlerinin sırasıyla 0.04 ng/mL, 0.05 ng/mL ve 0.08 ng/mL olduğunu belirtmişlerdir [16].

Hirauchi ve arkadaşları, HPLC-Florometri cihazı ile Vitamin K ve MK-4 miktar tayini yapan bir metot geliştirmiştir. Metodun ekstraksiyon basamağında 6 mL n-Hekzan ve yöntem maliyetini arttıran katı faz ekstraksiyon filtreleri kullanılmıştır. Analiz süresi 30 dakika süren metodun Vitamin K ve MK-4 LoQ değerlerinin 0.03 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir [19].

IFCC dökümanlarındaki tavsiyelere göre her toplum ve her laboratuvar için ayrı referans aralık hesaplamalarının yapılması gerekmektedir [20]. Farklı popülasyonlara

ait Vitamin K referans aralık belirleme çalışmalarında birbirine paralel olmayan sonuçlar elde edilmiştir [21-24]. Bu sonuçlar da IFCC tavsiyelerini desteklemektedir.

1.3 Hipotez

Vitamin K, insan vucudunda glutamik asit rezidülerinin posttranskripsiyonel modifikasyonu, kemik kalsifikasyonu, kalsiyum homeostazı ve hücre siklusu regülasyonu gibi esansiyel metabolik olaylarda görev alır. Bu nedenle, Vitamin K seviyesinin belirlenmesi, eksikliğine bağlı komplikasyonların tanısında büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında aynı zamanda, Vitamin K referans aralığının indirekt örnekleme yöntemi kullanılarak belirlenmesi de amaçlanmaktadır. Bu sayede, hastaların serum Vitamin K seviyelerinin belirlenmesine ve Vitamin K eksikliğine bağlı komplikasyonların tanısına katkı sağlanacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Vitamin K

Vitaminler yaşam için esansiyel fizyolojik fonksiyonlarda gerekli olan besinler arasında yer almaktadır. Diğer besinlerden farklı olarak enerji sağlamak yerine yapısal görevlerde işlev sağlarlar. Vitaminler türüne ve bulunduğu lokasyona göre kofaktör, antioksidan, oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları ve hormonal özellikler gibi görevlerde bulunabilirler [25]. Casimir Funk, bütün bu hayati yardımcı görevleri tanımlamak amacıyla bu moleküllere vital-amin kökünden gelen hayati aminler terimini kullanmayı seçmiştir [26, 27].

Vitaminleri suda çözünen yani bir veya daha fazla polar grubu bulunan (karboksil, keto, hidroksil, amino veya fosfat) ve yağda çözünen (lipofilik, apolar) şeklinde 2 gruba ayırabiliriz. Yağda çözünen vitaminler asetil-KoA'dan türetilen beş karbonlu isoprenoid birimlerinden oluştuğu için bitki ve hayvanlar biyosentez yapabilme kapasitesine sahiptir. Vitamin A (retinol, retinal, retinoik asit), Vitamin D (kolekalsiferol, ergokalsiferol), Vitamin E (α -tokoferol, γ -tokoferol) ve Vitamin K (filokinon, menakinonlar, menadion) yağda çözünen vitaminlerdir [1].

1929 yılında keşfedilen Vitamin K, Henrik Dam tarafından bulunmuş ve 1939 yılında kimyasal yapısı tanımlanmıştır. Aynı yıl sentez mekanizması da anlaşılmıştır. Henrik Dam ve Edward Doisy, 1943 yılında gerçekleştirdikleri çalışmalar sayesinde Nobel Ödülü kazanmışlardır [28-31].

Bu vitamin, yağsız diyetlerle beslenen tavuklarda aşırı kanama bozukluklarına neden olan bir madde olarak keşfedilmiş ve koagülasyon vitamini olarak adlandırılmıştır. Kimyasal yapısı 1939 yılında tanımlanmış, işlevi ise γ -karboksil glutamik asidin keşfiyle 1974 yılında açıklığa kavuşturulmuştur [32-34]. Vitamin K tarihi Tablo 2.1'de özetlenmiştir.

Vitamin K, elektron taşınımı ve enerji üretimi için kullanılan bir molekül olup, bitkiler ve bakteriler tarafından üretilmektedir. İnsanlar ise, protrombin sentezi, kemik

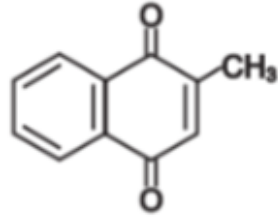
mineralizasyonu ve kalsiyum regülasyonu gibi önemli metabolik olaylarda Vitamin K kullanımına ihtiyaç duymaktadırlar [35-37].

Tablo 2.1 Bilim tarihinde Vitamin K ve türevleri ile ilgili yaşanmış önemli gelişmeler.

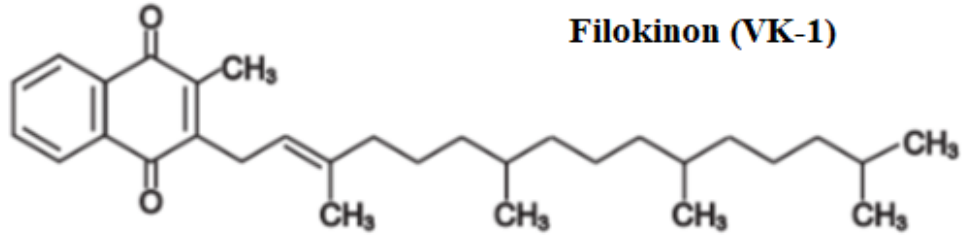
Tarih	Olay
1929	Yağsız diyetle beslenen tavuklardaki aşırı kanama bozukluklarının araştırılmasıyla keşfedilmiştir.
1935	Protrombin ile ilişkisi tespit edilmiştir.
1938	Menakinon (K ₂) keşfedilmiştir.
1939	Kimyasal yapısı tanımlanmıştır.
1941	Antikoagülanlar üretilmiştir.
1943	Henrik Dam ve Edward A. Doisy keşifleri ile Nobel ödülü almıştır.
1950	Menakinon (MK-n) türevleri keşfedilmiştir.
1960	MK-4'ün ilaç olarak kullanımı Japonya'da onaylanmıştır.
1974	γ -karboksil glutamik asidin keşfedilmesiyle metabolizmadaki işlevleri ortaya çıkmaya başlamıştır.
2015	Kardiyovasküler hastalıkların riskini düşürdüğü bildirilmiştir.

2.1.1 Kimyasal yapısı

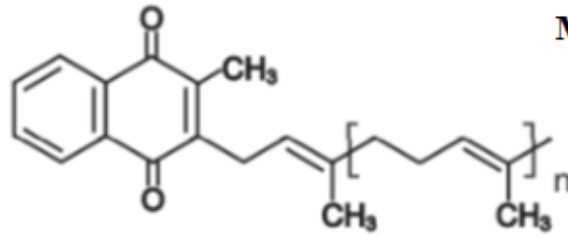
K vitamininin üç ana alt türü vardır: K₁ (2-Metil-3-fetil-1,4-naftokinon), K₂ (2-Metil-3-multiprenil-1,4-naftokinon) ve K₃ (2-metil-1,4-naftokinon) (Şekil 2.1).



Menadion (VK-3)



Filokinon (VK-1)



Menakinon (VK-2, MK-n)

Şekil 2.1 Vitamin K türevlerinin kimyasal yapısı.

2.1.2 Metabolizması

K₁ vitamini, filokinon olarak da bilinen yeşil yapraklı bitkiler tarafından sentezlenir. İnsanlarda ise, K₂ vitamini olarak da bilinen ve keşfedilmiş 13 alt türü bulunan menakinon (MK), enterik mikrobiyal sentez yoluyla kolonda bulunan gram pozitif bağırsak bakterileri tarafından üretilir (Tablo 2.2). K₂ vitamini alt türleri, yan zincirde bulunan izopren birimlerine göre adlandırılır ve en yaygın olarak MK6-10 arasında görülür. K₃ vitamini, menadion olarak da bilinir, doğal olarak bulunmayan, suda çözünebilen ve takviye amaçlı üretilen bir formdur.

Tablo 2.2 Menakinonların üretiminde görev alan enterik bakteriler ve üretim kapasitelerinin (+) toplam üretime oranı [38]

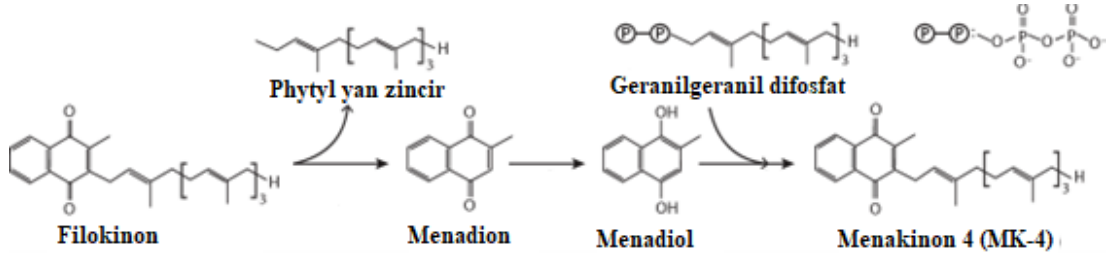
Organizma	MK-6	MK-7	MK-8	MK-9	MK-10	MK-11	MK-12
<i>Bacteroides fragilis</i>		+	+	+	++	++	++
<i>Bacteroides vulgatus</i>		+	+	+	++	++	++
<i>Eubacterium lentum</i>	++						
<i>Enterobacter sp.</i>			++				
<i>Enterococcus sp.</i>	+	+	+	++			
<i>Lactococcus lactis</i>		+	++	++			
<i>Leuconostoc lactis</i>		+	++	++			
<i>Veillonella sp.</i>	+	++					

K vitaminlerinin biyo-yararlanımı, yan zincirlerinin doğasına ve tüketilen besinlere, özellikle yağlara bağlı olduğu düşünülmektedir [39]. K vitaminleri için spesifik bir taşıyıcı henüz tanımlanmamıştır. Bağırsakta misellerin oluşumu ile lenfatik dolaşıma verilen K vitaminleri, lenf kanalları aracılığıyla karaciğere taşınır. Vitamin K, apo E etkileşimi ile karaciğer hücrelerine alınır.

K₁ ve MK-4 kısa bir yarılanma ömrüne sahipken, daha uzun yan zincirli K vitaminlerinin yarılanma ömrü daha yüksektir. Trigliserit açısından zengin fraksiyondan HDL'ye geçtiği gözlemlenen MK-4 ve MK-9'un izlendiği bir çalışmada, her ikisinin de HDL'ye geçtiği, ancak MK-9'un önce LDL'ye geçtiği bulunmuştur [37].

Vitamin K bağımlı pıhtılaşma proteinlerinin sentezlendiği karaciğer, K vitamininin ana depolama yeridir. Hem filokinonlar hem de menakinonlar hızla karaciğere taşınırken, diğer dokulara dağılan menadion daha yavaş bir şekilde alınır. Karaciğerdeki Vitamin K depolarının çoğu filokinon, MK-7, MK-10 ve MK-11'den oluşur. Beyin ve böbrekte MK-4 seviyesi filokinondan daha yüksektir [40].

Vitamin K, endoplazmik retikulum ve mitokondride lokalizedir. K vitamininin plasentadan geçişi zayıftır, bu nedenle normal plazma Vitamin K seviyesine sahip annelerin kordon kanında genellikle ölçülemeyecek kadar düşük seviyelerde bulunur. Bu nedenle, yenidoğanlarda hemorajik hastalık görülme riski yüksektir [41]. MK-4, diğer dokulardaki varlığı bakteriyel bir ürün olmadığı için, filokinonun fitil yan zincirinin geranilgeranil yan zincire dönüşümü ile açıklanır (Şekil 2.2). Dokular, tek diyet formu MK-4 olsa bile, daha uzun yan zincirli menakinonları da içerebilir [42].



Şekil 2.2 Filokinonun geranylgeranil yan zinciri ile MK-4'e dönüşümü.

Vitamin K'nın en önemli etkisi kan pıhtılaşması ile ilgilidir. Vitamin K eksikliği durumunda, kan pıhtılaşması gecikir ve protrombin düzeyleri düşer. Bu durum, Vitamin K tarafından protrombinin üretimindeki kritik rolünden kaynaklanır. Bununla birlikte, bitkiler, mikroorganizmalar ve hayvanlar tarafından yaygın şekilde sentezlenen K vitamininin, kan pıhtılaşması dışında başka fonksiyonları da olabileceği düşünülmektedir.

Özellikle, K vitamininin oksidatif fosforilasyonda görev aldığı bilinmektedir. Bazı araştırmalar, K vitamininin hayvansal dokularda elektron taşıma zincirinde özel bir koenzim olarak işlev görebileceğini düşündürmektedir. K vitamininin bir kinon olduğu ve reversibl olarak kinole indirgenebildiği için elektron taşıma yeteneği de olabilir. Dicoumarol, Vitamin K ile antagonist etki gösteren bir maddedir ve heparin gibi diğer antikoagülanlarla birlikte damar içi trombozları önlemede kullanılır [43].

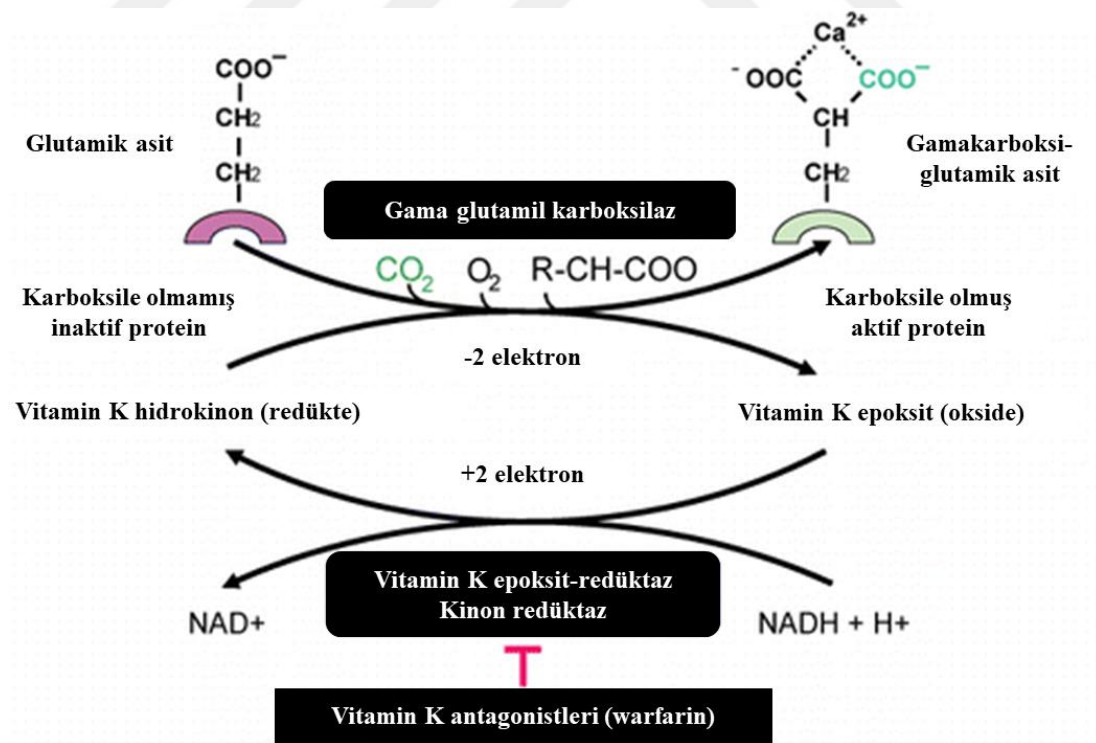
Vitamin K, besinlerde yaygın olarak bulunmakta ve ince bağırsaklarda mikroorganizmalar tarafından K₂ vitamini sentez edilebilmektedir, bu nedenle Vitamin K eksikliği nadiren görülmektedir. Ancak, yeni doğan bebeklerde henüz bağırsak mikroorganizmaları gelişmediği ve anne sütü yetersiz miktarda Vitamin K içerdiği için kanama riski oluşabilir. Ayrıca, uzun süreli antibiyotik kullanımı gibi bağırsak florasının tahrip edildiği durumlarda da Vitamin K eksikliği meydana gelebilir. Diğer yağda çözünen vitaminlerde olduğu gibi, yağ absorpsiyonunun yetersiz olduğu durumlarda da Vitamin K eksikliği görülebilir.

K vitamininin suda çözünen formu olan K₃ vitamini takviye olarak kullanılarak bu sorunların önüne geçilebilir. Suda çözünebilen sentetik form menadion, safra tuzu eksikliğinde bile emilerek doğrudan hepatik portal vene geçer. Bu nedenle, Vitamin K yetersizliği riski olan kişiler için K₃ vitamini takviyesi önerilebilir. [1, 43].

2.1.3 Vitamin K bağımlı proteinlerin gama karboksilasyonu

Vitamin K, insanların vücutlarında bulunan bazı proteinlerdeki glutamik asit kalıntılarının post-translasyonel modifikasyonu ile γ -karboksiglutamik aside (Gla) dönüştürülmesinde önemli bir rol oynar [4]. Bu reaksiyon, normal trombotik yolu başlatan ilk adımdır ve modifiye edilen kalıntılar genellikle spesifik protein bölgeleri olan Gla alanlarına yerleştirilir. Kalsiyumun bağlanmasıyla önemli bir rol oynayan Gla kalıntıları, bilinen bütün Gla proteinlerinin biyolojik aktivitesi için gereklidir [7, 44].

Proteinlerin Gla alanlarına sahip olması, üç fizyolojik süreç olan pıhtılaşma faktörlerinin, kemik metabolizması ve arteriyel damar duvarı kalsifikasyonunun düzenlenmesinde kilit bir rol oynar [45]. Vitamin K bağımlı proteinler, kemik ve diğer dokulardaki kalsiyum dengesi için önemlidir. Vitamin K bağımlı proteinler, kalsiyum kanalları yoluyla yüzey fosfolipitlerine bağlanarak pıhtılaşma faktörlerinin aktif formlarının sentezlenmesini sağlar [46]. Bu reaksiyon, Vitamin K epoksit döngüsü aracılığıyla mikrozomal enzimler tarafından gerçekleştirilir (Şekil 2.3) [47].



Şekil 2.3 Vitamin K redoks döngüsü [48].

Vitamin K, çeşitli fonksiyonel gama-karboksile proteinlerin oluşumu için, peptidil glutamil kalıntılarının karboksilasyonuna bağlı olarak döngüsel olarak oksidasyon ve indirgenme geçirir. Bu redoks döngüsü üç adımda gerçekleşir.

Vitamin K gama-glutamil karboksilaz, Vitamin K 2,3-epoksite katalizlerken dihidroksi-Vitamin K'nın (filokinon, MK-4 ve daha uzun yan zincirli menakinonlar dahil) oksidasyonunu gerçekleştirir. Bu enzim, endoplazmik retikulum ve golgide bulunan 94 kDa'lık bir proteindir.

Normal karaciğerdeki toplam vitamin K'nın yaklaşık %10'unu oluşturan Vitamin K-2,3-epoksit, insan, sığır ve sıçan Vitamin K gama-glutamil karboksilaz çalışmaları her birinde molekül başına üç gama-karboksilglutamil kalıntısı (Gla) olan yüksek dizi homolojisi gösterir [6]. Polimorfizmler, varfarin antikoagülasyonuna duyarlı bireyler arasındaki osteokalsinin gama-karboksilasyonundaki farklılıklarla ilişkilendirilmiştir [49, 50].

Vitamin K epoksit redüktaz, vitamin K-2,3-epoksitlerinin kinonlara indirgenmesini katalizler. Bu, Vitamin K döngüsündeki hız sınırlayıcı basamaktır. Kumarinler tarafından inhibe edilen 18 kDa'lık mikrozomal bir enzim olan Vitamin K epoksit redüktaz, Vitamin K kinon redüktaz olarak da bilinir. Bu enzimdeki genetik varyasyonlar, Vitamin K ve karboksillenmemiş osteokalsinin dolaşım seviyelerindeki farklılıkları varfarin tedavisine yanıtın takibinde kullanılmaktadır [51]. Ayrıca, kalp damar hastalıklarıyla da ilişkilendirilmektedir [52, 53].

Vitamin K kinonunun indirgenmesi, antikoagülanların inhibe ettiği, ditiyol bağımlı mikrozomal bir enzim olan vitamin K kinon redüktaz tarafından gerçekleştirilir. DT diaforaz, NADPH'ı indirgeme eşdeğeri kaynağı olarak kullanan bir mikrozomal flavoproteindir [32, 48].

Bu enzim, menadion sitotoksitesine karşı koruyarak, reaktif oksijen türleri üretebilen yarı kinonu üreten sitokrom P450-katalizli tek elektronlu indirgemelerle rekabet eder. Enzim ayrıca Vitamin K ve menakinonların indirgenmesini de katalizler, ancak en yüksek afinitesi menadion için geçerlidir. Kumarinlere göre nispeten duyarsızdır, böylece antikoagülanlar ile tedavi edilen bireylerde vitamin K kinonunun indirgenmesi devam eder [4, 32, 54].

Özetle bu döngü, karaciğer hücrelerinin endoplazmik retikulumunda gama-hidrojen yerine karboksil grubunun glutamat rezidüsüne eklenmesiyle gerçekleşmektedir.

Gamma-glutamyl karboksilaz enzimi tarafından katalizlenen bir tepkime ile bu durum gerçekleşir. Vitamin K, NADH veya NADPH'nin varlığında aktif formuna (hidrokinon) indirgenir.

Hidrokinon epoksit, vitamin K'ya oksitlenir. Bu ikinci tepkime, K vitamini bağımlı proteinlerin aktive edilmesiyle ilişkilidir. Sonuç olarak, epoksit vitamin K'ya dönüşür ve bu dönüşüm epoksit redüktaz enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Epoksit redüktaz, ditiyol bağımlı bir enzimdir ve antikoagülanlar tarafından inhibe edilebilir [8].

Bu süreçte, başlangıçta gamma-karboksi glutamat ile modifiye edilmiş protein protrombin olarak bilinir. Aynı zamanda, çeşitli pıhtılaşma faktörlerinin (faktör 7, 9, 10, protein Z, S, C, M) aktif hale getirilmesi için bu değişiklik gereklidir [9-11]. Vitamin K aracılığıyla gama-karboksi glutamatlanarak aktifleşen proteinler Tablo 2.3'te gösterilmiştir.

Tablo 2.3 Vitamin K aracılığıyla aktifleşen proteinler, görevleri ve spesifik olarak buldukları lokasyonlar [54, 55].

Protein	Fonksiyonu	Lokasyonu
Protrombin (Faktör II), Faktör VII, IX, ve X	Prokoagülan	Karaciğer
Protein C	Prokoagülan	Karaciğer
Protein S	Antikoagülan	Karaciğer
Protein Z	Protein C kofaktörü	Karaciğer
Osteokalsin	Antikoagülan Osteoklastlar için matriks sinyali ve kemik mineralizasyonu	Karaciğer
Matriks Gla protein	Kalsifikasyon inhibitörü	Kemik
Nefrokalsin	Kalsiyum okzalat taşlarının oluşumunun engellenmesi	Kemik, kırık ve diğer yumuşak dokular
Gas 6	Hücre büyümesinin regülasyonu	Proksimal tübüller
Prolinden zengin Gla proteini	Kalsifikasyonun düzenlenmesi	Spesifik bölgesi bulunmuyor
Periostin	Hücre dışı matriks mineralizasyonu	Spesifik bölgesi bulunmuyor
		Kemik

2.1.4 Klinik önemi

K vitamininin eksikliği, pankreas işlev bozukluğu, safra hastalığı, bağırsak mukozasının atrofisi veya yağ salgısındaki artış gibi faktörler nedeniyle yağların emilim bozukluğuna bağlı olarak ortaya çıkabilir. Antibiyotik kullanımı, sınırlı beslenme ve aşırı E vitamini alımı da Vitamin K eksikliğine yol açabilir. Yenidoğanlar, plasentanın Vitamin K aktarımındaki etkinliğinin düşük olması ve bağırsakların doğumdan sonra steril olması nedeniyle bu eksikliğe daha yatkındır. Bu durum, yenidoğanların hemorajik hastalığına neden olur ve karaciğerdeki gama karboksilasyon yoluyla pıhtılaşma faktörleri II, VII, IX ve X'u aktive eden Vitamin K takviyesiyle tedavi edilebilir [56, 57].

Yenidoğan bebekler, plasentanın yeterince vitamin K aktarmaması ve bağırsağın doğumdan hemen sonra steril olması nedeniyle vitamin K eksikliğine çok yatkındır [58].

Yenidoğanın hemorajik hastalığı ilk kez 1894 yılında Townsend tarafından tanımlanmıştır [59]. K vitamininin karaciğerde gama karboksilasyonla aktive ettiği faktör II, VII, IX ve X'un eksikliği, yenidoğanın hemorajik hastalığına yol açar [60]. Vitamin K eksikliğine bağlı kanamalar üç tipte görülmektedir. Bunlar erken tip, klasik tip ve geç tiptir.

Erken tip, ilk 24 saat içinde ortaya çıkar. Epileptik annelerde difenilhidantoin veya fenobarbital gibi ilaçların kullanımıyla ve daha sık olarak tüberküloz tedavisinde izoniazid veya rifampisin kullanımıyla tedavi edilen annelerde görülme sıklığı daha yüksektir. Bu tür kanamalarda aynı zamanda beyin içi kanama da gözlemlenebilir [60].

Klasik tipte, doğumdan sonra 48 ila 72 saat içinde vitamin K'nın plasentayı geçişi sınırlı olduğu için tüm yenidoğanlarda ortaya çıkar. Faktör 2, 7, 9 ve 10'da hafif bir düşüş meydana gelir ve genellikle 7 ila 10 gün içinde normal seviyelere ulaşır. Bu durum, bağırsak florasının henüz olgunlaşmamış olmasından kaynaklanır. Anne sütüyle beslenen bebeklerde, menakinon üretmeyen bifidus bakterisi florası baskındır [61]. Ayrıca anne sütündeki Vitamin K düzeyi 1 µg/L iken, formül mamalarda daha fazla olabilmektedir. Bu nedenle klasik hemorajik hastalık riski anne sütü ile beslenenlerde ve yetersiz beslenen bebeklerde artar [60, 62].

eç tip, genellikle doğumdan sonraki ilk haftadan sonra ve genellikle 2 ila 12 hafta içinde ortaya çıkar. Bazen bu süre 6 aya kadar uzayabilir. Bu tip kanamalar genellikle

beyin içi kanama şeklinde görülür. Anne sütünün yetersiz miktarda Vitamin K içermesi, yetersiz Vitamin K profilaksisi, kolestatik karaciğer hastalıkları (kistik fibroz, koledok kisti, alfa-1 antitripsin eksikliği) gibi Vitamin K'nın emilimini etkileyen durumlar ve antibiyotik kullanımı nedeniyle ortaya çıkabilir [63, 64]. Bu tür kanamaların sıklığı genellikle 4 ila 10/10000 arasında değişir ve Güney Doğu Asya'da daha yaygındır [60, 65].

Vitamin K eksikliği nedeniyle oluşan intrakraniyal kanama genellikle aniden ve herhangi bir uyarıcı belirti olmaksızın meydana gelebilir. Hastalar genellikle solukluk, konvülsiyon, bilinç bulanıklığı, kusma veya emmede azalma, ishal, ön fontanelde bombelik ve pulsasyon gibi semptomlarla karşılaşabilirler.

Vitamin K eksikliği olan hastaların protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) uzar ve trombosit sayısı normal olarak saptanır. Yenidoğanlarda hemorajik hastalık için spesifik bir test olmamakla birlikte, K vitamininin intramusküler veya intravenöz olarak verilmesinin ardından 24 saat içinde PT ve aPTT'nin normale dönmesi, tanıyı doğrular. [60, 66].

Vitamin K eksikliği, özellikle protrombin (Faktör II) proteininin en çok etkilendiği bir durumdur. Protrombin seviyesi normalin %10-15'ine düştüğünde, küçük travmalar bile kanamaya neden olabilir. Protrombin seviyesi %10'un altına düştüğünde ise belirgin bir sebep olmaksızın ciddi spontan kanamalar meydana gelebilir [67].

Vitamin K eksikliğine bağlı kafa içi kanama çoğunlukla herhangi bir uyarıcı belirti olmadan aniden gelişebilir. Hastalar, solukluk, konvülsiyon, bilinç bulanıklığı, kusma veya emmede azalma, ishal, ön fontanelde bombelik ve pulsasyon gibi semptomlarla başvurabilir [68]. Vitamin K eksikliği olan olgularda, protrombin zamanı (PT) ve aktive parsiyel tromboplastin zamanı (aPTT) uzamış olarak saptanabilir.

Ayrıca, endojen koagülasyon inhibitörlerinin meydana geldiği hastalıklarda, yağ emilimini engelleyen zayıflama ilaçlarının kullanımında, yanıklarda, radyoterapi, X-RAY ve hemodiyaliz kullanımında da Vitamin K eksikliği ortaya çıkabilir [12, 13].

K vitamininin eksikliği osteoporoza bağlı kemik kırıklarına neden olabilir ve kırığın şiddeti Vitamin K miktarı ile ilişkilidir [69, 70]. Düşük Vitamin K seviyeleri daha büyük kırıklara yol açabilir. K₁ vitamininin yeşil yapraklı sebzelerde bulunması, vejeteryenleri osteoporozdan koruyan faktörlerden biridir [71, 72].

Kemikteki Vitamin K'ya bağımlı Gla proteinlerinin varlığı, Vitamin K'nın kemik sağlığındaki rolünü göstermektedir. Düşük vitamin K seviyeleri ve/veya düşük vitamin K alımları olan bireylerin osteoporoz veya kırık riskinin yükseldiğini gösteren birkaç çalışma yapılmıştır [73]. 72.000 kadından oluşan bir çalışmada, vitamin K alımları >109 µg/gün olan kadınların yaşa göre ayarlanmış kalça kırığı riskinin, daha düşük miktarlar tüketenlere göre %30 daha az olduğunu bulmuştur [74]. Benzer bir ilişki, başka bir çalışmada daha gözlemlenmiştir.

Vitamin K alımı en yüksek (254 µg/gün) gruptaki konular, en düşük (56 µg/gün) gruplara göre önemli ölçüde kalça kırığı riskinde azalma görülmüştür [35]. Düşük Vitamin K seviyesi, erkeklerde ve kadınlarda artiküler kırık ve menisküs hasarı ile de ilişkilendirilmiştir [75]. Bu çalışmalar MK-4'ün kırık riskini azalttığını ve kemik mineral yoğunluğunu iyileştirdiğini belirtmiştir [45]. Bu tür etkilerin, kemikteki 3 Vitamin K'ya bağımlı Gla proteini aracılığıyla sağlandığı görülmektedir [76].

Osteokalsin kalsifiye dokuların en karakterize Vitamin K'ya bağımlı proteinlerden birisidir. Vitamin K'ya bağımlı plazma proteinleriyle homolojisi yoktur. Kemik matrisindeki kolajenden sonra ikinci en fazla bulunan proteindir ve toplam kemik proteininin yaklaşık %2'sini ve kolajen olmayan proteinin %10-20'sini oluşturmaktadır. Karboksilasyonu, varfarin tedavisiyle inhibe edilirken, menakinon takviyesi ve 1,25-(OH)₂-vitamin D₃ ile uyarılabilir. Osteokalsinin yaklaşık %20'si kemiklere bağlanmaz ve plazmaya geçebilir.

Çoğu türde, steokalsin her bir Gla alanında tamamen karboksile edilmiştir. Bu insanlarda böyle değildir. Benzer şekilde, insan plazmasındaki osteokalsinin büyük bir kısmı karboksile edilmemiştir. Plazma karboksillenmemiş osteokalsin seviyeleri hem vitamin K'ya bağımlı karboksilazda hem de epoksit redüktazdaki polimorfizmlerle ilişkili olan genetik değişkenliklere tabidir.

En yüksek karboksillenmemiş osteokalsin seviyeleri, Paget hastalığı gibi artmış kemik rezorpsiyonu/mineralizasyonu içeren diğer bozukluklarda ve genç çocuklarda bulunmaktadır. Osteokalsin karboksilasyon derecesinin, yaşlı kadınlarda kas gücü ve kemik sağlığı ölçüleriyle pozitif korelasyonlu olduğu bulunmuştur. Bu da karboksile osteokalsinin iskelet sağlığında önemli bir rol oynadığını göstermektedir [77].

Matriks Gla Protein (MGP), beş Gla kalıntısı arasında yer alan kalsiyum bağlanma aktivitesi kazandıran osteokalsin ile yapısal olarak ilişkili, çözünmeyen bir

polipeptittir. Vasküler ve düz kas hücreleri de dahil olmak üzere birçok yumuşak dokuda ifade edilmektedir. Ancak sadece kalsifiye dokularda birikir. Demineralize kemik matrisi ve mineralize olmayan kırıkta gibi yerlerde belirgin afiniteleri vardır. MGP, Vitamin K gama-karboksi glutamat tarafından beş Gla kalıntısı ve üç serin kalıntısının fosforile edilmesi sonrasında posttranslasyonel olarak modifiye edilir. Normalde, MGP tamamen karboksile olmaktadır. Ancak hemodiyaliz uygulanan hastalarda tam karboksile edilmemiş olduğu bulunmuştur [78].

Protein S, osteoblastlar tarafından sentezlenir. Trombin duyarlı bölge, bir epidermal büyüme faktörü benzeri alan ve bir steroid hormonu bağlama alanı içerir. Tirozin kinaz reseptörlerine bağlandığı gösterilmiştir [79]. Düşük protein S seviyelerine sahip iki pediatrik vakada, ağır osteopeni, düşük kemik mineral yoğunluğu ve vertebral kompresyon kırıkları bulunmuştur. Bu nedenle kemik fonksiyonunda rolü bulunduğu düşünülmektedir.

Periostin, kemik kaynaklı mezenkimal stromal hücreler tarafından üretilmektedir ve salgılanmaktadır. Mineralize kemik nodüllerinde bol miktarda bulunmaktadır. Ekstrasellüler kemik matrisinin oluşumunda işlevi olduğu düşünülmektedir [80].

Vitamin K takviyesi, karotis arterinin fonksiyonel özelliklerini iyileştirdiği, koroner arter kalsifikasyonu riskini azalttığı ve kardiyovasküler ölüm riskini azalttığı bulunmuştur [36, 81, 82].

Atherokalsin, kalsifiye aterosklerotik dokularda keşfedilmiştir. Atherokalsinin arter duvarlarında bulunan Vitamin K gama-glutamil karboksilazı inhibe edebileceği ve ateroskleroz gelişiminde rol oynayabileceği öne sürülmüştür [83].

Gas6, 75 kDa'lık bir proteindir. Protein S ile benzer şekilde, epidermal büyüme faktörü benzeri bir alan içerir. Protein S, Gas6 ile %44 dizi homolojisine sahiptir ve trombine duyarlı alanlara sahiptir. Gas6, sinir dokusunda geniş bir dağılıma sahiptir ve hücreleri apoptozdan koruduğu düşünülmektedir. Ayrıca hipokampal nöronlar üzerinde nörotrofik aktivite gösterdiği ve birkaç tür sinir hücresinin büyümesini ve hayatta kalmasını teşvik ettiği gösterilmiştir. Beyin mikrozomlarının gama-karboksilaz aktivitesi eksikliği, Gas6'nın posttranslasyonel glutamasyonunun başka dokularda oluşması gerektiği anlamına gelmektedir [84].

Gla zengin protein, kırıkta tanımlanmıştır. Diğer bilinen Gla proteinlerinden daha fazla Gla kalıntısı vardır [85].

Prolin-zengin Gla proteinleri, çeşitli ekstrahepatik dokularda ifade edilen küçük (17-23 kDa), tek geçişli transmembran proteinlerdir [86, 87]. Transtiretin, retinol ve tiroksin bağlar. Renal Gla proteinin kalsiyum taşınması ve atılımında rol oynadığı düşünülmektedir [88].

Diğer Gla proteinlerinin sperm, idrar ve hepatik mitokondride bulunduğu da bildirilmiştir. Vitamin K'nın nörolojik fonksiyonlarda da işlevi bulunmaktadır. Varfarinin beyin sfingolipid içeriğini ve nöral dokuda bulunan MK-4'ü azalttığı ve sfingolipidlerin, sülfatidlerin, sfingomiyelinlerin ve gangliositlerin nöral dokulardaki içerikleriyle güçlü bir şekilde ilişkili olduğu gösterilmiştir [44, 89].

Vitamin K'nın lipopolisakkarit uyarımlı inflamatuvar yanıtı azaltması ve MK-4'ün prostaglandinlerin ve IL-6'nın sentezini azaltması gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar Vitamin K'nın anti-inflamatuvar etkisi olabileceğini düşündürmektedir.

Hipoprotrombinemi, antibiyotik kullanımıyla ilişkilendirilmiştir. Hipoprotrombinemi yaygınlığı, 1980'lerde β -laktam antibiyotiklerinin kullanıma girmesiyle artmıştır. Bu ilaçlar intravenöz olarak uygulansa da safra salınımı yoluyla enterik bakteriyel metabolizmayı etkilemektedir. Tüm hastalarda fekal menakinonların seviyesini değiştirmemiş ancak Vitamin K ile tedavi edilen hastalarda dolaşımdaki vitamin K-2,3-epoksit seviyelerini arttırmıştır [90].

Vitamin K seviyesinin antikarsinojenik bir rol oynayabileceği, MK-4 tedavisinin inoperabl bronşiyal karsinomlu hastaların yaşam süresini artırdığı bulunduğu zaman düşünülmüştür [91]. Bu çalışmalardan sonra hepatoselüler karsinomlu hastalarda yüksek seviyelerde gama karboksile olmayan protrombin düzeyleri olduğu gözlemlenmiştir.

Büyük bir prospektif çalışmada, kanser mortalitesinin yüksek Vitamin K alımlarına sahip bireylerde önemli ölçüde daha az olduğu bulunmuştur [82]. Başka bir çalışmada menakinon seviyesinin kanser insidansı ve mortalitesi ile ters korelasyon gösterdiği bildirilmiştir. Vitamin K ile herhangi bir ilişki gözlenmemiştir [92]. Viral sirozu olan 43 kadında günlük 45 mg 8 yıl menakinon tedavisi yapılan klinik bir araştırmada hepatoselüler karsinom riskinin kontrol grubuna kıyasla %87 azaldığı tespit edilmiştir [93].

Obezite, düşük vitamin K düzeyleri ile ilişkilendirilmiştir. Adipoz dokusu, Vitamin K'yı nispeten yüksek seviyelerde depolar [94]. Glikoz metabolizması yolağındaki

parametreler serum toplam karboksile edilmemiş osteokalsin konsantrasyonlarıyla ters orantılı olarak ilişkilendirilmiştir [95]. Vitamin K seviyeleri kadınlarda vücut yağ yüzdesi ile ters orantılı olarak bulunmuştur [96]. Erkeklerde ve kadınlarda oral glikoz tolerans testlerinden alınan ölçümlerle gösterilen daha iyi insülin duyarlılığı ve glisemik kontrolle ilişkilendirilmiştir [97]. Başka bir çalışmada Vitamin K takviyesinin erkeklerde insülin direncini azalttığını tespit etmiştir [98].

2.1.5 Besin kaynakları ve emilimi

Vitamin K, türevlerine göre farklı kaynaklardan elde edilir. K₁, özellikle yeşil yapraklı sebzelerde (örneğin, kara lahana), *Brassica* cinsine ait sebzelerde (örneğin, Brüksel lahanası, brokoli), meyvelerde (örneğin, avokado, kivi ve yeşil üzümler), otlarda (örneğin, kişniş, maydanoz) ve yeşil ve bitkisel çaylarda bulunabilir (Tablo 2.4). Soya, kanola ve zeytinyağı gibi bitkisel yağlar da diğer diyet kaynaklarıdır.

Yeşil yapraklı bitkiler, ortalama olarak 400 ila 700 µg/100 g aralığında K₁ vitamini içeren en zengin kaynaklardan biridir. Ayrıca, soya, kolza tohumu ve zeytin gibi bazı bitkilerden elde edilen yağlar da yüksek düzeyde (ortalama 50-200 µg/100 g) K₁ vitamini içerir. Bununla birlikte, yer fıstığı, mısır, ayçiçeği, aspir gibi bazı bitkilerden elde edilen yağlar çok daha düşük oranlarda (ortalama 1-10 µg/100 g) K₁ vitamini içermektedir [99, 100].

Fermente edilmiş yiyecekler arasında fermente tereyağı veya peynir, kesilmiş peynir, yumurta sarısı ve sığır karaciğeri menakinon kaynaklarıdır. *Bacillus subtilis* kullanılarak fermantasyon yoluyla üretilen geleneksel bir Japon soya fasulyesi bazlı gıda olan Natto, MK-7 kaynağıdır [101]. Sentetik formu hayvansal gıdalara eklenerek tüketildiğinde karaciğer tarafından MK-4'e metabolize edilir [102, 103].

K vitamininin biyoyararlılığı hakkındaki bilgiler oldukça sınırlıdır ve yeşil yapraklı sebzelerde bulunan K₁ vitamini emilim düzeyleri oldukça düşüktür. Bu düşük emilim, K₁ vitamininin yeşil yapraklı sebzelerin kloroplastlarına sıkı bir şekilde bağlı olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak MK-4 ile zenginleştirilmiş tereyağındaki K vitamininin emilimi, haşlanmış ıspanaktaki K₁ vitamini emiliminden iki kat daha fazladır. Bu, Vitamin K aktivitesi taşıyan bileşenlerin biyoyararlılığının besinlere sıkıca bağlı olmadığı durumlarda yükseldiği anlamına gelmektedir [104].

Tablo 2.4 Vitamin K besin kaynakları ve içerdikleri Vitamin K miktarları [55].

Besinler	Vitamin K Miktarı (µg/100 g)
Asparagus	51
Snap Fasulyesi	48
Pancar	0.2
Brokoli	141
Lahana	109
Havuç	14
Karnabahar	14
Mısır	0.4
Salatalık	16
Kereviz	817
Domates	2
Marul	103
Bezelye	30
Patates	0.3
Ispanak	494
Tatlı Patates	2
Kanola	71
Mısır	2
Zeytinyağı	60
Fıstık	0.7
Soya Fasulyesi	184
Elma	2
Muz	0.05
Kızılcık	5
Portakal	0
Şeftali	3
Çilek	2
Dana Eti	1-3
Domuz Eti	0.1-0.2
Dana Ciğeri	3
İnek Sütü	0.1-0.6
Yumurta	0.3
Yumurta Sarısı	0.7
Pirinç	0-0.2
Buğday Kepeği	2
Buğday Unu	2

İnsan barsaklarında distal kolonda birçok K₂ vitamini formu sentezlenebilmektedir [105]. Barsaklarda bulunan fakültatif ve zorunlu anaerob bakteriler, şikimik asit ve α-ketoglutarattan uzun zincirli K₂ vitamini formlarının (menakinon-10-13 arası) sentezlenmesine katkıda bulunmaktadır [106]. Ancak intestinal K vitamininin biyoyararlılığı düşüktür çünkü K₂ vitamini sentezi çoğunlukla safra asitlerinin

bulunmadığı kolonda gerçekleşir ve daha çok bakteriyel sitoplazmik membrana sıkıca bağlı kalır [3].

Vitamin K, diyetle alındıktan sonra ince barsakta safra asitleriyle miçeller oluşturarak emilir. Emilim işlemi, intestinal mukozadan şilomikronlar içinde taşınarak lenf yoluyla kana geçer. K vitamininin emilimi, safra asitlerinin varlığı ve pankreas işlevlerinin normal olmasına bağlıdır.

Genel olarak, diyetle alınan Vitamin K'nın emilim oranı %40 ila %70 arasında değişir. K₁ vitamini, proksimal barsaklarda aktif taşıma yoluyla emilirken, K₂ ve K₃ vitamini formları miçeldeki yağ asitleri ve safra tuzları konsantrasyonuna bağlı olarak barsakların distal kısmından ve kolondan pasif difüzyon yoluyla emilir. Emildikten sonra, K vitamini formları apoprotein E reseptörleri tarafından karaciğere taşınır ve düşük dansiteli lipoproteinler (LDL) ve yüksek dansiteli lipoproteinler (HDL) arasında transfer edilir (Tablo 2.5). K vitaminine özel bir taşıyıcı protein yoktur [107].

Vitamin K'nın alımı, hücrelerdeki diğer lipitlerle benzer şekilde gerçekleşir. Vitamin K taşıyan şilomikron kalıntıları, yüzeylerindeki LDL reseptör ailesine özgü hücre yüzey reseptörlerine bağlanarak hücreye alınır. Bu süreç, apoE içeren trigliserit açısından zengin lipoproteinlerin ve HDL'lerin şilomikron kalıntıları tarafından taşınmasıyla gerçekleşir [108]. Bu sayede, şilomikron kalıntıları yüksek afiniteli hücre yüzey reseptörlerine daha kolay bağlanabilir ve bu bağlanma heparin sülfat proteoglikanlar tarafından kolaylaştırılan hücre içi alımı sağlar.

Belirli bir doz Vitamin K'nın oral alımından sonra, radyoaktif metabolitlerin hızla görünmesi, Vitamin K'nın hızlı bir şekilde emildiğini göstermiştir [109].

Tablo 2.5 Vitamin K'nın dolaşımdaki dağılımı [37].

Fraksiyonlar	Serum Vitamin K Oranı (%)
Trigliserit Zengin Fraksiyon	51.4 ± 17.0
LDL	25.2 ± 7.6
HDL	23.3 ± 10.9

K₁ vitamini dolaşımda en yaygın olan formdur ve karaciğer dışında kortikal ve trabeküler kemikte de bulunur [37]. Karaciğerde depo halinde bulunan formun %90'ını K₂ vitamini, %10'unu K₁ vitamini formu oluşturur. K₁ vitamini depoları A vitamini

depolarından 20 ila 40 bin kat daha azdır, bu da diyetle alınan K₁ vitamininin yüksek oranda atıldığını gösterir [106, 110, 111].

2.1.6 Toksisitesi

Vitamin K'nın toksisitesi konusunda genel olarak doğal vitamin K kaynaklarının kullanımıyla ilişkili sistematik toksisite vakaları oldukça nadirdir. Hem hayvanlar üzerinde yapılan araştırmalar hem de insanlar üzerindeki gözlemler, yüksek miktarda vitamin K alımının pıhtılaşma süreçlerine aşırı bir etkisi olabileceği endişelerine rağmen, gerçekleşmediğini göstermektedir. Bu durum, vitamin K'nın γ -karboksilasyon süreci için sınırlı sayıda aktif bölgeye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Ancak, nadir de olsa bazı vakalarda yüksek dozlarda vitamin K'nın paradoksal bir şekilde pıhtılaşma faktörlerinde eksikliğe neden olduğu görülmüştür. Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda ise, büyük dozlarda vitamin K'nın kanamalara ve anemiye yol açtığı tespit edilmiştir [112].

Mevcut veriler, insanlarda günlük 10 mg vitamin K₁ alımının bir ay boyunca herhangi bir olumsuz etkiye yol açmadığını göstermektedir. Bu bulgular, hayvan deneylerinde elde edilen sonuçlarla uyumlu olup aynı süre boyunca 2 g/kg dozunda bile güvenli olduğunu göstermektedir. Bildirilen vitamin K yan etkileri genellikle lokal etkilerle sınırlıdır ve genellikle vitamin K₂ alımını takiben hafif gastrointestinal şikayetler ve cilt döküntüleri şeklinde ortaya çıkmaktadır. Ancak bu etkiler, vitamin K takviyesi kesildikten sonra kaybolmaktadır [113].

Klinik uygulamada, vitamin K₁'in intramusküler enjeksiyonu, enjeksiyon bölgesinde ağrı ve cilt morarması gibi yan etkilere neden olabilmektedir. Öte yandan, yüksek dozlarda vitamin K₃ kullanımı, özellikle yeni doğan bebeklerde hemolitik anemi gibi toksik reaksiyonlara yol açabilmektedir. Bu reaksiyon, vitaminin redoks döngüsüyle ilişkilendirilmektedir [114].

Son olarak, intravenöz vitamin K₁ preparatlarının bazen anafilaktoid reaksiyonlara neden olabileceği gözlemlenmiştir. Bu reaksiyonlar, vitamin K'nın lipid çözünürlüğünden kaynaklanan sulu kolloidal süspansiyonlardaki bileşenlerle ilişkilendirilmekte ancak, lipozomal preparatların kullanımı bu olumsuz reaksiyonları engelleyebilmektedir [115].

2.2 Tandem Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometresi, bir molekülün kütle-yük oranını (m/z) ölçerek molekül yapısını belirleyen bir analitik tekniktir. İyonizasyon teknikleri çeşitlilik göstermektedir. İyonların ayrılması ve tespiti yüksek vakum koşullarında bir iyon kaynağı, bir kütle analizörü ve bir dedektörden oluşan bir sistemle gerçekleştirilir. Kütle spektrometresi, yüksek tarama hızı ve çözünürlüğü sayesinde özellikle biyolojik bilimlerde birçok uygulamaya sahiptir [116, 117].

Son yıllarda geliştirilen ileri cihazlar sayesinde kütle spektrometresi hızlı, hassas ve basit bir işlem olarak gelişmiştir. Kütle spektrometresi, birkaç temel elemandan oluşur ve iyonları m/z değerlerine göre ayırır. Sistem kontrol yazılımı, bu sinyallerin yoğunluğunu m/z değerinin bir fonksiyonu olarak transkribe eder ve bu verileri kütle spektrumu olarak sunmaktadır [117].

Tandem MS veya MS/MS, klinik laboratuvarlarda yaygın olarak kullanılan ve rutin örneklerin nicel analizinde geniş uygulama alanı bulan baskın bir MS tabanlı tekniktir. Ancak, yapısal karakterizasyon ve bileşik tanımlama için de kullanışlı bir tekniktir ve bu nedenle keşif çalışmalarında sıkça kullanılır. Bu teknikteki en önemli özellikler, son derece yüksek seçiciliği, çok düşük analit konsantrasyonlarını ölçme yeteneği ve tek bir yöntemde birden çok analitin ölçümünü çoğaltabilme yeteneğidir. MS/MS'nin interferansa karşı duyarlılığı genellikle çok düşüktür. Bunun nedeni, tespit edilen bileşiğin üç fiziksel özellik tarafından ayrıldığı ve karakterize edildiği için: kromatografik tutma süresi, öncü iyon kütlesi ve ürün iyon kütlesi. Yüksek özgüllüğü, düşük tüketim maliyeti ve potansiyel yüksek örnekleme tüketim oranı nedeniyle, artan sayıda klinik laboratuvar, rutin örnek analizi için tandem kütle spektrometrelerini kullanmaktadır.

Kütle spektrometresi ayrıca nicel analiz yapabilme özelliği, elementel ve izotopik bileşimi analiz edebilme yeteneği ve maddenin açık bir şekilde tanımlanmasını sağlayabilme avantajlarına sahiptir. Orbitrap, yüksek tarama hızı ve yüksek çözünürlüğü ile biyolojik bilimlerde sıklıkla tercih edilir konuma gelmiştir [118]. Farklı kütle spektrometresi tekniklerinin karşılaştırması Tablo 2.6'da sunulmuştur.

Tablo 2.6 Kütle spektrometrisi tekniklerinin karşılaştırması [119].

	Quadrupole	İyon Tuzağı	TOF	Manyetik Alan	FT-ICR	FT-Orbitrap
Kütle limiti (m/z)	4000	6000	10000000	20000	30000	50000
Çözünürlük (Da)	2000	4000	5000	100000	500000	100000
Doğruluk (ppm)	100	100	200	10	5	5
İyon sürekliliği	Devamlı	Aralıklı	Aralıklı	Devamlı	Aralıklı	Aralıklı
CE	Düşük	Düşük	Yüksek	Yüksek	Düşük	-

Sıvı kromatografi tandem kütle spektrometrisi yüksek performanslı sıvı kromatografinin (HPLC) tandem kütle spektrometriye doğrudan bağlı olduğu bir sistemdir. Likit Kromatografi – Tandem Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS), birçok ayırma yöntemiyle birleştirilebilir [120].

LC-MS'nin dört ana formu vardır: ters-faz LC, normal veya düz-faz LC, hidrofilik sıvı etkileşim kromatografisi (HILIC) ve iyon-değişim LC. Ayrımların çoğu, kolondaki sabit faz ile numunedeki analitlerin, bir mobil faz varlığındaki afinite farklılığına dayanmaktadır [121].

Sıvı kromatografide ayrımları yapılan analitler tandem kütle spektrometresi (MS/MS) kısmında iyonlaşır, ilgili kütleler seçilir ve aranan moleküller tespit edilir. Kütle spektrometresinde kullanılan iyonlaştırma teknikleri Tablo 2.7'de özetlenmiştir. Tandem MS analizinde en sık kullanılan iyonlaşma tekniği elektrosprey iyonizasyonudur (ESI). Analitleri içeren mobil faz, LC kısmından gelen ve ayrılmış olan bileşiklerin bulunduğu faz, atmosferik basınç altında çok ince bir nano-sprey iğnesi kullanılarak yüksek voltaj uygulanarak püskürtülür ve damlacıklar şeklinde dağıtılır. Damlacıklar, iğneden çıktıklarında yüklüdürler. Sisteme verilen bir inert gaz (Azot), çözücü damlacıklarının boyutunu küçültmeye ve yüklü analit moleküllerinin yüklerini artırmaya yardımcı olur. Bu süreç, çözücü damlacıklarının tamamen buharlaşmasına ve negatif veya pozitif yüklü serbest moleküllerin geriye kalmasına kadar devam eder [122, 123].

LC-MS/MS'de kullanılan başka bir iyonlaşma tekniği atmosferik basınç kimyasal iyonizasyondur (APCI). Bu yöntemde, LC'den ayrılmış örnek çözeltisi, ısıtılmış bir tüp içine püskürtülür. Azot gazının akışıyla birlikte, bu bölgede nano damlacıklar buharlaşır. Buharlaşma sonrasında, çözücü molekülleri iyonlaşır. İyonlaşma işlemi tüpün dışında gerçekleşmektedir [120, 121].

İyonlar, çözücü ve analit arasındaki çarpışmaların ve yük transfer reaksiyonlarının sonucunda oluşur. MS/MS'in hassasiyeti, iyonlaşma etkisine doğrudan bağlıdır. Düşük ve orta molekül ağırlıklı apolar moleküller için daha etkili bir iyonlaşma sağlamak için APCI tekniği kullanılabilir [124].

ESI tekniği ise, polar ve orta derecede apolar bileşiklerin geniş bir molekül kütle aralığında daha iyi iyonlaşmasını sağlar. Büyük biyolojik moleküllerin buharlaştırılması ve iyonlaştırılması zor olduğundan, ESI özellikle bu tür moleküller için faydalı bir iyonizasyon tekniği olarak kabul edilir [122]. İyonizasyondan sonra, elektrik alanın zorlamasıyla yüklü analitlerin tandem kütle spektrometrenin yüksek vakumuna girdiği iyonlar, giriş deliğine doğru hareket eder. İyonlar, kütlelerine göre ilk seçimin yapıldığı kuadrupol 1'e girer. Kuadrupol voltajları değiştirilerek iyonlar analiz edilir [119].

Kuadrupolda oluşan elektrik alan, sadece belirli m/z oranına sahip iyonların doğru yolu izleyerek kuadrupolden geçmesine izin verir ve diğerlerini ayırır. Seçilen iyonlar, kuadrupol 2'ye ilerler ve bir gaz (örneğin azot) varlığında hafif bir basınç altında fragmentlere ayrılırlar. Sonrasında, kuadrupol 3'e geçen analit fragmentlerinin m/z'ye göre ikinci bir seçimi yapılır. Yüklü analitlerin veya fragmentlerin tespiti ve elektrik sinyaline dönüştürülmesi, bir elektron çoğaltıcı dedektör tarafından gerçekleştirilir. Bu sinyal bilgisayara iletilir ve kütle spektrumu piklerini içeren veriler elde edilir [125, 126].

Tablo 2.7 Kütle spektrometrisinde kullanılan farklı iyonlaştırma tekniklerinin karşılaştırması.

İyon Kaynağı	İyonlaştırma Şekli	Numune Çeşidi	Parçalama	Büyükük	Ajan
Electron Impact (EI)	Elektron kaybı	Bileşikler	Yüksek parçalanma	<1000 Da	Enerjik Elektronlar
Electrospray (ESI)	Elektronlama	Peptitler, proteinler	Düşük parçalanma	<1000 Da	Elektrik alan
Atmospheric Pressure Chemical (APCI)	Pozitif deşarj (korona)	Polaritesi düşük bileşikler	Kimyasal parçalanma	<2000 Da	Atmosferik basınç
Matrix-assisted laser desorption (MALDI)	Buharlaştırma	Peptitler, proteinler	Hassas parçalanma	<500000 Da	Yüksek enerjili lazer

2.2.1 Python ve R ile spektrum analizi

Python, yüksek seviyeli bir programlama dilidir ve genellikle kolay okunabilirliği ve anlaşılabilirliği ile tanınır. Python, nesne yönelimli bir yapıya sahip olmakla birlikte, dinamik bir tip tanımlama sistemine de sahiptir. Bu dil, geniş bir kullanım alanına sahip olmakla birlikte, web geliştirme, veri analizi, yapay zeka, bilgisayar oyunları ve metabolomiks çalışmaları gibi birçok alanda kullanılmaktadır. Python, açık kaynaklı bir projedir ve topluluk tarafından sürekli olarak geliştirilip güncellenmektedir.

Yaşam bilimleri, Python'un yaygın olarak kullanıldığı alanlardan biridir. Biyoloji, kimya ve diğer ilgili alanlarda, Python sıklıkla veri analizi, veri görselleştirme ve modelleme için kullanılır. Özellikle, büyük veri setlerinin analizi ve yorumlanması için kullanılan Python kütüphaneleri, yaşam bilimleri araştırmalarında önemli bir rol oynamaktadır. Ayrıca, Python, biyoinformatik alanında da kullanılmaktadır.

Bu alanda kullanılan bir diğer kodlama dili olan R, istatistiksel hesaplamalar, veri analizi ve grafiksel görselleştirmeler için popüler bir programlama dilidir. R, araştırmacılar, veri bilimcileri ve istatistikçiler tarafından sıklıkla kullanılan açık

kaynaklı bir dildir. İstatistiksel modellerin uygulanması, büyük veri kümelerinin işlenmesi, grafiklerin oluşturulması ve görselleştirilmesi gibi birçok veri odaklı görevi gerçekleştirmek için kullanılır. R, geniş bir kütüphane ekosistemi ile birlikte gelir ve bu kütüphaneler sayesinde istatistiksel analizlerin, makine öğrenimi modellerinin ve veri görselleştirmelerinin kolayca gerçekleştirilebilmesini sağlamaktadır.

Her iki kodlama dili de kütle spektrometrisi verilerinin işlenmesi, analizi ve sonuçlarının değerlendirilmesinde kullanılmaktadır.

Kütle spektrometresi taraması sonucunda elde edilen ham verilerin doğru işlenmesi analizlerin yorumlanması açısından önemlidir. Ham veriler işlenirken MZmine [127] ve OpenMS [128] yazılımları kullanılabilir gibi Tablo 2.8’de listelenen R paketleri de kullanılmaktadır.

Tablo 2.8 Kütle spektrometrisi analizlerinde kullanılan bazı R paketleri ve kullanım alanları.

R Paketi	Özellikler
mzR [129-132]	MS verileri için mevcut dosya biçimleri arasında spektrum düzenlemeleri
MSnbase [133, 134]	MS verilerinin, ham verilerden nicel ve açıklamalı verilere kadar olan düzenlenmesi, işlenmesi ve görselleştirilmesi
xcms [135-137]	Kromatografik olarak ayrılmış ve tek spektrumlu kütle spektral verilerinin işlenmesi ve görselleştirilmesi
RMassBank [138]	Tandem MS dosyalarında spektrumların çıkarılması, fragmentlere formül atanması, spektrumların yeniden kalibre edilmesi, spektrum temizliği, veritabanlarından bileşik bilgilerinin otomatik olarak alınması ve veritabanı kayıtlarına aktarılması
MetaboAnalystR [139-141]	MS veri işleme, normalizasyon, istatistiksel analiz, metabolit seti zenginleştirme analizi, metabolik yol analizi ve biyobelirteç analizi
mzMatch [142]	MS verilerini görüntüleme, ön işleme ve düzenleme
specmine [143]	Farklı analitik platformlarda (LC-MS, GC-MS, NMR, IR, UV-VIS) veri işleme
patRoon [144]	MS verilerini düzenleme, formül tahmini, bileşik tanımlama ve raporlama
MS-CleanR [145]	Farklı özelliklere göre spektrum filtreleme ve tanımlama
MsCoreUtils [146]	Kütle spektrumu işleme, niceliksel düzenleme ve normalizasyon
Spectra [146]	Spektrum işleme, birleşme ve karşılaştırma

Genel olarak, kütle spektrometrisi, yüksek tarama hızı, yüksek çözünürlük, hızlı analiz yapabilmesi, yüksek hassasiyeti, karışımların birçok bileşenini aynı anda analiz edebilmesi, kantitasyon yapılabilmesi ve bileşiklerin yapısı hakkında bilgi

edinilebilmesiyle birçok avantaja sahip güçlü bir tekniktir. Bu nedenle analitik araştırma çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır.

2.2.2 Analitik validasyon

Kimyasal analizlerin uygulanmasında metodun geçerli kılınması oldukça önemlidir. Birçok analitik kimyacı, bunun ne zaman, neden ve tam olarak ne yapılması gerektiği konusunda karar vermede zorlanabilir.

Eğer bir analiz sonucu güvenilir değilse, sonucun değeri düşer ve hatta analiz hiç yapılmamış gibi bir durum ortaya çıkabilir. Bir analitik sonucun, kullanım amacına uygun olması için, karar vermek için yeterli güvenilirlikte olması gerekmektedir. ISO/IEC 17025, ISO 15189 ve ISO 15195 gibi standartlarda, gereklilikler açıklanmıştır [147-149].

Metodun geçerli kılınması, uluslararası standart belgelerde tanımlanmaktadır. ISO 9000, "özel amaçlı bir kullanım veya uygulama için şartların sağlandığının açık kanıtlar elde edilerek teyit edilmesi" şeklinde tanımlamıştır [150].

ISO/IEC 17025, "özel amaçlı bir kullanım için gerekli şartların inceleme sonucunda yerine getirildiğinin ve objektif bir delil elde edildiğinin teyit edilmesi" şeklinde tanımlamıştır [147]. VIM ise, "belirlenmiş şartların amaca uygun bir kullanım için yeterli olduğunun doğrulanması" şeklinde tanımlamıştır [151]. Metodun geçerli kılınması ve doğrulama çalışmalarının yapılacağı laboratuvarlarda kullanılacak cihazların prosedürlere uygun şekilde kalibrasyonlarının yapıyor olması gerekmektedir.

Metodun geçerli kılınması ve doğrulama farklı kavramlardır. Her iki durumda da laboratuvar, metodun temel geçerli kılma çalışmalarını tamamlar. Ancak, doğrulama, laboratuvarın metodun uygulanabilirliğini teyit etme ihtiyacını ifade eder. Bu doğrulama işlemi, son kullanıcının laboratuvarında metodun uygulanabilir olduğunu göstermek için deneysel çalışmalar yapması gerektiği anlamına gelir [152].

Metodun geçerli kılınması çalışmalarının yapılması için performans özelliklerinin analiz edilmesi gerekir. Bu özellikler arasında seçicilik, algılama sınırı, tayin sınırı, çalışma aralığı, analitik duyarlılık, gerçeklik, kesinlik ve sağlamlık bulunmaktadır. Bu özelliklerin her biri, bir ölçüm prosedürünün performansını etkiler. Ölçüm belirsizliği de bir performans özelliği olarak kabul edilebilir, ancak bir ölçüm prosedürünün

performans özelliği değildir; bunun yerine, bir ölçüm prosedürü kullanılarak elde edilen sonuçların bir özelliği olarak kabul edilir.

Analitik seçicilik (özgüllük, analitik özgüllük), bir yöntemin benzer özellik gösteren diğer bileşenlerin girişimleri olmaksızın belirli analitleri tanımlayabilme derecesidir. Bu girişimler, ölçülen büyüklüğe ait sinyali arttırarak veya azaltarak bir sapmaya neden olabilir. Seçicilik, belirli bileşenlerin bilinçli olarak eklendiği numunelerdeki ilgilenilen analitin ölçülebilir yeteneğinin çalışılmasıyla incelenir. Kromatografik sinyaldeki bir pik, onunla aynı noktada sinyal veren referans materyalinin içinde bulunduğu analitle kıyaslanarak tanımlanır [153].

Düşük konsantrasyonlarda yapılan ölçümlerde dikkate alınması gereken üç ana kavram vardır. İlk olarak, analit seviyesinde sıfırdan farklı bir sonuç elde edilmesi gerekebilir. Bu durum genellikle malzemenin kirliliği ile ilgilidir ve "kritik değer", "karar sınırı" veya AB direktiflerinde $CC\alpha$ olarak adlandırılır. İkinci olarak, belirli bir güvenilirlik seviyesinde tespit edilebilecek en düşük analit derişiminin bilinmesi önemlidir. Bu kavram için "algılama sınırı" (LoD), "en düşük tespit edilebilir değer", "algı sınırı" veya AB direktiflerinde $CC\beta$ terimleri kullanılır [154]. Üçüncü olarak, Uygulamanın performansının kabul edilebilir olduğu en düşük düzeyin belirlenmesi, belirli bir uygulama için son derece önemlidir. Bu kavram genellikle tayin seviyesi olarak adlandırılır (LoQ). LoD (tayin edilebilir sınır) ve LoQ (ölçülebilir sınır) genellikle standart sapmaların bir katsayı ile çarpılmasıyla hesaplanırlar.

Kromatografi gibi gürültü seviyesinin üzerindeki pikleri tespit edebilen teknikler için LoD'ye yakın veya daha yüksek derişim seviyesine sahip numuneler gereklidir. Bu tür numuneler, analit eklenen bir boş numune ile hazırlanabilir [152, 155].

Standart sapma, laboratuvarında kullanılan yöntemin performansını temsil etmeli ve tüm ölçüm prosedürlerine uygun olarak hesaplanmalıdır. Analiz edilen test sonuçlarına dayanarak hesaplanan standart sapma için yeterli sayıda tekrar yapılmalıdır. Genellikle 6-15 tekrar yeterli olarak kabul edilir, ancak metot geçerli kılma protokollerinde 10 tekrar önerilir. LoD, standart hatanın 3 ile çarpılmasıyla hesaplanır. LoQ ise standart hatanın genellikle 10 ile çarpılmasıyla hesaplanır. Duruma göre çarpım faktörü olarak 5 veya 6 da kullanılabilir [155].

Çalışma aralığı (ölçüm aralığı, linearite), bir metodun kabul edilebilir bir belirsizlikle sonuç sağladığı derişim aralığıdır. Bu aralığın alt sınırı LoQ, yani tayin sınırıdır.

Çalışma aralığının üst sınırı, analitik duyarlılığın bozulduğu derişimdir. Çalışma aralığının belirlenmesi için, beklenen derişim aralığını $\pm \%10$ veya hatta $\pm \%20$ aşacak şekilde 6-10 farklı derişimde kalibrasyon standartları ile çalışma yapılmalı ve sinyallere ait grafik çizilmelidir [156]. İlk değerlendirme, yanıt eğrisinin görsel incelemesi ile yapılır. Daha sonra, seçilen model için regresyon istatistiği ve grafiği incelenerek, derişim ve cihaz yanıtı arasındaki ilişki teyit edilir [157].

Analitik duyarlılık, ölçülen bir analitik derişimin değişimine karşı ölçüm cihazının yanıtında oluşan değişiklik, yani yanıt eğrisinin eğimi olarak tanımlanabilir [158].

Bir metotla elde edilen sonuçların kalitesini ifade etmek için, gerçeklik, kesinlik ve belirsizlik olmak üzere üç temel performans özelliği kullanılır. Ölçüm doğruluğu, tek bir sonucun referans değere yakınlığını ifade eder. Genellikle doğruluk, "gerçeklik" ve "kesinlik" bileşenleri ile ele alınır. Ölçüm belirsizliği ise doğruluğun giderek yaygınlaşan diğer bir ifadesidir. Ölçüm gerçekliği, metot ile elde edilen sonsuz sayıda sonucun ortalamasının referans değerine yakınlığıdır. Sonsuz sayıda ölçüm almak mümkün olmadığından gerçeklik ölçülemez. Bununla birlikte, gerçeklik için sapma üzerinden pratik bir değerlendirme yapılabilir [151].

Sapma tespiti, bir ölçümün referans değere göre ne kadar doğru olduğunu belirlemek için kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntem, aday metot ile elde edilen sonuçların ortalamasının, uygun bir referans değer ile karşılaştırılmasına dayanır. Bu amaç için kullanılan üç genel yaklaşım vardır. Bunlar, referans malzemelerin analizi, analit eklenmiş numuneler kullanarak geri kazanım deneyleri ve başka bir metot ile elde edilmiş sonuçlarla karşılaştırmaktır [55, 156].

Metot performans özelliklerinin güvenilir bir şekilde tespiti için tekrarlar, kesinlik ve sapma gibi parametreler önemlidir. Kesinlik, sonuçların birbirine ne kadar yakın olduğunu ölçer. Genellikle, sonuçların dağılımını tanımlayan istatistiksel parametreler, uygun koşullar altında gerçekleştirilen tekrar ölçümlerinden hesaplanan standart sapma (veya bağıl standart sapma) ile ifade edilir. "Ölçümün tekrarlanabilirliği" ve "ölçümün tekrar üretilebilirliği" elde edilebilecek iki farklı kesinlik ölçüsünü temsil eder.

Tekrarlanabilirlik, sonuçların arasındaki en küçük varyasyonu vermesi beklenen bir analistin, aynı cihazla kısa bir zaman aralığında gerçekleştirdiği ölçümlerin dağılımının ölçüsüdür. Tekrar üretilebilirlik, sonuçlar arasındaki en yüksek

varyasyonu vermesi beklenen laboratuvarlar arası sonuçların dağılımının ölçüsüdür [151, 159].

Kesinlik, uygun bir malzeme ile yeterli sayıda tekrarlı ölçüm yapıldığı zaman hesaplanabilir. Standart Referans Malzeme (SRM) olması gerekmez. Aynı zamanda tekrarlar bağımsız olmalıdır. Örneğin, tüm ölçüm süreci, herhangi bir numune hazırlama basamağı da dahil edilerek tekrar edilmelidir. Belirtilen en az tekrar sayısı değişik protokollerde farklılık gösterir, fakat yaygın olarak çalışmalarda kullanılan her bir malzeme için 6 ile 15 arası tekrar yapılır. Standart sapmadan, kesinlik sınırı hesaplamak kullanışlıdır. Kesinlik değerini %95 güvenilirlik sınırları içerisinde belirlemek için ölçülen standart sapma değeri 2.8 ile çarpılır [152].

Belirsizlik, ölçülen bir analit miktarı ile ilişkilendirilebilen değerlerin dağılımını ifade eden bir ölçüm sonucudur [160]. Belirsizlik tahmininde, sonuca etkisi olduğu kabul edilen tüm faktörler hesaba katılmalıdır. Örneğin, ekipman kalibrasyonu, teraziler, termometreler, pipetler, cam malzemeler gibi ekipmanların kalibrasyonundan kaynaklanan belirsizlikler. Bunlar genellikle ihmal edilebilecek kadar küçüktür ve belirsizlik tahminine dahil edilmesi gerekmez. Öte yandan, bireysel etkilerden kaynaklanan her bir katkının ayrı ayrı dikkate alınması gerekli olacaktır. Bununla birlikte, metotla izin verilen sıcaklık veya zaman aralıkları gibi diğer önemli etkenlerin de katkısı ortaya çıkarılmalıdır. Bu tür etkiler, sağlamlık çalışmaları ile tespit edilebilir [152].

Sağlamlık testi, bir yöntem üzerinde planlı değişiklikler yapmayı ve bu değişikliklerin performans üzerindeki etkilerini araştırmayı içeren bir yöntemdir. Bu yöntem, yöntemin normal kullanım sırasındaki güvenilirliğinin bir göstergesini sunmaktadır. Böylece yöntemde en önemli etkiye sahip değişkenleri tanımlamak ve yöntemi kullanırken bunların dikkatlice kontrol altında tutulduğundan emin olmak mümkün olur. Yöntemin kritik olduğu bilinen kısımlarına odaklanarak geliştirmeler yapılabilir. Kritik aşamalar çapraz deneylerle tekrarlanır ve elde edilen sonuçlar anlamlılık testiyle sınanır. Anlamlı farklılık görülen aşamalar elde edilen farklılığın büyüklüğüne göre sıralanarak rapor edilir. Tolerans sınırları dışında kalan farklılık görüldüğünde metodun ilgili aşamasının yeniden tasarlanması gerekmektedir [152].

2.3 Referans Aralık

Dünya Sağlık Teşkilatı (WHO), sağlığı sadece hastalık olmama durumu değil, aynı zamanda fiziksel, zihinsel ve sosyal refah durumu olarak tanımlar. Sağlıklı veya hasta olup olmadığımız belirli referans değerleriyle belirlenir. Bu değerler klinik tanı, tedavi takibi, prognoz, tarama, toksikoloji ve diğer klinik uygulamalarda kullanılır [161-163].

Klinik laboratuvarlarda hastaların test sonuçları, genellikle sağlıklı referans bir popülasyondan elde edilen laboratuvar test sonuçlarının merkezi %95'ini kapsayan referans aralıkları ile karşılaştırılarak yorumlanır. Bu nedenle, doğru referans aralıklarının belirlenmesi, klinik laboratuvar test sonuçlarının doğru bir şekilde yorumlanmasında önemli bir rol oynar [164, 165].

Bu konuda yapılan ilk çalışmalarda referans değerleri, normal değerler olarak adlandırılmıştır. Ancak "normal" kelimesi farklı anlamlar çağrıştırabileceğinden, bu terim karışıklığa neden olmuştur. 1969'da Saris ve Grasbeck, normal değerlere adanmış bir oturumda referans değer kavramını başlatmıştır [166, 167] ve referans değerleri normal değerler yerine kabul edilmiştir [168]. Bu nedenle daha sonraki yıllarda "referans değer" veya "referans aralık" terimi kullanılmaya başlanmıştır. IFCC, her laboratuvarın kendi referans aralıklarını oluşturmak için belirli prosedürleri izlemesini önermiştir [162, 169-172].

CLSI EP28-A3c kılavuzu, referans bireylerinin seçimi, ön analitik ve analitik konular, referans aralık belirlenme çalışması için referans değerlerinin analizi, referans aralıkların teorik olarak aktarımı ve doğrulanması için gereken adımları açıklamaktadır [173, 174]. Ancak, kanıta dayalı tıp çağında bile, referans aralıkların karar verme aracı olarak kullanımına ilişkin teori ve uygulama arasında hala önemli bir boşluk olduğu düşünülmektedir [175].

Avrupa Birliği, tıbbi cihaz yönergesinde, tanı üreticilerinin test platformları ve reaktifleriyle kullanım için uygun referans aralıklarını sağlamaları gerektiğini belirtmektedir [176-178]. Ayrıca, klinik laboratuvarların ISO 15189 standardına uygun şekilde akredite edilmesi ve her laboratuvarın kendi referans aralıklarını periyodik olarak yeniden değerlendirmesi gerektiği vurgulanmaktadır [148]. Çünkü popülasyon, yaş, diyet, teknik ve referans grubunun seçimindeki farklılıklar, her laboratuvarın kendi referans aralıklarını belirlemesini gerektirmektedir [176, 179].

Referans aralık belirleme çalışması yapılırken belirli bir yol haritası izlenir [180]. Referans aralık saptanması şeklinin belirlenmesi, referans bireylerin seçilme yönteminin belirlenmesi, standart anket formunun oluşturulması, referans aralığı saptanacak analitlerin özelliklerinin belirlenmesi, laboratuvar koşullarının hazırlanması, analitik kontrolün değerlendirilmesi ve sürdürülmesinin sağlanması belirlenmiş kriterlere göre verilerin toplanması, verilerin istatistiksel dağılımının değerlendirilmesi ve istatistiksel yöntemlere göre referans aralıklarının hesaplanması aşamaları bu yol haritasını oluşturmaktadır [180, 181].

Bireyin normal sağlık durumunu belirlemek zordur ve değerleri başka bir kişinin değerleriyle uyuzmaz. Ayrıca, aynı kişi bile farklı zamanlarda farklı sağlık koşullarında olabilir. Normal değerleri bir popülasyona uygulamak anlamsızdır ve referans aralıklarını belirlerken normal bireyler yerine referans bireylerin değerleri kullanılmalıdır [182].

Referans birey, belirli kriterlere göre seçilmiş kişidir; referans aralığı ise, bu bireylerin oluşturduğu referans dağılımından belli istatistiksel yöntemler kullanılarak elde edilen referans değerlerinin aralığıdır. Referans bireylerinin seçimi referans aralığının belirlenmesinde önemli bir adımdır. İlk olarak referans popülasyonunun doğru bir şekilde belirlenmesi gerekmektedir. Referans popülasyonu, genellikle istatistiksel bir çalışmada hedef alınan ancak tamamına ulaşılması zor veya imkansız olan kitleyi temsil eder [183].

Referans popülasyonundan belirli kriterler kullanılarak seçilmiş bireylerden oluşturulan kitleye örnek referans kitlesi denir [184]. Referans kitlesi, referans popülasyonundan belirli kriterler kullanılarak seçilen bireylerden oluşur. Referans popülasyonu, belirli bir özelliği taşıyan bireylerin oluşturduğu bir popülasyondur. Örneğin, bir referans popülasyonu, sağlıklı bireylerden oluşabilir. Bu bireylerin nasıl seçileceği konusunda çeşitli yöntemler vardır. Doğrudan ve dolaylı örnekleme yöntemleri mevcuttur.

Doğrudan örnekleme, IFCC tarafından önerilen ve bir dizi kriterin hasta seçiminde kullanılması yoluyla yapılır. Bu kriterlere dışlama kriterleri denir. Bazı dışlama kriterleri aynı zamanda gruplama amacıyla da kullanılabilir (Tablo 2.9).

Dolaylı örnekleme ise daha pratik bir yöntemdir [185]. Bu yöntemde, belirli bir özelliği taşıyan bireylerin oluşturduğu bir veri kitlesi kullanılır. Ancak, bu tip

örnekleme ile toplanan veri kitlelerinin istatistiksel analizi daha farklı işlemler gerektirir. Dolaylı örnekleme yöntemleri, laboratuvar bilgi sistemlerinin yardımı ile kolay uygulanır hale gelmiş ve yaygınlaşmıştır [186]. Ancak, her iki yöntemin de bazı dezavantajları vardır [187].

Örneğin, referans aralıklarının hastaneler arasında farklılık göstermesi gibi bir dezavantajı vardır. Bunun yanı sıra, elde edilen alt ve üst referans limitleri tamamıyla kullanılan matematiksel metoda bağlı kalmaktadır. Bu nedenle, referans aralıklarının daha genel bir hasta popülasyonuna uygulanması sakıncalı görülmektedir [188].

Tablo 2.9 Referans kitle belirlenirken kullanılan dışlama ve gruplama kriterleri [55].

Dışlama	Gruplama
Yaş	Yaş
Alkol kullanımı	Menstrual siklus
Kan bağıışı	Diyet
İlaç kullanımı	Coğrafi yerleşim
Son zamanlarda ameliyat	Biyoritm
Obezite	Kan grubu
Hastalıklar	İrk
Meslek	Örnekleme sırasındaki postür
Laktasyon	Sigara kullanımı
Cinsiyet	Cinsiyet
Tansiyon	Örnek alım saati
Egzersiz	Egzersiz
Gebelik	Gebelik
Açlık ve tokluk	Açlık ve tokluk

Referans gruplarını değerlendirirken veri sayısı oldukça önemlidir. Referans aralığı tayininde kullanılan istatistiksel yöntemleri parametrik ve non-parametrik olarak ikiye ayırabiliriz [175, 189].

Dağılım tipi belirlendikten sonra, dağılıma etki edebilecek faktörler göz önünde bulundurulmalıdır, özellikle de sıklıkla veri sayısının düşük olduğu durumlarda. Olası etkileri en aza indirgeyebilmek ve metodumuzun güvenilir şekilde çalışmasını sağlayabilmek için kullanmamız gereken veri miktarı araştırmalarda belirlenmiştir. Non-parametrik testler kullanıldığı takdirde en az 120 veri ile çalışılması önerilmektedir (Tablo 2.10) [173].

Veri sayısının artması Gaussian istatistiğini daha kuvvetli kılmaktadır, ancak dağılımda uç değerlerin daha fazla bulunmasına yol açabilmektedir.

Tablo 2.10 Dağılıma göre referans aralık hesaplama yöntemlerinin özet karşılaştırması [55].

	Non-parametrik	Parametrik
Örneklem Genişliği	120	40
Dağılım	Herhangi bir dağılım kabul edilir	Normal dağılımı gerekir
Uygulanabilirlik	Basittir, Uzmanlık gerektirmez	Karmaşık olabilir, Gauss dağılımının kanıtı gerekir, Verilerin dönüştürülmesi gerekebilir
Tavsiye eden kuruluş	IFCC, CLSI	-

Bir dağılımda sapan değerlerin oluşması kaçınılmazdır. Bu nedenle, iyi ayıklanmış bir veri setinde bile sapan değerlerin bulunabileceğini unutmamak önemlidir [190]. Sapan değerleri arındırmak için Dixon metodu, blok dağılım, standart sapma, Grubbs T istatistiği ve box-plot grafiği kullanılmaktadır.

Grubbs T istatistiğinde örneklemin normal dağılım göstermesi gerekmektedir. Koşullar sorgulanırken H_0 hipotezi aykırı değer olmadığını H_1 hipotezi en az bir aykırı değer olduğunu gösterir [191].

$$G = \frac{|y_i - \bar{y}|}{s} \quad (2.1)$$

$$G > \frac{N-1}{\sqrt{N}} \sqrt{\frac{t^2(\frac{a}{2N}, N-2)}{N-2 + t^2(\frac{a}{2N}, N-2)}} \quad (2.2)$$

Denklem 2.1’de, \bar{y} örneklem ortalamasını, s ise standart sapmayı göstermektedir. Eğer Denklem 2.2’deki koşul sağlanırsa H_0 hipotezi reddedilir. Denklem 2.2’de, $t^2 \left(\frac{a}{2N}, N - 2 \right)$, $N-2$ serbestlik derecesi ve $a/2N$ anlam seviyeli t dağılımının tablo değeridir. N ise örneklemin hacmini göstermektedir.

Tablo 2.11 Sapan değer tespit etmek için kullanılan diğer yöntemlerin kullanım şekilleri ve hesaplama formülleri.

Yöntem	Özellikler	Hesaplama Formülü
Z-Skoru [192]	Veri setinin ortalamasından kaç standart sapma uzaklıkta olduğunu ölçer. Burada -3’ten küçük ve 3’ten büyük değerler aykırı değer olarak tespit edilir.	$Z = (x - \mu) / \sigma$
Tukey Yöntemi	Alt ve üst sınırı belirlemek için kullanılır.	Alt Sınır = $Q1 - 1.5 \times IQR$ Üst Sınır = $Q3 + 1.5 \times IQR$

Tablo 2.11’de verilen diğer sapan değer tespit etme yöntemlerine ait formüllerde $Q1$, veri setinin alt çeyreği; $Q3$, veri setinin üst çeyreği; IQR , çeyrekler arası aralık; x , herhangi bir veri noktası; μ , veri setinin ortalaması; ve σ , veri setinin standart sapmasıdır.

Dixon yöntemi, sapan değer ayıklama yöntemlerinden biridir. Bu yöntem, bir veri setindeki en büyük ve en küçük değerlerin diğer değerlere göre ne kadar ayık olduğunu ölçer (Denklem 2.3) [193].

$$Q = \frac{|x_i - x_1|}{x_n - x_1} \quad (2.3)$$

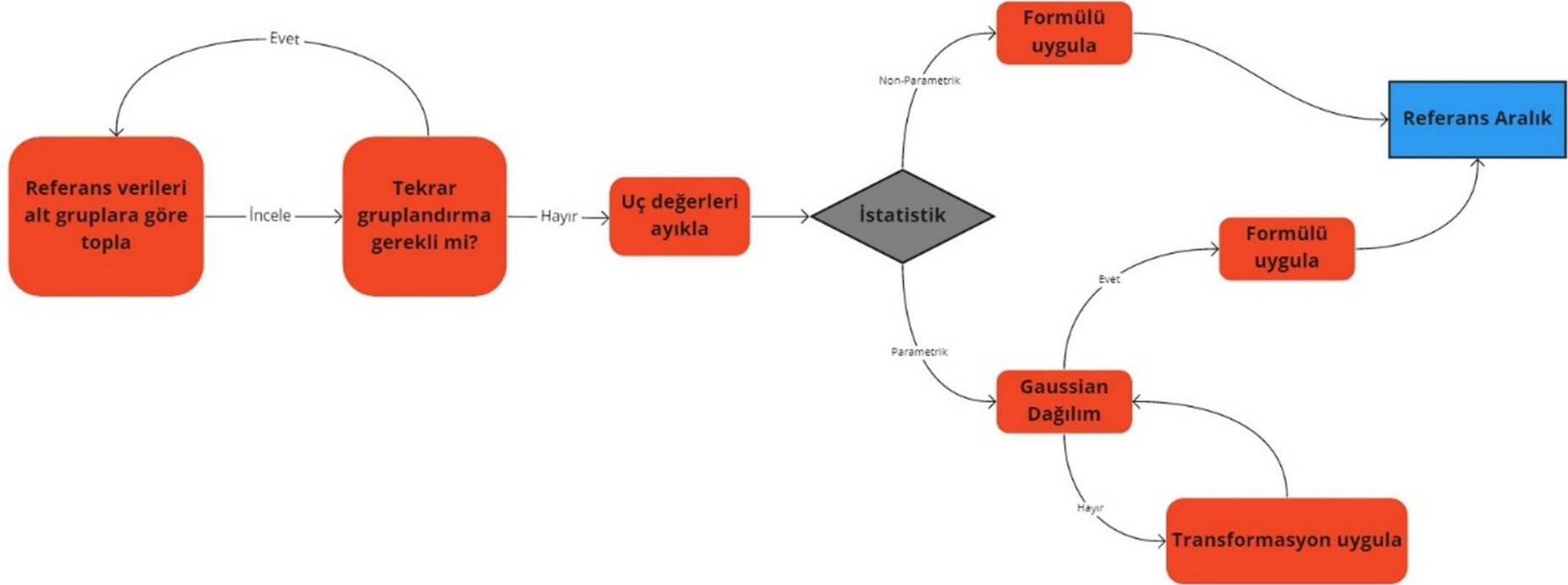
Burada, x_i en büyük veya en küçük değerdir ($i=1$ veya $i=n$), x_1 en küçük değerdir ve x_n en büyük değerdir. Q değeri, bir sınır değeri ile karşılaştırılır ve sınır değerinden büyükse, en büyük veya en küçük değer sapan değer olarak kabul edilir. Sınır değeri, veri setinin boyutuna ve belirlenen güven aralığına bağlı olarak değişebilir.

Dixon yöntemi, sadece küçük boyutlu veri setleri için uygundur ve büyük boyutlu veri setleri için diğer yöntemler daha uygun olabilir.

Referans aralık belirleme analizi yapılırken izlenmesi tavsiye edilen yol haritası Şekil 2.4’de gösterilmiştir.

Referans aralık hesaplaması yapılacak teste ait verilerin normallik sınaması yapılmalıdır. Parametrik dağılım göstermesi gereken verilerin normal dağılım göstermediği durumlarda logaritmik transform ve uç değer ayıklaması yapılmalıdır. Parametrik dağılımda referans aralık hesaplaması yapmak için çeyrekler aralığı kullanılır. Ortalama \pm (1.96 x standart sapma) ile alt ve üst referans değerler hesaplanabilir [20, 173].

Non-parametrik dağılımda referans aralık hesaplamak için öncelikle veriler küçükten büyüğe doğru sıralanır. Eğer n sayıda referans bireye ait test sonucunun referans aralığı %95 güven aralığında hesaplanacak ise bu sınırlardaki değerler (n+1) değerinin sırasıyla 0.025 ve 0.975 ile çarpılmasıyla elde edilir. Bu değerler önerilen 120 referans bireylik örneklem genişliği için 3 ve 118. değer sıralarına denk gelmektedir [20, 173, 194, 195].



Şekil 2.4 Referans aralık hesaplamalarında kullanılacak yol haritası (Şekil miro [196] aracılığıyla yapılmıştır) [55].

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Etik Bildirim

Deneyleer Bezmialem Vakıf Üniversitesi bünyesinde bulunan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarı, Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Tıbbi Biyokimya Laboratuvarı ve İlaç Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Rektörlüğü Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu'nun 18.02.2020 tarihli 04/64 sayılı kararı ile onay alınarak gerçekleştirilmiştir.

3.2 Gereç

Deneyleerde kullanılan cihazlar Tablo 3.1'de bildirilmiştir.

Tablo 3.1 Kullanılan cihazlar.

Cihaz	Marka/Model
pH metre	Milwaukee MI-151
Ultra saf su cihazı	New Human Power Series
Hassas terazi	Daihan Biomedical SC210
Otomatik pipetler	eppendorf Research plus
Santrifüj	HERMLE Z 326 K
Konsantratör	eppendorf Concentrator plus
Vorteks	DLAB MX-S
Su banyosu	memmert WNB22
LC-MS/MS	LC-HRMS Thermo Q Exactive
Buzdolabı	EMSAŞ
Derin dondurucu	JP Selecta
-86 °C	Haier DW-86L486
Ultrasonik su banyosu	JP Selecta
Manyetik karıştırıcı	neuation iStir HP 10M

Deneyleerde kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de bildirilmiştir.

Tablo 3.2 Kullanılan kimyasallar.

Kimyasal	Üretici Firma
Metanol	Merck
Asetonitril	Sigma-Aldrich
n-Hekzan	Sigma-Aldrich
Formik asit	Merck
Kloroform	Sigma-Aldrich
Etanol	Merck
Sodyum hidroksit	Merck
Sodyum klorür	Merck
2-propanol	Sigma-Aldrich
Lipaz	Sigma-Aldrich
Phylloquinone	Sigma-Aldrich
Vitamin K ₁ 2,3-epoxide	TRC
Vitamin K-d ₇ (5,6,7,8-d ₄ , 2-methyl-d ₃)	TRC
Vitamin K ₂ (MK-4)	TRC
Vitamin K ₂ (MK-7)	TRC

3.3 Yöntem

3.3.1 Standart ve stok solüsyonlar

Standartlar hazırlanırken internal standart olarak Vitamin K-d₇ (5,6,7,8-d₄, 2-methyl-d₃) kimyasalı kullanıldı. Bütün standartlar metanol içerisinde çözüldü. İnternal standart solüsyonu 500 ng/mL yoğunlukta hazırlandı. Metot kalibrasyonu için filokinon ve Vitamin K₂ (MK-4) kimyasalları ile 500 ng/mL'den 0.06 ng/mL yoğunluğa kadar standart hazırlandı (Tablo 3.3). Kalibrasyon standartlarının her biri içerisine son yoğunluk 10 ng/mL olacak şekilde internal standart eklendi.

Tablo 3.3 Kalibrasyon standartlarının konsantrasyonları.

Standart	Yoğunluk (ng/mL)
Standart 1	500.00
Standart 2	250.00
Standart 3	125.00
Standart 4	62.50
Standart 5	31.25
Standart 6	15.63
Standart 7	7.81
Standart 8	3.91
Standart 9	1.95
Standart 10	0.98
Standart 11	0.49
Standart 12	0.24
Standart 13	0.12
Standart 14	0.06

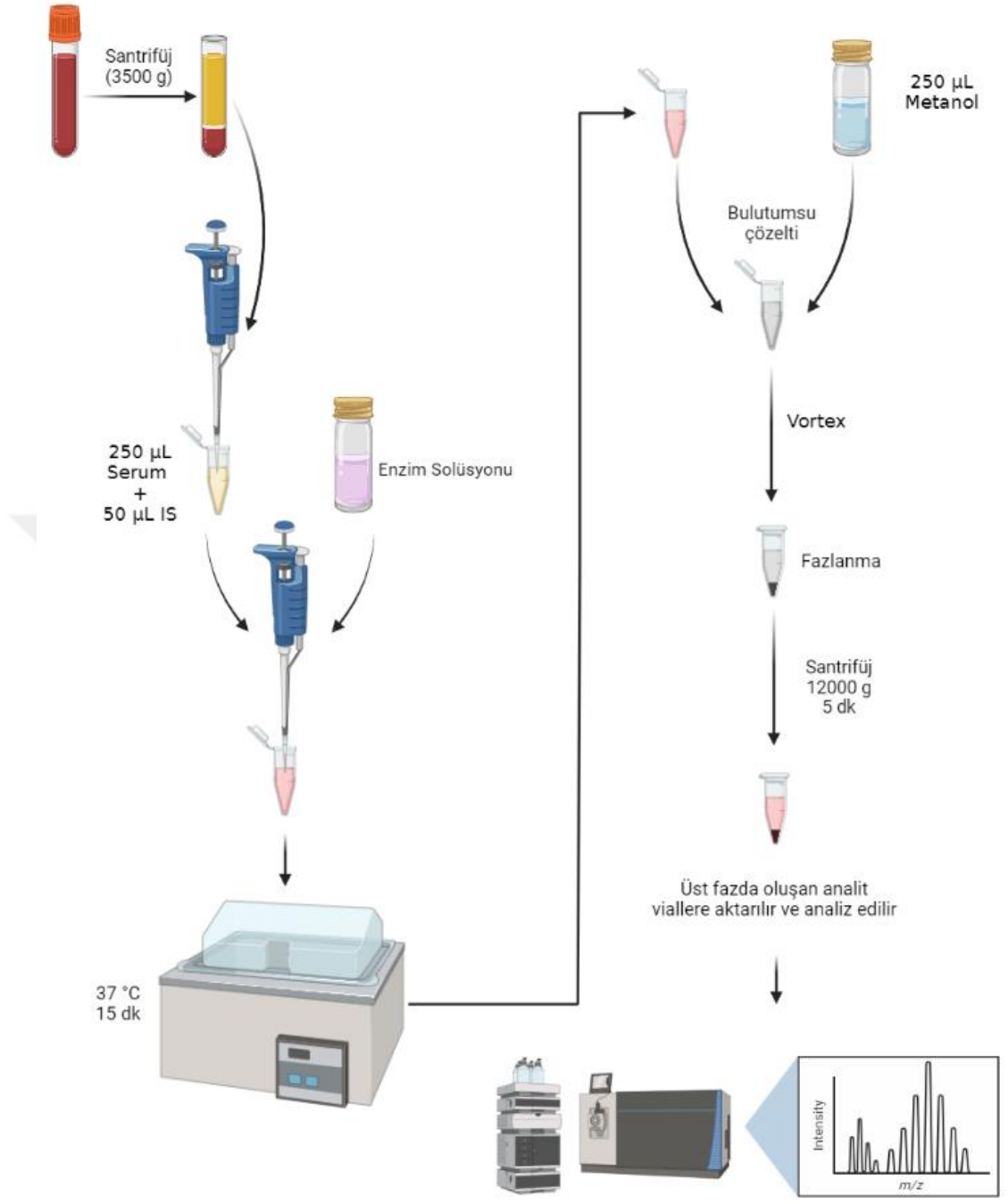
3.3.2 Numune hazırlama

Serum numuneleri hazırlanırken öncelikle Vitamin K-d7 (5,6,7,8-d4, 2-methyl-d3) kimyasalı ile hazırlanan internal standart eklendi. Serum içerisindeki proteini çöktürmek için etanol, metanol, asetonitril, kloroform, n-Hekzan, Lipaz ve amonyum sülfat çözeltileri kullanıldı. Sıcak su banyosunda (37 °C) ve derin dondurucuda (-20 °C) 15-30 dk inkübasyon yapıldı.

Daha sonra vortex ve santrifüj yapıldı. Üst faz alınarak konsantratör cihazında uçuruldu. Kalıntı 2-propanol, asetonitril ve metanol kimyasalları ile çözülerek serum numunelerine ait analitler hazırlandı. Bu basamakların farklı kombinasyonlarla sınındığı metotlar Tablo 3.4'te gösterilmiştir. Örnek olması için Yöntem 12'ye ait numune hazırlama basamakları Şekil 3.1'de özetlenmiştir.

Tablo 3.4 Vitamin K ölçümünde kullanılacak en uygun metodun belirlenmesi için sınanan alternatif metotlara ait ekstraksiyon basamaklarının detaylı karşılaştırması.

Metot	Numune miktarı	Internal Standart	Lipaz (1000 IU)	Organik Çözücü	İnkübasyon	Santrifüj	n-Hekzan	Konsantrasyon
1	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Etanol	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
2	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Metanol	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
3	250 µL	50 µL	Yok	500 µL Metanol	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
4	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Metanol	-20 °C'de 60 dk	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
5	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Metanol	Yok	12000 g'de 5 dk	2 mL	Var
6	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Metanol	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Yok
7	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Amonyum sülfat 1:1 (m/v)	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
8	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Asetonitril	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
9	250 µL	50 µL	Yok	250 µL Chloroform	Yok	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
10	250 µL	50 µL	250 µL	250 µL Metanol	37 °C'de 15 dk	12000 g'de 5 dk	1 mL	Var
11	250 µL	50 µL	250 µL	250 µL Metanol	37 °C'de 15 dk	12000 g'de 5 dk	1 mL	Yok
12	250 µL	50 µL	250 µL	250 µL Metanol	37 °C'de 15 dk	12000 g'de 5 dk	Yok	Yok
13	250 µL	50 µL	500 µL	250 µL Metanol	37 °C'de 15 dk	12000 g'de 5 dk	Yok	Yok
14	250 µL	50 µL	125 µL	250 µL Metanol	37 °C'de 15 dk	12000 g'de 5 dk	Yok	Yok



Şekil 3.1 Numune hazırlama basamaklarının şematik gösterimi (Şekil BioRender aracılığıyla oluşturulmuştur [197].).

3.3.3 Analitik şartlar

Hazırlanan analitler LC-HRMS (liquid chromatography-high resolution mass spectrometry) Thermo Q Exactive cihazında analiz edildi. Kütle spektrometresinde iyonizasyon kaynağı olarak APCI kullanıldı. Analitik şartlarla ilgili detaylar Tablo 3.5'te gösterilmiştir.

Tablo 3.5 Kütle spektrometrisi analitik şartları.

Parametre	Seçim
Ion kaynağı	APCI
Kütle tarama aralığı	350-900 m/z
Sheath gas akış oranı	45
Aux gas akış oranı	10
Sprey voltajı (kV)	3.80
Kapiler sıcaklık (°C)	320
Aux gas sıcaklığı (°C)	320
S-lens RF seviyesi	50

Kromatografik ayırım 40 °C'de Phenomenex Luna C18 - 100 x 2 mm - 3 µ kolonu kullanılarak yapıldı. Mobil faz olarak su içerisinde % 0.1 formik asit ve 3:1 (v/v) metanol/asetonitril kullanıldı. Mobil fazlara ait gradyan Tablo 3.6'da sunulmuştur.

Tablo 3.6 Likit kromatografi mobil faz gradyanı.

Zaman (dk)	Akış (mL/dk)	Mobil faz B (%)
0	0.5	40
1	0.5	50
3	0.5	90
6	0.5	100
7	0.5	50
15	0.5	40

Vitamin K, Vitamin K₁-d₇, MK-4 ve MK-7'ye ait kütle/yük (m/z) oranları Tablo 3.7'de verilmiştir.

Tablo 3.7 Vitamin K ve türevlerinin öncü iyon ve ürün iyonlarına ait kütle yük oranları ve kullanılan iyonlaştırma enerjileri.

Bileşik	Öncü İyon (m/z)	Ürün İyon (m/z)	EP (v)	CE (v)
Vitamin K ₁	451.35	187.1/185.1	11	31
Vitamin K ₁ -d ₇	458.40	193.8	9	10
Vitamin K ₂ -MK-4	445.31	186.9/227.1	9	24
Vitamin K ₂ -MK-7	649.50	186.9/94.9	9	32

3.3.4 Validasyon çalışmaları

Geliştirilen nihai metot validasyon çalışmaları kapsamında ölçüm sınırı, doğrusallık, gerçeklik, kesinlik ve sağlamlık testlerine tabi tutuldu.

Ölçüm sınırı testleri kapsamında konsantrasyonu 0.5 ng/mL olan Vitamin K, MK-4 ve MK-7 analitleri 10 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen sonuçların standart hatası 3 ile çarpılarak algılama sınırı belirlendi. Standart hata 10 ile çarpılarak tayin sınırı tespit edildi.

Doğrusallık testleri kapsamında 10 farklı konsantrasyonda kalibrasyon standartları hazırlandı. Hazırlanan standartlar 6 tekrarlı olarak çalışıldı. Kalibrasyon eğrisi çizildi. Sonuçlar regresyon analizi ile incelendi.

Gerçeklik, kesinlik ve sağlamlık testleri kapsamında 5, 10 ve 20 ng/mL konsantrasyona sahip Vitamin K analitleri hazırlandı. Analitler 2 ayrı günde 2 ayrı analist tarafından hazırlandı ve 10 tekrarlı olacak şekilde analiz edildi. Analiz sonucunda gün içi ve günler arası, ortalama ve bağıl standart sapma hesaplandı.

Geri kazanım testleri kapsamında serum havuzu numunesi hazırlandı. Hazırlanan serum havuz numunesi 2'ye ayrıldı. Ayrılan numunelerden birisine 1 ng/mL Vitamin K çözeltisi eklendi. Analitler 10 tekrarlı olarak analiz edildi. Elde edilen sonuçlara göre yüzde geri kazanım ve bias hesaplandı.

3.3.5 Referans aralık çalışmaları

Dahil olma ve dışlama kriterlerini (Tablo 3.8) sağlayan 64 kadın ve 67 erkek sağlıklı kontrol grubu gönüllüsüne ait serum numuneleri, geliştirilen metodun nihai numune hazırlama prosedürüne uygun şekilde hazırlandı ve analiz edildi.

Tablo 3.8 Referans aralık hesaplamaları için seçilen referans kitleye ait dahil olma ve dışlama kriterleri.

Durum	Kriter
Dahil Olma	18-65 yaş arası sağlıklı kadın veya erkekler Kanama ve pıhtılaşma bozukluğu hastalığı olanlar Gebelik Malignite Obezite Hipertansiyon Kardiyovasküler hastalıklar Genetik hastalıklar
Dışlama	İlaç kullanımı Alkol ve/veya sigara kullanımı Vitamin ve/veya takviye gıda kullanımı Kan donörü olma Laktasyon Yakın zamanda ameliyat hikayesi Yakın zamanda transfüzyon hikayesi Oral kontraseptif kullanımı

3.3.6 İstatistiksel analiz

Validasyon çalışmalarında uygulanan istatistiksel analizler R kodlama dili ile RStudio 2022.12.0+353 programı üzerinde dplyr [198], tidyr [199] ve ggplot2 [200] paketleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Spektrum analizleri açık kaynak kodlu MZmine 3 yazılımı üzerinde gerçekleştirilmiştir [127].

Referans aralık hesaplamaları Python [201] kodlama dili ile Google Colab platformu üzerinde pandas [202], numpy [203], matplotlib [204] ve seaborn [205] kütüphaneleri kullanılarak yapılmıştır [206].

4. BULGULAR VE TARTIŞMA

4.1 Metot Geliştirme Bulguları

Vitamin K₁, MK-4 ve MK-7 seviyelerini tayin etmek için denenen 14 farklı metotlara ait 6 tekrarlı geri kazanım çalışmalarının ortalama sonuçları Tablo 4.1’de sunulmuştur. Karşılaştırma yapılan yöntemler arasında en iyi sonuçların sırasıyla 12, 13, 14, 10 ve 2. yönteme ait olduğu tespit edilmiştir.

Tablo 4.1 Sınanan tayin metotlarında elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait geri kazanım değerleri.

Metot	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂ -MK-4	Vitamin K ₂ -MK-7
1	27.60	27.59	14.88
2	48.76	46.28	33.58
3	36.80	37.38	23.80
4	28.52	28.48	15.73
5	30.36	27.59	16.15
6	32.20	32.04	19.13
7	9.20	8.90	5.95
8	14.72	14.69	2.76
9	23.00	23.14	10.63
10	50.60	48.06	35.28
11	32.20	28.48	17.43
12	92.00	88.11	83.73
13	57.04	56.07	42.08
14	53.36	48.06	36.55

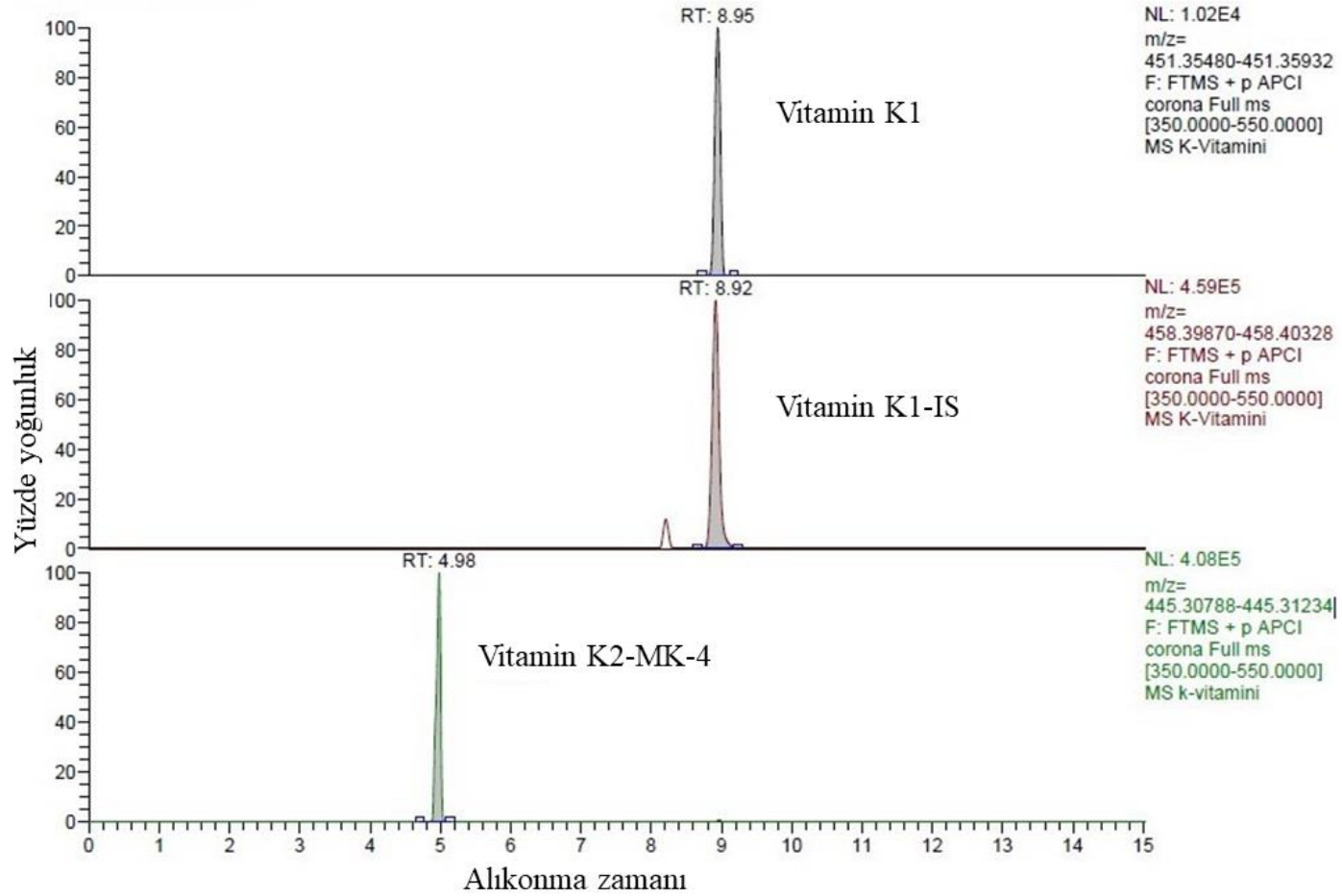
Vitamin K₁, MK-4 ve MK-7 seviyelerini tayin etmek için denenen 14 farklı yönteme ait 6 tekrarlı analizlerin ortalama sinyal oranları Tablo 4.2’de sunulmuştur. Karşılaştırma yapılan yöntemler arasında en iyi sonuçların sırasıyla 12, 13 ve 14. yönteme ait olduğu tespit edilmiştir. Yapılan karşılaştırmalar sonunda nihai metot olarak 12. yöntemin seçilmesine karar verilmiştir. Bu yöntemde, 250 µL serum numunesi içerisine 50 µL IS (500 ng/mL) ve 250 µL Lipaz (1000 IU) enzimi eklenerek 37 °C’de 15 dk inkübe edilmektedir. İnkübasyon sonrasında proteinleri çöktürmek

amacıyla 250 µL metanol eklenmiş ve 12000 g'de 5 dk santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonrasında oluşan üst faz HPLC viallerine alınarak enstrümental analize geçilmiştir. Analitler LC-HRMS-APCI cihazı ile Bölüm 3.3.3'de belirtilen analitik şartlar altında 15 dakika analiz edilmiştir. Yöntemin ön hazırlık ve ekstraksiyon süresi ise 25 dakika sürmektedir.

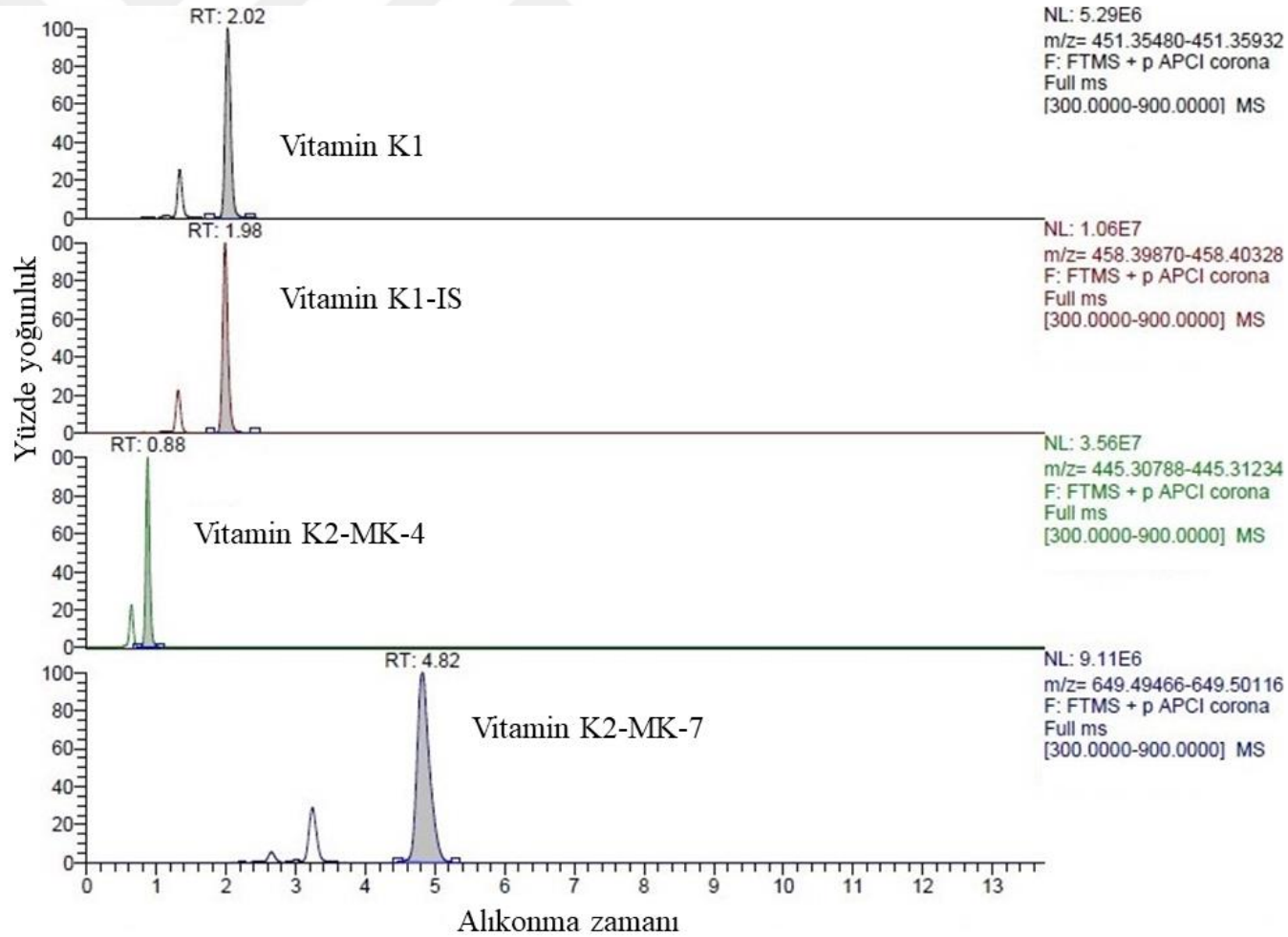
Tablo 4.2 Sınanan tayin metotlarında elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait sinyal değerleri.

Metot	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂ -MK-4	Vitamin K ₂ -MK-7
1	3.31E+06	3.31E+06	1.53E+06
2	6.58E+06	6.25E+06	4.20E+06
3	4.78E+06	4.49E+05	3.09E+05
4	3.58E+06	3.58E+06	1.93E+05
5	5.77E+06	5.24E+06	3.07E+06
6	6.50E+06	6.60E+05	3.83E+05
7	6.51E+05	6.92E+04	4.21E+05
8	1.33E+06	1.32E+06	2.49E+05
9	2.83E+06	2.85E+06	1.31E+06
10	2.81E+07	2.67E+07	1.98E+06
11	1.18E+07	1.04E+07	6.45E+05
12	9.66E+07	8.02E+07	7.95E+07
13	5.71E+07	5.61E+07	4.21E+06
14	4.79E+07	4.32E+06	3.28E+06

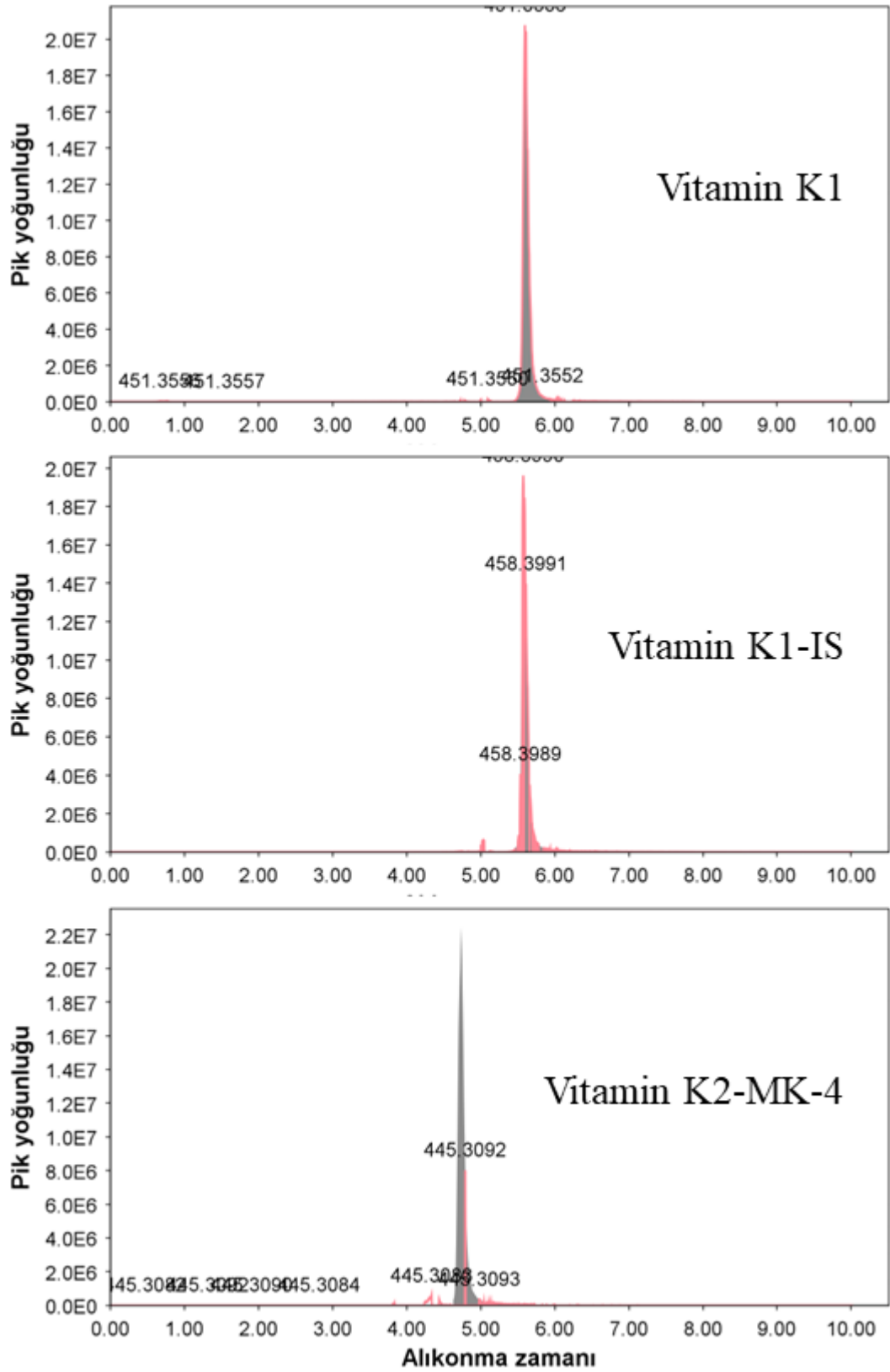
Vitamin K₁, MK-4 ve MK-7 seviyelerini tayin etmek için denenen yöntemlere ait kromatogramlar Şekil 4.1-6'da gösterilmiştir.



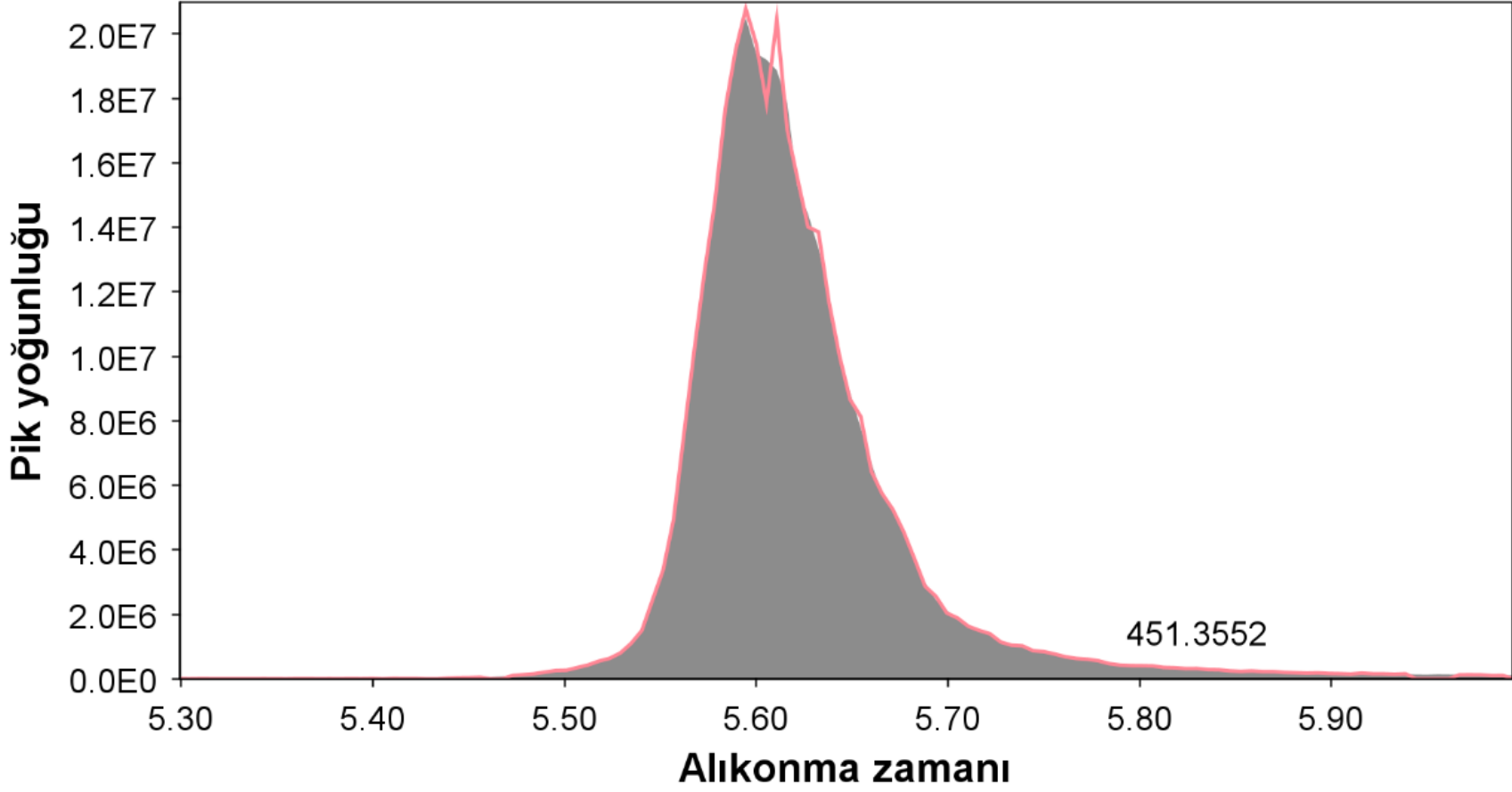
Şekil 4.1 Yöntem 2'nin serum analitlerine ait kromatogramı.



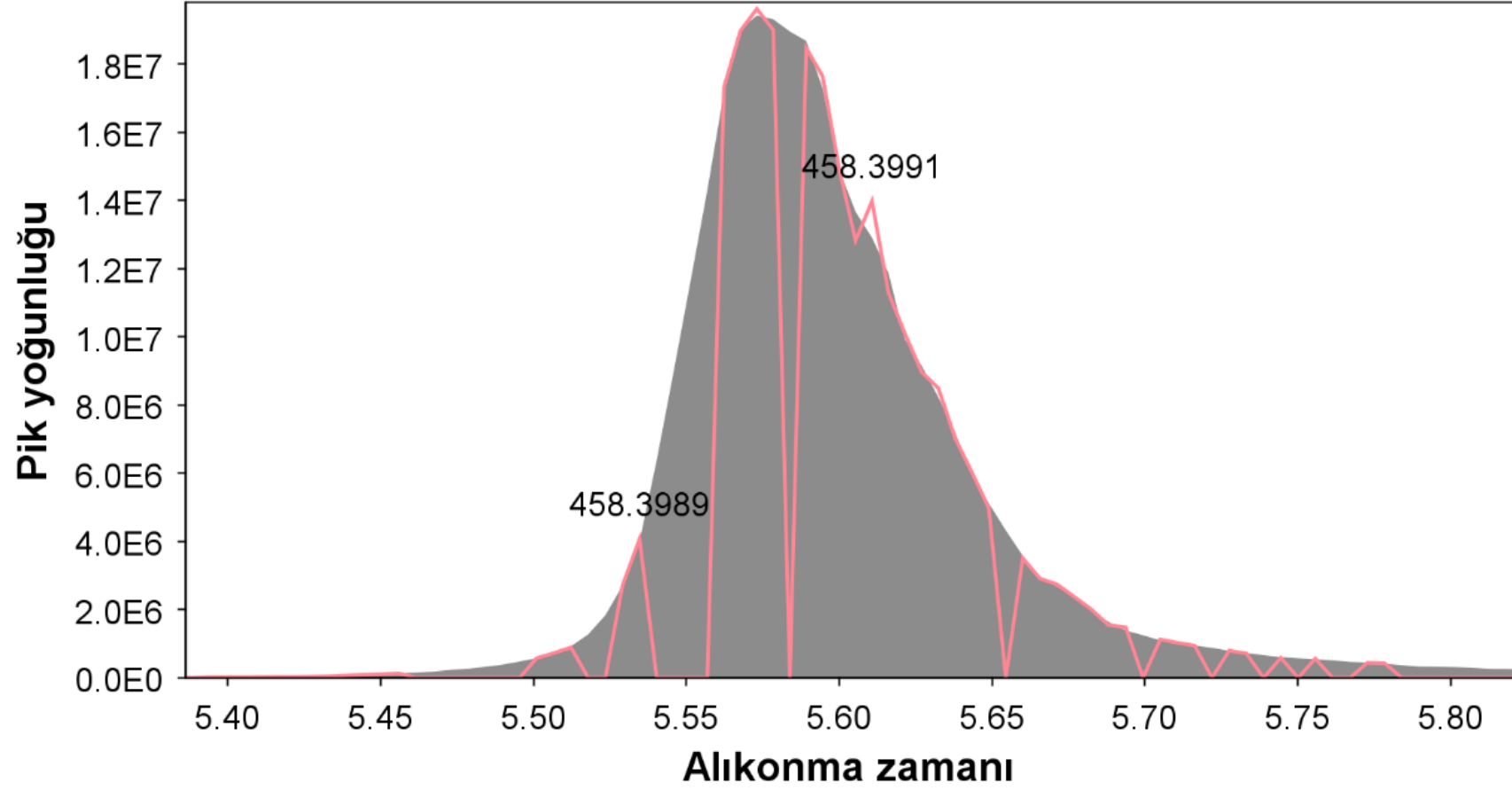
Şekil 4.2 Yöntem 12'nin serum analitlerine ait kromatogramı.



Şekil 4.3 Yöntem 12'ye ait standart analitlerinin kromatogramı.



Şekil 4.4 Vitamin K₁ kromatogramı.

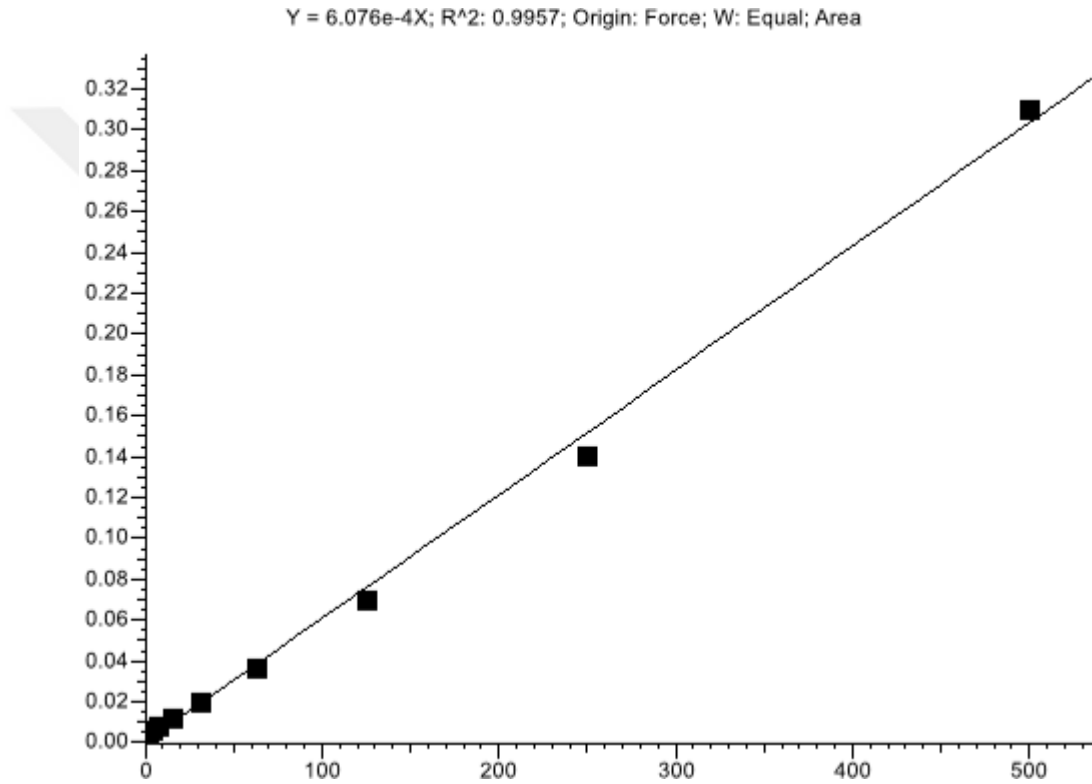


Şekil 4.5 Vitamin K₁ IS kromatogramı.

4.2 Validasyon Bulguları

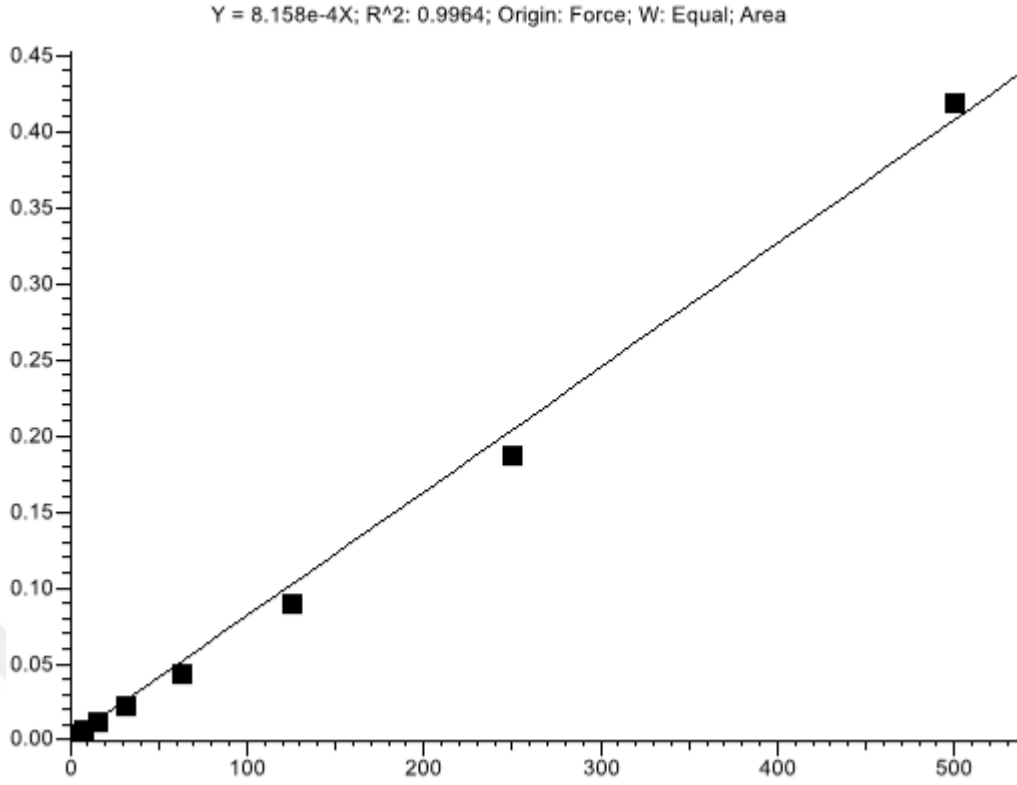
4.2.1 Doğrusallık

Geliştirilen metodun doğrusallık analizleri amacıyla 10 farklı konsantrasyonda Vitamin K₁ kalibrasyon standartı 6 tekrarlı olarak çalışıldı. Korelasyon kat sayısı 0.9957 olarak bulundu. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.7’de sunulmuştur.



Şekil 4.7 Vitamin K₁'e ait 10 noktalı kalibrasyon eğrisi.

Geliştirilen metodun doğrusallık analizleri amacıyla 10 farklı konsantrasyonda Vitamin K₂-MK-4 kalibrasyon standartı 6 tekrarlı olarak çalışıldı. Korelasyon kat sayısı 0.9957 olarak bulundu. Kalibrasyon eğrisi Şekil 4.8’de sunulmuştur.



Şekil 4.8 Vitamin K₂-MK-4'e ait 10 noktalı kalibrasyon eğrisi.

Hu ve arkadaşları, yaptıkları çalışmada LC-APCI-MS/MS ile Vitamin K miktarını tayin etmeyi amaçlamıştır [207]. Ortalama %83 geri kazanımla 0.10 ng/mL LoQ değerinde ölçümü 15 dakikalık analiz sonucunda yaptıklarını bildirmişlerdir.

Gentili ve arkadaşları, LC-APCI-MS/MS QTrap cihazı ile Vitamin K ve MK-4 miktar tayini gerçekleştiren bir metot geliştirmiştir [208]. Metodun ekstraksiyon basamağında 3 aşamalı n-Hekzan ve 2 aşamalı dondurma işlemleri yapılmıştır. Analiz süresi 22 dakika süren metodun Vitamin K ve MK-4 LoQ değerlerinin sırasıyla 0.087 ng/mL ve 0.207 ng/mL olduğunu tespit etmişlerdir.

Hirauchi ve arkadaşları, HPLC-Florometri cihazı ile Vitamin K ve MK-4 miktar tayini yapan bir metot geliştirmiştir [19]. Metodun ekstraksiyon basamağında 6 mL n-Hekzan ve yöntem maliyetini arttıran katı faz ekstraksiyon filtreleri kullanılmıştır. Analiz süresi 30 dakika süren metodun Vitamin K ve MK-4 LoQ değerlerinin 0.03 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Sandvik ve arkadaşları, Süperkritik akışkan kromatografi tandem kütle spektrometresi cihazında ESI ile Vitamin K miktarını tayin edebilen metot geliştirmiştir [15]. Bu metodun ekstraksiyon basamağında ters faz katı faz ekstraksiyon pleytleri

kullanılmıştır. Ortalama %60 geri kazanımla 0.1 ng/mL LoQ değerinde ölçüm gerçekleştirildiklerini bildirmişlerdir.

Suhara ve arkadaşları, LC-APCI-MS/MS cihazı ile Vitamin K, MK-4 ve MK-7 miktar tayini yapan bir metot geliştirmeyi amaçlamıştır [16]. Geliştirilen metodun ekstraksiyon basamağında 13 mL n-Hekzan ve katı faz ekstraksiyon filtreleri kullanılmıştır. Analiz süresi 80 dakika ve yıkama ile birlikte toplamda 120 dakika süren metodun Vitamin K, MK-4 ve MK-7 geri kazanım oranlarının sırasıyla %98, %102 ve %102 olduğunu belirtmişlerdir. Vitamin K, MK-4 ve MK-7 LoQ değerlerinin sırasıyla 0.04 ng/mL, 0.05 ng/mL ve 0.08 ng/mL olduğunu belirtmişlerdir.

Arachchige ve arkadaşları, UHPLC-ESI-MS/MS Orbitrap cihazı ile Vitamin K, MK-4 ve MK-7 miktar tayini gerçekleştiren bir metot geliştirmiştir [209]. Metodun ekstraksiyon basamağında fosfolipid ayrıştırıcı pleyt kullanmışlardır. Analiz süresi 19 dakika süren metodun Vitamin K, MK-4 ve MK-7 için ortalama geri kazanım oranlarının sırasıyla %89, %98 ve %90 olduğunu LoQ değerlerinin sırasıyla 0.3 ng/mL, 0.3 ng/mL ve 0.5 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Abro ve arkadaşları, HPLC-APCI-MS/MS Orbitrap cihazı ile Vitamin K miktar tayini gerçekleştiren bir metot geliştirmiştir [210]. Metodun ekstraksiyon basamağında 3 aşamalı metanol katı faz ekstraksiyon filtrelerini kullanmışlardır. Analiz süresi 15 dakika süren metodun ortalama geri kazanım oranının %86 olduğunu ve LoQ değerinin 0.17 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Klapkova ve arkadaşları, HPLC-Florometri cihazı ile Vitamin K, MK-4 ve MK-7 miktar tayini gerçekleştiren bir metot geliştirmiştir [211]. Ekstraksiyon basamağında 3 aşamalı n-Hekzan ve katı faz ekstraksiyon filtreleri kullanılmıştır. Analiz süresi 20 dakika süren metodun Vitamin K, MK-4 ve MK-7 için LoQ değerlerinin sırasıyla 0.03 ng/mL, 0.04 ng/mL ve 0.03 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Song ve arkadaşları, HPLC-APCI-MS cihazı ile Vitamin K miktar tayini gerçekleştiren bir metot geliştirmiştir [212]. Ekstraksiyon basamağında 3 mL n-Hekzan kullanılmıştır. Analiz süresi 13.5 dakika süren metodun Vitamin K için LoQ değerinin 0.3 ng/mL olduğunu bildirmişlerdir.

Bu tez çalışmasında geliştirilen yöntemde, dolaşımda yağlar ile birlikte lipoproteinler aracılığıyla taşınan Vitamin K ve alt türevleri lipaz enzimi destekli ekstraksiyon

sayesinde ayrıştırılmaktadır. Böylece katı faz ekstraksiyona gerek kalmadan %92 geri kazanımla ön hazırlık dahil 30 dakika içerisinde analiz tamamlanabilmektedir.

4.2.2 Stabilit 

Geliştirilen nihai metodun sağlamlık testleri kapsamında rutin laboratuvarlarda kullanıma uygunluğu değerlendirmek amacıyla hazırlanan analitler oda sıcaklığı, 2-8  C, 60  C ve -86  C saklanarak 7 gün analiz edilerek takip edilmiştir (Tablo 4.3). Oda sıcaklığı ve 2-8  C’de saklanan analitlerin gün içi çalışılmasında herhangi bir sorun olmadığı tespit edilmiştir. Ancak Vitamin K ve türevleri işığa hassas oldukları için saklama koşullarının karanlık olması gerekmektedir.



Tablo 4.3 Farklı sıcaklıklarda bekletilen analitlerin Vitamin K seviyelerindeki değişim.

Gün	Oda Sıcaklığı		2-8 °C		60 °C		-86 °C	
	Ölçülen (ng/mL)	%Fark	Ölçülen (ng/mL)	%Fark	Ölçülen (ng/mL)	%Fark	Ölçülen (ng/mL)	%Fark
0	150	0,00	150	0,00	150	0,00	150	0,00
1	146	2.67	145	3.33	141	6.00	148	1.33
2	142	5.33	142	5.33	133	11.33	149	0.67
3	140	6.67	139	7.33	116	22.67	146	2.67
4	138	8.00	135	10.00	104	30.67	148	1.33
5	137	8.67	132	12.00	85	43.33	145	3.33
6	131	12.67	131	12.67	82	45.33	146	2.67
7	129	14.00	128	14.67	77	48.67	147	2.00

4.2.3 Ölçüm ve raporlama sınırı

Geliştirilen metodun ölçüm sınırı belirleme çalışmalarında konsantrasyonu 0.5 ng/mL olan Vitamin K, MK-4 ve MK-7 analitleri 10 tekrarlı olarak çalışıldı. Elde edilen sonuçların standart hatası 0.009 olarak hesaplandı. Buna göre metodun LoD ve LoQ değeri sırasıyla 0.02 ng/mL ve 0.09 ng/mL olarak hesaplandı.

4.2.4 Gerçeklik, kesinlik ve doğruluk

Gerçeklik, kesinlik ve doğruluk testleri kapsamında yapılan çalışmalar sonucunda ortalama bağıl standart sapma %2.15 olarak hesaplandı. Ek olarak 10 ng/mL, 5 ng/mL, 1 ng/mL ve 0.5 ng/mL Vitamin K konsantrasyonuna sahip analitler 10 tekrarlı olarak çalışılmıştır. Her tekrarda elde edilen veriler, ortalamalar ve bağıl standart sapmalar Tablo 4.4'te sunulmuştur.

Tablo 4.4 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analitler ile yapılan tekrarlanabilirlik analizi sonuçları.

Beklenen (ng/mL)	Replika	Sonuç (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	%RSD
10	1	10.24	10.06	1.920548
	2	10.13		
	3	9.78		
	4	10.11		
	5	10.36		
	6	9.84		
	7	10.17		
	8	10.15		
	9	9.75		
	10	10.08		
5	1	4.89	4.94	2.771506
	2	5.26		
	3	4.88		
	4	4.93		
	5	4.84		
	6	4.81		
	7	4.84		
	8	5.13		
	9	4.88		
	10	4.89		
1	1	0.81	0.85	3.616571
	2	0.83		
	3	0.80		
	4	0.86		
	5	0.84		
	6	0.89		
	7	0.83		
	8	0.90		
	9	0.86		
	10	0.83		
0.5	1	0.48	0.5	6.18385
	2	0.46		
	3	0.47		
	4	0.53		
	5	0.53		
	6	0.52		
	7	0.54		
	8	0.47		
	9	0.48		
	10	0.54		

4.2.5 Yeniden üretilebilirlik ve sağlamlık

Vitamin K konsantrasyonları 5 ng/mL, 10 ng/mL ve 20 ng/mL olan analitlerin 10 tekrarlı olarak 2 farklı analist tarafından çalışılması sonucunda elde edilen verilerin gün-içi, günler-arası ve analistler arası ortalama değerleri Tablo 4.5'te sunulmuştur.

Tablo 4.5 Farklı konsantrasyonlarda hazırlanan analitler ile yapılan yeniden üretilebilirlik ve sağlamlık analizleri sonuçları.

Konsantrasyon (ng/mL)	5	10	20
Analist 1 - Gün 1	5.52	10.85	21.89
Analist 1 - Gün 2	5.23	10.26	21.01
Analist 2 - Gün 1	5.21	10.91	21.93
Analist 2 - Gün 2	5.38	10.66	21.68
Gün-içi (Gün 1)	5.365	10.88	21.91
Günler-arası (Analist 1)	5.375	10.555	21.45
Gün-içi (Gün 2)	5.305	10.46	21.345
Günler-arası (Analist 2)	5.295	10.785	21.805
%RSD	2.350504	2.381133	1.705896

Geri kazanım testleri kapsamında hazırlanan serum havuzu numunesine ait Vitamin K, MK-4 ve MK-7 seviyeleri sırasıyla 1.72 ng/mL, 0.84 ng/mL ve 0.53 ng/mL olarak tespit edildi. Numune içerisine 1 ng/mL Vitamin K eklendi. Analitler 10 tekrarlı olarak çalışıldıktan sonra Vitamin K, MK-4 ve MK-7 için elde edilen ortalama yüzde geri kazanım değerleri sırasıyla %94, %88 ve %85 olarak hesaplandı.

4.3 Referans Aralık Çalışmaları

Referans aralık çalışmalarına dahil olma ve dışlama kriterlerini sağlayan 64 kadın ve 67 erkek sağlıklı kontrol grubu referans kitle olarak dahil edildi. Referans kitleye ait demografik veriler Tablo 4.6'da sunulmuştur.

Tablo 4.6 Referans kitleye ait demografik veriler.

Parametre	Ortalama \pm Standart sapma	Referans Aralık
Yaş	31.40 \pm 3.50	-
25-Hidroksi-Vitamin D	25.74 \pm 16.00	20 – 70
Albumin	4.29 \pm 0.27	3.8 – 5.4
ALP	70.40 \pm 12.42	40 – 150
ALT	20.40 \pm 7.74	10 – 49
APTT	26.58 \pm 2.49	22.1 – 32.1
AST	21.12 \pm 4.99	15 – 50
Eritrosit	4.53 \pm 0.44	3.7 – 5.5
Glikoz	89.5 \pm 7.24	60 – 105
HDL	53.78 \pm 9.62	35 – 80
HCT	38.90 \pm 4.46	31 – 45
HGB	13.16 \pm 1.83	11 – 15
Ca	9.39 \pm 0.37	8.3 – 10.6
LDL	81.06 \pm 10.62	<100
Lenfosit	2.36 \pm 0.77	0.6 – 3.4
Lökosit	6.99 \pm 1.56	4.5 – 13.5
Monosit	0.64 \pm 0.19	0.19 – 0.81
Nötrofil	4.05 \pm 1.35	1.54 – 7.92
MCV	85.95 \pm 6.43	75 – 90
MCH	29.04 \pm 2.81	25 – 34
MPV	10.47 \pm 0.99	6 – 11
PCT	0.30 \pm 0.07	0.17 – 0.40
Potasyum	4.23 \pm 0.23	3.5 – 5.1
INR	0.99 \pm 0.09	0.8 – 1.2
Protrombin Zamanı (sn)	11.25 \pm 0.92	9.3 – 13.8
Na	137.94 \pm 2.33	135 – 145
PLT	277.20 \pm 78.23	142 – 424
PDW	12.24 \pm 2.15	9.5 – 15.2
Üre	27.86 \pm 6.60	12.8 – 42.8
Vitamin B12	352.50 \pm 49.63	211 – 911

Geliştirilen ve validasyon çalışmaları tamamlanan nihai Vitamin K ve türevleri LC-MS/MS tayin metodu aracılığıyla referans kitleye ait serum numunelerinin analiz edilmesi sonucunda elde edilen veriler “Data.xlsx” excel dosyasında “SONUC” sütunu içerisine eklenmiştir. Referans aralık hesaplama çalışmaları Tablo 4.7’de sunulan Python kodları ile yapılmıştır. Kod tablosundaki 2-5 satırları arasında gerekli kütüphaneler çağırılmaktadır. Satır 7’de “SONUC” sütunu içerisinde referans aralık çalışmasında kullanılan analitlerin geliştirilen metotla alınan Vitamin K sonuçlarının bulunduğu “Data.xlsx” excel dosyası okutulmaktadır. Satır 10-14’te dağılım ve box-

plot grafikleri çizdirilmektedir. Satır 17-24'te sapan değerler ayıklanmaktadır. Satır 25-28'de sapan değerler ayıklaması yapıldıktan sonra oluşan dağılım ve box-plot grafikleri çizdirilmektedir. Satır 38'de normallik sınaması yapılmaktadır. Satır 39-43'te logaritmik transform yapılmaktadır. Eğer verilen normal dağılıma sahip değilse, satır 51-60'ta non-parametrik dağılıma göre referans aralık hesaplanmaktadır. Eğer veriler normal dağılım gösteriyorsa, satır 64-70'te parametrik dağılıma göre referans aralık hesaplanmaktadır. Sonuç olarak referans aralık 0.1-1.2 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde farklı popülasyonlara ait farklı referans aralık sonuçları olduğu gözlenmiştir (Tablo 4.8).



Tablo 4.7 Referans aralık hesaplaması için Python programlama dili ile yazılan kod dizisi.

Satır	Kod
1	# Gerekli kütüphaneler
2	import numpy as np
3	import pandas as pd
4	import matplotlib.pyplot as plt
5	import seaborn as sns
6	# Veri dosyasını okutuyoruz
7	df = pd.read_excel("Data.xlsx")
8	import warnings
9	warnings.filterwarnings('ignore')
10	plt.figure(figsize=(16,5))
11	sns.distplot(df['SONUC'])
12	plt.show()
13	plt.boxplot(df.SONUC)
14	plt.show()
15	df = df.SONUC
16	# Sapan değerleri aykılıyorz
17	def remove_outlier_IQR(df):
18	Q1=df.quantile(0.25)
19	Q3=df.quantile(0.75)
20	IQR=Q3-Q1
21	df_final=df[~((df<(Q1-1.5*IQR)) (df>(Q3+1.5*IQR)))]
22	return df_final
23	df_outlier_removed=remove_outlier_IQR(df)
24	df=pd.DataFrame(df_outlier_removed)
25	sns.distplot(df)
26	plt.show()
27	plt.boxplot(df.SONUC)
28	plt.show()
29	# Normal dağılım sınaması
30	from scipy.stats import kurtosis
31	from scipy.stats import skew
32	from scipy.stats import normaltest
33	a = kurtosis(df)
34	b = skew(df)
35	p = normaltest(df)
36	alpha = 5e-3
37	p = p.value
38	if a > 1.5 or b > 1.5 or a < -1.5 or b < -1.5 or p < alpha :
39	df_log = np.log(df.SONUC)
40	sns.distplot(df_log)
41	fig = plt.figure()
42	df_outlier_removed=remove_outlier_IQR(df_log)
43	df=pd.DataFrame(df_outlier_removed)
44	sns.distplot(df)
45	plt.show()
46	plt.boxplot(df.SONUC)
47	plt.show()
48	# Non-parametrik dağılımda referans aralık hesaplama
49	import statistics
50	df = np.exp(df)
51	z = len(df)
52	t1 = ((z+1)*0.025)+1
53	t2 = ((z+1)*0.975)+1
54	t1 = int(t1)
55	t2 = int(t2)
56	t3 = df.sort_values(by=['SONUC'], ignore_index=True)
57	t3 = pd.DataFrame(t3)
58	Alt = t3.loc[t1,['SONUC']]
59	Üst = t3.loc[t2,['SONUC']]
60	print(f'Referans aralık {Alt.SONUC} ve {Üst.SONUC} aralığındadır. Kurtosis: {a} Skewness: {b} Normality: {p}')
61	else:
62	# Parametrik dağılımda referans aralık hesaplama
63	import statistics
64	sd=statistics.stdev(df.SONUC)
65	mean=statistics.mean(df.SONUC)
66	#Q1=df.SONUC.quantile(0.25)
67	#Q3=df.SONUC.quantile(0.75)
68	Alt=(mean-(1.96*sd))
69	Üst=(mean+(1.96*sd))
70	print(f'Referans aralık {Alt} ve {Üst} aralığındadır. Kurtosis: {a} Skewness: {b} Normality: {p}')

Tablo 4.8 Diğer bilimsel çalışmalarda farklı popülasyonlara ilişkin elde edilen Vitamin K ve türevlerine ait referans aralık sonuçları.

Örneklem genişliği	Popülasyon	Vitamin K₁ (ng/mL)	MK-4 (ng/mL)	MK-7 (ng/mL)	Kaynak
23	Japon sağlıklı 52-93 yaş arası kadınlar	0.41-0.55	0.03-0.07	0.01-3.4	Kawana [23]
52	Japon 30-49 yaş arası sağlıklı kadınlar	0.24-5.60	0.07 ± 0.14	4.96 ± 6.93	Tsugawa [24]
208	Japon 50-69 yaş arası sağlıklı kadınlar	0.13-8.83	0.10 ± 0.19	8.42 ± 11.44	Tsugawa [24]
136	Japon 70 yaş üstü sağlıklı kadınlar	0.19-6.67	0.09 ± 0.15	4.21 ± 6.81	Tsugawa [24]
20	Japon 59-82 yaş arası sağlıklı insanlar	0.392 ± 0.457	2.163 ± 1.340	17.53 ± 22.55	Kamao [213]
60	Japon 19-25 yaş arası sağlıklı erkekler	0.56 ± 0.34	0.07 ± 0.05	6.97 ± 13.30	Sogabe [214]
60	Hollandalı 45-65 yaş arası sağlıklı insanlar	0.61 ± 0.21	0.09 ± 0.01	<2.86	Riphagen [215]
631	Çinli 18-49 yaş arası doğum yapmış kadınlar	0.21-3.07	0.02-0.24	0.12-3.54	Nie [21]
62	İtalyan 51-65 yaş arası sağlıklı insanlar	1.36 ± 1.08	0.91 ± 0.85	1.95 ± 1.37	Fusaro [22]
387	İtalyan 18-89 yaş arası diyaliz hastası insanlar	0.98 ± 1.00	0.67 ± 0.74	1.15 ± 1.01	Fusaro [22]
1167	Hollandalı 45-64 yaş arası osteoporoz hastası kadınlar	0.17-3.05	0.07-2.68	0.33-4.48	Witteman [216]

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu doktora tez çalışmasında, insan serumunda Vitamin K, MK-4 ve MK-7 seviyelerini tayin edebilen LC-APCI-MS/MS metodu başarıyla geliştirilmiştir. Metot, ön hazırlık süresi dahilinde en fazla 30 dakika içerisinde sonuç verebilmektedir. Diğer metotlardan pozitif ayrışan özellikleri olan bu yöntem, ön hazırlık süresi ve ekstraksiyon basamağında katı faz ekstraksiyon filtrelerine ihtiyaç duymamasıyla öne çıkmaktadır.

Araştırma amacıyla laboratuvarlarda yapılan metot doğrulama çalışmalarının ardından, bu yöntem kullanılabilir. Metot karşılaştırma ve geçerlilik çalışmaları yapıldıktan sonra, rutin kullanım için uygun olacaktır.

Geliştirilen metot sayesinde, Türkiye popülasyonuna ait Vitamin K, MK-4 ve MK-7 referans aralığı belirlenmiştir. Bu alanda yapılmış önceki çalışmalara literatürde rastlanmamıştır. Belirlenen referans aralığının diğer popülasyonlara ait referans aralık değerlerinden farklı olması, popülasyona ve hatta laboratuvara özgü referans aralıklarının belirlenmesinin önemini bir kez daha vurgulamaktadır.

Metodun ekstraksiyon basamağında enzim kullanıldığı için, elde edilen sonuçların bu durum göz önüne alınarak değerlendirilmesi önemlidir. Ayrıca, enzim kullanılan metotlarda enzim stabilitesinin doğrudan sonuçları etkileyebileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, metodu uygulayan laboratuvarlarda enzim için optimum koşulların sağlanması tavsiye edilmektedir.

Vitamin K, MK-4 ve MK-7 referans aralığını belirlemek için Python programlama dilinde kod yazılmıştır. Bu kod, klinik laboratuvarlarda laboratuvar içi referans aralığı belirlemek amacıyla kullanılabilir ve laboratuvar bilgi sistemlerine entegre edilebilir.

Bu tez çalışması, uluslararası bir kongrede sözlü sunum ve hakemli bir dergide makale yayınlarıyla sonuçlanmıştır. Geliştirilen metot, farklı hastalık gruplarında yapılan araştırma çalışmalarıyla yeni yayınlar yapılması planlanmaktadır.

Üniversite-sanayi iş birliği çerçevesinde, metodun ticarileştirilmesi hedeflenmektedir. Şu anda, Vitamin K, MK-4 ve MK-7 ölçümünü bir arada yapabilen bir ticari ürün bulunmamaktadır. Tek olarak satılan ürünlerin ise düşük analitik performans özelliklerine sahip olduğu görülmektedir. Ayrıca, bu ürünler genellikle yabancı menşeli firmalar tarafından satılmaktadır.

Enzim destekli ekstraksiyon, diğer yağda çözünen vitaminlerin miktarının tayin edilmesinde kullanılabilir metotların geliştirilmesinde de potansiyel göstermektedir. Bu alanda yeni araştırma çalışmalarının yapılması önerilmektedir.

Sonuç olarak, bu çalışma, Vitamin K, MK-4 ve MK-7'nin hızlı ve güvenilir bir şekilde tayin edilebileceği yeni bir metot geliştirmiştir. Bu metot, literatürdeki diğer yöntemlerden pozitif ayrılarak önemli avantajlar sunmaktadır. Özellikle, en fazla 30 dakika içerisinde sonuç verme özelliği ve katı faz ekstraksiyon filtrelerine ihtiyaç duymaması, analiz sürecini hızlandırırken aynı zamanda maliyetleri de azaltmaktadır. Bu çalışmanın başarısı, ilgili alanda daha fazla araştırma ve uygulama yapılmasına ilham vermesi ve Vitamin K analizinde standart bir yaklaşımın benimsenmesi için bir temel oluşturması umulmaktadır.

KAYNAKLAR

1. **Combs Jr, G. F. ve McClung, J. P.** (2016). *The vitamins: fundamental aspects in nutrition and health*. Academic press.
2. **Shearer, M. J.** (2009). Vitamin K in parenteral nutrition. *Gastroenterology*, 137(5), S105-S118.
3. **Shearer, M.** (1992). Vitamin K metabolism and nutriture. *Blood reviews*, 6(2), 92-104.
4. **Suttie, J.** (1993). Synthesis of vitamin K-dependent proteins. *The FASEB journal*, 7(5), 445-452.
5. **Shearer, M. J. ve Newman, P.** (2008). Metabolism and cell biology of vitamin K. *Thrombosis and haemostasis*, 100(10), 530-547.
6. **Berkner, K. L. ve Pudota, B. N.** (1998). Vitamin K-dependent carboxylation of the carboxylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(2), 466-471.
7. **Furie, B., Bouchard, B. A. ve Furie, B. C.** (1999). Vitamin K-dependent biosynthesis of γ -carboxyglutamic acid. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 93(6), 1798-1808.
8. **Organization, W. H.** (2004). *Vitamin and mineral requirements in human nutrition*. World Health Organization.
9. **Booth, S. L. ve Saltzman, E.** (2001). Vitamin K: Structure and function. *eLS*.
10. **Isarangkura, P., Mahasandana, C., Chuansumrit, A. ve Angchaisuksiri, P.** (2004). Acquired bleeding disorders: the impact of health problems in the developing world. *Haemophilia*, 10, 188-195.
11. **Zipursky, A.** (1999). Prevention of vitamin K deficiency bleeding in newborns. *British journal of haematology*, 104(3), 430-437.
12. **Sutor, A. H., von Kries, R., Cornelissen, M. E., McNinch, A. W. ve Andrew, M.** (1999). Vitamin K deficiency bleeding (VKDB) in infancy. *Thrombosis and haemostasis*, 81(03), 456-461.
13. **Lanzkowsky, P.** (2005). *Manual of pediatric hematology and oncology*. Elsevier.
14. **Lynch, K. L.** (2016). CLSI C62-A: A New Standard for Clinical Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 62(1), 24-29.
15. **Sandvik, T. A., Husa, A., Buchmann, M. ve Lundanes, E.** (2017). Routine supercritical fluid chromatography tandem mass spectrometry method for determination of vitamin K1 extracted from serum with a 96-well solid-phase extraction method. *The Journal of Applied Laboratory Medicine*, 1(6), 637-648.
16. **Suhara, Y., Kamao, M., Tsugawa, N. ve Okano, T.** (2005). Method for the determination of vitamin K homologues in human plasma using high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 77(3), 757-763.
17. **McDonald, M. G., Yeung, C. K., Teitelbaum, A. M., Johnson, A. L., Fujii, S., Kagechika, H., ve ark.** (2019). A new LC-MS assay for the quantitative

- analysis of vitamin K metabolites in human urine. *Journal of lipid research*, 60(4), 892-899.
18. **Dunovska, K., Klapkova, E., Sopko, B., Cepova, J. ve Prusa, R.** (2019). LC-MS/MS quantitative analysis of phylloquinone, menaquinone-4 and menaquinone-7 in the human serum of a healthy population. *PeerJ*, 7, e7695-e7695.
 19. **Hirauchi, K., Sakano, T., Nagaoka, T. ve Morimoto, A.** (1988). Simultaneous determination of vitamin K1, vitamin K1 2,3-epoxide and menaquinone-4 in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 430, 21-29.
 20. **IFCC, C.** (2010). EP28-A3c document. *Defining, Establishing and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory: Approved Guideline*, 28(30).
 21. **Nie, S., Yang, L., Feng, J., Lu, J., Zhang, H., Li, W., ve ark.** (2023). Reference Range of Vitamin K Evaluating Indicators in Chinese Childbearing Women. *Nutrients*, 15(8), 1977.
 22. **Fusaro, M., Noale, M., Viola, V., Galli, F., Tripepi, G., Vajente, N., ve ark.** (2012). Vitamin K, vertebral fractures, vascular calcifications, and mortality: Vitamin K Italian (VIKI) dialysis study. *J Bone Miner Res*, 27(11), 2271-2278.
 23. **Kawana, K., Takahashi, M., Hoshino, H. ve Kushida, K.** (2001). Circulating Levels of Vitamin K1, Menaquinone-4, And Menaquinone-7 In Healthy Elderly Japanese Women and Patients with Vertebral Fractures and Patients with Hip Fractures. *Endocr Res*, 27(3), 337-343.
 24. **Tsugawa, N., Shiraki, M., Suhara, Y., Kamao, M., Tanaka, K. ve Okano, T.** (2006). Vitamin K status of healthy Japanese women: age-related vitamin K requirement for γ -carboxylation of osteocalcin. *The American journal of clinical nutrition*, 83(2), 380-386.
 25. **Combs, G. F. ve McClung, J. P.** (2017). Chapter 1 - What Is a Vitamin? İçinde G.F. Combs, J.P. McClung, (Ed.), *The Vitamins (Fifth Edition)* ss. 3-6): Academic Press.
 26. **Funk, C.** (1912). The Etiology of The Deficiency Diseases. *The Journal of State Medicine*, 20(6), 341-368.
 27. **Piro, A., Tagarelli, G., Lagonia, P., Tagarelli, A. ve Quattrone, A.** (2010). Casimir Funk: his discovery of the vitamins and their deficiency disorders. *Ann Nutr Metab*, 57(2), 85-88.
 28. **Carpenter, K. J.** (2004). The Nobel Prize and the discovery of vitamins. *NobelPrize.org Nobel Prize Outreach AB2021 Stockholm Available online at: <https://www.nobelprize.org/prizes/themes/the-nobel-prize-and-the-discovery-of-vitamins> (accessed August 28, 2021).*
 29. **Binkley, S., Maccobquodale, D., Thayer, S. A. ve Doisy, E. A.** (1939). The isolation of vitamin K1. *Journal of Biological Chemistry*, 130, 219-234.
 30. **MacCorquodale, D., Cheney, L., Binkley, S., Holcomb, W., McKee, R., Thayer, S. A., ve ark.** (1939). The constitution and synthesis of vitamin K1. *Journal of Biological Chemistry*, 131, 357-370.
 31. **Dam, H. ve Schönheyder, F.** (1936). The occurrence and chemical nature of vitamin K. *Biochemical Journal*, 30(5), 897.
 32. **Hill, T. ve Morrissey, P.** (2011). Vitamins - Vitamin K.
 33. **Dam, H.** (1935). The antihemorrhagic vitamin of the chick. *Biochemical Journal*, 29(6), 1273.

34. **Dam, H.** (1935). The antihæmorrhagic vitamin of the chick.: occurrence and chemical nature. *Nature*, 135(3417), 652-653.
35. **Booth, S. L., Tucker, K. L., Chen, H., Hannan, M. T., Gagnon, D. R., Cupples, L. A., ve ark.** (2000). Dietary vitamin K intakes are associated with hip fracture but not with bone mineral density in elderly men and women. *The American journal of clinical nutrition*, 71(5), 1201-1208.
36. **Braam, L., Knapen, M., Geusens, P., Brouns, F., Hamulyak, K., Gerichhausen, M., ve ark.** (2003). Vitamin K1 supplementation retards bone loss in postmenopausal women between 50 and 60 years of age. *Calcified Tissue Int*, 73, 21-26.
37. **Kohlmeier, M., Salomon, A., Saupe, J. ve Shearer, M. J.** (1996). Transport of vitamin K to bone in humans. *The Journal of nutrition*, 126(suppl_4), 1192S-1196S.
38. **Mathers, J., Fernandez, F., Hill, M., McCarthy, P., Shearer, M. ve Oxley, A.** (1990). Dietary modification of potential vitamin K supply from enteric bacterial menaquinones in rats. *British Journal of Nutrition*, 63(3), 639-652.
39. **Gijsbers, B. L., Jie, K.-S. G. ve Vermeer, C.** (1996). Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *British Journal of Nutrition*, 76(2), 223-229.
40. Ferland, G., Year editör^editörler. Vitamin K and brain function. Seminars in thrombosis and hemostasis; 2013: Thieme Medical Publishers; Published.
41. **Humpl, T., Brühl, K., Brzezinska, R., Hafner, G., Coerdts, W. ve Shearer, M. J.** (1999). Fatal late vitamin K-deficiency bleeding after oral vitamin K prophylaxis secondary to unrecognized bile duct paucity. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 29(5), 594-597.
42. **Davidson, R. T., Foley, A. L., Engelke, J. A. ve Suttie, J. W.** (1998). Conversion of dietary phylloquinone to tissue menaquinone-4 in rats is not dependent on gut bacteria. *The Journal of nutrition*, 128(2), 220-223.
43. **Bingöl, G.** (1977). *Vitaminler ve Enzimler*. Ankara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları.
44. **Shearer, M. J., Fu, X. ve Booth, S. L.** (2012). Vitamin K nutrition, metabolism, and requirements: current concepts and future research. *Advances in Nutrition*, 3(2), 182-195.
45. **Cockayne, S., Adamson, J., Lanham-New, S., Shearer, M. J., Gilbody, S. ve Torgerson, D. J.** (2006). Vitamin K and the prevention of fractures: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Archives of internal medicine*, 166(12), 1256-1261.
46. **Berkner, K. L.** (2005). The vitamin K–dependent carboxylase. *Annu Rev Nutr*, 25, 127-149.
47. **Furie, B. ve Furie, B. C.** (1990). Molecular basis of vitamin K-dependent-carboxylation. *Blood*, 75(9), 1753-1762.
48. **Gröber, U., Reichrath, J., Holick, M. F. ve Kisters, K.** (2014). Vitamin K: an old vitamin in a new perspective. *Dermato-Endocrinology*, 6(1), e968490.
49. **Kinoshita, H., Nakagawa, K., Narusawa, K. i., Goseki-Sone, M., Fukushima-Irie, M., Mizoi, L., ve ark.** (2007). A functional single nucleotide polymorphism in the vitamin-K-dependent gamma-glutamyl carboxylase gene (Arg325Gln) is associated with bone mineral density in elderly Japanese women. *Bone*, 40(2), 451-456.
50. **Sokoll, L. J., Booth, S. L., O'Brien, M. E., Davidson, K. W., Tsaioun, K. I. ve Sadowski, J. A.** (1997). Changes in serum osteocalcin, plasma

- phylloquinone, and urinary gamma-carboxyglutamic acid in response to altered intakes of dietary phylloquinone in human subjects. *The American journal of clinical nutrition*, 65(3), 779-784.
51. **Crosier, M. D., Peter, I., Booth, S. L., Bennett, G., Dawson-Hughes, B. ve Ordovas, J. M.** (2009). Association of sequence variations in vitamin K epoxide reductase and γ -glutamyl carboxylase genes with biochemical measures of vitamin K status. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 55(2), 112-119.
 52. **Wang, Y., Zhang, W., Zhang, Y., Yang, Y., Sun, L., Hu, S., ve ark.** (2006). VKORC1 haplotypes are associated with arterial vascular diseases (stroke, coronary heart disease, and aortic dissection). *Circulation*, 113(12), 1615-1621.
 53. **Holden, R. M., Booth, S. L., Tuttle, A., James, P. D., Morton, A. R., Hopman, W. M., ve ark.** (2014). Sequence variation in vitamin K epoxide reductase gene is associated with survival and progressive coronary calcification in chronic kidney disease. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 34(7), 1591-1596.
 54. **Shearer, M. J.** (1990). Vitamin K and vitamin K-dependent proteins. *British journal of haematology*, 75(2), 156-162.
 55. **Burtis, C. A. ve Bruns, D. E.** (2014). *Tietz fundamentals of clinical chemistry and molecular diagnostics-e-book*. Elsevier Health Sciences.
 56. **Allison, A.** (1955). Danger of vitamin K to newborn. *The Lancet*, 265(6865), 669.
 57. **Tovar, A., Ameho, C. K., Blumberg, J. B., Peterson, J. W., Smith, D. ve Booth, S. L.** (2006). Extrahepatic tissue concentrations of vitamin K are lower in rats fed a high vitamin E diet. *Nutrition & metabolism*, 3(1), 29.
 58. **Rodwell, V. W., Bender, D. A., Botham, K. M., Kennelly, P. J. ve Weil, A.** (2015). *Illustrated Biochemistry*. New York: McGraw-Hill.
 59. **Lane, P. A. ve Hathaway, W. E.** (1985). Vitamin K in infancy. *The Journal of pediatrics*, 106(3), 351-359.
 60. **Türkmenoğlu, Y., Taş, B. T., Türkkkan, E., Aydınol, F. N., Kafadar, İ. ve Adal, S. E.** (2012). Tek doz K vitamini yenidoğanın geç hemorajik hastalığını önlemede yeterli bir profilaksi mi? İki olgu sunumu. *Okmeydanı Tıp Dergisi*.
 61. **Schubiger, G., Tönz, O., Grüter, J. ve Shearer, M.** (1993). Vitamin K1 concentration in breast-fed neonates after oral or intramuscular administration of a single dose of a new mixed-micellar preparation of phylloquinone. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*, 16(4), 435-439.
 62. **Haroon, Y., Shearer, M., McEnery, G., Allan, V., Barkhan, P. ve Macdonald, I.** (1980). Assay of vitamin K1 (phylloquinone) by high performance liquid chromatography: values for human and cow's milk. *Proceedings of the Nutrition Society*, 39(2).
 63. **Conway, S. P., Wolfe, S. P., Brownlee, K. G., White, H., Oldroyd, B., Truscott, J. G., ve ark.** (2005). Vitamin K status among children with cystic fibrosis and its relationship to bone mineral density and bone turnover. *Pediatrics*, 115(5), 1325-1331.
 64. **von Kries, R., Funda, J., Shearer, M. ve Göbel, U.** (1992). Late hemorrhagic disease of newborn: a case with increased vitamin K requirement. *Acta Paediatrica*, 81(9), 728-729.
 65. **Bozaykut, A., Karaman, S. ve Akyıldız, B.** (2002). Yenidoğanın hemorajik hastalığı. *Retrospektif çalışma Ege Pediatri Bülteni*, 9(2), 65-67.

66. **Widdershoven, J., Van Munster, P., De Abreu, R., Bosman, H., Van Lith, T., Van Der Putten-Van Meyel, M., ve ark.** (1987). Four methods compared for measuring des-carboxy-prothrombin (PIVKA-II). *Clinical chemistry*, 33(11), 2074-2078.
67. **Von Kries, R., Shearer, M., Widdershoven, J., Motohara, K., Umbach, G. ve Göbel, U.** (1992). Des-gamma-carboxyprothrombin (PIVKA II) and plasma vitamin K1 in newborns and their mothers. *Thrombosis and haemostasis*, 68(10), 383-387.
68. **Grontoft, O.** (1954). Intracranial haemorrhage and blood-brain barrier problems in the new-born; a pathologico-anatomical and experimental investigation. *Acta pathologica et microbiologica*, 100, 8.
69. **Bolton-Smith, C., McMurdo, M. E., Paterson, C. R., Mole, P. A., Harvey, J. M., Fenton, S. T., ve ark.** (2007). Two-year randomized controlled trial of vitamin K1 (phylloquinone) and vitamin D3 plus calcium on the bone health of older women. *J Bone Miner Res*, 22(4), 509-519.
70. **Abay, H., Kaplan, S., Pınar, G. ve Akalın, A.** (2015). Çağın Pandemisi: Osteoporoz ve Güncel Yaklaşımlar. *Yıldırım Beyazıt Üniversitesi Hemşirelik E-Dergisi*, 2(2).
71. **Chuang, T.-L., Lin, C.-H. ve Wang, Y.-F.** (2021). Effects of vegetarian diet on bone mineral density. *Tzu-Chi Medical Journal*, 33(2), 128.
72. **Tucker, K. L.** (2014). Vegetarian diets and bone status. *The American journal of clinical nutrition*, 100(suppl_1), 329S-335S.
73. **Weber, P.** (2001). Vitamin K and bone health. *Nutrition*, 17(10), 880-887.
74. **Feskanich, D., Weber, P., Willett, W. C., Rockett, H., Booth, S. L. ve Colditz, G. A.** (1999). Vitamin K intake and hip fractures in women: a prospective study. *The American journal of clinical nutrition*, 69(1), 74-79.
75. **Shea, M. K., Kritchevsky, S. B., Hsu, F.-C., Nevitt, M., Booth, S. L., Kwoh, C. K., ve ark.** (2015). The association between vitamin K status and knee osteoarthritis features in older adults: the Health, Aging and Body Composition Study. *Osteoarthritis and cartilage*, 23(3), 370-378.
76. **Iwamoto, J., Takeda, T. ve Sato, Y.** (2006). Menatetrenone (vitamin K2) and bone quality in the treatment of postmenopausal osteoporosis. *Nutrition reviews*, 64(12), 509-517.
77. **Levinger, I., Scott, D., Nicholson, G. C., Stuart, A. L., Duque, G., McCorquodale, T., ve ark.** (2014). Undercarboxylated osteocalcin, muscle strength and indices of bone health in older women. *Bone*, 64, 8-12.
78. **Luo, G., Ducy, P., McKee, M. D., Pinero, G. J., Loyer, E., Behringer, R. R., ve ark.** (1997). Spontaneous calcification of arteries and cartilage in mice lacking matrix GLA protein. *Nature*, 386(6620), 78-81.
79. **Nakamura, Y. S., Hakeda, Y., Takakura, N., Kameda, T., Hamaguchi, I., Miyamoto, T., ve ark.** (1998). Tyro 3 receptor tyrosine kinase and its ligand, Gas6, stimulate the function of osteoclasts. *Stem cells*, 16(3), 229-238.
80. **Coutu, D. L., Wu, J. H., Monette, A., Rivard, G.-E., Blostein, M. D. ve Galipeau, J.** (2008). Periostin, a member of a novel family of vitamin K-dependent proteins, is expressed by mesenchymal stromal cells. *Journal of Biological Chemistry*, 283(26), 17991-18001.
81. **Shea, M. K., Gundberg, C. M., Meigs, J. B., Dallal, G. E., Saltzman, E., Yoshida, M., ve ark.** (2009). γ -Carboxylation of osteocalcin and insulin resistance in older men and women. *The American journal of clinical nutrition*, 90(5), 1230-1235.

82. **Juanola-Falgarona, M., Salas-Salvadó, J., Martínez-González, M. Á., Corella, D., Estruch, R., Ros, E., ve ark.** (2014). Dietary intake of vitamin K is inversely associated with mortality risk. *The Journal of nutrition*, 144(5), 743-750.
83. **Levy, R. J., Lian, J. B. ve Gallop, P.** (1979). Atherocalcin, a γ -carboxyglutamic acid containing protein from atherosclerotic plaque. *Biochemical and biophysical research communications*, 91(1), 41-49.
84. **Bellido-Martín, L. ve de Frutos, P. G.** (2008). Vitamin K-dependent actions of Gas6. *Vitamins & Hormones*, 78, 185-209.
85. **Viegas, C. S., Simes, D. C., Laizé, V., Williamson, M. K., Price, P. A. ve Cancela, M. L.** (2008). Gla-rich protein (GRP), a new vitamin K-dependent protein identified from sturgeon cartilage and highly conserved in vertebrates. *Journal of biological chemistry*, 283(52), 36655-36664.
86. **Berkner, K. ve Runge, K.** (2004). The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(12), 2118-2132.
87. **Shearer, M. J.** (2000). Role of vitamin K and Gla proteins in the pathophysiology of osteoporosis and vascular calcification. *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care*, 3(6), 433-438.
88. **Stępień, A., Koziarska-Rościszewska, M., Rysz, J. ve Stępień, M.** (2022). Biological Role of Vitamin K—With Particular Emphasis on Cardiovascular and Renal Aspects. *Nutrients*, 14(2), 262.
89. **Shearer, M. J. ve Barkhan, P.** (1973). Studies on the metabolites of phylloquinone (vitamin K1) in the urine of man. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 297(2), 300-312.
90. **Suttie, J.** (1995). The importance of menaquinones in human nutrition. *Annual review of nutrition*, 15(1), 399-417.
91. **Mitchell, J., Brinkley, D. ve Haybittle, J.** (1965). Clinical trial of radiosensitizers, including synkavit and oxygen inhaled at atmospheric pressure. *Acta radiologica: therapy, physics, biology*, 3(5), 329-341.
92. **Nimptsch, K., Rohrmann, S. ve Linseisen, J.** (2008). Dietary intake of vitamin K and risk of prostate cancer in the Heidelberg cohort of the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC-Heidelberg). *The American journal of clinical nutrition*, 87(4), 985-992.
93. **Habu, D., Shiomi, S., Tamori, A., Takeda, T., Tanaka, T., Kubo, S., ve ark.** (2004). Role of vitamin K2 in the development of hepatocellular carcinoma in women with viral cirrhosis of the liver. *Jama*, 292(3), 358-361.
94. **Shea, M. K., Booth, S. L., Gundberg, C. M., Peterson, J. W., Waddell, C., Dawson-Hughes, B., ve ark.** (2010). Adulthood obesity is positively associated with adipose tissue concentrations of vitamin K and inversely associated with circulating indicators of vitamin K status in men and women. *The Journal of nutrition*, 140(5), 1029-1034.
95. **Booth, S. L., Centi, A., Smith, S. R. ve Gundberg, C.** (2013). The role of osteocalcin in human glucose metabolism: marker or mediator? *Nature Reviews Endocrinology*, 9(1), 43-55.
96. **Yoshida, M., Booth, S. L., Meigs, J. B., Saltzman, E. ve Jacques, P. F.** (2008). Phylloquinone intake, insulin sensitivity, and glycemic status in men and women. *The American journal of clinical nutrition*, 88(1), 210-215.

97. **Yoshida, M., Jacques, P. F., Meigs, J. B., Saltzman, E., Shea, M. K., Gundberg, C., ve ark.** (2008). Effect of vitamin K supplementation on insulin resistance in older men and women. *Diabetes care*, 31(11), 2092-2096.
98. **Kumar, R., Binkley, N. ve Vella, A.** (2010). Effect of phylloquinone supplementation on glucose homeostasis in humans. *The American journal of clinical nutrition*, 92(6), 1528-1532.
99. **Booth, S. L., Davidson, K. W. ve Sadowski, J. A.** (1994). Evaluation of an HPLC method for the determination of phylloquinone (vitamin K1) in various food matrixes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42(2), 295-300.
100. **Booth, S. L., Sadowski, J. A., Weihrauch, J. L. ve Ferland, G.** (1993). Vitamin K1 (phylloquinone) content of foods: a provisional table. *Journal of Food Composition and Analysis*, 6(2), 109-120.
101. **Schurgers, L. J., Teunissen, K. J., Hamulyák, K., Knapen, M. H., Vik, H. ve Vermeer, C.** (2007). Vitamin K-containing dietary supplements: comparison of synthetic vitamin K1 and natto-derived menaquinone-7. *Blood*, 109(8), 3279-3283.
102. **Simes, D. C., Viegas, C. S., Araújo, N. ve Marreiros, C.** (2020). Vitamin K as a diet supplement with impact in human health: current evidence in age-related diseases. *Nutrients*, 12(1), 138.
103. **Fusaro, M., Cianciolo, G., Brandi, M. L., Ferrari, S., Nickolas, T. L., Tripepi, G., ve ark.** (2020). Vitamin K and Osteoporosis. *Nutrients*, 12(12), 3625.
104. **Gijsbers, B. L. M. G., Jie, K.-S. G. ve Vermeer, C.** (1996). Effect of food composition on vitamin K absorption in human volunteers. *British Journal of Nutrition*, 76(2), 223-229.
105. **Conly, J. ve Stein, K.** (1992). Quantitative and qualitative measurements of K vitamins in human intestinal contents. *American Journal of Gastroenterology*, 87(3).
106. **Shearer, M. J., Bach, A. ve Kohlmeier, M.** (1996). Chemistry, nutritional sources, tissue distribution and metabolism of vitamin K with special reference to bone health. *The Journal of nutrition*, 126(suppl_4), 1181S-1186S.
107. **Gonçalves, F. M.** (2013) *Agentes antioxidantes na reprodução de matrizes pesadas*: Universidade Federal de Pelotas.
108. **Yan, L., Zhou, B., Nigdikar, S., Wang, X., Bennett, J. ve Prentice, A.** (2005). Effect of apolipoprotein E genotype on vitamin K status in healthy older adults from China and the UK. *British journal of nutrition*, 94(6), 956-961.
109. **Saupe, J., Shearer, M. J. ve Kohlmeier, M.** (1993). Phylloquinone transport and its influence on γ -carboxyglutamate residues of osteocalcin in patients on maintenance hemodialysis. *The American journal of clinical nutrition*, 58(2), 204-208.
110. **Hodges, S., Bejui, J., Leclercq, M. ve Delmas, P.** (1993). Detection and measurement of vitamins K1 and K2 in human cortical and trabecular bone. *J Bone Miner Res*, 8(8), 1005-1008.
111. **Sokoll, L. J. ve Sadowski, J. A.** (1996). Comparison of biochemical indexes for assessing vitamin K nutritional status in a healthy adult population. *The American journal of clinical nutrition*, 63(4), 566-573.
112. **Smith, A. M. ve Custer, R. P.** (1960). Toxicity of vitamin K: induced hypoprothrombinemia and altered liver function. *Journal of the American Medical Association*, 173(5), 502-504.

113. **Beulens, J. W., Booth, S. L., van den Heuvel, E. G., Stoecklin, E., Baka, A. ve Vermeer, C.** (2013). The role of menaquinones (vitamin K₂) in human health. *British Journal of Nutrition*, 110(8), 1357-1368.
114. **Shearer, M. J. ve Newman, P.** (2014). Recent trends in the metabolism and cell biology of vitamin K with special reference to vitamin K cycling and MK-4 biosynthesis. *Journal of Lipid Research*, 55(3), 345-362.
115. **Mladěnka, P., Macáková, K., Kujovská Krčmová, L., Javorská, L., Mrštná, K., Carazo, A., ve ark.** (2021). Vitamin K – sources, physiological role, kinetics, deficiency, detection, therapeutic use, and toxicity. *Nutrition Reviews*, 80(4), 677-698.
116. **Domon, B. ve Aebersold, R.** (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, 312(5771), 212-217.
117. **Glish, G. L. ve Vachet, R. W.** (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140-150.
118. **Zubarev, R. A. ve Makarov, A.** (2013). Orbitrap Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry*, 85(11), 5288-5296.
119. **De Hoffmann, E. ve Stroobant, V.** (2007). *Mass spectrometry: principles and applications*. John Wiley & Sons.
120. **McLafferty, F. W.** (1981). Tandem Mass Spectrometry. *Science*, 214(4518), 280-287.
121. **Gross, J. H.** (2017). Tandem Mass Spectrometry. *Mass Spectrometry: A Textbook* ss. 539-612). Cham: Springer International Publishing.
122. **Cunsolo, V., Foti, S., Ner-Kluza, J., Drabik, A., Silberring, J., Muccilli, V., ve ark.** (2019). Mass Spectrometry Applications. *Mass Spectrometry: An Applied Approach*, 261-388.
123. **Sleno, L. ve Volmer, D. A.** (2004). Ion activation methods for tandem mass spectrometry. *Journal of Mass Spectrometry*, 39(10), 1091-1112.
124. **Byrdwell, W. C.** (2001). Atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry for analysis of lipids. *Lipids*, 36(4), 327-346.
125. **Wanner, K. T. ve Höfner, G.** (2007). *Mass spectrometry in medicinal chemistry*. Wiley-VCH New York.
126. **Glish, G. L. ve Burinsky, D. J.** (2008). Hybrid mass spectrometers for tandem mass spectrometry. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 19(2), 161-172.
127. **Schmid, R., Heuckeroth, S., Korf, A., Smirnov, A., Myers, O., Dyrland, T. S., ve ark.** (2023). Integrative analysis of multimodal mass spectrometry data in MZmine 3. *Nature Biotechnology*, 41(4), 447-449.
128. **Röst, H. L., Sachsenberg, T., Aiche, S., Bielow, C., Weisser, H., Aicheler, F., ve ark.** (2016). OpenMS: a flexible open-source software platform for mass spectrometry data analysis. *Nature Methods*, 13(9), 741-748.
129. **Chambers, M. C., Maclean, B., Burke, R., Amodei, D., Ruderman, D. L., Neumann, S., ve ark.** (2012). A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, 30(10), 918-920.
130. **Martens, L., Chambers, M., Sturm, M., Kessner, D., Levander, F., Shofstahl, J., ve ark.** (2011). mzML a Community Standard for Mass Spectrometry Data *. *Molecular & Cellular Proteomics*, 10(1).
131. **Pedrioli, P. G. A., Eng, J. K., Hubley, R., Vogelzang, M., Deutsch, E. W., Raught, B., ve ark.** (2004). A common open representation of mass spectrometry data and its application to proteomics research. *Nature Biotechnology*, 22(11), 1459-1466.

132. **Kessner, D., Chambers, M., Burke, R., Agus, D. ve Mallick, P.** (2008). ProteoWizard: open source software for rapid proteomics tools development. *Bioinformatics*, 24(21), 2534-2536.
133. **Gatto, L. ve Lilley, K. S.** (2012). MSnbase-an R/Bioconductor package for isobaric tagged mass spectrometry data visualization, processing and quantitation. *Bioinformatics*, 28(2), 288-289.
134. **Gatto, L., Gibb, S. ve Rainer, J.** (2020). MSnbase, efficient and elegant R-based processing and visualization of raw mass spectrometry data. *Journal of Proteome Research*, 20(1), 1063-1069.
135. **Smith, C. A., Want, E. J., O'Maille, G., Abagyan, R. ve Siuzdak, G.** (2006). XCMS: processing mass spectrometry data for metabolite profiling using nonlinear peak alignment, matching, and identification. *Analytical chemistry*, 78(3), 779-787.
136. **Tautenhahn, R., Böttcher, C. ve Neumann, S.** (2008). Highly sensitive feature detection for high resolution LC/MS. *BMC bioinformatics*, 9(1), 1-16.
137. **Benton, H. P., Want, E. J. ve Ebbels, T. M.** (2010). Correction of mass calibration gaps in liquid chromatography–mass spectrometry metabolomics data. *Bioinformatics*, 26(19), 2488-2489.
138. **Stravs, M. A., Schymanski, E. L., Singer, H. P. ve Hollender, J.** (2013). Automatic recalibration and processing of tandem mass spectra using formula annotation. *Journal of Mass Spectrometry*, 48(1), 89-99.
139. **Pang, Z., Chong, J., Li, S. ve Xia, J.** (2020). MetaboAnalystR 3.0: Toward an Optimized Workflow for Global Metabolomics. *Metabolites*, 10(5), 186.
140. **Chong, J., Yamamoto, M. ve Xia, J.** (2019). MetaboAnalystR 2.0: From Raw Spectra to Biological Insights. *Metabolites*, 9(3), 57.
141. **Chong, J. ve Xia, J.** (2018). MetaboAnalystR: an R package for flexible and reproducible analysis of metabolomics data. *Bioinformatics*, 34(24), 4313-4314.
142. **Scheltema, R. A., Jankevics, A., Jansen, R. C., Swertz, M. A. ve Breitling, R.** (2011). PeakML/mzMatch: A File Format, Java Library, R Library, and Tool-Chain for Mass Spectrometry Data Analysis. *Analytical Chemistry*, 83(7), 2786-2793.
143. Costa, C., Afonso, T., Cardoso, S., Maraschin, M. ve Rocha, M., Year editör^editörler. Specmine: an R package for metabolomics and spectral data analysis and mining2017 Published.
144. **Helmus, R., ter Laak, T. L., van Wezel, A. P., de Voogt, P. ve Schymanski, E. L.** (2021). patRoon: open source software platform for environmental mass spectrometry based non-target screening. *Journal of Cheminformatics*, 13(1), 1.
145. **Fraisier-Vannier, O., Chervin, J., Cabanac, G., Puech, V., Fournier, S., Durand, V., ve ark.** (2020). MS-CleanR: A Feature-Filtering Workflow for Untargeted LC–MS Based Metabolomics. *Analytical Chemistry*, 92(14), 9971-9981.
146. **Rainer, J., Vicini, A., Salzer, L., Stanstrup, J., Badia, J. M., Neumann, S., ve ark.** (2022). A Modular and Expandable Ecosystem for Metabolomics Data Annotation in R. *Metabolites*, 12(2), 173.
147. **ISO.** 2005. ISO/IEC 17025:2005 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
148. **ISO.** 2012. ISO 15189:2012 Medical laboratories – Requirements for quality and competence.

149. **ISO.** 2003. ISO 15195:2003 Laboratory medicine – Requirements for reference measurement laboratories.
150. **ISO.** 2005. ISO 9000:2005 Quality management systems – Fundamentals and vocabulary. <https://www.iso.org/standard/40874.html>; s.
151. **De Bièvre, P.** (2012). *International Vocabulary of Metrology: ‘VIM’*. Chemistry International--Newsmagazine for IUPAC; 2012.
152. **Barwick, V. J. ve Prichard, E.** (2011). *Eurachem Guide: Terminology in analytical measurement – Introduction t o VIM 3*. Eurachem; 2011.
153. **Vessman, J., Stefan, R. I., Van Staden, J. F., Danzer, K., Lindner, W., Burns, D. T., ve ark.** (2001). Selectivity in analytical chemistry (IUPAC Recommendations 2001). *Pure and Applied Chemistry*, 73(8), 1381-1386.
154. **Desimoni, E.** (2004). About CC α and CC β as introduced by the Commission Decision of 12 August 2002 implementing Council Directive 96/23/EC. *Accreditation and Quality Assurance*, 9, 724-725.
155. **Miller, J. N.** (1991). Basic statistical methods for analytical chemistry. Part 2. Calibration and regression methods. A review. *Analyst*, 116(3), 235-249.
156. **Bertil, M. ve Örnemark, U.** (2014). The fitness for purpose of analytical methods: a laboratory guide to method validation and related topics. *A laboratory guide to method validation and related topics*.
157. **Committee, A. M.** (1988). Uses (proper and improper) of correlation coefficients. *Analyst*, 113(9), 1469-1471.
158. **Theodorsson, E.** (2012). Validation and verification of measurement methods in clinical chemistry. *Bioanalysis*, 4(3), 305-320.
159. **ISO.** 1998. Accuracy (trueness and precision) of measurement methods and results.
160. **IFPMA.** (2005). Validation of analytical procedures: text and methodology. *International Conference on Harmonization*, 1(20), 05.
161. **Organization, W. H.** (2001). *The World Health Report 2001: Mental health: new understanding, new hope*.
162. **Solberg, H. E. ve Gräsbeck, R.** (1989). Reference values. *Advances in clinical chemistry*, 27, 1-79.
163. **Gräsbeck, R.** (1984). Health and Disease from the Point of View of the Clinical Laboratory. İçinde L. Nordenfelt, B.I.B. Lindahl, (Ed.), *Health, Disease, and Causal Explanations in Medicine* ss. 47-60). Dordrecht: Springer Netherlands.
164. **Pincus, M.** (1996). Interpreting laboratory results: reference values and decision making. *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 74-91.
165. **Statland, B. E.** (1983). *Clinical decision levels for lab tests*. Medical Economics Books.
166. **Grasbeck, R.** (1969). Establishment and use of normal values. *Scand J Clin Invest Suppl*, 110, 11-15.
167. **Alstrom, T.** (1981). Evolution and nomenclature of the reference value concept. *Reference Values in Laboratory Medicine: The Current State of the Art* ss. 3-13): John Wiley & Sons, Chichester, England.
168. **Gräsbeck, R.** (1977). Reference values (formerly called normal values). *Chronobiologia*, 4(1), 59-61.
169. **Solberg, H.** (1988). International Federation of Clinical Chemistry (IFCC). Approved recommendation on the theory of reference values. Part 3.

- Preparation of individuals and collection of the specimens for the production of reference values. *Clin Chim Acta*, 177, S1-12.
170. **Sunderman Jr, F. W.** (1975). Current concepts of "normal values," "reference values," and "discrimination values" in clinical chemistry. *Clinical Chemistry*, 21(13), 1873-1877.
 171. **Dybkaer, R. ve Solberg, H.** (1987). Approved Recommendation (1987) on the Theory of Reference Values. *J Clin Chem Clin Biochem*, 25(9).
 172. **PetitClerc, C. ve Solberg, H.** (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 2. Selection of individuals for the production of reference values. *Clinica Chimica Acta*, 170(2-3), S1-S11.
 173. **Wayne, P.** (2008). CLSI Defining, Establishing, and Verifying Reference Intervals in the Clinical Laboratory-Approved Guideline. *CLSI Document EP28-A3C Third edition*.
 174. **Solberg, H. E. ve Stamm, D.** (1991). IFCC recommendation: the theory of reference values. part 4. Control of analytical variation in the production, transfer and application of reference values. *Journal of analytical methods in chemistry*, 13(5), 231-234.
 175. **Ozarda, Y.** (2020). Establishing and using reference intervals. *Turkish Journal of Biochemistry*, 45(1), 1-10.
 176. **Testa, S., Meijer, P., Lasne, D. ve Mullier, F.** (2022). Implementation of the new EUR IVD regulation and relation with ISO15189 accreditation: Guidance is urgently required for haemostasis testing. *International journal of laboratory hematology*, 44, 71-78.
 177. **Genzen, J. R.** (2019). Regulation of laboratory-developed tests: a clinical laboratory perspective. *Am J Clin Pathol*, 152(2), 122-131.
 178. **Spitzenberger, F., Patel, J., Gebuhr, I., Kruttwig, K., Safi, A. ve Meisel, C.** (2022). Laboratory-developed tests: design of a regulatory strategy in compliance with the International State-of-the-Art and the Regulation (EU) 2017/746 (EU IVDR [In Vitro Diagnostic Medical Device Regulation]). *Therapeutic innovation & regulatory science*, 56, 47-64.
 179. **Faulkner, W.** (1994). Reviews and Notes: Geriatrics: Geriatric Clinical Chemistry: Reference Values. *Annals of Internal Medicine*, 120(7), 624.
 180. **Dybkaer, R.** (1981). Observed values related to reference values. *Reference values in laboratory medicine New York: J Wiley Publishing Co*, 263-278.
 181. **Solberg, H.** (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 5. Statistical treatment of collected reference values. Determination of reference limits. *Clinica Chimica Acta*, 170(2-3), S13-S32.
 182. **JCGM, B.** 2012. JCGM 200: 2012 International Vocabulary of Metrology: Basic and General Concepts and Associated Terms (VIM). The Joint Committee for Guides in Metrology and The Bureau International des Poids et Mesures: Paris, France.
 183. **Alström, T., Gräsbeck, T. R., Lindblad, F. B., Solberg, H. E., Winkel, T. P. ve Viinikka, L.** (1993). Establishing reference values from adults: Recommendation on procedures for the preparation of individuals, collection of blood, and handling and storage of specimens. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation*, 53(6), 649-652.
 184. **Dybkaer, R.** (1987). Approved recommendation (1987) on the theory of reference values. Part 6. Presentation of observed values related to reference values. *Clinica Chimica Acta*, 170(2-3), S33-S41.

185. **Baadenhuijsen, H. ve C., S. J.** (1985). Indirect Estimation of Clinical Chemical Reference Intervals from Total Hospital Patient Data: Application of a Modified Bhattacharya Procedure. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 23(12), 829-840.
186. **Kouri, T., Kairisto, V., Virtanen, A., Uusipaikka, E., Rajamäki, A., Finneman, H., ve ark.** (1994). Reference intervals developed from data for hospitalized patients: computerized method based on combination of laboratory and diagnostic data. *Clinical Chemistry*, 40(12), 2209-2215.
187. **Solberg, H. E.** (1994). Using a hospitalized population to establish reference intervals: pros and cons. *Clinical Chemistry*, 40(12), 2205-2206.
188. **RM, T.** (1986). Interpretation of Clinical Laboratory Tests—Reference Values and Their Biological. *Western Journal of Medicine*:
189. **Ichihara, K., Boyd, J. C., Intervals, o. b. o. t. I. C. o. R. ve Limits, D.** (2010). An appraisal of statistical procedures used in derivation of reference intervals. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 48(11), 1537-1551.
190. **Healy, M. J.** (1979). Outliers in clinical chemistry quality-control schemes. *Clinical Chemistry*, 25(5), 675-677.
191. **Grubbs, F. E.** (1969). Procedures for Detecting Outlying Observations in Samples. *Technometrics*, 11(1), 1-21.
192. **Rousseeuw, P. J. ve Hubert, M.** (2011). Robust statistics for outlier detection. *Wiley interdisciplinary reviews: Data mining and knowledge discovery*, 1(1), 73-79.
193. **Dixon, W.** (1953). Processing data for outliers. *Biometrics*, 9(1), 74-89.
194. **Reed, A. H., Henry, R. J. ve Mason, W. B.** (1971). Influence of Statistical Method Used on the Resulting Estimate of Normal Range. *Clinical Chemistry*, 17(4), 275-284.
195. **Linnet, K.** (2000). Nonparametric Estimation of Reference Intervals by Simple and Bootstrap-based Procedures. *Clinical Chemistry*, 46(6), 867-869.
196. **Miro.** (2023). www.miro.com
197. BioRender. **BioRender App.** (2020).
198. **Wickham, H., François, R., Henry, L. ve Müller, K.** 2018. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 0.7. 6. Computer software] <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>.
199. **Wickham, H. ve Henry, L.** 2020. Tidy: Tidy messy data. R package version397.
200. **Wickham, H.** 2016. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag, New York. ISBN 978-3-319-24277-4.
201. **Van Rossum, G. ve Drake, F. L.** (1995). *Python reference manual*. Centrum voor Wiskunde en Informatica Amsterdam.
202. **Team, T. P. D.** 2020. pandas-dev/pandas: Pandas. latest ed: Zenodo; s.
203. **Harris, C. R., Millman, K. J., van der Walt, S. J., Gommers, R., Virtanen, P., Cournapeau, D., ve ark.** (2020). Array programming with NumPy. *Nature*, 585(7825), 357-362.
204. **Hunter, J. D.** (2007). Matplotlib: A 2D Graphics Environment. *Computing in Science & Engineering*, 9(3), 90-95.
205. **Waskom, M. L.** (2021). seaborn: statistical data visualization. *Journal of Open Source Software*, 6(60), 3021.
206. **McKinney, W.** (2010). Data Structures for Statistical Computing in Python. İçinde S. van der Walt, J. Millman (Editörler), *Proceedings of the 9th Python in Science Conference*, 2010 (s. 56-61).

207. **Hu, K., Li, Y., Ding, R., Zhai, Y., Chen, L., Qian, W., ve ark.** (2018). A simple, sensitive, and high-throughput LC-APCI-MS/MS method for simultaneous determination of vitamin K1, vitamin K1 2,3-epoxide in human plasma and its application to a clinical pharmacodynamic study of warfarin. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 159, 82-91.
208. **Gentili, A., Cafolla, A., Gasperi, T., Bellante, S., Caretti, F., Curini, R., ve ark.** (2014). Rapid, high performance method for the determination of vitamin K1, menaquinone-4 and vitamin K1 2,3-epoxide in human serum and plasma using liquid chromatography-hybrid quadrupole linear ion trap mass spectrometry. *J Chromatogr A*, 1338, 102-110.
209. **Arachchige, G. R. P., Thorstensen, E. B., Coe, M., O'Sullivan, J. M. ve Pook, C. J.** (2021). Absolute quantification of eleven A, D, E and K vitamers in human plasma using automated extraction and UHPLC-Orbitrap MS. *Analytica Chimica Acta*, 1181, 338877.
210. **Abro, K., Memon, N., Bhanger, M. I., Abro, S., Perveen, S. ve Laghari, A. H.** (2014). Determination of Vitamins E, D3, and K1 in Plasma by Liquid Chromatography-Atmospheric Pressure Chemical Ionization-Mass Spectrometry Utilizing a Monolithic Column. *Analytical Letters*, 47(1), 14-24.
211. **Klapkova, E., Cepova, J., Dunovska, K. ve Prusa, R.** (2018). Determination of vitamins K1, MK-4, and MK-7 in human serum of postmenopausal women by HPLC with fluorescence detection. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 32(5), e22381.
212. **Song, Q., Wen, A., Ding, L., Dai, L., Yang, L. ve Qi, X.** (2008). HPLC-APCI-MS for the determination of vitamin K1 in human plasma: Method and clinical application. *Journal of Chromatography B*, 875(2), 541-545.
213. **Kamao, M., Suhara, Y., Tsugawa, N. ve Okano, T.** (2005). Determination of plasma Vitamin K by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection using Vitamin K analogs as internal standards. *Journal of Chromatography B*, 816(1), 41-48.
214. **Sogabe, N., Tsugawa, N., Maruyama, R., Kamao, M., Kinoshita, H., Okano, T., ve ark.** (2007). Nutritional effects of γ -glutamyl carboxylase gene polymorphism on the correlation between the vitamin K status and γ -carboxylation of osteocalcin in young males. *Journal of nutritional science and vitaminology*, 53(5), 419-425.
215. **Riphagen, I. J., Molen, J. C. v. d., Faassen, M. v., Navis, G., Borst, M. H. d., Muskiet, F. A. J., ve ark.** (2016). Measurement of plasma vitamin K1 (phylloquinone) and K2 (menaquinones-4 and -7) using HPLC-tandem mass spectrometry. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (CCLM)*, 54(7), 1201-1210.
216. **Wittman, J. C., Grobbee, D. E., Valkenburg, H. A., van Hemert, A. M., Stijnen, T., Burger, H., ve ark.** (1994). J-shaped relation between change in diastolic blood pressure and progression of aortic atherosclerosis. *Lancet*, 343(8896), 504-507.

EKLER

EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ.....82

EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU.....84



EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ



EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

 BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ 1845	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			
	Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002	Yayın Tarihi: 17.09.2019	Revizyon No: 00	Revizyon Tarihi: .../.../.....

CALISMANIN ADI: K vitamini ölçüm metodunun geliştirilmesi ve referans aralığının belirlenmesi

Aşağıda bilgileri yer almakta olan bir araştırma çalışmasına katılmanız istenmektedir. Çalışmaya katılıp katılmama kararı tamamen size aittir. Katılmak isteyip istemediğinize karar vermeden önce araştırmanın neden yapıldığını, bilgilerinizin nasıl kullanılacağını, çalışmanın neleri içerdiğini, olası yararları ve risklerini ya da rahatsızlık verebilecek yönlerini anlamanız önemlidir. Lütfen aşağıdaki bilgileri dikkatlice okumak için zaman ayırınız. Eğer çalışmaya katılma kararı verirsiniz, **Çalışmaya Katılma Onayı Formu'nu** imzalayınız. Çalışmadan herhangi bir zamanda ayrılmakta özgürsünüz. Çalışmaya katıldığınız için size herhangi bir ödeme yapılmayacak ya da sizden herhangi bir maddi katkı/malzeme katkısı istenmeyecektir.

ÇALIŞMANIN KONUSU VE AMACI

İnsan kanındaki K vitamini seviyelerini belirlemek için ölçüm metodu geliştirilmesi ve referans aralığının belirlenmesi amaçlanmaktadır. Bu çalışma için 200 kadın ve 200 erkek olmak üzere toplamda 400 kişinin kan numunesinin kullanılması planlanmaktadır.

CALISMA İSLEMLERİ

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne başvuran hastalardan kan alma biriminde alınan kanların, poliklinik doktorları tarafından istenen parametreleri Tıbbi Biyokimya laboratuvarında günlük olarak rutin bir şekilde çalışılmaktadır. Bu numuneler işlemlerinin ardından tıbbi atık olarak imha edilmektedirler. Rutin laboratuvarında günlük hasta sonuçlarının belirlenmesinden sonra tıbbi atık olarak imha edilecek olan ve kriterlerimize uygun rutin klinik hasta serumlarının, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nden alınmış olan izin doğrultusunda kullanılması planlanmaktadır. Bu işlemler için hastalardan ekstra kan alımı olmayacaktır. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi kan alma biriminde alınan 5ml (1 tatlı kaşığı kadar) kan kullanılacaktır.

ÇALIŞMADA YER ALMAMIN YARARLARI NELERDİR?

Bu çalışma ile yerli K vitamini ölçüm metodu geliştirilmesi amaçlanmaktadır. Geliştirilen metod aracılığıyla K vitamini referans aralığı belirlenecektir. Böylece K vitamini eksikliğine bağlı hastalıkların erken tanısına katkı sağlanmış olacaktır.

BU ÇALIŞMAYA KATILMAMIN MALİYETİ NEDİR?

Çalışmaya katılmakla parasal yük altına girmeyeceksiniz ve size de herhangi bir ödeme yapılmayacaktır.

ÇALIŞMAYA KATILMALI MIYIM?

Bu çalışmada yer alıp almamak tamamen size bağlıdır. Şu anda bu formu imzalarsanız bile istediğiniz herhangi bir zamanda bir neden göstermeksizin çalışmayı bırakmakta özgürsünüz. Eğer katılmak istemez iseniz veya çalışmadan ayrılırsanız, araştırmacı tarafından sizin için en uygun tedavi planı uygulanacaktır. Aynı şekilde çalışmayı yürüten araştırmacı çalışmaya devam etmeniz için yararlı olmayacağına karar verebilir ve sizi çalışma dışı bırakabilir, bu durumda da sizin için en uygun tedavi seçilecektir.

 BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ 1849	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			
	Doküman Kodu: ÜNV-GOAEK-FRM-002	Yayın Tarihi: 17.09.2019	Revizyon No: 00	Revizyon Tarihi: .../.../.....

KİŞİSEL BİLGİLERİM NASIL KULLANILACAK?

Çalışma araştırmacınızın kişisel bilgilerinizi, araştırmayı ve istatistiksel analizleri yürütmek için kullanacaktır ancak kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır. Yalnızca gereği halinde, sizinle ilgili bilgileri etik kurullar ya da resmi makamlar inceleyebilir. Çalışmanın sonunda, kendi sonuçlarınızla ilgili bilgi istemeye hakkınız vardır. Çalışma sonuçları çalışma bitiminde tıbbi literatürde yayınlanabilecektir ancak kimliğiniz açıklanmayacaktır.

SORU VE PROBLEMLER İÇİN BAŞVURULACAK KİŞİLER:

ADI : Metin Demirel
GÖREVİ : Araştırma Görevlisi
TELEFON : 535 316 91 07

ÇALIŞMAYA KATILMA ONAYI

Yukarıdaki bilgileri ilgili araştırmacı ile ayrıntılı olarak tartıştım ve kendisi bütün sorularımı cevapladı. Bu bilgilendirilmiş olur belgesini okudum ve anladım. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorum ve bu onay belgesini kendi hür irademle imzalıyorum. Bu onay, ilgili hiçbir kanun ve yönetmeliği geçersiz kılmaz. Araştırmacı, saklamam için bu belgenin bir kopyasını çalışma sırasında dikkat edeceğim noktaları da içerecek şekilde bana teslim etmiştir.

Gönüllü Adı Soyadı		Tarih ve İmza	
Telefon			

Vasi (var ise) Adı Soyadı		Tarih ve İmza	
Telefon			

Görüşme Tanığı Adı Soyadı		Tarih ve İmza	
Telefon			

Araştırmacı Adı Soyadı		Tarih ve İmza	
Telefon			

- 1: Gönüllünün bilgilendirilme işlemine başından sonuna dek tamklık eden kişi
- 2: Gönüllüyü araştırma hakkında bilgilendiren kişi

ÖZGEÇMİŞ

Ad-Soyad : Metin Demirel

Doğum Tarihi ve Yeri :

E-posta :

ÖĞRENİM DURUMU:

- **Lisans** : 2015, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü
- **Yükseklisans** : 2018, Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Biyoloji Anabilim Dalı

MESLEKİ DENEYİM VE ÖDÜLLER:

- 2017-Halen Araştırma Görevlisi, Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi

DOKTORA TEZİNDEN TÜRETİLEN YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Demirel M. ve Selek Ş. (2022)**. K Vitamini Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi Ve Referans Aralığının Belirlenmesi. *Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 // 33. Ulusal Biyokimya Kongresi*, October 26-30, İzmir, Türkiye.
- **Demirel M. ve Selek Ş.** Measurement of vitamin K and its derivatives in human plasma through enzyme-assisted liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay. *European Journal of Mass Spectrometry*. 2023;0(0). doi:10.1177/14690667231183046

DİĞER YAYINLAR, SUNUMLAR VE PATENTLER:

- **Demirel, M., Yılmaz S. ve Selek Ş. (2018)**. Investigation of Trace Element and Oxidative Stress Parameters in Patients with Oral Glucose Tolerance Test. *Union of Thrace Universities 2nd International Health Sciences Congress*, November 15-17, Tekirdağ, Türkiye
- **Cağlar, H. G., Selek, S., Koktasoglu, F., Koyuncu, I., Demirel, M., Sarikaya, A. ve Meydan, S. (2019)**. Effect of *Camellia sinensis*, *Hypericum perforatum* and *Urtica dioica* on kidney and liver injury induced by carbon tetrachloride in rats. *Cellular and Molecular Biology*, 65(5), 79–86.
- **Koktasoglu, F., Cağlar, H. G., Sarikaya, A., Demirel, M., Gul, A. Z. ve Selek, S. (2019)**. New Zinc Assay For Automated Clinical Chemistry Analyzers.

- **Caglar, H. G., Koktasoglu, F., Sarikaya, A., Demirel, M., Gul, A. Z. ve Selek, S. (2019).** New Copper Assay For Automated Clinical Chemistry Analyzers. *Clinica Chimica Acta*, 493, S632.
- **Fahri, A., Metin, D., Ahmet, O. ve Sahabettin, Ş., (2021).** Molecular Cloning And Characterization Of Nad(+) Dependent Isocitrate Dehydrogenase Enzyme From Shewanella Putrefaciens. *Research Journal Of Biotechnology* , Vol.16, No.10, 78-86.
- **Demirel, M., Selek, Ş., Yıldız, T., Sönmez, R., Gül, A. Z., Sarıkaya, U. ve Köktaşoğlu, F.(2022).** Serum Reference Intervals Of Zinc And Copper In Healthy Subjects Of Turkey Population . *Euromedlab Munich 2021* (Pp.913). Munich, Germany
- **Demirel, M., Selek, Ş., Gül, A. Z., Köktaşoğlu, F., Sarıkaya, U., Yıldız, T. ve Dulun Ağaç, H.(2022).** G6pd And Gapdh As Potential Diagnostic Biomarkers For Iron Deficiency Anemia . *Euromedlab Munich 2021* (Pp.502). Munich, Germany
- **Köktaşoğlu, F., Demirel, M., Gül, A. Z., Elçioğlu, Ö. C., Aris, Ö. ve Selek, Ş., (2022).** Metabolic Profiling Study In Serum Of Patients With Polycystic Kidney Disease And Chronic Kidneydisease Based On 1H Nmr Spectroscopy. *Euromedlab-2021* (Pp.585). Munich, Germany
- **Gül, A. Z., Selek, Ş., Gören, A. C., Demirel, M., Köktaşoğlu, F., Dulun Ağaç, H. ve Sarıkaya, U.(2021).** Serum Metabolome Analysis Of Iron Deficiency Anemia Patients Using Nuclear Magnetic Resonance (Quantitative Approach) . *24th Ifcc-Eflm European Congress Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine* (Pp.103). Munich, Germany
- **Toruntay, C., Korkmaz, N. D., Selek, Ş., Gül, A. Z., Demirel, M., Sarıkaya, U. ve Akbaş, F.(2021).** Production Of Fumarase Enzyme From Shewanella Putrefaciens Bacteria And Utilization In Biochemical Diagnostic Kits . *17. Tıbbi Biyoloji Ve Genetik Kongresi* (Pp.114-115). İstanbul, Turkey
- **Gul, A. Z., Atakul, N., Selek, Ş., Atamer, Y., Sarıkaya, U., Yıldız, T. ve Demirel, M.(2022).** Maternal Serum Levels Of Zinc, Copper, And Thiols In Preeclampsia Patients: A Case-Control Study. *Biological Trace Element Research* , Vol.200, No.2, 464-472.
- **Sarikaya, U., Meydan, S., Selek, Ş., Sarikaya, A., Demirel, M., Gül, A. Z. ve Yildiz, T. (2022).** Could The Pon1 Phenotype Play A Key Role In Insulin Resistance?. *International Journal Of Diabetes In Developing Countries* , Vol.42, No.2, 1-6.
- **Değer, B., Çakıcı, Ç., Güngör, Z. B., Tunç, T., Büyüksulu, N. ve Demirel, M., (2022).** Tip 2 Diyabetli Hastalarda; Antioksidan Mineraller Ve Oksidatif Stresin Anksiyete İle İlişkisi . *Uluslararası Biyokimya Kongresi 2022 // 33. Ulusal Biyokimya Kongresi*, İzmir, Turkey
- **Demirel, M., Gul, A. Z., Koktasoglu, F., Agac, H., Goren, A. C., Karatoprak, C. ve Selek, S. (2023).** 1h Nmr Spectroscopy-Based Serum Metabolomics Analysis Of Iron Deficiency Anemia. *Journal of Chemical Metrology*
- **Demirel, M., Selek, Ş., Yildiz, T., Sönmez, R. ve Gül, A. Z. (2023).** Determination Of Serum Reference Intervals For Zinc And Copper. *Romanian Journal Of Diabetes Nutrition And Metabolic Diseases*, 30(1), 42-47.
- **Selek, S., Gul, A. Z., Atakul, N., Meydan, S., Sarıkaya, U., Koktasoglu, F. ve Demirel, M. (2023).** Investigation of serum enzyme activities and oxidative stress markers in preeclampsia: a multiparameter analysis. *Ginekologia polska*, 10.5603/GP.a2022.0062.

- **Demirel, M., Köktaşoğlu, F., Özkan, E., Ağaç, H., Gül, A.Z., Sharifov, R., Sarıkaya, U., Başaranoğlu, M. ve Selek, Ş. (2023).** Mass Spectrometry-Based Untargeted Metabolomics Study of Non-Obese Individuals with Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*.

