

TIBBİ BİYOKİMYA DOKTORA PROGRAMI

2023

1. M**** D***** K Vitamini Ölçüm Metodunun Geliştirilmesi Ve Referans Aralığının Belirlenmesi

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 farklıdır. 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, doğrusalılık, 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 çökeltisi oluşması 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