



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

*«Προσδιορισμός βιταμίνης D: Σύγκριση ανοσολογικής μεθόδου
Liaison® με νέα χρωματογραφική μεθοδολογία με εν σειρά
εκχύλιση στερεάς φάσεως»*

Χρήστος Αλ. Κρητικός

-ΛΑΡΙΣΑ 2016-



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ

ΕΦΑΡΜΟΣΜΕΝΗ ΔΗΜΟΣΙΑ ΥΓΕΙΑ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗ ΥΓΙΕΙΝΗ:
ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΑΣΦΑΛΕΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΥΔΑΤΩΝ & ΔΗΜΟΣΙΑ
ΥΓΕΙΑ

ΤΙΤΛΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ:

*«Προσδιορισμός βιταμίνης D: Σύγκριση ανοσολογικής μεθόδου
Liaison® με νέα χρωματογραφική μεθοδολογία με εν σειρά
εκχύλιση στερεάς φάσεως»*

Χρήστος Αλ. Κρητικός

-ΛΑΡΙΣΑ 2016-

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

- Ανδρέας Τσακάλωφ (Αν. Καθηγητής Π.Θ., Επιβλέπων)
- Δημήτριος Φλετούρης (Αν. Καθηγητής Α.Π.Θ.)
- Γεώργιος Ζαχαριάδης (Καθηγητής Α.Π.Θ.)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Εισαγωγή: Η συγκέντρωση της 25(OH)D -25υδροξυβιταμίνης D- στο πλάσμα/ορό είναι ένας σοβαρός δείκτης εκτίμησης της κατάστασης της βιταμίνης D στο ανθρώπινο σώμα και συνεπώς σημαντικός για την διάγνωση και την θεραπεία ασθενειών και καταστάσεων που σχετίζονται με την ανεπάρκεια βιταμίνης D. Υπάρχουν πολλές προσεγγίσεις για την ποσοτικοποίηση της 25(OH)D και στην εργασία αυτή συγκρίνουμε τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ευρέως χρησιμοποιημένη ανοσολογική μέθοδο DIASORIN LIAISON και την νέα μέθοδο UHPLC.

Υλικά: 25 δείγματα ορού επιλέχθηκαν τυχαία για την μέτρηση της βιταμίνης D. Τα δείγματα αναλύθηκαν με ανοσολογική χημειοφωταύγεια από την LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL και με την on-line εκχύλιση στερεάς φάσης UHPLC για τη βιταμίνη D. Η ανοσολογική τεχνική και η ανάλυση με την UHPLC διεξήχθησαν στο LIAISON ANALYSER και τον DIONEX Ultimate 3000 UHPLC αντίστοιχα. Η ανάλυση με Passing-Bablok και το διάγραμμα Bland-Altman χρησιμοποιήθηκαν για την σύγκριση των μεθόδων.

Αποτελέσματα: Το εύρος των μετρήσεων για την συγκέντρωση της 25(OH)D κυμαινόταν από 7,9 ng/ml έως 39,6 ng/ml στην ανοσολογική μέθοδο και από 5,13 ng/ml έως 37,19 ng/ml όπως μετρήθηκαν με την UHPLC. Η συγκέντρωση που προέκυψε από τις δύο διαφορετικές μεθόδους έχει ισχυρή συσχέτιση (Pearson's $R= 0,802$) με πανομοιότυπη διαγνωστική κατηγοριοποίηση τόσο της ανεπάρκειας (<20 ng/ml), όσο και της επάρκειας (>20 ng/ml) για το 96% των δειγμάτων. Ωστόσο, υπάρχει ένα μικρό συστηματικό σφάλμα μεταξύ των δύο μεθόδων, το οποίο υπολογίστηκε από το διάγραμμα Bland-Altman με μέση διαφορά Liaison - HPLC περίπου -3,8 ng mL⁻¹. Αυτή η μέση διαφορά ίσως να μην είναι τόσο κλινικά σημαντική, αλλά η τυπική απόκλιση SD της μέσης τιμής (SD= ±5.5ng mL⁻¹) δείχνει ότι για ορισμένα δείγματα οι δύο μέθοδοι μπορεί να έχουν αποτελέσματα τα οποία θα είναι αντιφατικά και έτσι μερικά δείγματα να μπορούν να διαγνωσθούν με ήπια ανεπάρκεια από την μία μέθοδο και με επάρκεια από την άλλη. Αυτό όντως συνέβη σε ένα συγκεκριμένο δείγμα στην μικρή πιλοτική μελέτη μας, όπου στο συγκεκριμένο δείγμα διαγνώσθηκε οριακή ανεπάρκεια με την ανοσολογική μέθοδο (18,5 ng/ml), ενώ με την UHPLC διαγνώσθηκε επάρκεια (25,9

ng/ml). Σύμφωνα με την ανάλυση Passing-Bablok τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων μπορούν να αναλυθούν μέσω της γραμμικής εξίσωσης $y = 4,69 + 0,6167x$ με το 95% CI (Confidence Interval-Διάστημα Εμπιστοσύνης) να κυμαίνεται για την τομή από -1,919 έως 8,715 και για την κλίση από 0,4633 έως 0,8976. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι δεν υπάρχει σταθερή διαφορά, αλλά υπάρχει σημαντική αναλογική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

ABSTRACT

Introduction. The concentration of 25-hydroxyvitamin D in plasma/serum is an optimal indicator of vitamin D status in human body and thus important for the diagnosis and treatment of diseases and conditions related to vitamin D deficiency. There are multiple approaches for the 25(OH)D quantification and here we compare results acquired by widely applied DIASORIN LIAISON immunoassay and new UHPLC methods.

Materials. 25 serum samples were randomly selected for routine vitamin D test. The samples were analyzed by LIAISON® 25 OH Vitamin D TOTAL chemiluminescent immunoassay and by UHPLC with on-line vitamin D Solid Phase Extraction. Immunoassay and UHPLC analysis were conducted on LIAISON® Analyzer and DIONEX Ultimate 3000 UHPLC respectively. Passing –Bablok analysis and Bland-Altman plot were used to compare methods. Inter-rater agreement was analyzed using kappa (k) analysis.

Results. The concentration acquired by two different methods are moderately correlated ($R= 0,64$) with identical diagnostical categorization of inadequacy ($< 20\text{ng mL}^{-1}$) vs sufficiency ($>20\text{ng mL}^{-1}$) was in 88% of the samples. One sample can be qualified as borderline by both approaches – 20ng mL^{-1} by UPLC and 18ng mL^{-1} by CPBA. However there is systematic bias between two methods which can be seen from Bland-Altman plot with mean difference HPLC-CPBA about $3,5 \text{ ng mL}^{-1}$. This mean difference may not be so much clinically significant, but SD of the mean ($SD= \pm 6.3\text{ng mL}^{-1}$) indicates that for some samples the two methods can generate contradictive results and some samples can be diagnosed as insufficient by one method and sufficient by the other (fig. 3, A). This actually took place in our small pilot study for two samples (fig. 2, A) where insufficiency was diagnosed by CPBA (7 and 10 ng mL^{-1}) while UHPLC testified for borderline sufficiency (20 and 22 ng mL^{-1} respectively).

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να ευχαριστήσω πρώτα από όλους τον καθηγητή μου Κο Ανδρέα Τσακάλωφ ο οποίος είχε ουσιαστική συμβολή στην εκπόνηση της παρούσας διπλωματικής όντας στο πλευρό μου, με πολύ υπομονή, καθ' όλη τη διάρκειά της. Συνέβαλε ουσιαστικά τόσο στην επίλυση διαφόρων θεμάτων που προέκυπταν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων, όσο και με τις παρατηρήσεις και τις διορθώσεις επί του κειμένου κατά τη συγγραφή της διπλωματικής μου εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κα Μαρίνα Χατζηνίκου για τη πολύτιμη βοήθεια της στην εκμάθηση και εξοικείωση με τον εξοπλισμό κατά το πρώτο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας.

Ακόμα το επιστημονικό προσωπικό του εργαστηρίου «ΒΙΟΦΟΡΜΑ» στη Νέα Ιωνία Αττικής για την άψογη συνεργασία μας κατά το δεύτερο σκέλος της πειραματικής διαδικασίας.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στην οικογένεια μου, στους συνεργάτες μου και στους φίλους μου, οι οποίοι με στήριξαν καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου, ιδιαίτερος δε στον φίλο, συνάδελφο βιοχημικό Ευάγγελο Τσιγαρίδα με τον οποίο έχουμε κοινή επιστημονική πορεία και επαφή από τα πρώτα χρόνια της προπτυχιακής μας περιόδου.-

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

25(OH)D	25-υδροξυβιταμίνη D
1,25[OH] ₂ D	1,25 διυδροξυβιταμίνη D
VDR	Vitamin D Receptors
PTH	παραθορμόνη
CRP	C-αντιδρώσα πρωτεΐνη
NOD	nonobese diabetic
HPLC	high-performance liquid chromatography
RIA	radioimmunoassay
HAAA	Human anti-animal antibodies
GCMS	gas chromatography mass spectrometry
CLIA	ChemiLuminiscent ImmunoAssays
EIA	Enzyme immunoassays
LC-MS/MS	Liquid chromatography–mass spectrometry
P-A	Passing-Bablok
B-A	Bland-Altman

Περιεχόμενα

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	- 1 -
1.1 Βιταμίνη D.....	- 1 -
1.1.1 Ιστορική αναδρομή Βιταμίνης D.....	- 1 -
1.1.2 Γενικά στοιχεία για τη Βιταμίνη D	- 3 -
1.1.3 Χημική δομή των βιταμινών D2 /D3.....	- 4 -
1.1.4 Βιοχημεία και μεταβολισμός Βιταμίνης D.....	- 5 -
1.1.5 Βιταμίνη D και ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία.....	- 5 -
1.1.6 Βιταμίνη D και Διατροφή	- 7 -
1.1.7 Δράση Βιταμίνης D.....	- 9 -
1.1.8 Προσδιορισμός της κατάστασης της βιταμίνης D στον άνθρωπο.....	- 12 -
1.1.9 Σημασία της έλλειψης βιταμίνης D στον άνθρωπο.....	- 13 -
1.1.10 Εκτίμηση επιπέδων βιταμίνης D.....	- 16 -
1.1.11 Φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D	- 17 -
1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D	- 19 -
1.2.1 Ιστορική αναδρομή για την μέτρηση της βιταμίνης D	- 19 -
1.2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι μέτρησης Βιταμίνης D	- 21 -
1.2.3 Απόδοση ανοσολογικών μεθόδων μέτρησης Βιταμίνης D της εκάστοτε εταιρίας -	24 -
1.2.4 Ακρίβεια των ανοσολογικών μεθόδων μέτρησης της βιταμίνης D	- 26 -
1.2.5 Υγρή Χρωματογραφία.....	- 28 -
1.2.6.Συγκριτικά οι μέθοδοι μέτρησης της βιταμίνης D.....	- 31 -
2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	- 34 -
2.1 Είδη χρωματογραφίας	- 34 -
2.2 HPLC - Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης	- 35 -
2.2.1 Είδη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC).....	- 37 -
2.2.2 HPLC και σημαντικότερα μέρη (εξαρτήματα) που την αποτελούν	- 39 -
2.3 Μέθοδος Μέτρησης Diasorin LIAISON 25OH Vitamin D Total assay	- 43 -
2.3.1 Αρχή διαδικασίας LIAISON 25OH Vitamin D Total assay	- 44 -

2.3.2 Υλικά.....	- 44 -
2.3.3 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων.....	- 45 -
2.3.4 Διαδικασία Ανάλυσης.....	- 46 -
2.3.5 Εύρος τιμών μέτρησης.....	- 46 -
2.3.6 Αναμενόμενες τιμές.....	- 47 -
2.3.7 Λειτουργική ευαισθησία.....	- 47 -
2.3.8 Αληθινότητα.....	- 47 -
2.3.9 Ειδικότητα.....	- 48 -
2.3.10 Παρεμβαλλόμενες ουσίες.....	- 49 -
2.4 Σύγκριση μεθόδων και σκοπός της σύγκρισης.....	- 50 -
2.4.1 Ανάλυση δεδομένων κατά την σύγκριση των μεθόδων.....	- 51 -
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	- 58 -
3.1 Ανάλυση Passing – Bablok.....	- 59 -
3.2 Ανάλυση Bland – Altman.....	- 60 -
4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	- 62 -
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 64 -

1. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Βιταμίνη D

1.1.1 Ιστορική αναδρομή Βιταμίνης D

Για αρκετούς αιώνες ήταν γνωστές πολλές ασθένειες, όπως για παράδειγμα η ραχίτιδα, η νόσος μπέρι-μπέρι και το σκορβούτο. Παρόλα αυτά η αιτιολογία των ασθενειών αυτών παρέμενε ασαφής μέχρι την έλευση του εικοστού αιώνα. Κατά την διάρκεια του δεκάτου ενάτου αιώνα διαμορφώθηκε η αντίληψη ότι υφίσταται κάποιου είδους συσχέτιση ανάμεσα στις ασθένειες αυτές και στην διατροφή(1). Για την επαλήθευση αυτής της υπόθεσης έλαβαν μέρος πολλά πειράματα, όπου διαφοροποιούνταν τα ποσοστά των συγκεντρώσεων των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του λίπους στην διατροφή για να παρατηρήσουν εάν επέρχεται ίαση. Παρότι τα πειράματα αυτά επί της ουσίας δεν έβγαλαν κάποιο αποτέλεσμα σχετικά με αιτιολογική σχέση των συγκεντρώσεων των υδατανθράκων, των πρωτεϊνών και του λίπους με την ίαση των ασθενειών αυτών, είχε γίνει το ένα πρώτο βήμα για τη διερεύνηση της συσχέτισης της διατροφής με την αιτιολογία των ασθενειών αυτών. (1).

Σε μεταγενέστερο χρόνο οι Hoist και Frohlich παρατήρησαν ότι στους ναυτικούς θεραπεύονταν το σκορβούτο όταν αυτοί καταναλώνανε εσπεριδοειδή φρούτα. Οδηγήθηκαν λοιπόν στο συμπέρασμα ότι μία ουσία που περιεχότανε στα συγκεκριμένα φρούτα είτε εμπόδιζε την εμφάνιση του σκορβούτου είτε βοηθούσε στη θεραπεία του. Έτσι για πρώτη φορά έχουμε την εμφάνιση των βιταμινών, μίας ιδέας του Funk(2), ο οποίος οραματίστηκε μια σημαντική αμίνη, ‘vital amine’, που έπρεπε να είναι παρούσα στα φαγητά και η οποία ήταν υπεύθυνη για την ευεξία, την υγεία και την επιβίωση. Μετά την εισαγωγή της νέας αυτής έννοιας των βιταμινών, είχαμε την πραγματοποίηση στοχευμένων πειραμάτων τα οποία είχαν ως απόρροια την ανακάλυψη διαφόρων παραγόντων που εμπόδιζαν την εμφάνιση ασθενειών όπως η μπέρι-μπέρι και το σκορβούτο. Οι παράγοντες αυτοί που πλέον ονομάστηκαν βιταμίνες και παρατηρήθηκε ότι η απουσία της βιταμίνης A ήταν υπεύθυνη για την ασθένεια μπέρι-μπέρι και η απουσία της βιταμίνης C για το σκορβούτο. Πρωτοπόρος στον τομέα αυτό αλλά και

επικεφαλής των πειραμάτων ήταν ο καθηγητής Elmer McCollum σε συνεργασία με τον καθηγητή Harry Steenbock που στηρίχτηκαν στην ιδέα του Funk και έδωσαν την εν λόγω ονομασία στους παράγοντες που μόλις είχαν ανακαλυφθεί(1, 3-5).

Εν συνεχεία, η βιταμίνη η οποία ανακαλύφθηκε ήταν η βιταμίνη D και η ασθένεια η οποία μελετήθηκε για να οδηγηθούμε στην ανακάλυψη της βιταμίνης D ήταν η ραχίτιδα. Η ραχίτιδα ήταν μία ασθένεια με μεγάλο επιπολασμό στο Ηνωμένο Βασίλειο και ιδιαιτέρως στην Σκωτία, τόσο μεγάλο που είχε ως απόρροια η ασθένεια αυτή να μείνει γνωστή ως η ασθένεια των Άγγλων(1). Μετά την ανακάλυψη των βιταμινών A και C, επικράτησε η θεωρία ότι και στην ραχίτιδα η έλλειψη διατροφικών παραγόντων ήταν η αιτιολογία που οδηγούσε στην ασθένεια. Ο καθηγητής που μελέτησε την ασθένεια ήταν ο Sir Edward Mellanby και στηρίχθηκε στο έργο του McCollum για να μελετήσει και να θεραπεύσει την ασθένεια(6, 7). Στα πειράματα του χρησιμοποίησε σκύλους ως πειραματόζωα και ευφυώς χρησιμοποίησε τις διατροφικές συνήθειες των κατοίκων της Σκωτίας για να επιφέρει την ραχίτιδα στα σκυλιά, τα οποία τα κράτησε εσώκλειστα. Όντως τα σκυλιά ανέπτυξαν ραχίτιδα, την ασθένεια που ήταν πανομοιότυπη και στους ανθρώπους. Με την αλλαγή της διατροφής στα σκυλιά και την χρησιμοποίηση μωρουνέλαιου (που προέρχεται από το σπυρμάκι του βακαλάου) μπόρεσε να επιφέρει ίαση και για τον λόγο αυτό υπέθεσε ότι η έλλειψη της βιταμίνης A, και στην περίπτωση της ραχίτιδας, ήταν υπεύθυνη για την εμφάνιση της ασθένειας(6-10). Έπειτα ο McCollum θέλοντας να επιβεβαιώσει την θεωρία του Sir Mellanby πραγματοποίησε πειράματα για να διασταυρώσει εάν όντως η έλλειψη βιταμίνης A ήταν υπεύθυνη για την εμφάνιση της ραχίτιδας. Για να επαληθεύσει την θεωρία επανέλαβε τα πειράματα, με την διαφορά ότι στο μωρουνέλαιο που χρησιμοποίησε η βιταμίνη A είχε αλλοιωθεί με τη μέθοδο της διοχέτευσης οξυγόνου. Στα πειράματα του διαπίστωσε ότι η αλλοιωμένη βιταμίνη A όντως δεν μπορούσε να θεραπεύσει ασθένειες που οφειλόταν στην έλλειψή της. Παρόλα αυτά θεραπεύονταν και πάλι η ραχίτιδα. Έτσι ο McCollum κατάλαβε ότι ένας διαφορετικός παράγοντας ήταν υπεύθυνος για την ίαση της ραχίτιδας και όχι η βιταμίνη A. Γι' αυτό συμπέρανε ότι ο παράγοντας που θεραπεύει την ραχίτιδα είναι μία νέα βιταμίνη την οποία ονόμασε βιταμίνη D(1, 4).

Η βιταμίνη D λοιπόν βρέθηκε ότι όταν είναι σε επάρκεια στον οργανισμό μέσω της σωστής διατροφής μπορεί να θεραπεύσει πλήρως την ραχίτιδα. Επιπροσθέτως άλλες μελέτες πάνω στην ραχίτιδα έδειξαν ότι η ίαση μπορεί να επέλθει ακόμα και εάν παιδιά τα οποία υποφέρουν από ραχίτιδα εκτεθούν το καλοκαίρι στην ηλιακή ακτινοβολία ή σε

τεχνητή UV ακτινοβολία. Αυτές οι νέες μελέτες προκάλεσαν επιπλέον ερωτήματα και προβληματισμό για την δράση της βιταμίνης D. Τότε ο καθηγητής Steenbock επανέλαβε νέο κύκλο πειραμάτων χρησιμοποιώντας ως πειραματόζωα αίγες, όπου παρατήρησε ότι κατά την διάρκεια του καλοκαιριού, οπότε και οι αίγες ήταν στο ύπαιθρο, δεν υπέφεραν από ραχίτιδα και τα επίπεδα ασβεστίου στα ζώα ήταν πάνω από τα φυσιολογικά όρια σε αντίθεση με τον χειμώνα που βρισκότανε εσώκλειστες και παρατηρούταν εμφάνιση ραχίτιδας και τα επίπεδα ασβεστίου ήταν κάτω από τα φυσιολογικά όρια. Με τον τρόπο αυτό ο καθηγητής Steenbock για πρώτη φορά έκανε την συσχέτιση της βιταμίνης D με την ηλιακή ακτινοβολία(1).

1.1.2 Γενικά στοιχεία για τη Βιταμίνη D

Αρχικά η πραγματική ταυτοποίηση της δομής της βιταμίνης D δεν ήταν δυνατή. Στη συνέχεια με την πάροδο του χρόνου και με την βοήθεια της τεχνολογίας ανακαλύφθηκε ότι με τον όρο βιταμίνη D εννοούμε τις δύο μορφές του μορίου. Η πρώτη μορφή βιταμίνης D που απομονώθηκε και ταυτοποιήθηκε ήταν η D₂ το 1932. Έπειτα το 1937 ανακαλύφθηκε και ταυτοποιήθηκε μία ακόμη μορφή της βιταμίνης D, η D₃, αφού πρώτα έγινε εφικτή η απομόνωση της 7-δεϋδροχοληστερόλη. Η συσχέτιση της 7 – δεϋδροχοληστερόλης με τη D₃ έγκειται στο γεγονός ότι η βιταμίνη D₃ είναι μία φυσική μορφή της βιταμίνης D που σχηματίζεται στο δέρμα με την δράση του ηλιακού φωτός (της υπεριώδους ακτινοβολίας) πάνω σε ένα παράγωγο της χοληστερόλης, την 7-δεϋδροχοληστερόλη όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως(11-14).

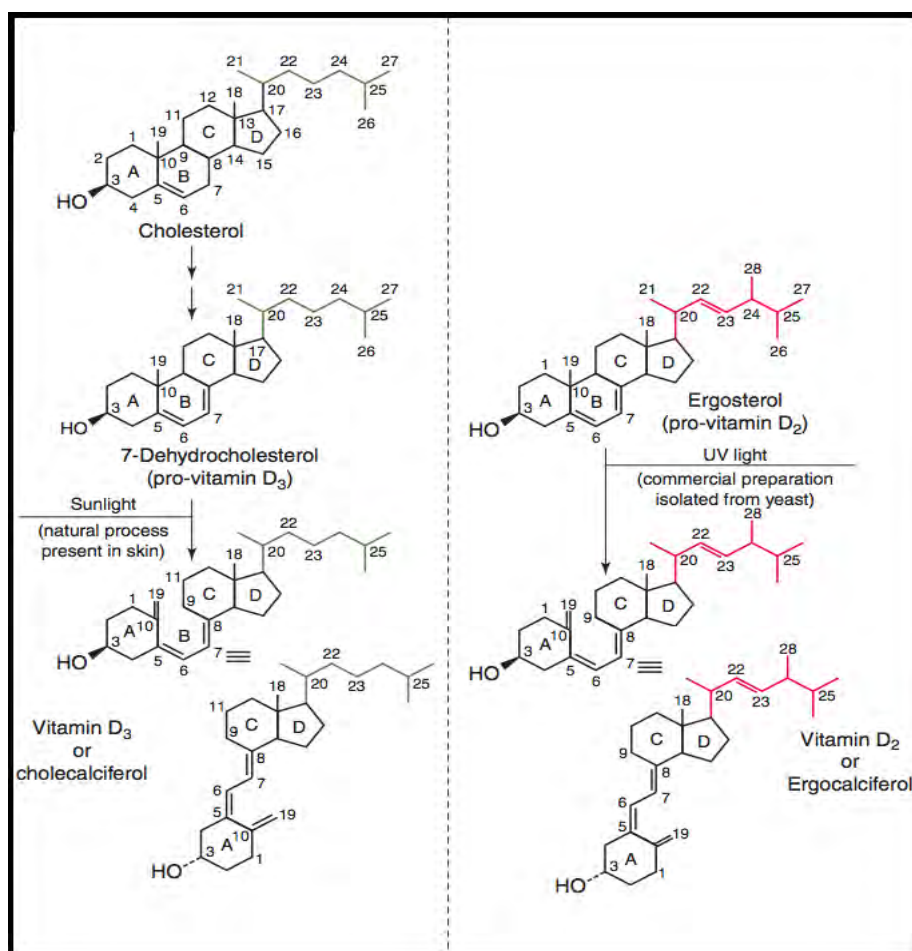
Η βιταμίνη D₂ ονομάζεται και εργοκαλσιφερόλη ενώ η βιταμίνη D₃ ονομάζεται χοληκαλσιφερόλη. Η χοληκαλσιφερόλη είναι και η μορφή της βιταμίνης D που συναντούμε στην διατροφή και η οποία επίσης συναντάται και με την ονομασία καλσιόλη. Η εργοκαλσιφερόλη και η χοληκαλσιφερόλη έχουν πανομοιότυπη βιολογική λειτουργία και υφίστανται πανομοιότυπο μεταβολισμό(11, 14).

Η κύρια λειτουργία της βιταμίνης D είναι η ρύθμιση της απορρόφησης και της ομοιόστασης τόσο του ασβεστίου, όσο και του φωσφόρου από το έντερο, ιχνοστοιχεία τα οποία είναι σημαντικά για την διατήρηση της ομοιόστασης ενός οργανισμού. Ο τρόπος δράσεως της βιταμίνης D είναι μέσω της γονιδιακής ρύθμισης η οποία ασκείται μέσω πυρηνικών υποδοχέων(3).

1.1.3 Χημική δομή των βιταμινών D2 /D3

Οι βιταμίνες D ανήκουν στα στεκοστεροειδή (με τον όρο στεκοστεροειδή αναφέρουμε στεροειδή στα οποία έχει σπάσει ένας δακτύλιος και είναι μία υποκατηγορία στεροειδών). Είναι λοιπόν αντιληπτό ότι οι βιταμίνες D δεν είναι αυστηρά βιταμίνες, αλλά κατατάσσονται στη κατηγορία των ορμονών, καθώς δε προσλαμβάνονται κατά κύριο λόγο με εξωτερικά με τη διατροφή, αλλά παράγονται από τον ίδιο τον οργανισμό μέσω μιας σειράς διεργασιών που πραγματοποιούνται όταν υπάρχει η παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας.

Το χημικό μόριο της γενικής δομής της βιταμίνης D φαίνεται στην εικόνα παρακάτω (Εικόνα 1). Φαίνεται να περιέχει τους δακτυλίους A, B, C και D, όπου σε κάθε μία από τις δύο μορφές έχουμε και διαφορετικές πλευρικές αλυσίδες.



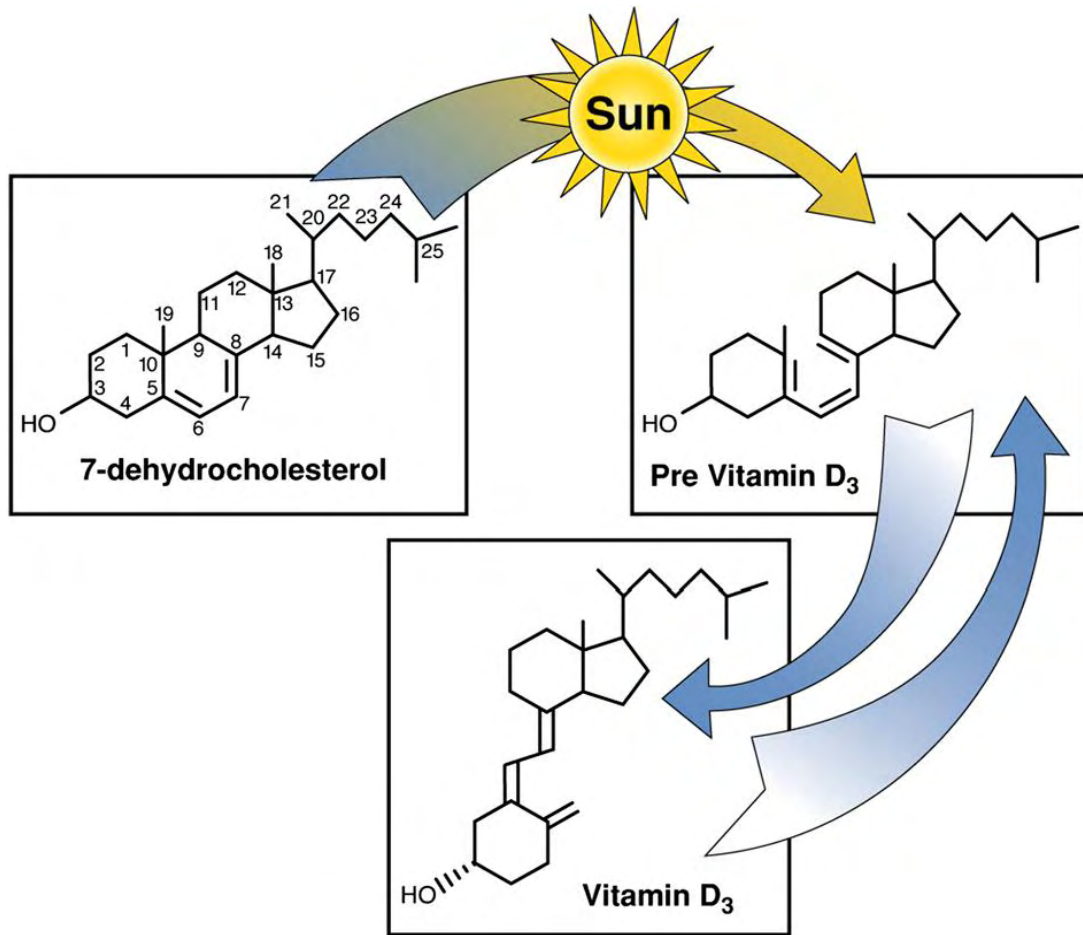
Εικόνα 1 - Δομή της χοληστερόλης, της 7-δευδροχοληστερόλης, της χοληκαλσιφερόλης, της εργοστερόλης και τέλος της εργοκαλσιφερόλης και οι δομικές σχέσεις μεταξύ τους. Η χημική ένωση της χοληκαλσιφερόλης και της εργοκαλσιφερόλης είναι ισότιμες(15).

1.1.4 Βιοχημεία και μεταβολισμός Βιταμίνης D

Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω οι δύο μορφές της βιταμίνης D συναντώνται στον οργανισμό με δύο τρόπους. Η βιταμίνη D₃ συναντάται στον οργανισμό κυρίως μέσω της διεργασίας που πραγματοποιείται στο δέρμα, με τη συμβολή της ηλιακής ακτινοβολίας, αλλά και μέσω της διατροφής και η βιταμίνη D₂ που προέρχεται αποκλειστικά από την διατροφή. Και οι δύο αυτές μορφές υφίστανται δύο διαδοχικές υδροξυλιώσεις. Η πρώτη λαμβάνει μέρος στο ήπαρ όπου έχουμε τον σχηματισμό της 25(OH)D (25-υδροξυβιταμίνη D) και εν συνεχεία έχουμε την δεύτερη υδροξυλίωση που λαμβάνει χώρα στους νεφρούς όπου εκεί έχουμε τον σχηματισμό της 1,25[OH]₂D (1,25 διυδροξυβιταμίνη D). Η τελευταία είναι αυτή που θεωρείται η ενεργή μορφή της βιταμίνης D και λειτουργεί ως στεροειδής ορμόνη. Επιπροσθέτως η μετατροπή (υδροξυλίωση) της 25(OH)D σε 1,25[OH]₂D μπορεί να γίνει και στα κερατινοκύτταρα του δέρματος, σε μικρότερο βαθμό(4, 16).

1.1.5 Βιταμίνη D και ηλιακή (υπεριώδης) ακτινοβολία

Είναι πλέον γνωστό ότι η βιταμίνη D δε λαμβάνεται στον οργανισμό αποκλειστικά από την διατροφή αλλά κυρίως σχηματίζεται στο δέρμα με την βοήθεια της ηλιακής ακτινοβολίας και πιο συγκεκριμένα από την υπεριώδη ακτινοβολία σε μήκη κύματος που κυμαίνονται από 280 έως και 350 nm. Κάτω υπό κανονικές συνθήκες η συντριπτική πλειοψηφία της βιταμίνης D, σε ποσοστό που κυμαίνεται στο 90%, προέρχεται από την ενδογενή σύνθεση της στο δέρμα κάτω από την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας. Η ηλιακή ακτινοβολία πυροδοτεί την φωτόλυση της 7-δευδροχοληστερόλης (που είναι η προ-βιταμίνη D₃) σε προ-βιταμίνη D₃ στην πλασματική μεμβράνη των κερατινοκυττάρων του ανθρώπινου δέρματος. Όταν η προ-βιταμίνη D₃ σχηματιστεί στο δέρμα, ταχέως μετατρέπεται σε βιταμίνη D₃ μέσω της θερμοκρασίας του δέρματος (Εικόνα 2)(1, 3, 17, 18).



Εικόνα 2 - Η μετατροπή της 7-δευδροχοληστερόλης σε προ-βιταμίνη D₃ από υπεριώδης ακτινοβολία μήκους κύματος 282-310nm και το ισοζύγιο μεταξύ της προ-βιταμίνη D₃ και της βιταμίνης D₃ που εξαρτάται από την θερμοκρασία του δέρματος.(1)

Ωστόσο η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία περιορίζεται από κάποιες συνήθειες των ανθρώπων όπως η ενδυμασία, ο περιορισμός των υπαίθριων δραστηριοτήτων η χρησιμοποίηση αντηλιακού κ.α.. Το γεγονός αυτό καθιστά σημαντική και απαραίτητη την λήψη της βιταμίνης D μέσω της διατροφής ή μέσω συμπληρωμάτων(3, 17).

Στην Ελλάδα και σε άλλες χώρες με παρόμοια εύκρατα κλίματα τα επίπεδα της βιταμίνης D στο πλάσμα των ατόμων παρουσιάζουν διακυμάνσεις αναλόγως την εποχή, με τα υψηλότερα ποσοστά να καταγράφονται κατά την διάρκεια των θερινών μηνών, ενώ αντιστοίχως τα χαμηλότερα να σημειώνονται τον χειμώνα. Ακόμη ένας σημαντικός παράγοντας είναι και το γεωγραφικό πλάτος της χώρας που κατοικούν οι άνθρωποι. Συγκεκριμένα οι κάτοικοι των χωρών που βρίσκονται αρκετά βόρεια παρουσιάζουν χαμηλά ποσοστά βιταμίνης D. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι άνθρωποι δεν

εκτίθενται επαρκώς στην ηλιακή ακτινοβολία και οι ανάγκες λήψης της βιταμίνης D μέσω της διατροφής είναι μεγαλύτερες(17, 18).

Συνοπτικά λοιπόν η παραγωγή της βιταμίνης D στο δέρμα εξαρτάται από τους εξής παράγοντες:

1. Την διάρκεια της έκθεσης στον ήλιο
2. Την ώρα της ημέρας που το άτομο εκτίθεται στην ηλιακή ακτινοβολία
3. Την επιφάνεια του δέρματος που εκτίθεται στον ήλιο
4. Την εποχή του έτους
5. Το γεωγραφικό πλάτος της χώρας που κατοικούν οι άνθρωποι
6. Τον τύπο του δέρματος του ατόμου
7. Την ηλικία
8. Την χρήση αντηλιακού (όταν ο δείκτης προστασίας είναι μεγαλύτερος από 15, τότε μειώνεται η παραγωγή της βιταμίνης D δραματικά, σε ένα ποσοστό που αγγίζει το 99%)

Μελέτες έχουν δείξει ότι η έκθεση στον ήλιο κατά την άνοιξη, το φθινόπωρο και το καλοκαίρι επαρκεί για την απαιτούμενη παραγωγή βιταμίνης D, αρκεί να γίνεται για χρονικό διάστημα μεταξύ 5-15 λεπτών και να λαμβάνει χώρα μεταξύ 10:00 και 15:00 σε άτομα με ανοιχτόχρωμο δέρμα. Άτομα με πιο σκούρο δέρμα απαιτούνται 5-10 λεπτά περισσότερης έκθεσης στην ηλιακή ακτινοβολία(17-21).

1.1.6 Βιταμίνη D και Διατροφή

Οι πηγές πρόσληψης της βιταμίνης D μέσω της διατροφής είναι σχετικά περιορισμένες. Συναντώνται λοιπόν εκεί κάποια λιπαρά ψάρια όπως ο σολομός, το σκουμπρί, η ρέγκα, η σαρδέλα και ο τόνος. Επίσης κάποια έλαια προέλευσης από τα ψάρια περιέχουν βιταμίνη D, όπως είναι το μωρουνέλαιο. Εκτός από τα ψάρια η βιταμίνη D μπορεί να βρεθεί και σε τροφές όπως το συκώτι, το βοδινό και μοσχαρίσιο κρέας, τα αυγά, τα μανιτάρια καθώς και σε γαλακτοκομικά προϊόντα(22-24). Έτσι γίνεται αντιληπτό ότι σε

περιοχές με μειωμένη ηλιακή ακτινοβολία και περιορισμό στη λήψη τροφών που περιέχουν βιταμίνη D είχαμε την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την έλλειψή της. Μεγαλύτερο παράδειγμα ασθένειας που οφείλεται στην υποβιταμίνωση D, ήταν η εμφάνιση της ραχίτιδας στο Ηνωμένο Βασίλειο που αναφέρθηκε και ανωτέρω στην ιστορική αναδρομή. Γι' αυτόν τον λόγο αυτό σε πολλές χώρες προκειμένου να έχουμε την αναγκαία πρόσληψη βιταμίνης D μερικά τρόφιμα εμπλουτίζονται με αυτήν. Αυτό συνήθως γίνεται σε περιοχές ή χρονικές περιόδους κατά τις οποίες η ηλιακή ακτινοβολία δεν επαρκεί, χωρίς όμως να αποκλείονται και περιπτώσεις άλλων χωρών, όπως π.χ. η Αυστραλία, όπου για προληπτικούς λόγους υπάρχουν σε μόνιμη βάση τροφές εμπλουτισμένες σε βιταμίνη D. Τα τρόφιμα που ως επί το πλείστον εμπλουτίζονται είναι το γάλα, τα δημητριακά, η μαργαρίνη καθώς και μερικά έλαια. Στον παρακάτω πίνακα (Πίνακας 1) αναφέρονται τροφές που περιέχουν την βιταμίνη D καθώς και τροφές που συνηθίζεται να εμπλουτίζονται με βιταμίνη D(22-27).

Πίνακας 1- Τροφές με Βιταμίνη D (22, 24)_(23, 27)

<p>Τροφές που περιέχουν βιταμίνη D</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Συκώτι • Μοσχαρίσιο και βοδινό κρέας • Γαλακτοκομικά προϊόντα (γάλα, τυρί, βούτυρο) • Ψάρια (ρέγκα, σολομός, τόνος, σαρδέλα, σκουμπρί) • Αυγά • Μουρουνέλαιο • Μανιτάρια
<p>Τροφές εμπλουτισμένες σε βιταμίνη D</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Γάλα • Δημητριακά • Μαργαρίνη • Μερικά έλαια

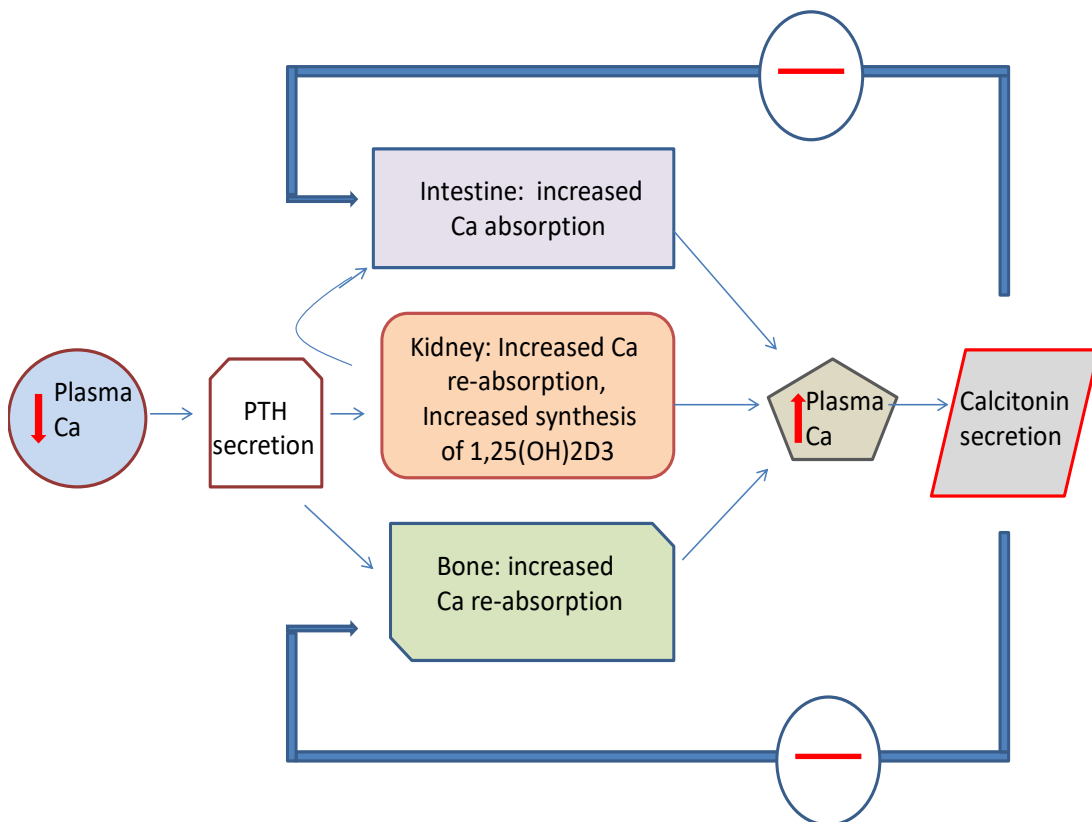
1.1.7 Δράση Βιταμίνης D

Η ενεργή μορφή της βιταμίνης D -1,25[OH]₂D θεωρούταν αρχικά ότι τα όργανα στόχοι στα οποία δρα ήταν το έντερο, τα οστά και οι νεφροί. Όμως έρευνες έδειξαν ότι η ενεργή μορφή δρα τόσο στον πυρήνα των κυττάρων, όσο και στην κυτταρική μεμβράνη σε περισσότερους από 30 ιστούς και όργανα στοχεύοντας πάνω από 200 γονίδια με μεγαλύτερα παραδείγματα την καρδιά, τους μυς, τον εγκέφαλο, το δέρμα καθώς και το ανοσοποιητικό σύστημα. Πιο συγκεκριμένα η βιταμίνη D αλληλεπιδρά με πυρηνικούς υποδοχείς, εκτός των ειδικών μεμβρανικών υποδοχέων, οι οποίοι ονομάζονται VDR (Vitamin D Receptors) και εμπλέκονται με την γονιδιακή ρύθμιση και την μεταγραφή των γονιδίων. (17)

Η 1,25[OH]₂D έχει δύο δράσεις. Αρχικά η δράση της 1,25[OH]₂D σχετίζεται κυρίως με την απορρόφηση του ασβεστίου, αλλά και του φωσφόρου δευτερευόντως, από το έντερο. Επιπλέον η 1,25[OH]₂D μέσω των πυρηνικών υποδοχέων διεγείρει τη παραγωγή της ινσουλίνης και ρυθμίζει την έκκριση της παραθυροειδούς ορμόνης. Τέλος, μέσω της γονιδιακής ρύθμισης η 1,25[OH]₂D επιδρά στην κυτταρική ανάπτυξη καθώς και στην κυτταρική διαφοροποίηση και πολλαπλασιασμό.

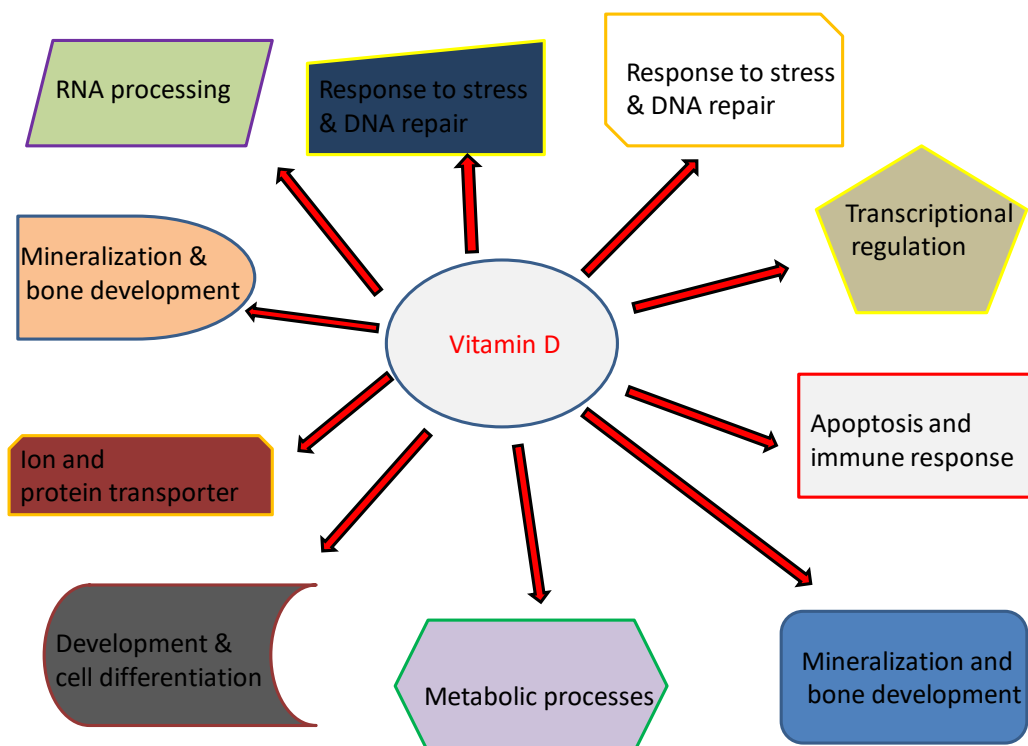
Στην αρχή θα αναφερθούμε στην δράση της 1,25[OH]₂D για την διατήρηση των επιπέδων του ασβεστίου και του φωσφόρου στον οργανισμό. Για την ομοιόσταση ενός οργανισμού είναι ζωτικής σημασίας τα επίπεδα στοιχείων, όπως το ασβέστιο και ο φώσφορος, να παραμένουν σταθερά για να έχουμε την ομαλή σύσπαση των μυών, τη σωστή αγωγιμότητα από τους νευρώνες καθώς και σωρεία άλλων κυτταρικών λειτουργιών. Η διατήρηση της σωστής συγκέντρωσης στο πλάσμα του ασβεστίου επιτυγχάνεται από την 1,25[OH]₂D, η οποία συνήθως αλληλεπιδρά με την παραθορμόνη (PTH) με τρεις τρόπους(28). Ο πρώτος τρόπος διατήρησης της σωστής συγκέντρωσης του ασβεστίου στο πλάσμα είναι μέσω της ταχείας απορρόφησής του στο έντερο, το οποίο επιτελείται άμεσα, μέσω του ανοίγματος των καναλιών ασβεστίου. Δεύτερος τρόπος είναι μέσω της επαναρρόφησης του ασβεστίου από τα άνω νεφρικά σωληνάκια. Στην προκειμένη διαδικασία η 1,25[OH]₂D δρα σε συνάρτηση με την PTH, η οποία εκκρίνεται από τους παραθυροειδείς αδένες εξαιτίας της έλλειψης του ασβεστίου. Αυτό έχει ως απόρροια η PTH να αυξάνει τα επίπεδα της 1,25[OH]₂D μέσω της μετατροπής από την 25(OH)D. Εν τέλει η 1,25[OH]₂D μαζί με την PTH προκαλούν αύξηση της επαναρρόφησης του ασβεστίου από τους νεφρούς. Τέλος η διατήρηση της σωστής

συγκέντρωσης στο πλάσμα του ασβεστίου επιτυγχάνεται μέσω της κινητοποίησης του ασβεστίου των οστών. Είναι μια διαδικασία κατά την οποία το ασβέστιο κινητοποιείται από τα οστά και έτσι έχουμε αύξηση του ασβεστίου στο πλάσμα και με τον τρόπο αυτό ο οργανισμός επιτυγχάνει φυσιολογική συγκέντρωση ασβεστίου στο αίμα. Πάλι έχουμε την $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ που δρα σε συνάρτηση με την PTH και επάγουν την κυτταρική διαφοροποίηση των αιμοποιητικών κυττάρων σε οστεοκλάστες (Εικόνα 3). Το αποτέλεσμα όμως αυτής της διαδικασίας έχει ως απόρροια την αποδυνάμωση των οστών που τα καθιστά πιο επιρρεπή σε κατάγματα.(28, 29).



Εικόνα 3 - Σχηματική αναπαράσταση της ρύθμισης της συγκέντρωσης ασβεστίου σε έναν οργανισμό σε συνθήκες υποβιταμίνωσης D. Παρατηρούμε ότι για την ομοίωση του ασβεστίου στον οργανισμό έχουμε την αλληλεπίδραση τόσο της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ όσο και της παραθορμόνης (PTH). Παρατηρούμε τις τρεις διαφορετικές δράσεις. Αρχικά έχουμε την αύξηση της απορρόφησης του ασβεστίου από το έντερο. Επιπλέον έχουμε την αύξηση της επαναρρόφησης του ασβεστίου από τους νεφρούς με ταυτόχρονη αύξηση της σύνθεσης της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$. Τέλος έχουμε την αύξηση της επαναρρόφησης του ασβεστίου από τα οστά που βοηθά στην ομοίωση του ασβεστίου και αύξηση του στα φυσιολογικά όρια.

Από την άλλη η $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ ελέγχει πληθώρα γονιδίων, τα οποία υπολογίζεται ότι ξεπερνούν τα 200 σε αριθμό, στα οποία συμπεριλαμβάνονται γονίδια που είναι υπεύθυνα για την έκκριση ορμονών, για την ρύθμιση της κυτταρικής διαφοροποίησης, του κυτταρικού πολλαπλασιασμού και τέλος της κυτταρικής ανάπτυξης (Εικόνα 4). Έτσι η $1,25[\text{OH}]_2\text{D}$ άμεσα ή έμμεσα εμπλέκεται με την απέκκριση της ινσουλίνης, την απέκκριση των παραθυρεοειδών και θυρεοειδών ορμονών, με το ανοσοποιητικό σύστημα (πιστεύεται ότι βελτιώνει την εύρυθμη λειτουργία του), με ασθένειες του δέρματος, καθώς και με τον καρκίνο. Στην εμπλοκή της με τον καρκίνο θεωρείται ότι ίσως είναι ικανή να αναστέλλει την ανάπτυξη των καρκινικών κυττάρων(28).



Εικόνα 4 - Οι κατηγορίες γονιδίων οι οποίες επηρεάζονται από την βιταμίνη D και πιο συγκεκριμένα, από την ενεργή της μορφή την $1,25(\text{OH})_2\text{D}$.

1.1.8 Προσδιορισμός της κατάστασης της βιταμίνης D στον άνθρωπο

Η έλλειψη της βιταμίνης D αρχίζει να είναι ένα έντονο φαινόμενο και με την πάροδο του χρόνου όλο και μεγαλύτερο μέρος του πληθυσμού εμφανίζει ανεπάρκεια στην βιταμίνη D. Έτσι λοιπόν πλέον γίνεται αναφορά σε παγκόσμιο επίπεδο για πανδημία υποβιταμίνωσης D, η οποία χρήζει άμεσης αντιμετώπισης έτσι ώστε να περιοριστεί το πρόβλημα. Η ολοένα και αυξανόμενη τάση έλλειψης της βιταμίνης D μπορεί να οφείλεται είτε στην περιορισμένη έκθεση στον ήλιο που οδηγεί σε μειωμένη σύνθεση στο δέρμα, είτε στην μειωμένη πρόσληψη της μέσω της τροφής(26, 30, 31).

Η ανεπάρκεια της βιταμίνης D παγκοσμίως αποτελεί μια μη αναγνωρισμένη επιδημία σε πολλές πληθυσμούς. Η έλλειψη της έχει αναφερθεί σε υγιή παιδιά, νεαρούς ενήλικες ανθρώπους, ειδικά σε Αφρο-Αμερικάνους, καθώς και μεσήλικες και ηλικιωμένους. Τυπικά, η επικράτηση των χαμηλών επιπέδων 25(OH)D [$<20\text{ng/ml}$ ή αλλιώς 50nmol/L] αγγίζει περίπου το 36% του πληθυσμού των κατά τα άλλα υγιών ενηλίκων ηλικίας από 18 έως 29 ετών, το 42% των έγχρωμων γυναικών ηλικίας 15 έως 49 ετών, το 41% των ασθενών ηλικίας από 49 έως 83 ετών στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής με αυτά τα νούμερα να έχουν μια αύξηση σε όσο αφορά τους κατοίκους της Ευρώπης(26, 30). Όλα αυτά τα στοιχεία συνηγορούν στο γεγονός ότι πρόκειται για μία επιδημία υποβιταμίνωσης D η οποία θα πρέπει να μας απασχολήσει αρκετά ούτως ώστε να βρούμε τρόπους γρήγορης και εύκολης μέτρησης της βιταμίνης D για να αναγνωρίσουμε τα άτομα που έχουν έλλειψη έτσι ώστε να γίνει πρόληψη από την εμφάνιση ασθενειών που σχετίζονται με την υποβιταμίνωση D(22, 24, 26, 27, 30, 31). Σε αυτό το σημείο όμως πρέπει να τονιστεί ότι δεν έχουν συμφωνηθεί ακόμα τα ικανοποιητικά επίπεδα που υποδηλώνουν επάρκεια ή ανεπάρκεια βιταμίνης D, καθώς αυτά αλλάζουν με βάση την ασθένεια για την οποία μιλάμε.

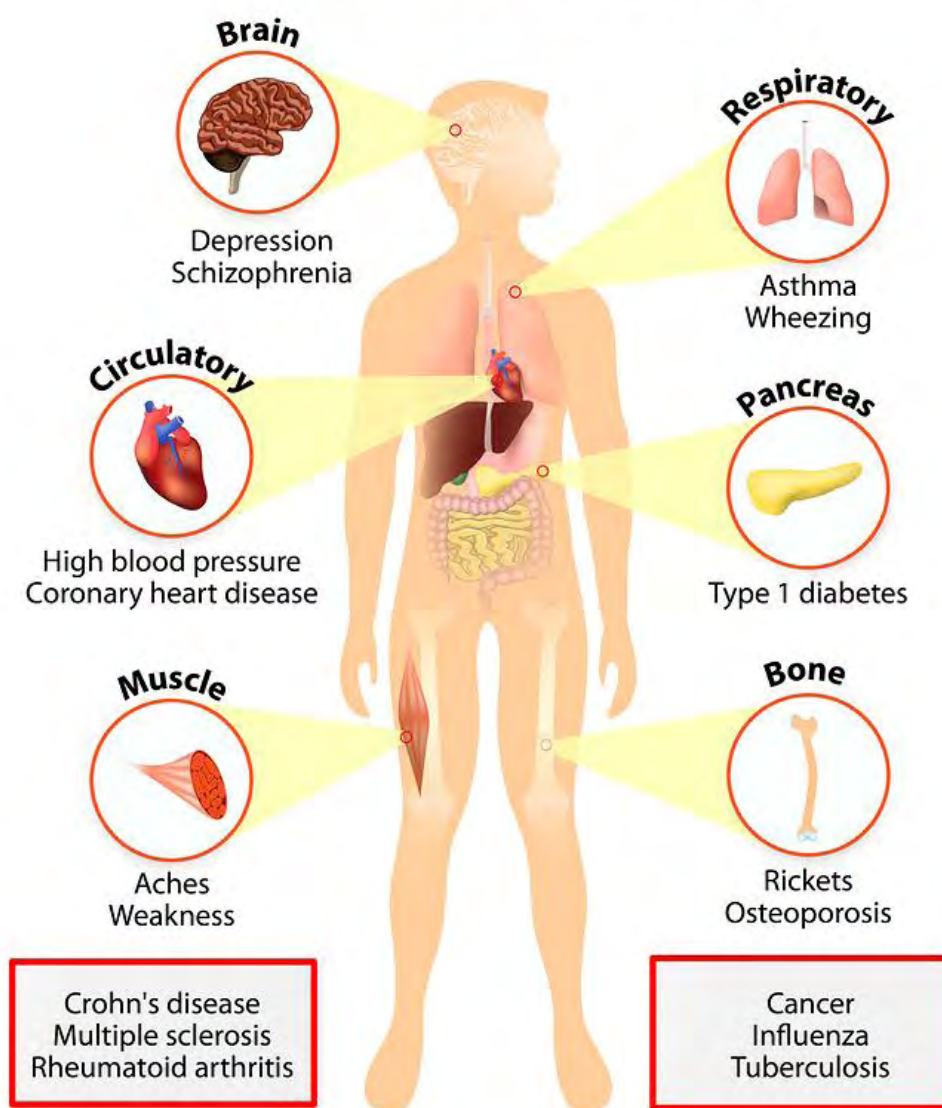
Οι μετρήσεις για την εξακρίβωση ή όχι της έλλειψης βασίζονται στην μέτρηση της 25(OH)D₃/D₂. Η 25(OH)D είναι ο καταλληλότερος δείκτης μέτρησης της επάρκειας της βιταμίνης D. Παρόλο που η 1,25(OH)₂D είναι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D δεν θα πρέπει να μετράτε για τον καθορισμό της καταστάσεως της βιταμίνης D σε έναν οργανισμό και αυτό γιατί συνήθως η 1,25(OH)₂D είναι σε φυσιολογικά επίπεδα ή ακόμη και αυξημένη σε ασθενείς με έλλειψη βιταμίνης D. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι κατά

την έλλειψη βιταμίνης D ο οργανισμός αυξάνει τα επίπεδα της PTH για να αποκαταστήσει την ομοιόσταση του ασβεστίου η οποία με την σειρά της ενισχύει την παραγωγή της $1,25(\text{OH})_2\text{D}$ όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως(26, 30), έτσι λοιπόν η μέτρησή της μπορεί να οδηγήσει σε λανθασμένη κλινική εικόνα του ατόμου.

1.1.9 Σημασία της έλλειψης βιταμίνης D στον άνθρωπο

Η έλλειψη της βιταμίνης D δε θα είχε σημασία αν δεν υπήρχε σαφής συσχέτισή της με την εμφάνιση κάποιων ασθενειών. Έχει αποδειχθεί λοιπόν ότι η έλλειψη της βιταμίνης D σχετίζεται με διάφορες ασθένειες εκτός της ραχίτιδας και άλλων κλασικών ασθενειών που αποδεδειγμένα οφείλονται στην έλλειψη της, όπως για παράδειγμα η οστεομαλακία και η οστεοπόρωση. Μερικές ακόμα από τις ασθένειες που πλέον σχετίζονται με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D είναι μερικές μορφές καρκίνου, διάφορες καρδιαγγειακές νόσοι, σκλήρυνση κατά πλάκας, νευρολογικές/ ψυχιατρικές ασθένειες και ο σακχαρώδης διαβήτης (Εικόνα 5).

VITAMIN D deficiency



Εικόνα 5 - Η έλλειψη βιταμίνης D καθώς και μέρος των ασθενειών που προκαλεί(32).

Όσον αφορά τις διάφορες μορφές του καρκίνου υπάρχουν πειραματικά στοιχεία που υποστηρίζουν τη συσχέτιση της βιταμίνης D με την πρόσληψη και στην συνέχεια με τη βοήθεια της ίασης του. Έχει διαπιστωθεί σε προκλινικές μελέτες τόσο μέσω *in vitro*, όσο και *in vivo* πειραμάτων, ότι η ενεργή μορφή της βιταμίνης D καθώς και τα παράγωγά της ότι έχουν αντικαρκινική δράση. Οι μηχανισμοί με τους οποίους επάγει την αντικαρκινική δράση είναι μέσω της διακοπής του κυτταρικού κύκλου, της

απόπτωσης, της κυτταρικής διαφοροποίησης και μέσω διακοπής της φλεγμονής, της αγγειογένεσης και της μετάστασης. Αυτό είναι λογικό αν θυμηθούμε τις κατηγορίες των γονιδίων που επηρεάζει η βιταμίνη D(33)

Στον τομέα των καρδιαγγειακών παθήσεων υπάρχει συσχέτιση με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D και πιο συγκεκριμένα με την υπέρταση. Πρέπει όμως να τονιστεί ότι υπάρχουν αντικρουόμενα στοιχεία σχετικά με αυτή τη δράση. Μία μετά-ανάλυση πραγματοποιήθηκε για να αποδειχθεί αν όντως υπάρχει η συσχέτιση. Παρά την συσσώρευση αποδείξεων για συσχέτιση της σύνδεσης της βιταμίνης D με την υπέρταση τα στοιχεία είναι ελλιπή και αυτό διότι τα δεδομένα ήταν μόνο μέσω παρατήρησης. Οπότε το ερώτημα παραμένει για να βρούμε την αιτιολογία αυτής της σύνδεσης(34). Εν αντιθέσει, παλιότερες έρευνες έδειξαν ότι η βιταμίνη D μπορεί να είναι χρήσιμη για την αρτηριακή υπέρταση(35).

Για την σκλήρυνση κατά πλάκας υπάρχουν επιδημιολογικά δεδομένα τα οποία στηρίζουν μία πιθανή σχέση με την βιταμίνη D, την έλλειψη της και την αύξηση της πιθανότητας εμφάνισής της(36). Αυτό συμβαίνει επειδή η ανεπάρκεια βιταμίνης D είναι κοινή σε άτομα με σκλήρυνση κατά πλάκας. Το ερώτημα που εγείρεται και είναι ιδιαίτερης σημασίας είναι το κατά πόσο έχει και αρνητική επίδραση στην έκβαση της(36). Πρόσφατα δεδομένα έδειξαν ότι χαμηλά επίπεδα 25(OH)D στα αρχικά στάδια της πορείας της ασθένειας είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην μακροπρόθεσμη δραστηριότητα και πρόοδο της σκλήρυνσης κατά πλάκας(37, 38).

Ένας επιπλέον τομέας ασθενειών με τον οποίο σχετίζεται η έλλειψη βιταμίνης D είναι και οι ψυχιατρικές νόσοι. Αρχικά έχουμε την κατάθλιψη στην οποία αποτελέσματα από μετά-αναλύσεις είναι σε συμφωνία με την υπόθεση ότι χαμηλές συγκεντρώσεις βιταμίνης D συνδέονται με την κατάθλιψη(39). Επιπλέον έρευνες χρειάζονται για να φανεί αν η σύνδεση της υποβιταμίνωσης D είναι αιτιώδης με την κατάθλιψη και κατά πόσο η βιταμίνη D μπορεί να προλάβει ή και να θεραπεύσει την κατάθλιψη. Απάντηση σε αυτό το ερώτημα έδωσε μία άλλη μετά-ανάλυση στην οποία αποδείχθηκε ότι είχαμε στατιστικά σημαντική βελτίωση της κατάθλιψης με συμπληρώματα βιταμίνης D(40). Όσον αφορά την σχιζοφρένεια υπάρχουν ενδείξεις σχετικά με τον ρόλο της βιταμίνης D στην μείωση της φλεγμονής και τον τρόπο που αυτή σχετίζεται με την C-αντιδρώσα πρωτεΐνη (CRP) σε ασθενείς με σχιζοφρένεια(41). Επιπροσθέτως η βιταμίνη D παίζει σημαντικό ρόλο στην νευροπροστασία και την νευρική ανάπτυξη, όπου τα χαμηλά

επίπεδά της σχετίζονται επίσης με την σχιζοφρένεια(42). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι υψηλά επίπεδα βιταμίνης D ίσως σχετίζονται με μειωμένο ρίσκο για την εμφάνιση της σχιζοφρένειας όταν έχουμε ανεβασμένη CRP και ότι μειωμένα επίπεδα βιταμίνης D στις γυναίκες παρουσιάζουν μία αύξηση της κυτταρικής γήρανσης που σχετίζεται με την σχιζοφρένεια(41, 42).

Ο σακχαρώδης διαβήτης έχει άμεση σχέση με την βιταμίνη D λόγω του γεγονότος ότι το ασβέστιο είναι απαραίτητο για την έκκριση της ινσουλίνης και αυτό υποδηλώνει ότι η βιταμίνη D συνεισφέρει στην διατήρηση έκκρισης της ινσουλίνης(43). Επιπλέον έχει παρατηρηθεί ότι σε ασθενείς με σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 και 2 έχουμε υψηλότερα ποσοστά υποβιταμίνωσης D. Επίσης τα παγκρεατικά κύτταρα εκφράζουν τους VDR (vitamin D receptors) που σχετίζονται με την ανοχή στην γλυκόζη, την έκκριση ινσουλίνης και την φλεγμονή. Επιπρόσθετα επιστημονικά δεδομένα δείχνουν ότι η πρόσληψη δόσεων της ενεργής μορφής της βιταμίνης D εμποδίζει την ινσουλίτιδα και τον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 1 στα μη παχύσαρκα διαβητικά (NOD-nonobese diabetic) ποντίκια πιθανώς μέσω της ανοσολογικής διαφοροποίησης(43). Έτσι είναι εμφανής η σύνδεση της βιταμίνης D με τον διαβήτη. Στον σακχαρώδη διαβήτη τύπου 2 συμπληρώματα βιταμίνης D μπορούν να αυξήσουν την ευαισθησία στην ινσουλίνη και να μειώσουν την φλεγμονή. Τέλος νέα έρευνα δείχνει στενή σχέση του διαβήτη σε παιδιά στην Σουηδία, όπου χαμηλά επίπεδα βιταμίνης D είναι κοινά μεταξύ παχύσαρκων εφήβων.(44)

Έτσι καθιστάτε σαφές ότι μία γρήγορη, τυποποιημένη, φθηνή εξέταση για την μέτρηση της επάρκειας της βιταμίνης D είναι αναγκαία για να μπορούμε να προλαμβάνουμε την εμφάνιση σημαντικών ασθενειών όπως η οστεομαλακία και η ραχίτιδα, αλλά και νέων ασθενειών που μέχρι πρόσφατα δεν υπήρχε συσχέτιση με την ανεπάρκεια της βιταμίνης D όπως είναι π.χ. ο σακχαρώδης διαβήτης, η σκλήρυνση κατά πλάκας, ψυχιατρικές νόσοι κλπ.

1.1.10 Εκτίμηση επιπέδων βιταμίνης D

Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η 25(OH)D είναι ο πιο σημαντικός μεταβολίτης της βιταμίνης D ο οποίος μπορεί να αντανακλά την ποσότητα της βιταμίνης D που προέρχεται τόσο μέσω της διατροφής, όσο και μέσω της παραγωγής στο δέρμα με τη

δράση της UV ακτινοβολίας. Η μέτρηση της 25(OH)D στον ορό του αίματος είναι πολύ σημαντική σε ασθενείς που έχουν πιθανότητα έλλειψης βιταμίνης D. Οι ασθενείς με κίνδυνο υποβιταμίνωσης D είναι όλοι οι ηλικιωμένοι, ασθενείς με χρώση του δέρματος, ασθενείς με οστεοπόρωση και τέλος ασθενείς με σύνδρομο κακής απορρόφησης. Οι μετρήσεις της 25(OH)D μπορούν να πραγματοποιηθούν μέσω κλινικών τεστ που περιλαμβάνουν τεστ χημειοφωταύγειας πρόσδεσης πρωτεΐνης (Nichols Advantage Assay-chemiluminescence protein-bind assay), ράδιο-ανοσολογικά τεστ (Diasorin), υψηλής απόδοσης υγρή χρωματογραφία (high-performance liquid chromatography) και τέλος υγρή χρωματογραφία φασματοσκοπίας μάζας. Τα πιο ευρέως διαδεδομένα τεστ που χρησιμοποιούνται για τον καθορισμό των επιπέδων βιταμίνης D των ασθενών είναι το τεστ χημειοφωταύγειας πρόσδεσης πρωτεΐνης και το ράδιο-ανοσολογικό τεστ. Παρόλα αυτά από τις έρευνες προέκυψε ότι τα αποτελέσματα ανάμεσα στα διάφορα τεστ ποικίλουν ανάμεσα στα διαφορετικά εργαστήρια, ακόμη και όταν χρησιμοποιούν τα ίδια τεστ. Έτσι χρειάζεται να γίνει πρόοδος στις μεθόδους όπου θα βελτιωθούν και θα τυποποιηθούν τα τεστ, για να ενισχυθεί η ακρίβεια και η αναπαραγωγή των ίδιων αποτελεσμάτων και στα υπόλοιπα εργαστήρια.

1.1.11 Φυσιολογικά επίπεδα της βιταμίνης D

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η μέτρηση της 25(OH)D είναι υπεύθυνη για να οριστούν τα φυσιολογικά όρια της βιταμίνης D στον οργανισμό. Το ερώτημα που ακόμη υπάρχει και μέχρι στιγμής δεν έχει δοθεί πειστική απάντηση, είναι ποια επίπεδα βιταμίνης D στον οργανισμό θεωρούνται ικανοποιητικά. Συνήθως τα επίπεδα της βιταμίνης D, που θεωρούνται ικανοποιητικά, μπορούν να διαφοροποιούνται ανάλογα με την ασθένεια στην οποία αναφερόμαστε. Κάτι τέτοιο όμως δεν μπορεί να έχει εφαρμογή για τον λόγο ότι κάθε οργανισμός μπορεί να φτάνει το κατώτερο όριο βιταμίνης D και παρόλα αυτά να μην εμφανίζει την ασθένεια. Σύμφωνα με το review του Michael F. Holick τα ικανοποιητικά επίπεδα της 25(OH)D είναι περίπου από 30ng/ml (75nmol/L) και πάνω. Αυτό προκύπτει από το γεγονός ότι η βιταμίνη D παίζει έναν κομβικό ρόλο στην ομοίωση τόσο του ασβεστίου όσο και του φωσφόρου και της σκελετικής υγείας. Ωστόσο η υποβιταμίνωση D οδηγεί σε μη σωστό μεταβολισμό του ασβεστίου το οποίο έχει ως απόρροια την πυροδότηση του δευτεροταγούς υπερπαραθυρεοειδισμού με επακόλουθο την επαναρρόφηση του ασβεστίου από τα οστά τα οποία οδηγούν σε

σταδιακή μείωση της οστικής πυκνότητας, την οστεοπόρωση και την οστεομαλακία. Με βάση αυτά τα δεδομένα το βέλτιστο εύρος της 25(OH)D στον ορό του αίματος για την υγεία του σκελετικού συστήματος έχει προταθεί να είναι το εύρος το οποίο μειώνει τα επίπεδα τη PTH στο ελάχιστο επίπεδο και ταυτόχρονα η απορρόφηση του ασβεστίου να είναι στο μέγιστο επίπεδο(3, 45). Το όριο αυτό προτάθηκε να είναι τα 30ng/ml όπως αναφέρθηκε παραπάνω από τον Holick όπου υπήρξε και ταύτιση απόψεων με τις έρευνες του Meunier(3, 19, 46). Ωστόσο άλλες έρευνες αναφέρουν διαφορετικές τιμές για την επάρκεια της βιταμίνης D με τον Dawson-Hughes να αναφέρουν ως επαρκείς τιμές από τα 32ng/ml, επίπεδα στα οποία συμφωνούν και οι έρευνες του Heaney(47, 48). Έρευνες του Vieth προτείνουν ως επαρκείς επίπεδα τα 28ng/ml(49). Οπότε με τα παραπάνω δεδομένα παρατηρούμε ότι επαρκείς ποσότητες της βιταμίνης D ορίζονται περίπου στα 30ng/ml, χωρίς όμως αυτό να θεωρείται de facto. Πάντως τιμές <20ng/ml θεωρούνται ότι υπάρχει μέτρια υποβιταμίνωση, ενώ τιμές <10ng/ml θεωρούνται ως σοβαρή έλλειψη βιταμίνης D. Στον Πίνακα 2 φαίνονται συγκεντρωτικά τα ελάχιστα επιθυμητά επίπεδα της 25(OH)D που προτείνουν οι διαφορετικοί ερευνητές.

Πίνακας 2 – Επιθυμητά επίπεδα 25(OH)D (19, 45)

<u>Ερευνητής</u>	<u>Επιθυμητά επίπεδα 25(OH)D</u>	<u>Επιθυμητά επίπεδα 25(OH)D</u>
	(ng/ml)	(nmol/L)
<i>Holick</i>	30	75
<i>Heaney</i>	32	80
<i>Meunier</i>	30	75
<i>Vieth</i>	28	70
<i>Dawson-Hughes</i>	32	80

1.2 ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΙΤΑΜΙΝΗΣ D

1.2.1 Ιστορική αναδρομή για την μέτρηση της βιταμίνης D

Είναι σαφές ότι η μέτρηση της συγκέντρωσης της 25OHD είναι ο καλύτερος δείκτης της κατάστασης της βιταμίνης D σε έναν οργανισμό, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω. Η συγκέντρωση αυτή προκύπτει από το άθροισμα των συγκεντρώσεων τόσο της D₃, όσο και της D₂ μορφής. Η μεν 25(OH)D₃ παράγεται ενδογενώς υπό την επίδραση της ηλιακής ακτινοβολίας στο δέρμα και η 25(OH)D₂ που λαμβάνεται εξωγενώς μέσω της διατροφής. Η επιλογή της 25(OH)D για δείκτη της κατάστασης της βιταμίνης D έγκειται στο γεγονός ότι έχει μεγάλο χρόνο ημιζωής, περίπου τρεις εβδομάδες, και δεν επηρεάζεται/ελέγχεται από άλλους φυσιολογικούς παράγοντες. Η ενεργή μορφή της βιταμίνης D, η 1,25(OH)₂D, που θεωρητικά θα ήταν ένας πιο αξιόπιστος δείκτης της βιταμίνης D δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον σκοπό αυτό, αφενός εξαιτίας του μικρού χρόνου ημιζωής (περίπου τέσσερις ώρες) και αφετέρου επειδή επηρεάζεται από αρκετούς φυσιολογικούς παράγοντες. Αυτό θα είχε σαν αποτέλεσμα η συγκέντρωση της 1,25(OH)₂D να μην μειώνονταν αρχικά, αλλά η μείωση να παρουσιάζονταν μετά από αρκετό χρονικό διάστημα από τη στιγμή της πραγματικής ανεπάρκειας της βιταμίνης D στον οργανισμό. Οι φυσιολογικοί παράγοντες που μπορεί να επηρεάσουν την συγκέντρωση της 1,25(OH)₂D είναι οι εξής: προλακτίνη, οστραδιόλη, τεστοστερόνη, προγλανδίνη, κορτικοστεροειδή, ηπαρίνη και μερικά είδη διουρητικών φαρμάκων(50, 51).

Η πρώτη μέθοδος μέτρησης της 25OHD χρησιμοποιήθηκε κατά την δεκαετία του 1970 και στηριζότανε στην ανταγωνιστική δέσμευση πρωτεϊνών (competitive binding protein) μετά από εκχύλιση με κατάλληλο διαλύτη. Μεταγενέστερα κατά την δεκαετία του 1970 είχαμε για πρώτη φορά την χρησιμοποίηση μεθόδων υγρής χρωματογραφίας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της βιταμίνης D και πιο συγκεκριμένα της HPLC (High Performance Liquid Chromatography = Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης). Έπειτα με την πάροδο του χρόνου και την εξέλιξη της επιστήμης και της τεχνολογίας παρουσιάστηκαν και άλλες μέθοδοι που χρησιμοποιούνταν για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D. Έτσι για πρώτη φορά το 1985 χρησιμοποιήθηκε ράδιο-ανοσολογική μέθοδος (RIA-radioimmunoassay), οι οποίες μέθοδοι όμως είχαν συγκεκριμένες αδυναμίες και προβλήματα που δεν μπορούσαν να ξεπεραστούν. Έτσι για να

αποφευχθούν τα προβλήματα που σχετίζονταν με την χρησιμοποίηση ραδιενέργειας και τον περιορισμένο χρόνο ημιζωής των ραδιενεργών ανιχνευτών, οι ράδιο-ανοσολογικές μέθοδοι αντικαταστάθηκαν από τις ανοσολογικές μεθόδους. Οι τελευταίες χρησιμοποιούν έναν σημασμένο ιχνηθέτη που ως επί το πλείστον είναι ένα αντίσωμα ζωικής προέλευσης, ο οποίος είναι εξειδικευμένος να κάνει σύμπλοκο με το εκάστοτε μόριο – στόχο και έπειτα η μέτρηση γίνεται με τη χρήση χημειοφωταύγειας (CLIA). Παρόλα αυτά η εξέλιξη της τεχνολογίας μας δίνει την δυνατότητα χρησιμοποίησης νέων μεθόδων με μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα και ακρίβεια στις μετρήσεις. Έτσι με την εξέλιξη στην φασματομετρία μάζας κατά την διάρκεια του τελευταίου αιώνα δόθηκε η δυνατότητα χρησιμοποίησης της υγρής χρωματογραφίας φασματοσκοπίας μάζας (LC-MS/MS) στην καθημερινότητα των εργαστηρίων για την μέτρηση της βιταμίνης D και των μεταβολιτών της.(50, 52).

Στον παρακάτω πίνακα φαίνονται στοιχεία τα οποία σχετίζονται με τις διαφορετικές μεθόδους μέτρησης της 25(OH)D. Υπάρχουν λοιπόν 935 πιστοποιημένα εργαστήρια για τη μέτρηση της βιταμίνης D, εκ των οποίων φαίνεται στον πίνακα 3 ο αριθμός των εργαστηρίων που χρησιμοποιούν την εκάστοτε μέθοδο. Από τα 935 εργαστήρια, η μεγαλύτερη πλειοψηφία, τα 221 που αντιπροσωπεύουν περίπου το ένα τέταρτο του συνολικού αριθμού, χρησιμοποιούν τη μέθοδο την οποία ερευνούμε στη παρούσα εργασία την Diasorin LIAISON TOTAL.

Πίνακας 3 – Μέθοδοι μέτρησης Βιταμίνης D και αριθμός εργαστηρίων που χρησιμοποιούν την κάθε μέθοδο (Προσωπικό Αρχείο Αν. Καθηγητή Κ^{ov} Τσακάλωφ)

25 Hydroxyvitamin D		January 2016		Laboratory	2090
Sample	Method	n	Method Mean	SD	CV
487	(all methods)	935	100.3 (40.1)	14.9 (6.0)	14.9
487	Abbott Architect - New kit (5P02)	9	102.3 (40.9)	5.8 (2.3)	5.6
487	Abbott Architect - Old kit (3L52)	72	103.9 (41.6)	7.2 (2.9)	7.0
487	Automated IDS EIA	7	107.6 (43.0)	9.7 (3.9)	9.0
487	Beckman Access2 Total 25OHD	7	85.6 (34.3)	4.7 (1.9)	5.5
487	Beckman Unicel Dxi Total 25OHD	36	90.6 (36.2)	9.4 (3.7)	10.3
487	bioMerieux 25OH Vitamin D Total	2	107.3 (42.9)	4.9 (1.9)	4.5
487	Bio-Rad BioPlex 2200	1	87.8 (35.1)	0.0 (0.0)	0.0
487	DiaSorin Liaison Total	221	92.7 (37.1)	7.5 (3.0)	8.0
487	DiaSorin RIA	6	82.9 (33.1)	12.2 (4.9)	14.7
487	DIAsource Total 25OHD ELISA	1	79.3 (31.7)	0.0 (0.0)	0.0
487	DIAsource Total 25OHD RIA	2	92.2 (36.9)	2.6 (1.1)	2.9
487	Diazyme 25OH VitD Chemistry Analyzers	2	122.2 (48.9)	9.5 (3.8)	7.8
487	Diazyme 25OH VitD EIA	2	97.4 (39.0)	33.8 (13.5)	34.7
487	DRG ELISA	1	109.3 (43.7)	0.0 (0.0)	0.0
487	DRG Hybrid-XL	1	120.5 (48.2)	0.0 (0.0)	0.0
487	Euroimmun ELISA	13	102.2 (40.9)	13.8 (5.5)	13.5
487	Fujirebio Lumipulse G 25OH Vit D	2	81.0 (32.4)	6.0 (2.4)	7.4
487	HPLC	27	97.3 (38.9)	16.5 (6.6)	16.9
487	IDS EIA	23	95.1 (38.0)	13.1 (5.2)	13.8
487	IDS RIA	5	108.8 (43.5)	25.6 (10.3)	23.6
487	IDS-iSYS	91	104.0 (41.6)	7.3 (2.9)	7.0
487	LC-MS-MS	154	97.0 (38.8)	9.1 (3.7)	9.4
487	Ortho Total 25OHD	5	94.5 (37.8)	11.8 (4.7)	12.5
487	Qualigen FastPack IP Vitamin D	1	113.5 (45.4)	0.0 (0.0)	0.0
487	Roche Total 25OHD	165	121.2 (48.5)	9.0 (3.6)	7.5
487	Siemens ADVIA Centaur	69	85.3 (34.1)	10.0 (4.0)	11.7
487	SNIBE Maglumi 25OH Vit D	2	87.6 (35.0)	2.1 (0.8)	2.4
487	Tosoh AIA	5	106.5 (42.6)	14.1 (5.6)	13.2
487	Unknown	3	83.9 (33.6)	9.6 (3.8)	11.4
487	Target Value		92.9 nmol/L		

1.2.2 Ανοσολογικές μέθοδοι μέτρησης Βιταμίνης D

Εξαιτίας της ολοένα και μεγαλύτερης ανάγκης για μέτρηση της βιταμίνης D, λόγω της πανδημίας της ανεπάρκειάς της, ολοένα και περισσότερες εταιρίες άρχισαν να εισάγουν αυτοματοποιημένες μεθόδους ανοσολογικής φύσεως για τη μέτρηση της βιταμίνης D. Οι εταιρίες που ασχολήθηκαν με τη μέτρηση της βιταμίνης D είναι η Diasorin, η Abbott, η IDS, η Roche και η Siemens. Επίσης είναι σημαντικό να αναφέρουμε ότι όλες αυτές οι εταιρίες, εξαιρουμένης της Roche, χρησιμοποιούν παραπλήσια μέθοδο μέτρησης της βιταμίνης D. Ακολούθως παραθέτουμε τις εταιρίες καθώς και αναφορά στην διαδικασία μέτρησης που χρησιμοποιεί η εκάστοτε εταιρία(50, 53).

1) *Abbott architect 25-OH vitamin D assay*

Στην εταιρία αυτή η διαδικασία ξεκινάει με τον διαχωρισμό της 25(OH)D όπου το δείγμα υφίσταται κατεργασία με το 8-ανιλινο-1-νιφθαλινοσουλφονικό οξύ (8-anilino-1-nephtalensulfonic acid) σε ρυθμιστικό διάλυμα τριαιθανολαμίνης μεθανόλης. Εν συνεχεία αναμιγνύεται με παραμαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με πολυκλωνικό αντίσωμα προβάτου για την βιταμίνη D (sheep polyclonal anti-vitamin D IgG). Μετά την επώαση η βιταμίνη D κάνει σύζευξη με ένα σημασμένο ακρινίδιο το οποίο προστίθεται. Έπειτα προσδένεται σε μη κατειλημμένες θέσεις σύνδεσης του anti-vitamin D IgG. Τα σωματίδια συλλέγονται με την χρησιμοποίηση ενός μαγνητικού πεδίου και τα μη προσδεδεμένα σωματίδια απομακρύνονται. Για να έχουμε την χημειοφωταύγεια μέσω του σημασμένου ακριδινίου προσθέτουμε υπεροξείδιο του υδρογόνου και υδροξείδιο του νατρίου. Έτσι έχουμε έναρξη της χημειοφωταύγειας(52).

2) *Diasorin LIAISON 25 OH vitamin total assay*

Η Diasorin LIAISON 25 OH vitamin total assay είναι και η μέθοδος μέτρησης της εν λόγω εργασίας. Αρχικά είχαμε τον διαχωρισμό της 25OHD από ένα ιδιόκτητο παράγοντα της Diasorin σε αλκαλικό διάλυμα με 10% αιθανόλη και τασιενεργά. Για τον προσδιορισμό της βιταμίνης D χρησιμοποιείται anti-25(OH)D αντίσωμα κασίικας επιστρωμένο με μαγνητικά σωματίδια. Η 25OHD του δείγματος ανταγωνίζεται με τη 25(OH)D, που είναι συζευγμένο με ένα παράγωγο ισοφωταύγειας (N-4amino-butyl-N-ethyl-isoluminol), για θέσεις πρόσδεσης στα αντισώματα. Μετά τον καθαρισμό των μη δεσμευμένων σωματιδίων, έχουμε την διέγερση της χημειοφωταύγειας μέσω του παραγώγου της ισοφωταύγειας(54, 55).

3) *IDS-iSYS 25-hydroxyvitamin D*

Η IDS, χρησιμοποιεί στο δείγμα για τον διαχωρισμό του 25(OH)D δικές της ενώσεις σε 10-20% μεθανόλη και ακολουθεί επώαση με πολυκλωνικό anti-25(OH)D αντίσωμα προβάτου, το οποίο περιέχει σημασμένο ακριδίνιο. Η 25OHD συνδέεται με τα μαγνητικά σωματίδια και στην συνέχεια προστίθεται και συνδέεται σε μη κατειλημμένες θέσεις στα αντισώματα της anti-vitamin D. Ακολουθεί μαγνητικός διαχωρισμός και καθαρισμός των μη συνδεμένων

σωματιδίων και τελικά έχουμε την πυροδότηση της χημειοφωταύγειας μέσω του σημασμένου ακριδινίου (56).

4) *Roche vitamin D total assay*

Όπως αναφέρθηκε αρχικά η Roche είναι η μοναδική εταιρία που έχει τελείως διαφορετικό τρόπο μέτρησης της βιταμίνης D. Η διαδικασία της Roche βασίζεται στην ανταγωνιστική πρόσδεση πρωτεΐνης και όχι σε ανοσολογία. Επίσης στην μέθοδο της για την δέσμευση της 25(OH)D χρησιμοποιεί την πρωτεΐνη πρόσδεσης της βιταμίνης D (DBP) και όχι ένα αντίσωμα ζώου. Στο δείγμα αρχικά μειώνεται το pH μέσω της χρήσης dithioireitol και εν συνεχεία έχουμε την αποκατάσταση του pH χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του νατρίου. Μετά ακολουθεί η επώαση του δείγματος με το DBP το οποίο έχει σημανθεί με ρουθίνιο. Ακολούθως έχουμε την προσθήκη 25(OH)D η οποία έχει σημανθεί με βιοτίνη και δεσμεύει την τυχόν ελεύθερη σημασμένη DBP. Επικαλυμμένα με στρεπταβιδίνη μικροσωματίδια προστίθενται και δεσμεύουν την 25(OH)D που έχει κάνει σύμπλοκο με το σημασμένο DBP. Τα μικροσωματίδια συλλέγονται με την χρήση μαγνητικού πεδίου και μετά το πέρας του καθαρισμού έχουμε διέγερση της χημειοφωταύγειας(57, 58).

5) *Siemens vitamin D total assay*

Το δείγμα υφίσταται κατεργασία με 8-ανιλίνο-ναφθαλίνο-σουλφονικό οξύ, αιθυλενογλυκόλη και διαζολιδινυλο ουρία. Κατόπιν επωάζεται με μονοκλωνικά αντισώματα anti-vitamin D ποντικού τα οποία έχουν σημανθεί με αστέρα ακριδινίου. Ένα ανάλογο της 25(OH)D συζευγμένο με φλουορεσκεΐνη προστίθεται και δεσμεύεται με οποιοδήποτε μη καλυμμένο σημείο πρόσδεσης των αντισωμάτων. Παραμαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με μονοκλωνικά αντισώματα αντι-φλουορεσκεΐνης προστίθενται και προσδένονται στη συζευγμένη 25(OH)D. Τα σωματίδια συλλέγονται με την χρήση μαγνητικού πεδίου και μετά ακολουθεί καθαρισμός. Στο τέλος έχουμε την πυροδότηση της χημειοφωταύγειας μέσω του εστέρα του ακριδινίου(52, 53, 59).

1.2.3 Απόδοση ανοσολογικών μεθόδων μέτρησης Βιταμίνης D της εκάστοτε εταιρίας

Για την εξασφάλιση της αξιοπιστίας των αναλύσεων/μετρήσεων της 25(OH)D και της 1,25(OH)₂D το 1989 ιδρύθηκε ο οργανισμός DEQAS. Ο DEQAS είναι ο επίσημος φορέας με τον οποίο ελέγχονται τα αποτελέσματα και η αξιοπιστία τους. Είναι ενδεικτικό ότι μέχρι τον Ιανουάριο του 2013 συμμετείχαν 1200 κέντρα από 54 χώρες.

1. *Abbott architect 25-OH vitamin D assay*

Η λειτουργική ευαισθησία της τεχνικής είναι στα 5 ng/ml. Το προφίλ ακρίβειας δείχνει ότι η μέθοδος επικυρώνεται μεταξύ 13,6 ng/ml και 78,1 ng/ml. Επίσης οι έρευνες δείχνουν καλή συσχέτιση με την DiaSorin RIA. Παρόλα αυτά από τα 50 ng/ml και άνω παρατηρήθηκε ένα συστηματικό σφάλμα, το οποίο πάντα έδινε τιμές αναλογικά μεγαλύτερες από τη μέθοδο σύγκρισης. Πρέπει να επισημανθεί ότι στην συγκεκριμένη έρευνα τα αποτελέσματα της Abbott συγκρίθηκαν με την μέθοδο της DiaSorin RIA και όχι με την LC-MS/MS ή με την HPLC(60).

2. *Diasorin LIAISON 25 OH vitamin total assay*

Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι αρκετά δημοφιλής και χρησιμοποιείται στο μεγαλύτερο ποσοστό μέσα στο DEQAS. Το 2009 αντιπροσώπευε το 36% των αποτελεσμάτων στο DEQAS. Ο κατασκευαστής υπολόγιζε ακρίβεια μεταξύ των παρτίδων <12,2% κάτι το οποίο επαληθεύτηκε σε μελέτες που έγιναν με αυτό τον σκοπό και με λειτουργική ευαισθησία (CV) 8-10%. Επιπροσθέτως στις μελέτες αυτές έγινε και σύγκριση με την μέθοδο της LC-MS/MS. Τα αποτελέσματα έδειξαν μικρότερη διακύμανση με τις παλαιότερες τεχνικές της εταιρίας, μεγαλύτερη συσχέτιση με την LC-MS/MS (0,95 vs 0,90) και λιγότερα ψευδή αποτελέσματα(50, 54, 55).

3. *IDS-iSYS 25-hydroxyvitamin D*

Η εν λόγω τεχνική είναι νέα στην αγορά και δεν υπάρχουν επαρκή δεδομένα για ασφαλή εξαγωγή συμπερασμάτων(50). Ωστόσο σε μία πρόσφατη δημοσίευση για την IDS iSYS παρατηρήθηκε ότι όταν τα

δείγματα μετρήθηκαν όλα μαζί, υπήρχε συστηματικό σφάλμα σε σχέση με τις μεθόδους αναφοράς, ενώ όταν τα δεδομένα διαχωρίστηκαν σε τιμές μεταξύ 6 και 49ng / mL (15-122nmol / L) ή μεταξύ 50 και 100 ng / mL (125-250nmol/L) φάνηκαν σημαντικές συσχετίσεις μεταξύ των αποτελέσματα που ελήφθησαν. Οι μετρήσεις συγκρίθηκαν με αυτές που προέκυψαν από την LC-MS/MS. Τέλος η εν λόγω μέθοδος χρήζει περισσότερων ερευνών τα επόμενα χρόνια(61).

4. *Roche vitamin D total assay*

Η διαδικασία εισήχθη για πρώτη φορά στην αγορά το 2008 και αντιπροσωπεύει το 6% των χρηστών στο DEQAS. Ο συντελεστής διακύμανσης μεταξύ των εργαστηρίων σε ετήσια ακρίβεια ήταν στο 16,7% που είναι παρόμοιο με δημοσιευμένα δεδομένα από διάφορες έρευνες. Γενικά υπήρχε σχετική ταύτιση μεταξύ των αποτελεσμάτων της Roche και της LC-MS/MS, αν και μεγάλες διακυμάνσεις παρατηρήθηκαν σε μεμονωμένα δείγματα ασθενών. Τέλος είναι σημαντικό να συμπληρώσουμε ότι η μέθοδος μετράει μόνο την 25OHD₃ και όχι την 25(OH)D₂(57, 58).

5. *Siemens vitamin D total assay*

Η μέθοδος της εταιρίας Siemens δεν χρησιμοποιείται στον ίδιο βαθμό όσο αυτές από τις υπόλοιπες εταιρίες και είναι χαρακτηριστικό ότι έχουμε τα λιγότερα δείγματα προς εξέταση με τη μέθοδο αυτή. Διάφορες έρευνες έδειξαν ότι μεταξύ των μετρήσεων της εταιρίας Siemens και της μεθόδου LC-MS/MS παρατηρήθηκε μία μέση απόκλιση ανάμεσα στα αποτελέσματα της τάξεως του -6,1%. Το μικρό αυτό συστηματικό σφάλμα για τα δείγματα που μετρήθηκαν με την μέθοδο της Siemens συνέπεσε εντός του κλινικώς αποδεκτού εύρους. Οι έρευνες κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι οι μετρήσεις της μεθόδου της Siemens επιδεικνύουν αποδεκτή απόδοση σε σύγκριση με την LC-MS/MS(62, 63).

1.2.4 Ακρίβεια των ανοσολογικών μεθόδων μέτρησης της βιταμίνης D

Οι αυτοματοποιημένες εξετάσεις μέτρησης της 25OHD έχουν δυσκολία στην απόδοση τους κυρίως όταν έχουμε διαφορές στην συγκέντρωση του δείγματος. Σε υψηλές συγκεντρώσεις 25(OH)D όλες οι εταιρίες έχουν μεγάλη ακρίβεια στις μετρήσεις τους και καλύπτουν τους στόχους που έχουν θέσει. Πιο συγκεκριμένα σε έρευνες διαπιστώθηκε ότι σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 258 nmol/L η Abbott, Diasorin, Siemens και Roche είχαν μεγάλη ακρίβεια στις μετρήσεις τους. Παρομοίως, σε συγκεντρώσεις της τάξεως των 84 nmol/L η IDS είχε παραπλήσια ακρίβεια στις μετρήσεις τους όπως οι προηγούμενες εταιρίες. Στον αντίποδα όταν οι μετρήσεις διεξάγονταν σε δείγματα με χαμηλές συγκεντρώσεις 25(OH)D όλες οι εταιρίες είχαν δυσκολία στη διενέργεια μετρήσεων με ακρίβεια, πάντα σύμφωνα με τις προδιαγραφές που είχαν θέσει. Χαρακτηριστικά μόνο δυο εταιρίες μπορούσαν να έχουν ακρίβεια σε μετρήσεις που διενεργούνταν για συγκεντρώσεις της τάξεως των 24,2 nmol/L, ενώ καμία εταιρία δεν μπορούσε να έχει ακρίβεια στις μετρήσεις όταν η συγκέντρωση ήταν ακόμη μικρότερη και έφτανε στα 12,8 nmol/L. Πρέπει να αναφερθεί ότι η σύγκριση στις τιμές γινόταν πάντα σε αντιδιαστολή με αποτελέσματα που προέρχονταν από LC-MS/MS. Δηλαδή μετρήσεις στο εκάστοτε δείγμα γινόταν τόσο από την κάθε εταιρία, όσο και από την LC-MS/MS και εν συνεχεία είχαμε σύγκριση των αποτελεσμάτων(52, 53, 64, 65).

Όσον αφορά τα σφάλματα οι εταιρίες Abbot, Diasorin και Roche σε σύγκριση με την LC-MS/MS είχαν σφάλματα κάτω του 3%, ενώ η IDS κάτω του 6%. Εξαίρεση παρατηρήθηκε μόνο στις μετρήσεις από την εταιρία Siemens με τις έρευνες να δείχνουν ανεπαρκή απόδοση. Ακόμη διαφορές μπορεί να υπάρχουν στην διακύμανση ατομικών αποτελεσμάτων σε σύγκριση με τις μεθόδους αναφοράς (reference methods). Μέθοδοι αναφοράς είναι οι δύο μέθοδοι χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται και εννοούμε είτε την HPLC είτε την LC-MS/MS(64, 66).

Ένας παράγοντας που μπορεί να επηρεάζει τα αποτελέσματα των αυτοματοποιημένων μεθόδων μέτρησης της βιταμίνης D μπορεί να είναι και ο τρόπος της προεπεξεργασίας των δειγμάτων πριν την μέτρηση. Μία μεγάλη διαφορά στην διαδικασία επεξεργασίας του δείγματος είναι ότι στις μεθόδους αναφοράς χρησιμοποιείται διαλύτης για την εκχύλιση, έπειτα πραγματοποιείται χρωματογραφική ανάλυση και τέλος βήματα καθαρισμού πριν την μέτρηση. Στις αυτοματοποιημένες μεθόδους έχουν απλοποιημένες

διαδικασίες προ-επεξεργασίας του δείγματος ούτως ώστε να υπάρχει αυτοματοποίηση στις μετρήσεις, αλλά και να έχουν υψηλής απόδοσης δείγμα. Ωστόσο αυτό μπορεί να έχει σαν μειονέκτημα ότι η μέτρηση θα είναι επιρρεπής σε παρεμβολές από άλλα λιπίδια στο δείγμα και ιδιαίτερα από λιποπρωτεΐνες(52, 66).

Λάθη κατά τις μετρήσεις μπορεί να προκύψουν από τις διακυμάνσεις που υπάρχουν κατά την προσπάθεια μέτρησης τόσο της 25(OH)D₂, όσο και της 25(OH)D₃. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η Roche μπορεί να ανιχνεύει/μετράει μόνο την 25(OH)D₃ και όχι την 25(OH)D₂. Επιπροσθέτως λάθη στις μετρήσεις προκύπτουν και από την λανθασμένη αντίδραση των μεταβολιτών της βιταμίνης D με τα επιμερή του αντισώματος. Και τα δύο αυτά στοιχεία συμβάλουν επίσης στις αποκλίσεις στις τιμές ανάμεσα στις αυτοματοποιημένες μετρήσεις και στα αποτελέσματα από την LC-MS/MS(52).

Η παρουσία του ανθρώπινου αντισώματος Human anti-animal antibodies (HAAA) είναι ένας επιπρόσθετος παράγοντας, για τις εταιρείες που το χρησιμοποιούν, που ίσως μπορεί να προκαλεί λανθασμένα αποτελέσματα για την 25(OH)D στις αυτοματοποιημένες μετρήσεις. Συνήθως το πρόβλημα είναι πιο έντονο και συχνό για τις ανοσολογικές εξετάσεις του τύπου «σάντουιτς» εν αντιθέσει με τις ανταγωνιστικές μεθόδους μέτρησης της 25(OH)D. Παρόλα αυτά, αυτό το πρόβλημα με το HAAA έχει καταγραφεί μόνο σε μία παλαιότερη μέθοδο της Diasorin LIAISON και όχι στην μέθοδο RIA, χωρίς να αποκλείεται το ενδεχόμενο να υπάρχει και τώρα και να μην έχει παρατηρηθεί(52).

Παρά το γεγονός ότι υπάρχουν αρκετοί παράγοντες που συμβάλουν στην μεταβλητότητα των αποτελεσμάτων των αυτοματοποιημένων μεθόδων, πρέπει να τονιστεί ότι οι αυτοματοποιημένες μέθοδοι γενικά έχουν βελτιωθεί σημαντικά. Έχει φανεί μία σταδιακή μείωση στη λειτουργική ευαισθησία από 30% το 1995 στο 15% το 2011. Ποσοστό το οποίο προβλέπεται ότι θα μειωθεί ακόμη περισσότερο στο μέλλον από την στιγμή που οι κατασκευαστές προχωρούν ραγδαία σε περαιτέρω βελτιώσεις(52).

1.2.5 Υγρή Χρωματογραφία

Η μέθοδος της υγρής χρωματογραφίας για την μέτρηση της 25(OH)D είναι η μέθοδος με την μεγαλύτερη ακρίβεια που υπάρχει με βάση την σημερινή τεχνολογία. Οι δύο κύριες μορφές υγρής χρωματογραφίας που χρησιμοποιούνται για την μέτρηση της 25(OH)D είναι η HPLC με ανίχνευση υπεριώδους ακτινοβολίας (UV detection) και η LC-MS/MS. Οι χρωματογραφικές μέθοδοι έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να μετρήσουν ξεχωριστά την 25(OH)D₃ και την 25(OH)D₂ καθώς και άλλους μεταβολίτες της βιταμίνης D. Στον αντίποδα όμως ως αρνητικό στην μέθοδο της χρωματογραφίας έχουμε το γεγονός ότι δεν μπορούμε να έχουμε παραγωγή μεγάλου όγκου αποτελεσμάτων σε καθημερινή βάση, καθώς και ότι απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό. Για την μέτρηση της βιταμίνης D στον ορό οι μέθοδοι HPLC και LC-MS/MS αρχίζουν με αποπρωτεΐνωση που ακολουθείται από εκχύλιση και καθαρισμό του δείγματος. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός πραγματοποιείται με ανάστροφης φάσης αναλυτική στήλη (που συνήθως περιέχουν C18 στήλες/σωματίδια). Στην HPLC η ανίχνευση γίνεται με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας με μήκος κύματος στα 265nm. Στην LC-MS/MS χρησιμοποιείται ένας ανιχνευτής μάζας. Οι μέθοδοι αυτοί εκτελούνται σε διάφορα εξειδικευμένα εργαστήρια, τα οποία μεταξύ τους έχουν μικρές διαφοροποιήσεις στο πρωτόκολλο.

1.2.5.1 HPLC

Στην HPLC τα δείγματα προς εξέταση έχουν εύρος όγκου που κυμαίνεται από 0,5-1ml. Η αποπρωτεΐνωση επιτυγχάνεται με την χρήση ακετονιτριλίου, αιθανόλης, ή ενός μίγματος ακετονιτριλίου και αιθανόλης ή μεθανόλη. Ακολούθως οι μεταβολίτες της βιταμίνης D συνήθως ποσοτικοποιούνται με την μέτρηση απορρόφησης της υπεριώδους ακτινοβολίας στα 265nm. Παρόλα αυτά μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν μέθοδοι ηλεκτροχημικής ανίχνευσης. Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως η HPLC μπορεί να μετρήσει και της δύο μορφές της 25(OH)D καθώς και των υπολοίπων μεταβολιτών της βιταμίνης D.

Όσον αφορά την ακρίβεια των μετρήσεων η HPLC έχει την δυνατότητα να δίνει μετρήσεις με πολύ μεγάλη ακρίβεια. Ωστόσο αυτό συμβαίνει μόνο όταν η χρήση των μηχανημάτων της HPLC γίνεται από εξειδικευμένο προσωπικό. Η χρησιμοποίηση από προσωπικό μη καταρτισμένο, μπορεί να έχει σαν απόρροια να παρερμηνευτούν τα αποτελέσματα από την UV απορρόφηση και να θεωρηθούν λανθασμένες κορυφές ως κορυφές της 25(OH)D₂ και αυτό να έχει ως αποτέλεσμα την υπερεκτίμηση της 25(OH)D. Ακόμη ένα θέμα μπορεί να προέλθει από τα λιπίδια στα δείγματα των ασθενών, τα οποία μπορεί να διαταράζουν την έκλυση των μεταβολιτών της 25(OH)D. Ως εκ τούτου, τα βήματα καθαρισμού είναι απαραίτητα για να υπάρξουν αξιόπιστα αποτελέσματα.

Σε όλες τις έρευνες η HPLC δείχνει αποδεκτά χαρακτηριστικά επιδόσεων με πολλή μεγάλη ακρίβεια. Επιπλέον υπάρχει ταύτιση και με τα αποτελέσματα από την LC-MS/MS. Τα κύρια μειονέκτημα της HPLC είναι η μεγάλη απαίτηση όγκου δείγματος προς εξέταση, ο μικρός όγκος μετρήσεων - αναλύσεων που μπορεί να γίνουν σε καθημερινή βάση, η ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού και τέλος το υψηλό κόστος του εξοπλισμού(52, 67-70).

1.2.5.2 LC-MS/MS

Η LC-MS/MS θεωρείται ως η καλύτερη τεχνική για την μέτρηση της 25(OH)D και η ακρίβεια της έχει αποδειχθεί ότι είναι άριστη, καθώς η αυξανόμενη αναλυτική ειδικότητα που παρέχεται από την ανίχνευση της φασματοσκοπίας μάζας προσφέρει τη δυνατότητα για υψηλή ακρίβεια. Επίσης η LC-MS/MS ξεπερνά και πολλές από τις δυσκολίες που συνδέονται με τις ανοσολογικές μεθόδους. Επιπροσθέτως, αναγνωρισμένες μέθοδοι αναφοράς (reference methods) για την 25(OH)D₂ και την 25(OH)D₃ έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας μεθοδολογία αραίωσης ισοτόπου LC-MS/MS.

Ο όγκος δείγματος κυμαίνεται από 100μl έως 200μl. Η αποπρωτεΐνωση επιτυγχάνεται με την χρήση ακετονιτριλίου, ακετονιτριλίου με υδροξυδείο του νατρίου ή μεθανόλη. Η εκχύλιση μπορεί να είναι είτε εκχύλιση στερεής φάσης με στήλες C8 ή C18 είτε

εκχύλιση υγρού/υγρού με χρήση εξανίου. Κατά την διάρκεια της ανίχνευσης μάζας τα μόρια ιονίζονται είτε με χημικό ιονισμό ατμοσφαιρικής πίεσης είτε με ηλεκροψεκασμό ιονισμού ατμοσφαιρικής πίεσης. Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός επιτεύχθηκε είτε με αντίστροφης φάσης C8 ή C18, είτε με ισοδύναμο αναλυτή HPLC με αναλυτική στήλη(64, 71-73).

Ωστόσο η LC-MS/MS δεν είναι τέλεια και είναι επιρρεπής σε διάφορες παρεμβολές. Μια κατηγορία παρεμβολών ειδικά για τις μεθόδους φασματοσκοπίας μάζας είναι τα ισότοπα με το ίδιο ατομικό βάρος (Isobars). Αυτά είναι ενώσεις με το ίδιο μοριακό βάρος με την 25(OH)D που σχηματίζουν πρόδρομα μόρια ή προϊόντα ζευγών ιόντων με τις ίδιες αναλογίες μάζας προς φορτίο με εκείνο της 25(OH)D. Τα isobars είναι ένα μείζον θέμα, κυρίως για τις LC-MS/MS ρουτίνες. Η LC-MS/MS ρουτίνες είναι απλές αυτοματοποιημένες LC-MS/MS με μεγάλη παραγωγή αποτελεσμάτων την ημέρα. Μπορούν να διενεργήσουν μετρήσεις σε περισσότερα από 300 δείγματα την ημέρα. Οι LC-MS/MS ρουτίνες χρησιμοποιούν σύντομους χρόνους «τρεξίματος» χρωματογραφίας, όπου τα isobars μπορεί να εκλουστούν ταυτόχρονα με την 25(OH)D. Χαρακτηριστικό παράδειγμα isobar είναι η 7^α-υδροξυ-4-χολεστεν-3-όνη. Επίσης οι περισσότερες LC-MS/MS ρουτίνες δεν μπορούν να διαχωρίσουν την 3-επι-25(OH)D από την 25(OH)D.

Παρόλα αυτά, το θέμα αυτό επιλύεται αυξάνοντας τον χρόνο του χρωματογραφικού διαχωρισμού των επιμερών και των isobars. Με τον τρόπο αυτό όμως μειώνεται η πρακτικότητα της μεθόδου και κυρίως στην εφαρμογή της στην καθημερινότητα. Ουσιαστικά λύνοντας το πρόβλημα των παρεμβολών από τα ισότοπα και τα isobars, επαναφέρουμε το πρόβλημα του μικρού όγκου μετρήσεων σε καθημερινή βάση. Οπότε προκύπτει ένα δίλλημα μεταξύ της LC-MS/MS ρουτίνες με πιθανές παρεμβολές από ισότοπα και isobars ή LC-MS/MS χωρίς πιθανότητα παρεμβολών, αλλά με λιγότερες μετρήσεις δειγμάτων την ημέρα. Βεβαίως δεν αποκλείεται στο μέλλον με την τεχνολογική ανάπτυξη να βρεθεί λύση στις LC-MS/MS ρουτίνες για να απαλειφθεί το πρόβλημα των παρεμβολών, αφού έρευνες γίνονται προς αυτή την κατεύθυνση.

Ένα ακόμη μεγάλο πρόβλημα που οδηγούσε σε αναντιστοιχία αποτελεσμάτων μεταξύ των LC-MS/MS ήταν η έλλειψη υλικών αναφοράς καθώς και αναφορών της διαδικασίας μέτρησης. Ουσιαστικά τα διάφορα εργαστήρια χρησιμοποιούσαν διαφορετικά υλικά για τις LC-MS/MS και είχαν και διαφορετικό τρόπο προετοιμασίας

των προς ανάλυση δειγμάτων. Αυτό όμως αρχίζει να επιλύεται σιγά σιγά με την εισαγωγή του NIST που πρόκειται ουσιαστικά για αναφορά σε συγκεκριμένα υλικά, δηλαδή είναι σαν ένα πρωτόκολλο χρησιμοποίησης υλικών για να υπάρχει ταύτιση αποτελεσμάτων μεταξύ των διαφόρων εργαστηρίων που χρησιμοποιούν LC-MS/MS. Έτσι με την χρησιμοποίηση αυτού του κοινού προτύπου έχει αποδειχθεί μια βελτιστοποίηση στην συμφωνία αποτελεσμάτων μεταξύ διαφορετικών LC-MS/MS ακόμη και όταν υπάρχουν διαφορές στις διαδικασίες προετοιμασίας του δείγματος και της εξαγωγής του(64, 71, 73-79).

1.2.6. Συγκριτικά οι μέθοδοι μέτρησης της βιταμίνης D

Δεδομένου του εύρους των μεθοδολογιών οι οποίες είναι διαθέσιμες για την μέτρηση της 25(OH)D, η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου για το εκάστοτε εργαστήριο αποτελεί πρόκληση. Μία πρόκληση η οποία γίνεται εντονότερη τα τελευταία χρόνια με την δραματική αύξηση των μεθόδων τόσο σε επίπεδο καθημερινών κλινικών μετρήσεων, όσο και σε επίπεδο έρευνας. Ωστόσο καθίσταται σαφές πως για την εκάστοτε μέθοδο υπάρχουν πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

Μια πληθώρα ερευνών τονίζουν τις δυνατότητες των ανοσολογικών μεθόδων που «τρέχουν» σε αυτοματοποιημένες πλατφόρμες και επισημαίνουν το γεγονός ότι σε θέματα χρηστικότητας, διευκόλυνσης και μεγάλης παραγωγικότητας αποτελεσμάτων (μετρήσεων δειγμάτων) οι ανοσολογικές μέθοδοι έχουν ισχυρό πλεονέκτημα. Ένα πλεονέκτημα το οποίο είναι σημαντικό για εργαστήρια τα οποία χρειάζεται να αναλύσουν τεράστιο όγκο δειγμάτων σε καθημερινή βάση. Η έρευνα του Wootton έδειξε ότι η μέτρηση της 25(OH)D από ανοσολογικές μεθόδους παραμένει η μέθοδος επιλογής για λόγους γρήγορης διεκπεραίωσης, ευκολίας και κόστους. Η έρευνα του Hollis και Horst πρότεινε ότι εργαστήρια που έχουν μεγάλο όγκο δειγμάτων προς μέτρηση, άρα και μεγάλη ανάγκη παραγωγικότητας αποτελεσμάτων, θα ήταν πιο κατάλληλο να χρησιμοποιούν τις εμπορικές μεθόδους μετρήσεων της 25(OH)D όπως είναι η ELISA και η RIA. Επιπροσθέτως επεσήμαναν το γεγονός ότι οι μετρήσεις αυτές από ανειδίκευτο προσωπικό θα έδιναν ακόμη μεγαλύτερο εύρος διακύμανσης των αποτελεσμάτων, το οποίο σημαίνει ότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων θα ήταν ακόμη

περισσότερο ανακριβή. Με αυτά τα δεδομένα πολλές έρευνες οδηγούνται στο συμπέρασμα ότι οι πιο απλές και οι πιο εύκολες μέθοδοι, όπως οι ανοσολογικές, έχουν θυσιάσει την αναλυτική ακρίβεια στον βωμό της σκοπιμότητας και είναι ικανές να παρουσιάσουν αποτελέσματα τα οποία θα είναι ικανά να δείξουν μία σχετική κατάσταση της βιταμίνης D χωρίς να οδηγούν σε διαφορετικό κλινικό συμπέρασμα, αλλά και χωρίς να έχουν μεγάλη ακρίβεια.

Η αλήθεια είναι ότι με την σωστή χρήση, οι τυποποιημένες ανοσολογικές μέθοδοι, μπορούν να είναι ένα εξαιρετικό εργαλείο στα χέρια των ιατρών, αλλά με τις δεδομένες συνθήκες και τεχνολογίες, είναι αδύνατο να περιμένουμε να πλησιάσουν την ακρίβεια των αποτελεσμάτων που δίνουν η HPLC και η LC-MS/MS. Παρόλα αυτά η HPLC και η LC-MS/MS απαιτούν αρκετά πιο ακριβό εξοπλισμό και αρκετά πιο εξειδικευμένο προσωπικό.

Η προσπάθεια σύγκρισης αποτελεσμάτων δεν μπορεί να είναι στο επιθυμητό επίπεδο λόγω του γεγονότος ότι υπάρχει έλλειψη μια προτεινόμενης μεθόδου αναφοράς. Τα τελευταία χρόνια μια νέα μέθοδος η οποία βασίζεται στην αέρια φασματοσκοπία μάζας (GCMS-gas chromatography mass spectrometry) είναι υπό ανάπτυξη. Μία τέτοια μέθοδος θα ήταν δύσκολο να λειτουργεί σε καθημερινή βάση, εξαιτίας της έντονης εργασίας η οποία απαιτείται, αλλά θα ήταν εξαιρετικά χρήσιμη για λόγους σύγκρισης αποτελεσμάτων. Επιπλέον υπάρχουν προσπάθειες να αποκτηθεί μια μέθοδος αναφοράς για την LC-MS/MS με την εξασφάλιση ενός πρωτοκόλλου μετρήσεως της 25(OH)D με συστηματοποιημένες διαδικασίες και πρότυπα υλικά(50, 80-83).

Παρακάτω παρατίθεται πίνακας με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των μεθόδων

Πίνακας 4 – Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα μεθόδων μέτρησης της Βιταμίνης D

	<u>Ανοσολογικές τεχνικές</u>	<u>Χρωματογραφικές τεχνικές</u>
<u>Πλεονεκτήματα</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Χαμηλό LOD, LOQ ➤ Χαμηλό κόστος εξοπλισμού ➤ Ανεπίδικο προσωπικό ➤ Αυτοματοποιημένη διαδικασία μέτρησης ➤ Μεγάλος αριθμός μετρήσεων στην ρουτίνα 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Υψηλή ειδικότητα (D2/D3) ➤ Χαμηλό LOD, LOQ ➤ Χαμηλό κόστος αντιδραστηρίων ➤ Καθολική τεχνική
<u>Μειονεκτήματα</u>	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Υψηλό κόστος αντιδραστηρίων ➤ Προβλήματα ειδικότητας (cross reactivity) ➤ Kit-διακυμάνσεις επιπέδων ➤ Επεξεργασία δειγμάτων ➤ Χρήση HAAA (human anti-animal antibodies) ➤ Παρεμβολές από λιπίδια ➤ Μέτρηση 25(OH)D₂ και 25(OH)D₃ 	<ul style="list-style-type: none"> ➤ Κόστος εξοπλισμού ➤ Απαιτείται βήμα απομόνωσης και καθαρισμού ➤ Εξειδικευμένο προσωπικό ➤ Μικρός αριθμός μετρήσεων στην ρουτίνα ➤ Μη αυτοματοποιημένη μέθοδος ➤ Σε αυτοματοποιημένη μέθοδο → μικρούς χρόνους καθαρισμού → παρεμβολές από λιπίδια και isobars.

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Είδη χρωματογραφίας

Στην χρωματογραφία έχουμε τέσσερα είδη. Την χρωματογραφία στήλης στην οποία ανήκει και η HPLC που χρησιμοποιήθηκε στην διπλωματική, την χρωματογραφία χάρτου, την χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) και τέλος την αέρια χρωματογραφία (GC)(84).

Όσον αφορά την χρωματογραφία στήλης είναι η πρώτη ιστορικά χρωματογραφία που πραγματοποιήθηκε. Σε αυτήν λοιπόν, μία στήλη (σωλήνας) είναι γεμάτη με το κατάλληλο για τον επιθυμητό διαχωρισμό προσροφητικό υλικό (τα συνηθέστερα είναι το οξείδιο του πυριτίου και η αλουμίνα), τοποθετημένη κάθετα. Στο άνω μέρος της στήλης τοποθετείται το δείγμα και ακολουθεί έκλυση. Κατάλληλα επιλεγμένος διαλύτης τοποθετείται στο πάνω μέρος της στήλης και όπως ρέει προς τα κάτω εκλύει και το δείγμα. Έτσι μέσα στη στήλη επιτελείται ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος, τα οποία είναι ορατά σε χρωματιστές ζώνες (εξ ου και το όνομα χρωματογραφία), εφόσον βέβαια τα συστατικά είναι έγχρωμα. Αν δεν είναι έγχρωμα, ο διαχωρισμός είναι εξίσου καλός, αλλά επειδή δεν είναι ορατά με το μάτι χρησιμοποιούνται διάφορες τεχνικές για να τα αντιληφθεί ο αναλυτής (π.χ. αν φθορίζουν στο υπεριώδες φως τα φωτίζει με τέτοιο, οπότε έχουμε φθορίζουσες ζώνες). Εξέλιξη της χρωματογραφίας στήλης είναι η χρωματογραφία υψηλής πίεσης ή απόδοσης (HPLC - High pressure (performance) liquid chromatography)(84).

Συνέχεια έχει η χρωματογραφία χάρτου η οποία είναι η πιο απλή μορφή χρωματογραφίας. Στην άκρη από ένα κομμάτι χαρτί (ακίνητη φάση) τοποθετείται μια κηλίδα δείγματος. Το χαρτί βυθίζεται στον κατάλληλο διαλύτη (κινητή φάση) από την μεριά της κηλίδας, και όπως το χαρτί διαποτίζεται σιγά-σιγά από το διαλύτη, εκλύονται τα συστατικά του δείγματος και γίνεται ο διαχωρισμός.

Επόμενη χρωματογραφία είναι η λεπτής στιβάδας και είναι ανάλογη της χρωματογραφίας χάρτου, αλλά αντ' αυτού χρησιμοποιείται λεπτή στιβάδα προσροφητικού υλικού που στηρίζεται πάνω σε λεία επιφάνεια (συνήθως οξείδιο πυριτίου ή αλουμίνα πάνω σε γυάλινη πλάκα). Έχει πολύ καλύτερη ικανότητα

διαχωρισμού από την χρωματογραφία χάρτου και επίσης είναι πιο ανθεκτική σε έντονα διαλυτικά μέσα π.χ. ένα οξύ το οποίο θα κατέστρεφε το χαρτί.

Τέλος έχουμε την αέρια χρωματογραφία, όπου σε αυτήν η κινητή φάση είναι ένα αέριο και η όλη οργανολογία είναι αρκετά πολύπλοκη. Το δείγμα εισάγεται σε ένα χώρο που αεριοποιείται άμεσα. Αυτό σημαίνει ότι όλα τα συστατικά του δείγματος πρέπει να μπορούν να αεριοποιηθούν (αναλυτικός περιορισμός). Το αέριο πλέον δείγμα παρασύρεται μέσα σε μια στήλη που περιέχει ένα προσροφητικό υλικό, οπότε γίνεται ο διαχωρισμός. Έτσι από την άλλη άκρη της στήλης εξέρχονται με τη σειρά τα διαχωρισθέντα συστατικά. Από εκεί οδηγούνται στον ανιχνευτή (ηλεκτρονικό μέρος) ο οποίος στέλνει το σήμα σε ένα καταγραφικό ανάλογα με την ένταση ανίχνευσης. Πετυχαίνει πάρα πολύ καλούς διαχωρισμούς, ενώ η ικανότητα ανίχνευσης των αναλυόμενων συστατικών είναι πολύ μεγάλη.

Η παρούσα εργασία όμως ασχολείται μόνο με την χαρτογραφία στήλης και πιο συγκεκριμένα με την υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης. Τα είδη της υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης διαχωρίζονται σε χρωματογραφία προσρόφησης (η οποία διαχωρίζεται σε χρωματογραφία κανονικής φάσης και σε χρωματογραφία αντίστροφης φάσης), σε χρωματογραφία κατανομής, σε χρωματογραφία Ιοντοανταλλαγής, σε χρωματογραφία συγγένειας και τέλος σε χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους(84).

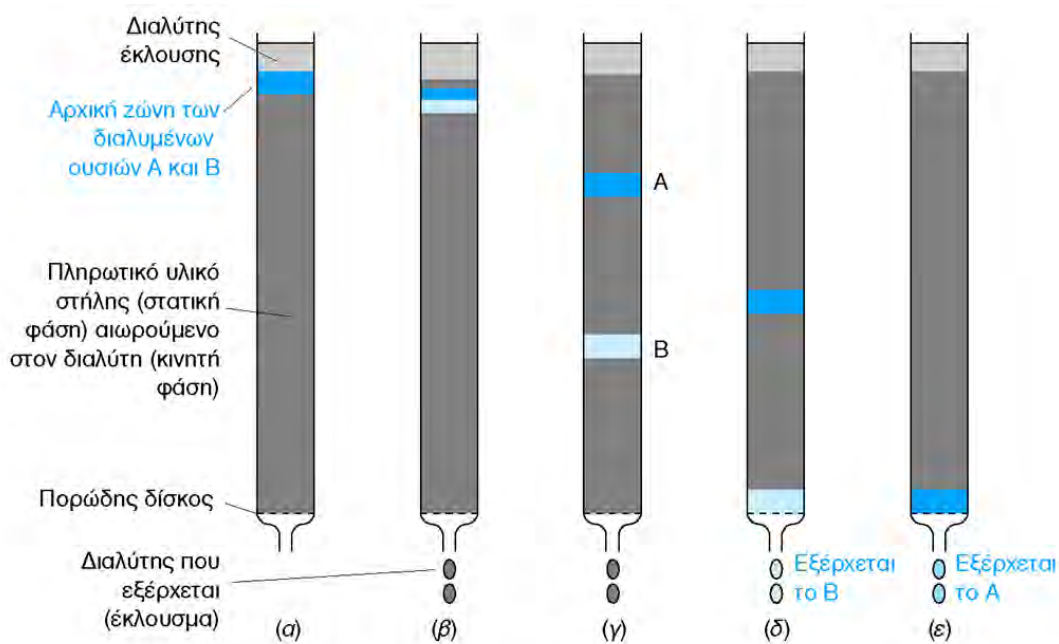
2.2 HPLC - Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης



Στην παρούσα διπλωματική χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις το συγκεκριμένο μοντέλο HPLC, το Dionex model ultimate 3000(85).

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC-High Performance Liquid Chromatography) είναι μία χρωματογραφική τεχνική και ο διαχωρισμός είναι αποτέλεσμα της δράσης τόσο μίας στατικής όσο και μίας κινητής φάσης. Στην χρωματογραφία το δείγμα τοποθετείται στην μία άκρη ενός υλικού προσρόφησης

που ουσιαστικά είναι η στατική φάση. Εν συνεχεία αυτό εκλούεται από την κινητή φάση, στην οποία χρησιμοποιούνται αδρανείς διαλύτες (H₂O, οργανικοί διαλύτες, ρυθμιστικά διαλύματα κλπ) με ελεγχόμενη πίεση και έχει κατεύθυνση προς την άλλη άκρη της στατικής φάσης, η οποία συνήθως αποτελείται από πυριτική πηκτή ή από άλλες πολυμερείς ενώσεις. Με τον τρόπο αυτό έχουμε τον διαχωρισμό τους, μιας και όσες ουσίες προσροφώνται ισχυρά κινούνται αργά, ενώ αυτές που δεν προσροφώνται ισχυρά από την στατική φάση 'τρέχουν' πρώτες και συνήθως αυτές είναι πολύ διαλυτές στην κινητή φάση. Τα συστατικά κινούνται με την μορφή ζωνών και εκλούνται το ένα μετά το άλλο. Οι διαφορές στην κινητικότητα των συστατικών ανάμεσα στις δύο φάσεις έγκειται στις διαφορές που υφίστανται ανάμεσα στα διάφορα συστατικά ενός μείγματος. Οι διαφορές αυτές είναι αρκετές όπως το σημείο ζέσεως, το ηλεκτρικό φορτίο, το μέγεθος των μορίων κλπ. Έτσι επιτυγχάνεται ο διαχωρισμός. Αυτή είναι και η αρχή με την οποία δρα η χρωματογραφία(Εικόνα 6).



Εικόνα 6 - Τρόπος λειτουργίας της χρωματογραφίας στήλης. Η διαλυμένη ουσία A εμφανίζει μεγαλύτερη συγγένεια προς την στατική φάση σε σχέση με την ουσία B, οπότε παραμένει περισσότερο χρόνο στην στήλη(86).

2.2.1 Είδη υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC)

2.2.1.1 Χρωματογραφία προσρόφησης

Στην χρωματογραφία προσρόφησης η σημαντικότερη αλληλεπίδραση που λαμβάνει χώρα είναι ηλεκτροστατικής φύσης και ο διαχωρισμός των ουσιών επιτυγχάνεται χάρη στο διαφορετικό βαθμό προσρόφησης στη στατική φάση. Συνήθως η χρωματογραφία προσρόφησης χρησιμοποιείται στον διαχωρισμό ουσιών τα οποία έχουν παραπλήσια δομή, αλλά διαφορετική πολικότητα. Η χρωματογραφία προσρόφησης χωρίζεται σε δύο κατηγορίες, την χρωματογραφία κανονικής φάσης και την χρωματογραφία αντίστροφης φάσης. Αυτό προκύπτει ανάλογα με την σχέση πολικότητας μεταξύ της στατικής και κινητής φάσης(87).

- *Χρωματογραφία κανονικής φάσης*

Στην εν λόγω κατηγορία η στατική φάση είναι πολικότερη της κινητής φάσης. Εδώ η στατική φάση αποτελείται συνήθως από SiO_2 ή Al_2O_3 και η κινητή από μη πολικούς διαλύτες με χαρακτηριστικά παραδείγματα το εξάνιο ή το χλωροφόρμιο.

- *Χρωματογραφία αντίστροφης φάσης*

Σε αντίθεση με την κανονικής φάσης χρωματογραφία, εδώ η στατική φάση είναι λιγότερο πολική της κινητής. Η στατική φάση αποτελείται από οξείδιο του πυριτίου συζευγμένο με διάφορες χημικές ομάδες, όπως αλκύλια, φαινύλιο, διόλες, αμινομάδες κλπ. Όσον αφορά την κινητή φάση αυτή αποτελείται από μείγματα οργανικών διαλυτών με υδατικά ρυθμιστικά διαλύματα και νερό(87).

2.2.1.2 Χρωματογραφία κατανομής

Η χρωματογραφία κατανομής εφαρμόζεται στην ανάλυση ομόλογων μη ιονικών ενώσεων. Ο διαχωρισμός στηρίζεται στην διαφορετική κατανομή των συστατικών ενός μείγματος(87).

2.2.1.3 Χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής

Η χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής επιτυγχάνεται στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα αναλυόμενα ιόντα και στις φορτισμένες ομάδες της

στατικής φάσης(87). Οι παράμετροι οι οποίες καθορίζουν την συγκράτηση στη χρωματογραφία ιοντοανταλλαγής είναι οι εξής:

1. Αντίθετο ιόν της δραστικής ομάδας της στατικής φάσης
2. Ιονική ισχύς
3. pH
4. Θερμοκρασία
5. Ο τροποποιητής της κινητής φάσης

2.2.1.4 Χρωματογραφία συγγένειας

Στην χρωματογραφία συγγένειας ανήκει και η χρωματογραφία εναντιομερών. Στην χρωματογραφία συγγένειας η επίτευξη του διαχωρισμού πραγματοποιείται με την εκλεκτική δέσμευση των προσδιορισμένων ενώσεων σε συγκεκριμένους υποκαταστάτες οι οποίοι είναι συνδεδεμένοι στην επιφάνεια του διοξειδίου του πυριτίου(87).

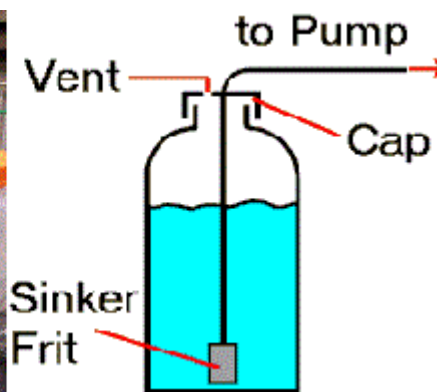
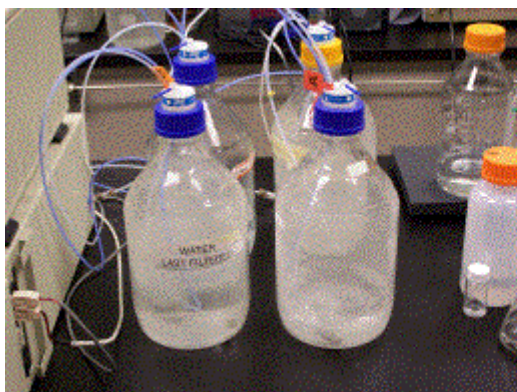
2.2.1.5 Χρωματογραφία αποκλεισμού μεγέθους ή διάχυσης πηκτής

Η εν λόγω χρωματογραφία χρησιμοποιείται στην ανάλυση και τον χαρακτηρισμό των πολυμερών. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με βάση το σχήμα και το μέγεθος των μορίων. Αυτό που συμβαίνει είναι αρχικά τα μεγάλα μόρια να εξέρχονται από την στήλη και να ακολουθούν τα μικρότερα. Ο λόγος αυτού του φαινομένου είναι ότι τα μικρά μόρια εισέρχονται στους πόρους των σωματιδίων της στατικής φάσης και καθυστερούν να εξέλθουν(87).

2.2.2 HPLC και σημαντικότερα μέρη (εξαρτήματα) που την αποτελούν

2.2.2.1 Φιάλες αποθήκευσης διαλυτών

Οι φιάλες (reservoirs) των υγρών διαλυτών της κινητής φάσης. Είναι κοινές γυάλινες φιάλες αντιδραστηρίων στις οποίες τοποθετούνται είτε καθαροί οργανικοί διαλύτες ή νερό υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) ή ρυθμιστικά διαλύματα, ή μίγματα αυτών.



2.2.2.2 Αντλία



Οι αντλίες πίεσης (pumps) για τη ροή των διαλυτών, με τη βαλβίδα ανάμιξης και προγραμματισμού ροής αυτών. Είναι παλινδρομικές αντλίες με τις οποίες παραλαμβάνονται οι διαλύτες από τις φιάλες με πίεση, διέρχονται από τον εγχυτή και οδεύουν προς τη στήλη. Ο αναμίκτης –

προγραμματιστής ροής είναι ηλεκτρονικά ρυθμιζόμενος και ελέγχει την πίεση και τη ροή των διαλυτών καθώς και την αναλογία ανάμιξης και μεταβολής αυτής, κατά τη διαδικασία της ανάλυσης.

2.2.2.3 Μονάδα εισαγωγής δείγματος

Ο θάλαμος εισαγωγής του δείγματος (injector). Στο θάλαμο αυτό εισάγεται το δείγμα υπό μορφή διαλύματος με ειδική σύριγγα. Το δείγμα παραμένει εκεί μέχρι να το παραλάβουν οι διαλύτες της κινητής φάσης και να το οδηγήσουν προς τη στήλη.



2.2.2.4 Στήλη ανίχνευσης/χρωματογραφική στήλη

Η στήλη ανάλυσης (analytical column) του δείγματος. Είναι ένας ευθύγραμμος κυλινδρικός σωλήνας από ανοξείδωτο ατσάλι μικρού μήκους και διαμέτρου, που στο εσωτερικό του βρίσκεται ειδικά συσκευασμένο υπό πίεση (packed) το προσροφητικό υλικό επί του οποίου θα γίνει ο διαχωρισμός των συστατικών του δείγματος. Τα συστατικά αυτά, μεταφέρονται από τους διαλύτες της κινητής φάσης, (με διαφορετική ταχύτητα έκλουσης το καθένα), από τη στήλη προς τον ανιχνευτή.



2.2.2.5 Ανιχνευτής



Ο ανιχνευτής (detector) ή οι ανιχνευτές για την ανίχνευση των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος. Είναι ένα ανεξάρτητο όργανο υψηλής τεχνολογίας, το οποίο υποδέχεται το έκλουσμα των διαχωρισμένων συστατικών του δείγματος, ανιχνεύοντας τα ένα προς ένα, ποιοτικά αλλά και ποσοτικά. Το σήμα του ανιχνευτή μεταβιβάζεται στο σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων.

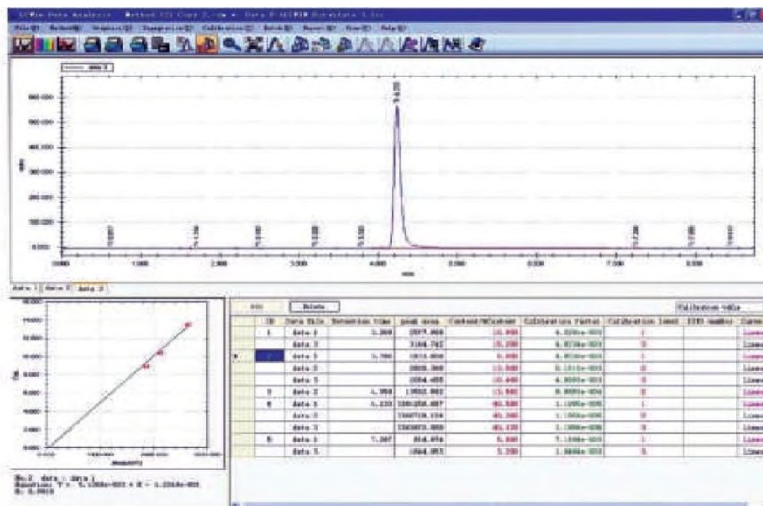
Οι ανιχνευτές στην HPLC χρησιμοποιούνται τόσο για τον ποιοτικό, όσο και για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ουσιών που θέλουμε να μελετήσουμε. Ο ρόλος τους είναι η διαρκής παρακολούθηση της κινητής φάσης που εξέρχεται

από την στήλη. Υπάρχουν διάφορα είδη ανιχνευτών και η επιλογή του κατάλληλου εξαρτάται από τις ιδιότητες του προς ανάλυση μίγματος. Οι ανιχνευτές οι οποίοι χρησιμοποιούνται κατά κόρον είναι:

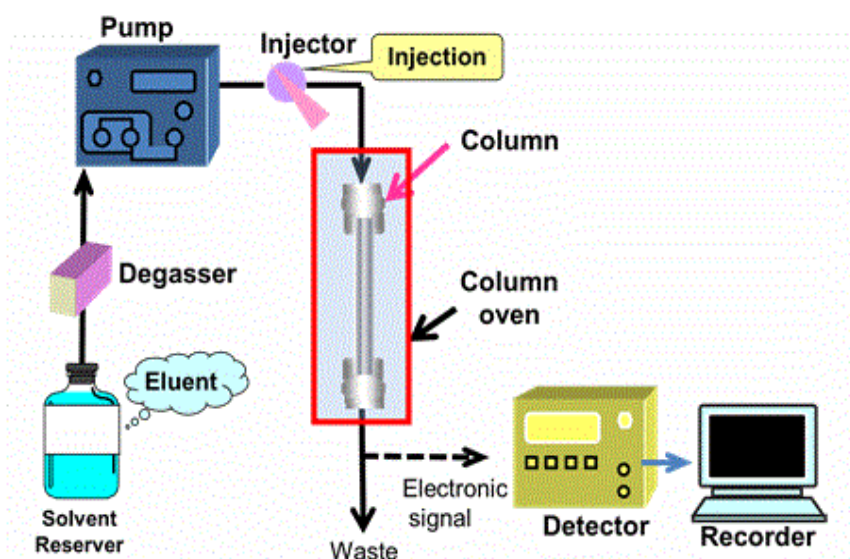
- Ανιχνευτής Υπεριώδους-Ορατού (UV-Vis Detector).
- Φθορισμομετρικός ανιχνευτής (Fluorescence Detector).
- Φασματογράφος μαζών (Mass Spectroscopic Detector)
- Ηλεκτροχημικός ανιχνευτής (Electrochemical Detector)
- Ανιχνευτής παράταξης φωτοδιόδων (Photodiode Array Detector).
- Ανιχνευτής δείκτη διάθλασης (Refractive Index Detector).
- Ανιχνευτής σκεδασμού φωτός (Light Scattering Detectors).

2.2.2.6 Σύστημα επεξεργασίας δεδομένων

Το σύστημα επεξεργασίας των δεδομένων, αποτελούμενο από τον ολοκληρωτή (integrator) ή τον υπολογιστή (computer), για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων και από τον καταγραφέα (recorder), για την καταγραφή του χρωματογραφήματος.



Ολόκληρη η διαδικασία για την μέτρηση ουσιών μέσω της HPLC καθώς και ο εργαστηριακός εξοπλισμός ο οποίος χρησιμοποιήθηκε υπάρχει συγκεντρωτικά στην παρακάτω Εικόνα 7.



Εικόνα 7 - Ένα τυπικό σύστημα HPLC και τα μέρη από τα οποία αποτελείται και τα οποία μέρη έχουν παρουσιαστεί άνωθεν αναλυτικά(88).

2.3 Μέθοδος Μέτρησης Diasorin LIAISON 25OH Vitamin D Total assay

Η ανάλυση LIAISON 25OH Vitamin D Total assay χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση της 25(OH)D και άλλων υδροξυλιωμένων μεταβολιτών της βιταμίνης D στον ανθρώπινο ορό. Η τεχνολογία στην οποία βασίζεται αυτή η μέθοδος είναι η τεχνολογία ανοσοπροσδιορισμού χημειοφωταύγειας (CLIA)(89). Το μηχάνημα στο οποίο επιτελείται ολόκληρη η διαδικασία φαίνεται στην παρακάτω Εικόνα(90).



Όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως ο καλύτερος δείκτης της κατάστασης της βιταμίνης D είναι η 25(OH)D. Αν και το βέλτιστο επίπεδο της 25(OH)D είναι ακόμη σε διαδικασία συζήτησης, ένα νούμερο της τάξεως $>32\text{ng/ml}$ ($>80\text{nmol/L}$) έχουν κριθεί ότι είναι επαρκή για την υγεία των οστών. Επιπροσθέτως πρέπει να επισημανθεί ότι η τοξικότητα της βιταμίνης D είναι ένα αναγνωρισμένο πρόβλημα, παρόλα αυτά σπάνια αποτελεί πρόβλημα. Η μέθοδος όμως αυτή χρησιμοποιείται για την έλλειψη της βιταμίνης D ακόμη και σε φαινομενικά υγιείς πληθυσμούς, φαινόμενο το οποίο αρχίζει να παίρνει διαστάσεις πανδημίας, όπως έχει προαναφερθεί.

Ο τρόπος αντιμετώπισης της υποβιταμίνωσης D πραγματοποιείται κυρίως με δύο τρόπους. Είτε με φαρμακευτική αγωγή με φάρμακα D2 και D3 σε δόσεις οι οποίες μπορεί να έχουν εύρος από 50.000IU/μήνα έως 50.000 IU/εβδομάδα, είτε με ενισχυμένες τροφές (έως και συμπληρώματα διατροφής) τα οποία μπορεί να περιέχουν μία εκ των δύο μορφών της βιταμίνης D. Ωστόσο για να υπάρχει ακριβής αξιολόγηση της συνολικής βιταμίνης D θα πρέπει να γίνεται μέτρηση τόσο της D2 και D3(89).

Επιπλέον έρευνες έχουν ανακαλύψει ένα ανενεργό επιμερές-3 της 25(OH)D το οποίο μπορεί να βρίσκεται στον ορό σε βρέφη μικρότερα του ενός έτους και σε πολύ μικρά ποσοστά σε ενήλικες και παιδιά. Αυτό είναι σημαντικό σε μία ανάλυση καθώς πρέπει να αποφεύγεται η μέτρησή του και να μετρούνται μόνο οι ενεργές μορφές D3 και D2(89).

2.3.1 Αρχή διαδικασίας LIAISON 25OH Vitamin D Total assay

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή η LIAISON 25OH Vitamin D Total assay είναι ένας συναγωνιστικός ανοσοπροσδιορισμός χημειοφωταύγειας για τον ποσοτικό προσδιορισμό της συνολικής 25(OH)D στον ορό. Κατά το πρώτο στάδιο της διαδικασίας πραγματοποιείται επώαση όπου η 25(OH)D αποσυνδέεται από την δεσμευτική πρωτεΐνη και εν συνεχεία δεσμεύεται στο συγκεκριμένο αντίσωμα στη στερεά κατάσταση. Στο επόμενο στάδιο και μετά το πέρασ 10 λεπτών προστίθεται βιταμίνη D συνδεδεμένη με ένα παράγωγο ισολουμινόλης που χρησιμεύει ως ιχνηθέτης. Μετά από μία δεύτερη επώαση 10 λεπτών ακολουθεί το στάδιο της έκπλυσης κατά το οποίο το αδέσμευτο υλικό απομακρύνεται. Κατόπιν έχουμε την εισαγωγή των αντιδραστηρίων εκκίνησης για να έχουμε την έναρξη της αντίδρασης χημειοφωταύγειας. Το φωτεινό σήμα το οποίο παράγεται μετريέται από ένα φωτοπολλαπλασιαστή σε σχετικές μονάδες φωτός (RLU) και το αποτέλεσμα είναι αντιστρόφως ανάλογο της συγκέντρωσης της 25(OH)D που υπάρχει στους βαθμονομητές, στα υλικά ελέγχου ή στα δείγματα(89).

2.3.2 Υλικά

Παρεχόμενα Υλικά

Μαγνητικά σωματίδια (2,4 ml)	SORB	Μαγνητικά σωματίδια επικαλυμμένα με αντίσωμα αίγας έναντι της 25(OH)D.
Ρυθμιστικό διάλυμα ανάλυσης (28 ml)	BUF AS	Ρυθμιστικό διάλυμα με 10% αιθανόλη, επιφανειοδραστικούς παράγοντες και 0,2% ProClin 300.
Σύζευγμα (4,5ml)	CONJ	25(OH)D συζευγμένη σε ένα παράγωγο ισολουμινόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα.
Βαθμονομητής 1 (1 ml)	CAL 1	Ανθρώπινος ορός BSA, <0,1% αζίδιο του νατρίου και 25(OH)D.
Βαθμονομητής 2 (1 ml)	CAL 2	Ανθρώπινος ορός BSA, <0,1% αζίδιο του νατρίου και 25(OH)D.
Αριθμός εξετάσεων		100

Απαιτούμενα υλικά που δεν παρέχονται

Αναλυτής LIAISON XL	Αναλυτής LIAISON
LIAISON Wash/System liquid	LIAISON Wash/System liquid
LIAISON XL Waste Bags	LIAISON Waste Bags
LIAISON XL Cuvettes	LIAISON Module
LIAISON XL Starter Kit	LIAISON XL Starter Kit
LIAISON XL Disposable Tips	LIAISON Starter Kit
	LIAISON Light Check
	LIAISON Light Check 12
	LIAISON Cleaning Kit

Πρόσθετα απαιτούμενα υλικά

- 1) LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL-Control Set
- 2) LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL-Specimen Diluent

2.3.3 Συλλογή και προετοιμασία δειγμάτων

Για την μέτρηση χρησιμοποιείται ανθρώπινος ορός, όπου τα δείγματα συνιστώνται να είναι δείγματα νηστείας χωρίς όμως αυτό να είναι απαραίτητο. Η αιμοληψία επιβάλλεται να πραγματοποιείται ασηπτικά μέσω φλεβοπαρακέντησης. Επίσης θα πρέπει να επιτραπεί η πήξη του αίματος και ο διαχωρισμός του ορού από το πήγμα να συντελείται το συντομότερο δυνατό. Η διαφύλαξη των δειγμάτων μπορεί να γίνει τόσο σε γυάλινα όσο και σε πλαστικά φιαλίδια. Η διατήρηση της ακεραιότητας των δειγμάτων δεν απαιτεί πρόσθετα ή συντηρητικά. Τα δείγματα τα οποία είναι ακατάλληλα για εξέταση είναι τα αιμολυμένα δείγματα ή τα υπερβολικά λιπαιμικά καθώς και δείγματα τα οποία περιέχουν σωματίδια ή παρουσιάζουν εμφανή μικροβιακή μόλυνση. Τα δείγματα θα πρέπει να διατηρούνται στους 2 έως 8°C αν ο προσδιορισμός τους εκτελεστεί εντός 120 ωρών από την συλλογή του δείγματος, ενώ σε διαφορετική περίπτωση η φύλαξη τους πρέπει να γίνεται στους -20°C. Καλό θα ήταν να υπάρχει αποφυγή επαναλαμβανόμενων κύκλων ψύξης-απόψυξης. Ο ελάχιστος όγκος που

απαιτείται για την εξέταση είναι 175μl για την πρώτη εξέταση και 25μl για κάθε πρόσθετη εξέταση(89).

2.3.4 Διαδικασία Ανάλυσης

LIAISON Analyser: Κάθε παράμετρος εξέτασης αναγνωρίζεται μέσω γραμμικού κώδικα στη συσκευασία αντιδραστηρίων. Εάν δεν είναι δυνατή η σάρωση του γραμμωτού κώδικα από τον αναλυτή, η συσκευασία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί(89).

LIAISON XL Analyser: Κάθε παράμετρος εξέτασης αναγνωρίζεται από τις κωδικοποιημένες πληροφορίες στον πομποδέκτη ταυτοποίησης μέσω ραδιοσυχνοτήτων (RFID) της συσκευασίας αντιδραστηρίων. . Εάν δεν είναι δυνατή η σάρωση της ετικέτας του RFID από τον αναλυτή, η συσκευασία δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί(89).

Οι λειτουργίες του αναλυτή είναι οι εξής:

1. Διανομή δείγματος, βαθμονομητή ή υλικού ελέγχου στην υπομονάδα αντίδρασης
2. Διανομή μαγνητικών σωματιδίων και ρυθμιστικού διαλύματος ανάλυσης στην υπομονάδα αντίδρασης
3. Επώαση
4. Διανομή ιχνηθέτη στην υπομονάδα αντίδρασης
5. Επώαση
6. Έκπλυση με υγρό πλύσης/συστήματος
7. Προσθήκη αντιδραστηρίων εκκίνησης και μέτρηση του εκλυόμενου φωτός.

2.3.5 Εύρος τιμών μέτρησης

Η ανάλυση LIASON 25OH Vitamin D Total assay έχει εύρος μέτρησης από 4 έως 150 ng/ml. Η κατώτατη αναφερόμενη τιμή είναι 4ng/ml η οποία βασίζεται στην ακρίβεια μεταξύ των αναλύσεων που είναι περίπου ίση με 20% CV (λειτουργική ευαισθησία). Η υψηλότερη τιμή που μπορεί να αναφερθεί χωρίς αραίωση είναι 150ng/ml(89).

2.3.6 Αναμενόμενες τιμές

Είναι σημαντικό το εκάστοτε εργαστήριο να καθιερώσει το δικό του εύρος αναφοράς, το οποίο θα είναι και αντιπροσωπευτικό του πληθυσμού. Όπως αναφέρθηκε και αρχικά παράγοντες όπως η έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία, η εποχή, η φυλή και η διατροφή επηρεάζουν τις συγκεντρώσεις της 25(OH)D στους ανθρώπους. Μία υψηλή επικράτηση της υποκλινικής έλλειψης 25(OH)D παρατηρείται σε πολλές χώρες ιδιαίτερα κατά την χειμερινή περίοδο(89).

Κατάσταση βιταμίνης D	25(OH)D	25(OH)D
Έλλειψη	<10 ng/ml	<25 nmol/L
Ανεπάρκεια	10-30 ng/ml	25-75 nmol/L
Επάρκεια	30-100 ng/ml	75-250 nmol/L
Τοξικότητα	>100 ng/ml	>250 nmol/L

2.3.7 Λειτουργική ευαισθησία

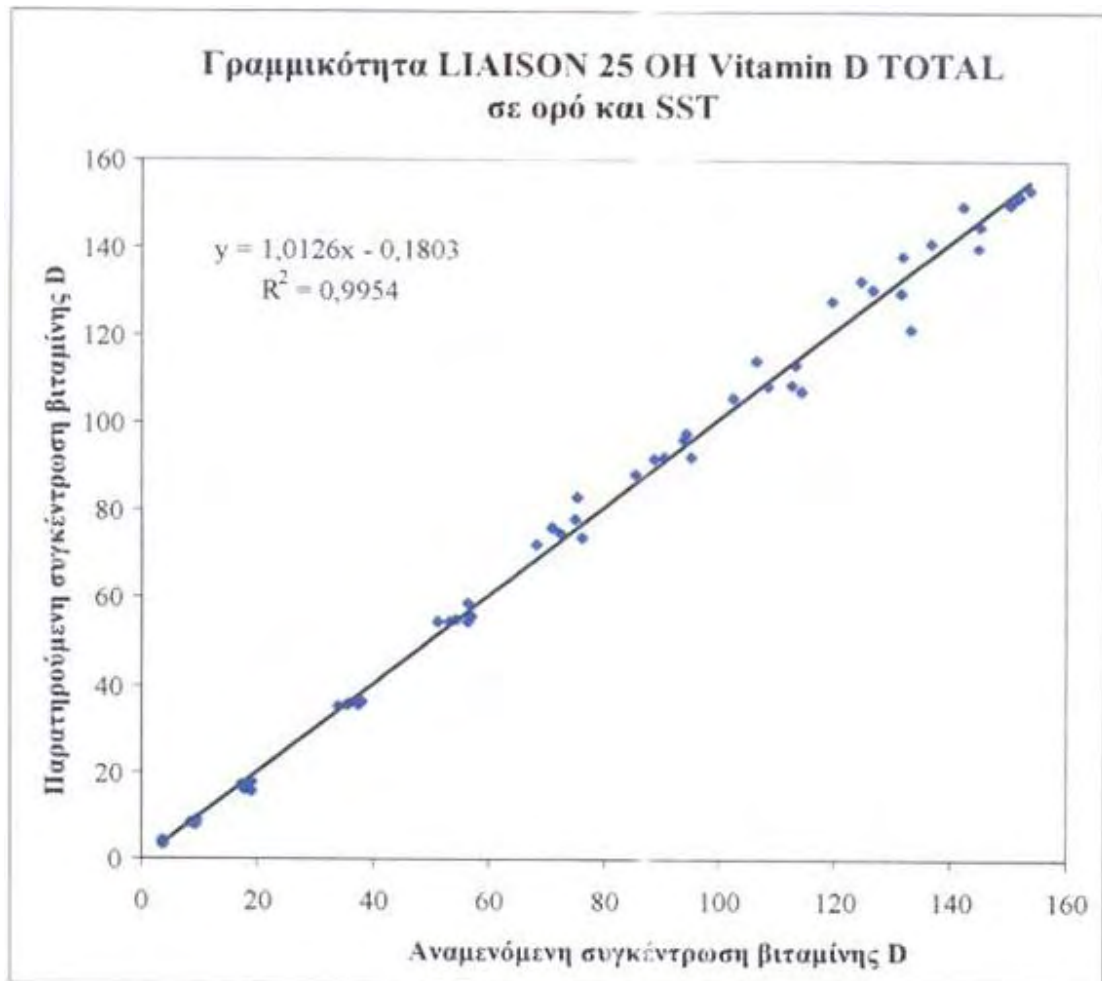
Ως λειτουργική ευαισθησία ορίζεται η συγκέντρωση δόσης στην οποία το %CV υπερβαίνει το 20%. Τα δείγματα προετοιμάστηκαν σε ονομαστικές συγκεντρώσεις από 2 έως 14ng/ml και έγιναν προσδιορισμοί σε πολλαπλές εκτελέσεις για να καθοριστεί η μέση συγκέντρωση και το %CV. Η συγκέντρωση του δείγματος αποτυπώθηκε γραφικά έναντι του %CV και δημιουργήθηκε μια διακύμανση για τον προσδιορισμό της λειτουργικής ευαισθησίας. Η λειτουργική ευαισθησία που προκύπτει από την εξίσωση παλινδρόμησης είναι <4.0ng/ml(89).

2.3.8 Αληθινότητα

Η αληθινότητα της ανάλυσης επικυρώθηκε με την εξέταση αραιώσης και ανάκτησης. Η γραμμικότητα αξιολογήθηκε σύμφωνα με το CLSI EP6-A. Δύο δεξαμενές δειγμάτων αραιώθηκαν με το LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL Specimen Diluent και αναλύθηκαν. Η ανάλυση των αποτελεσμάτων έγινε με γραμμική διακύμανση των αναμενόμενων τιμών έναντι των παρατηρούμενων τιμών. Η εξίσωση παλινδρόμησης που προκύπτει είναι:

Παρατηρούμενη= Αναμενόμενη $1,01X-0,180$, $R^2= 0,995$

Η δόση των δειγμάτων κυμάνθηκε από 3,8 έως 151 ng/ml και τα στοιχεία παρουσιάζονται στο διάγραμμα 1 (89).



Διάγραμμα 1 – Γραμμικότητα LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL σε ορό και SST (89).

2.3.9 Ειδικότητα

Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα εξετάστηκε όπως περιγράφεται στο CLSI EP7-A2. Λήφθηκαν δεδομένα σχετικά με τη διασταυρούμενη αντιδραστικότητα του αντιορού που χρησιμοποιείται σε αυτή την ανάλυση με προσθήκη έως και 100 ng/ml πιθανής διασταυρούμενης αντιδρούσας ουσίας και ανάλυση του μίγματος. Η διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κάθε ένωσης, κανονικοποιημένη στην 25(OH)D, αναγράφεται

παρακάτω. Το αντίσωμα που χρησιμοποιείται σε αυτή την ανάλυση επιδεικνύει διασταυρούμενη αντιδραστικότητα κυρίως σε διυδροξυλιωμένους μεταβολίτες της βιταμίνης D(89).

<u>Στεροειδές</u>	<u>% Διασταυρούμενη Αντιδραστικότητα</u>
25(OH)D ₂	100%
25(OH)D ₃	100%
Vitamin D ₂	1,9%
Vitamin D ₃	1,9%
1,25(OH) ₂ D ₂	6,7%
1,25(OH) ₂ D ₃	9,3%
3epi-25(OH)D ₃	1,3%

2.3.10 Παρεμβαλλόμενες ουσίες

Οι παρεμβαλλόμενες ουσίες εξετάστηκαν όπως περιγράφεται στο CLSI EP7-A2 χρησιμοποιώντας την ανάλυση LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται παρακάτω:

Τα δείγματα που είναι	Επιδεικνύουν αλλαγή <10% σε αποτελέσματα έως
Αιμολυμένα	200 mg/dl αιμοσφαιρίνης
Λιπαιμικά	589 mg/dl τριγλυκεριδίων
Ικτερικά	40 mg/dl συζευγμένης χολερυθρίνης
Ικτερικά	40 mg/dl μη συζευγμένης χολερυθρίνης

Τα δείγματα που είναι	Επιδεικνύουν αλλαγή <10% σε αποτελέσματα έως
Χοληστερόλη	301 mg/dl
Ουρικό οξύ	20 mg/dl
Ολική πρωτεΐνη	12 mg/dl

2.4 Σύγκριση μεθόδων και σκοπός της σύγκρισης

Ένα μείζον θέμα στην κλινική εργαστηριακή έρευνα είναι η επικύρωση της μεθόδου. Κάθε νέα μέθοδος θα πρέπει να επικυρωθεί για την εισαγωγή της στην καθημερινότητα ενός εργαστηρίου. Έτσι ελέγχεται η ορθότητα και ακρίβεια της νέας μεθόδου. Αυτό επιτυγχάνεται όταν κάνουμε ένα πείραμα που συγκρίνει τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την νέα μέθοδο/τεχνική/εξοπλισμό (μηχάνημα) και συγκρίνεται με αποτελέσματα που προέκυψαν από άλλη αναλυτική μέθοδο η οποία είναι επικυρωμένη και χρησιμοποιείται ευρέως. Η ιδανική κατάσταση επιτυγχάνεται όταν η αναλυτική μέθοδος που χρησιμοποιείται για την σύγκριση είναι μία μέθοδος αναφοράς. Στην παρούσα διπλωματική εργασία η μέθοδος αναφοράς είναι η HPLC και η μέθοδος που θέλουμε να ‘επικυρώσουμε’ η μέτρηση από την LIAISON 25 OH Vitamin D Assay. Αυτό γίνεται διότι τα αποτελέσματα των μετρήσεων από την μέθοδο αναφοράς είναι μη αμφισβητήσιμα ούτως ώστε τα αποτελέσματα της νέας μεθόδου να δούμε αν συνάδουν με τα αποτελέσματα της μεθόδου αναφοράς και έτσι να οριοθετηθεί η ορθότητα της νέας μεθόδου.

Ο σκοπός της σύγκρισης είναι για να εκτιμηθεί η συστηματική (τόσο η σταθερή όσο και η αναλογική) διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων (π.χ. για να διαπιστωθεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά σε σχέση με την ακρίβειά τους, χρησιμοποιώντας ίδια δείγματα ασθενών). Σημαντική παράμετρος στην όλη διαδικασία είναι η σωστή και προσεκτική ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Αν η διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων είναι μικρή και κλινικά αποδεκτή, τότε οι δύο μέθοδοι είναι αξιόπιστες και μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο ταυτόχρονα, όσο και ξεχωριστά. Αν η διαφορά είναι μη αποδεκτή θα πρέπει να διερευνηθεί ποια εκ των δύο μεθόδων είναι ανακριβής. Βεβαίως στην περίπτωση που η μία μέθοδος είναι μέθοδος αναφοράς και είναι μέθοδος η οποία χρησιμοποιείται με μεγάλη ακρίβεια στην καθημερινότητα των εργαστηρίων, τότε καθίσταται σαφές ότι η νέα μέθοδος είναι με τα μη αποδεκτά αποτελέσματα. Παρόλα αυτά θα πρέπει να τονιστεί το γεγονός ότι η ανάλυση των δεδομένων και η ερμηνεία τους είναι πολύπλοκο θέμα και ακόμη και σήμερα δεν υπάρχει κάποιος κανόνας για την στατιστική διαδικασία που θα πρέπει να χρησιμοποιείται για τις αναλύσεις των δεδομένων. Πάντως το κύριο μέλημα κατά τη σύγκριση 2 ή και περισσότερων μεθόδων δεν είναι τόσο η ταύτιση των αποτελεσμάτων, όσο τα αποτελέσματα που προκύπτουν να οδηγούν σε κοινά συμπεράσματα σχετικά με την κλινική εικόνα ενός ασθενή.

2.4.1 Ανάλυση δεδομένων κατά την σύγκριση των μεθόδων

Υπάρχουν κάποια συγκεκριμένα στατιστικά τεστ (Standard Statistical tests) που διερευνούν τις διαφορές μεταξύ δύο σετ από μετρήσεις δεδομένων με την ίδια μέθοδο μέτρησης. Ωστόσο αυτά δεν μπορούν να εφαρμοστούν για να κάνουμε σύγκριση διαφορετικών μεθόδων. Επίσης ανεξάρτητα t-test δείγματος (independent sample t-test) δεν θα πρέπει να χρησιμοποιηθούν, διότι τα δύο σετ μετρήσεων αποκτήθηκαν από μετρήσεις στο ίδιο βιολογικό δείγμα, γεγονός το οποίο τα στοιχειοθετεί ως εξαρτώμενα δείγματα (dependent samples). Επιπλέον ένα άλλο στατιστικό εργαλείο όπως το Paired t-test θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για χονδρική εκτίμηση της διαφοράς μεταξύ των δυο σετ δεδομένων, ωστόσο ούτε αυτό θα ήταν χρήσιμο στην παρούσα εργασία.. Αυτό συμβαίνει διότι στην περίπτωση αυτή θα είχαμε σύγκριση των μέσων όρων των δύο δειγμάτων και τα αποτελέσματα θα οδηγούσαν σε μία σταθερή, αλλά όχι αναλογική διαφορά.

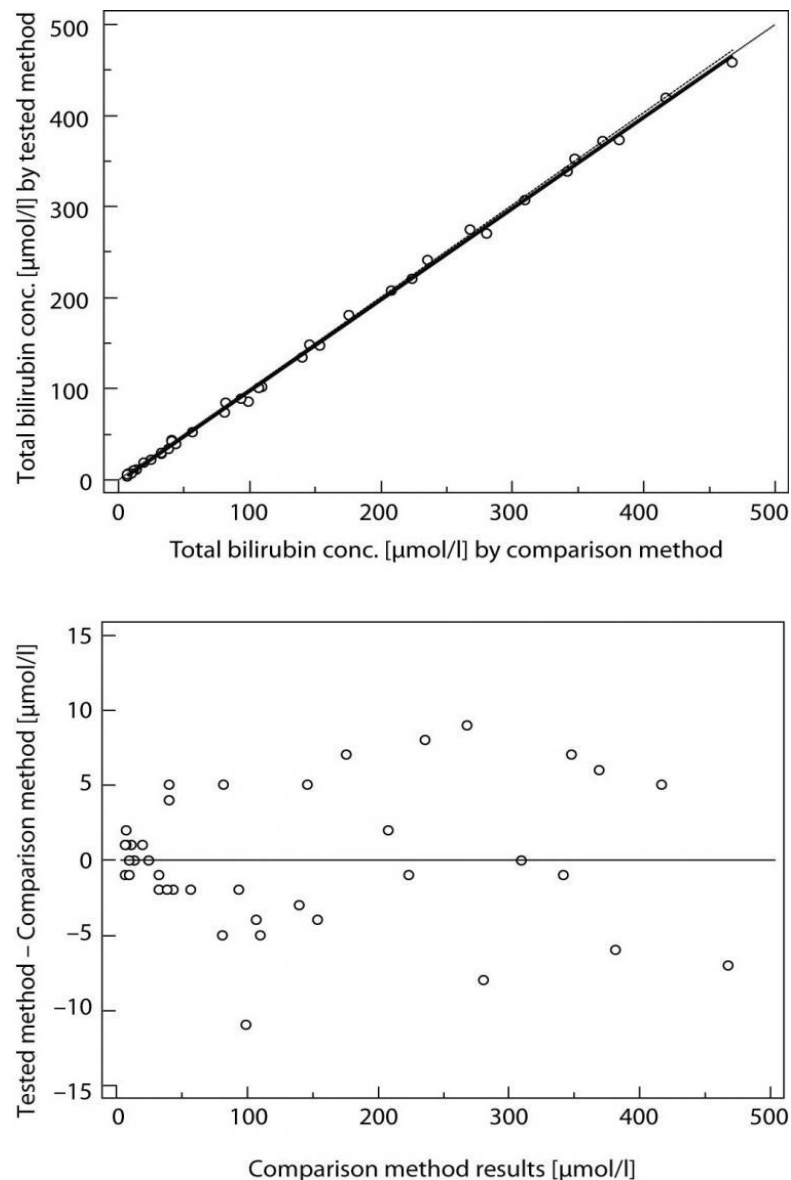
Άλλα στατιστικά τεστ τα οποία χρησιμοποιούνται συχνά για την ανάλυση σύγκρισης δεδομένων, αλλά δεν παρέχουν σωστά συμπεράσματα είναι ο συντελεστής συσχέτισης Pearson's (Pearson's correlation coefficient). Όταν το ίδιο δείγμα μετριέται από δύο διαφορετικές μεθόδους, τότε αναμένεται ότι ο συντελεστής συσχέτισης θα είναι 0,99 ή υψηλότερος. Η συσχέτιση περιγράφει την γραμμική σχέση μεταξύ των δύο σετ δεδομένων αλλά όχι και την συμφωνία (ταύτιση) τους. Δεν εντοπίζει αν υπάρχει σταθερή ή αναλογική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Το Linear regression μοντέλο είναι πιο κατάλληλο για τη σύγκριση μεθόδων αλλά είναι πολύ ευαίσθητο με την κατανομή των δεδομένων και ειδικά των ακραίων τιμών. Επιπροσθέτως, προϋποθέτει ότι τα αποτελέσματα της συγκριτικής μεθόδου δεν εμπεριέχουν σφάλματα. Λαμβάνοντας υπόψη όλους αυτούς τους περιορισμούς, καθίσταται σαφές ότι και αυτό το μοντέλο δεν είναι κατάλληλο. Οπότε η στατιστική μέθοδος που κρίθηκε καταλληλότερη και εν τέλει επιλέχθηκε για την παρούσα εργασία ήταν η Passing-Bablok analysis και η Bland-Altman plot.

2.4.1.1 Passing-Bablok analysis

Το Passing-Bablok είναι το προτεινόμενο μοντέλο για τη σύγκριση μεθόδων, το οποίο βασίζεται σε ισχυρά, μη-παραμετρικά μοντέλα. Το διάγραμμα που προκύπτει από την ανάλυση αυτή βοηθά στην οπτική ποσοτικοποίηση του βαθμού συμφωνίας μεταξύ των μετρήσεων. Το Passing-Bablok δεν είναι ευαίσθητο απέναντι σε ακραίες τιμές και υποθέτει ότι η μέτρηση των σφαλμάτων και στις δύο μεθόδους έχουν την ίδια κατανομή (όχι απαραίτητα την κανονική κατανομή), σταθερή αναλογία διακύμανσης, αυθαίρετη κατανομή δειγματοληψίας και τέλος ανακρίβεια ανάμεσα στις δύο μεθόδους. Οι απαιτήσεις για την σωστή χρήση του Passing-Bablok analysis είναι: α) συνεχόμενα διανεμημένες μετρήσεις (οι οποίες θα καλύπτουν ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων) και β) γραμμική σχέση μεταξύ των μεθόδων. Η συσχέτιση μεταξύ των συγκρινόμενων μεθόδων εξαρτάται από το εύρος του αριθμού των δειγμάτων. Αν αυτός είναι μεγάλος, η αντιστοιχία θα είναι μεγαλύτερη από ό,τι αν ο αριθμός των δειγμάτων είναι περιορισμένος. Το Passing-Bablok regression υπολογίζει την εξίσωση γραμμικής παλινδρόμησης (regression line equation) από τα δύο σετ δεδομένων. Ακόμα, με τη χρήση του P – B θέλουμε να γνωρίζουμε κατά πόσο η νέα μέθοδος είναι πιθανό να διαφέρει από την παλιά. Αν η διαφορά δεν είναι αρκετή για να προκαλέσει προβλήματα στην κλινική ερμηνεία μπορούμε να αντικαταστήσουμε την παλιά μέθοδο με τη νέα, ή εναλλακτικά να χρησιμοποιούνται και οι δύο.

Το Passing-Bablok regression αποτελείται από διάφορα μέρη και το καθένα έχει το ρόλο του στην ερμηνεία της σύγκρισης μεθόδων και δείχνει αν υπάρχει συμφωνία ανάμεσα στις μεθόδους (91, 92). Το πρώτο αποτέλεσμα είναι το διάγραμμα διασποράς με τη γραμμή παλινδρόμησης που επιτρέπει την οπτική επιθεώρηση των μετρούμενων δεδομένων και τη προφανή συμφωνία μεταξύ της καμπύλης παλινδρόμησης και τη γραμμής ταυτότητας (identity line) (Σχήματα 1Α και 2Α). Η εξίσωση παλινδρόμησης ($y = a + bx$) αποκάλυψε σταθερή {σημείο τομής της γραμμής παλινδρόμησης είναι (α)} και αναλογική {κλίση της γραμμής παλινδρόμησης του (β)} διαφορά με τα διαστήματα εμπιστοσύνης του 95% (95% CI). Τα διαστήματα εμπιστοσύνης εξηγούν αν η αξία τους διαφέρει από την αξία μηδέν (0) για την τομή και την αξία ενός (1) για την κλίση μόνο κατά τύχη. Έτσι, όταν το 95% CI για την τομή περιλαμβάνει μηδενική τιμή μπορεί να συναχθεί το συμπέρασμα ότι δεν υπάρχει σημαντική διαφορά μεταξύ της αξίας τομής (intercept line) που αποκτήθηκε και της αξίας μηδέν και ότι δεν υπάρχει σταθερή διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Το πρώτο παράδειγμα των Passing και Bablok

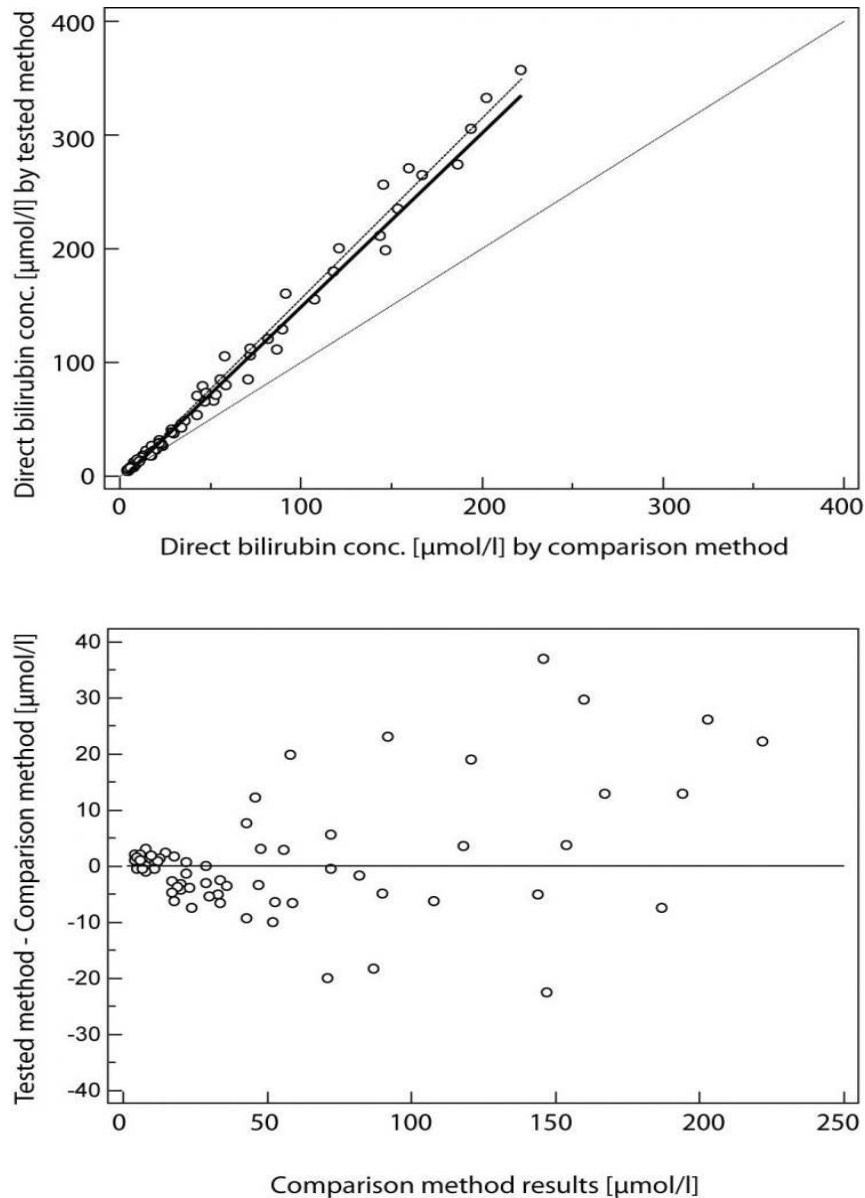
αναλύσεων παλινδρόμησης, στο σετ των δεδομένων που λήφθηκαν από τις μετρήσεις της συγκέντρωσης της συνολικής χολερυθρίνης σε ορούς ασθενών με τη χρήση δύο διαφορετικών αυτοματοποιημένων αναλυτών, παρουσιάζεται στο διάγραμμα 2. Σημειώστε ότι υπάρχει μικρή σταθερή διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων (Διάγραμμα 2).



Διάγραμμα 2 - Passing - Bablok αναλύσεις παλινδρόμησης των δύο μεθόδων για την ολική χολερυθρίνη , N = 40. Το εύρος συγκέντρωσης κυμαίνεται 3-468 μmol / L. Pearson συντελεστής συσχέτισης $r = 0,99$, $P < 0,001$.

(A) Το διάγραμμα διασποράς με τη γραμμή παλινδρόμησης και οι ζώνες εμπιστοσύνης για την γραμμή παλινδρόμησης . Η γραμμή ταυτοποίησης είναι διακεκομμένη . Η εξίσωση της γραμμής παλινδρόμησης είναι : $y = -3.0 + 1.00 x$? 95 % CI για τομή -3,8 έως -2,1 και για την κλίση 0,98 - 1,01 το οποίο δείχνει καλή συμφωνία . Η δοκιμή Cusum για την γραμμικότητα δείχνει ότι δεν υπάρχει σημαντική απόκλιση από τη γραμμικότητα ($P > 0.10$) . (B) Το διάγραμμα διασποράς παρουσιάζει κατανομή της διαφοράς γύρω από προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης (92).

Το δεύτερο παράδειγμα παρουσιάζει το σετ δεδομένων που λαμβάνεται μέσω της μέτρησης άμεσης χολερυθρίνης σε ορούς χρησιμοποιώντας δύο μεθόδους, αποκαλύπτοντας μικρά σταθερά σφάλματα, αλλά τεράστια αναλογικά σφάλματα, καθώς παρατηρείται ότι όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις, τόσο αυξάνεται η διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των 2 μεθόδων(Διάγραμμα 3).



Διάγραμμα 3 - Passing και Bablok αναλύσεις παλινδρόμησης των δύο μεθόδων για την άμεση χολερυθρίνη , N = 70. Το εύρος συκέντρωσης κυμαίνεται 4-357 $\mu\text{mol} / \text{L}$ Pearson συντελεστής συσχέτισης $r = 0,99$, $P < 0,001$.

(A) διάγραμμα διασποράς με τη γραμμή παλινδρόμησης και την ζώνη εμπιστοσύνης για τη γραμμή παλινδρόμησης . Η ταυτότητα είναι διακεκομμένη .Η εξίσωση της γραμμής παλινδρόμησης : $y = -3.2 + 1,52 x$? 95 % CI για τομή -4,2 έως -1,9 και για την κλίση 1,47 - 1,58 αναγράφεται μικρή σταθερά και τεράστια ανάλογη διαφορά . δοκιμή Cusum για γραμμικότητα υποδηλώνει σημαντική απόκλιση από τη γραμμικότητα ($P < 0,05$) . (B) Το διάγραμμα διασποράς παρουσιάζει κατανομή της διαφοράς γύρω από προσαρμοσμένη γραμμή παλινδρόμησης (92).

Οι μέθοδοι αυτές διαφέρουν σοβαρά και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν ταυτόχρονα. Σημειώστε ότι ο συντελεστής συσχέτισης και στα δύο παραδείγματα είναι $r = 0,99$ αποδεικνύοντας ότι τα αποτελέσματα της μεθόδου σύγκρισης δεν μπορούν να εκτιμηθούν με τη χρήση συσχέτισης του Pearson (Pearson's correlation).

2.4.1.2 Bland-Altman plot

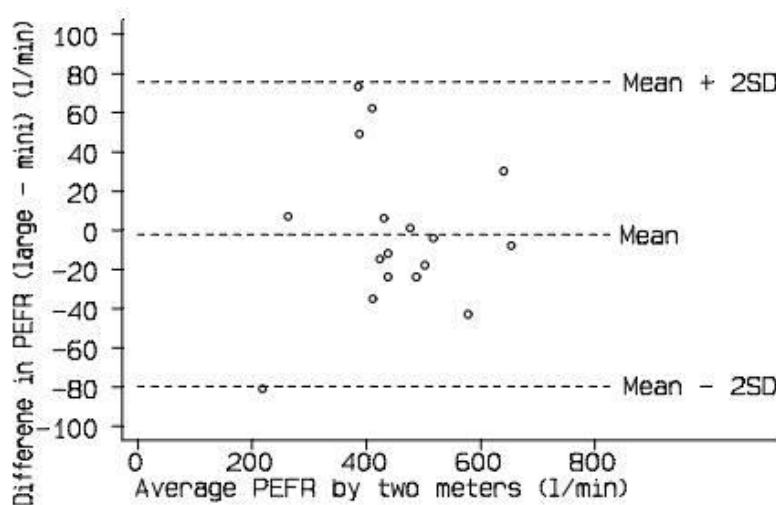
Το Bland-Altman plot στην αναλυτική χημεία και βιοστατιστική είναι ένα εργαλείο που χρησιμοποιείται για να αναλύσει την συμφωνία μεταξύ δύο διαφορετικών μεθόδων. Οι Bland και Altman τόνισαν το γεγονός ότι οποιεσδήποτε δύο μέθοδοι που έχουν σχεδιαστεί για την μέτρηση της ίδιας παραμέτρου θα πρέπει να έχουν καλή συσχέτιση όταν ένα σετ από δείγματα επιλέγονται ούτως ώστε να καθοριστεί αν υπάρχει σημαντική διαφορά. Μία υψηλή συσχέτιση για οποιεσδήποτε δύο μεθόδους οι οποίες έχουν σχεδιαστεί για να μετρήσουν την ίδια παράμετρο, θα μπορούσε να είναι από μόνη της αρκετή και ικανή συνθήκη για να οριστεί ότι υπάρχει συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Ωστόσο μια υψηλή συσχέτιση δεν σημαίνει αυτομάτως ότι υπάρχει καλή συμφωνία μεταξύ των δύο μεθόδων. Αυτό καθιστά σαφές ότι από μόνη της η καλή συσχέτιση δεν σημαίνει απόλυτα και συμφωνία ανάμεσα στις μεθόδους(93-96).

Πέραν του Passing-Bablok και το Bland-Altman μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συγκρίνει μια νέα τεχνική μέθοδο με μία μέθοδο αναφοράς. Για τον λόγο αυτό επιλέχθηκε η βιοστατιστική ανάλυση της εν λόγω διπλωματικής να βασιστούνε σε αυτά τα δύο βιοστατιστικά εργαλεία. Το Bland-Altman διάγραμμα χρησιμοποιείται ευρέως για την αξιολόγηση της συμφωνίας μεταξύ των δύο διαφορετικών εξοπλισμών ή τεχνικών ή μεθόδων. Το Bland-Altman διάγραμμα επιτρέπει να διερευνήσουμε την τυχόν ύπαρξη συστηματικής διαφοράς μεταξύ των μεθόδων και να εντοπίσει πιθανές ακραίες τιμές. Η μέση διαφορά είναι το εκτιμώμενο σφάλμα και η τυπική απόκλιση (SD-Standard Deviation) των διαφορών μετρά τις τυχαίες διακυμάνσεις γύρω από αυτό το μέσο όρο. Αν η μέση τιμή της διαφοράς παρεκκλίνει σημαντικά από το μηδέν στη βάση του ενός δείγματος t-test, αυτό υποδεικνύει την παρουσία σταθερών σφαλμάτων. Αν υπάρχει ένα συνεχές σφάλμα, μπορεί να ρυθμιστεί με την αφαίρεση του μέσου όρου της διαφοράς από τη νέα μέθοδο(93-96).

Το Bland-Altman διάγραμμα χρησιμοποιείται επίσης για να διερευνήσει κάθε πιθανή σχέση των αποκλίσεων μεταξύ των μετρήσεων και της πραγματικής αξίας (δηλαδή των

σφαλμάτων). Η ύπαρξη αναλογικών σφαλμάτων υποδεικνύει ότι οι μέθοδοι δεν συμφωνούν εξίσου μέσω του εύρους των μετρήσεων. Για να αξιολογηθεί αυτή η σχέση, η διαφορά μεταξύ των μεθόδων θα πρέπει να μειώνεται επί του μέσου όρου των δύο μεθόδων. Όταν εντοπιστεί μία σχέση μεταξύ των διαφορών και των πραγματικών τιμών, θα πρέπει να παρέχεται μία παλινδρόμηση με βάση το 95% των ορίων συμφωνίας (regression-based 95% limits of agreement)(93-96).

Ένα διάγραμμα της διαφοράς μεταξύ των μεθόδων κατά τον μέσο όρο τους μπορεί να είναι πιο κατατοπιστικό εν αντιθέσει με το passing-bablok. Το διάγραμμα διαφοράς έναντι μέσων τιμών μας επιτρέπει να διερευνήσουμε κάθε πιθανή σχέση μεταξύ της μέτρησης σφάλματος και της πραγματικής αξίας. Αυτό γίνεται διότι δεν γνωρίζουμε την πραγματική αξία, και ο μέσος όρος των δύο μετρήσεων είναι η καλύτερη εκτίμηση που έχουμε. Θα ήταν λάθος να σχεδιάσουμε την διαφορά έναντι κάθε αξίας ξεχωριστά, γιατί η διαφορά θα πρέπει να σχετίζεται με το άλλο.



Διάγραμμα 4 – Διάγραμμα Bland – Altman διαφοράς έναντι μέσων τιμών (94)

Όπως φαίνεται και στο διάγραμμα 4 δεν υπάρχει εμφανής σχέση μεταξύ της διαφοράς και του μέσου όρου. Υπό αυτές τις συνθήκες, μπορούμε να συνοψίσουμε την έλλειψη συμφωνίας με τον υπολογισμό του σφάλματος. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω του υπολογισμού της μέσης διαφοράς MD και της τυπικής απόκλισης των διαφορών SD. Θα περιμέναμε τις περισσότερες διαφορές να βρίσκονται μεταξύ MD – 2SD και MD + 2SD.

Εάν οι διαφορές είναι κανονικά κατανομημένα (Gaussian), το 95% των διαφορών θα βρίσκονται μεταξύ αυτών των ορίων (ή, ακριβέστερα, μεταξύ $MD - 1.96SD$ και $MD + 1.96SD$). Υπό την προϋπόθεση ότι οι διαφορές στο εσωτερικό του $MD \pm 2SD$ δεν θα ήταν κλινικά σημαντικές, θα μπορούσαμε να χρησιμοποιήσουμε τις δύο μεθόδους μέτρησης εναλλακτικά. Τα όρια των τιμών $MD \pm 2SD$ μπορούμε να τα αναφέρουμε και ως όρια συμφωνίας. Αυτή η έλλειψη συμφωνίας που προκύπτει από το παράδειγμα αυτό δεν θα ήταν καθόλου προφανής στην P - B ανάλυση, αν δεν γινόταν και η B - A ανάλυση.

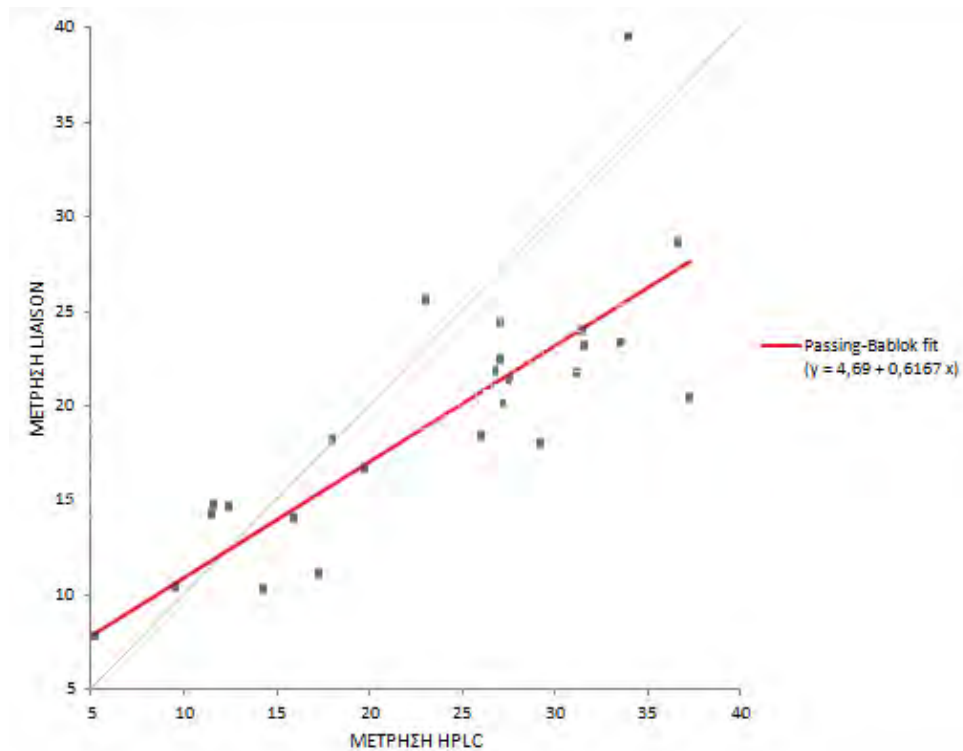
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.

Στον Πίνακα 5 έχουμε τα αποτελέσματα των μετρήσεων. Στην πρώτη στήλη έχουμε τον αριθμό του δείγματος, στην δεύτερη στήλη έχουμε τον κωδικό του δείγματος, ο οποίος αντιστοιχεί σε έναν ασθενή, στην τρίτη στήλη έχουμε το αποτέλεσμα της μέτρησης για τα επίπεδα της βιταμίνης D από την LIAISON και τέλος στη τέταρτη στήλη έχουμε τα αποτελέσματα της μέτρησης για τα επίπεδα της βιταμίνης D από την HPLC.

Πίνακας 5 – Αποτελέσματα μετρήσεων με τις 2 μεθόδους

<u>A/A</u>	<u>ΚΩΔ. ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ</u>	<u>ΜΕΤΡΗΣΗ LIAISON</u>	<u>ΜΕΤΡΗΣΗ HPLC</u>
1	119	18,5	25,97
2	143	7,9	5,13
3	298	16,8	19,69
4	178	21,8	31,1
5	275	14,9	11,56
6	272	20,5	37,19
7	68	22,5	26,91
8	162	21,9	26,67
9	290	24,04	31,34
10	251	39,6	33,81
11	217	20,2	27,08
12	60	24,5	26,94
13	261	14,8	12,29
14	271	18,3	17,9
15	232	18,1	29,09
16	284	10,4	14,17
17	16	14,1	15,88
18	66	11,2	17,19
19	283	21,4	27,46
20	258	23,5	33,47
21	267	23,3	31,45
22	255	25,7	22,91
23	97	28,7	36,55
24	287	10,5	9,42
25	273	14,3	11,37

3.1 Ανάλυση Passing – Bablok



N | 25

	Minimum	Maximum
METPHΣH HPLC	5,130	37,190
METPHΣH LIAISON	7,900	39,600

Fit Y on X

Passing-Bablok fit

Equation | METPHΣH LIAISON = 4,69 + 0,6167 METPHΣH HPLC

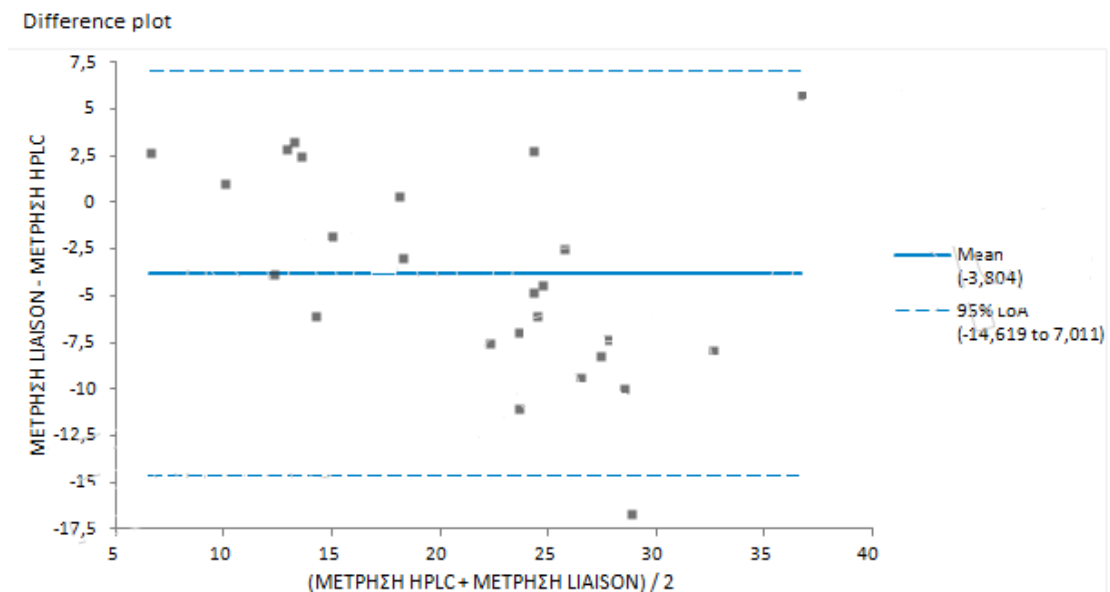
Parameter	Estimate	Bootstrap 95% CI
Intercept	4,690	-1,919 to 8,715
Slope	0,6167	0,4633 to 0,8976

CI based on 999 bootstrap samples.

Η σύγκριση των δύο μεθόδων έδειξε ότι τα αποτελέσματα διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους. Η εξίσωση $y=4,69+0,6167x$ περιγράφει την σχέση των αποτελεσμάτων των δύο μεθόδων και η ανάλυση κατά P-B έδωσε σημείο τομής 4,69 και κλίση 0,62. Για να δούμε αν υπάρχουν συστηματικές διαφορές, παρατηρούμε το μέτρο των συστηματικών διαφορών μεταξύ των δύο μεθόδων που είναι το σημείο τομής. Το 95% του διαστήματος εμπιστοσύνης (confidence interval) του σημείου τομής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι $A=0$. Αυτή η υπόθεση γίνεται αποδεκτή εάν το διάστημα εμπιστοσύνης για το A περιλαμβάνει την τιμή 0. Όμως σύμφωνα με το Passing Bablok παρατηρούμε ότι το σημείο τομής έχει εύρος που κυμαίνεται από -1,919

έως 8,715. Είναι εμφανές ότι περιλαμβάνει τη τιμή 0, οπότε η υπόθεση δεν απορρίπτεται και οι δύο μέθοδοι δεν διαφέρουν και έχουν συστηματικές διαφορές. Εν συνεχεία πρέπει να προσδιοριστεί αν υπάρχουν αναλογικές διαφορές. Η κλίση B (slope) είναι το μέτρο των αναλογικών διαφορών μεταξύ των δύο μεθόδων. Το διάστημα εμπιστοσύνης 95% για την κλίση B μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί η υπόθεση ότι $B = 1$. Αυτή η υπόθεση γίνεται αποδεκτή εάν το διάστημα εμπιστοσύνης για το B περιλαμβάνει την τιμή 1. Σύμφωνα με το P – B η κλίση κυμαίνεται από 0,4633 έως 0,8976 και δεν περιλαμβάνει τη τιμή 1. Οπότε η υπόθεση μας απορρίπτεται και συμπεραίνεται ότι η κλίση είναι σημαντικά διαφορετική από την μονάδα και υπάρχει τουλάχιστον μια αναλογική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων. Τα αποτελέσματα μας δείχνουν λοιπόν ότι υπάρχουν κατά την ανάλυση P – B σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο μεθόδους μέτρησης της βιταμίνης D.

3.2 Ανάλυση Bland – Altman



N	25	
	Minimum	Maximum
MΕΤΡΗΣΗ HPLC	5,130	37,190
MΕΤΡΗΣΗ LIAISON	7,900	39,600
(ΜΕΤΡΗΣΗ HPLC + ΜΕΤΡΗΣΗ LIAISON) / 2	6,515	36,705

Fit Differences

Parameter	Estimate	95% CI	SE
Mean difference	-3,804	-6,0817 to -1,5263	1,1036
95% Lower LoA	-14,619	-18,5649 to -10,6735	1,9118
95% Upper LoA	7,011	3,0655 to 10,9569	1,9118

SD | 5,518

Από το παραπάνω διάγραμμα ανάλυσης B – A παρατηρούμε ότι έχουμε κατά τη σύγκριση των δύο μεθόδων τις εξής τιμές, μέση τιμή MD = -3,8 και SD = 5,51. Για να εκτιμήσουμε κατά πόσο υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων πρέπει να παρατηρήσουμε αν στο διάστημα $MD \pm 2SD$ βρίσκεται σχεδόν το 95% των αποτελεσμάτων των δειγμάτων και με τις 2 μεθόδους. Όπως φαίνεται από το διάγραμμα, αυτή η προϋπόθεση ισχύει, οπότε υπάρχει συσχέτιση μεταξύ των δύο μεθόδων.

Όσον αφορά την ταύτιση των δύο μεθόδων παρατηρούμε την απόκλιση της μέσης τιμής από τη τιμή 0. Όπως φαίνεται η μέση τιμή απέχει από τη τιμή μηδέν, γεγονός που συνεπάγεται ότι οι δύο μέθοδοι δεν έχουν απόλυτη ταύτιση κατά τη σύγκριση των αποτελεσμάτων τους. Ακόμα παρατηρώντας την κατανομή των αποτελεσμάτων γύρω από τη μέση τιμή και από τη τιμή μηδέν, φαίνεται να υπάρχει περίπτωση συστηματικού σφάλματος.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέτρηση της 25(OH)D είναι ο καλύτερος δείκτης της κατάστασης της βιταμίνης D στον ανθρώπινο οργανισμό. Ωστόσο, η ακριβής μέτρηση της 25(OH)D παραμένει δύσκολη λόγω των προβλημάτων που δημιουργούνται από την συγγένεια δέσμευσης των πρωτεϊνών μεταφοράς (βιταμίνη D δεσμεύουσα πρωτεΐνη), από τις υδροφοβικές ιδιότητες της και τέλος εξαιτίας των διαφόρων μεταβολιτών της (περισσότεροι από 40 μεταβολίτες). Οι ανοσολογικές μέθοδοι μέτρησης της 25(OH)D είναι ιδιαιτέρως ευάλωτες εξαιτίας των διαφορών στα αντισώματα που είναι συγκεκριμένα για τους μεταβολίτες. Έτσι το ενδιαφέρον για την μέτρηση της 25(OH)D οδήγησε στην αύξηση της απαίτησης υψηλή απόδοση στις μεθόδους ποσοτικού προσδιορισμού της στα βιολογικά δείγματα, δηλαδή για γρήγορη ταχύτητα διεκπεραίωσης, καλή τιμή ανάλυσης και υψηλή ακρίβεια ανάλυσης. Αρκετές έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί τα τελευταία χρόνια για να συγκρίνουν την απόδοση και την ακρίβεια των νέων μεθόδων, όπου η πιστοποίηση της αναλυτική απόδοσης και της επαναληψιμότητας των ανοσολογικών τεχνικών γίνεται σε σχέση με τις μετρήσεις της μεθόδου αναφοράς LC-MS/MS. Η παρούσα εργασία κινήθηκε στο ίδιο πνεύμα με σκοπό να διαπιστώσουμε την ακρίβεια και την απόδοση της DiaSorin LIAISON Vitamin D TOTAL 25 σε σύγκριση με την HPLC.

Το εύρος των ολικών συγκεντρώσεων που μετρήθηκαν για την 25(OH)D κυμαινόταν από 7,9 ng/ml έως 39,6 ng/ml σύμφωνα με την ανοσολογική μέθοδο και από 5,13 ng/ml έως 37,19 ng/ml σύμφωνα με την UHPLC. Η συγκέντρωση που προέκυψε από τις δύο διαφορετικές μεθόδους έχει ισχυρή συσχέτιση (Pearson's $R=0,802$) με πανομοιότυπη διαγνωστική κατηγοριοποίηση τόσο της ανεπάρκειας (<20 ng/ml), όσο και της επάρκειας (>20 ng/ml) για το 96% των δειγμάτων. Ωστόσο, υπάρχει ένα μικρό συστηματικό σφάλμα μεταξύ των δύο μεθόδων, το οποίο υπολογίστηκε από το διάγραμμα Bland-Altman με μέση διαφορά Liaison - HPLC περίπου -3,8 ng/mL. Αυτή η μέση διαφορά ίσως να μην είναι τόσο κλινικά σημαντική, αλλά η τυπική απόκλιση SD της μέσης τιμής ($SD= \pm 5.5 \text{ ng mL}^{-1}$) δείχνει ότι για ορισμένα δείγματα οι δύο μέθοδοι μπορεί να έχουν αποτελέσματα τα οποία θα είναι αντιφατικά και έτσι μερικά δείγματα να μπορούν να διαγνωσθούν με ήπια ανεπάρκεια από την μία μέθοδο και με επάρκεια από την άλλη. Αυτό όντως συνέβη σε ένα συγκεκριμένο δείγμα στην μικρή πιλοτική μελέτη μας, όπου στο συγκεκριμένο δείγμα διαγνώσθηκε οριακή ανεπάρκεια με την

ανοσολογική μέθοδο (18,5 ng/ml), ενώ με την UHPLC διαγνώσθηκε επάρκεια (25,9 ng/ml). Σύμφωνα με την ανάλυση Passing-Bablok τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων μπορούν να αναλυθούν μέσω της γραμμικής εξίσωσης $y = 4,69 + 0,6167x$ με το 95% CI (Confidence Interval-Διάστημα Εμπιστοσύνης) να κυμάνετε για την τομή από -1,919 έως 8,715 και για την κλίση από 0,4633 έως 0,8976. Αυτά τα δεδομένα δείχνουν ότι δεν υπάρχει σταθερή διαφορά, αλλά υπάρχει σημαντική αναλογική διαφορά μεταξύ των δύο μεθόδων.

Το συμπέρασμα που απορρέει είναι ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο μέθοδοι για την εκτίμηση της κατάστασης της βιταμίνης D στον άνθρωπο. Αυτό συμβαίνει γιατί τα αποτελέσματα των δύο μεθόδων μας δίνουν την ίδια κλινική εικόνα του ασθενούς. Η UHPLC μας δίνει μεγάλη ακρίβεια στις μετρήσεις της, η οποία ακρίβεια δεν μπορεί να επιτευχθεί από την LIAISON DiaSorin παρόλα αυτά η κλινική ερμηνεία παραμένει η ίδια.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Deluca HF. History of the discovery of vitamin D and its active metabolites. BoneKey reports. 2014 Jan 8;3:479. PubMed PMID: 24466410. Pubmed Central PMCID: 3899558.
2. Funk C. On the chemical nature of the substance which cures polyneuritis in birds induced by a diet of polished rice. The Journal of physiology. 1911 Dec 22;43(5):395-400. PubMed PMID: 16993097. Pubmed Central PMCID: 1512869.
3. Holick MF. High prevalence of vitamin D inadequacy and implications for health. Mayo Clinic proceedings. 2006 Mar;81(3):353-73. PubMed PMID: 16529140.
4. Holick MF. McCollum Award Lecture, 1994: vitamin D--new horizons for the 21st century. The American journal of clinical nutrition. 1994 Oct;60(4):619-30. PubMed PMID: 8092101.
5. Steenbock H. White Corn Vs. Yellow Corn and a Probable Relation between the Fat-Soluble Vitamine and Yellow Plant Pigments. Science. 1919 Oct 10;50(1293):352-3. PubMed PMID: 17743784.
6. Mellanby E. An experimental investigation on rickets. 1919. Nutrition. 1989 Mar-Apr;5(2):81-6; discussion 7. PubMed PMID: 2520279.
7. Mellanby E. A British Medical Association Lecture ON DEFICIENCY DISEASES, WITH SPECIAL REFERENCE TO RICKETS. British medical journal. 1924 May 24;1(3308):895-900. PubMed PMID: 20771593. Pubmed Central PMCID: 2304391.
8. Harrison DC, Mellanby E. Phytic acid and the rickets-producing action of cereals. The Biochemical journal. 1939 Oct;33(10):1660-80 1. PubMed PMID: 16747083. Pubmed Central PMCID: 1264631.
9. Mellanby E. Nutrition Classics. The Lancet 1:407-12, 1919. An experimental investigation of rickets. Edward Mellanby. Nutrition reviews. 1976 Nov;34(11):338-40. PubMed PMID: 794773.
10. Mellanby E. The rickets-producing and anti-calcifying action of phytate. The Journal of physiology. 1949 Sep;109(3-4):488-533, 2 pl. PubMed PMID: 15395027. Pubmed Central PMCID: 1392604.
11. Suda T, DeLuca HF, Schnoes H, Blunt JW. 25-hydroxyergocalciferol: a biologically active metabolite of vitamin D2. Biochemical and biophysical research communications. 1969 Apr 29;35(2):182-5. PubMed PMID: 5305760.
12. Suda T, DeLuca HF, Schnoes HK, Ponchon G, Tanaka Y, Holick MF. 21,25-dihydroxycholecalciferol. A metabolite of vitamin D3 preferentially active on bone. Biochemistry. 1970 Jul 7;9(14):2917-22. PubMed PMID: 4318898.
13. Norman AW, Myrtle JF, Midgett RJ, Nowicki HG, Williams V, Popjak G. 1,25-dihydroxycholecalciferol: identification of the proposed active form of vitamin D3 in the intestine. Science. 1971 Jul 2;173(3991):51-4. PubMed PMID: 4325863.
14. Jones G, Schnoes HK, DeLuca HF. Isolation and identification of 1,25-dihydroxyvitamin D2. Biochemistry. 1975 Mar 25;14(6):1250-6. PubMed PMID: 1078978.
15. . Available from: <http://vitamind.ucr.edu/>.
16. Holick MF, Tian XQ, Allen M. Evolutionary importance for the membrane enhancement of the production of vitamin D3 in the skin of poikilothermic animals. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1995 Apr 11;92(8):3124-6. PubMed PMID: 7724526. Pubmed Central PMCID: 42117.
17. Stroud ML, Stilgoe S, Stott VE, Alhajian O, Salman K. Vitamin D - a review. Australian family physician. 2008 Dec;37(12):1002-5. PubMed PMID: 19142273.
18. Rovner AJ, O'Brien KO. Hypovitaminosis D among healthy children in the United States: a review of the current evidence. Archives of pediatrics & adolescent medicine. 2008 Jun;162(6):513-9. PubMed PMID: 18524740.

19. Chapuy MC, Preziosi P, Maamer M, Arnaud S, Galan P, Hercberg S, et al. Prevalence of vitamin D insufficiency in an adult normal population. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 1997;7(5):439-43. PubMed PMID: 9425501.
20. Glerup H. [Vitamin D deficiency among immigrants]. *Ugeskrift for laeger*. 2000 Nov 13;162(46):6196-9. PubMed PMID: 11107965. Vitamin D-mangel hos indvandrere.
21. Glerup H, Mikkelsen K, Poulsen L, Hass E, Overbeck S, Thomsen J, et al. Commonly recommended daily intake of vitamin D is not sufficient if sunlight exposure is limited. *Journal of internal medicine*. 2000 Feb;247(2):260-8. PubMed PMID: 10692090.
22. Tangpricha V, Koutkia P, Rieke SM, Chen TC, Perez AA, Holick MF. Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health. *The American journal of clinical nutrition*. 2003 Jun;77(6):1478-83. PubMed PMID: 12791627.
23. Holick MF. Vitamin D: importance in the prevention of cancers, type 1 diabetes, heart disease, and osteoporosis. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Mar;79(3):362-71. PubMed PMID: 14985208.
24. Holick MF, Shao Q, Liu WW, Chen TC. The vitamin D content of fortified milk and infant formula. *The New England journal of medicine*. 1992 Apr 30;326(18):1178-81. PubMed PMID: 1313548.
25. Holick M. Does sunscreen block the skin's ability to make vitamin D? If so, how can I get enough of this vitamin without raising my risk of skin cancer? *Health news*. 2002 Jul;8(7):12. PubMed PMID: 12132498.
26. Holick MF. Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1678S-88S. PubMed PMID: 15585788.
27. Tangpricha V, Pearce EN, Chen TC, Holick MF. Vitamin D insufficiency among free-living healthy young adults. *The American journal of medicine*. 2002 Jun 1;112(8):659-62. PubMed PMID: 12034416. Pubmed Central PMCID: 3091001.
28. Cashman KD. Vitamin D in childhood and adolescence. *Postgraduate medical journal*. 2007 Apr;83(978):230-5. PubMed PMID: 17403948. Pubmed Central PMCID: 2600028.
29. Cashman KD, Kiely M, Kinsella M, Durazo-Arvizu RA, Tian L, Zhang Y, et al. Evaluation of Vitamin D Standardization Program protocols for standardizing serum 25-hydroxyvitamin D data: a case study of the program's potential for national nutrition and health surveys. *The American journal of clinical nutrition*. 2013 Jun;97(6):1235-42. PubMed PMID: 23615829. Pubmed Central PMCID: 3652922.
30. Grant WB, Holick MF. Benefits and requirements of vitamin D for optimal health: a review. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic*. 2005 Jun;10(2):94-111. PubMed PMID: 15989379.
31. Holick MF. Sunlight and vitamin D: both good for cardiovascular health. *Journal of general internal medicine*. 2002 Sep;17(9):733-5. PubMed PMID: 12220371. Pubmed Central PMCID: 1495109.
32. . Available from: <http://cathedralchiropractic.co.uk/benefits-of-vitamin-d/>.
33. Ma Y, Johnson CS, Trump DL. Mechanistic Insights of Vitamin D Anticancer Effects. *Vitamins and hormones*. 2016;100:395-431. PubMed PMID: 26827961.
34. Ke L, Mason RS, Kariuki M, Mpofu E, Brock KE. Vitamin D status and hypertension: a review. *Integrated blood pressure control*. 2015;8:13-35. PubMed PMID: 25897260. Pubmed Central PMCID: 4396645.
35. Pilz S, Tomaschitz A, Ritz E, Pieber TR. Vitamin D status and arterial hypertension: a systematic review. *Nature reviews Cardiology*. 2009 Oct;6(10):621-30. PubMed PMID: 19687790.

36. Weinstock-Guttman B, Mehta BK, Ramanathan M, Karmon Y, Henson LJ, Halper J, et al. Vitamin D and multiple sclerosis. *The neurologist*. 2012 Jul;18(4):179-83. PubMed PMID: 22735240.
37. Ascherio A, Munger KL, White R, Kochert K, Simon KC, Polman CH, et al. Vitamin D as an early predictor of multiple sclerosis activity and progression. *JAMA neurology*. 2014 Mar;71(3):306-14. PubMed PMID: 24445558. Pubmed Central PMCID: 4000029.
38. Speer G. [Impact of vitamin D in neurological diseases and neurorehabilitation: from dementia to multiple sclerosis. Part I: the role of vitamin D in the prevention and treatment of multiple sclerosis]. *Ideggyogyaszati szemle*. 2013 Sep 30;66(9-10):293-303. PubMed PMID: 24358684. A D-vitamin jelentosege neurologiai korkepekben es a neurorehabilitacioban: a dementiatol a sclerosis multiplexig. I. resz: a D-vitamin szerepe a sclerosis multiplex megelőzésében és kiegészítő kezelésében.
39. Anglin RE, Samaan Z, Walter SD, McDonald SD. Vitamin D deficiency and depression in adults: systematic review and meta-analysis. *The British journal of psychiatry : the journal of mental science*. 2013 Feb;202:100-7. PubMed PMID: 23377209.
40. Spedding S. Vitamin D and depression: a systematic review and meta-analysis comparing studies with and without biological flaws. *Nutrients*. 2014 Apr;6(4):1501-18. PubMed PMID: 24732019. Pubmed Central PMCID: 4011048.
41. Zhu DM, Liu Y, Zhang AG, Chu ZX, Wu Q, Li H, et al. High levels of vitamin D in relation to reduced risk of schizophrenia with elevated C-reactive protein. *Psychiatry research*. 2015 Aug 30;228(3):565-70. PubMed PMID: 26106052.
42. Cieslak K, Feingold J, Antonius D, Walsh-Messinger J, Dracxler R, Rosedale M, et al. Low vitamin D levels predict clinical features of schizophrenia. *Schizophrenia research*. 2014 Nov;159(2-3):543-5. PubMed PMID: 25311777. Pubmed Central PMCID: 4252834.
43. Boucher BJ. Vitamin D insufficiency and diabetes risks. *Current drug targets*. 2011 Jan;12(1):61-87. PubMed PMID: 20795936.
44. Ekblom K, Marcus C. Vitamin D deficiency is associated with pre-diabetes in obese Swedish children. *Acta paediatrica*. 2016 Feb 12. PubMed PMID: 26871588.
45. Mithal A, Wahl DA, Bonjour JP, Burckhardt P, Dawson-Hughes B, Eisman JA, et al. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2009 Nov;20(11):1807-20. PubMed PMID: 19543765.
46. Chapuy MC, Chapuy P, Thomas JL, Hazard MC, Meunier PJ. Biochemical effects of calcium and vitamin D supplementation in elderly, institutionalized, vitamin D-deficient patients. *Revue du rhumatisme*. 1996 Feb;63(2):135-40. PubMed PMID: 8689285.
47. Dawson-Hughes B, Heaney RP, Holick MF, Lips P, Meunier PJ, Vieth R. Estimates of optimal vitamin D status. *Osteoporosis international : a journal established as result of cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*. 2005 Jul;16(7):713-6. PubMed PMID: 15776217.
48. Heaney RP. Functional indices of vitamin D status and ramifications of vitamin D deficiency. *The American journal of clinical nutrition*. 2004 Dec;80(6 Suppl):1706S-9S. PubMed PMID: 15585791.
49. Vieth R. Vitamin D supplementation, 25-hydroxyvitamin D concentrations, and safety. *The American journal of clinical nutrition*. 1999 May;69(5):842-56. PubMed PMID: 10232622.
50. Wallace AM, Gibson S, de la Hunty A, Lamberg-Allardt C, Ashwell M. Measurement of 25-hydroxyvitamin D in the clinical laboratory: current procedures, performance characteristics and limitations. *Steroids*. 2010 Jul;75(7):477-88. PubMed PMID: 20188118.
51. Seamans KM, Cashman KD. Existing and potentially novel functional markers of vitamin D status: a systematic review. *The American journal of clinical nutrition*. 2009 Jun;89(6):1997S-2008S. PubMed PMID: 19403634.

52. Farrell CJ, Herrmann M. Determination of vitamin D and its metabolites. *Best practice & research Clinical endocrinology & metabolism*. 2013 Oct;27(5):675-88. PubMed PMID: 24094638.
53. Farrell C, Soldo J, Williams P, Herrmann M. 25-Hydroxyvitamin D testing: challenging the performance of current automated immunoassays. *Clinical chemistry and laboratory medicine*. 2012 Nov;50(11):1953-63. PubMed PMID: 23113977.
54. Carter GD, Jones JC, Berry JL. The anomalous behaviour of exogenous 25-hydroxyvitamin D in competitive binding assays. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007 Mar;103(3-5):480-2. PubMed PMID: 17197167.
55. Souberbielle JC, Fayol V, Sault C, Lawson-Body E, Kahan A, Cormier C. Assay-specific decision limits for two new automated parathyroid hormone and 25-hydroxyvitamin D assays. *Clinical chemistry*. 2005 Feb;51(2):395-400. PubMed PMID: 15563480.
56. Knox S, Harris J, Calton L, Wallace AM. A simple automated solid-phase extraction procedure for measurement of 25-hydroxyvitamin D3 and D2 by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Annals of clinical biochemistry*. 2009 May;46(Pt 3):226-30. PubMed PMID: 19389886.
57. Roth HJ, Schmidt-Gayk H, Weber H, Niederau C. Accuracy and clinical implications of seven 25-hydroxyvitamin D methods compared with liquid chromatography-tandem mass spectrometry as a reference. *Annals of clinical biochemistry*. 2008 Mar;45(Pt 2):153-9. PubMed PMID: 18325178.
58. Leino A, Turpeinen U, Koskinen P. Automated measurement of 25-OH vitamin D3 on the Roche Modular E170 analyzer. *Clinical chemistry*. 2008 Dec;54(12):2059-62. PubMed PMID: 18927245.
59. Hollis BW. Measuring 25-hydroxyvitamin D in a clinical environment: challenges and needs. *The American journal of clinical nutrition*. 2008 Aug;88(2):507S-10S. PubMed PMID: 18689391.
60. Cavalier E, Carlisi A, Bekaert AC, Rousselle O, Chapelle JP, Souberbielle JC. Analytical evaluation of the new Abbott Architect 25-OH vitamin D assay. *Clinical biochemistry*. 2012 Apr;45(6):505-8. PubMed PMID: 22321565.
61. Simpson CA, Cusano AM, Bihuniak J, Walker J, Insogna KL. Effect of 25(OH) vitamin D reference method procedure (RMP) alignment on clinical measurements obtained with the IDS-iSYS chemiluminescent-based automated analyzer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2015 Apr;148:41-6. PubMed PMID: 25239596.
62. Freeman J, Wilson K, Spears R, Shalhoub V, Sibley P. Erratum to "Influence of Vitamin D Binding Protein on Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Measurement Using the ADVIA Centaur Vitamin D Total Assay". *International journal of endocrinology*. 2014;2014:653692. PubMed PMID: 25388159. Pubmed Central PMCID: 4214162.
63. Freeman J, Wilson K, Spears R, Shalhoub V, Sibley P. Influence of Vitamin D Binding Protein on Accuracy of 25-Hydroxyvitamin D Measurement Using the ADVIA Centaur Vitamin D Total Assay. *International journal of endocrinology*. 2014;2014:691679. PubMed PMID: 25045351. Pubmed Central PMCID: 4089903.
64. Farrell CJ, Martin S, McWhinney B, Straub I, Williams P, Herrmann M. State-of-the-art vitamin D assays: a comparison of automated immunoassays with liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods. *Clinical chemistry*. 2012 Mar;58(3):531-42. PubMed PMID: 22230812.
65. Viljoen A, Singh DK, Farrington K, Twomey PJ. Analytical quality goals for 25-vitamin D based on biological variation. *Journal of clinical laboratory analysis*. 2011;25(2):130-3. PubMed PMID: 21438007.
66. Cluse ZN, Fudge AN, Whiting MJ, McWhinney B, Parkinson I, O'Loughlin PD. Evaluation of 25-hydroxy vitamin D assay on the immunodiagnostic systems iSYS analyser. *Annals of clinical biochemistry*. 2012 Mar;49(Pt 2):159-65. PubMed PMID: 22155920.

67. Hollis BW. Editorial: The determination of circulating 25-hydroxyvitamin D: no easy task. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jul;89(7):3149-51. PubMed PMID: 15240585.
68. Lensmeyer GL, Wiebe DA, Binkley N, Drezner MK. HPLC method for 25-hydroxyvitamin D measurement: comparison with contemporary assays. *Clinical chemistry*. 2006 Jun;52(6):1120-6. PubMed PMID: 16574756.
69. Wootton AM. Improving the measurement of 25-hydroxyvitamin D. *The Clinical biochemist Reviews / Australian Association of Clinical Biochemists*. 2005 Feb;26(1):33-6. PubMed PMID: 16278775. Pubmed Central PMCID: 1240027.
70. Turpeinen U, Hohenthal U, Stenman UH. Determination of 25-hydroxyvitamin D in serum by HPLC and immunoassay. *Clinical chemistry*. 2003 Sep;49(9):1521-4. PubMed PMID: 12928235.
71. Tai SS, Bedner M, Phinney KW. Development of a candidate reference measurement procedure for the determination of 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ in human serum using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Analytical chemistry*. 2010 Mar 1;82(5):1942-8. PubMed PMID: 20136128. Pubmed Central PMCID: 2838390.
72. Stepman HC, Vanderroost A, Van Uytvanghe K, Thienpont LM. Candidate reference measurement procedures for serum 25-hydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₂ by using isotope-dilution liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 2011 Mar;57(3):441-8. PubMed PMID: 21248072.
73. Shah I, James R, Barker J, Petroczi A, Naughton DP. Misleading measures in Vitamin D analysis: a novel LC-MS/MS assay to account for epimers and isobars. *Nutrition journal*. 2011;10:46. PubMed PMID: 21569549. Pubmed Central PMCID: 3114718.
74. Saenger AK, Laha TJ, Bremner DE, Sadrzadeh SM. Quantification of serum 25-hydroxyvitamin D(2) and D(3) using HPLC-tandem mass spectrometry and examination of reference intervals for diagnosis of vitamin D deficiency. *American journal of clinical pathology*. 2006 Jun;125(6):914-20. PubMed PMID: 16690491.
75. Chen H, McCoy LF, Schleicher RL, Pfeiffer CM. Measurement of 25-hydroxyvitamin D₃ (25OHD₃) and 25-hydroxyvitamin D₂ (25OHD₂) in human serum using liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its comparison to a radioimmunoassay method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008 May;391(1-2):6-12. PubMed PMID: 18279671.
76. Mata-Granados JM, Luque De Castro MD, Quesada JM. Fully automated method for the determination of 24,25(OH)₂ and 25(OH) D₃ hydroxyvitamins, and vitamins A and E in human serum by HPLC. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*. 2004 May 28;35(3):575-82. PubMed PMID: 15137982.
77. Mata-Granados JM, Quesada Gomez JM, Luque de Castro MD. Fully automatic method for the determination of fat soluble vitamins and vitamin D metabolites in serum. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009 May;403(1-2):126-30. PubMed PMID: 19361456.
78. Yates AM, Bowron A, Calton L, Heynes J, Field H, Rainbow S, et al. Interlaboratory variation in 25-hydroxyvitamin D₂ and 25-hydroxyvitamin D₃ is significantly improved if common calibration material is used. *Clinical chemistry*. 2008 Dec;54(12):2082-4. PubMed PMID: 19042996.
79. Carter GD, Jones JC. Use of a common standard improves the performance of liquid chromatography-tandem mass spectrometry methods for serum 25-hydroxyvitamin-D. *Annals of clinical biochemistry*. 2009 Jan;46(Pt 1):79-81. PubMed PMID: 19103962.
80. Binkley N, Krueger D, Cowgill CS, Plum L, Lake E, Hansen KE, et al. Assay variation confounds the diagnosis of hypovitaminosis D: a call for standardization. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*. 2004 Jul;89(7):3152-7. PubMed PMID: 15240586.

81. Hollis BW. Assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: emergence as clinically important diagnostic tools. *Nutrition reviews*. 2007 Aug;65(8 Pt 2):S87-90. PubMed PMID: 17867378.
82. Hollis BW, Horst RL. The assessment of circulating 25(OH)D and 1,25(OH)2D: where we are and where we are going. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*. 2007 Mar;103(3-5):473-6. PubMed PMID: 17197173. Pubmed Central PMCID: 1892844.
83. Jones G, Horst R, Carter G, Makin H. Contemporary diagnosis and treatment of vitamin D-related disorders. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*. 2007 Dec;22 Suppl 2:V11-5. PubMed PMID: 18290713.
84. A. Braithwaite FJS. *Chromatographic Methods*1999.
85. . Available from: www.dionex.com.
86. . Available from: http://www.chem.uoa.gr/courses/instrumental/Eisagwgh_stis_xrwmata_methodous.pdf.
87. . Available from: <http://chimikoergastirio.blogspot.gr/2009/12/hplc.html>.
88. . Available from: <http://shodexhplc.com/lessons/lesson-1-introduction-to-hplc/>.
89. LIAISON 25 OH Vitamin D TOTAL Assay (REF 310600): DIASORIN Inc.
90. . Available from: <http://atommed.net/index.php/products/hematologiji/reagent>.
91. Payne RB. Method comparison: evaluation of least squares, Deming and Passing/Bablok regression procedures using computer simulation. *Annals of clinical biochemistry*. 1997 May;34 (Pt 3):319-20. PubMed PMID: 9158833.
92. Bilic-Zulle L. Comparison of methods: Passing and Bablok regression. *Biochemia medica*. 2011;21(1):49-52. PubMed PMID: 22141206.
93. Bland JM AD. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. 1986. Pubmed Central PMCID: 2868172.
94. **Bland JM AD**. Measuring agreement in method comparison studies. *Statistical Methods in Medical Research*. 1999. Pubmed Central PMCID: 10501650.
95. Altman DG BJ. "Measurement in medicine: the analysis of method comparison studies". *The Statistician*. 1983; 32: 32: 307–17.
96. Hanneman SK. Design, analysis, and interpretation of method-comparison studies. *AACN advanced critical care*. 2008 Apr-Jun;19(2):223-34. PubMed PMID: 18560291. Pubmed Central PMCID: 2944826.