

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

PLAZMA / SERUMDA
TOPLAM HOMOSİSTEİN MİKTARININ
ESI-LC-MS/MS YÖNTEMİYLE
ÖLÇÜLMESİ

Murat ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

GEBZE
2009

T.C.
GEBZE YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ
MÜHENDİSLİK VE FEN BİLİMLERİ
ENSTİTÜSÜ

PLAZMA / SERUMDA
TOPLAM HOMOSİSTEİN MİKTARININ
ESI-LC-MS/MS YÖNTEMİYLE
ÖLÇÜLMESİ

Murat ÇELİK
YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Ali TÜRKAN

GEBZE
2009

ÖZET

TEZ BAŞLIĞI: Plazma / Serumda Toplam Homosistein Miktarının ESI-LC-MS/MS Yöntemiyle Ölçülmesi

YAZAR ADI: Murat ÇELİK

Bu tez çalışmasında, sıvı kromatografisi/elektrosprey iyonizasyonlu ardışık kütle spektrometresi (ESI-LC-MS/MS) yöntemi kullanılarak tHcys'nin kantitatif ölçümü için türevlendirme esaslı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde örnekler propil kloroformat ile reaksiyona sokularak Hcys-propil esteri elde edilmiş olup, internal standart olarak kullanılan homosistein-d4 varlığında analiz edilmiştir. Örnekler, aynı zamanda, türevlendirme işlemi yapılmadan da ESI-LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar doğrusallık, tekrarlanabilirlik, örnek kararlılığı ve teşhis ve miktarlandırma limitleri açısından karşılaştırılmıştır.

Lineerite çalışmasında türevsiz yöntem için lineerite aralığı 0-35 µmol/L, türevli yöntem içinse 0-50 µmol/L olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik çalışmasında ise relatif standart sapma değerleri (%RSD) %4,48-7,62 arasında değişirken, türevli yöntem için %1,77-2,06 arasında değişmektedir. Teşhis limitleri türevsiz ve türevli yöntem için sırasıyla 0,24 µmol/L ve 0,07 µmol/L olarak hesaplanmıştır. Miktarlandırma limitleri de türevsiz ve türevli yöntem için sırasıyla 0,80 µmol/L ve 0,23 µmol/L olarak hesaplanmıştır. Stabilite çalışmasında türevli örneklerin türevsiz örneklere göre daha kararlı olduğu gözlemlenmiştir.

Sonuç olarak türevli yöntemde örnek hazırlama aşamaları ve süresinde bir miktar artış olmasına rağmen yöntemin doğrusallığı, tekrarlanabilirliği, teşhis ve miktarlandırma limitleri ve örnek stabilitesi gibi konularda belirgin avantajlar sağlanmıştır.

SUMMARY

TITLE OF THESIS: Determination of Total Homocysteine Level in Plasma / Serum by ESI-LC-MS/MS Method

AUTHOR: Murat ÇELİK

In this study, a derivatization based liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry (ESI-LC-MS/MS) method for the quantitative determination of total homocysteine in plasma/serum has been developed. The propyl ester of homocysteine formed upon the treatment of the samples with propyl chloroformate. The derivatized samples were analyzed under the presence of the deuterated internal standards homocysteine-d₄. The underivatized samples were also analyzed by ESI-LC-MS/MS method. Both underivatized and derivatized methods were compared in terms of linearity, repeatability, stability of samples and limit of detection and quantitation.

The linearity ranges were 0-35 $\mu\text{mol/L}$ and 0-50 $\mu\text{mol/L}$ for underivatized and derivatized homocysteine, respectively. The relative standard deviations ranged from 4,48 to 7,62% for underivatized homocysteine and from 1,77 to 2,06% for derivatized methods. The limits of detection were 0,24 $\mu\text{mol/L}$ and 0,07 $\mu\text{mol/L}$ for underivatized and derivatized methods, respectively. The limits of quantitation were 0,80 $\mu\text{mol/L}$ for underivatized method and 0,23 $\mu\text{mol/L}$ for derivatized method. Derivatized samples were found to be more stable than underivatized ones.

Overall, in spite of some extra steps and extra time for sample preparation, the derivatized method gave better results compared to the underivatized one in terms of linearity, repeatability, stability of samples and limit of detection and quantitation.

TEŞEKKÜR

Tez alıőmam sűresince her tűrlű desteęini esirgemeyen, sorunlarda faydalı tavsiyelerde bulunup, özűme yűnelik yol gűsteren danıőman hocam Yrd. Doę. Dr. Ali TŪRKAN'a;

Tavsiyelerinden ve katkılarından dolayı juri űyelerim, Doę. Dr. Aziz TANRISEVEN ve Yrd. Doę. Dr. Cengiz YATMAZ'a

Tez çalıőmam sırasında laboratuvar imkanlarından faydalanmama olanak sağlayan Zivak Teknoloji San. Tic. Ltd. Őti' ne;

Tez çalıőmam sırasında maddi ve manevi destekte bulunan çalıőma arkadaşlarıma ve aileme içtenlikle teőekkűr ederim.

İÇİNDEKİLER DİZİNİ

| | Sayfa No |
|--|-----------------|
| TEZ KABUL..... | iii |
| ÖZET..... | iv |
| ABSTRACT..... | v |
| TEŞEKKÜR..... | vi |
| İÇİNDEKİLER DİZİNİ..... | vii |
| ŞEKİLLER DİZİNİ..... | ix |
| TABLolar DİZİNİ..... | ix |
| SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ..... | x |
| BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ..... | 1 |
| BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER..... | 3 |
| 2.1 HOMOSİSTEİN..... | 3 |
| 2.1.1. Homosisteinin Yapısı..... | 3 |
| 2.1.2. Homosisteinin Oluşumu..... | 5 |
| 2.1.3. Homosistein Metabolizması..... | 6 |
| 2.1.3.1. Remetilasyon Yolu..... | 7 |
| 2.1.3.2. Transsülfürasyon Yolu..... | 7 |
| 2.1.4. Homosistein Düzeyi..... | 8 |
| 2.1.5. Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler..... | 9 |
| 2.1.6. Homosistein Metabolizmasındaki Edinsel Bozukluklar..... | 10 |
| 2.1.7. Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar..... | 11 |
| 2.1.8. Hiperhomosisteineminin Vasküler Hastalıklarla İliksisi..... | 11 |
| 2.1.9. Homosisteinin Hasar Mekanizmaları..... | 12 |
| 2.1.10. Hiperhomosisteineminin Komplikasyonları..... | 12 |
| 2.2 YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ..... | 13 |
| 2.3. KÜTLE SPEKTROMETRESİ..... | 14 |
| 2.4.1. Kütle Spektrometresinin Prensibi..... | 15 |
| 2.4.2. İyonlaştırma Kaynağı..... | 15 |
| 2.4.3. Ayrıştırma Teknikleri..... | 16 |
| 2.4.3.1. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi..... | 16 |
| 2.4.3.2. Likit Kromatografi-Kütle Spektrometresi..... | 17 |
| 2.4.4. Kantitatif Analiz..... | 17 |
| 2.4.5. Ardışık Kütle Spektrometresi..... | 18 |
| 2.4.6. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı..... | 19 |

| | | |
|---|--|-----------|
| 2.4.7. | Tandem MS/MS Sisteminin Avantajları..... | 19 |
| 2.4 | LİTERATÜRDE HOMOSİSTEİN ÖLÇÜMÜ | 20 |
| BÖLÜM 3: GEREÇ VE YÖNTEM..... | | 22 |
| 3.1. | GEREÇLER..... | 22 |
| 3.2. | YÖNTEM..... | 22 |
| 3.2.1. | Türevsiz Homosistein Analizi için Örnek Hazırlanması..... | 22 |
| 3.2.2. | Türevli Homosistein Analizi için Örnek Hazırlanması..... | 22 |
| 3.2.3. | HPLC Şartları..... | 23 |
| 3.2.4. | Kütle Spektrometresi Şartları..... | 24 |
| 3.2.5 | Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Karşılaştırılması..... | 26 |
| 3.2.5.1 | Spesifiklik..... | 26 |
| 3.2.5.2 | Doğruluk..... | 26 |
| 3.2.5.3 | Örnek Stabilitesi..... | 26 |
| 3.2.5.4 | Doğrusallık..... | 26 |
| 3.2.5.5 | Tekrarlanabilirlik..... | 27 |
| 3.2.5.6 | Laboratuvar İçi Yeniden Üretilirlik..... | 27 |
| 3.2.5.7 | Teşhis ve Miktarlandırma Limitleri | 27 |
| BÖLÜM 4: SONUÇLAR VE TARTIŞMA..... | | 28 |
| 4.1. | Örneklerin Hazırlanmasında Kullanılan Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Karşılaştırılması..... | 28 |
| 4.2. | DTT Konsantrasyonunun Analiz Sonuçlarına Etkisi..... | 35 |
| 4.3. | Türevli ve Türevsiz Yöntemlerde Sinyal/Gürültü Oranlarının Karşılaştırılması..... | 36 |
| 4.4. | Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Analiz Sonuçlarının Doğruluğu..... | 37 |
| 4.5. | Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Örnek Stabilitésinin Karşılaştırılması..... | 38 |
| 4.6. | Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Doğrusallığın Karşılaştırılması..... | 39 |
| 4.7. | Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Tekrarlanabilirlik Verilerinin Karşılaştırılması..... | 40 |
| 4.8. | Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Laboratuvar İçi Yeniden Üretilirlik Verilerinin Karşılaştırılması..... | 42 |
| 4.9. | Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Tespit ve Miktarlandırma Limitlerinin Karşılaştırılması..... | 44 |
| BÖLÜM 5: GENEL SONUÇ..... | | 45 |
| KAYNAKLAR..... | | 46 |
| ÖZGEÇMİŞ..... | | 53 |

ŞEKİLLER DİZİNİ

| Şekil | | Sayfa No |
|-------|--|----------|
| 2.1 | Homosisteinin Yapısı..... | 3 |
| 2.2 | Homosisteinin Vücuttaki Bulunduğu Haller..... | 4 |
| 2.3 | Metiyonin ve SAM..... | 5 |
| 2.4 | SAH molekülünün yapısı | 6 |
| 2.5 | Homosistein metabolizması..... | 8 |
| 4.1 | Protein-HCYS disülfid bağının DTT ile indirgenmesi..... | 28 |
| 4.2 | Türevsiz yöntemle elde edilen HCYS ve HCYS-d4 kromatogramları..... | 29 |
| 4.3 | Plazma örneğinde türevsiz Hcys'e ait iyon piki (A) ve parçalanma sonrası spektrumu (B)..... | 30 |
| 4.4 | Homosisteinin propil kloroformat ile esterleşmesi..... | 31 |
| 4.5 | Türevlendirilmiş plazma örneğine ait toplam iyon kromatogramı.... | 32 |
| 4.6 | Plazma örneğinde türevli Hcys'e ait iyon piki (A) ve parçalanma sonrası spektrumu (B)..... | 33 |
| 4.7 | Türevli yöntemle elde edilen HCYS ve HCYS-d4 kromatogramları..... | 33 |
| 4.8 | Türevli ve türevsiz yöntemle elde edilen HCYS piklerinin karşılaştırılması | 34 |
| 4.9 | Farklı DTT konsantrasyonları ile muamele edilmiş plazma örneklerine ait kromatogramlar..... | 35 |
| 4.10 | Türevli ve türevsiz yöntem için temsili boş örneklerin analizi ile elde edilen kromatogramlar..... | 36 |
| 4.11 | Türevli ve türevsiz yöntem kalibrasyon eğrileri..... | 39 |
| 4.12 | Türevli ve türevsiz yöntemler için tekrarlanabilirlik grafiği | 41 |
| 4.13 | Türevsiz (A) ve türevli (B) yöntemler için laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik grafikleri..... | 43 |

TABLolar DİZİNİ

| Tablo | | Sayfa No |
|-------|--|----------|
| 3.1 | Türevsiz yöntem için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi..... | 24 |
| 3.2 | Türevli yöntem için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi..... | 24 |
| 3.3 | Türevsiz Homosistein Analizi için Optimum MS Koşulları..... | 25 |
| 3.3 | Türevli Homosistein Analizi için Optimum MS Koşulları..... | 25 |
| 4.1 | Türevli yöntem için gerçeklik çalışması..... | 37 |
| 4.2 | Türevsiz yöntem için gerçeklik çalışması..... | 37 |
| 4.3 | Türevli ve türevsiz yöntemler için stabilite çalışması..... | 38 |
| 4.4 | Türevli ve türevsiz yöntemler için %RSD değerleri..... | 40 |
| 4.5 | Türevli ve türevsiz yöntemler için LOD ve LOQ değerleri..... | 44 |

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

| | |
|----------|---|
| Hcys | Homosistein |
| tHcys | Toplam Homosistein |
| µmol | Mikromol |
| L | Litre |
| HPLC | Yüksek Performanslı Likit Kromatografisi |
| EI | Enzim İmmunoassay |
| GC | Gaz Kromatografisi |
| LC | Sıvı Kromatografisi |
| MS | Kütle Spektrometresi |
| ESI | Elektrosprey İyonizasyon |
| S/N | Sinyal/Gürültü |
| MAT | Metiyonin Adenozil Transferaz |
| SAM | S-Adenozil Metiyonin |
| ATP | Adenozin trifosfat |
| RNA | Ribonükleik asit |
| DNA | Deoksiribonükleik asit |
| SAH | S-Adenozil Homosistein |
| MTHFR | Metilen Tetrahidrofolat Redüktaz |
| m/z | Kütle/Yük Oranı |
| CI | Kimyasal İyonizasyon |
| FAB | Hızlı Atom Bombardımanı |
| MALDI | Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu |
| IS | İnternal Standart |
| RT | Alıkonma Zamamı |
| DTT | Dithiothreitol |
| CE | Çarpışma Enerjisi |
| eV | Elektronvolt |
| amu | Atomik Kütle Birimi |
| RSD | Relatif standart sapma |
| LOD, LOQ | Teşhis Limiti, Miktarlandırma Limiti |
| mg | Miligram |
| M | Molar |
| σ | Standart Sapma |

BÖLÜM 1: GİRİŞ VE AMAÇ

Homosistein (Hcys) sülfür içeren bir aminoasit olup vitamin B₁₂'nin önemli bir rol oynadığı normal metiyonin metabolizmasının bir ürünüdür. Genetik faktörler, folik asit ve vitamin B₁₂ bozuklukları plazma/serumdaki Hcys konsantrasyonunun artmasına neden olmaktadır. Hcys konsantrasyonundaki bu artış kardiyovasküler hastalıklar, venöz tromboembolizm, kavrama yeteneğindeki zayıflıklar (Alzheimer hastalığı vb.), nöral tüp bozuklukları gibi hastalıklar için önemli bir risk faktörü olarak kabul edilmektedir. Bu nedenle Hcys konsantrasyonunun doğru olarak ölçülmesi klinik laboratuvarlar için büyük öneme sahiptir.

Normal toplam plazma Hcys konsantrasyonları açlık durumunda 5-15 µmol/L arasındadır. Bazı yayınlarda 12-15 µmol/L arasındaki değerler sınır değerleri olarak kabul edilmektedir. Hcys düzeyi yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik durum, etnik özellikler gibi pek çok faktörden etkilenmektedir.

Klinik çalışmalarda genel olarak Hcys toplam plazma homosisteini (tHcys) olarak ölçülür. Bu ölçüm; disülfid bağı içeren Hcys, Hcys tiyolakton, serbest Hcys ve proteine bağlı Hcys formlarının toplamını içermektedir. Toplam miktarın %70- 80'i proteine bağlı formdur.

Literatür incelendiğinde plazma/serum örneklerinde toplam homosistein miktarı genel olarak yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC), enzim immunoassay (EI), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi (GC-MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemleri (LC-MS) ile ölçülmüştür. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) MS/MS sistemi kullanılarak kararlı izotop dilüsyon yöntemi ile ilk toplam homosistein ölçümü Magera ve ark.(1995) tarafından gerçekleştirilmiş ve daha sonra birkaç grup tarafından benzer çalışmalar yapılmıştır. Tandem kütle spektrometresinin bu ölçümlerde kullanılmaya başlaması sonucunda analizlerde sinyal/gürültü (S/N) oranlarında artış ile analizin duyarlılığı artmıştır. Ayrıca parçalanana ana iyonun istenen

parçası izlenebildiğinden girişim yapan etkenler elimine edilerek analizin seçiciliği de artırılmıştır.

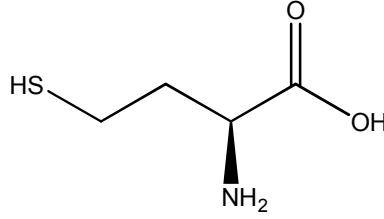
Bu tez çalışmasında, sıvı kromatografisi/elektrosprey iyonizasyonlu ardışık kütle spektrometresi (ESI-LC-MS/MS) yöntemi kullanılarak tHcys'nin kantitatif ölçümü için türevlendirme esaslı bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemde örnekler propil kloroformat ile reaksiyona sokularak Hcys-propil esteri elde edilmiş olup, internal standart olarak kullanılan homosistein-d4 varlığında analiz edilmiştir. Örnekler, aynı zamanda, türevlendirme işlemi yapılmadan da ESI-LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilmiştir. Her iki yöntemle elde edilen sonuçlar doğrusallık, tekrarlanabilirlik, örnek kararlılığı ve teşhis ve miktarlandırma limitleri açısından karşılaştırılmıştır. Karşılaştırmalı çalışmalar sonucunda her iki yöntemin doğrusallık, tekrarlanabilirlik, teşhis ve miktarlandırma limiti, laboratuvar içi tekrarlanabilirlik ve örnek stabilitesi gibi özellikleri incelenerek avantajları ve dezavantajları belirtilmiştir.

BÖLÜM 2: GENEL BİLGİLER

2.1. HOMOSİSTEİN

2.1.1. Homosisteinin Yapısı

Hcys ilk kez 1932 yılında Butz ve du Vigneaud tarafından tanımlanmıştır [1]. Hcys proteinlerin yapısına katılmayan, kükürtlü bir aminoasittir. Normal olarak diyetle alınmaz, vücuttaki tek kaynağı gerekli bir aminoasit olan metiyonindir. [2].



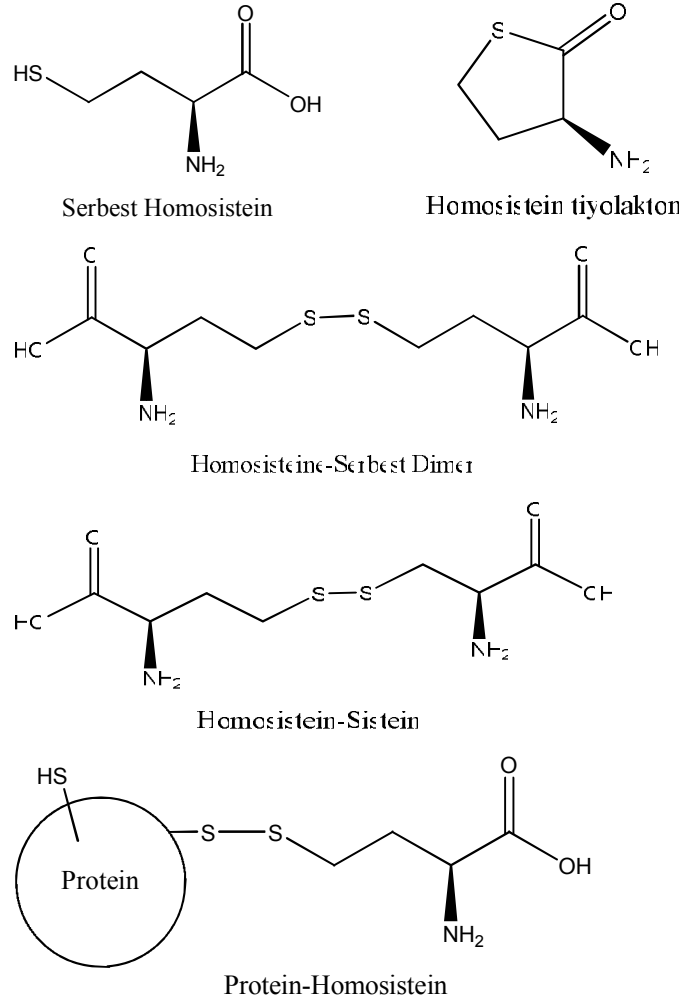
Şekil 2.1. Homosisteinin yapısı

Hcys, metiyonin metabolizması esnasında bir ara ürün olarak oluşmakta, serin ve glutatyonun oluşumuna katılarak veya tekrar metiyonine dönüşerek metabolize olmaktadır. Metabolizması bazı vitaminlerle yakından ilişkilidir ve Hcys metabolizmasındaki değişiklikler, ateroskleroz, venöz tromboz, malinite ve nöral tüp defekti gibi pek çok patolojide etkili bir faktör olarak görülmektedir [3-7].

Kardiyovasküler hastalıklara bağlı ölüme ve sakatlığa sebep olan nedenler içinde önemli bir yer tutmaktadır. Vasküler risk faktörleri arasında kolesterol yüksekliği, diyabet, sigara kullanımı ve hipertansiyon sayılmakla birlikte, son yıllarda “yeni kolesterol” olarak tanımlanan kanda homosistein yüksekliğinin önemi yoğun araştırmalara neden olmaktadır.

Hcys kaynaklı vasküler hasarlarda pek çok mekanizma öne sürülmesine rağmen hasar mekanizmaları tam olarak aydınlatılamamıştır. Üzerinde en çok durulan mekanizma endotel fonksiyon bozukluğudur.

İnsan plazmasında Hcys indirgenmiş (hücre içi) ve yükseltgenmiş (hücre dışı) olmak üzere iki halde bulunur [2]. İndirgenmiş ve yükseltgenmiş hallerin toplamı toplam homosistein (tHcys) olarak adlandırılır [8]. Homosisteinin yükseltgenmiş hali insan plazmasındaki toplam homosisteinin genellikle %98–99’unu oluşturur [2]. Toplam Hcys’in %1’ini ise indirgenmiş hali oluşturur. İndirgenmiş Hcys redoks reaksiyonlarına katılabilen yüksek derecede reaktif serbest –tiyo grubu içermektedir [9].



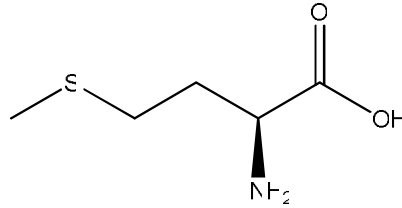
Şekil 2.2. Homosisteinin Vücutta Bulunduğu Haller

Hcys'nin vücutta birçok sistemde yaptığı hasardan indirgenmiş hali sorumludur. Bu yüzden indirgenmiş haldeki Hcys molekülleri arasında disülfid

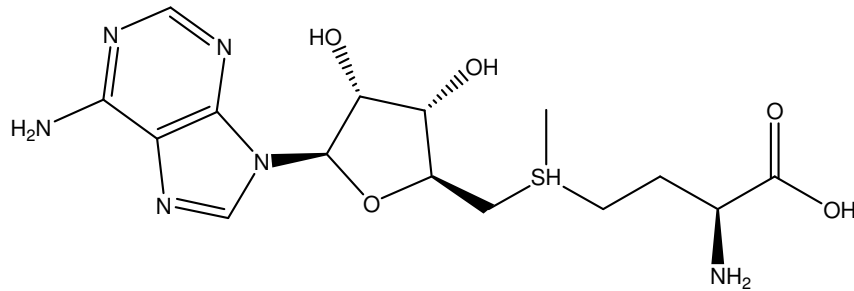
bağları oluşturulur ve yükseltgenmiş hali olan homosistin ve sisteine çevrilir. Bir diğer yükseltgenmiş hali ise Hcys'in proteinlere bağlanması ile oluşur. tHcys, vücutta genellikle plazma/serumda, bazen beyin omurilik sıvısında ve nadir olarak da idrarda ölçülür [1].

2.1.2. Homosisteinin Oluşumu

Hcys, gerekli bir aminoasit olan ve metil grubu içeren metiyoninin demetilasyonu ile oluşur. Metiyoninin içerdiği metil grubu, metiyonin adenzil transferaz (MAT) enzimi aracılığı ile ATP kullanarak S-Adenzil metiyonin'e (SAM) dönüştürülerek aktifleştirilir.



Metiyonin

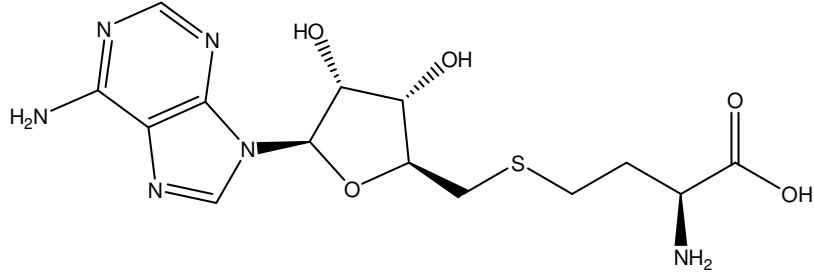


S-adenozil metiyonin (SAM)

Şekil 2.3. Metiyonin ve SAM yapıları

SAM organizma için temel biyolojik metil vericidir. Merkezi sinir sisteminde ise tek metil vericidir. SAM'nin içerdiği metil grubu oldukça reaktiftir ve birçok metil transferaz reaksiyonunda görev alır [1]. SAM'nin yer

aldığı 100'ün üzerinde reaksiyon tanımlanmıştır. Bu metilasyon reaksiyonlarından bazıları arasında RNA, DNA, proteinler, fosfolipidler, myelin, polisakkaritler, katekolaminler, poliaminler, sipermidin ve spermin sentezi sayılabilir. Metil transferaz reaksiyonları sonucunda SAM molekülünden S-adenozil homosistein (SAH) oluşur. SAH de SAH hidrolaz enzimi ile homosistein ve adenozele ayrışır.



S-adenozil homosistein (SAH)

Şekil 2.4. SAH molekülünün yapısı

Bu seri reaksiyonlar transmetilasyon reaksiyonları olarak bilinir ve vücudun her hücresinde gerçekleşir [2]. SAH seviyeleri yükseldiğinde tHcys artar [1]. Birçok metil transferaz enzimi SAM ile karşılaştırıldığında SAH molekülüne göre daha fazla afinite gösterir. Hiperhomosisteinemi durumunda en önemli temel mekanizma SAH birikimidir. Hücre içi metilasyon için SAM/SAH oranı önemli bir göstergedir.

2.1.3. Homosistein Metabolizması

Hücrel Hcys metabolizması, metiyonin kullanılabilirliğine, Hcys'in metiyonine remetilasyonuna ve sisteine transsülfürasyonuna bağlıdır. Metiyoninin metilasyonu ile oluşan Hcys'in %50'si remetilasyona uğrayarak tekrar metiyonine, kalan %50'si ise transsülfürasyon yolu ile sisteine çevrilir [1]. Hcys metabolizmasının genel bir şeması Şekil 2.5'te gösterilmiştir.

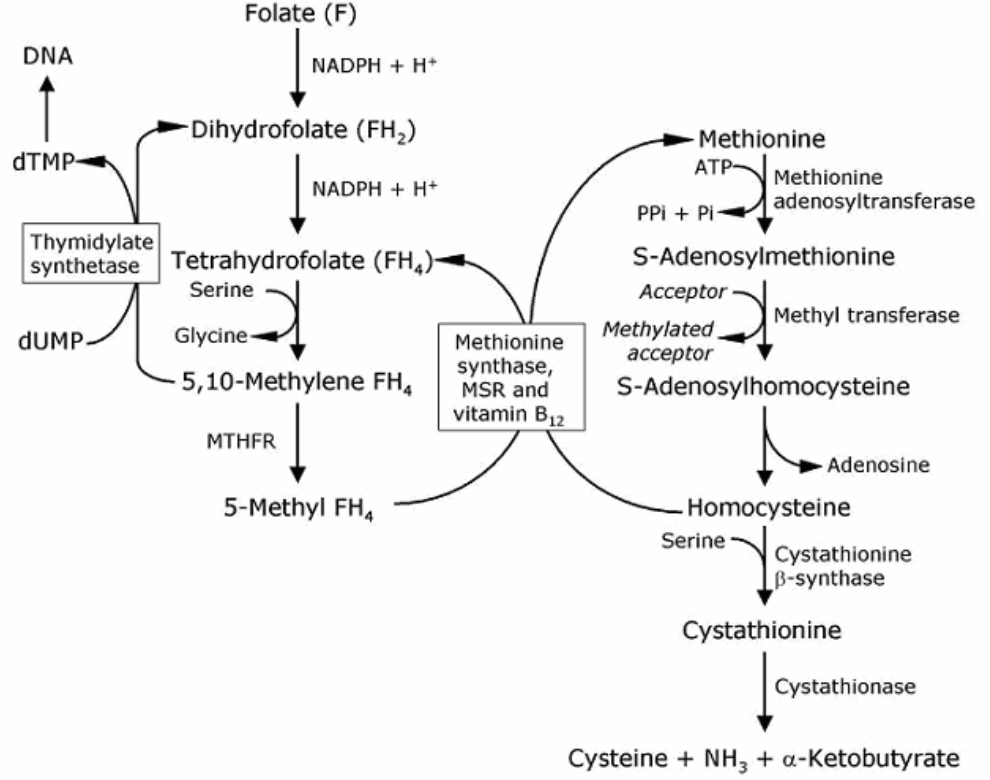
2.1.3.1 Remetilasyon Yolu

Hcys, vitamin B12'ye bağımlı bir enzim olan metiyonin sentaz aracılığı ile metiyonine dönüşür. Metiyonine dönüşümde gerekli metil grubu 5,10-metilen tetrahidrofolattan sağlanır. Buradaki metil grubu metilen tetrahidrofolat redüktaz enzimi (MTHFR) aracılığı ile sağlanır. Vitamin B12 MTHFR enzimi için kofaktördür. Remetilasyon karaciğer ve böbrekte gerçekleşir. Hcys'in remetilasyonunun azalması normal beyin fonksiyonu için gerekli metilasyon reaksiyonlarını bozar. SAM seviyelerinin düşmesi, SAH seviyelerinin artışı ise beyin ve diğer dokularda DNA hipometilasyonunu gösterir [1].

2.1.3.2 Transsülfürasyon Yolu

SAM konsantrasyonu arttığında transsülfürasyon yolu devreye girer. Hcys'in fazlası merkezi sinir sistemi hariç diğer dokularda serin ile geri dönüşümsüz olarak birleşerek sistatyonin ve sisteini oluşturur [1]. Bu yolda sistatyonin- β sentaz ve sistatyonin- χ - liyaz enzimleri ile kofaktör olarak da vitamin B6 kullanılır [10].

Sistein, hücresel yapıları oksidatif hasar ve diğer tip hasarlara karşı koruyan glutatyonun öncü maddesidir. Transsülfürasyon yolu karaciğer, böbrek, ince bağırsak ve pankreasta aktiftir. Nöronlarda bu yol kapalıdır ve glutatyon sentezi için glial sistein kullanılır. Bu yüzden merkezi sinir sistemi oksidatif strese diğer dokulara göre daha duyarlıdır [1].



Şekil 2.5. Homosistein metabolizması [1].

2.1.4. Homosistein Düzeyi

Klinik çalışmalarda genel olarak Hcys “toplam plazma homosisteini” olarak ölçülür. Bu ölçüm; serbest Hcys, disülfid bağı içeren Hcys, Hcys tiyolakton ve proteine bağlı Hcys’i içermektedir. Toplam miktarın %70- 80’i proteine bağlı halidir.

Toplam plazma Hcys konsantrasyonları sağlıklı insanlarda açlık durumunda 5-15 $\mu\text{mol/L}$ arasındadır. Bazı yayınlarda 12-15 $\mu\text{mol/L}$ arasındaki değerler sınır değerleri olarak kabul edilmektedir. Hcys değerleri, yaşla birlikte artış gösterir. Erkeklerde ve postmenopozal kadınlarda daha yüksektir. [11-13].

Hcys düzeyi yaş, cinsiyet, sosyo-ekonomik durum, etnik özellikler gibi pek çok faktörden etkilenmektedir. Toplumların bu özellikler doğrultusunda kendi Hcys referans aralıklarını belirlemeleri gerekmektedir. Türk toplumu için yapılan referans çalışmasında homosisteinemi üst sınırı 12 µmol/L olarak bulunmuştur [14, 15].

Normal toplam plazma Hcys düzeyi 5-12 µmol/L'dir. Fakat yapılan çalışmalar, vasküler patolojinin 10 µmol/L'nin üzerinde başladığını göstermektedir [16, 17].

- Hafif hiperhomosisteinemi (15-30 µmol/L)
- Orta hiperhomosisteinemi (31-100 µmol/L)
- Ağır hiperhomosisteinemi (>100 µmol/L)

Ağır hiperhomosisteinemi durumları nadir görülürken (1/40000 - 1/100000), hafif hiperhomosisteineminin toplumda görülme sıklığı yaklaşık %5-7'dir. Hafif hiperhomosisteinemili hastalar, genellikle 30-40'lı yaşlarında, tekrarlayıcı arteriyel ve venöz tromboz veya prematüre koroner arter hastalığı oluşana kadar asemptomatiktirler. Ağır hiperhomosisteinemi vakaları genellikle homozigot enzim bozukluklarından kaynaklanırken, hafif hiperhomosisteinemi vakaları ise genellikle heterozigot enzim bozukluklarından veya edinsel nedenlerden meydana gelmektedir [18, 19].

2.1.5. Homosistein Düzeyini Etkileyen Faktörler

Plazma Hcys konsantrasyonları genetik ve beslenme faktörleri tarafından düzenlenir. Hiperhomosisteinemi, Hcys metabolizmasında rol oynayan enzimlerdeki genetik bir bozukluktan veya beslenmeye bağlı vitamin yetmezliğinden veya her iki durumdan dolayı oluşabilmektedir [20, 21]. Aşağıda hiperhomosisteinemiye neden olan genel etkenler belirtilmiştir.

2.1.6. Homosistein Metabolizmasındaki Edinsel Bozukluklar

Bu bozukluklar en sık rastlanan ve kolaylıkla tedavi edilebilen bozukluklardır. Edinsel beslenmeyle ilgili hiperhomosisteinemi nedenlerinden, folat ve kobalaminin yetersiz alınması en yaygın görülen nedenlerdir. B6 vitamininin yetersiz alımı da özellikle transsülfürasyon yolu bozukluğuna neden olabilmektedir. Verhoef ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diyetle alınan folik asit, B6 ve B12 vitamin yetersizliğinin, Kuzey Amerika ve Avrupa'da özellikle de yaşlılar arasında oldukça yaygın olduğu saptanmıştır [22]. Bu maddeler Hcys metabolizmasında kosubstrat ve kofaktörlerdir. Bu vitaminlerin hafif veya orta düzeylerde nadiren de ağır düzeyde hiperhomosisteinemiye neden olabileceği bilinmektedir [23-27]. B6, B12 ve folik asit düzeyi ile kan Hcys konsantrasyonu arasında negatif korelasyon vardır. Hiperhomosisteinemili vakaların 2/3'ünde bir veya daha fazla B vitamin eksikliği saptanmıştır [28-30].

Edinsel hiperhomosisteinemi nedenlerinden bir diğer grubu ise hastalık durumları oluşturmaktadır. Bunların içinde en önemlisi böbrek fonksiyon bozukluklarıdır. Kronik böbrek yetmezliği olan hastalarda kreatinin artışı ile birlikte kan Hcys düzeyi artarak normalin 4 katına kadar çıkabilmektedir. Bu artış son dönem böbrek yetmezliği olan hastalardaki aterosklerozis oluşumundaki hızlanmayı kısmen açıklayabilmektedir [30].

Hofmann ve ark. yaptıkları bir çalışmada tip I diabetli hastaların yaklaşık %35'inde plazma homosistein düzeylerini yüksek bulmuştur. Hcys düzeyi yüksek diabetik hastalarda, retinopati, nefropati ve kalp makrovasküler veya bacak damarlarındaki hastalıklarının sıklığının daha fazla olduğu bildirilmektedir [25].

Pek çok ilaç kullanımı hiperhomosisteinemiye neden olmaktadır. Sigara pridoksal fosfat sentezini azaltmaktadır. Sigara içen kadınlarda %23, erkeklerde %12 daha yüksek plazma Hcys düzeyi saptanmıştır [31-33].

2.1.7. Homosistein Metabolizmasındaki Genetik Bozukluklar

Ağır genetik bozukluklar içinde en yaygın görülenen homozigot sistatasyonin- β sentaz (SBS) yetmezliğidir. Bu durum “kongenital homosistinüri” olarak da adlandırılır. Hastaların plazma ve idrar Hcys düzeyleri çok fazla yükselmekte ve bazı durumlarda 400 $\mu\text{mol/L}$ nin üzerine çıkabilmektedir. Homosistinüri doğuştan otozomal resesif bir metabolizma hastalığıdır. Toplumda görülme sıklığı 1/200.000’dir. SBS enzim aktivitesi %0-2 arasındadır. Bu enzimin geni 21. kromozomdadır ve bugüne kadar tanımlanmış 17 tane mutasyonu mevcuttur. Bu farklı mutasyonlar plazma toplam homosistein düzeylerindeki farklılıklara neden olmaktadır [31, 32, 34].

2.1.8. Hiperhomosisteineminin Vasküler Hastalıklarla İlişkisi

McCully 1960’lı yıllarda yüksek plazma Hcys düzeylerinin ateroskleroz ve tromboza neden olabileceğini ileri sürmüştür. O günden bu güne kadar yapılan çalışmalarda hiperhomosisteineminin serebrovasküler, koroner ve periferik vasküler hastalığı olanlarda kontrollere göre daha yüksek düzeylerde bulunduğu gözlenmiştir ve yüksek Hcys düzeyinin, koroner, serebrovasküler ve periferik ateroskleroz ve venöz tromboz için, diğer bilinen risk faktörleri olmaması durumunda dahi tek başına bir risk faktörü olduğu belirtilmiştir.

Prematüre vasküler hastalığı olan hastaların %15-30’unda hafif (15 $\mu\text{mol/L}$ üstü) hiperhomosisteinemi varlığı gösterilmiştir. Hcys düzeyi normal üst sınırdan fazla olan vakalarda yapılan bir çalışmada, diğer risk faktörleri ortadan kaldırılmış olmasına rağmen, kontrollerle karşılaştırıldığında myokard infaktüsü riskinin 3 kat arttığı saptanmıştır [35, 36]. Venöz tromboz riski yüksek homosistein düzeyi ile ilişkilidir. Tekrarlayıcı venöz tromboembolizmli vakaların %25’inde, ilk venöz trombozis atağı geçiren hastaların %10’unda homosistein düzeyi yüksek bulunmuştur [37].

2.1.9. Homosisteinin hasar mekanizmaları

Hiperhomosisteinemi durumunda Hcys, reaktif oksijen radikallerinin oluşumunu sağlayarak oksidatif strese neden olur. Oksidatif stresi sağlayan mekanizmalar aşağıda belirtilmiştir.

- 1-** Endotelial nitrik oksit sentezine katılarak biyoyararlanımını azaltır [38].
- 2-** Antioksidan enzim aktivitesi veya ekspresyonunu azaltır.
- 3-** Vitamin C, E ve folik asit gibi antioksidan vitaminleri azaltır [39].
- 4-** Metal iyonlar ile etkileşime girer; Hcys'in reaktif sülfidril grubu demir ve bakır iyonlarının varlığında katalitik aktivite göstererek hidrojen peroksit, oksijen radikalleri ve homosisteinil radikallerinin artışına neden olur [40].
- 5-** Bozulmuş metilasyon; S-Adenozil homosistein seviyesinin yükselmesine, S-Adenozil Metiyonin düzeyinin düşmesine neden olur. S-Adenozil Metiyonin seviyesinin düşmesine bağlı olarak daha önce bahsedilmiş olan metilasyon reaksiyonunda sorunlar ortaya çıkar. Bunlardan biri de lipit transportu, metabolizması ve sinir sinyal iletiminde görevli olan kolin sentezinin etkilenmesidir [40].

2.1.10. Hiperhomosisteineminin Komplikasyonları

- 1.** Tromboz riskini arttırır.
- 2.** Kardiyovasküler risk faktörüdür.
- 3.** Kanser gelişiminde risk faktörüdür.
- 4.** Hiperhomosisteinemi folat eksikliği, oksidatif stress, anormal DNA metilasyonu gibi nedenlerden dolayı risk faktörüdür [41].

2.2. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli bir faz yardımıyla, sabit bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır.

Kromatografide durgun faz, bir katı veya katı yüzeyine kaplanmış bir sıvı fazdır. Durgun fazın üzerinden akan hareketli faz ise bir gaz veya sıvı fazdır. Hareketli fazın sıvı olduğu kromatografi türüne Sıvı Kromatografi, hareketli fazın gaz olduğu kromatografi türüne ise gaz kromatografi denir. Gaz kromatografi, gaz, uçucu sıvı ve katı karışımlar için uygulanan bir tekniktir. Sıvı kromatografi ise özellikle ısıl kararsız ve uçucu olmayan örnekler için uygulanır.

Sıvı kromatografi bir ayırma tekniğidir. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPLC) denir.

2.3. KÜTLE SPEKTROMETRESİ

Kütle spektrometreleri manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırt ederek analizleme esasına göre çalışan cihazlardır. Kütle spektrometreleri uzun yıllardır kullanılan analiz metodlarından birisidir. Günümüzde bilgisayar kontrollü son derece hassas kütle spektrometreleri üretilmiş, araştırma ve analiz laboratuvarlarında kullanılan önemli cihazlar haline gelmiştir. Kütle spektrometresinin tıp alanında kullanımı son yıllarda önemli oranda artmıştır. Özellikle metabolik hastalıkların tanısında ve yenidoğan dönemindeki tarama programlarında kütle spektrometresinin önemi son derece fazladır.

Arthur J Dempster'in 1918 yılında elektron iyonizasyon ve termal iyonizasyon konusunda sağladığı ilerlemeler ve Francis Aston'un 1920'li yıllarda izotoplar ve onların kütleleri üzerindeki çalışmaları ile kütle spektrometresinde gelişmeler kaydedilmiştir. Kütle spektrometresi ticari amaçla ilk defa 1940'lı yıllarda petrol ve kimya endüstrisinde kullanıma sunulmuştur. Holmes ve Morrell isimli araştırmacılar 1957 yılında ilk defa gaz kromatografi-kütle spektrometresi (GC-MS) sistemini oluşturmuşlardır [42].

Kütle spektrometresinin biyokimyada kullanımı 1956 yılında steroidlerin analizi ile başlamış, 1960'lı yıllarda peptidlerin sekans analizleri gerçekleştirilmiştir. İlk defa 1966 yılında Tanaka ve ark.'nın GC-MS sistemi ile izovalerik asidemi tanımlamalarıyla birlikte cihaz metabolik hastalıkların tanısında kullanılmaya başlamıştır [43]. 1980'li yıllarda tandem kütle spektrometresi geliştirilmiş ve birçok alanda kullanıma sunulmuştur. Artık günümüzde yapılacak analizin özelliğine göre farklı tiplerde son derece hassas kütle spektrometreleri geliştirilmiş, tıp, kimya ve fizik gibi bilim dalı laboratuvarlarının önemli cihazları haline gelmiştir [44-46].

2.2.1. Kütle Spektrometresinin Prensibi

Kütle spektrometreleri, yüklü partiküllerin manyetik ya da elektriksel bir alandan geçerken diğer yüklü partiküllerden m/z oranlarına göre ayrılmaları prensibine göre çalışırlar [47].

Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Yüklü moleküller stabil olmadıklarından başka moleküllerle veya bir yüzey ile çarpıştıklarında fragmentlerine parçalanırlar.

Oluşan her bir iyon kendine özgü bir kütle/yük oranına sahiptir ve bu oranlarının yoğunluğa karşı gösterildiği bir spektrumla tanımlanmaktadır. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen spektrum referans spektrum ile karşılaştırılarak bileşiğin kütlesi tanımlanır [47-49].

2.2.2. İyonlaştırma Kaynağı

Numune sisteme girdikten sonra gerçekleşen ilk işlem iyonlaştırma olayıdır. İyon kaynağı incelenecek maddenin türüne ve çalışmada istenilen bilgilere göre değişmektedir. İyon kaynağı ne türde olursa olsun yüksek iyon verimi ve olabildiğince küçük enerji dağılımı sağlayacak özelliklerde olması istenir. İyonlaştırma işlemi çeşitli kaynaklarla sağlanabilir.

İyon kaynaklarını başlıca gaz faz iyon kaynakları ve desorpsiyon iyon kaynakları olmak üzere iki grupta incelemek mümkündür. Gaz faz iyon kaynaklarında numune önce buharlaştırılır ve daha sonra iyonize edilir. Desorpsiyon kaynaklarında ise numune sıvı veya katı halden direkt gaz iyonlara dönüştürülür. Isıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşiklere kolaylıkla uygulanabilir olması desorpsiyon kaynaklarının avantajıdır. Gaz faz

kaynaklar ise genellikle kaynama noktası 500 °C'nin altındaki ısıya dayanıklı numunelere uygulanmaktadır [50].

Gaz faz iyon kaynaklarından elektron iyonizasyon (EI) [51] ve kimyasal iyonizasyon (CI) [52, 53] teknikleri en sık kullanılanlardır. Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; hızlı atom bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılmaktadır [54]. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır [55]. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ise yeni bir iyonizasyon yöntemi olup özellikle peptitlerin analizinde kullanılmaktadır [56].

2.2.3. Ayırıştırma Teknikleri

Kütle spektrometreleri iyon kaynağına giren bütün bileşikleri ayırıştırır ve iyonlaştırır. Organik bileşiklerin içerisinde çok fazla sayıda molekül mevcuttur ve hepsinin kütle fragmenti izlenir. Bu nedenle iyi bir spektrum elde etmek amacıyla belirli bir sürede sadece saf bir bileşiğin kütle spektrumunu almak gereklidir. Dolayısı ile kütle spektrometreleri gaz veya sıvı kromatografi gibi bir ayırıştırma işlemi ile birlikte kullanılması gerekir.

2.3.3.1. Gaz Kromatografi-Kütle Spektrometresi (GC-MS)

Gaz kromatografisi (GC) yüksek hassasiyette, hızlı analiz yapabilmesi ve çok yönlü olması açısından kompleks karışımların ayırımında kullanılan önemli enstrümental analiz tekniklerinden birisidir. GC'nin kapiler kolonları ile ayırıştırma işlemi sağlanır ve ayırıştırılan numune kütle spektrometresinde analiz edilir. GC-MS sistemleri organik bileşiklerin tanımlanmasında kullanılan son derece hassas ve seçici araçlardır [47, 50].

2.3.3.2. Likit Kromatografi–Kütle Spektrometresi (LC-MS)

Uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıksız olan bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılır. Sıvı faz kullanıldığı için yüksek ısı gerekmemektedir [57]. Thermosprey, LC uygulamalarından biri olup yüklü damlacıklar yaratmak esasına dayanır. Yüksek basınçlı sıvı kromatografi (HPLC) sisteminden MS sistemine gelen kapiler tüpün ucu yüksek voltaj uygulanarak ısıtılır. Isıyı optimize etmek için de tüpün ucundan numune iyon kaynağına püskürtülerek gönderilir.

“Thermosprey” iyonların sıvı halden gaz hale dönüştürüldüğü iyon evaporasyon işlemi esasına dayanır. Bu teoriye göre damlacıklar (+) ve (-) yüklü iyonlar ile çözücü içermektedirler. Ancak iyonlardan birinin polaritesi daha baskındır. Aradaki fark ise net yüküdür. Fazla yükün damlanın yüzeyinde biriktiği varsayılmaktadır. Çözücü buharlaştıkça damlacının küçülen çapına bağlı olarak yüzeyindeki elektrik alanı artar. Damlacık yeterince buharlaştığında damlacığın yüzeyinde biriken iyonlar yüzeyden ayrılır. “Thermosprey” genellikle yüksek vakum altında çalışır ve yüksek sıcaklıklara ihtiyaç duyar [57-59].

2.2.4. Kantitatif Analiz

Kütle spektrometresinde kantitatif doğruluk analitik işlemin başlangıcında eklenen uygun internal standart (IS) ile sağlanır. Bilinen miktarda IS eklenmesi ekstraksiyon, türevlendirme ve analiz sırasında herhangi bir aşamadaki madde kayıplarından gelen hataları elimine eder. Seçilen IS’ın ilgilenilen bileşiğin kimyasal yapısına uygun olması gerekir. Böylece IS’ın fiziksel ve kimyasal özelliklerinin bilinmeyen maddeninki ile uyumlu olması sağlanır. Bu sebeple döteryumla işaretlenmiş bileşiklerin IS olarak kullanımı yaygındır.

Kimyasal farklılık olarak sadece izotopların kullanıldığı yöntemlere izotop dilüsyonu denir. Bir bileşiğin analizinde kullanılan döteryum ile

zenginleştirilmiş IS'ın tek farkı bir veya bir kaç hidrojen atomu yerine döteryum atomlarının geçmiş olmasıdır. Döteryumlu IS yapısal benzerliğinden dolayı analizlenen bileşiğinki ile aynı kromatografik alıkonma zamanına (RT) sahiptir. GC'de analiz edilen bileşikten kromatografik olarak ayrıştırılması mümkün olmadığından döteryumla işaretlenmiş IS kullanılamaz. Kütle spektrometresinde ise bu sorun değildir. Çünkü döteryumun atomik kütle birimi hidrojenden bir fazladır ve analizlenen numuneden kromatografik RT yerine kütleli olarak farklılık gösterir. Döteryum işaretlenmiş IS'ın m/z değeri göreceli olarak daha yüksektir [47, 49].

Kantitatif ölçümlerde, numunenin yoğunluğu veya alanı IS'nin alanı ile orantılanarak kalibrasyon eğrisinden konsantrasyonu belirlenir.

2.2.5. Ardışık Kütle Spektrometresi (Tandem MS/MS)

Seçimliliği yükseltmek ve teşhis limitlerini artırmak için MS'den önce numunenin ekstraksiyon, türevlendirme, kromatografik ayrıştırmalar gibi bazı ön işlemlerden geçirilmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi, iki veya daha fazla analitik tekniğin ardışık olarak bağlanmasıdır [49].

Ardışık MS/MS'de karışım birinci MS'nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine ait iyonlarının oluşmasını sağlar. Bunlara ana iyonlar denir. Bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Bu incelenecek olan bileşiği karışımın içindeki diğer bileşenlerinden ayırır. Birinci MS'de ayrılmış olan ana iyon ikinci MS analizöre gönderilir ve burada parçalanarak ikincil iyon fragmentlerine ayrılır. Bunlara ikincil iyon denir. Bu şekilde ana iyon ile ikincil iyonun birlikte taranması bileşiğin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve karışımındaki diğer bileşenlerden tamamen ayrılmasını sağlar [49].

Özet olarak birinci MS bir karışımdan tek bir bileşiği ayırmak için kullanılır. Bu işlem GC-MS sistemindeki GC nin fonksiyonu yerine geçer ancak arada çok önemli bir hız farkı vardır. GC-MS ile saatte 4-6 örnek analiz edilebilirken, tandem MS/MS ile saatte 60 örneğe kadar çıkılabilir. Böylece

analiz hızı artılmış ve örnek başına birim maliyet düşürülmüş olmaktadır. Örnek ekstraksiyonu ve türevlendirme aşamaları son derece azaltılmış ve hatta bazen gerekmemektedir [47, 50, 60].

2.2.6. Kütle Spektrometresinin Tıp Alanında Kullanımı

Kütle spektrometresinin tıp alanında kullanımı günümüzde gittikçe artan bir öneme sahiptir. Yüksek hassasiyeti ve güvenilirliği, analiz süresinin kısa olması ve bilgisayar kontrollü programlar sayesinde kütle spektrometreleri artık birçok hastalığın tanısına yaklaşımda son derece kuvvetli bir analitik teknik haline gelmiştir.

Günümüzde ardışık MS/MS sisteminin en yaygın kullanım alanı metabolik hastalıkların tanısı [61] olmakla birlikte artık proteinler [62-64], lipitler [65-68], karbonhidratlar [69] ve DNA analizi [70] gibi birçok bileşiğin analizinde kullanılmakta ve bunlara sürekli yenileri eklenmektedir. Ardışık MS/MS ile yapılan açilkarnitin ve aminoasit analizi ile metabolik hastalıkların tanımlanması son zamanlarda oldukça yaygınlaşmıştır [71, 72]. Ülkemizde ve dünyanın birçok ülkesinde ardışık MS/MS spektrometresi ile yenidoğan tarama programları yürütülmektedir.

2.2.7. Tandem MS/MS Sisteminin Avantajları

1. Yaklaşık 2 dakika gibi kısa bir sürede analizin sonuçlanabilmesi
2. Kromatografik ayrıştırmaya veya saflaştırmaya gerek kalmadan karışım halindeki örneklerin analiz edilebilmesi
3. Son derece hassas ve güvenilir bir yöntem olması.
4. Otomasyona uygun olması ve kısa sürede çok sayıda analiz yapılabilmesi.
5. Testlerin çok az örnek miktarları ile çalışılabilmesi
6. Yalancı pozitif ve yalancı negatif sonuçların oranının az olması.
7. Birçok metabolik hastalığın aynı analizde taranabilmesi
8. Maliyet açısından ekonomik olması

2.4. LİTERATÜRDE HOMOSİSTEİN ÖLÇÜMÜ

Literatür incelendiğinde plazma/serum örneklerinde tHcys miktarı genel olarak yüksek performanslı likit kromatografisi (HPLC), enzim immunoassay (EI), gaz kromatografisi-kütle spektrometresi sistemi (GC-MS), sıvı kromatografisi-kütle spektrometresi sistemleri (LC-MS) ile ölçülmüştür.

GC-MS sistemi ile yapılan bir çalışma Petr Husek (2000) tarafından yayınlanmıştır [73]. Bu çalışmada serum örnekleri trikloroasetik asit ile deproteinize edildikten sonra DTT ile bağlı formlar indirgenmiş ve bir alkil kloroformat ile türevlendirme yapıldıktan ile Hcys analizi GC-MS sisteminde yapılmıştır. Bu çalışmada tHcys için lineerite aralığı 5-50 µmol/L olarak belirlenmiştir [73].

Elektrosprey iyonizasyon ardışık kütle spektrometresi (ESI-LC-MS/MS) sistemi kullanılarak kararlı izotop dilüsyon yöntemi ile ilk toplam Hcys ölçümü Magera ve ark. tarafından [74] gerçekleştirilmiştir. Ardışık kütle spektrometresinin bu ölçümlerde kullanılmaya başlaması sonucunda analizlerde sinyal/gürültü oranlarında artış ile analizin duyarlılığı artmıştır. Ayrıca parçalanana ana iyonun istenen parçası izlenebildiğinden girişim yapan etkenler elimine edilerek analizin seçiciliği de artırılmıştır.

ESI-LC-MS/MS yöntemi ile yapılan en önemli çalışmalardan biri de M. Rافی ve ark. (2007) tarafından yapılan çalışmadır [75]. Bu çalışmada türevlendirme işlemi yapılmadan asidik deproteinizasyon ve ekstraksiyon sonrası pozitif ESI-LC-MS/MS yöntemi ile Hcys analizi yapılmış ve normal tHcys seviyesi civarında doğruluk %103,7 olarak bulunmuştur. Aynı çalışmada farklı seviyelerde tHcys ölçümü için tekrarlanabilirlik %3,0-6,1 arasında değişmektedir ve analiz süresi 4,5 dakika olarak belirtilmiştir [75].

Christel Hempen ve ark. (2008) tarafından yapılan bir çalışmada da yine ESI-LC-MS/MS yöntemi kullanılarak metilmalonik asit ve Hcys birlikte analiz edilmiştir [76]. Bu çalışmada bağlı formların indirgenmesi için DTT yerine

TCEP (Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride) kullanılmıştır. Bu yöntemde türevlendirme yapılmamıştır. Ancak ek bir aşama olarak ultrafiltrasyon basamağı mevcuttur. Elde edilen sonuçlara göre tHcys için tekrarlanabilirliğin %2,9-3,2 arasında değiştiği belirtilmiştir. Teşhis limiti de 0,88 $\mu\text{mol/L}$ olarak hesaplanmıştır. Bu yöntemde analiz süresi 4 dakika olarak belirlenmiştir.

Bu tez çalışmasında aminositlerin GC analizleri için kullanılan bir türevlendirme yöntemi olan alkil kloroformat ile esterleşme reaksiyonu kullanılarak ESI-LC-MS/MS yöntemi ile plazma/serumda tHcys miktarının analizi konusunda farklı bir yaklaşım amaçlanmıştır. Özellikle trevlendirilerek daha büyük bir moleküle dönüştürülen analitin daha yüksek sinyal/gürültü oranı sağlayacağı n grlmştir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 GEREÇLER

HPLC gradient saflıkta metanol, formik asit, DTT, DL-homosistein, n-propanol ve propyl chloroformate Sigma-Aldrich (Almanya) firmasından, pyridine ve isooktan Merck (Almanya) firmasından, kloroform Lab-scan firmasından, amonyum format Fluka (Almanya) firmasından, d8-homosistin Cambridge Isotope Lab. (USA)'dan temin edilmiştir. Belirli miktarlarda homosistein içeren sertifikalı plazma örnekleri Recipe (Almanya) firmasından temin edilmiştir. Kullanılan MAX-RP ters faz HPLC kolonları Phenomenex (USA) firmasından temin edilmiştir.

3.2. YÖNTEM

3.2.1. Türevsiz Homosistein Analizi için Örnek Hazırlanması

Liyofilize halde alınmış olan ve belirli miktarlarda Hcys içeren sertifikalı plazma örnekleri 3 ml deiyonize su ile çözüldü. Her bir örnekten 1,5 ml polipropilen santrifüj tüpüne 50 µl alındı. Üzerine internal standart olarak kullanılacak olan 10 µmol/L konsantrasyonunda hazırlanan d8-homosistin çözeltilisinden 50 µl eklendi. 15 sn boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 250 mM DTT çözeltilisinden 50 µl eklendi. Vorteks karıştırıcıda tekrar 15 sn karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. Daha sonra su/formik asit/trifloroasetik asit (99,875:0,1:0,025) karışımından 500 µl eklenerek plazma proteinleri çöktürüldü. 30 sn vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra bir örnek tüpüne alınarak 5 µl LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapıldı.

3.2.2. Türevli Homosistein Analizi için Örnek Hazırlanması

Liyofilize halde alınmış olan ve belirli miktarlarda Hcys içeren sertifikalı plazma örnekleri 3 ml deiyonize su ile çözüldü. Her bir örnekten 1,5 ml polipropilen santrifüj tüpüne 50µl alındı. Üzerine internal standart olarak kullanılacak olan 10 µmol/L konsantrasyonunda hazırlanan d8-homosistin

çözeltilisinden 50 µl eklendi. 15 sn boyunca vorteks karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra 250 mM DTT çözeltilisinden 50 µl eklendi. Vorteks karıştırıcıda tekrar 15 sn karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dk bekletildi. 200 µl n-propanol/piridin (5:1) karışımı eklendi. Vorteks karıştırıcıda 10 sn karıştırıldıktan sonra 150 µl isooktan/PCF (6:1) karışımı eklendi. Vorteks karıştırıcıda 10 sn karıştırıldıktan sonra kloroform/isooktan (2:1) karışımı eklendi. Vorteksle 10 sn karıştırıldıktan sonra 4000 rpm'de 3 dk santrifüj edildi. Üstte kalan fazdan 100 µl alınarak 40 °C de azot gazı akışı altında uçuruldu. Uçurma işlemi tamamlandıktan sonra 250 µl mobil faz eklenerek çözüldü. LC-MS/MS sistemine 5 µl enjeksiyon yapıldı.

3.2.3. HPLC Şartları

Yöntem geliştirme aşamasında, hareketli faz seçimi için yürütülen çalışmalara öncelikle izokratik hareketli faz sistemlerinin denenmesi ile başlanmıştır. İzokratik sistemler, göreceli basit bileşimleri, kolay hazırlanabilir olmaları ve düzgün baz çizgisi gibi kromatografik avantajlara sahip olmaları nedeniyle analiz işlemlerinde sıklıkla tercih edilmektedir. Bu düşünceden yola çıkılarak, metanol, asetonitril, su ve benzeri genel kullanıma ait ters faz çözücülerinden oluşan farklı bileşimlerde birçok hareketli faz denenmiş ve sonuçları değerlendirilmiştir.

Çalışmalar sonucunda türevsiz Hcys çalışması için %0,1 formik asit içeren su/metanol (90:10) karışımı en uygun mobil faz olarak seçilmiştir. Türevli Hcys çalışması içinse 0,1 mM amonyum format içeren su/metanol (30:70) karışımı en uygun mobil faz olarak belirlenmiştir. Kolon olarak her iki çalışmada da 50x2 mm ölçülerinde 5 µm por büyüklüğüne sahip MAX-RP kolonu (Phenomenex) kullanılmıştır.

3.2.4. Kütle Spektroskopi (MS) Şartları

Kütle spektrometre analizleri TANDEM GOLD Triple Quadrupole LC-MS/MS sistemi (Zivak Teknoloji, Türkiye) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. İyonizasyon yöntemi olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon yöntemi seçilmiştir.

Türevsiz ve türevli yöntemler için homosistein ve d4-homosistein için belirlenen kütle/yük oranları ile parçalanma sonrası oluşan iyonlar ile kolondan elüsyon zamanları, ana iyon (MH⁺), ikincil iyon (MS/MS) ve parçalanma enerjileri (CE) sırasıyla Tablo 3.1 ve Tablo 3.2’de verilmiştir.

Tablo 3.1. Türevsiz yöntem için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi

| | Tutunma Zamanı (dk) | MH+ [m/z] | MS/MS | CE [eV] |
|----------------|----------------------------|------------------|--------------|----------------|
| Homosistein | 0,9 | 136 | 90 | 10V |
| Homosistein-D4 | 0,9 | 140 | 94 | 10V |

Tablo 3.2. Türevli yöntem için tutunma zamanı, m/z değeri ve parçalama enerjisi

| | Tutunma Zamanı (dk) | MH+ [m/z] | MS/MS | CE [eV] |
|----------------|----------------------------|------------------|--------------|----------------|
| Homosistein | 1,5 | 350 | 142 | 15V |
| Homosistein-D4 | 1,5 | 354 | 145 | 10V |

Türevsiz ve türevli yöntemler için yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen kütle spektrometresi şartları sırasıyla Tablo 3.3 ve Tablo 3.4’te verilmiştir.

Tablo 3.3. Türevsiz Homosistein Analizi için Optimum MS Koşulları.

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Enjeksiyon Hacmi | 5 µL |
| HPLC Pompa Programı (0,2 ml/dk) | 0.00 min 100% A 3:00 min 100% A |
| İyonizasyon Modu | ESI positive |
| Nebulizing Gaz Basıncı | 55 psi |
| SIM Genişliği | Q1: 1,2 amu Q3: 1,2 amu |
| Kurutucu Gaz Sıcaklığı | 350 °C |
| Kurutucu Gaz Basıncı | 34 psi |
| Needle Voltajı | 5000V |
| Shield Voltajı | 600V |
| Kapiler Voltajı | 40V |
| Dedektör Voltajı | 1600 V |
| Parçalayıcı Gaz Türü, Basıncı | Ar, 2,00 mTorr |

Tablo 3.4. Türevli Homosistein Analizi için Optimum MS Koşulları.

| | |
|---------------------------------|------------------------------------|
| Enjeksiyon Hacmi | 5 µL |
| HPLC Pompa Programı (0,2 ml/dk) | 0.00 min 100% A 3:00 min 100% A |
| İyonizasyon Modu | ESI positive |
| Nebulizing Gaz Basıncı | 55 psi |
| SIM Genişliği | Q1: 1,2 amu Q3: 1,2 amu |
| Kurutucu Gaz Sıcaklığı | 300 °C |
| Kurutucu Gaz Basıncı | 40 psi |
| Needle Voltajı | 5000V |
| Shield Voltajı | 600V |
| Kapiler Voltajı | 40V |
| Dedektör Voltajı | 1600 V |
| Parçalayıcı Gaz Türü, Basıncı | Ar, 2,00 mTorr |

3.2.5. Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Karşılaştırılması

3.2.5.1. Spesifiklik

Türevli ve türevsiz yöntemlerin spesifikliğinin belirlenmesi için her iki yöntemle altışar adet homosistein içermeyen fakat reaksiyon ortamındaki diğer bileşenleri (DTT, plazma proteinleri, reaktifler vb.) içeren numune analiz edilmiştir. Kromatogramda homosisteinin beklenen alıkonma zamanında çakışma olup olmadığı (sinyaller, pik izleri, iyon izleri vb.) incelenmiştir. Ayrıca bu numunelerin analizi ile her iki yöntem için gürültüleri karşılaştırılmıştır.

3.2.5.2. Doğruluk

Doğruluğun hesaplanması için Recipe Firması'ndan (Almanya) temin edilen 10,1 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonundaki referans plazma örneği altışar tekrar olacak şekilde türevli ve türevsiz metotlar kullanılarak hazırlanmıştır. Her bir tekrar için analitin konsantrasyonu hesaplanmıştır. Bu sonuçlara göre ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmıştır. Ortalama değer in sertifika değerine oranının 100 ile çarpımı ile yöntemin yüzde gerçeklik değeri belirlenmiştir.

3.2.5.3. Örnek Stabilesi

Örnek stabilesinin belirlenmesi için 10,1 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda homosistein içeren plazma örneklerinden türevli ve türevsiz yöntemlerle örnekler hazırlanmıştır. İlk enjeksiyonların ardından aynı örneklerden 3 saatlik periyotlarla enjeksiyonlar yapılarak ölçümdeki azalma izlenmiştir. İlk enjeksiyonda elde edilen pik alanları 100 kabul edilerek her üç saatlik periyotta ölçülen pik alanları hesaplanmıştır.

3.2.5.4. Doğrusallık

Bu tez çalışmasında sırasıyla 3,6; 5,05; 7,2; 10,1; 14,4, 21,7; 28,8; 43,4 ve 57,6 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonlarında plazma örneklerinden her seviye için altışar tekrar olacak şekilde türevli ve türevsiz yöntemlerle analiz numuneleri hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Türevli ve türevsiz yöntem için kalibrasyon eğrileri yukarıda belirtilen konsantrasyonlara karşı pik alanlarının

ortalamalarının grafiğe geçirilmesiyle elde edilmiştir. Aynı şekilde her bir seviye için standart sapma değerleri de kalibrasyon eğrilerinde fark çizimleri ile gösterilmiştir.

3.2.5.5. Tekrarlanabilirlik

Bu tez çalışmasında 10,1; 14,4 ve 21,7 µmol/L konsantrasyonlarında plazma örneklerinden her seviye için altışar tekrar olacak şekilde türevli ve türevsiz yöntemlerle analiz numuneleri hazırlanmış ve analiz edilmiştir. Hazırlanan örnek setlerinden ortalama miktar, standart sapma ve yüzde relatif standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.6. Laboratuvar İçi Yeniden Üretilirlik

Laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik çalışması için türevli ve türevsiz yöntemler için doğrusallık çalışması iki farklı günde yapılmış ve bu çalışmalardan elde edilen değerlere göre yüzde relatif standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

3.2.5.7. Teşhis ve Miktarlandırma Limitleri (LOD, LOQ)

Bu tez çalışmasında teşhis ve miktarlandırma limitlerinin hesaplanması için doğrusallık çalışmasında elde edilen verilerden yararlanılmıştır. Kalibrasyon eğrisinin eğimi ile alan oranlarının relatif standart sapmalarına dayanan formülden yararlanarak hesaplanmıştır [77].

$$\text{Teşhis Limiti (LOD)} = 3,3\sigma / S$$

$$\text{Miktarlandırma Limiti (LOQ)} = 10\sigma / S$$

S: Regresyon doğrusunun eğimi

σ : Alan oranlarının standart sapması

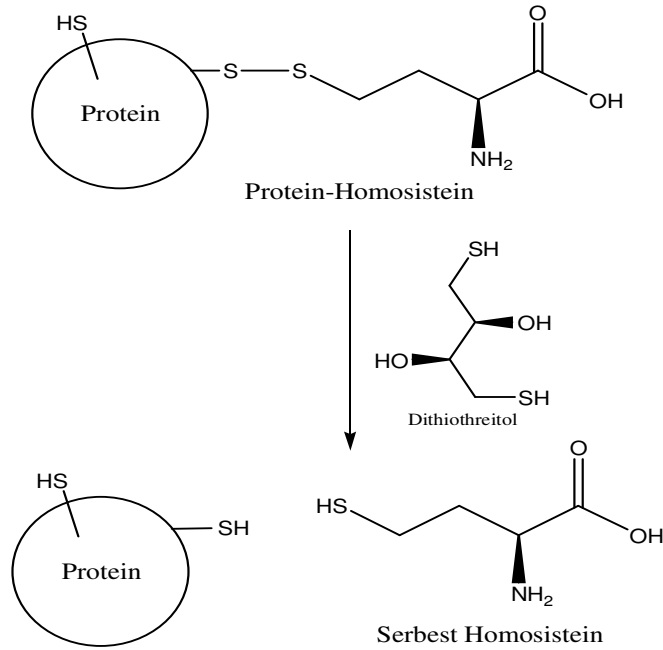
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

4.1. Örneklerin Hazırlanmasında Kullanılan Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Karşılaştırılması

Giriş kısmında da belirtildiği gibi Hcys, plazmada çoğunlukla (>%90) proteinlere ve diğer moleküllere bağlı olduğu için, analizden önce DTT veya 2-merkaptoetanol gibi bir indirgeyici kullanılarak serbest Hcys haline getirilmelidir.

Türevsiz yöntemle örnek hazırlanması sırasında plazma/serum örneğinde bulunan serbest ve bağlı homosisteinin toplam olarak tespit edilmesi için örnekler ilk aşamada DTT ilave edilir. Böylece proteinlere veya birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmış olan homosistein molekülleri serbest homosisteine indirgenir.

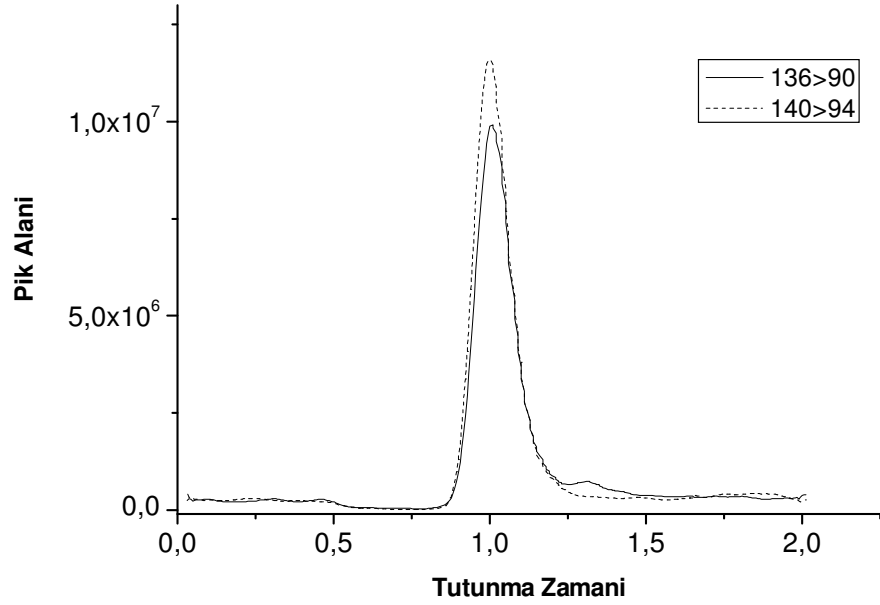
Şekil 4.1'de protein molekülü ile disülfid bağı yapmış olan bir homosistein molekülünün DTT ile reaksiyonu sonucu disülfid bağının koparak serbest homosisteinin oluşumu gösterilmiştir.



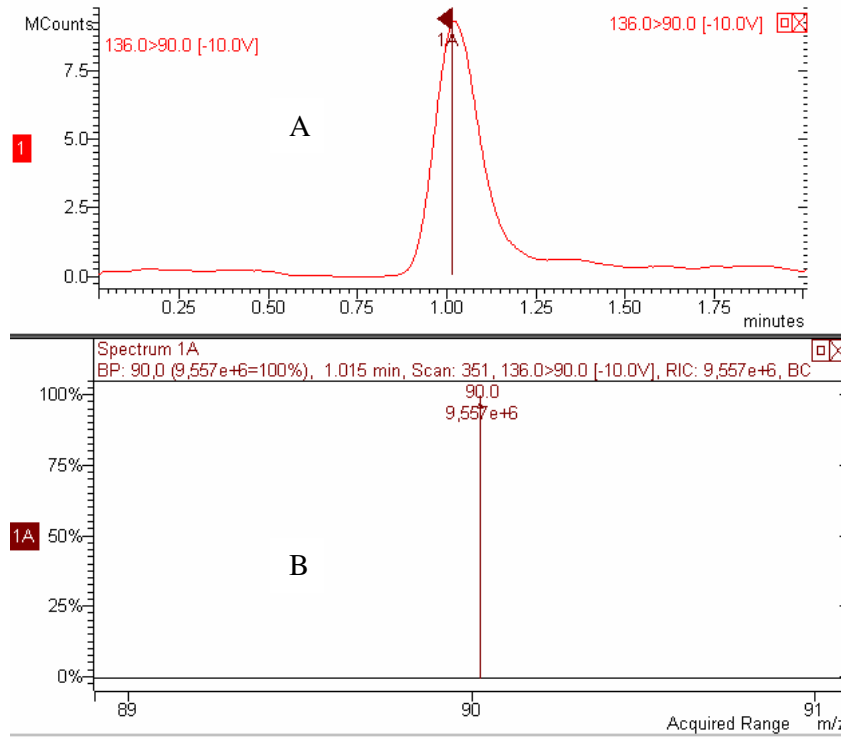
Şekil 4.1. Protein-Hcys disülfid bağının DTT ile indirgenmesi.

DTT ile muamele edilmesi sonucunda serbest hale gelen homosistein molekülleri kütle spektrometresinde pozitif elektrosprey modunda tarandığı zaman ana iyon olarak homosisteinin molekül ağırlığı olan 135,1'in 1 birim fazlası olan 136,1 elde edilmiştir. Bu ana iyonla voltaj uygulanarak ikincil iyonu tarandığında ise 136,1 iyonunun 90,1'e parçalandığı gözlenmiştir. Bu durumda homosistein için 136,1>90,1 iyonları tarama iyonları olarak seçilmiştir. Aynı şekilde internal standart olarak kullanılacak homosistein-d4 molekülü için de 140,1>94,1 iyonları seçilmiştir.

Şekil 4.2'de türevsiz yöntemle hazırlanan örneğe ait kromatogram gösterilmiştir.



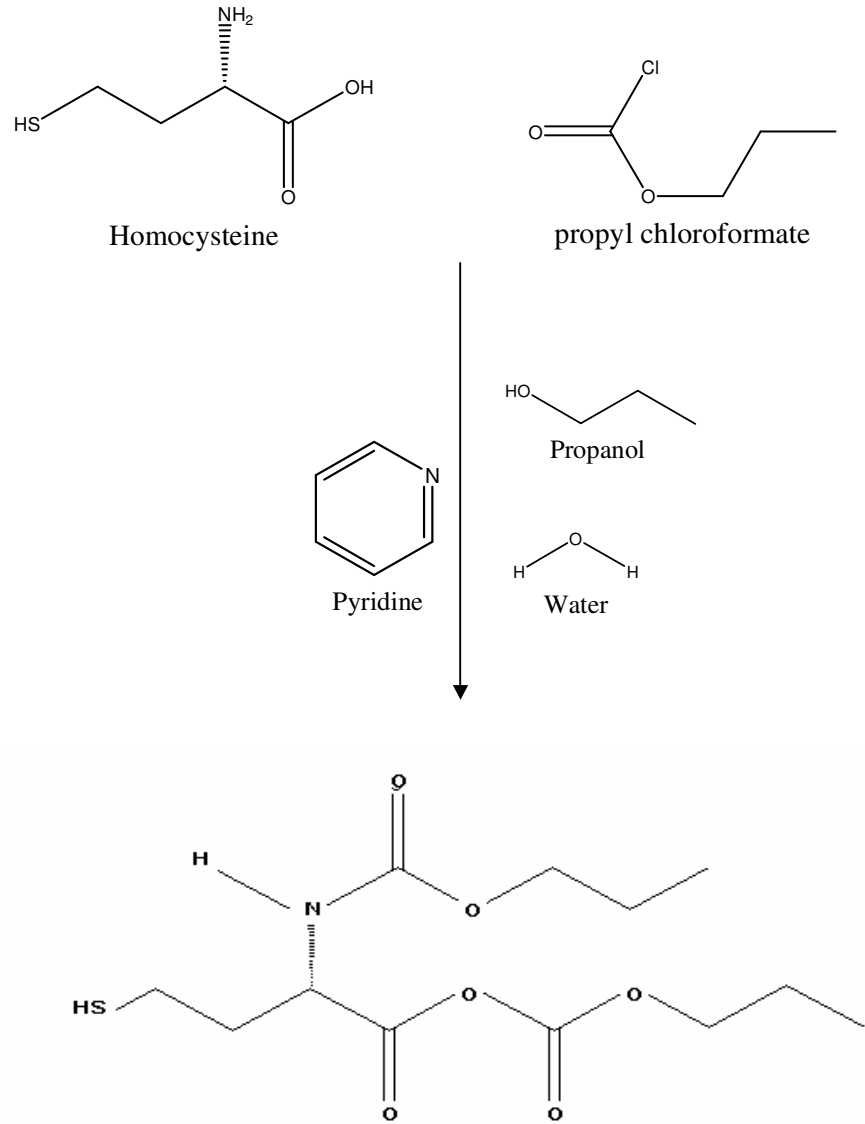
Şekil 4.2. Türevsiz yöntemle elde edilen Hcys ve Hcys-d4 kromatogramları. 10,1 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazmadan Bölüm 3.2.1'deki türevsiz yöntemle analiz numunesi hazırlanarak Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir.



Şekil 4.3. Plazma örneğinde türevsiz Hcys'e ait iyon piki (A) ve parçalanma sonrası spektrumu (B)

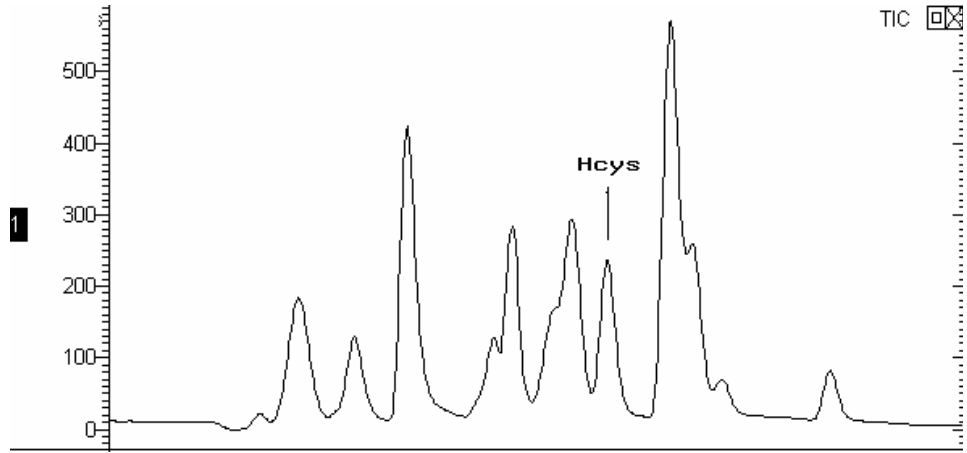
Türevli yöntemle örnek hazırlanırken ise türevsiz yöntemde olduğu gibi proteinlere veya birbirlerine disülfid bağı ile bağlanmış olan homosistein molekülleri serbest homosisteine dithiothreitol ile indirgenir. Ancak bu aşamadan sonra türevsiz yöntemden farklı olarak alkol ve piridin varlığında alkil kloroformat ile reaksiyona sokularak aminoasitin karboksil ve amin gruplarının esterleşmesi sağlanır. Oluşan bu yeni molekül normal homosisteine göre daha yüksek bir molekül ağırlığına sahiptir.

Şekil 4.4'te serbest haldeki homosistein molekülünün *n*-propanol ve piridin varlığında esterleşmesi sonucu oluşan homosistein türevinin oluşumu gösterilmiştir.



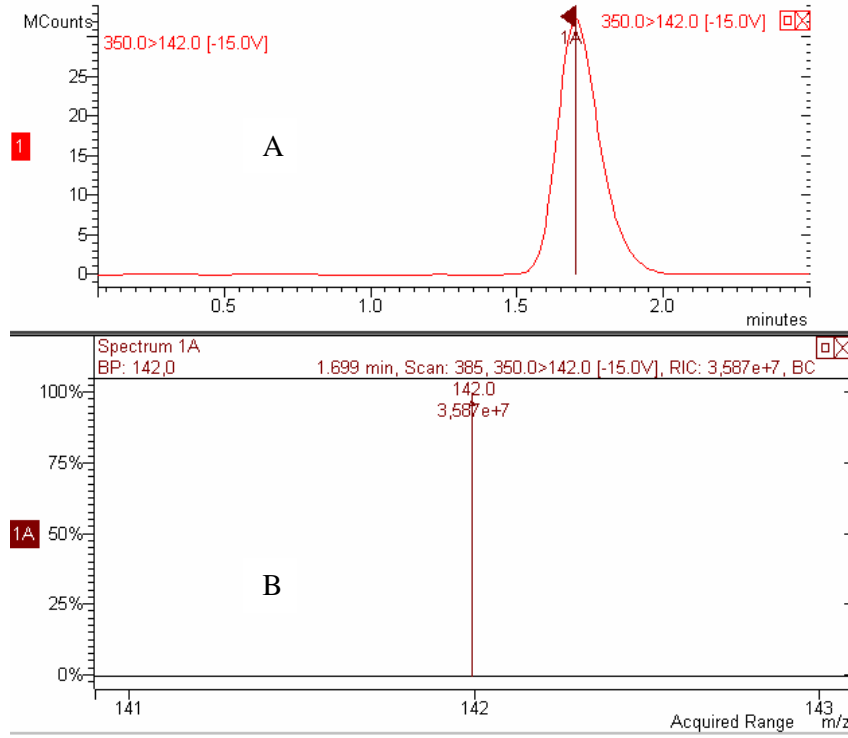
Şekil 4.4. Homosisteinin propil kloroformat ile esterleşmesi.

Şekil 4.5'te türevlendirme işlemi uygulanmış plazma örneğinin taranması ile elde edilen toplam iyon kromatogramı verilmiştir. Bu şekilden anlaşılacağı gibi serum/plazma örneklerinde kloroformat ile türevlenebilen birçok analit (aminoasit, yağ asidi vb.) bulunmaktadır.

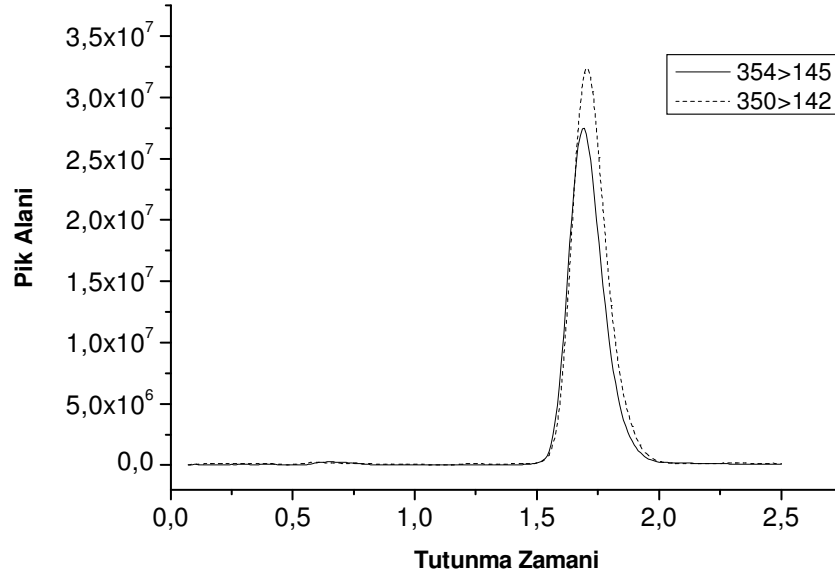


Şekil 4.5. Türevlendirilmiş plazma örneğine ait toplam iyon kromatogramı. 10,1 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda Hcys içeren plazmadan Bölüm 3.2.2'deki türevli yöntemle analiz numunesi hazırlanarak Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir. Analizde seçici iyon kullanılmadan tarama modunda çalışılarak toplam iyon kromatogramı çıkarılmıştır.

Türevlendirilerek propil esteri oluşturulan homosistein molekülleri kütle spektrometresinde (+) elektrosprey modunda tarandığı zaman ana iyon olarak türevli bileşiğin molekül ağırlığının 1 birim fazlası olan 350 iyonu elde edilmiştir. Bu ana iyona voltaj uygulanarak ikincil iyonu tarandığında ise 350 iyonunun 142'ye parçalandığı gözlenmiştir. Bu durumda türevlendirilmiş homosistein için 350>142 iyonları tarama iyonları olarak seçilmiştir. Aynı şekilde internal standart olarak kullanılacak homosistein-d4 molekülü için de 354>145 iyonları seçilmiştir

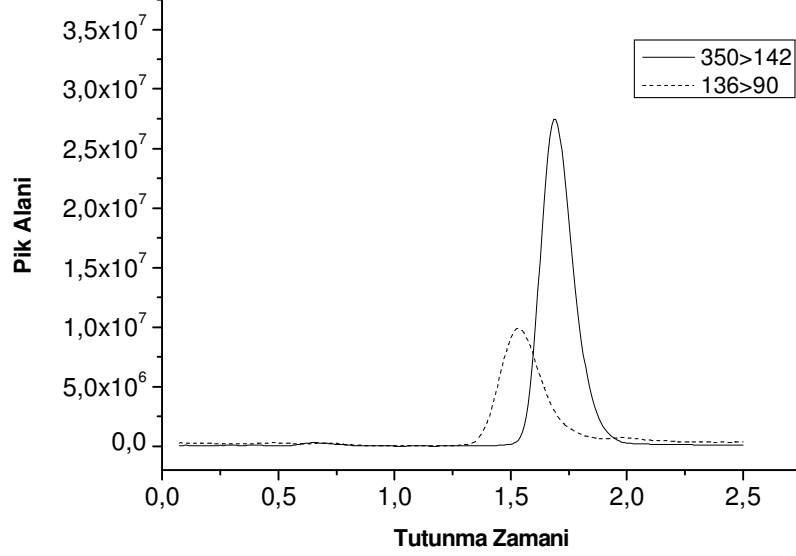


Şekil 4.6. Plazma örneğinde türevli Hcys'e ait iyon piki (A) ve parçalanma sonrası spektrumu (B).



Şekil 4.7. Türevli yöntemle elde edilen Hcys ve Hcys-d4 kromatogramları. 10,1 µmol/L konsantrasyonunda plazmadan Bölüm 3.2.2'deki türevli yöntemle analiz numunesi hazırlanarak Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir.

Yukarıda anlatılan iki farklı yöntemle elde edilen pik şekillerini ve oluşan pik alanlarını karşılaştırmak için aynı konsantrasyonda homosistein içeren sertifikalı plazma kullanılarak her iki yöntemle örnekler hazırlanmıştır. Bu hazırlanan örnekler kendi mobil fazları bağlanmış olarak LC-MS/MS sistemine enjeksiyon yapılmıştır. Elde edilen pikler Şekil 4.8’de gösterilmiştir.



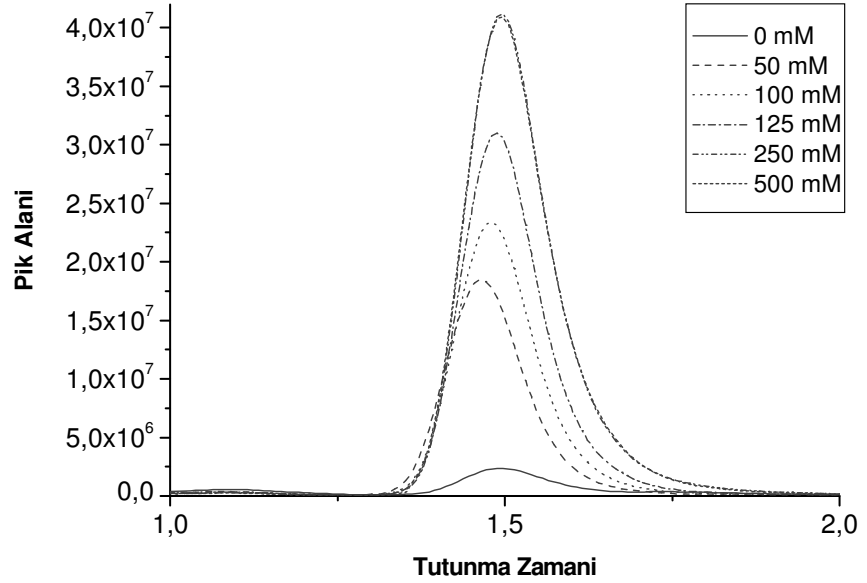
Şekil 4.8. Türevli ve türevsiz yöntemle elde edilen Hcys piklerinin karşılaştırılması. 10,1 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazmadan Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2’deki türevsiz ve türevli yöntemlere göre analiz numuneleri hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4’teki MS koşullarında analiz edilmiştir.

Şekil 4.8 incelendiğinde türevsiz yöntemle hazırlanan örneklerin pik şekillerinde kuyruklanma oluştuğu görülmektedir. Aynı zamanda analiz edilen molekül küçük olduğundan baz çizgisinde oluşan gürültüler daha fazla oluşmakta ve düz bir baz çizgisi oluşmamaktadır.

Türevli yöntemle hazırlanan örneklerde ise baz çizgisindeki gürültüde azalma açık bir şekilde görülmektedir. Aynı zamanda türevlendirilen örnekler daha iyi iyonize olduklarından pik alanları da türevsiz örneklerin 2,5-3 katı kadar yüksektir. Bu durum hem yöntemin tekrarlanabilirliğini hem de yöntemin teşhis limitini olumlu yönde etkileyecek faktörlerdir.

4.2. Dithiothreitol Konsantrasyonunun Analiz Sonuçlarına Etkisi

İndirgeme aşamasında kullanılacak DTT'nin konsantrasyonunu belirlemek amacıyla sırasıyla 0, 50, 100, 125, 250, 500 mM DTT ile örnekler muamele edilmiş ve elde edilen pik büyüklükleri Şekil 4.9'da karşılaştırılmıştır.



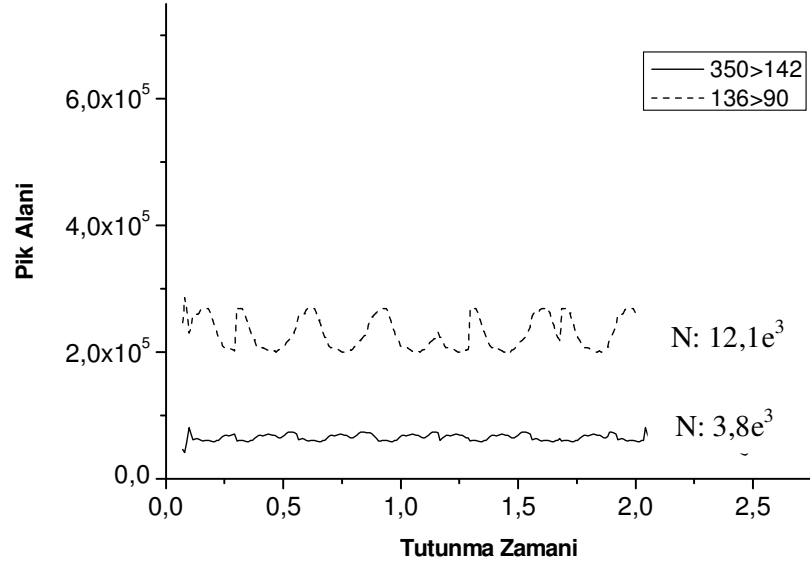
Şekil 4.9. Farklı DTT konsantrasyonları ile muamele edilmiş örnekler için MS kromatogramları. $10,1 \mu\text{mol/L}$ konsantrasyonunda plazmadan Bölüm 3.2.2'deki türevli yöntemle analiz numuneleri hazırlanmıştır. Numuneler hazırlanırken farklı konsantrasyonlarda DTT kullanılmıştır. Numune hazırlama yöntemi aynen uygulanmış ve hazırlanan numuneler Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir.

Şekil 4.9'da görüldüğü gibi 250 mM ve 500 mM konsantrasyonlarında eşit pik alanı elde edilirken, 125 mM DTT konsantrasyonundan itibaren pik alanında azalma görülmüştür. DTT ile muamele edilmeyen örnekte ise belirgin şekilde pik alanında azalma gözlemlenmiştir. Bu sonuçlar da plazmada bulunan toplam homosisteinin çok az bir kısmının serbest halde bulunduğunu, geri kalan kısmının ise farklı şekillerde (proteinlere bağlı, disülfid bağları ile birbirine bağlı vb.) bulunduğunu göstermiştir.

4.3. Türevli ve Türevsiz Yöntemlerde Sinyal/Gürültü Oranlarının Karşılaştırılması

Analitik yöntemler için analizi yapılacak madde (analit) ve matris içinde bulunabilecek benzer maddeler (izomerler, metabolitler, bozunma ürünleri, matris bileşenleri vb.) arasındaki ayırım gücü önemlidir. Olası girişimleri tespit etmek açısından potansiyel olarak çakışabilecek maddeler belirlenmelidir.

Spesifiklik çalışmasında temsili boş numunelerin analizi sonucu elde edilen baz çizgileri Şekil 4.10'da gösterilmiştir. Ayrıca her iki yöntemle hazırlanan numuneler için analizin gürültüsü incelenmiştir.



Şekil 4.10. Türevli ve türevsiz yöntem için temsili boş örneklerin analizi ile elde edilen kromatogramlar. Hcys içermeyen temsili örnek kullanılarak Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'deki türevsiz ve türevli yöntemlere göre analiz numuneleri hazırlanmıştır. Numuneler Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir. Her iki yöntem için sinyal/gürültü oranları hesaplanmıştır.

Her iki yöntemde de homosisteinin tutunma zamanına denk gelen zaman aralığında herhangi bir girişim gözlenmemiştir. Ancak türevli yöntem ile hazırlanan örneklerin gürültüsünün türevsiz yöntemle göre en az 3 kat daha az olduğu görülmüştür. Gürültünün az olmasının esas nedeni türevlendirilen homosistein molekülünün daha büyük m/z oranına sahip olmasıdır.

4.4. Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Analiz Sonuçlarının Doğruluğu

Doğruluk, bir yöntemin ölçümlerinin gerekçe değere yakınlığını ifade eden bir parametredir. Yalnızca sertifikalandırılmış referans numune ile hesaplanabilir. Doğruluk çalışmasında 10,1 µmol/L konsantrasyonundaki plazma örneklerinden türevli ve türevsiz yöntemle hazırlanan örneklerden elde edilen veriler Tablo 4.1 ve Tablo 4.2’de gösterilmiştir.

Tablo 4.1 Türevsiz yöntem için doğruluk çalışması. 10,1 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazmadan Bölüm 3.2.1’deki türevsiz yöntemle göre 6 adet analiz numunesi hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4’teki MS koşullarında analiz edilmiştir.

| Enjeksiyon | Ölçülen HCYS | %Doğruluk |
|-----------------|--------------|---------------|
| 1. | 9,639 | %95,44 |
| 2. | 9,762 | %96,65 |
| 3. | 9,735 | %96,39 |
| 4. | 9,474 | %93,80 |
| 5. | 9,502 | %94,08 |
| 6. | 9,851 | %97,53 |
| Ortalama | 9,661 | % 95,6 |

Tablo 4.2. Türevli yöntem için doğruluk çalışması. 10,1 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazmadan Bölüm 3.2.2’deki türevli yöntemle göre 6 adet analiz numunesi hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4’teki MS koşullarında analiz edilmiştir.

| Enjeksiyon | Ölçülen HCYS | %Doğruluk |
|-----------------|--------------|----------------|
| 1. | 10,256 | %101,54 |
| 2. | 10,236 | %101,35 |
| 3. | 10,071 | %99,71 |
| 4. | 10,369 | %102,66 |
| 5. | 10,245 | %101,44 |
| 6. | 10,215 | %101,44 |
| Ortalama | 10,232 | % 101,3 |

Her iki yöntem için de elde edilen doğruluk değerleri de kabul edilebilir limitler içindedir. Yine de türevli yöntem türevsiz yöntemle göre %3,1 oranında daha gerçeğe yakın sonuçlar vermektedir.

4.5. Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Örnek Stabilitésinin Karşılaştırılması

Numune analize hazırlandıktan sonra saklama veya analiz sırasında numunedeki analit veya matris bileşenlerinin stabilitesi yeteri kadar uzun olmadığında analiz sonuçlarında önemli sapmalara neden olabilmektedir. Bu nedenle hazırlanan örneklerin stabilitesi belirlenmelidir.

Tablo 4.3. Türevli ve türevsiz yöntemler için stabilize çalışması. Örnek stabilitelerini karşılaştırmak için 10,1 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazma örneklerinden Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'deki türevsiz ve türevli yöntemle göre analiz numuneleri hazırlanmıştır. İlk enjeksiyonların ardından oda sıcaklığında tutulan aynı örneklerden 3 saatlik periyotlarla enjeksiyonlar yapılarak ölçümdeki azalma izlenmiştir. İlk enjeksiyonda elde edilen pik alanları 100 kabul edilerek her üç saatlik periyotta ölçülen pik alanları gösterilmiştir.

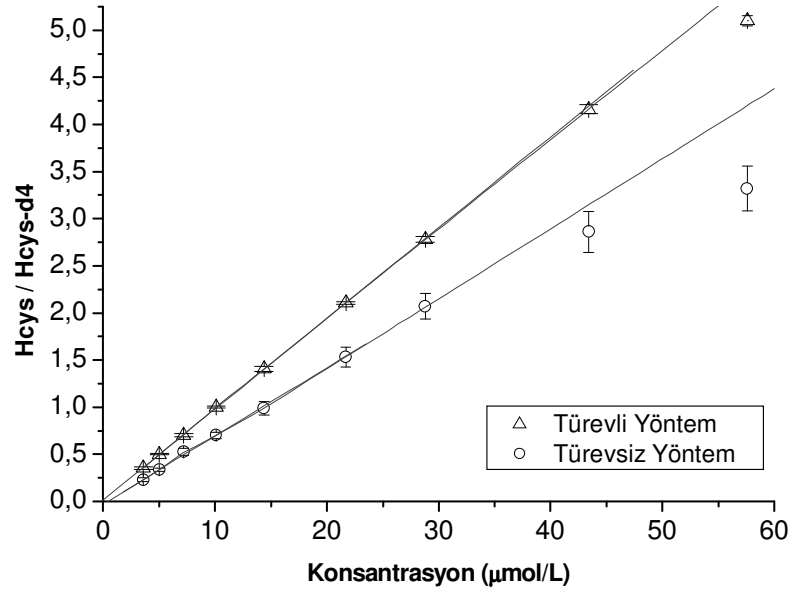
| | Örnek Hazırlandıktan Sonra Geçen Süre | | | |
|------------------------|---------------------------------------|--------|--------|---------|
| | 3 saat | 6 saat | 9 saat | 12 saat |
| Türevli Yöntem | 99,2 | 98,5 | 97,1 | 96,2 |
| Türevsiz Yöntem | 98,2 | 96,2 | 94,6 | 93,3 |

Sonuçlar incelendiğinde türevsiz yöntemle hazırlanan örneklerde 6. saatten sonra %5'ten fazla bozulma gözlenmiştir. Türevli yöntemde ise ancak 12. saatten sonra %5'lik bozulma görülmüştür. Bu durumda sonuçlarda önemli oranda sapma olmaması için türevsiz yöntemle hazırlanan örnekler 6 saat içinde analiz edilmelidir. Türevli yöntemle hazırlanan örnekler için bu süre 12 saattir.

4.6. Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Doğrusallığın Karşılaştırılması

Geliştirilen bir yöntemin kalibrasyon eğrisi doğrusallığını analiz edilecek aralıkta koruyor ise ölçümlerde tek standart ile kalibrasyon yapılabilir. Bu nedenle bir yöntem geliştirildiğinde hangi aralıkta doğrusallığını koruduğu belirlenmelidir.

Doğrusallık çalışmasında dokuz farklı konsantrasyonda homosistein içeren plazma örneklerinden altışar tekrar olacak şekilde türevli ve türevsiz yöntemlerle numuneler hazırlanmış ve elde edilen sonuçlar Şekil 4.11’de gösterilmiştir.



Şekil 4.11. Türevli ve türevsiz yöntem kalibrasyon eğrileri. 3,6; 5,05; 7,2; 10,1; 14,4, 21,7; 28,8; 43,4 ve 57,6 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazma örneklerinden Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2’deki türevsiz ve türevli yöntemlere göre 6’şar adet analiz numuneleri hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4’teki MS koşullarında analiz edilmiştir. Her bir seviye için ortalama ve standart sapma değerleri hesaplanmış ve kalibrasyon eğrisi çizilmiştir.

Doğrusallık çalışması sonucunda her iki yöntem için regresyon katsayıları sırasıyla türevli yöntem için 0,99912, türevsiz yöntem için de 0,99381 olarak hesaplanmıştır. Grafikler incelendiğinde her iki yöntemin de alt limitlerde doğrusallığını koruduğu gözlenmektedir. Ancak üst limitlerde doğrusallık bozulmaya başlamaktadır. Türevli yöntemde kalibrasyon eğrisindeki bozulma yaklaşık 50 µmol/L homosistein konsantrasyonunda başlarken, türevsiz yöntemde bu değer yaklaşık 35 µmol/L'dir.

Doğrusallıktaki sapmalara neden olabilecek başlıca etkenler iyonizasyon problemleri ve örnek içindeki bileşenlerin (protein, yağ, tuzlar, reaktif kalıntıları vb.) etkisidir. Türevli yöntemde türevsiz yöntemle göre ekstra ekstraksiyon ve uçurma aşaması olduğundan bu bileşenlerin etkisi kısmen azalmaktadır. Bu nedenle türevli yöntemde daha geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusallık devam etmektedir.

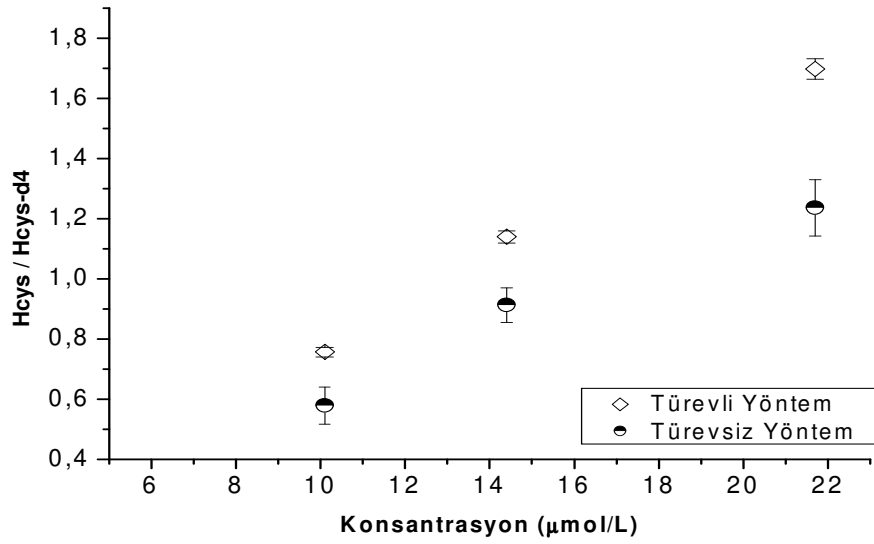
4.7. Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Tekrarlanabilirlik Verilerinin Karşılaştırılması

Türevli ve türevsiz yöntemlerle hazırlanan 10,1; 14,4 ve 21,7 µmol/L konsantrasyonlarındaki numuneler için tekrarlanabilirlik çalışması sonucu elde edilen relatif standart sapma değerleri sırasıyla Tablo 4.4'te verilmiştir.

Tablo 4.4. Türevli ve türevsiz yöntemler için %RSD değerleri 10,1 µmol/L; 14,4 µmol/L ve 21,7 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazma örneklerinden Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'deki türevsiz ve türevli yöntemlere göre 6'şar adet analiz numuneleri hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir. Her bir seviye için yüzde relatif standart sapma değerleri hesaplanmıştır.

| Konsantrasyon (µmol/L) | % Relatif Standart Sapma | |
|---------------------------|--------------------------|-----------------|
| | Türevli Yöntem | Türevsiz Yöntem |
| 10,1 | 2,06 | 5,49 |
| 14,4 | 1,77 | 4,48 |
| 21,7 | 2,03 | 7,62 |

Tablo 4.4'teki relatif standart sapma değerleri incelendiğinde bütün seviyelerde türevli yöntemin tekrarlanabilirliğinin türevsiz yöntemle göre en az 2,5-3 kat daha iyi olduğu görülmektedir. Aynı veriler ile Şekil 4.12'deki karşılaştırmalı tekrarlanabilirlik grafiği çizilerek fark çizimleri yapıldığında iki yöntem arasındaki tekrarlanabilirlik farkları daha net olarak görülebilmektedir.



Şekil 4.12. Türevli ve türevsiz yöntemler için tekrarlanabilirlik grafiği

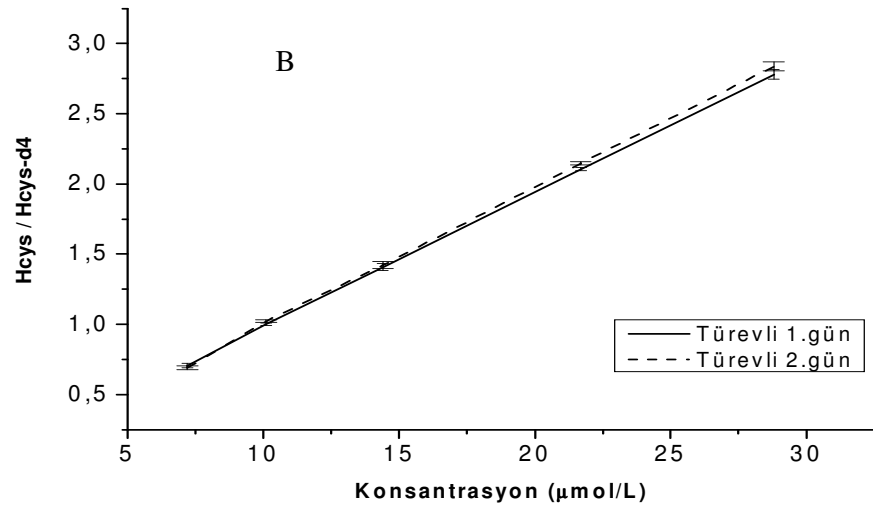
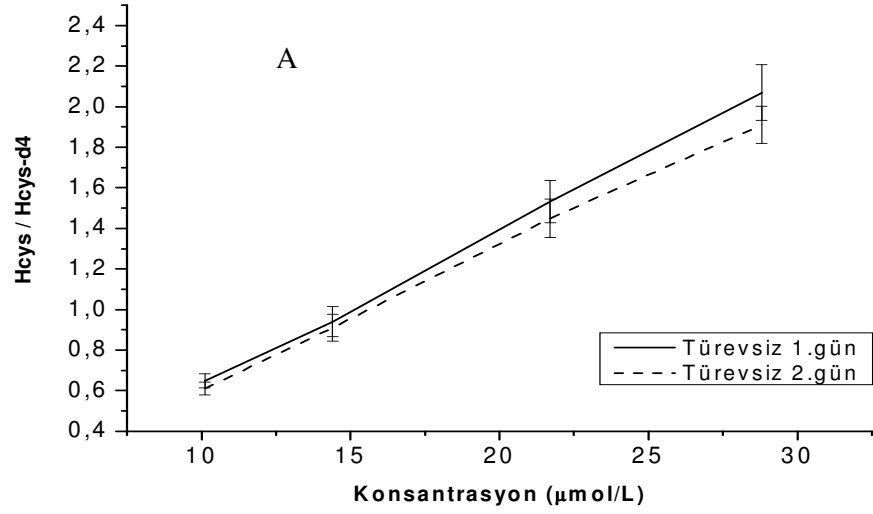
İki yöntem arasındaki tekrarlanabilirlik farkının iki esas nedeni vardır: Bunlardan ilki türevsiz yöntemde elde edilen piklerin şekillerinin kuyruklu olması ve baz çizgisinin dalgalı olması nedeniyle piklerin integrasyonu sırasında oluşan alan farklılıklarıdır. İkinci nedeni ise türevli yöntemde elde edilen piklerin sinyal / gürültü oranlarının türevsiz yöntemle göre daha yüksek olmasıdır. (Örneğin türevli yöntemle elde edilen Hcys piki için S/N: 4302, türevsiz yöntemle elde edilen Hcys piki için S/N:1238)

Türevlendirme işleminin esas amaçlarından biri de analiz edilen maddenin molekül ağırlığını artırarak baz çizgisindeki diğer moleküllerden kaynaklanan gürültünün azaltılmasıdır. Kütle spektrometresi sistemlerinde genellikle düşük molekül ağırlıklı maddeler analiz edilirken baz çizgisinde daha fazla gürültü oluşmaktadır.

4.8. Türevli ve Türevsiz Yöntemlerin Laboratuvar İçi Yeniden Üretilbilirlik Verilerinin Karşılaştırılması

Laboratuvar içi yeniden üretilbilirlik çalışması sonucu her iki yöntemden elde edilen değerler ile çizilen karşılaştırmalı grafikler sırasıyla Şekil 4.13'te verilmiştir.

Grafikler incelendiğinde türevli yöntemle farklı günlerde farklı kişiler tarafından yapılan analizlerin türevsiz yöntemle göre oldukça tutarlı olduğu görülmektedir. Bunun temel nedeni tekrarlanabilirlik çalışmasında gösterilmiş olan farklılıklardır. Aynı çalışma içinde görülen tekrarlanabilirlik problemleri farklı çalışmalar arasında da görülmüştür.



Şekil 4.13. Türevsiz (A) ve türevli (B) yöntemler için laboratuvar içi yeniden üretilebilirlik grafikleri. 10,1; 14,4, 21,7 ve 28,8 µmol/L konsantrasyonunda Hcys içeren plazma örneklerinden Bölüm 3.2.1 ve 3.2.2'deki türevsiz ve türevli yöntemlere göre 6'şar adet analiz numuneleri hazırlanmış ve Bölüm 3.2.4'teki MS koşullarında analiz edilmiştir. Aynı çalışma farklı bir günde farklı bir analist tarafından hazırlanan numunelerle tekrarlanıp sonuçlar karşılaştırılmıştır.

4.9. Türevli ve Türevsiz Yöntemler İçin Tespit ve Miktarlandırma Limitlerinin Karşılaştırılması

Kalibrasyon eğrisinin eğimi ile alan oranlarının relatif standart sapmalarına dayanan formülden yararlanarak tespit (LOD-Limit of detection) ve miktarlandırma limitleri (LOQ-Limit of quantitation) aşağıdaki gibi hesaplanmıştır.

Tablo 4.5. Türevli ve türevsiz yöntemler için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla ($3,3\sigma/S$) ve ($10\sigma/S$) formülleri ile hesaplanmıştır. Bölüm 4.6’da gösterilen kalibrasyon eğrisinden elde edilen eğim ve standart sapma değerleri kullanılmıştır.

| | σ | S | LOD ($\mu\text{mol/L}$) | LOQ ($\mu\text{mol/L}$) |
|------------------------|----------|--------|------------------------------|------------------------------|
| Türevli Yöntem | 0,0199 | 0,9436 | 0,07 | 0,23 |
| Türevsiz Yöntem | 0,0696 | 0,9006 | 0,24 | 0,80 |

Elde edilen sonuçlara göre türevli yöntemin türevsiz yöntemle göre yaklaşık üç kat daha duyarlı olduğu belirlenmiştir. İki yöntem arasındaki duyarlılık farkının temel nedeni iki yöntemde elde edilen sinyal/gürültü oranlarıdır. Türevli yöntemin 3-3,5 kat daha iyi olan sinyal/gürültü oranı yöntemin yaklaşık aynı oranda daha duyarlı olmasını sağlamıştır.

5. GENEL SONUÇ

Bu tez çalışmasında literatüre yeni giren LC-MS/MS yöntemi ile plazma ve serumda toplam Hcys miktarının analizi konusuna farklı bir yaklaşım getirilmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda kullanılan örnekten ekstrakte edilen Hcys'in direkt analizi yerine Hcys molekülüne bir alkil grubu bağlamak suretiyle molekülün m/z oranı artırılmıştır. Böylece genel olarak aminositlerin GC analizleri için kullanılan bir türevlendirme yöntemi ilk defa homosistein analizi için LC-MS/MS sistemine adapte edilmiştir. m/z oranındaki artış analiz esnasında oluşan gürültüyü azaltmış ve cihazdan elde edilen pik büyüklüklerini artırmıştır. Bu değişimlerin doğal sonucu olarak analitik yöntemler için önemli bir parametre olan S/N oranı belirgin şekilde artmıştır. Bu sayede analiz teşhis ve tespit limitleri açısından daha duyarlı hale gelmiştir. Daha önce yapılan çalışmalarda 0,3-0,8 µmol/L arasında değişen teşhis limiti türevli yöntem ile 0,07 µmol/L değerine kadar inmiştir. Bu sayede özellikle düşük konsantrasyon değişimleri daha kolay tespit edilebilir hale gelmiştir.

Ayrıca Hcys'in örnek içindeki kararlılığında artış gözlenmiştir. Literatürdeki çalışmalarda %2,9-6,1 aralığında değişen tekrarlanabilirlik değerleri de türevli yöntem için %1,8-2,1 arasında bulunmuştur. Ayrıca yeniden üretilebilirlik ve doğrusalılık çalışmalarında da türevli yöntemin türevsiz yönteme göre daha tutarlı sonuçlar verdiği görülmüştür.

Literatürde daha önceki Hcys analizlerinde yapılmamış olan DTT konsantrasyonu optimizasyonu bu tez çalışması sırasında yapılmıştır.

Sonuç olarak türev oluşturma aşamasının örnek hazırlanmasında ek aşamalar getirmesine karşın, özellikle yeniden üretilebilirlik, doğrusalılık, tekrarlanabilirlik, örnek stabilitesi ve teşhis ve tespit limitleri konularında avantajlar sağladığı görülmüştür.

KAYNAKLAR

1. Gouaille C.B., Bottiglieri T. Homocysteine Metabolism. Edited by Bottigliere T. Homocysteine Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders. Springer. 2003:21-28
2. Temel İ., Özerol E.: Homosistein metabolizma bozuklukları ve vasküler hastalıklarla ilişkisi. İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi. 9; 149-15, 2005
3. McCully KS. Vascular pathology of homocysteinemia. Am J Pathol 1969; 56:111-28.
4. Matthew M. Rees, George M. Rodgers. Homocysteinemia: association of a metabolic disorder with vascular disease and thrombosis. Thrombosis Research 1993; 71: 337-359.
5. Clarke R., Daly L., Robinson K: Hyperhomocysteinemia: an independent risk factor for vascular disease. N, Engl, J,Med 1991; 324:1149-55.
6. Boushey CJ, Beresford SA, Omenn GS, Motulsky AG. A quantitative assessment of plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. Probable benefits of increasing folic acid intakes. JAMA 1995; 274: 1049-57.
7. D'Angelo A, Selhub J. Homocysteine and thrombotic disease. Blood 1997; 90: 1-11.
8. Brosnon J.T., Jacobs R.L., Stead L.M., Brosnon M.E.: Methylation demand: a key determinant of homocysteine metabolism. Acta Biologica Polonica. 51; 405-413, 2004
9. Liu X.X., Wilson K., Charlton C.G.: Effects of L-Dopa treatment on methylation in mouse brain: implications for the side effects of L-Dopa. Life Sciences. 66; 2277-2288, 2000
10. Cheng H., Trolin C.G., Aquilonius S.M., Steinberg A., Löfberg C., Ekblom J., Oreland L.: Levels of L-Methionine S-Adenozyltransferase Activity in Erythrocytes and Concentrations of S-Adenosylhomocysteine in Whole Blood of Patients with Parkinson's Disease. Experimental Neurology 145, 580-585, 1997

11. Ueland PM, Refsum H. Plasma homocysteine, a risk factor for vascular disease: plasma levels in health, disease and drug therapy. *J Lab Clin Med* 1989; 114: 473-501.
12. Møller J, Christensen L, Rasmussen K. An external quality assessment study on the analysis of methylmalonic acid and total homocysteine in plasma. *Scand J Clin Lab Invest* 1997;57:613-619.
13. Moller J, Rasmussen K, Christensen L. External quality assessment of methylmalonic acid and total homocysteine. *Clin Chem* 1999;45:1536-1542.
14. Taskin G, Yilmaz-Sipahi E, Yıldırımkaaya M, Nadirler F, Halloran M, Ayoglu FN, Laleli Y. Plasma homocysteine levels in a healthy Turkish population sample. *Acta Cardiologica*,2006 Feb;61:35-42.
15. Sipahi E, Taskin G, Kumbasar D, Halloran M, Yildirimkaaya M, Nadirler F, Yıldırım A, Berkalp B, Laleli Y. Hyperhomocysteinemia and coronary artery disease in the Turkish population. *Acta Cardiol* 2002; 57: 415-420.
16. Pfeiffer CM, Huff DL, Smith SJ, Miller DT, Gunter EW. Comparison of plasma total homocysteine measurements in 14 laboratories: an international study. *Clin Chem* 1999;45:1261-1268.
17. Tripodi A, Chantarangkul V, Lombardi R, Lecchi A, Mannucci PM, Cattaneo M. Multicenter study of homocysteine measurement-performance characteristics of different methods, influence of standards on interlaboratory agreement of results. *Thromb Haemost* 2001;85:291-295.
18. Stampfer MJ, Malinow MR, Willett WC et al. A prospective study of plasma homocysteine and risk of myocardial infarction in US physicians. *JAMA* 1992; 268 :877-81.
19. Verhoef P, Meleady R, Daly LE, Graham IM, Robinson K, Boers GHJ, and the European COMAC Group. Homocysteine, vitamin status and risk of vascular disease. *Eur Heart J* 1999; 20: 1234-1244.
20. Alfthan G, Pekkanen J, Jauhiainen M, et al. Relation of serum homocysteine and lipoprotein (a) concentrations to atherosclerotic disease in a prospective Finnish population based study. *Atherosclerosis* 1994; 106:9-19. 31
21. Sans S, Kesteloot H, Kromhout D. The burden of cardiovascular diseases mortality in Europe. Task Force of the European Society of Cardiology on

- Cardiovascular Mortality and Morbidity Statistics in Europe. *Eur Heart J* 1997; 18: 1231-48.
22. Verhoef P., Stampfer MJ., Buring JE., Gaziano JM., Allen RH., Stabler SP., Reynolds RD., Kok FJ., Hennekens CH. and Willett WC. *Am. J. Epidemiol* 1996; 143: 845-859.
 23. De Bree A, Verschuren WM, Kromhout D, Kluijtmans LA, Blom HJ. Homocysteine determinants and the evidence to what extent homocysteine determines the risk of coronary heart disease. *Pharm Rev* 2002; 54: 599-618.
 24. Clarke R, Collins R. Can dietary supplements with folic acid or vitamin B6 reduce cardiovascular risk? Design of clinical trials to test the homocysteine hypothesis of vascular disease. *J Cardiovasc Risk* 1998; 5: 249-55.
 25. Liu JL, Maniadakis N, Gray A, Rayner M. The economic burden of coronary heart disease in the UK. *Heart* 2002; 88: 597-603.
 26. McGill HC Jr, McMahan CA, Herderick EE, Malcom GT, Tracy RE, Strong JP. Origin of atherosclerosis in childhood and adolescence. *Am J Clin Nutr* 2000; 72: 1307 -1315.
 27. Kavey RE, Daniels SR, Lauer RM, Atkins DL, Hayman LL, Taubert K. American Heart Association guidelines for primary prevention of atherosclerotic cardiovascular disease beginning in childhood. *Circulation* 2003; 107: 1562-6.
 28. Tsimikas S, Witztum JL. Shifting the diagnosis and treatment of atherosclerosis to children and young adults: a new paradigm for the 21st century. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40: 2122-4.
 29. Graham IM, Daly LE, Refsum HM, et al. Plasma homocysteine as a risk factor for vascular disease. The Europe Concerted Action Project. *JAMA* 1997; 277: 1775- 1781.
 30. Arnesen E, Refsum H, Bonna KH, Ueland PM, Forde OH, Nordrehaug JE. Serum total homocysteine and coronary heart disease. *Int J Epidemiol* 1995; 24:704-9.
 31. Welch GN, Loscalzo J. Homocysteine and atherothrombosis. *N Eng J Med* 1998; 338: 1042-1050.30

32. Moghadasian MH, McManus BM, Frohlich JJ. Homocyst (e) ine and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1997; 157: 2299-2308.
33. Ubbink JB, Vermaak WJH, Bennett JM, Becker PJ, van Staden DA and Bissbort S. The prevalence of homocystinemia and hypercholesterolemia in angiographically defined coronary heart disease. *Wochenschr.* 1991; 69: 527.
34. Frosst P, Blom MJ, Milos R, et al. A candidate genetic risk factor for vascular disease: a common mutation in methylenetetrahydrofolate reductase. *Nat Genet* 1995; 10: 111-113.
35. Harker LA, Ross R, Slichter SJ, Scott CR. Homocysteine-induced arteriosclerosis. The role of endothelial cell injury and platelet response in its genesis. *J Clin Invest* 1976; 58: 731-41.
36. Giannini MJ, Coleman M, Innerfield I. Antithrombin activity in homocystinuria. *Lancet* 1975; 1: 1094.
37. Kumbasar SD, Dincer I, Ertas F, Gulec S, Erol C, Akyurek O, Kilickap M, Oral D, Sipahi E, Laleli Y. Hyperhomocysteinemia and restenosis. *J Cardiovasc Risk* 2001; 8: 9-13.
38. Weiss N.: Mechanisms of increased vascular oxidant stres in hyperhomocysteinemia and its impact on endothelial function. *Curr Drug Metab.* 6: 27-36, 2005
39. Sachder P.: Homocysteine, cerebrovascular disease and brain atrophy. *J Neurol Sci.* 15, 25-9,2004
40. Gouaille C.B., Bottiglieri T. Why Do Homocysteine Levels Increase?. Edited by Bottigliere T. *Homocysteine Related Vitamins and Neuropsychiatric Disorders.* Springer. 2003:59-92
41. Wu L.L., Wu J.T.: Hyperhomocysteinemia is a risk factor for cancer and a new potential tumor marker. *Clinica Chimica Acta.* 2002;322, 21-28,
42. Tanaka K, Budd MA, Efron ML, Isselbacher KJ. Isovaleric acidemia: a new genetic defect of leucine metabolism. *Proc Natl Acad Sci USA* 1966; 56:236-42.
43. Chace DH, Diperna JC, Naylor EW. Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. *Acta Paediatr Suppl* 1999; 432:45-7.

44. Clayton PT. Applications of mass spectrometry in the study of inborn errors of metabolism. *J. Inher Metab Dis* 2001; 24: 139-50.
45. Mosharafa M, Stauffer WM, Reed JH. Recent developments in clinical mass spectrometry. *Biomed Sci Instrum* 1971; 8: 71.
46. Andersen BD, Wise BL. Textbook of clinical chemistry. Philadelphia: WB Saunders Company, 1986; 197-208.
47. Cooks RG, Busch KL, Glish GL. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science* 1983; 21:222(4621):273-91.
48. Lehrer M. In Kaplan LA. Mass spectrometry. St. Louis: Mosby Company, 1996; 167-84.
49. Skoog DA, Holler JF, Nieman TA. In principles of instrumental analysis. Molecular mass spectrometry. Philadelphia: Saunders College Publishing, 1998; 498-534.
50. Kiser RW, Sullivan RE. Mass spectrometry. *Anal Chem* 1968; 40: 273.
51. Dougherty RC, Roberts JD, Biros FJ. Positive and negative chemical ionization mass spectra of some aromatic chlorinated pesticides. *Anal Chem* 1975; 47: 54-9.
52. Dougherty RC. Negative chemical ionization mass spectrometry: applications in environmental analytical chemistry. *Biomed Mass Spectrom* 1981; 8 : 283-92.
53. Di Donato GC, Busch KL. Derivatization of ketosteroids for fast atom bombardment mass spectrometry. *Biomed Mass Spectrom* 1985; 12:364-6.
54. Mora JF, Van Berkel GJ, Enke CG, Cole RB, Martinez-Sanchez M, Fenn JB. Electrochemical processes in electrospray ionization mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 2000; 35: 939-52.
55. Kirpekar F, Nordhoff E, Larsen LK, Kristiansen K, Roepstorff P, Hillenkamp F. DNA sequence analysis by MALDI mass spectrometry. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 2554-9.
56. Meng CK, Fenn JB. Analyzing organic molecules with electrospray mass spectrometry *Am Biotechnol Lab* 1990; 8: 54-60.
57. Hochstrasser DF, Sanchez JC, Appel RD. Proteomics and its trends facing nature's complexity. *Proteomics* 2002; 2:807-12.
58. Sannes-Lowery KA, Hofstadler SA. Characterization of multipole storage assisted dissociation: implications for electrospray ionization mass

spectrometry characterization of biomolecules: *J Am Soc Mass spectrom* 2000; 11: 1-9

59. Wu Q, Cheng X, Hofstadler SA, Smith RD. Specific metal-oligonucleotide binding studied by high resolution tandem mass spectrometry. *J Mass Spectrom* 1996; 31: 669-75.
60. Rashed MS, Ozand PT, Bucknall MP, Little D. Diagnosis of inborn errors of metabolism from blood spots by acylcarnitines and amino acids profiling using automated electrospray tandem mass spectrometry. *Pediatric Research* 1995; 38: 324-31.
61. Belov ME, Gorshkov MV, Udseth HR, Anderson GA, Smith RD. Zeptomole-sensitivity electrospray ionization fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry of proteins. *Anal Chem* 2000; 72: 2271-9.
62. Lacey JM, Magera MJ, Matern D, Rinaldo P, O'Brien JF. A method for the rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography–mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 178.
63. McGinley MD, Davis MT, Robinson JH. A simplified device for protein identification by microcapillary gradient liquid chromatography – tandem mass spectrometry: *Electrophoresis* 2000; 21: 1678-84.
64. Clayton PT. Disorders of cholesterol biosynthesis. *Arch Dis Child* 1998; 78:185-9.
65. Mayatepek E, Zelezny R, Lehmann WD, Hammond JW, Hoffmann GF. Defects in the synthesis of cysteinyl leukotrienes: a new group of inborn errors of metabolism. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 404-8.
66. Vreken P, Valianpour F, Overmars H. Analysis of plasmenylethanolamines using electrospray tandem mass spectrometry and its application in screening for peroxisomal disorders. *J Inher Metab Dis* 2000; 23 : 429-33.
67. Whitfield PD, Sharp P, Meikle PJ, Hopwood JJ. Characterization of ganglioside storage in mucopolysaccharidosis IIIA by tandem mass spectrometry. *J Inher Metab Dis* 2000; 23: 237.
68. Berry GT, Nissim I, Lin Z, Mazur AT, Gibson JB, Segal S. Endogenous synthesis of galactose in normal men and patients with hereditary galactosaemia. *Lancet* 1995; 346: 1073-4.

69. Banks JF, Jr, Shen S, Whitehouse CM, Fenn JB. Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Anal Chem* 1994; 66: 406-14.
70. Chace DH, Adam BW, Smith SJ, Alexander JR, Hillman SL, Hannon WH. Validation of accuracy-based amino acid reference materials in dried-blood spots by tandem mass spectrometry for newborn screening assays. *Clin Chem* 1999; 45: 1269-77.
71. Naylor EW, Chace DH. Automated tandem mass spectrometry for mass newborn screening for disorders in fatty acid, organic acid and amino acid metabolism. *J Child Neurol* 1999; 14: 4-8.
72. Zytkevich TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: A two-year summary from the new england newborn screening program. *Clin Chem* 2001; 47: 1945- 55
73. Husek P, Determination of homocysteine by gas chromatography-mass spectrometry following treatment with chloroformates: a comment, *Journal of Chromatography B*, 740 (2000) 289–290
74. M.J. Magera, J.M. Lacey, B. Casetta, P. Rinaldo, Method for the determination of total homocysteine in plasma and urine by stable isotope dilution and electrospray tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.* 45 (1999) 1517–1522.
75. Rafii M. et al. Homocysteine and cysteine in plasma and urine. *Anal. Biochem.* 371 (2007) 71–81
76. Hempen C, Wanschers H, van der Sluijs Veer G, A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem* (2008) 391:263–270
77. ISO/IEC 17025:2005; General requirements for the competence of testing and calibration laboratories

ÖZGEÇMİŞ

ADI SOYADI: Murat ÇELİK

DOĞUM YERİ: SALIPAZARI / SAMSUN

DOĞUM TARİHİ: 01.04.1982

LİSANS: MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN EDEBİYAT FAKÜLTESİ
KİMYA BÖLÜMÜ [2002]

YÜKSEK LİSANS: Eylül 2006-Haziran 2006 Yabancı Dil Hazırlık
Eylül 2007-Haziran 2008 Ders Dönemi
Eylül 2008-Haziran 2009 Tez Dönemi