

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TRANSFERRİN İZOFORMLARI ANALİZİNDE  
ELEKTROFOREZ VE SIVI KROMATOĞRAFİSİ  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Arzu ALYAKUT**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Aslı PINAR**

**ANKARA  
2017**



**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ  
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**TRANSFERRİN İZOFORMLARI ANALİZİNDE  
ELEKTROFOREZ VE SIVI KROMATOĞRAFİSİ  
YÖNTEMLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. Arzu ALYAKUT**

**UZMANLIK TEZİ  
Olarak Hazırlanmıştır**

**TEZ DANIŞMANI  
Doç. Dr. Aslı PINAR**

**ANKARA  
2017**

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim süresince değerli bilgilerini benimle paylaşan, kazandırdığı her deneyim ile uzmanlık eğitimime çok büyük katkıları olan ve bana her konuda vermiş olduğu sonsuz destek nedeniyle danışmanım, saygıdeğer hocam Doç. Dr. Aslı PINAR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Asistanlığım süresince eğitimime katkıda bulunan anabilim dalımızın öğretim üyelerine, yol arkadaşlığı yapan tüm asistan arkadaşlarıma ve başta elektroforez birimi çalışanları olmak üzere tüm merkez laboratuvarı çalışanlarına teşekkür ederim.

Çalışmamı kit temini ile destekleyen Biz Medikal, Pera Medikal ve Rotakim Analiz'e teşekkür ederim.

Son olarak, eğitim hayatım boyunca beni her konuda koşulsuz destekleyen sevgili anneme ve babama, sevgili kayınvalideme, uzmanlık eğitimim ve tez çalışmalarım sırasında motivasyonumu hep yüksek tutan, desteğini esirgemeyen sevgili hayat arkadaşım Bawer Alyakut'a ve bana ihtiyaç duyduğu dönemlerde yanında olamama rağmen mutlu bir çocuk olmaya devam eden ve beni üzmeyen anlayışlı biricik kızım Arin Alyakut'a teşekkür ederim.

## ÖZET

**Alyakut A., Transferrin izoformlarının analizinde elektroforez ve sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya, Uzmanlık tezi, 2017, Ankara.** Transferrin (Tf), siyalik asit sayısına göre birçok izoformu bulunan bir serum glikoproteinidir. Tf izoformlarındaki patern değişiklikleri konjenital glikozilasyon defektlerinin tanısında kullanılmaktadır. Bu amaçla izoelektrik odaklama (İEO) elektroforezi, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiller zon elektroforez (CE) yöntemleri ile Tf izoformları değerlendirilmektedir. Çalışma, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında Mayıs 2015-Mayıs 2016 tarihleri arasında Konjenital glikozilasyon sendromu (CDG) taraması amacıyla kabul edilen hasta numuneleri ile gerçekleştirildi. Çalışmamızda merkez laboratuvarında rutin analizlerde kullanılan 1. CE sistemi (Sebia 2 Capillarys™ Sebia, France), 2. CE sistemi (Helena Biosciences V8® E-class analizörü; Helena Biosciences Europe, UK) ve HPLC (CDT test kiti UV/VIS-FAST EUREKA reagent / Shimadzu Europe) sistemleri karşılaştırıldı. Her bir sistemin gün içi ve günler arası varyasyonları hesaplanarak karşılaştırıldı. Sistemler Tf izoformları analiz performansları ve çeşitli interferanslar (hemoliz, lipemi, bilirubin ve betada ilerleyen monoklonal pik) yönünden karşılaştırıldı. Her üç sistemin varyasyon katsayısı (%CV) değerleri karşılaştırıldığında gün içi ve günler arası varyasyon çalışmasında; disialo-Tf için en düşük değerler HPLC sisteminde diğer izoformlar için 1.CE sisteminde görüldü. Rutin Tf izoformları analiz karşılaştırmasında toplam 36 serum numunesi çalışıldı. 1.CE sistemi ile 36, 2.CE sistemi ile 29, HPLC sistemi ile de 35 numune değerlendirildi. Üç sistemin sınıf içi korelasyon analizi sonucunda yöntemler arasında uyum saptanmadı. Sistemler ikişerli sınıf içi korelasyon analizi ile karşılaştırıldığında en kabul edilebilir sonucun trisiyalo-Tf ölçümünde 1.CE ve 2.CE sistemleri arasında olduğu görüldü. Sistemler arasında her bir Tf izoformu için yapılan Bland-Altman analizlerinde disiyalo-Tf için sonuçlar uyumlu bulundu. Trisiyalo-Tf için sonuçların kabul edilebilir sınırlar içinde (<%10) ancak, 2. CE ve HPLC sisteminde artan konsantrasyonlarda negatif yönde bias gösterdiği saptandı. Tetrasiyalo-Tf'de sistemler arasında farklılığın arttığı ancak kabul edilebilir sınırlar içinde olduğu, pentasiyalo-Tf için arasındaki uyumun bozulduğu görüldü.

Hemoglobin (Hb) interferansının özellikle disiyalo-Tf üzerinde negatif yönde etkisi saptandı. Transferrin izoform analizlerinde Hb'nin 125 mg/dL düzeylerinden itibaren hemolizin kabul edilmemesi gerektiği sonucuna varıldı. Hemolizli, lipemik ve bilirübinli numunelerden en az etkilenen sistemin 1. CE sistemi olduğu belirlendi. Beta bölgesinde ilerleyen monoklonal piklerin Tf izoformları analizine etkisi değerlendirildiğinde HPLC sisteminin genel olarak etkilenmediği saptandı. Buna ek olarak, HPLC sisteminde gözlenen az sayıda monoklonal pik interferansının immün eksiltme işlemi ile giderildiği saptandı. CDG şüpheli olarak saptanan hasta numuneleri HPLC ve 1. CE sistemlerinde uyumlu Tf izoform paternleri gösterdiği saptandı. Tf izoformları analizinde iyi bir performans elde edilebilmesi, kullanılan yöntemle olduğu kadar hasta numunesinin bileşenlerine de bağlıdır. Bu nedenle yöntemi interfere eden etmenler tam olarak belirlenmelidir. Kullanılan analiz sisteminin bu değişkenlere verdiği yanıt bilinirse doğru sonuç elde etmek mümkün olacaktır.

**Anahtar kelimeler:** Transferrin izoform analizi, Kapiller elektroforez, HPLC, İnterferens, Monoklonal bant

## ABSTRACT

**Alyakut A, Comparison of electrophoresis and liquid chromatography in analysis of transferrin isoforms, Hacettepe University Faculty of Medicine, Thesis in Medical Biochemistry, Ankara 2017.** Transferrin (Tf) , is a serum glycoprotein with many isoforms based on number of sialic acid residues. Changes in Tf isoform patterns are used in diagnosis of congenital glycosylation defects. For this purpose, isoelectric focusing (IEF) electrophoresis, high performance liquid chromatography (HPLC) and capillary zone electrophoresis (CE) methods are used to evaluate Tf isoforms. The study was carried out in the Hacettepe University Hospitals Central Laboratory between May 2015- May 2016 with patient samples accepted for congenital disorders of glycosylation (CDG) screening. 1.CE system (Sebia 2 Capillarys™ Sebia, France) which is used in routine analyzes in the central laboratory was compared with 2. CE system (Helena Biosciences V8® E-class analyzer; Helena Biosciences Europe, UK) and HPLC system (CDT test kit UV/VIS-FAST EUREKA reagent / Shimadzu Europe). Intra-day and between-days variations were calculated and compared for each system. Systems were compared according to Tf isoform analysis performances and various interferences (hemolysis, lipemia, bilirubin, and beta migrating monoclonal components). When coefficient of variation (%CV) values of three systems were compared for each isoform, lowest value for disialo-Tf was found in HPLC system, for the other isoforms in 1.CE system. In comparison of routine Tf isoforms analysis, totally 36 serum samples were studied and 36 samples with 1.CE system, 29 samples with 2.CE system, 35 samples with HPLC system were analyzed. No accordance was detected in intra-class correlation analysis of three systems. When the three systems were compared by double pairs intra-class correlation analysis, the most acceptable result in measurement of threesialo-Tf measurement was found between 1.CE and 2.CE systems. According to Bland- Altman analysis for each Tf isoforms, results were compatible for disialo-Tf between the systems. The results for threesialo-Tf were found to be within the acceptable limits (<10%) but negative bias was detected for increasing concentrations in 2.CE and HPLC systems. For tetrasialo-Tf analysis, it was observed that the difference between the systems was within the acceptable limits, but for pentasialo-Tf analysis compatibility was impaired. Negative effect of

hemoglobin (Hb) interference was observed in disialo-Tf analysis. It was concluded that Hb levels greater than 125 mg/dL were not acceptable in transferrin isoforms analysis. On the other hand it was determined that the system which is at minimally effected by hemolysed, lipemic and icteric samples is 1. CE system. When the effect of monoclonal peaks migrating in beta region was evaluated, it was observed that the HPLC system was generally uneffected. In addition, it was determined that a small number of monoclonal peak interferences observed in the HPLC system were eliminated by immune-substraction process. CDG suspected patient samples showed consistent Tf isoform patterns in HPLC and 1.CE systems. Achievement of a good performance in Tf isoform analysis, is based on patient sample constituents as well as the technique used. For this reason, all elements interfering with the method should be detected. Results will be correct, if the responses of the analysis systems are elucidated to these variables.

**Key words:** Transferrin isoform analysis, Capillary electrophoresis, HPLC, Interference, Monoclonal Band

## İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	iii
ÖZET	iv
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xi
ŞEKİLLER	xiii
TABLOLAR	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Glikoproteinler	3
2.2. Proteinlerin Glikozilasyonu	3
2.3. Glikozilasyon ve Önemi	7
2.4. Protein Glikozilasyon Bozuklukları	7
2.4.1. Konjenital Glikozilasyon Defektleri	7
2.4.2. Diğer Glikozilasyon Bozuklukları	12
2.5. Glikozilasyonun Değerlendirilmesinde Transferrin	16
2.5.1. Transferrin Yapısı ve Özellikleri	16
2.5.2. Transferrin İzofomları	18
2.5.3. Transferrin Varyantları	19
2.5.4. Konjenital glikozilasyon bozukluklarının tanısında transferrin	20
2.6. Transferrin İzofomlarının Analiz Yöntemleri	21
2.6.1. İzoelektrik Odaklama Elektrofrez	21
2.6.2. Kapiller Elektrofrez	22
2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi	23
2.6.4. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri	24

2.7. Transferrin İzofomlarının Analizinde Karşılaşılan Güçlükler	25
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	27
3.1. Araç ve Gereçler	27
3.2. Kullanılan Kimyasallar	28
3.3. Çalışmada Kullanılan Numuneler	28
3.4. Numune Hazırlıkları	29
3.4.1. Nöraminidaz ile Transferrin İzofomlarının Hazırlanması	29
3.4.2. Hemoglobin İnterferens Çalışması için Numunelerin Hazırlanması	29
3.4.3. Lipemi İnterferens Çalışması için Numunelerin Hazırlanması	30
3.4.4. Bilirubin İnterferens Çalışması için Numunelerin Hazırlanması	30
3.4.5. Monoklonal Pik İçeren Numuneler	31
3.4.6. Gün içi ve Günler Arası Varyasyon Numunelerinin Hazırlanması	31
3.5. Transferrin İzofomlarının Analizi	31
3.5.1. HPLC Sistemi ile Analiz	31
3.5.2. CE Sistemleri ile Analiz	33
3.6. Hesaplamalar ve İstatistiksel Analizler	35
4. BULGULAR	38
4.1. Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri	38
4.1.1. Rutin Hasta Grubunun Demografik Özellikleri	38
4.1.2. Monoklonal Pik Saptanan Hasta Grubunun Demografik Özellikleri	38
4.2. Rutin Hasta Karşılaştırması Bulguları	39
4.2.1. Disiyalotransferrin İzofomlarının Karşılaştırılması	40
4.2.2. Trisiyalotransferrin İzofomlarının Karşılaştırılması	40
4.2.3. Tetrasiyalotransferrin İzofomlarının Karşılaştırılması	40
4.2.4. Pentasiyalotransferrin İzofomlarının Karşılaştırılması	40
4.3. Gün İçi ve Günler Arası Varyasyon Çalışma Bulguları	45
4.4. İnterferans Çalışma Bulguları	45
4.4.1. Hemoglobin İnterferens Çalışması	46
4.4.2. Lipemi İnterferans Çalışması	49
4.4.3. Bilirubin İnterferans Çalışması	52

4.4.4. Monoklonal Pik İnterferens Çalışması	55
4.5. Konjenital Glikozilasyon Defekti Saptanan Hasta Bulguları	65
5. TARTIŞMA	70
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	81
7.KAYNAKÇA	83

## EKLER

EK 1. Etik Kurul Onayı

EK 2. Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Aydınlatılmış Onam Formu

EK 3. Araştırma Amaçlı Çalışma İçin Çocuk Rıza Formu

EK 4. Çalışmadan hazırlanan uluslararası 15. EFLM Continuos Postgraduate Course in Clinical Chemistry and Laboratory Medicine’de sunulan poster

**SİMGELER VE KISALTMALAR**

%CV	Yüzde varyasyon katsayısı
aAT	Alfa-1 antitripsin
ALT	Alanin aminotransferaz
Apo-Tf	Apo-transferrin
AST	Aspartat aminotransferaz
Asn	Asparajin
ATIII	Antitrombin III
BOS	Beyin omurilik sıvısı
CDG	Konjenital glikozilasyon sendromu
CDT	Karbohidrat eksik transferrin
CRP	C-reaktif protein
CE	Kapiller zon elektroforezi
DAS28	Hastalık aktivite skoru-28
ER	Endoplazmik retikulum
ESI-MS	Elektrosprey İyonizasyon- Kütle Spektrometri
GalNAc	N-asetilgalaktozamin
GALT	Galaktoz 1 fosfat üridil transferaz
GDP-mannoz	Guanozin difosfomannoz
GlcNAc	N-asetilglukozamin
Hb	Hemoglobin
HFİ	Hereditör fruktoz intoleransı
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

IFCC	Uluslararası Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
IgG	İmmunoglobulin G
İEO	İzoelektrik odaklama
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi, Tandem Kütle Spektrometri
LLO	Lipid bağlı oligosakkarit
MALDI-MS	Matriks-Destekli Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometri
MBP	Mannoz bağlayıcı protein
PMI	Fosofomannoizomeraz
PMM	Fosfomannomutaz
pI	İzoelektrik nokta
SD	Standart sapma
Ser	Serin
SELDI-MS	Yüzey-Zenginleştirilmiş Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometri
TBG	Tiroksin bağlayıcı globulin
Tf	Transferrin
Thr	Treonin

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Glikoproteinlerde görülen glikozidik bağlar	4
Şekil 2.2. N-Glikozilasyon basamakları	5
Şekil 2.3. N-Glikozilasyon ve konjenital glikozilasyon bozuklukları	9
Şekil 2.4. Transferrin molekül yapısı	17
Şekil 2.5 Normal transferrin paterni ve konjenital glikozilasyon bozukluğunda transferrin izoformları	18
Şekil 2.6 CDG tanısı için önerilen tanısal algoritma	20
Şekil 4.1. Disiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi	41
Şekil 4.2. Trisiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi	42
Şekil 4.3. Tetrasiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi	43
Şekil 4.4. Pentasiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi	44
Şekil 4.5. Transferrin izoform analizlerinde Hb interferansının değerlendirilmesi	48
Şekil 4.6. Transferrin izoform analizlerinde lipemi interferansının değerlendirilmesi	51
Şekil 4.7. Transferrin izoform analizlerinde bilirübin interferansının değerlendirilmesi	54
Şekil 4.8. 1. Monoklonal gammopati hastası (N.A.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	58

Şekil 4.9. 2. Monoklonal gammopati hastası (A.Ç.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	60
Şekil 4.10. 3. Monoklonal gammopati hastası (C.Y.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	61
Şekil 4.11. 4. Monoklonal gammopati hastası (E.K..) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	62
Şekil 4.12. 5. Monoklonal gammopati hastası (H.D.A.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	63
Şekil 4.13. 6. Monoklonal gammopati hastası (M.Ö.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması	64
Şekil 4.14. Nöraminidaz ile hazırlanan ve Tf'nin tüm izoformlarını içeren serumun 1. CE sistemindeki analiz sonucu	65
Şekil 4.15. 1. CDG hastası (B.A.) için Tf izoform elektroforez paterni	66
Şekil 4.16. 2. CDG hastası (B.Ç.) için Tf izoform elektroforez paterni	67
Şekil 4.17. 3. CDG hastası (E.B.) için Tf izoform elektroforez paterni	68
Şekil 4.18. 4. CDG hastası (M.Ö.Ş.) için Tf izoform elektroforez paterni	69

## TABLOLAR

Tablo	Sayfa
Tablo 2.1. Konjenital glikozilasyon bozukluklarının alt grupları	10
Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve reaktifler	27
Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar	28
Tablo 3.3. HPLC sisteminde transferrin izoform analizi için numune hazırlama prosedürü	32
Tablo 3.4. HPLC sisteminde transferrin izoform analizinde uygulanan gradient protokolü	32
Tablo 3.5. HPLC sisteminde Tf izoformlarının kromatogram zamanları belirlenen referans aralıkları	33
Tablo 3.6. 2. CE sisteminde Tf izoformları analizi için belirlenen normal değerler	35
Tablo 3.7. 2. CE sisteminde CDT analizi için belirlenen değerler	35
Tablo 4.1. Rutin hasta grubu demografi tablosu	38
Tablo 4.2. Monoklonal pik saptanan hasta grubunun demografik özellikleri	39
Tablo 4.3. Üç sistemin Tf izoform analizindeki korelasyon değerlendirmeleri.	39
Tablo 4.4. Sistemlerin Tf izoformları analizinde ikişerli korelasyonu	40
Tablo 4.5. Gün içi ve günler arası varyasyon çalışmasının sistemlere göre hesaplama tablosu	45

Tablo 4.6. Transferrin izoform analizlerinde Hb interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar.	46
Tablo 4.7. Transferrin izoform analizlerinde lipemi interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar.	49
Tablo 4.8. Transferrin izoform analizlerinde bilirubin interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar	52
Tablo 4.9. Monoklonal pik interferans çalışması sonuçları.	55
Tablo 4.10. Monoklonal pik interferansı çalışmasında pik türü, lokalizasyonu sistemleri etkileme durumu	56
Tablo 4.11. 1. CDG hastası (B.A.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Tf izoformları.	66
Tablo 4.12. 2. CDG hastası (B.Ç.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Tf izoformları.	67
Tablo 4.13. 3. CDG hastası (E.B.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Tf izoformları.	68
Tablo 4.14. 5. CDG hastası (M.Ö.Ş.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Tf izoformları.	69

## 1. GİRİŞ ve AMAÇ

Transferrin (Tf), 79,6 kDa büyüklüğünde, %5,5 karbohidrat içeren demir (Fe) taşıyıcı bir serum glikoproteinidir. İnsan Tf'ni "*TF geni*" tarafından kodlanmaktadır (1). Transferrin, demiri (Fe<sup>+3</sup>) geri dönüşümlü bağlayarak bağırsaktan kemik iliği, karaciğer gibi dokulara taşır. Biyolojik sıvılarda serbest demir seviyesini düzenleyen Tf, aynı zamanda negatif akut faz proteinidir. Temel üretim yeri hepatositler olup, koroid pleksustan da az miktarda sentezlenmektedir (2, 3).

Bir glikoprotein olan Tf glikozilasyonu birçok durumda değişiklik gösterebilmektedir. Doğumsal glikozilasyon bozukluklarında (CDG), Tf dahil birçok proteinin glikozilasyonunda bozukluk ve buna bağlı çoklu organ sistemlerinde disfonksiyon izlenmektedir. Glikozilasyon bozuklukları, siyalik asit kalıntılarında izlenen farklılıklar nedeni ile oluşan Tf izoformlarındaki patern değişiklikleri ile tanınabilmektedir. Günümüzde Tf izoformları yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), izoelektrik odaklama elektroforezi (İEO), kapiller zon elektroforezi (CE) veya sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS) yöntemleri ile değerlendirilebilmektedir. Transferrin izoformları; konjenital glikozilasyon defektlerinden başka, alkol bağımlılığının izleminde, galaktozemi ve herediter fruktoz intoleransı tanılarında kullanılabilir. Ayrıca birçok hastalığın daha tanı ve izleminde de kullanılabilir. Transferrin izoformlarının belirlenmesinde, izoelektrik odaklama elektroforezi referans yöntem olarak kullanılır (4). Diğer patolojik durumlarda da aynı referans metodların uygun olup olmadığı tartışma konusudur ve aynı zamanda Tf izoformlarının analizinde kullanılan bu yöntemlerin birbirlerine olan üstünlükleri konusunda kesin bir ayırım bulunamamaktadır.

Bu çalışmada, CDG tanısında kullanılan Tf izoformlarının HPLC ve CE yöntemleri ile karşılaştırılması amaçlandı. Tf izoformları iki farklı CE sistemi ve bir HPLC sistemi ile analiz edilerek sonuçlar değerlendirildi. Ayrıca, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarına CDG taraması amacıyla gelen hasta numuneleri de bu sistemler ile analiz edildi. Her bir Tf izoformunun sistemler arası karşılaştırmaları yapıldı.

Çalışmamızda kullandığımız analitik sistemler tıbbi laboratuvarlarda kullanılan her yöntem için bilinmesi gereken gün içi ve günler arası varyasyon açısından karşılaştırıldı. Konjenital glikozilasyon bozukluğu tarama analizleri genel olarak yenidoğan ve bebeklik döneminde yapılmaktadır ve bu yaş grubundaki hastalarda kan alınırken yaşanan zorluklar nedeni ile hemolizli numuneler sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Yine çocuk hastalarda açlık kanı alınmadığından lipemi ve özellikle yenidoğanlarda sıkça karşılaştığımız bilirubineminin karşılaştırılan yöntemlere olan etkileri de değerlendirildi. Serum protein elektroforezinde Tf beta bölgesinde ilerlemektedir. Bu nedenle bir diğer interferans etkeni olarak beta bölgesinde izlenen monoklonal piklerin sistemlere etkileri de çalışmamızda değerlendirildi.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Glikoproteinler

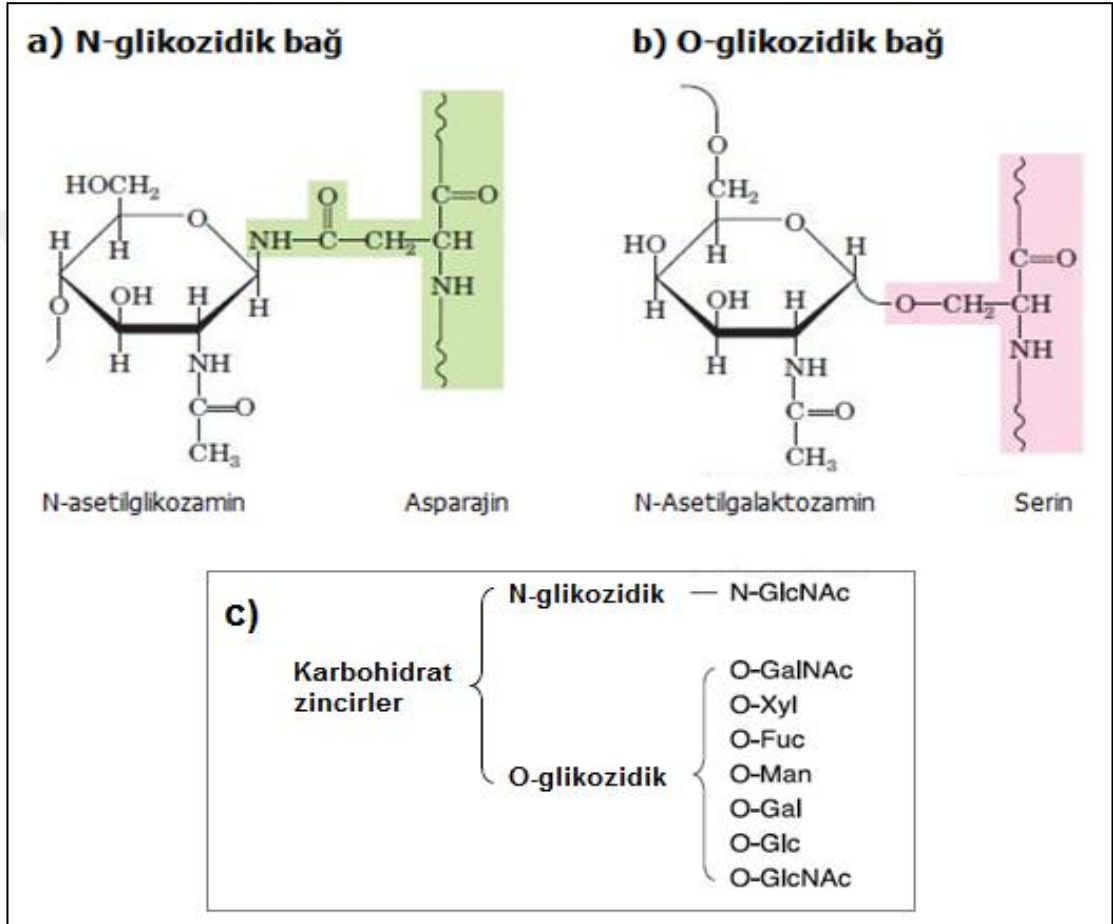
Glikoproteinler, glikanların proteinlere kovalent bağlarla eklenmesi ile post-translasyonel olarak oluşmaktadır. Glikoproteinler, canlı organizmalarda hemen tüm biyolojik süreçlerde görev almaktadır. Plazma zarının dış yüzeyi, hücre dışı matriks ve kanda bulunan glikoproteinler, hücre içinde ise Golgi, salgı granülleri ve lizozomlar gibi özel organellerde yer alırlar. Glikoproteinlerdeki oligosakkarit zincirler, diğer proteinler tarafından yüksek özgülükte bağlanma bölgeleri sağlarlar (5).

Glikoproteinler enzim, taşıma proteini, reseptör, hormon ve yapısal protein olmak gibi çok geniş işlev ve fonksiyona sahiptirler. Plazma zarının dış yüzeyinde çeşitli karmaşıklıkta oligosakkaritlerin, kovalent olarak bağlandığı diziler şeklinde birçok zar glikoproteini vardır. Bunlardan en iyi karakterize edilmiş olan zar glikoproteini eritrosit zarında yer alan glikoforin A'dır. Ökaryotik hücreler tarafından salgılanan birçok protein glikoprotein yapısındadır. Albümin haricindeki plazma proteinleri, kan grubu proteinleri, immünglobulinler, folikül stimüle edici hormon, luteinize edici hormon, tiroid stimüle edici hormon, laktalbümin gibi birçok süt proteini, pankreas tarafından salgılanan bazı proteinler (ribonüklezlar) ve lizozomlarda bulunan proteinlerin çoğu glikozillenmiş olarak bulunur. Zar proteinlerinden G proteini glikoprotein yapıdadır. Hücre dışı matriks elemanı olan kollajenin ağırlığının % 0,5'i karbohidrattır (5).

### 2.2. Proteinlerin Glikozilasyonu

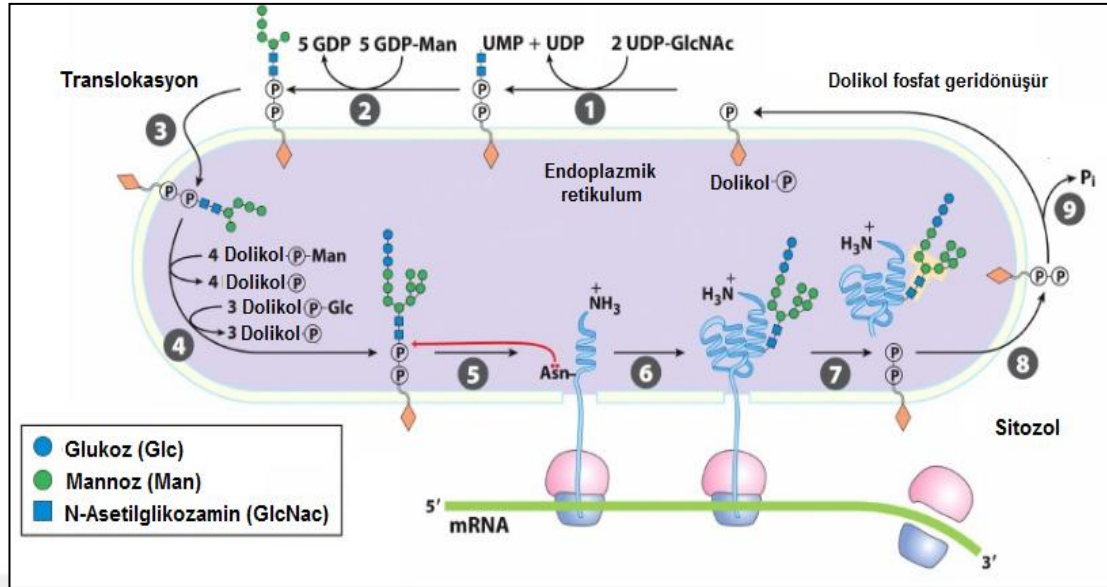
Glikozilasyon, en sık görülen ve en önemli post-translasyonel modifikasyonlardan biri olup, enzimatik olarak bir veya daha fazla sakkaritin protein, lipit veya organik moleküllere bağlanarak glikan oluşturması işlemidir. Eklenen karbohidrat yapıları hücre yüzey reseptörleri, sinyal proteinleri, hücre-hücre etkileşimini sağlayan mediatörler ve polipeptitleri proteazlardan koruyan yapılar olarak görev almaktadırlar (6).

Glikozilasyon işlemi sırasında karbohidrat eklentideki anomerik karbon, bir proteinin asparajil kalıntısının amid azotu ile bağlandığında N-glikozidik bağ meydana gelmektedir. İnsan vücudundaki glikoproteinlerin büyük kısmı N-glikozidik bağ ile oluşmaktadır. Eğer, karbohidrat eklentideki anomerik karbon, serin ya da treonin hidroksil grubu ile bağlanırsa O-glikozidik bağ meydana gelmektedir (Şekil 2.1) (5).



Şekil 2.1. Glikoproteinlerde görülen glikozidik bağlar. a) N-asetilglukozamin terminal karbohidrat eklentisi ile asparajil kalıntısındaki amid nitrojeni arasında N-glikozidik bağ görülmektedir. b) N-asetilgalaktozamin terminal karbohidrat eklentisi ile serin kalıntısındaki hidroksil arasında O-glikozidik bağ görülmektedir (5, 7).

Glikoproteinlerde N-glikozilasyon biraraya gelme, sentez ve işleme basamakları ile oluşmaktadır. İlk iki basamak sitozol ve endoplazmik retikulum (ER)'da başlar ve devam eder. Son işleme basamağı ise ER ile Golgi'de tamamlanır (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. N-Glikozilasyon basamakları: 1) ER sitozolik yüzünde bulunan dolikol fosfata N-asetilglukozamin (iki adet) birimlerinin N-asetilglukozamin transferaz katalizi ile aktarımı ve ilk lipid bağlı oligosakkarit sentezi. 2) Sitozolda lipid bağlı oligosakkarite mannoz (beş adet) birimlerinin mannozil transferaz katalizi ile aktarımı. 3) Dolikole bağlı oligosakkarit zincir ER membranından flip flop hareketi ile ER içerisine taşınması. 4) Dolikole bağlı şeker birimlerinin diğer taşıyıcı dolikol birimlerinden gelen mannoz (dört adet) ve glukoz (üç adet) birimleri ile birleşerek uzaması. 5-6) Dolikole bağlı oligosakkarit (12-14 şeker kalıntısı içeren) biriminin oligosakkarit transferaz enzimi katalizi ile asparajin aminoasidinin amid azotu ile birleşmesi. 7) Oluşan N-glikozid bağdan dolikol pirofosfat biriminin uzaklaştırılması 8) Serbest dolikolpirofosfat biriminin sitozole geçmesi. 9) Dolikolpirofosfat biriminden pirofosfataz aracılığıyla pirofosfatın uzaklaştırılması. 10) Serbest dolikolfosfatın yeni oligosakkarit sentezinde tekrar kullanılması (5).

Proteinlerin N-glikozilasyonları dört önemli basamak içermektedir:

- i. Taşıyıcı lipid dolikol fosfat sentezi,
- ii. Lipid bağlı oligosakkarit ara ürünü oluşumu,
- iii. Olgunlaşmamış polipeptit üzerindeki asparajil rezidülerine dolikolden oligosakkarit aktarımı,
- iv. ER ve Golgi'de oligosakkaritlerin modifikasyonu.

Bu süreçte ilk önce mannoz-6-fosfattan fosfomannoz (PMM) ve fosfomannoizomeraz (PMI) enzimleri ile guanozin difosfomannoz (GDP-mannoz)

sentezlenir. Nükleotid şekerler, lipid bağı oligosakkarit şekerlerden oluşan dolikol pirofosfata bağlanır.

Bu prekürsör proteine 2 adet N-asetilglukozamin (GlcNac) ve beş adet mannoz şeker eklenerek ER sitozolik membranına tutunur. Ardından bu lipide bağı oligosakkarit öncül molekül ER'un lüminal tarafına girerek sırasıyla dolikol-P-mannoz/glikozdan şeker birimleri eklenir (Şekil 2.2). En son aşamada glikoprotein Golgi'ye son modifikasyonlar için gönderilir, oligosakkarit yan zincirlerinin sentezi siyalik asit birimlerinin eklenmesiyle son bulur. N-glikozilasyonun işleme aşaması ise ER'de glikozların (glikozidaz I ve II tarafından) ve bir mannozün ( $\alpha$ -mannozidaz I tarafından) uzaklaştırılması ile başlar. Daha sonra yeniden yapılanma GlcNac, fukoz, galaktoz, siyalik asit birimlerinin ilavesi ile sonlanır (8). Glikosiyalotransferazlar transkripsiyonel olarak regüle edilmektedir ama sentezin yanında önemli başka bir konu da lokalizasyonları ve yıkılımlarıdır (ER ve Golgi'de dinamik olarak yıkılmaktadırlar). Siyalik asit birimleri 50'nin üzerinde üyeye sahiptir, 6 farklı şeker ile bağ kurabilir ve böylece trilyonun üzerinde kombinasyonlarla yeni moleküller ortaya çıkabilmektedir. Bir şeker birimi farklı proteinlere eklenerek fonksiyonel olarak çeşitlilik sağlamaktadır (9).

O-glikozilasyon ise sadece sentez aşamasından oluşur. O-bağı glikoproteinlerin oligosakkarid zincirleri, şeker birimlerin özgün glikoprotein glikoziltransferazlar tarafından katalizlenen tepkimelerle adım adım eklenmesi ile Golgi'de gerçekleşir. Glikoprotein yapısına katılan şekerlerin vericisi, nükleotid şekerlerdir. N-bağı glikoproteinlerin sentezinin aksine özgün bir dolikol pirofosfat ve çeşitli glikozidazlar sentezde yer almaz (10). Bazı glikoproteinler ileri modifikasyonları olan fukozilasyon ve fosforilasyona uğrarlar ve en son olarak da golgiye aktarılarak bu proteinlerin aktivasyonları sağlanır. Sekretuar glikoproteinler vücut sıvılarına salınırken, membran glikoproteinleri hücre membranlarının yapısına katılır, lizozomal enzimler ise lizozomlar tarafından alınır (6, 11).

### 2.3. Glikozilasyon ve Önemi

Glikoproteinlerin yapısındaki glikanların biyolojik işlevleri çok hücreli kompleks organ ve organizmalar için çok önemlidir. Çünkü bu hücrelerin birbirleri ve hücre dışı matris ile etkileşimleri bir gerekliliktir. Glikanların çoğu hücre dış yüzeyi ve hücre dışına salgılanan glikoproteinlerde bulunur. Dolayısı ile hücre-hücre ve hücre-matris etkileşimlerini düzenlemek veya aracılık etmek için çok uygun yerleşimdedirler. Membrana bağlı bu glikoproteinler, hücre yüzeyinin tanınması (hormonlar, virüsler ve başka hücreler tarafından), hücre yüzey antijenitesi (kan grubu antijenleri gibi), hücre dışı matris bileşenlerini oluşturma benzeri birçok hücresel olayda rol alırlar. Gastrointestinal ve ürogenital yolların münis salgısı olarak biyolojik koruyucu kaygan yapıyı oluştururlar (5). Serüloplazmin ve Tf gibi taşıyıcı moleküller olarak rol alırlar. Tiroid stimüle edici hormon, koryonik gonadotropin gibi hormonlar ve alkalen fosfataz gibi bazı enzimler de glikoprotein yapıdadır. Trombositlerin yüzey membranlarındaki özgün glikoproteinler ise hemostazda rol oynarlar. Ayrıca embriyonik gelişim, normal doku organizasyonu, tümör metastazı ve hücrelerin hücre dışı moleküller ile etkileşimlerinde de rol almaktadırlar (12, 13).

### 2.4. Protein Glikozilasyon Bozuklukları

Glikoproteinlerin glikan kısımlarının fonksiyonlarını anlayabilmek için birçok çalışma yapılmış, glikanların yapısal farklılığı gösterilmiştir (14). Glikoproteinlerdeki karbohidrat zincirde bozuklukların saptandığı hastalıklar içinde konjenital glikozilasyon bozuklukları (CDG) (8, 15), inflamasyon, otoimmün hastalıklar, kanser, gebelik, karaciğer hastalığı (14), galaktozemi (16), sepsis (17), kronik alkol alımı (18, 19) ve anoreksiya nervoza gibi katabolik durumla seyreden hastalıklar (20) sayılabilir.

#### 2.4.1. Konjenital Glikozilasyon Defektleri

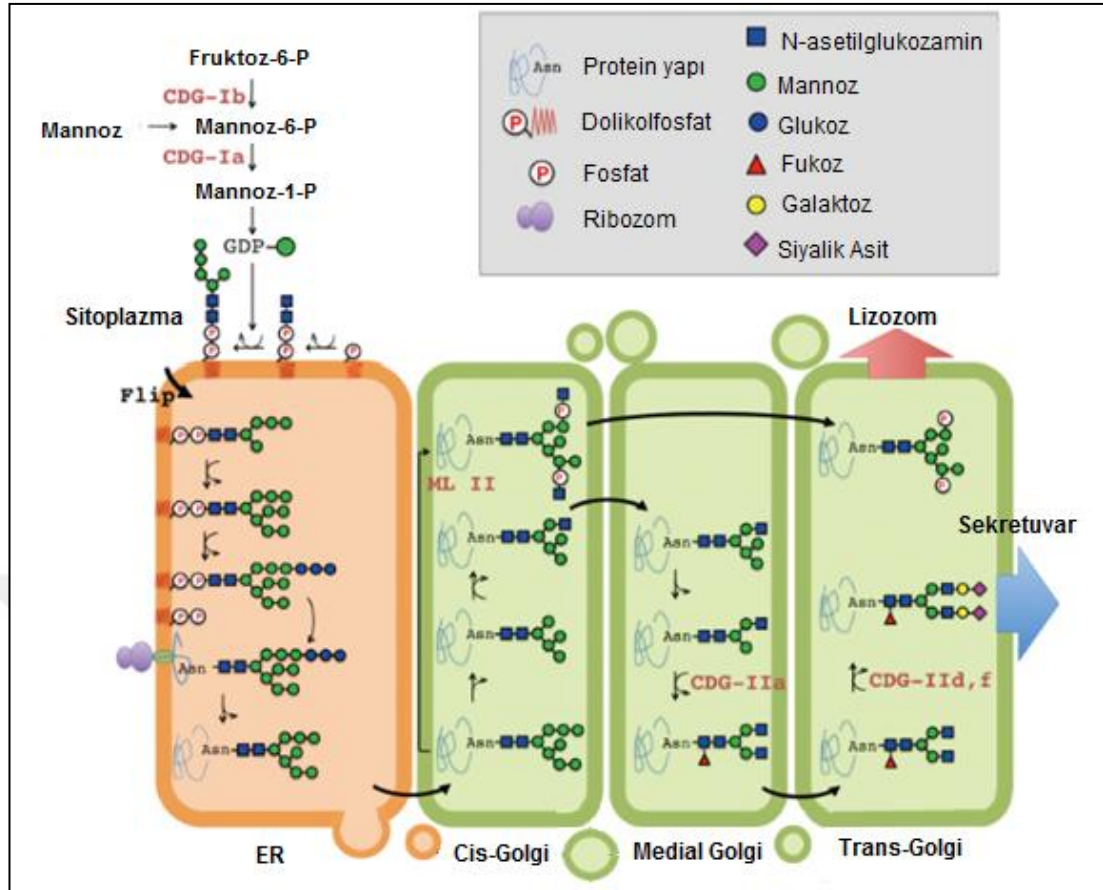
Bu hastalık grubu önceleri "Karbohidrat eksik glikoprotein sendromu" olarak adlandırılırken, daha sonra "Konjenital glikozilasyon bozuklukları" (Congenital disorders of glycosylation; CDG) olarak isimlendirilmiştir (11). Glikoproteinler, glikolipidler ve glikofosfatidilinozitolin glikozilasyonunda görevli enzimleri

kodlayan genlerdeki mutasyonlar sonucu ortaya çıkan doğumsal metabolik hastalıklar “CDG” olarak tanımlanır. Glikozilasyon bozukluğu çoğunlukla N-glikozilasyon işleminde olmakla birlikte, O-glikozilasyon, glikolipid ve glikofosfatidil inozitollerin glikozilasyon bozukluğu ve multipl glikozilasyon bozuklukları olmak üzere dört ana gruba ayrılır (21, 22). Glikozilasyon işleminin pek çok basamağında görevli enzimlerdeki bozukluklar hastalığın alt tiplerini oluşturmaktadır (Tablo 2.1., Şekil 2.3.) En son yayınlanan 2014 verilerine göre 50 farklı N-glikozilasyon defekti saptanmıştır (23).

Glikozilasyon işleminin pek çok basamağında görülen bozukluklar hastalığın alt tiplerini oluşturmaktadır. Bunlar; sitoplazmada şeker rezidülerinin aktivasyon veya transportundaki defekt, dolikol sentezi veya dolikol bağlı glikan sentezindeki kusur, ER aracılı glikan sentezinde veya kompartmanlar arasındaki hareketteki bozukluk, Golgideki transport ve sekresyon basamaklarındaki bozukluklar, glikoz sinyalizasyonunda, glikozun proteine aktarımında, glikoproteinlerin hareketleri ve işleme basamaklarındaki bozukluklar (24-26).

Bu hastalık grubu, tüm organ ve dokularda hastadan hastaya değişen seviyelerde farklı kliniklerle ortaya çıkabilmektedir (27). Beyin gelişimi ve işlevleri başta olmak üzere sinir sistemi, gastrointestinal ve immün sistem etkilenmektedir. O-glikozilasyon bozuklukları, N-glikozilasyon bozukluklarından farklı olarak organ ve dokuya özgü klinik bulgularla açığa çıkmaktadır (28).

Hastalık enzim eksikliği lokalizasyonuna göre tip 1 ve 2 olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. CDG-I oligosakkaritin birleşme ve proteine eklenme aşamasında (sitozol, ER ve Golgi), CDG-II ise işleme basamaklarındaki (ER ve Golgi) bozukluk nedeniyle oluşmaktadır (15). Şimdiye kadar tanımlanan 16 CDG alt tipinin 12 tanesinde esas olarak N-glikozilasyon, 4 tanesinde ise O-glikozilasyon bozukluğu görülmüştür. N-glikozilasyon aşamasında 42 farklı enzim eksikliği tanımlanmıştır. N-Glikozilasyon defektlerinden sekizi (CDG-Ia-h) birleşme ve dördü (CDG-IIa-d) işleme basamaklarındaki bozukluklardan kaynaklanmaktadır. En sık görülen tip PMM-2 eksikliğine bağlı sitozolik defekt CDG-Ia (yeni isimlendirmeye göre PMM-2-CDG)’dir. İkinci sıklıkta ise ER’da glikozil transferaz-I eksikliği nedeniyle ortaya çıkan ALG6-CDG görülmektedir. Tedavi edilebilen (oral



Şekil 2.3. N-glikozilasyon ve konjenital glikozilasyon bozuklukları. CDG-Ib; konjenital glikozilasyon defekti tip Ib, CDG-Ia; konjenital glikozilasyon defekti tip Ia, ER; endoplazmik retikulum. (7)

mannoz tedavisi ile) tek tip ise saf hepatik ve intestinal tutulumla giden sitozolik fosfomanno-izomeraz (PMI) eksikliğine bağlı gelişen CDG-Ib (MPI-CDG)'dir (29).

CDG-Ia mannoz-6-P'ı mannoz-1-P'a dönüştüren PMM enzim eksikliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır (30). CDG-Ia alt-tipine ait tanımlanmış 75'in üzerinde gende mutasyon tanımlanmıştır. En sık görülen mutasyon olan *R141H* %40'dan fazla CDG-Ia alt-tipinde tanımlanmıştır (31, 32). Hastalar sıklıkla neonatal veya erken infantil periyotta tipik klinik bulgular olan ayrık meme başı, şaşılık, müsküler hipotoni, büyüme gelişme geriliği, artmış transaminaz düzeyleri ile tanı almaktadır (29, 33). Bir diğer sık görülen belirti serebellar hipoplazidir. Hastalığın yaklaşık %20'yi bulan mortalite nedeni ciddi enfeksiyon ve organ yetmezlikleridir (24, 34). İleri yaşlarda mental retardasyon, serebellar disfonksiyon, pigmenter retinopati,

Tablo 2.1. Konjenital glikozilasyon bozukluklarının alt grupları (35).

Tip	Gen	Genetik Lokasyon	Eksik olan enzim	Öne çıkan semptomlar
I a	PMM1, 2	16p13.3-p13.2	Fosfomannomutaz	Dismorfizm, hipotoni, serebellar hipoplazi
I b	MPI	15q22-qter	Fosfomanno izomeraaz	Hepatik fibrozis, enteropati, koagülopati
I c	ALG6	1p22.3	Glukoziltransferaz I	CDG Ia'nın ılımlı formu
I d	ALG3	3q27	Mannoziltransferaz VI	CDG Ia'nın şiddetli formu
I e	DPM1	20q13.13	Dolikor-P-Man sentaz I	CDG Ia'ya benzer, kortikal körlük, mikrosefali
I f	MPDU1	17p13.1-p12	Dolikor-P-Man I	CDG Ia'ya benzer, iktiyozis
I g	ALG12	Chr.22	Mannoziltransferaz VIII	Genel CDG Ia semptomları, düşük IgG düzeyi
I h	ALG8	11pter-p15.5	Glukoziltransferaz II	CDG Ib benzeri semptomlar
I i	ALG2	9q22	$\alpha$ -1,3 Mannoziltransferaz	CDG Ia'nın tipik semptomları
I j	DPAGT1	11q23.3	Dolikor-P-N-NAcGlc-1-P-transferaz	CDG Ia benzeri semptomlar
I k	ALG1	16p13.3	Mannoziltransferaz I	Genel CDG Ia semptomları, düşük B lenfosit ve IgG düzeyi
II	ALG9	11q23	$\alpha$ -1,2 Mannoziltransferaz	Mikrosefali, hipotoni, nöbetler, hepatomegali
II a	MGAT2	14q21	N-Asetil-glukozaminiltransferaz II	Gelişim geriliği, dismorfizm, nöbetler
II b	GCS1	2p13-p12	Glukozidaz I	Dismorfizm, hipotoni, nöbetler, hepatik fibrozis
II c	FUCT1	11p11.2	GDP-fukoz transporter	Tekrarlayan enfeksiyonlar, gelişim geriliği, hipotoni
II d	$\beta$ 4GALT1	9p13	$\beta$ -1,4-Galakoziltransferaz I	Miyopati, Dandy-Walker malformasyonu, koagülopati
II e	COG7	16p	COG7	Dismorfizm, hipotoni, tekrarlayan enfeksiyonlar
II f	CMP		CMP-siyalik asit transporter	Trombositopeni, nörolojik hiçbir semptom görülmez.

periferal nöropati gibi sinir sisteminde değişen derecelerde bozukluklar, ilerleyen dönemlerde hipertrofik kardiyomyopati gelişebilmektedir (8, 32, 36). Enfeksiyonlar sırasında ortaya çıkan ateş, hücrelerde PMM aktivitesini azaltarak epileptik nöbet ve

geri dönüşümlü inme benzeri ataklara neden olabilmektedir. Erişkin yaş kadınlarda hipergonadotropik hipogonadizm görülebilmektedir (36, 37). Tipik klinik görünüm dışındaki, başvuran hasta sayısı da fazladır ve birçoğu normale yakın mental aktiviteye sahiptir (32, 38).

Yeni isimlendirmeye göre CDG-MPI, CDG-Ib endojen mannoz-6-P üretimini sağlayan fosfomanno-izomeraz eksikliği nedeniyle ortaya çıkmaktadır. Mental ve motor gelişim CDG-Ia'nın aksine normaldir (39, 40). En öne çıkan semptomu sıklıkla hayatın ilk yılında başlayan kronik diare ve siklik kusmalardır (37). Büyüme gelişme geriliği ve protein kaybettiren enteropati ortaya çıkabilir (40). Duedonal biyopside saptanan parsiyel villus atrofi, çölyak hastalığını düşündürmektedir (37, 40). Sıklıkla hipoglisemi ve bazı hastalarda konjenital hepatik fibrozis de görülebilmektedir (41). Hipoalbuminemi, yüksek aminotransferazlar ve düşük antitrombin-III (ATIII) aktivitesi, trombotik epizodlar ve ciddi kanamalar bulgular arasındadır (40).

Birçok proteinin fonksiyonunda glikozilasyonun öneminden dolayı CDG hastalarında biyokimyasal testlerde değişimler görülür. Glikozilasyon işlemindeki bozukluk sonucunda alfa-1-antitripsin (aAT), tiroksin bağlayıcı globulin (TBG) ve Tf gibi glikoproteinlerin elektroforetik patern değişikliği görülmektedir. Ayrıca, CDG-Ia; anormal karaciğer fonksiyon testleri, proteinüri ile beraber düşük plazma kolesterol ve kolinesteraz aktivitesi, hipoalbuminemi, insülin eksikliği nedeniyle hipoglisemi, yüksek aminotransferaz aktivitesi gösterebilmektedir. CDG-Ib'de aminotransferaz aktivitesinde değişimler olmaktadır. CDG-II için ise artmış AST ve normal ALT düzeyleri tipiktir. Birçok pıhtılaşma faktörü ve onların inhibitörleri (FV, XI, II, X, ATIII, Protein C/S, heparin kofaktör II) için de geçerlidir. Tiroid hormonları (T3, T4, rT3) sıklıkla normalin altındadır. Bu glikoproteinlerin seviyeleri zamanla artar ve sabitlenir CDG-Ia'da amniyotik sıvıda artmış  $\beta$ -hekzozaminidaz aktivitesi belirteç olarak kullanılabilir (42).

## 2.4.2. Diğer Glikozilasyon Bozuklukları

### Galaktozemi

Yenidoğan tarama analizlerinden galaktozemi taramasında Guthrie kağıdına alınan topuk kanı örneğinde galaktoz ve galaktoz-1-fosfat ve/veya galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) enzim aktivitesi analizi yapılır (43). Bu hastalıkların tanısında gecikme ağır sekillere ve ölüme yol açabileceğinden erken tanı çok önemlidir. Tedavi edilmemiş galaktozemili hastalarda transferrin İEO elektroforezinde patern değişikliği saptanmıştır (44, 45). Bu patern değişikliği ile birlikte zeka geriliği, hipergonadotropik hipogonadizm, karaciğer hastalıkları gibi benzer semptomlar CDG tip 1'e benzerlik göstermektedir (46). Bu durumun altında yatan mekanizma henüz çözülmemekle birlikte galaktozeminin; N-glikozilasyonun birçok basamağında defekt sonucu oluşan sekonder bir CDG olduğu düşünülmektedir (44). Bunun yanında hastalarda galaktozdan fakir diyetle beslenme sonucunda patern değişikliği de normale dönmektedir. CDG tip 1 hastaları ile galaktozemili hastaları birbirinden ayırt edebilmek için total karbohidrat eksik transferrin (CDT) düzeyleri yardımcı olabilmektedir. Galaktozemi hastalarında CDT düzeyleri CDG tip 1 hastalarına göre daha düşüktür (46).

### Sepsis

Sepsis ve septik şok yoğun bakım ünitelerinde %50 -30 görülme oranı ile önemli ölüm nedenleri arasında yer almaktadır (47). Sepsisin patofizyolojisinde inflamasyonun akut fazında birçok proteinin aşırı üretimi ve sekresyonu yer almaktadır (48). İnflamasyon demir metabolizması ile ilişkilidir. Bunun yanı sıra Tf negatif akut faz proteindir. Sepsisli hastaların eritrositlerinin, membran siyalik asit içeriklerinin azaldığı gösterilmiştir. Eritrosit membranındaki siyalik asit negatif yüklü olduğundan eritrositlerin birbirini itmesini sağlar ve agregasyonu engeller. Sepsisli hastalarda ise membran siyalik asit içeriğinin azalmasına bağlı eritrosit sedimentasyonunun arttığı, ve esneklik yeteneklerinin azaldığı gösterilmiştir (49). Sepsisli hastalarda kapiller zon elektroforez (CE) yöntemi ile bakılan CDT düzeylerinin artmış olduğu gösterilmiştir (17). Başka bir çalışmada ise sepsiste Tf'nin hızlı desiyalizasyonu gözlenmiştir. Bu durumun siyalik asidi parçalayan

enzim olan nöraminidaz aktivitesi ya da üretiminin artışı veya tetrasiyalo-Tf ile disiyalo-Tf'nin plazmaya salınım hızlarının farklı oluşuna bağlı olabileceği ileri sürülmüştür (17). Hastalığın patofizyolojisiyle olan bağlantılar ve yapılan çalışmalarla ortaya çıkan sonuçlar hastalığın takibinde bu parametrelerin değerli olduğunu göstermektedir.

### **Hereditör Fruktöz İntoleransı**

Hereditör fruktoz intoleransının (HFİ) rutin laboratuvar testleri ile yakalanması çok güçtür. HFİ için, Aldolaz B gen mutasyon taraması güvenilir bir tanı yöntemi olsa da duyarlılığının çok iyi olmaması, testin pahalı olması ve sadece bu mutasyonu taşıyanları saptayabilmesi eksik yönleridir (16). Kesin tanı için karaciğerde Aldolaz B enzim aktivitesinin ölçümü gerekir (49). Tedavi edilmemiş HFİ hastalarında yapılan çalışmalarda CDT düzeylerinin artmış olduğu ve tedavi ile bu seviyelerin düştüğü gösterilmiştir (16). Bu nedenle, HFİ tarama ve tanı analizlerine ek olarak ve hastalığın takibinde Tf izoform analizi umut vericidir.

### **Otoimmün Hastalıklar**

Akut ve kronik inflamatuvar birçok hastalıkta glikoproteinlerin glikozilasyonunda değişiklik olduğu gösterilmiştir (50). Romatoid artrit de kronik inflamasyonla seyreden bir durumdur. Bu inflamasyonun sorumlusu olarak da dolaşımdaki immünglobulin G (IgG) moleküllerinin bozulmuş glikozilasyonu teorisi üzerinde durulmaktadır. IgG'nin Fc bölgesi galaktozdan yoksun kalır ve GlcNAc ile sonlanır. Mannoza bağlayıcı protein (MBP), karaciğer hücreleri tarafından sentez edilerek dolaşıma salınan bir C-lektin olup mannoza, GlcNAc ve diğer bazı şekerleri bağlar. Dolayısıyla agalaktozil IgG moleküllerini de bağlayabilir ve bu moleküller daha sonra kompleman sistemini aktive ederek eklemlerin sinovyal membranlarındaki kronik inflamasyona katkıda bulunurlar (10). Romatoid artrit ve sistemik sklerozis hastalarının takibinde CRP ile %CDT'nin korele oldukları, hastalık aktivite değerlendirme sistemi DAS28 skoru ile %CDT'nin kuvvetli ilişkisi gözlenmiştir (51). Başka bir çalışmada ise erkeklerde yüksek CDT düzeylerinin, artmış romatoid artrit riski ile birliktelik gösterdiği kanıtlanmıştır (50). Daha önce yapılan çalışmalarda ise romatoid artritli hastalarda, yüksek sayıda siyalik asit içeren

Tf izoformlarının artışı ve buna bağlı CDT'nin düşüşü gösterilse de bunun nedeni açıklanamamıştır (52, 53).

### **Anoreksiya Nervoza**

Katabolik durumla seyreden hastalıklarda da protein glikozilasyonunun etkilendiğine dair çalışmalar mevcuttur. Katabolik durumlarda oluşan keton cisimlerinden biri asetoasetattır. Alkol metabolizma ürünü olan asetaldehite yapısal benzerliği nedeniyle asetoasetatın glikozil transferazları inhibe ederek bu hastalıklarda CDT artışına neden olduğu düşünülmektedir Farklı etiyojilere bağlı katabolik sürece girmiş hastalarda, serum CDT düzeylerinin yüksek olduğu ve CDT'nin bu hasta grubunda alkol alımını değerlendirmek için uygun bir belirteç olmadığı gösterilmiştir (54). Başka bir çalışmada da anoreksiyalı hastalarda CDT artışının hastalığın prognoz ve ciddiyetiyle ilişkili olabileceği gösterilmiştir (20). Başka bir çalışmada ise anoreksiya'da aslında CDT artışının olmadığı, bu hatalı yüksekliğin özgüllüğü ve duyarlılığı düşük yöntemlerle çalışmanın bir sonucu olduğu öne sürülmüştür (55).

### **Kanser**

Kanser hücrelerinin yüzeylerindeki glikoprotein ve diğer glikokonjugatların yapısındaki değişimlerin metastaz sürecinde rol oynadığı düşünülmektedir (10). Hepatoselüler kanserli hastalarda serum CDT düzeyinin alkolizm tanısı koyma gücünün düştüğü gösterilmiştir (56). Kanser hastalarında yapılan bir başka çalışmada trisiyalo-Tf'nin arttığı saptanmış ve bu artış trisiyalo-Tf ile birlikte göç eden olasılıkla sakkarit yapıda başka bir maddenin varlığına bağlanmıştır (57).

### **Kronik Alkol Kullanımı**

Kronik alkol kullanımı; haftada en az bir defa 50-80 g/gün alkol tüketimi olarak tanımlanan, psikiyatrik, nörolojik ve somatik birçok komplikasyonu olan patolojik bir bağımlılıktır. Alkolün fazla tüketilmesine bağlı olarak Tf izoformlarının CDT'yi oluşturacak şekilde arttığı gösterilmiştir (58). Bu artış ölçülü alkol alımında ılımlı düzeydeyken, aşırı alkol alımında çok yüksek seviyelere çıkabilir (59). Yoğun alkol kullanımı dönemlerinde Tf içindeki karbohidrat içeriği (siyalik asit, galaktoz,

N-asetilglukozamin) düşmektedir (19). Nedeni tam anlaşılamamakla birlikte alkol nedeniyle birçok glikoproteinin karaciğerdeki sentez, glikozilasyon, eliminasyon, yıkım gibi birçok metabolik sürecindeki etkilenmeye bağlı ortaya çıktığı düşünülmektedir. Etanol ve/veya onun metaboliti olan asetaldehitin, Golgide N-glikan zinciri sentezini ve enzim aktivitesi etkilediği, glikoziltransferaz enzimini inhibe ederek bu sürece aracılık ettiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir (60).

Son yıllarda, CDT alkol kullanımını gösteren önemli bir belirleyici olmuştur (19). Bunun nedeni  $\gamma$ -glutamilttransferaz, aspartat aminotransferaz (AST), glutamat dehidrogenaz gibi diğer belirteçlerin sadece belli bir organdaki hastalığı göstermeleri ve özgüllük/duyarlılıklarının düşük olmasıdır (58). CDT ise kronik alkol alımını değerlendirmede kullanılan en özgül laboratuvar belirteçidir (61). Ortalama yarı ömrü 14-17 gündür (62, 63). Numunelerin bakteriler veya virüslerle kontaminasyonu sonucu Tf'nin nöraminidaz enzimi ile yıkımı yanlış pozitif CDT yüksekliğine neden olmaktadır (64). CDT'nin diurnal varyasyonu oldukça azdır (65, 66).

Uluslararası klinik kimya federasyonu (IFCC) çalışma grubu tarafından CDT ölçümünde referans metod HPLC olarak belirlenmiştir (67-69). Demir yüklenmesi CDT duyarlılığını, eksikliği ise özgüllüğünü azaltabilmektedir. Hemakromatozis hastalarında demir birikimi nedeni ile CDT düzeyleri artmış olarak saptanmaktadır (70-72). CDT düzeyleri alkolik ve alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında farklılıklar göstermektedir. Primer biliyer siroz, kronik aktif hepatit, kriptojenik siroz, kronik persistan hepatit ve hemakromatozis gibi alkolik olmayan karaciğer hastalıklarında CDT düzeyleri yüksek saptanmaktadır (73). Tedavi edilmemiş galaktozemide, çölyak hastalarında, postmenapozal östrojen kullanımında ve hamilelikte de artmış CDT düzeyleri bildirilmiştir (16, 46, 74-77). Toplumda sık görülen hipertansiyon, astım, bronşit, diabetes mellitus, lipid metabolizma bozuklukları, anjina pectoris, depresyon ve gastrointestinal sistem hastalıklarına bağlı sıklıkla kullanılan ilaçların CDT düzeylerine etkisi olmadığı görülmüştür (78). Ayrıca premenepozal dönem ve bupropion kullanımı da CDT düzeylerinin artma nedenleri arasındadır. Bunun yanında anjiyotensin II reseptör blokerleri ve trisiklik antidepressanlar gibi ilaçlar düşük CDT düzeyleri ile ilişkili bulunmuştur (79). Bu durumlar göz önünde bulundurularak CDT ölçümü yapılması hastaların

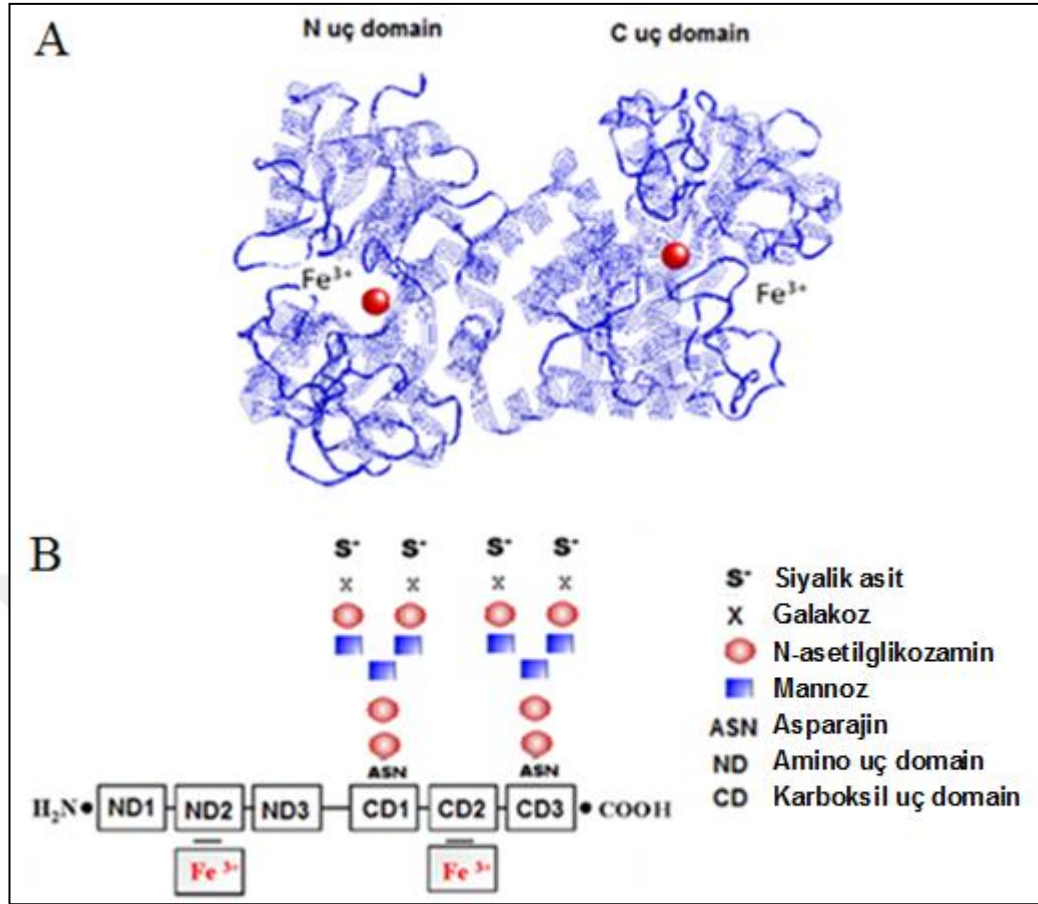
bağımlılıklarının saptanmasında yanlış pozitif veya negatif sonuçların önüne geçmeyi sağlar.

## **2.5. Glikozilasyonun Değerlendirmesinde Transferrin**

### **2.5.1. Transferrin Yapısı ve Özellikleri**

Transferrin (Tf) 79.6 kDa ağırlığında ve demir ( $Fe^{+3}$ ) için temel taşıyıcı moleküldür. Tf polipeptid zincirinin, iki N-glikan ve iki  $Fe^{+3}$  bağlama bölgesi olmak üzere üç ayrı yapısal bölümü vardır. Tek bir polipeptid zincir 679 aminoasitten oluşmaktadır. Her Tf molekülü biri N terminal diğeri ise C terminal bölümde olmak üzere 2 adet  $Fe^{3+}$  bağlama bölgesi bulundurur. İçerdiği yaklaşık %5.5 oranındaki karbohidrat yapıda iki adet N-bağlı kompleks glikan içermektedir (Şekil 2.4) (80-82). Bu yapı, farklı patolojik durumlarda belirgin değişkenlikler göstermektedir (80, 83)

Karaciğerde apo-transferrin (Apo-Tf) olarak sentezlenen glikoprotein iki adet demir iyonu bağlayınca Tf olarak adlandırılır. Yarı ömrü 8-10 gün olup, plazma düzeyleri vücutta bulunan demir ile düzenlenir. Dolaşımdaki Tf miktarı sağlıklı bireylerde 250-425 mg/dL arasında değişkenlik göstermektedir Tf'nin yaklaşık %30'u demir ile doygundur. Demir eksikliği olan bireylerde Tf'nin demir doygunluğu azalırken, hemakromatozis gibi vücutta demir fazlalığı görülen durumlarda Tf doygunluğu artmaktadır. Organizmanın demir yüküne göre; demir içermeyen Apo-Tf formunda veya bir ya da iki  $Fe^{3+}$  yüklü olarak bulunabilir. Tf'nin doygunluk durumuna göre molekülün her  $Fe^{+3}$  bağlamasıyla izoelektrik noktası 2.2 birim pH azalmaktadır (80).

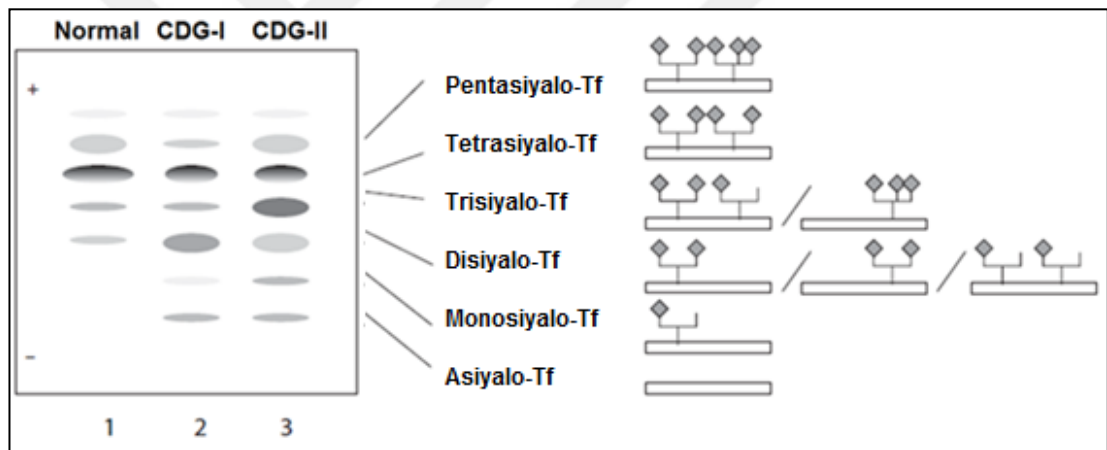


**Şekil 2.4.** Transferrin molekülü yapısı: A) Transferrin molekülünün amino (N) ve karboksil (C) uç domainleri ve içerdikleri Fe<sup>3+</sup>; B) Polipeptit zincir, iki bağımsız metal iyon bağlama bölgesi ve iki adet kompleks N-bağlı glikan zincirinden oluşan Tf şematik yapısı görülmektedir. Metal bağlama bölgelerinden biri N-terminalde, diğeri C-terminalde bulunur. [Kaynak (82, 84, 85)'dan değiştirilerek alınmıştır.]

Transferrin molekülü üzerinde N-glikan zincir değişik dallanmalar yapabilmektedir. Her uç bir adet siyalik asit molekülü ile sonlanır. Her bir N-glikan zincir ucunda birer siyalik asit bulunur. Demir bağlama bölgeleri Fe<sup>+3</sup> ile bağlandığında molekül net yükünü bu siyalik asit grupları belirler. Hiç N-glikan uç içermeyen asiyalo-Tf formundan, oktasiyalo-Tf forma kadar farklı Tf izoformları serumda değişen oranlarda bulunabilmektedir (Şekil 2.4). Transferrin molekülünün izoelektrik noktası (pI) her bir siyalik asit eklentisi ile yaklaşık 0.1 pH ünitesi azalır.(18, 80)

### 2.5.2. Transferrin İzofomları

Molekülün iki N-glikan zinciri farklı derecelerde dallanmalar yapabilmekte ve iki, üç veya dört dala ayrılabilen ve herbiri negatif yüklü siyalik asit molekülü ile sonlanabilmektedir (Şekil 2.5). Böylece Tf molekülünün farklı izoformları olan asiyalo, monosiyalo Tf'den oktasiyalo izoformuna kadar değişik formları görülebilmektedir. Tf molekülüne bağlı her siyalik asit parçası molekülün izoelektrik noktasını 0.1 pH birimi azaltmaktadır. Tf izoformlarının referans değerleri Tablo 2.2'de belirtildiği gibidir. Sağlıklı bireylerde asiyalo-, monosiyalo- ve oktasiyalo-Tf saptanmamaktadır.



Şekil 2.5 Normal transferrin paterni ve konjenital glikozilasyon bozukluğunda transferrin izoformları. Normal Tf üzerindeki oligosakkaritler en fazla tetrasiyalo-Tf olarak bulunur (1); CDG hastalarında bu normal patern değişmektedir: CDG-I'de disiyalo-Tf ve asiyalo-Tf artar (2), CDG-II'de asiyalo-, monosiyalo-, disiyalo- ve trisiyalo- Tf fraksiyonlarının tümünde artış görülür (3). Tf izoformlarının yapısal çizimleri sağda verilmiştir.(86)

İlk kez 1976 yılında Stibler ve Kjellin tarafından, alkol bağımlılarının önce BOS daha sonra serumlarında belirlenen glikan zincirlerinden bir veya ikisinin birden olmaması ile karakterize, izoelektrik noktaları 5.7'den büyük asiyalo-, monosiyalo- ve disiyalo Tf izoformlarının toplamına "karbohidrat eksik transferrin

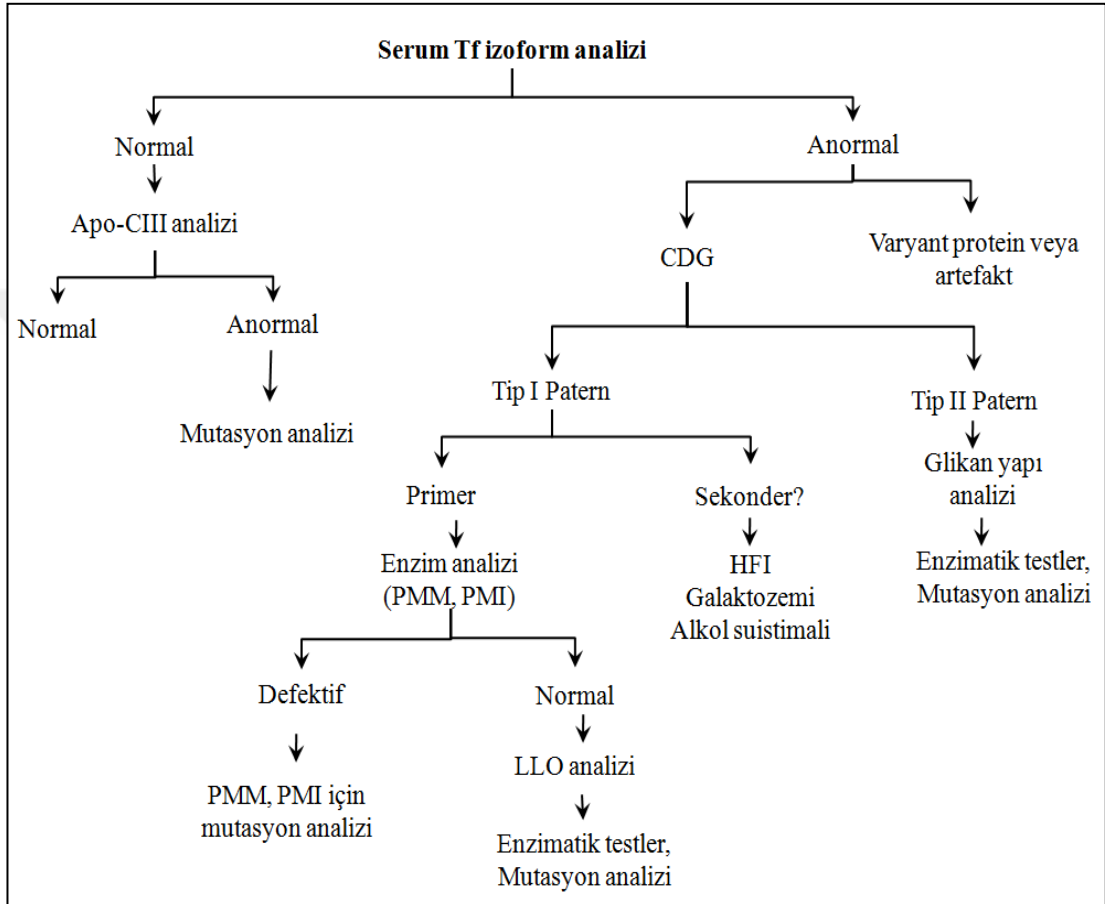
(CDT)" adı verilmiştir (58, 87, 88). CDT'nin fizyolojik rolü henüz tam bilinmemekle birlikte, hücre içi migrasyon ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. kronik alkol tüketimine bağlı olarak değişim gösterdiği bilinen karbohidrat (siyalik asit, galaktoz, N-asetilglukozamin) oranı düşük Tf izoformlarını göstermesi nedeni ile klinikte kullanımı yaygındır. Kronik alkol tüketimi yanı sıra CDT düzeyleri, cinsiyet, yaş, sigara kullanımı, obezite, serum demiri ve insülini gibi birçok faktörden normal sınırları aşmayan oranlarda etkilenebilmektedir (54).

### 2.5.3. Transferrin Varyantları

Transferrinin polipeptit zincirindeki aminoasitlerin değişimi ile en az 38 genetik varyant bilinmektedir. (83). Bunlardan sadece dördünün görülme sıklığı %1'dir. İçlerinde en önemlisi beyaz ırkta en çok görülen Tf-C (Caucasians) varyantı olan Tf-C1 olup, prevalansı % 95'tir. Günümüze kadar bu varyantın 16 alt-tipi tanımlanmıştır. Diğer varyantlar olan Tf-B ("busy") ve Tf-D varyantları Tf izoform analizlerinde hiposiyale Tf için interferansa neden olan varyantlardır. Non-CDT Tf-D ile CDT Tf-C'nin izoelektrik noktaları benzer olduğundan Tf-CD heterozigot olan bireylerde normal miktarlarda alkol tüketimine rağmen yanlış pozitif sonuçlar görülmektedir (58, 89). Tf-D varyantının izoelektrik noktasından dolayı Tf izoform analizinde hiposiyale-Tf izoformlarında yanlış sonuçlara neden olduğu bildirilmiştir. Ayrıca, Tf-B'nin, Tf-C izoelektrik noktasını etkileyerek elektroforetik mobilitesinin artmasına neden olduğu gösterilmiştir (4). Tf-CB heterozigot ve kronik alkol kullanımı olan bireylerde, Tf-C varyantının CDT olmayan izoformları ile Tf-B'nin CDT izoformları birlikte yanlış negatif sonuçlara neden olmaktadır. Bu nedenlerle, Tf izoform analizlerinde varyantlar göz önünde bulundurularak hatalı değerlendirmelerin önüne geçilmelidir. Kullanılan yöntemlerin bu varyantlardan etkilenme durumları iyi bilinmelidir.

### 2.5.4. Konjenital Glikozilasyon Bozukluklarının Tanısında Transferrin

CDG tanısında ilk aşamada genellikle elektroforez yöntemi kullanılarak Tf izoform analizi ile sağlıklı durum ile tip 1 ve tip 2 olmak üzere iki farklı elektroforetik patern birbirlerinden ayırdedilmeye çalışılır (Şekil 2.5).



Şekil 2.6. CDG tanısı için önerilen tanısal algoritma. PMM: Fosfomannoz mutaz; PMI: fosfomannoz izomeraz, LLO: lipid –bağlı oligosakkarit (90, 91).

CDG-I hastalarında görülen tip 1 patern, disiyalo- ve asiyalo-Tf bandlarının artışı, tetrasiyalo-Tf bandının düşüklüğü ile karakterizedir. CDG-II hastalarındagörülen tip 2 patern ise trisiyalo- ve monosiyalo-Tf bandlarının artışı ile karakterizedir (8, 92, 93). Bu tiplendirme ile defektin yeri hakkında da bilgi sahibi olunur. Tip 1 patern sitoplazmik ve ER kaynaklı, tip 2 patern ise Golgi kaynaklı hasarlarda görülür. Bu saptamalar ile tanısal planlamalar, enzim defektinin belirlenmesi tahmini ve ilişkili kompartmanların belirlenmesi kolaylık

kazanmaktadır. Elektroferez yöntemi ile yapılan bu analiz ile taranan bireylerde olası hastalık şüphesinde fibroblast veya lökosit kültürlerinde enzim aktivitesi araştırılmakta, CDG'nin alt tiplerinin tanısının konabilmesi için ise mutasyon analizleri gibi ileri tanı yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Şekil 2.6) (92). Günümüzde ileri teknoloji yeni jenerasyon sekanslama ve tandem kütle spektroskopisi yöntemleri ile tanı konulan hastaların sayısı artmaktadır. Kütle teknolojisi ile serumdan N-glikanlar izole edilebilir ve bu N-glikanlardan da defektif olanlar ayrıştırılarak gerçek biyokimyasal bozukluk hakkında bilgi sahibi olunup ve hastalık tiplendirilmesi yapılabilmektedir (25, 93-95)

## **2.6. Transferrin İzofomlarının Analiz Yöntemleri**

Stibler tarafından 1976 yılında CDT ilk kez tanımlandıktan sonra analiz amacıyla birçok yöntem bildirilmiştir. Günümüzde, Tf izofomlarının belirlenmesinde genellikle kromatografi veya elektroferez yöntemleri kullanılmaktadır. Gelişmekte olan teknoloji ile kütle spektroskopik analizler de kullanılmaya başlanmıştır. Elektroferez ve kromatografi yöntemleri yaygınlaşmadan önce immün yöntem ile Tf izofomlarına çok da spesifik olmayan antikorlar aracılığıyla analiz yapılabilmekte iken günümüzde bu teknolojilerin gelişmesiyle her bir izofomun spesifik bir şekilde belirlenmesi mümkün olmaktadır. izoelektrik odaklama ve kapiller elektroferez yöntemleri ile anyon değiştirici kromatografi bu amaçla başarılı şekilde kullanılabilir. Kromatografik yöntemlerle kıyaslandığında elektroforetik yöntemler daha yüksek özgüllüğe ve duyarlılığa sahiptirler (42). Bu yöntemlerin dışında daha duyarlı ve özgül bir yöntem olan kütle spektrometrinin farklı tipleri olan Matriks-Destekli Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometri (MALDI-MS), Yüzey-Zenginleştirilmiş Lazer Dezorbsiyon İyonizasyon Kütle Spektrometri (SELDI-MS) ve Elektrosprey İyonizasyon- Kütle Spektrometri (ESI-MS) de kullanılmaya başlanmıştır (42, 96).

### **2.6.1. İzoelektrik Odaklama Elektroferezi**

İzoelektrik odaklama (İEO) elektroferezi proteinler, enzimler ve peptidler gibi moleküllerin net yük ve üç boyutlu yapılarına göre birbirlerinden ayrıştırılmasında kullanılır. Proteinler, izoelektrik noktalarının altındaki pH'da

pozitif yüklenerken negatif yüklü elektroda (katoda) ve izoelektrik noktalarının üstündeki pH'larda ise proton kaybederek negatif yüklenerken pozitif yüklü elektroda (anoda) doğru göç eder (97). Proteinler İEO elektroforezinde, uygun pH gradiyenti içinde kendi izoelektrik noktalarına (pI) ulaşmaya kadar hareketlerini sürdürürler. İzoelektrik noktalarına geldiklerinde ise net yük sıfırlandığı için hareketleri durarak burada keskin birer bant oluştururlar. İki proteinin İEO elektroforezi ile ayrılabilmesi için izoelektrik noktaları arasında en az 0.02 pH ünitesi fark olması gerekir (98). İEO elektroforezinde, protein göçünü sağlayan temel koşul ortamın pH gradiyentidir; yüksek ayrışma ve keskin bantlar için dar bir pH aralığı olan ortam ve yüksek elektriksel alan gücünün olması gereklidir.

Tf izoformlarının analizinde ilk kullanılan yöntem İEO olup ilk defa 1978 yılında Stibler tarafından uygulanmıştır (87). Kantitasyon amacıyla immünelektroforez, immünfiksasyon, immünoelot gibi yöntemlerle kombinasyonları kullanılmıştır (89, 99-102). Halen Tf izoformlarının yüksek rezolüsyon ile analizi için değerli bir yöntemdir. Fakat oldukça uzun analiz süresi, deneyim gereksinimi nedenleri ile klinik laboratuvarlarda kullanılmak üzere alternatif analiz yöntemleri geliştirilmiştir.

### **2.6.2. Kapiller Elektroforez**

Kapiller elektroforez (CE), analitleri yük, elektroforetik hareket kabiliyeti, faz ayırımı ve moleküler boyut ve şekildeki farklılıklarına bağlı olarak elektrokinetik ayırım yapan bir tekniktir (103). Bu elektrokinetik ayırımı sağlayan kapillerler değişik uzunluklarda (genellikle 15-100 cm), çok küçük iç çaplı (yaklaşık 25-100  $\mu\text{m}$ ) ve UV ışınlarına geçirgen silika kuvarztan yapılmış iki ucu açık kılcal borulardır. Tipik bir sistem ince silika kapiller bir boru, iki elektrolit tampon haznesi, yüksek voltaj güç kaynağı ve veri değerlendirme birimiyle ilişkili bir dedektörden oluşmaktadır. Kapiller, elektrotları ve tamponu içeren iki cam hazne arasına yerleştirilmiş olup, kapiller tüpler jel ile dolduktan sonra pL-nL düzeyinde çok az miktardaki numune, kapillerin anodal ucuna yüklenir, yüksek voltaj (yaklaşık 25-30 kV, 1-150  $\mu\text{A}$ ) uygulanarak yaklaşık 200-500 V/cm doğru akım altında 1 dakikadan kısa sürede çok fazla sayıda fraksiyonun elde edilmesine olanak sağlar. Yüksek

voltajın uygulanması kapiller duvar boyunca verimli ısı değişimine izin veren yüksek yüzey/hacim oranıyla mümkün olmaktadır. Elektrik akımı aynı zamanda tüm solüsyonun hareketini de (elektro-endoozmoz) sağlar (104, 105) . Numuneler kapillerin anot ucuna yakın yerleştirilen sensörler ile kapiller üzerinden saptanırlar. Kapillerdeki elektro endo-ozmotik akış normalde tüm iyonları yüke bakmaksızın katoda taşıyacak kadar güçlüdür. Bu nedenle numune kapillere anodik uçtan verilir. Net hareket katoda doğru olduğundan ayırım anoda doğru geri migrasyon hızlarındaki farklılıklara dayanır. Numunedeki (+) iyonlar, elektro endo-ozmotik akış ve iyon hareketinin aynı yönde olması nedeniyle kapiller çıkışa daha erken gelirler. Numunedeki (-) iyonlar, aynı zamanda kapiller çıkışa hareket ederler, ama hızları daha yavaştır. Kapiller çıkışa doğru göç eden numuneler ışık absorpsiyonu, floresans, elektrokimyasal, radyometrik ve kütle spektrometrik dedektörlerle çok küçük madde miktarlarını bile saptayabilmektedir (106-108).

Transferrin izoformları analizinde, kapiller elektroforez ilk defa 1998 yılında kullanılmış (109) daha sonraları yöntem geliştirilerek kullanılmaya devam edilmiştir. Kapiller elektroforezin diğer yöntemlere üstünlükleri; kısa analitik zaman, yüksek ayırım gücü, düşük reaktif (sadece tampon) tüketimi ve mikrolitre düzeyinde numune hacimleri, otomatizasyona uyumu, dedektör kullanımında çeşitliliğe izin vermesi olarak sayılabilir (110, 111).

### **2.6.3. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi**

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere iki fazlı bir sistem aracılığıyla ayrıştırılması ve saflaştırılması yöntemidir. Kromatografik metodların bütün tiplerinde ana prensip; hareketli bir fazın, sabit bir faz içerisinden akması ve çözeltideki maddelerin sabit ve hareketli fazlara farklı ilgilerinden dolayı ayrışmasıdır. Hareketli fazın türüne ve özelliğine göre çeşitleri bulunmaktadır; gaz-sıvı (sabit faz sıvı) ve gaz-katı (sabit faz katı) olarak gaz kromatografisi; sıvı kromatografisi; adsorpsiyon kromatografisi (sıvı-katı), partitasyon kromatografisi (sıvı-sıvı), jel filtrasyon kromatografisi ve iyon değişimi kromatografisi (iyon çeşitine göre anyon ve katyon değişim kromatografisi) gibi.

İyon değişimi kromatografisi; çözeltideki iyonların, ters yüklü destek matriks iyonlarına olan ilgisine dayalı bir ayırım yapmaktadır. Durgun faz zayıf ya da kuvvetli, katyon ya da anyon değiştirici bir reçinedir. Reçinenin sabit yükü (-) ise buna “katyon değiştirici”, (+) ise de “anyon değiştirici” kromatografi adı verilir. Analiz sırasında reçinenin tamamen iyonlaşmış durumda olması gerekmektedir. Hareketli faz genellikle tamponlanmış, istenen iyonların oluşmasına neden olan belli bir pH değerinde sulu çözeltilidir ve yükü katının sabit yükünün tersi olan zıt iyonu içerir. Taşıdığı yükü, hareketli fazın zıt iyonları ile aynı olan iyonik yapıdaki örnek bileşenleri katıya bağlanmak için zıt iyonlarla yarışır, taşıdığı yüke bağlı olarak kuvvetle bağlanan bileşenler kolonda uzun süre kalırken, katıya zayıfça bağlanan, uygun yükte olmayan veya yüksüz olan bileşenler kolonu çabuk terk eder. Bu teknikte proteinler ya da amino asit karışımları belirli bir pH’da taşıdıkları yüke göre birbirlerinden ayrılırlar. Protein izolasyonunda kullanılan iyon değiştiriciler, matrikslerine dietilaminoetil (DEAE) ya da karboksimetil (CM) gruplarının eklenmesi ile elde edilir. DEAE tipi iyon değiştiriciler (+) yük taşırlar ve anyon değiştirici görevi görürler; CM-tipi iyon değiştiriciler, pH 4’ün üzerinde (-) yük taşırlar ve katyon değiştirici görevi görürler. Matriks yüküne karşıt yük taşıyan proteinler, elektrostatik etkileşimle matrikse bağlanır ve sonrasında elüsyon şartları değiştirilerek kolondan sökülürler. Elüsyon çeşidinden biri tuz yıkaması diğeri ise elüsyon pH’sının değiştirilmesidir.

Transferrin izoformlarının analizinde kromatografi tekniği ilk defa 1986 yılında anyon değiştirici kromatografi kolonu kullanılarak Stibler tarafından geliştirilmiştir (112). Daha sonraları kolonların değişimi ile yöntem geliştirilmiştir (113). Günümüzde bu yöntemi kullanan laboratuvarlar mevcuttur.

#### **2.6.4. Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometri**

Sıvı Kromatografi-Kütle/Kütle Spektrometri (LC-MS/MS) tekniğinde; fizikokimyasal özelliklerine göre ayrılan moleküller kütle dedektörü ile analiz edilmektedir. Moleküller normalde yüklü partiküller değillerdir ve kütle spektrometreleri iyonizasyon işlemi ile molekülleri uyararak yüklü iyonize moleküller haline dönüştürürler. Birinci quadropol filtrede kütle/yük (m/z) oranına göre ayrılan moleküller yüksek saflıkta özel bir gaz ile parçalanmaya tabi

tutulmaktadır. İkinci quadropol filtrede parçalanma sonucu oluşan iyonların üzerinden teşhis ve miktar tayini yapılmaktadır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip molekül sayısı doğada 1/10000 dür. Bu nedenle LC-MS/MS çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek kalmamaktadır. Küçük bileşiklerden büyük proteinlerin tayinine kadar, polar, iyonik, kararsız ve uçucu olmayan bileşiklerin analizleri gibi çok geniş bir kullanım alanına sahiptir. LC-MS ile çok hızlı bir sürede bileşimin molekül ağırlığı belirlenebilir. Proteinlerin glikozilasyonları hakkında yapısal bilgi edinmek amacıyla kütle spektrometrik analizler güvenilir bir yöntem olarak kullanılmaktadır (114, 115). MS ile Tf izoformlarının analizi intakt glikoproteinlerden veya proteinlerin enzimatik yıkımı sonucu açığa çıkan glikan veya glikopeptitler üzerinden gerçekleştirilebilir (116, 117). MS ile Tf glikoformlarını araştırmak yerine daha düşük moleküler ağırlıklı spesifik glikopeptid veya spesifik glikanları saptamak ise yeni bir yaklaşım olmuştur (118, 119). Fakat birçok araştırmacı Tf glikoformlarının parçalanma sonrası ortaya çıkan N-glikanları saptamak gerektiğini düşünmektedir. Ayrıca, glikanlar yerine glikopeptitlerin değerlendirilmesi hem oligosakkaritin yapısal kompozisyonu hakkında hem de glikozilasyon bölgeleri hakkında bilgi verir. Bazı araştırmacılar CDT glikoformlarını MALDI-TOF-MS ile araştırmıştır (120). Tipik vakum kaynağı kullanıldığında MALDI aracılığıyla glikan ve glikokonjugat analitleri labil glikozidik bağlarına ayrılmaktadır. Yüksek özgüllüğünden dolayı kullanım alanı giderek yaygınlaşarak klinik laboratuvarlarda rutin kullanımı giderek artmaktadır.

## **2.7. Transferrin İzofomlarının Analizinde Karşılaşılan Güçlükler**

Tıbbi laboratuvarlarda tüm numune analizlerinde olduğu gibi Tf izoform analizinde de hemoliz, lipemi ve yüksek bilirubin bulunması hatalı sonuçlara neden olabilmektedir. Her yöntem için validasyon veya verifikasyon çalışmaları yapılırken bu interferans nedenlerinin ölçüme olan etkileri araştırılmaktadır. Genel olarak, bu gibi numunelerin red edilmesi önerilmektedir. Fakat rutin işleyle özellikle Tf izoform analizi gibi özel çocuk hasta grubundan alınan numunelerin red edilmesi mümkün olmayabilmektedir. Kimi zaman tekrar alınması bazen mümkün

olmamaktadır. Bu durumda laboratuvarların interferans nedenlerinden ne düzeyde etkilendiği bilgisine sahip olmaları gerekmektedir. Biz de çalışmamızda bu üç çeşit interferansı içeren numunler hazırlayarak belli konsantrasyonlarının Tf izoform analizine olan etkilerini araştırdık.

Ayrıca, genel interferans nedenleri dışında monoklonal bant bulunmasının da Tf izoform analizine etkileşimlerinin olduğu bilinmektedir. Ancak farklı analitik sistemeler yönünden karşılaştırmalar bulunmamaktadır. Bu amaçla çalışmamızda farklı tip monoklonal pike sahip olan hastaların Tf izoform analizleri de çalışılmıştır.



### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışma Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında Mayıs 2015-Mayıs 2016 tarihleri arasında yapıldı. Çalışmada merkez laboratuvarımızda rutin analizlerde kullanılan 1. CE sistemi (Sebia 2 Capillarys™ Sebia, France) ile 2. CE sistemi (Helena Biosciences V8® E-class analizörü; Helena Biosciences Europe, UK) ve HPLC (CDT test kiti UV/VIS-FAST EUREKA reagent / Shimadzu Europe) sistemleri karşılaştırıldı.

#### 3.1. Araç ve Gereçler

Çalışmamızda kullanılan cihaz ve reaktifler Tablo 3.1.'de görülmektedir.

Tablo 3.1. Çalışmada kullanılan cihaz ve reaktifler.

Cihaz	Marka/Model/Katalog no	Üretici Firma
<b>HPLC</b>		
Reaktif	UV/VIS-FAST CDT test kiti	EUREKA ,Germany
Degasser	DGU 20A3R	Shimadzu, Europe
Pompa	LC 20AT	Shimadzu, Europe
Autosampler	SIL 20AHT	Shimadzu, Europe
Kolon Fırını	CTO 10ASVP	Shimadzu, Europe
UV Dedektör	SPD 20A	Shimadzu, Europe
Analitik Kolon	SAX X 500 (50x4,6mm-5µm)	Shimadzu, Europe
<b>1. CE Sistemi</b>		
Tampon solüsyonu	PN 2208	Sebia, France
Capillarys/minicap yıkama solüsyonu	PN 2052	Sebia, France
Capiclean solüsyonu	PN 2058,	Sebia, France
Kontrol serumu	PN 4795	Sebia, France
Tetravalent CDT / IS	PN 2054	Sebia, France
<b>2. CE Sistemi</b>		
CDT Auto Tamponu	803110	Europe, UK
CDT Auto Solüsyonu	803111	Europe, UK
CDT normal kontrol	803300	Europe, UK
<b>Diğer</b>		
Vorteks	Bisvorte V1	Japonya
Santrifüj	NF048	Türkiye
Santrifüj	5810R	Türkiye

### 3.2. Kullanılan Kimyasallar

Çalışmamızda kullanılan kimyasallar Tablo 3.2'de görülmektedir.

Tablo 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasallar.

<b>Kimyasal</b>	<b>Marka</b>	<b>Katalog no.</b>
Bilirübin	Merck	K16217120 109
Dimetil sulfoksit (DMSO)	Merck-Schuchard	802912
Distile su	M. D. C tıbbi ürünler kimya sanayi	R120135691
Nöraminidaz	Sigma	N6514 (tip II V.Cholera)
İzotonik NaCl	Polifarma	PS-1609032
İntralipid solüsyonu	Baxter (20% I.V. Fat Emulsion)	335893

### 3.3. Çalışmada Kullanılan Numuneler

Çalışmaya Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik kurul onayı alınmasından sonra başlandı (GO 15/262-08, Ek-1). Çalışmaya dahil edilen hastalardan erişkinlerin kendilerine, çocukların velilerine bilgilendirme formu okutularak bilgi verildikten sonra onam formu imzalatıldı (sırasıyla EK 2 ve 3). Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarlarında Mayıs 2015 - Mayıs 2016 tarihleri arasında konjenital glikozilasyon defektinin taranması amacı ile transferrin izoformlarının analizi için kabul edilen toplam 36 numune yöntem karşılaştırma çalışmasında kullanıldı. Venöz kan numuneleri, antekübital venden kırmızı kapaklı tüplere alınarak 22-24°C'de 2000xg'de 10 dk santrifüj edilerek elde edilen serum numuneleri 1,5 mL'lik eppendorf tüplere ayrıldı. Uygun şekilde porsiyonlanan numuneler çalışılincaya kadar -80°C'de muhafaza edildi.

Gün içi ve günler arası varyasyon çalışmaları ile hemoliz, lipemi ve bilirübinemi interferans numuneleri için serum havuzu oluşturuldu. Serum havuzu, Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarlarına rutin biyokimya analizi amacıyla gelen, lipemi, ikter veya hemoliz (LIH indeksi) değerlendirmeleri negatif olan, laboratuvarımızın red kriterlerini karşılayan ve biyokimyasal parametreleri

patolojik olmayan serum numunelerinden hazırlandı. Hemolizat hazırlanması amacıyla laboratuvara tam kan sayımı için gelen numuneler kullanıldı. Hazırlanan numuneler analize kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi. Monoklonal piklerin transferrin izoformlarının analizine olan interferansını incelemek amacıyla serum protein elektroforezi ve serum immün tiplendirme elektroforezlerinde monoklonal pik saptanan numuneler, porsiyonlara ayrılarak analiz süresine kadar  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de muhafaza edildi.

### **3.4. Numune Hazırlıkları**

CDG taraması amacıyla laboratuvara gelen hasta numuneleri ön hazırlık gerektirmeden CE ve HPLC yöntemleri ile analiz edildi.

#### **3.4.1. Nöraminidaz ile Transferin İzofomlarının Hazırlanması**

Yöntem karşılaştırma çalışmalarında kullanılmak üzere asiyalo- ve hiposiyalo- Tf izoformlarını elde edebilmek amacı ile nöraminidaz kullanıldı. Bu amaçla farklı mikroorganizmalardan izole edilen rekombinant nöraminidaz ekstraktları kullanılmaktadır (121). Bu çalışmada tip II-A *Vibrio cholerae*'dan izole edilen nöraminidaz (Sigma, Deisenhofen, Germany) kullanıldı. Nöraminidaz ile inkübe edilen numunelerde Tf'ne bağlı bulunan negatif yüklü siyalik asit birimleri uzaklaştırılarak tamamen asiyalo- Tf izoformu oluşmaktadır. Nöraminidaz (8-24 U/mg protein) ve numune 1:6 (v/v) oranında karıştırılıp bir gece etüvde  $37^{\circ}\text{C}$ 'de inkübe edildi. İnkübasyondan alınan numuneler  $2000\times\text{g}$ 'de 10 dk santrifüjlendikten sonra Tf izoform analizleri yapıldı.

#### **3.4.2. Hemoglobin İnterferens Çalışması İçin Numunelerin Hazırlanması**

Hemolizli numuneler "CLSI EP7-A2 Klinik Kimyada İnterferens Numunelerinin Hazırlanması Kılavuzu"nda (122) verilen ozmotik şok prosedürüne göre hazırlandı. Öncelikle, 500 mg/dL hemoglobin (Hb) bulunan stok Hb numunesi hazırlandı. Bu stok numune için 5 mL heparinli tam kan 10 dk  $2000\times\text{g}$ 'de santrifüj edildi. Süzüntü (plazma) alınıp yerine 10 mL izotonik NaCl solüsyonu eklenerek tüp yavaşça 10 defa alt üst edilerek karıştırılıp tekrar 10 dk  $2000\times\text{g}$ 'de santrifüjlendi. Santrifüj sonrası süzüntü atılarak yerine 10 mL izotonik NaCl solüsyonu eklenip aynı

işlem ikinci kez tekrarlandı. Ardından 10 dk 2000xg'de santrifüj yapıldı ve alınan süzüntü yerine deiyonize su eklenerek 10 kez alt üst edilerek karıştırıldı ve gece boyunca donduruldu. Ertesi gün dondurucudan çıkarılarak oda sıcaklığında çözünen numune 30 dk 2000xg'de santrifüjlendi. Süzüntü (hemolizat) hücre paketinden ayrıldı. Elde edilen hemolizattaki Hb konsantrasyonları tam kan sayımı analizörü Coulter LH 750 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ile ölçüldü. 0 mg/dL Hb içeren serum numunesi hazırlamak için aynı miktar seruma hemolizat yerine izotonik NaCl solüsyonu eklendi. Hb numunesi, 0 mg/dL Hb içeren serum ile seri dilüsyonlar yapılarak 125, 250, 375 ve 500 mg/dL Hb içeren numuneler hazırlandı (123). Hazırlanan numuneler çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.4.3. Lipemi İnterferens Çalışması İçin Numunelerin Hazırlanması**

Lipemik numuneler “CLSI EP7-A2 Klinik Kimyada İnterferans Numunelerinin Hazırlanması Kılavuzu” (122) modifikasyonu ile hazırlanmıştır. Serum havuzuna 3000 mg/dL trigliserid konsantrasyonunu sağlayacak hacimde parenteral intralipid solüsyonu eklendi. En düşük konsantrasyonda (100 mg/dL) trigliserid içeren numune ise aynı miktarda serum havuzuna intralipid solüsyonu yerine izotonik NaCl solüsyonu eklenerek elde edildi. Seri dilüsyonlarla diğer konsantrasyonlar oluşturuldu. Trigliserid konsantrasyonları biyokimya otoanalizörü AU 680 (Beckman Coulter, Fullerton, CA) ile ölçüldü. Lipemi interferansı için hazırlanan, 100, 750, 1500, 2250 ve 3000 mg/dL trigliserid içeren numuneler çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.4.4. Bilirübin İnterferens Çalışması İçin Numunelerin Hazırlanması**

Bilirübinli numuneler “CLSI EP7-A2 Klinik Kimyada İnterferans Numunelerinin Hazırlanması Kılavuzu” (122) prosedürüne göre hazırlandı. Stok bilirübin çözeltisi (10 mg/mL) hazırlamak için 20 mg unkonjuge bilirübin 2 mL dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözüldü. Stok çözeltiden 0,1 mL, 5 mL serum havuzuna eklenerek 20 mg/dL bilirübin içeren numune hazırlandı. Serum havuzuna 0,1 mL stok çözelti yerine aynı miktarda DMSO eklenerek 0 mg/dL bilirübin içeren numune hazırlandı. Seri dilüsyonlarla bilirübin konsantrasyonları 0, 6, 12, 17 ve 20 mg/dL olarak hazırlanan numuneler çalışma gününe kadar -80°C'de muhafaza edildi.

### **3.4.5. Monoklonal Pik İçeren Numuneler**

Monoklonal piklerin analize olan etkisini incelemek amacıyla beta bölgesinde monoklonal pik izlenen numuneler HPLC ve 1.CE sistemi ile çalışıldı.

#### **Monoklonal Pik İçeren Numunelerin Ön İşlemden Geçirilmesi**

Monoklonal bant izlenen hastalarda, Capillarys CDT (Sebia, France) kiti için elektroforetik patterni bozuk numunelerde kullanılmak üzere geliştirilen "Tetravalent CDT/IS" numune işleme solüsyonunun etkinliği değerlendirildi. Bu solüsyon ile muamele sonrası elektroforetik paternde düzelme olup olmadığı HPLC ve 1.CE sistemleri için incelendi. Monoklonal pik saptanan numunelerden 200 µL bir mikrotüpe alındı. Üzerine "Ttravelent/IS" solüsyonundan 50 µL eklendi ve 5 saniye boyunca vortekslendi. Daha sonra 10 dakika boyunca 600xg'de santrifüjlendi. Süzüntü başka bir tüpe alınarak analiz tekrarlandı. Bu şekilde monoklonal pik içeren serumlar önce doğrudan daha sonra da işlemden geçirildikten sonra elde edilen süzüntülerinden ikinci kez Tf izoform analizleri çalışıldı.

#### **3.4.6. Gün içi ve Günler Arası Varyasyon Numunelerinin Hazırlanması**

Oluşturulan serum havuzu gün içi ve günler arası varyasyon çalışmalarında 1., 2. CE ve HPLC sistemlerinde 5 gün süresince, her çalışma günü başında ve sonunda olmak üzere ikişer analiz edildi.

### **3.5. Transferrin İzofomlarının Analizi**

#### **3.5.1. HPLC Sistemi ile Analiz**

HPLC analizi yapılmak üzere, 3 mL serum kullanıldı. Reaktif B1-Çöktürme solüsyonu 1, 1 mL distile su eklenerek hazırlandı. Hemen ardından kontrol ve numuneler hazırlandı. Tablo 3. 3 'de açıklanan prosedür ile numuneler hazırlandı.

**Tablo 3.3.** HPLC sisteminde transferrin izoformlarının analizi için numune hazırlama prosedürü.

	<b>Kontrol Tüpü</b>	<b>Numune Tüpü</b>
<b>Kontrol serumu</b>	200 µL	-
<b>Hasta numunesi</b>	-	200 µL
<b>Reaktif A1</b>	25 µL	25 µL
<b>Reaktif A2</b>	25 µL	25 µL
10 dk vorteks		
<b>Reaktif B1</b>	25 µL	25 µL
<b>Reaktif B2</b>	25 µL	25 µL
20 dk vorteks		
+4°C'de 30 dk inkubasyon		
2000 x g 5 dk santrifügasyon		
<b>Süzüntüden yeni tüpe</b>	200 µL	200 µL
<b>Deiyonize H<sub>2</sub>O</b>	400 µL	400 µL
10 dk vorteks		

Spektrofotometrik dedektörde 460 nm'de elde edilen kromatogramdan herbir Tf izoformu eğri altında kalan alanın toplam alana "Yüzde Transferrin" olarak hesaplandı. Her çalışma başında üretici firmanın kontrol serumu çalışıldı.

**Tablo 3.4.** HPLC sisteminde transferrin izoformlarının analizinde uygulanan gradient protokolü.

<b>Zaman (dk)</b>	<b>% M1 (A Pompası)</b>	<b>% M2 (B Pompası)</b>	<b>Akış hızı (mL /dk)</b>
0,0	100	0	1,5
0,5	100	0	1,5
0,6	93	7	1,5
5,0	75	25	1,5
5,1	0	100	1,5
7,5	0	100	1,5
7,6	100	0	1,5
10,0	100	0	1,5

Hipersiyalo-Tf izoformları kromatogramda eğri altında kalan alana göre manuel olarak hesaplama yapıldı. HPLC sisteminde Transferrin izoformları için belirlenen normal değer aralıkları Tablo 3.5.'de görülmektedir.

**Tablo 3.5.** HPLC sisteminde Tf izoformlarının kromatogram zamanları ve belirlenen referans aralıkları (124)

<b>Tf İzofomu</b>	<b>Referans aralığı</b>	<b>Retansiyon zamanı (dk)</b>
<b>Asiyalo-Tf</b>	Değerlendirilemez	
<b>Monosiyalo-Tf</b>	Değerlendirilemez	
<b>Disiyalo-Tf</b>	%2-2.5	3.92
<b>Trisiyalo-Tf</b>	%4.5-9	4.34
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	%64-80	5.10
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	%12-18	5.80

### 3.5.2. CE Yöntemleri ile Analiz

#### 1. CE Sistemi

Çalışmamızda değerlendirdiğimiz 1. CE sistemi (MINICAP CDT kiti, Capillarys™, Sebia, France; Phoresis Rel. 7.4.7-Minicap N<sup>0</sup>1222 yazılımı) laboratuvarımızda rutin olarak transferrin izoformlarının analizinde kullanmakta olduğumuz kapiller elektroforez sistemidir.

Serum transferrin izoformları bu sistem ile siyalik asit içeriklerine göre ayrılmaktadır. Bu sistem ile hem kantitatif CDT (hiposiyale izoformlar olan asiyalo-Tf, monosiyalo-Tf ve disiyalo-Tf) analizi hem de CDG taraması amacıyla tüm izoformları aynı anda değerlendiren transferrin profilini elde etmek mümkündür. Bu teknikte, yüklü moleküller, elektroforetik hareketliliklerine göre alkali tampon içinde, pH ve elektro-endoozmotik akışa göre ayrılabilir. Sistem, eş zamanlı analize imkan veren, paralel olarak çalışan iki kapillere sahiptir.

Otomatize numune hazırlama ve analiz basamakları şu şekilde gerçekleştirilmektedir: Sistemde numune tüplerinden reaktif kaplarına numune dilüsyonu yapılır. Numune dilüsyon aşamasında aynı zamanda transferrinin demir saturasyonu da gerçekleşmektedir. Ardından, kapillerlerin anodik ucundan numune sisteme aspire edilir. Proteinlerin ayrımı 300 sn'de 8200 V yüksek voltaj altında gerçekleştirilmektedir. Tf izoformları nonspesifik olarak 200 nm'de absorban

izlenmesi ile saptanmaktadır. Kapillerler, her analiz sonrası yıkama solüsyonu ile yıkanarak bir sonraki analiz için hazırlanır. Bazik pH'da tampon (pH 8.8) kullanımı ile transferrin izoformları sırası ile asiyalo-, disiyalo-, trisiyalo-, tetrasiyalo- ve pentasiyalo-Tf izoformları olarak saptanır (125). Her çalışma başında üretici firmanın kontrol serumu çalışıldı.

Elde edilen elektroforetik paternde pentasiyalo-, tetrasiyalo-, trisiyalo- ve disiyalo-Tf izoformları otomatik olarak saptanırken; asiyalo- ve monosiyalo-, asiyalo- ve diğer hipersiyalo- formlar manuel olarak hesaplandı. Her bir Tf izoformu toplam Tf alanına göre "yüzde Tf" olarak hesaplandı.

## 2. CE sistemi

Helena Biosciences' V8® E-class analizörü (Helena Biosciences Europe, UK) ile "Platinum 4.1- an autostanding diagnostics" yazılımı kullanıldı. Test basamakları şu şekildedir: 100 µL CDT Auto tamponu ile kapiller doldurulur ve anodal tampon rezervi olarak kullanılır. 10 µL serum numunesi 90 µL CDT Auto solüsyonu ile seyreltilerek numune karışımı oluşturulur. Bu numune karışımının demir ile saturasyonu gerçekleştirildikten sonra slika kapilleri anodik uçundan aspirasyon ile elektroforetik olarak 10000 volt yüksek voltaj altında pH 8.45 alkali tamponda 20°C sıcaklıkta 1810 saniye yürütülür ve spektrofotometrik dedeksiyon 220 nm'de gerçekleştirilir. Elektroforetik ayırım 25 dk, diğer bütün işlem basamakları ile 40 dk içinde tamamlanır. Her çalışma başında üretici firmanın kontrol serumu çalışıldı (126).

2. CE sisteminden elde edilen elektroforetik paternde pentasiyalo- ve tetrasiyalo- Tf izoformları birlikte trisiyalo-, disiyalo- Tf izoformları ise ayrı ayrı otomatik olarak hesaplandı. Hiposiyalo- ve hipersiyalo-Tf izoformları manuel olarak saptandı. Her bir Tf izoformu toplam Tf alanına göre "yüzde Tf" olarak hesaplandı.

CDG taraması amacıyla Tf izoformları analizi için belirlenen normal değerler Tablo. 3.6'da verilmiştir (127). Fakat Tf izoform analizi alkol bağımlılığının izleminde CDT ölçümü amacıyla kullanıldığında ise sonuçları Tablo 3.7' de verilen değerlere göre yorumlanmalıdır.

**Tablo 3.6.** 2. CE sisteminde Tf izoformları analizi için belirlenen normal değerler

<b>Transferrin İzofomu</b>	<b>Beklenen aralık (%)</b>
<b>Heptasiyalo-Tf</b>	<1.5
<b>Hekzasiyalo-Tf</b>	1-3
<b>Pentasiyalo- Tf</b>	12-18
<b>Tetrasiyalo- Tf</b>	64-80
<b>Trisiyalo-Tf</b>	4.5-9
<b>Disiyalo-Tf</b>	<2.5
<b>Monosiyalo-Tf</b>	0

**Tablo 3.7.** 2. CE sisteminde CDT analizi için belirlenen değerler.

	<b>Beklenen aralık (% CDT)</b>
<b>Normal sonuç</b>	<1.3
<b>Belirsiz sonuç</b>	<1.6 ve >1.3
<b>Patolojik sonuç</b>	>1.6

### 3.6. Hesaplamalar ve İstatistiksel Analizler

Verilerin kaydedilmesi, analiz ve değerlendirilmesinde "Windows Excel 2007" ve istatistiksel değerlendirmeler için "SPSS 23.00 for windows" programlarından yararlanıldı. CE sistemleri ile elde edilen elektroforetik profillerde ve HPLC sistemi ile elde edilen kromatogramlarda herbir Tf izoformu eğri altında kalan alanın toplam alana oranı " Transferrin İzofom Yüzdesi" olarak hesaplandı.

### CDG tanısında hesaplama:

CDG tanısında bu şekilde yapılan hesaplamalar kullanılmaktadır:

$$\% \text{ Tf İzofomu} = \frac{\text{Her bir Tf izofomu için eğri altında kalan alan}}{\text{Tüm Tf izoformlarının toplam alanı}} \times 100$$

### CDT hesaplanması:

Alkol bağımlılarının takibinde kullanılan % CDT IFCC'ye göre toplam transferin miktarına göre raporlanmaktadır:

$$\% \text{ CDT} = \frac{\text{Asiyalo-Tf + Monosiyalo-Tf + Disiyalo-Tf toplam alanları}}{\text{Tüm Tf izoformlarının toplam alanı}} \times 100$$

### Korelasyon analizi:

Korelasyon analizi ile sayısal değişkenler arasındaki doğrusal ilişkinin yönü ve derecesi belirlenir. Elde edilen korelasyon katsayısı (-1) ile (+1) arasında bir değer alır. Pozitif değerler aynı yönlü doğrusal ilişkiyi; negatif değerler ise ters yönlü bir doğrusal ilişkiyi belirtir. Korelasyon değerleri için  $r = 0.00-0.24$  ise zayıf,  $r = 0.25-0.49$  ise orta,  $r = 0.50-0.74$  ise güçlü ve  $r = 0.75-1.00$  ise çok güçlü olarak değerlendirildi. Yöntem karşılaştırma çalışmaları "sınıf içi korelasyon analizi" (intraclass correlation coefficient; ICC) ile değerlendirildi. Bu analizde, standart sapmalara göre düzeltme yapılmakta ve tüm sistemlerin birlikte karşılaştırılması mümkün olabilmektedir (128).

Yöntem karşılaştırma verileri değerlendirilirken aynı zamanda Bland-Altman yöntemi de kullanıldı (129). Bland-Altman yöntemi, bias ve hatanın da incelenebilmesine olanak sağlaması nedeni ile tercih edildi. Bu değerlendirmelerde üç yöntemden elde edilen ölçüm sonuçlarının ortalamalarına karşı farkların saçılım grafiği çizildi. Gerçek değerler elde edilemediği için en iyi kestirim değeri olarak genel ortalamalar alındı. Bu grafiklerde farklar normal dağılıma sahip ise farkların sıfırın etrafında rastgele dağılım göstermesi ve %95'inin  $-1.96 \text{ SD}$  ve  $+1.96 \text{ SD}$  arasından dağılım göstermesi beklenmektedir. Bu grafiklerde dağılımların ortalama

etrafında saçılımına, konsatrasyona bağlı değişimlerine ve %95'inin -1.96 SD ve + 1,96 SD aralığında bulunmasına göre değerlendirmeler yapıldı.

### **%Değişim:**

İnterferens çalışmalarında, interferans yapıcı eklenmeden alınan Tf izoform yüzdesi hedef değer olarak belirlendi. Diğer interferans yapıcıların eklendiği numunelerden elde edilen sonuçlar aşağıda belirtilen formüle göre hesaplandı:

$$\% \text{ Değişim} = 100 - \left( \frac{\text{Hedef Değer} - \text{Bulunan Değer}}{\text{Hedef Değer}} \times 100 \right)$$

Yüzde değişimler (%Değişim) için sapma sınırı % 10 olarak alındı (CLIA 88 CDT için belirlenen optimum TAH sınırı). Transferrin izoform yüzde sonuçlarında  $\pm$  % 10' u aşan değişimler "*etkilenme var*" olarak kabul edildi.

### **Gün içi ve günler arası varyasyon alışması**

Her bir gün için elde edilen iki sonuç arasındaki varyansdan gün içi standart sapma (SD) ve varyasyon katsayısı (%CV) hesaplandı. Her bir gün için elde edilen sonuçların ortalamaları arasındaki varyans değerlerinden günler arası SD ve %CV hesaplandı. alışmalar sonucunda her sistem ve her Tf izoformu için ayrı ayrı hesaplamalar ile karşılaştırma yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Çalışma Gruplarının Demografik Özellikleri

#### 4.1.1. Rutin Hasta Grubunun Demografik Özellikleri

Hacettepe Merkez Laboratuvarına CDG taraması amacıyla gelen 36 hasta rutin analizlerde kullanılmakta olan 1.CE sistemi ile değerlendirildi. Bu hastalardan 23'ü erkek 13'ü kadın olup, bu yöntemle çalışılan 36 hastanın yaş ortalaması ise 14,1 yıl bulundu. 1.CE sistemi ile çalışılan hastaların 29'u 2.CE sistemi ile değerlendirildi. Bu hastalardan 19'u erkek 10'u kadın ve yaş ortalamaları 12,4 yıl olarak bulundu. 1.CE sistemi ile değerlendirilen hastalardan 35'i HPLC sistemi ile değerlendirildi. Bu hastalardan 22'si erkek 13'ü kadın ve yaş ortalaması da 13,0 yıl olarak bulundu (Tablo 4.1). Analiz sürecinde serum yetersizlikleri nedeni ile tüm numunelerin birebir tüm sistemler tarafından karşılaştırılmamış olmasına rağmen gruplar arasında demografik olarak anlamlı bir farklılık bulunmadı.

**Tablo 4.1.**Rutin hasta grubu demografi tablosu

	1. CE Sistemi	2. CE Sistemi	Hplc Sistemi
<b>Erkek</b>	23 (%64)	19 (%65)	22 (%63)
<b>Kadın</b>	13 (%36)	10(% 35)	13 (%37)
<b>Toplam</b>	36	29	35
<b>Yaş ortalaması (Yıl)</b>	14,4 (±19,69)	11,7 (±15,4)	13,3 (±18,7)

#### 4.1.2. Monoklonal Pik Saptanan Hasta Grubunun Demografik Özellikleri

Hacettepe Merkez Laboratuvarına serum protein elektroforezi ve immün tiplendirme elektroforezi için gelen ve monoklonal pik saptanan 39 hasta çalışmada karşılaştırılan sistemler ile transferrin izoformlarının analizi yönünden değerlendirildi. Monoklonal pik saptanan hastaların yaş ortalamaları (65,5 - 65,9 yıl) olarak bulundu (Tablo 4.2).

**Tablo 4.2.** Monoklonal Pik Saptanan Hasta Grubunun Demografik Özellikleri

	<b>1. CE Sistemi</b>	<b>2. CE Sistemi</b>	<b>HPLC Sistemi</b>
<b>Erkek</b>	26 (%67)	24(%67)	26(%67)
<b>Kadın</b>	13 (%33)	12(%33)	13(%33)
<b>Toplam</b>	39	36	39
<b>Yaş ortalaması (Yıl)</b>	65,5(±14,1)	65,9(±14,1)	65,5(±13,5)

#### 4.2. Rutin Hasta Karşılaştırması Bulguları

Transferrin izoformlarının analizi karşılaştırma çalışmasında, kapiller elektroforez sistemlerinden 1.CE ile 36 hasta, 2.CE sistemi ile 29 hasta ve HPLC sistemi ile de 35 hasta numunesi değerlendirildi (Tablo 4.1). Tf izoformu analizlerinde her bir Tf izoform yüzdesi sistemler arasında korelasyon analizi ile karşılaştırıldı. Sınıf içi korelasyon analizi yapılarak her üç sistemin birbiri ile tutarlılıkları karşılaştırıldı. Aynı zamanda sistemler ikişerli olarak birbirleri ile karşılaştırıldı (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Üç sistemin sınıf içi korelasyon analizi sonucunda yöntemler arasında uyum saptanmadı. Sistemlere ikişerli olarak sınıf içi korelasyon analizi uygulandığında ise en kabul edilebilir sonucun (korelasyon değeri 0,688) trisiyalo-Tf değerlendirmesinde 1.CE ve 2.CE sistemleri arasında olduğu, bunun dışında ikili karşılaştırmalarda sistemlerden elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olmadıkları saptandı.

**Tablo 4.3.** Üç sistemin Tf izoform analizindeki korelasyon değerlendirmeleri.

<b>Tf izoformu</b>	<b>Korelasyon değeri</b>	<b>P değeri</b>
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,036	0,361
<b>Trisiyalo-Tf</b>	0,087	0,212
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	0,077	0,238
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	-0,051	0,666

**Tablo 4.4.** Sistemlerin Tf izoformları analizinde ikişerli korelasyonu

	1.CE-HPLC		1.CE-2.CE		2.CE-HPLC	
	r	P	r	P	r	P
<b>Disiyalo- Tf</b>	0,233	0,087	-0,006	0,512	-0,013	0,526
<b>Trisiyalo- Tf</b>	-0,002	0,503	0,688	0,000	-0,046	0,593
<b>Tetrasiyalo- Tf</b>	0,054	0,378	-0,065	0,634	0,027	0,443
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	-0,186	0,859	0,117	0,267	-0,329	0,960

#### 4.2.1. Disiyalo-Tf İzofomlarının Karşılaştırılması

Hastaların her üç sistemden elde edilen disiyalo-Tf sonuçları Bland-Altman grafiğinde değerlendirildi (Şekil 4.1). Disiyalo-Tf düzeyleri için elde edilen sonuçların sistemler arasında uyumlu ve kabul edilebilir sınırlar içinde (<%10) olduğu izlendi.

#### 4.2.2. Trisiyalo-Tf İzofomlarının Karşılaştırılması

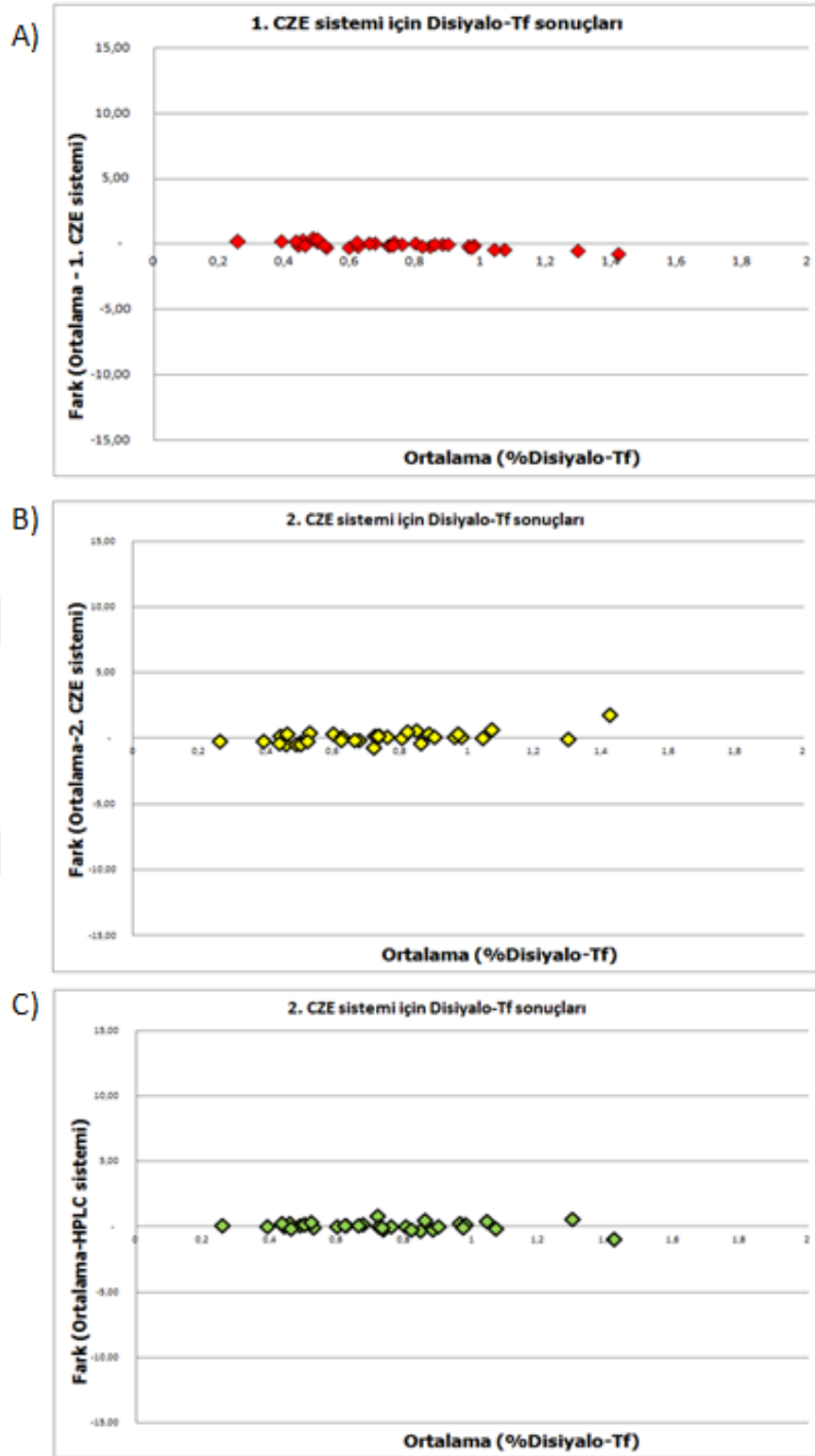
Hastaların her üç sistemden elde edilen trisiyalo-Tf sonuçları Bland-Altman grafiğinde değerlendirildi (Şekil 4.2). Trisiyalo-Tf seviyeleri için elde edilen sonuçların kabul edilebilir sınırlar içinde (<%10) olduğu izlendi. Ancak, 2. CE sisteminde artan konsantrasyonlarda negatif yönde ve HPLC sisteminde artan konsantrasyonlarda pozitif yönde bias olduğu saptandı.

#### 4.2.3. Tetrasiyalo-Tf İzofomlarının Karşılaştırılması

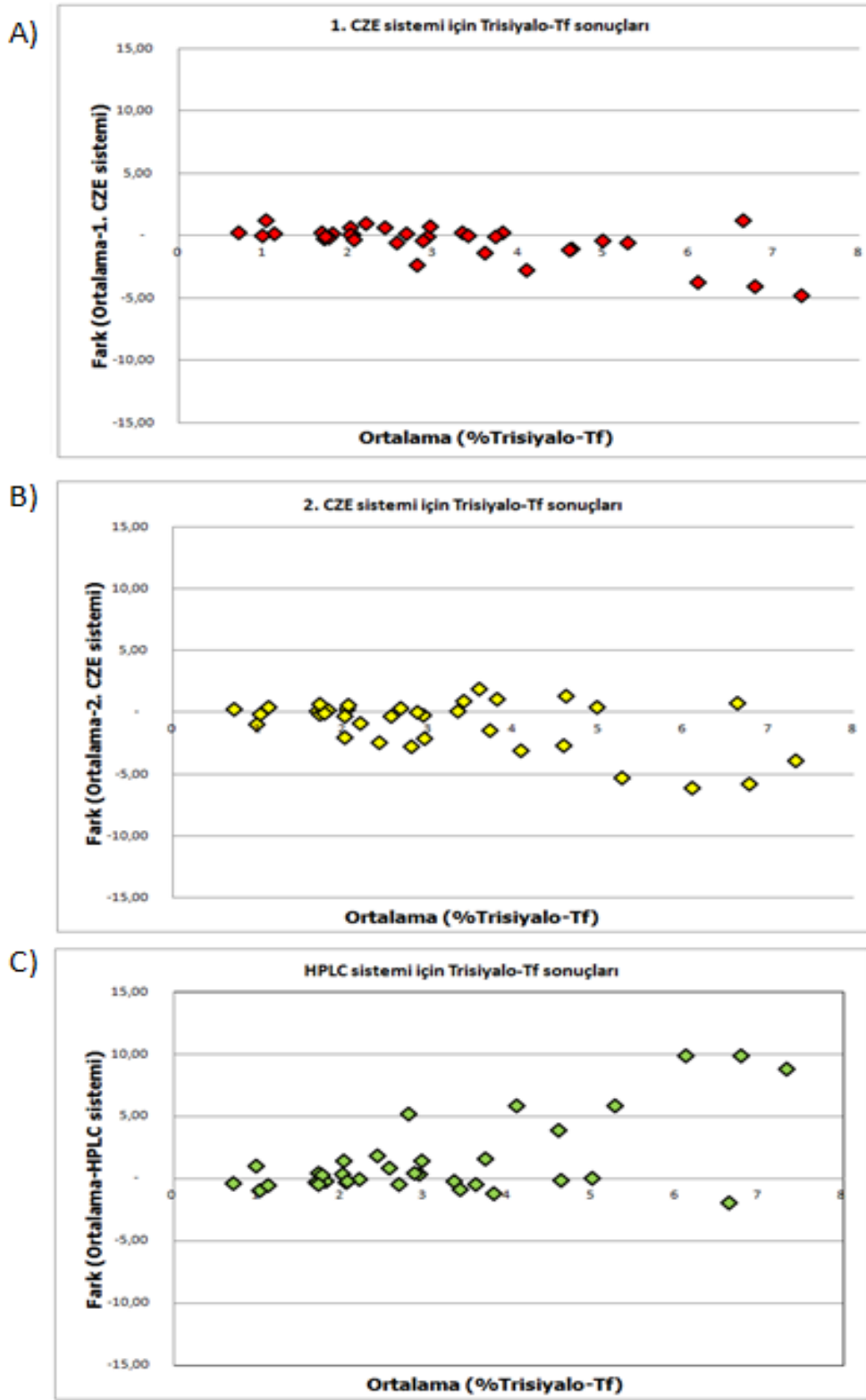
Hastaların tetrasiyalo-Tf yüzdeleri çalışılan sistemlerde Bland-Altman grafiğinde karşılaştırıldığında (Şekil 4.3'de) sistemler arasında farklılığın arttığı ancak kabul edilebilir sınırlar içinde (<%10) olduğu görüldü.

#### 4.2.4. Pentasiyalo-Tf İzofomlarının Karşılaştırılması

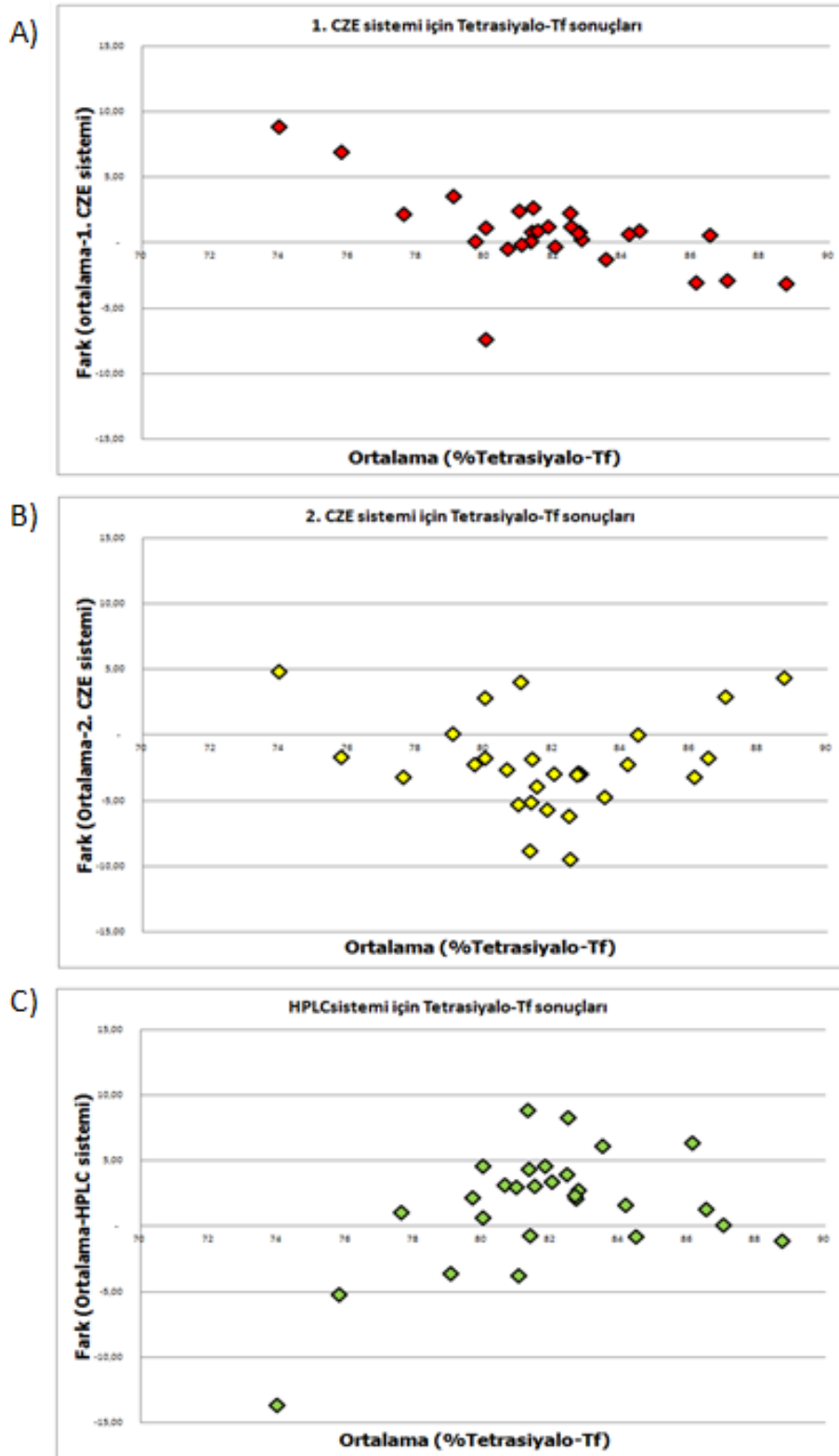
Hastaların pentasiyalo-Tf yüzdeleri çalışılan sisteme göre Bland-Altman istatistiksel analiz yöntemi ile karşılaştırıldığında sonuçlar Şekil 4.4'de görüldüğü gibi tetrasiyalo-Tf seviyeleri arasındaki uyumun bozulduğu saptandı.



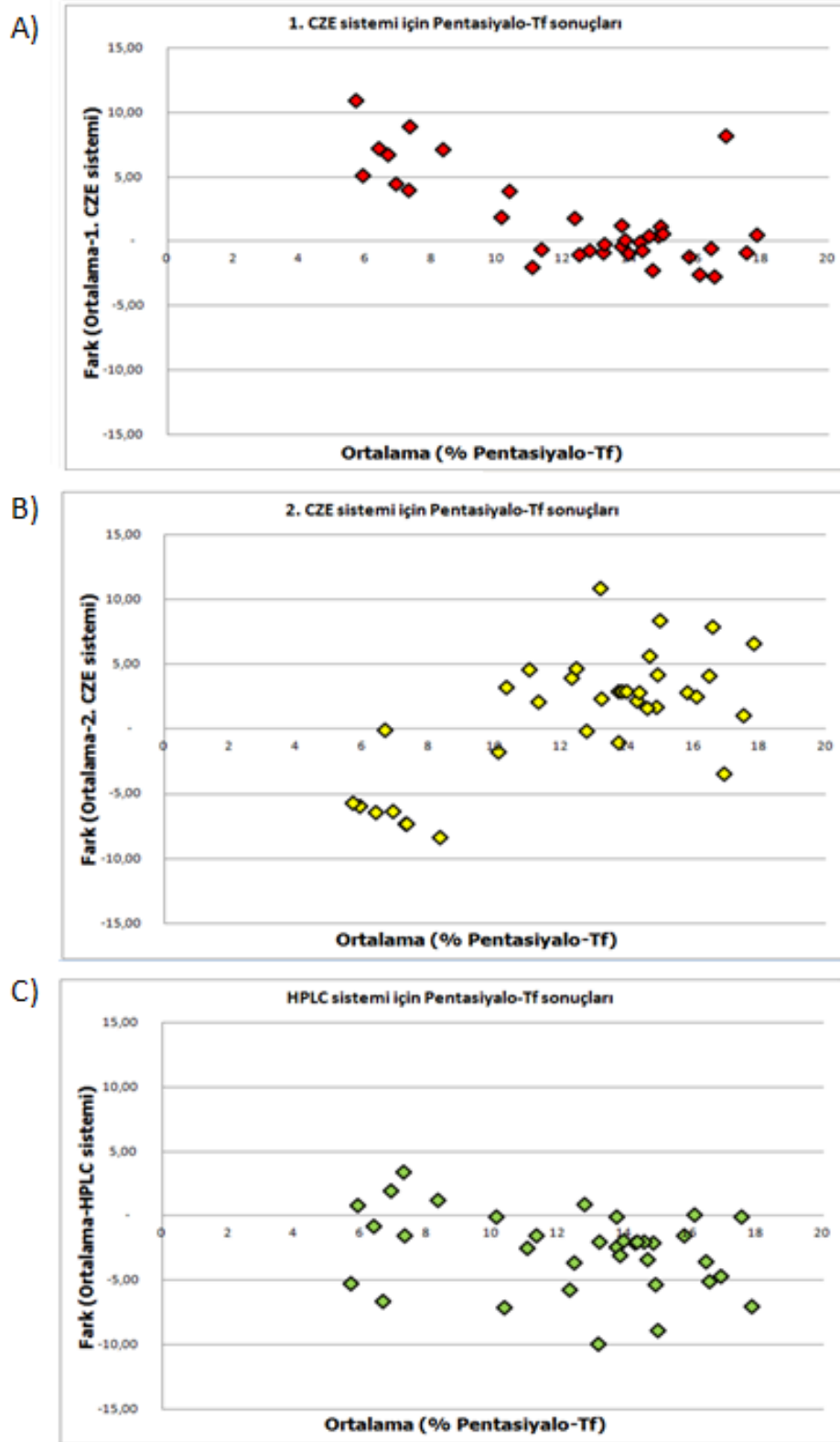
**Şekil 4.1.** Disiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi: A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile yapılan Bland-Altman karşılaştırma sonuçları.



**Şekil 4.2.** Trisiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi: A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile yapılan Bland-Altman karşılaştırma sonuçları.



**Şekil 4.3.** Tetrasiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi: A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile yapılan Bland-Altman karşılaştırma sonuçları.



**Şekil 4.4.** Pentasiyalo-Tf düzeylerinin Bland-Altman değerlendirmesi: A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile yapılan Bland-Altman karşılaştırma sonuçları.

### 4.3. Gün İçi ve Günler Arası Varyasyon Çalışma Bulguları

Her üç sistem için gün içi ve günler arası değişkenliğini saptamak amacıyla her dört izoformu ayrı ayrı değerlendirerek bulunan sonuçlar Tablo 4.5'te görülmektedir. Gün içi ve günler arası varyasyon çalışmasında disiyalo-Tf için her üç sistemde de %CV değerleri yüksek olarak saptandı. Transferrin izoform yüzdesi arttıkça bu değerlerin düştüğü izlendi. İzofomlar içinde tetrasiyalo-Tf için %CV değerleri tüm sistemlerde kabul edilebilir sınırlarda (<%5) bulundu. Ayrıca, her üç sistemin hem gün içi hem de günler arası varyasyon sonuçları genel olarak karşılaştırıldığında, en düşük % CV değerleri HPLC sisteminde disiyalo-Tf, 1.CE sistemi ile diğer izofomlarda saptandı.

**Tablo 4.5** Gün içi ve günler arası varyasyon çalışmasının sistemlere göre hesaplama tablosu

	Disiyalo-Tf	Trisiyalo-Tf	Tetrasiyalo-Tf	Pentasiyalo-Tf
<b>1.CE sistemi</b>				
<b>Ortalama</b>	0,53	2,96	78,02	18,49
<b>Gün içi % CV</b>	14,60	2,81	0,85	3,49
<b>Günler arası %CV</b>	23,57	11,86	3,72	17,46
<b>2.CE sistemi</b>				
<b>Ortalama</b>	0,62	2,35	76,35	20,68
<b>Gün içi % CV</b>	22,46	21,26	2,36	6,17
<b>Günler arası %CV</b>	21,55	14,57	1,61	6,4
<b>HPLC sistemi</b>				
<b>Ortalama</b>	0,63	5,13	85,14	9,11
<b>Gün içi % CV</b>	11,59	19,75	2,93	27,77
<b>Günler arası %CV</b>	12,90	51,22	5,28	24,09

### 4.4. İnterferans Çalışma Bulguları

İnterferans çalışmasında hemolizli, lipemik ve bilirübinli interferans numuneleri hazırlanarak sistemler performansları açısından karşılaştırıldı. CLIA 88'e göre CDT için önerilen %10 hata oranı üzerinde saptanan % değişimler etkilenme var olarak kabul edildi.

#### 4.4.1. Hemoglobin İnterferens Çalışması

Transferrin izoform analizlerinde hemolizin etkisini değerlendirmek için hazırlanan 0, 125, 250, 375 ve 500 mg/dL Hb içeren numuneler iki CE sistemi ve HPLC sistemi ile çalışıldı. Sonuçlar ve % değişimler Tablo 4.6 ve Şekil 4.5'te verildi.

**Tablo 4.6** Transferrin izoform analizlerinde Hb interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar.

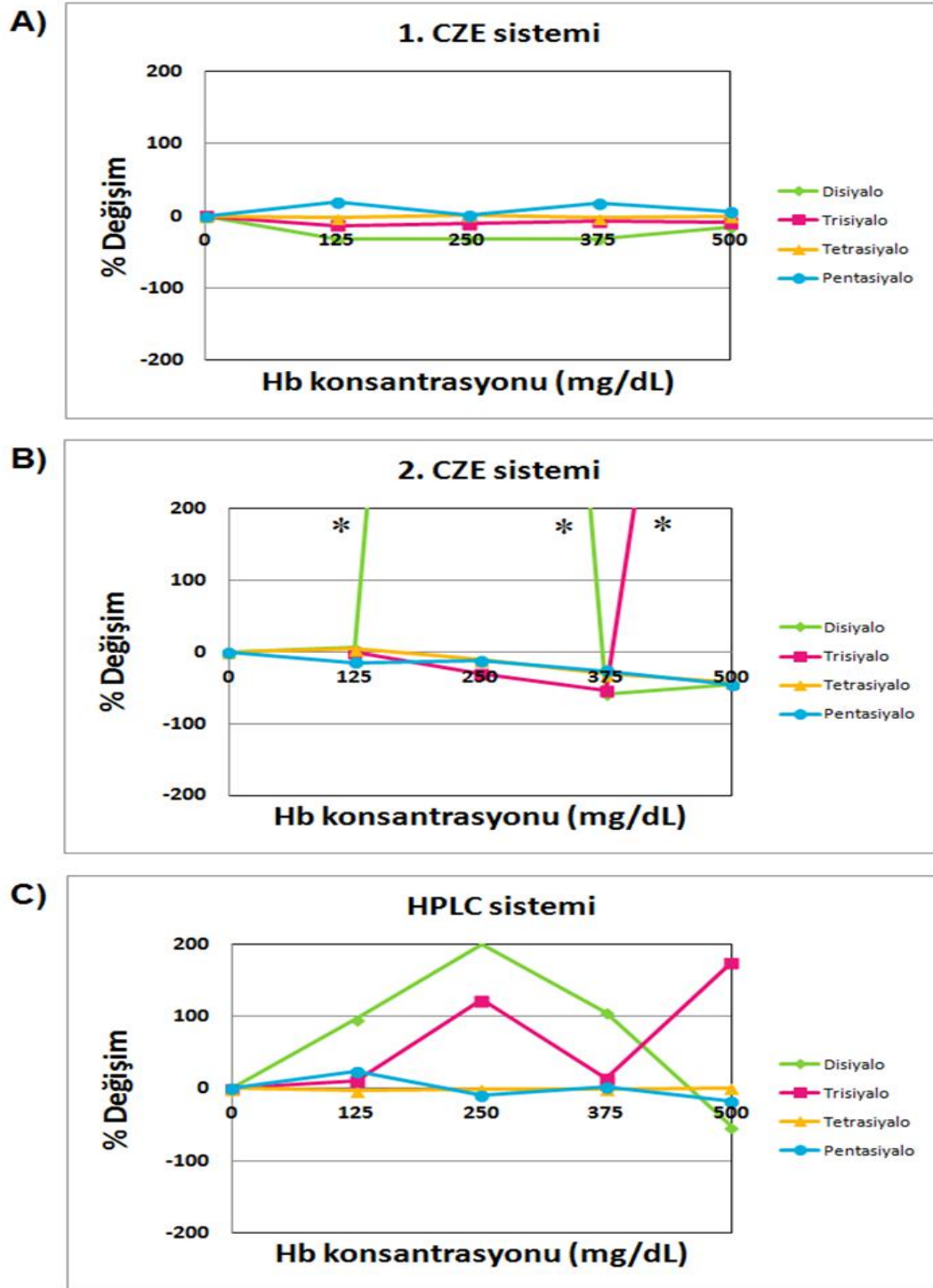
İnterferens Numunelerindeki Hemoglobin Konsantrasyonları (mg/dL)										
	0		125		250		375		500	
Sistemlerden alınan sonuçlar										
	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%
<b>1. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,65	0	0,44	-32	0,44	-32	0,44	-32	0,54	-16
<b>Trisiyalo-Tf</b>	3,66	0	3,18	-13	3,28	-10	3,39	-7	3,35	-8
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	79,8	0	77,4	-3	80,2	1	77,5	-3	79,1	-1
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	15,9	0	18,9	19	16,1	1	18,7	17	16,9	7
<b>2. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,62	0	0,65	6	12,97	2006	0,25	-59	0,34	-45
<b>Trisiyalo-Tf</b>	2,7	0	1,9	-30	1,2	-54	31,8	1083	44,7	15,7
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	77,3	0	80,9	5	68,9	-11	53,7	-31	44,37	-43
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	19,4	0	16,5	-15	16,9	-13	14,2	-26	10,5	-46
<b>HPLC Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,19	0	0,37	96	0,57	200	0,39	106	0,09	-53
<b>Trisiyalo-Tf</b>	0,70	0	0,77	11	1,56	123	0,80	14	1,92	175
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	88,2	00	85,51	-3	88,0	0	87,8	-1	89,1	1
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	10,8	00	13,34	23	9,9	-9	11,0	2	8,9	-17

Hemoliz çalışmasında 1.CE sisteminin özellikle disiyalo-Tf izoform değerlendirmelerinde 125 mg/dL gibi düşük düzeylerden başlayarak negatif yönde (%-16 ile %-32 arasında) belirgin olarak etkilendiği saptandı. Yine pentasiyalo-Tf değerlendirmelerinde de 125 mg/dL Hb için %19, 375 mg/dL Hb için % 17 ve 500

mg/dL Hb için %7 olmak üzere değişen oranlarda %Değişim saptandı. Disiyalo-Tf değerlendirmelerinde negatif yönde, pentasiyalo-Tf değerlendirmelerinde ise pozitif yönde sapmalar izlendi. Trisiyalo-Tf değerlendirmeleri minimal oranda (%-7 ile -13 arasında) negatif yönde etkilenme gösterdi. Tetrasiyalo-Tf analizlerinin ise genel olarak etkilenmediği (%-3 ile %3 arasında) saptandı.

HPLC sistemi ise, özellikle disiyalo-Tf için 125 mg/dL Hb ve trisiyalo-Tf değerlendirmelerinde 250 mg/dL Hb düzeylerinden itibaren belirgin oranlarda (%-53 ile %200 arasında değişen oranlarda) etkilenme gösterdi. Pentasiyalo-Tf değerlendirmeleri minimal oranda (%-17 ile %-23 arasında) her iki yönde etkilenme gösterdi. Tetrasiyalo-Tf analizlerinin ise etkilenmediği (%-3 ile %1 arasında) saptandı

2.CE sisteminde, disiyalo-Tf için 250 mg/dL düzeyinde %2006 yüksek pozitif etkilenme ve daha yüksek Hb düzeylerinde negatif yönde etkilenmeler izlendi. Yine trisiyalo-Tf için 375 mg/dL düzeyinde %1083 olmak üzere 125 mg/dL Hb düzeylerinden itibaren pozitif ve negatif yönlerde %Değişimler saptandı. Tetrasiyalo-Tf için 375 mg/dL'den itibaren anlamlı oranlarda negatif yönde (%-31 ve %-43) etkilenme saptandı. Pentasiyalo-Tf değerlendirmelerinde 125 mg/dL'den itibaren belirgin olarak negatif yönde (%-15 ile %-46 arasında) etkilenme izlendi.



**Şekil 4.5.** Transferrin izoform analizlerinde Hb interferansının değerlendirilmesi. A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile Hb interferans çalışması için hazırlanan 0, 125, 250, 375 ve 500 mg/dL Hb içeren numunelerin % Değişimleri. (\* 2. CE sisteminde 250 mg/dL Hb içeren numunede Disiyalo-Tf için 2006, 375 mg/dL Hb İçeren numunede Trisiyalo-Tf için 1083 ve 500 mg/dL Hb içeren numunede 1565 % değişim saptandı.)

#### 4.4.2. Lipemi İnterferens Çalışması

Transferrin izoform analizlerinde lipemi interferansı çalışması için hazırlanan 100, 750, 1500, 2250 ve 3000 mg/dL trigliserid içeren numuneler iki CE Sistemi ve HPLC sistemi ile çalışıldı. Sonuçlar ve % değişimler Tablo 4.7 ve Şekil 4.6'da verildi.

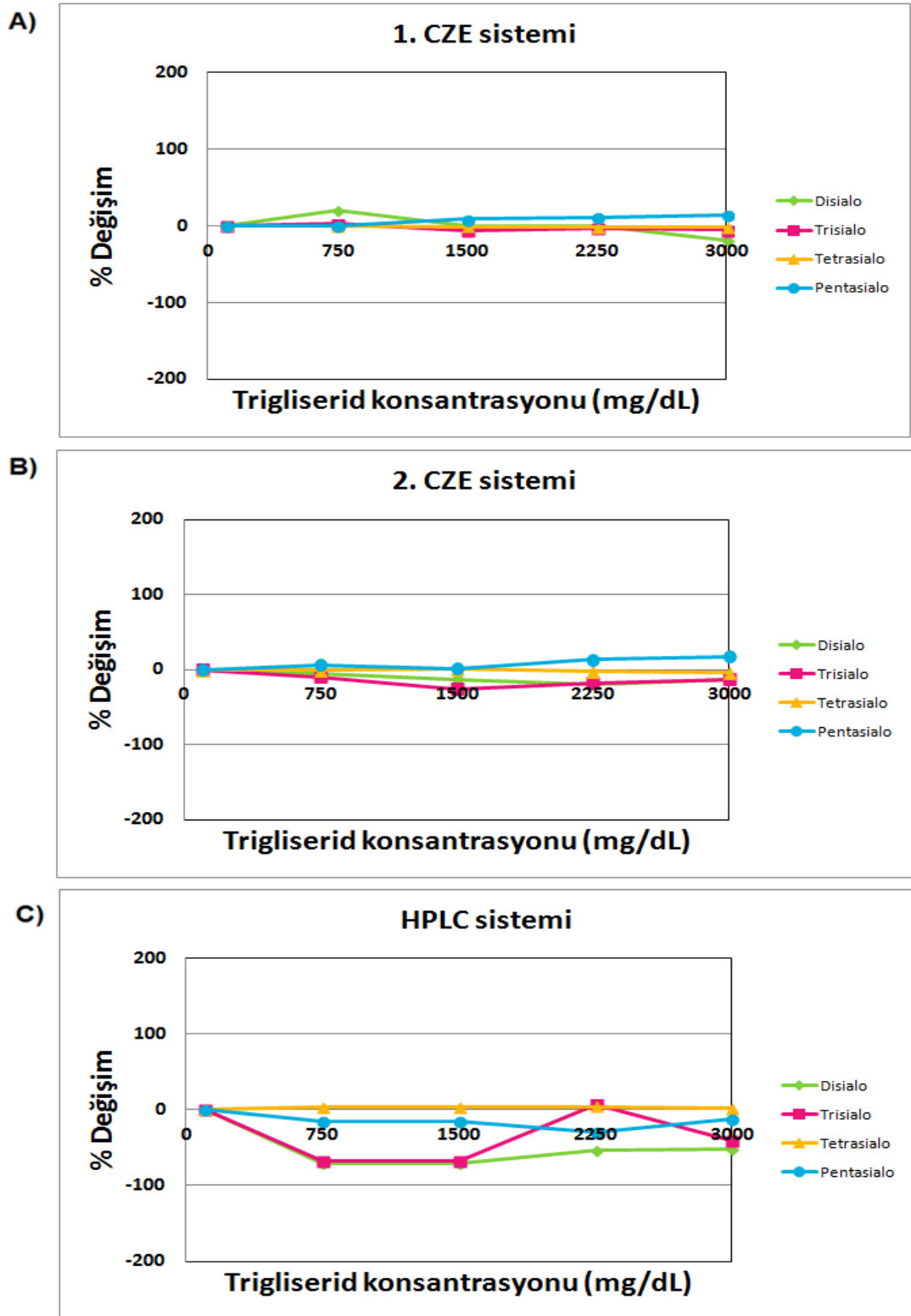
**Tablo 4.7** Transferrin izoform analizlerinde lipemi interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar.

İnterferens Numunelerindeki Trigliserid Konsantrasyonları (mg/dL)										
	100		750		1500		2250		3000	
Sistemlerden alınan sonuçlar										
	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%	Sonuç	%
<b>1. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,53	0	0,64	20	0,53	0	0,53	0	0,43	0
<b>Trisiyalo-Tf</b>	3,4	0	3,5	3	3,2	-6	3,3	-3	3,2	-5
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	79,9	0	79,6	0	78,7	-1	78,2	-2	77,9	-2
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	16,2	0	16,3	0	17,6	9	17,9	11	18,4	14
<b>2. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,84	0	0,80	-5	0,73	-13	0,68	-19	0,73	-13
<b>Trisiyalo-Tf</b>	3,1	0	2,8	-10	2,3	-26	2,6	-18	2,7	-13
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	78,7	0	78,1	-1	79,4	1	77,2	-2	76,2	-3
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	17,3	0	18,3	6	17,6	1	19,6	13	20,4	17
<b>HPLC Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,71	0	0,21	-70	0,21	-70	0,33	-53	0,34	-52
<b>Trisiyalo-Tf</b>	1,1	0	0,4	-68	0,4	-68	1,2	7	0,7	-41
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	86,2	0	89,3	4	89,3	4	90,1	4	88,5	3
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	11,9	0	10,2	-15	10,2	-15	8,42	-30	10,51	-12

Lipemi interferans çalışmasında 1.CE sisteminin disiyalo-Tf için sadece 750 mg/dL trigliserid düzeyinde pozitif yönde (%20) ve pentasiyalo-Tf için 3000 mg/dL trigliserid düzeyinde pozitif yönde (%14) etkilendiği saptandı. Bu etkilenmeler dışında genel olarak 1. CE sisteminin lipemiden etkilenmediği saptandı.

2.CE sisteminde ise lipid interferansından tetrasiyalo-Tf izoform değerlendirmelerinin etkilenmediği izlendi. Bu sistem için etkilenmeler 1500 mg/dL düzeyinden itibaren görüldü. Bu etkilenmeler %Değişim olarak, disiyalo- ve trisiyalo-Tf için negatif yönde; pentasiyalo-Tf için pozitif yönde izlendi. 1500 mg/dL trigliserid düzeyinde disiyalo- ve trisiyalo-Tf'deki %Değişimler %-13 ve %-26 iken pentasiyalo-Tf izoformunda bu konsantrasyondaki lipid interferansından etkilenmediği görüldü. Daha yüksek konsantrasyonlar olan 2250 ve 3000 mg/dL trigliseridin disiyalo- ve trisiyalo-Tf'ni benzer oranlarda (sırasıyla %-19/-18 ile %-13) etkilediği saptandı. Pentasiyalo-Tf izoformunda 2250 ve 3000 mg/dL trigliserid düzeylerinde pozitif yönde minimal (sırasıyla %13 ve %17) olarak izlendi.

HPLC sistemi ise, tetrasiyalo-Tf dışındaki izoformların lipid interferansından negatif yönde belirgin şekilde etkilendiği, tetrasiyalo-Tf izoformunun ise etkilenmediği saptandı. Disiyalo-, trisiyalo- ve pentasiyalo-Tf için 750 ve 1500 mg/dL trigliserid konsantrasyonlarında %Değişimler sırasıyla %-70, %-68 ve %-15 olarak hesaplandı. 2250 mg/dL trigliserid düzeylerinde trisiyalo- ve pentasiyalo-Tf izoformları için %-53 ve %-30 etkilenme görüldü. 3000 mg/dL trigliserid düzeyleri için disiyalo-, trisiyalo- ve pentasiyalo-Tf izoformları için %-52, -41 ve %-12 %Değişim izlendi.



Şekil 4.6 Transferrin izoform analizlerinde lipemi interferansının değerlendirilmesi. A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile lipemi interferans çalışması için hazırlanan 100, 750, 1500, 2250 ve 3000 mg/dL trigliserid

içeren numunelerin % Değişimleri. (\* 2. CE sisteminde Disiyalo-Tf %3905 ve Trisiyalo-Tf %2079 değişim saptandı.)

#### 4.4.3. Bilirubin İnterferens Çalışması

Bilirubin interferans çalışması için hazırlanan 0, 6, 12, 17 ve 20 mg/dL bilirubin içeren numuneler iki CE sistemi ve HPLC sistemi ile çalışıldı. Sonuçlar ve % Değişimler Tablo 4.8 ve Şekil 4.7'de verildi.

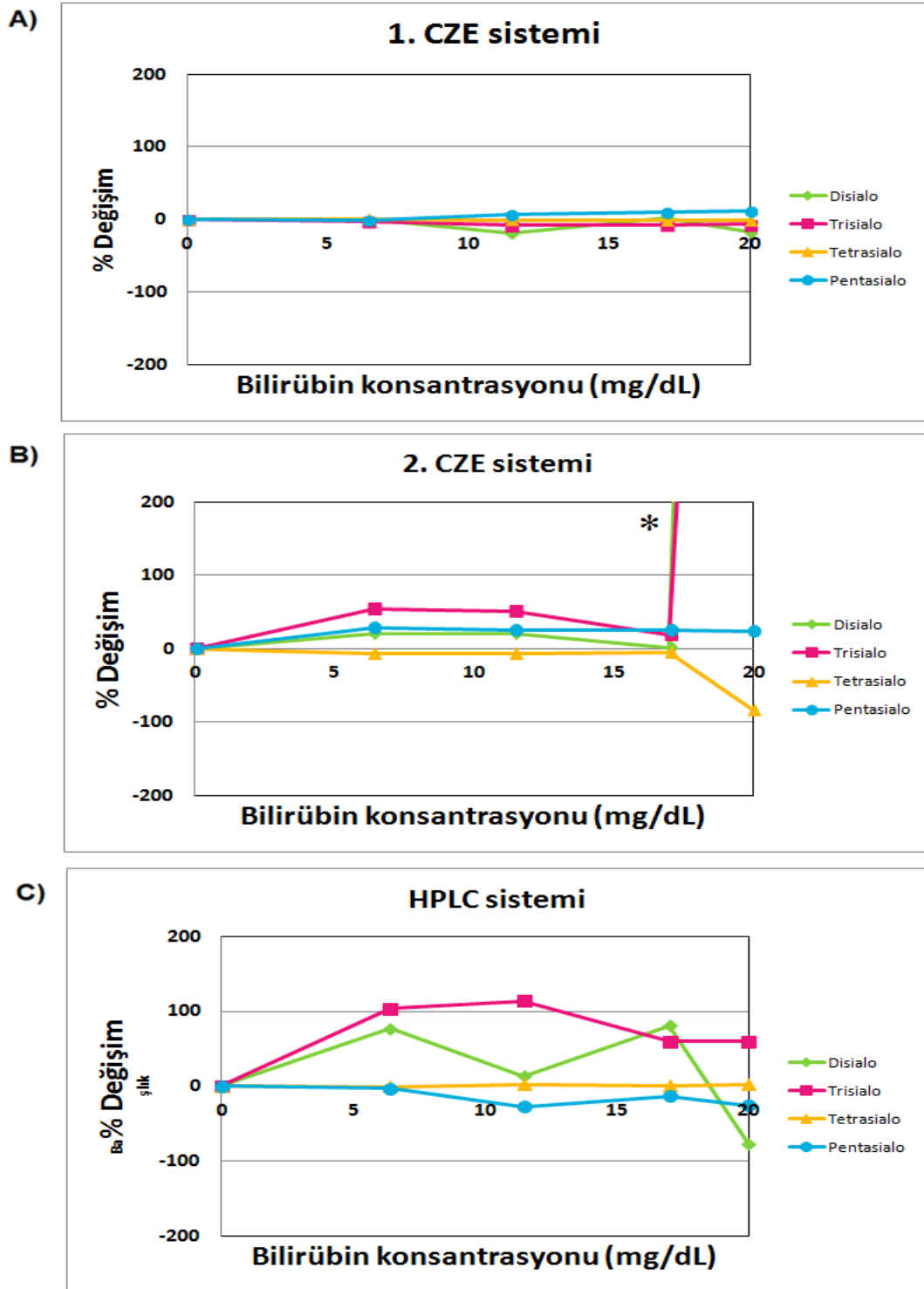
**Tablo 4.8** Transferrin izoform analizlerinde bilirubin interferansı için hazırlanan numunelerden alınan sonuçlar.

<b>İnterferens Numunelerindeki Bilirubin Konsantrasyonları</b>										
<b>(mg/dL)</b>										
<b>0</b>		<b>6</b>		<b>12</b>		<b>17</b>		<b>20</b>		
<b>Sistemlerden alınan sonuçlar</b>										
<b>Sonuç</b>	<b>%</b>	<b>Sonuç</b>	<b>%</b>	<b>Sonuç</b>	<b>%</b>	<b>Sonuç</b>	<b>%</b>	<b>Sonuç</b>	<b>%</b>	
<b>1. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,5	0	0,5	0	0,4	-19	0,5	2	0,4	-18
<b>Trisiyalo-Tf</b>	3,4	0	3,3	-3	3,1	-8	3,2	-7	3,2	-7
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	79,1	0	78,2	0	78,2	-1	77,5	-2	77,5	-2
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	17,0	0	16,9	0	18,3	8	18,8	10	18,9	11
<b>2. CE Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,7	0	0,8	21	0,8	20	0,7	1	26,9	3805
<b>Trisiyalo-Tf</b>	1,9	0	2,9	54	2,9	51	2,3	19	39,7	1979
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	81,6	0	75,9	-7	76,5	-6	77,3	-5	14,0	-83
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	15,8	0	20,3	29	19,8	26	19,7	25	19,4	23
<b>HPLC Sistemi</b>										
<b>Disiyalo-Tf</b>	0,22	0	0,39	77	0,25	13	0,40	81	0,05	22,6
<b>Trisiyalo-Tf</b>	0,48	0	0,98	103	1,03	114	0,77	60	0,77	60
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	89,18	0	88,77	0	91,35	2	90,01	1	91,66	3
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	10,12	3	9,85	-3	7,37	-27	8,82	-13	7,52	-26

Bilirubin interferans çalışmasında 1.CE sistemi ile analiz sonuçlarında sadece disiyalo-Tf'de negatif yönde ve pentasiyalo-Tf'de ise pozitif yönde minimal düzeyde etkilenmeler olduğu saptandı. Disiyalo-Tf'nin 12 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin düzeylerinden negatif yönde sırasıyla %-19 ve %-18 olarak etkilendiği, Öte yandan pentasiyalo-Tf'in sadece 20 mg/dL bilirubin için ihmal edilebilir düzeyde %Değişimi (%11) izlendi. Genel olarak 1. CE sisteminin 12 mg/dL bilirubin düzeylerine kadar hiç etkilenmediği sonucuna varıldı.

2.CE sisteminde bilirubin interferansı disiyalo-Tf için etkilenmeler pozitif yönde 6 mg/dL, 12 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin için sırasıyla %21, %20 ve %3805 %Değişim saptandı. Trisiyalo-Tf için 6 mg/dL 12 mg/dL, 17 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin konsantrasyonlarında sırasıyla %54, %51, %19 ve %1979 düzeylerinde pozitif yönde %Değişimler izlendi. Tetraiyalo-Tf izoformu sadece 20 mg/dL bilirubin düzeyinde %-83 oranında negatif yönde%Değişim gösterdi. Pentasiyalo-Tf'deki %Değişimler 6 mg/dL, 12 mg/dL, 17 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin konsantrasyonları için sırasıyla %29, %26 %25 ve %23 olarak pozitif yönde bulundu. 2. CE sistemi ile Tf izoform analizinde bilirubin için genel olarak pozitif yönde (20 mg/dL için tetraiyalo-Tf %-83 hariç) %Değişimler izlendi. Özellikle 20 mg/dL bilirubin düzeyinin tüm izoformlarda çok belirgin şekilde etkilenmeye neden olduğu saptandı.

HPLC sisteminde ise, tetraiyalo-Tf dışındaki izoformların bilirubin interferansından belirgin şekilde etkilendiği, tetraiyalo-Tf izoformunun ise etkilenmediği (%2-3 oranlarında pozitif yönde minimal) izlendi. Disiyalo-Tf 6 mg/dL, 12 mg/dL, 17 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin konsantrasyonları için sırasıyla %77, %13, %81 ve %22,6 oranında pozitif yönde %Değişim gösterdi. Trisiyalo-Tf 6 mg/dL, 12 mg/dL, 17 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin konsantrasyonları için sırasıyla %103, %114, %60 ve %60 %Değişim gösterdi. Pentasiyalo-Tf izoformu ise 12 mg/dL, 17 mg/dL ve 20 mg/dL bilirubin konsantrasyonlarından sırasıyla %-27, %-13 ve %-26 oranlarında negatif olarak etkilenme gösterdi. Bu değerlendirmeler içerisinde trisiyalo-Tf izoformunun bilirubin interferansının her konsantrasyonundan belirgin etkilendiği görüldü.



**Şekil 4.7** Transferrin izoform analizlerinde bilirubin interferansının değerlendirilmesi. A) 1. CE sistemi B) 2. CE Sistemi ve C) HPLC sistemi ile bilirubin interferans çalışması için hazırlanan 0, 6, 12, 17 ve 20 mg/dL bilirubin içeren numunelerin % değişimleri.

#### 4.4.4. Monoklonal Pik İnterferens Çalışması

Monoklonal piklerin Tf izoform analizinde CE ve HPLC yöntemleri üzerinde interfere edici etkisi olup olmadığı değerlendirildi. Pik paterninin bozuk olup değerlendirme yapmanın olanaksız olduğu analizler "*etkilenme var*" olarak değerlendirildi. 1.CE sistemi ile toplam 29 hasta numunesi değerlendirildi. Bunlardan %62'sinde etkilenme saptanırken %38'inde etkilenme saptanmadı. HPLC sisteminde 29 hasta numunesi değerlendirildi bunlardan %21'inde etkilenme saptanırken %79'unda etkilenme saptanmadı. 2.CE sistemi ile 26 hasta numunesi değerlendirildi bunlardan %73'ünde etkilenme saptanırken %27'sinde etkilenme saptanmadı (Tablo 4.9).

**Tablo 4.9.** Monoklonal pik interferans çalışması sonuçları.

	Etkilenme Var		Etkilenme Yok		Toplam
	Sayı	%	Sayı	%	
<b>1. CE Sistemi</b>	18	62	11	38	29
<b>2. CE Sistemi</b>	19	73	7	27	26
<b>HPLC Sistemi</b>	6	21	23	79	29

Monoklonal pik interferans çalışması serum protein elektroforezinde beta-1 ve beta-2 bölgesinde monoklonal pik saptanan numuneler ile gerçekleştirildi. Çalışılan numunelerin monoklonal pik bölgelerine (beta-1 ve beta-2 bölgelerine göre 2 gruba ayrıldı) ve türlerine göre Tf izoform analizlerine olan etkileri Tablo 4.10 de görülmektedir. Buna göre 1. CE sistemi ile beta-1 bölgesinde iki IgA-lambda ve iki IgM-kappa monoklonal pikleri olan numunelerin Tf izoform analizlerini etkilediği, bir serbest lambda (F-L) pikinin ise analize etkisi olmadığı görüldü. 1. CE sistemi ile beta-2 bölgesinde monoklonal pikleri olan hastalar değerlendirildiğinde; 3 IgG-kappa ve 3 IgG-lambda pikinin analizi etkilemediği, 11 IgA-kappa numunesinden 8'inin analizi olumsuz etkileği 3'ünün ise etkilemediği, 5 IgA-lambdadan 4'ünün Tf izoform analizini etkilediği birinin ise etkilemediği saptandı. Aynı bölge monoklonal piki olan birer IgM-K ve IgD-L numunelerinin ise analizi olumsuz olarak etkilediği saptandı.

**Tablo 4.10.** Monoklonal pik interferans çalışmasında pik türü, lokalizasyonu sistemleri etkileme durumu

	n	1.CE		2. CE		HPLC	
		+	-	+	-	+	-
<b>Beta-1</b>							
<b>IgA -L</b>	2	2	-	1	*	1	1
<b>IgM-K</b>	2	2	-	2	-	1	1
<b>F-L</b>	1	-	1	-	1	1	-
<b>Beta-2</b>							
<b>IgG-K</b>	3	-	3	1	2	1	2
<b>IgG-L</b>	3	-	3	3	-	1	2
<b>IgA-K</b>	11	8	3	7	2**	1	10
<b>IgA-L</b>	5	4	1	4	1	-	5
<b>IgM-K</b>	1	1	-	-	1	-	1
<b>IgD-L</b>	1	1	-	1	-	-	1
<b>Toplam</b>	<b>29</b>	<b>18</b>	<b>11</b>	<b>19</b>	<b>7</b>	<b>6</b>	<b>23</b>

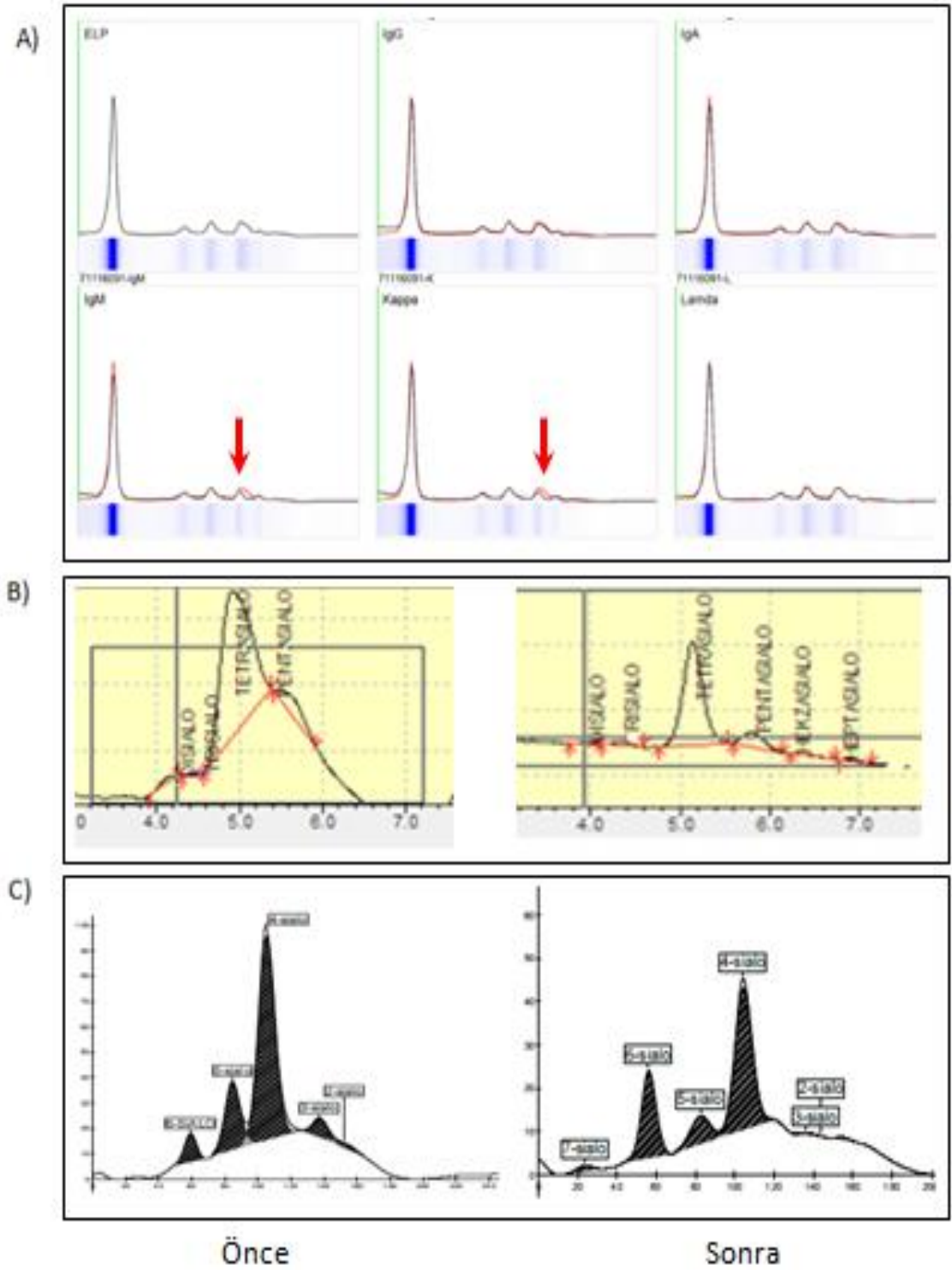
(\* Bir hasta çalışılmadı, \*\* İki hasta çalışılmadı, +, etkilenme var; -, etkilenme yok, Ig; immünglobulin, K; kappa hafif zincir, L;lambda hafif zincir )

2. CE ile yapılan analiz sonuçları incelendiğinde beta-1 bölgesindeki bir IgA-lambda ve iki IgM-kappa monoklonal pikleri olan numunelerin Tf izoform analizlerini olumsuz etkilediği, bir serbest lambda (F-L) pikinin ise analize etkisi olmadığı izlendi. Beta- 2 bölgesindeki monoklonal piklerden 3 IgG-kappanın birinin analizi olumsuz diğer ikisinin ise etkilemediği, 3 IgG-lambda pikinin üçünün de analizi etkilediği, 9 IgA-kappa numunesinden 7'sinin analizi olumsuz etkileği 2'sinin ise etkilemediği, 5 IgA-lambda'dan 4'ünün Tf izoform analizini etkilerken birinin ise etkilemediği saptanmıştır. Aynı bölge monoklonal piki olan bir IgM-kappa numunesi ile yapılan analizin etkisinin olmadığı ve IgD-lambda ise analizi olumsuz olarak etkilediği görüldü.

HPLC sistemi değerlendirildiğinde ise beta-1 bölgesindeki iki IgA-lambda ve iki IgM-kappa monoklonal pik numunelerinden biri analizi etkilerken, diğerinin etkilemediği görüldü. Serbest lambda (F-L) pikinin ise analize etkisinin olduğu görüldü. Beta-2 bölgesinde monoklonal pikleri olan hastalar değerlendirildiğinde; 3 IgG-kappa ve 3 IgG-lambda piklerinin birer tanesinin analize olumsuz etki ettiği diğer ikisinin ise etkilerinin olmadığı görüldü. 11 IgA-kappa numunesinden sadece birinde etkilenme izlendi. IgA-lambda için sadece beta-1 bölgesindeki bir numunede etkilenme izlendi. IgM-kappa ve IgD-lambda numunelerinin ise bu sistem ile Tf izoformları analizi üzerine etkilerinin olmadığı görüldü.

1.CE sisteminde Tf izoform analizinde pik değerlendirmesini olanaksız kılan monoklonal pik varlığı veya şüphesinde üretici firma tarafından "Tetravelent/IS" numune işleme solüsyonu ile muamuele sonra yeniden analiz önerilmektedir. Geliştirilen bu solüsyon insan immünglobülin ağır ve hafif zincir antiserumu içermektedir. Bu işlem ile monoklonal bantların immün eksiltme yöntemi ile uzaklaştırılması hedeflenmektedir. Çalışmamızda Tf izoformları analizleri etkilenen numuneler numuneler bu işlem sonrası 1.CE ve HPLC sistemleri ile tekrar değerlendirilerek Tf-patnlerinde düzelme olup olmadığı incelendi. 1. CE sisteminde etkilenme saptanan 18 hastadan 7'sine bu solüsyon ile muamele sonrası hiçbirinde düzelme saptanmazken, HPLC sisteminde etkilenme olan 6 hastadan 4'ünün pik paterninde düzelme saptandı ( iki numune hacim yetersizliği nedeniyle çalışılmadı).

Çalışmaya dahil edilen monoklonal gammopati hastasının (N.A.) serum protein elektroforezinde beta-1 bölgesinde izlenen pik daha sonra yapılan serum immüntiplendirme elektroforezinde monoklonal Ig M-kappa olarak saptandı. Bu hasta numunesinin 1. CE sistemi ile analizinde elektroforez zemininde interferans olduğu saptandı. Numune işlem sonrası tekrar analiz edildiğinde 1.CE sisteminde bu interferansın kısmen giderildiği saptandı. HPLC ile işlem öncesinde pik paterni bozuk olmasına rağmen işlem sonrası belirgin düzelme saptandı (Şekil 4.8)



**Şekil 4.8.** 1. Monoklonal gammopati hastası (N.A.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve C) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.

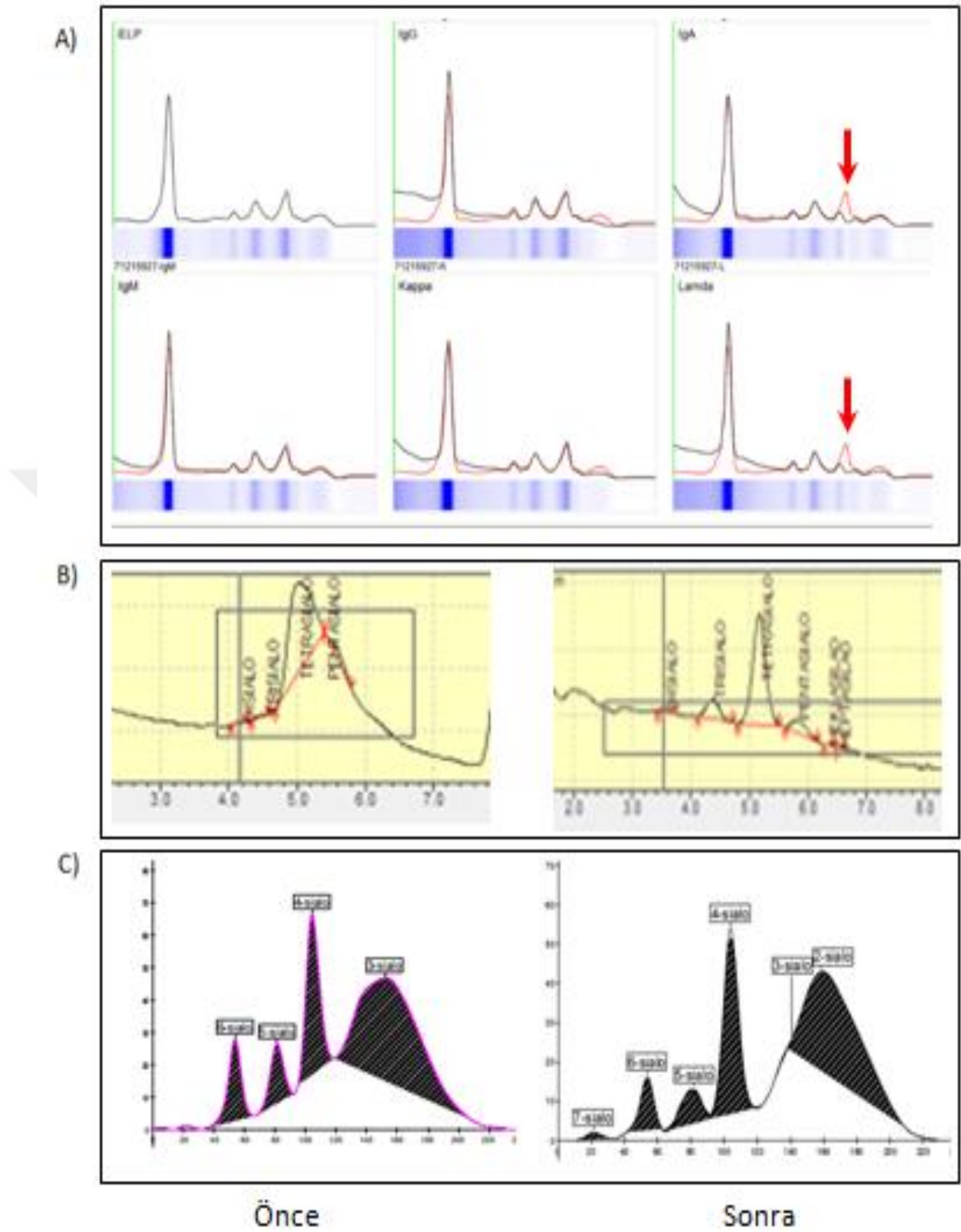
Monoklonal gammopatili 2. hastamızın (A.Ç.) serum protein elektroforezinde beta-2 bölgesinde izlenen pik daha sonra yapılan serum immüntiplendirme elektroforezinde monoklonal Ig A-kappa olarak saptandı. Bu serum, 1. CE sisteminde disiyalo-Tf ve trisiyalo-Tf için girişime neden olduğu ve işlem sonrası düzelme olmadığı izlendi. HPLC sisteminde ise monoklonal pikin girişim yaptığı ve işlem sonrası bu interferansın düzeldiği saptandı (Şekil 4.9).

Monoklonal gammopatili 3. hastamız (C.Y.)'nin serum immün tiplendirme elektroforezinde beta-1 bölgesinde Ig A-lambda piki mevcuttur. Bu serum, 1. CE sistemi ile Tf izoform analizine alındığında disiyalo-Tf ve trisiyalo-Tf için interferansa neden olduğu ve işlem sonrası düzelme olmadığı izlenirken, HPLC sisteminde de Tf izoform analizine bu monoklonal pikin girişim yaptığı ve fakat bu sistem ile işlem sonrasında interferansın düzeldiği saptandı (Şekil 4. 10).

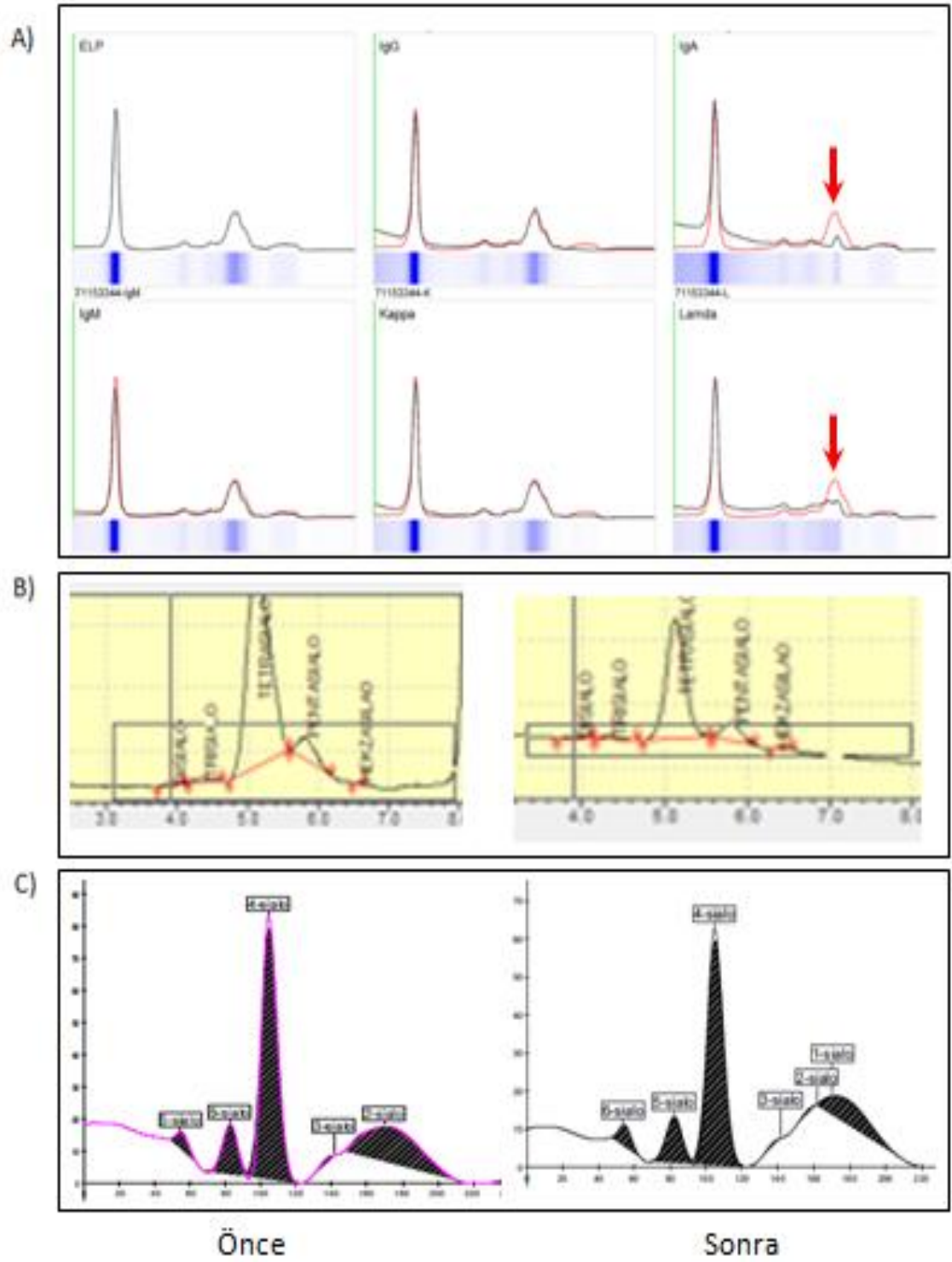
Monoklonal gammopatili 4. hastamız (E.K.)'nin serum immün tiplendirme elektroforezinde beta-2 bölgesinde Ig D-lambda ve serbest lambda pikleri mevcuttur. Bu serum 1. CE sistemi ile Tf izoform analizine alındığında disiyalo- ve asiyalo-Tf için interferansa neden olduğu ve işlem sonrası düzelme olmadığı izlenirken, HPLC sistemi ile Tf izoform analizine bu monoklonal pikin girişim yapmadığı ve dolayısıyla ile işlem sonrasında herhangi bir değişim saptanmadı (Şekil 11).

Monoklonal gammopatili 5. hastamız (H.D.A.)'nin serum immün tiplendirme elektroforezinde beta-2 bölgesinde Ig A-kappa piki mevcuttur. Bu serum 1. CE sistemi ile Tf izoform analizine alındığında disiyalo-Tf ve trisiyalo-Tf için interferansa neden olduğu ve işlem sonrası düzelme olmadığı izlenirken, HPLC sistemi ile Tf izoform analizine bu monoklonal pikin girişim yapmadığı izlendi ve dolayısıyla ile işlem sonrasında herhangi bir değişim saptanmadı (Şekil 4.12).

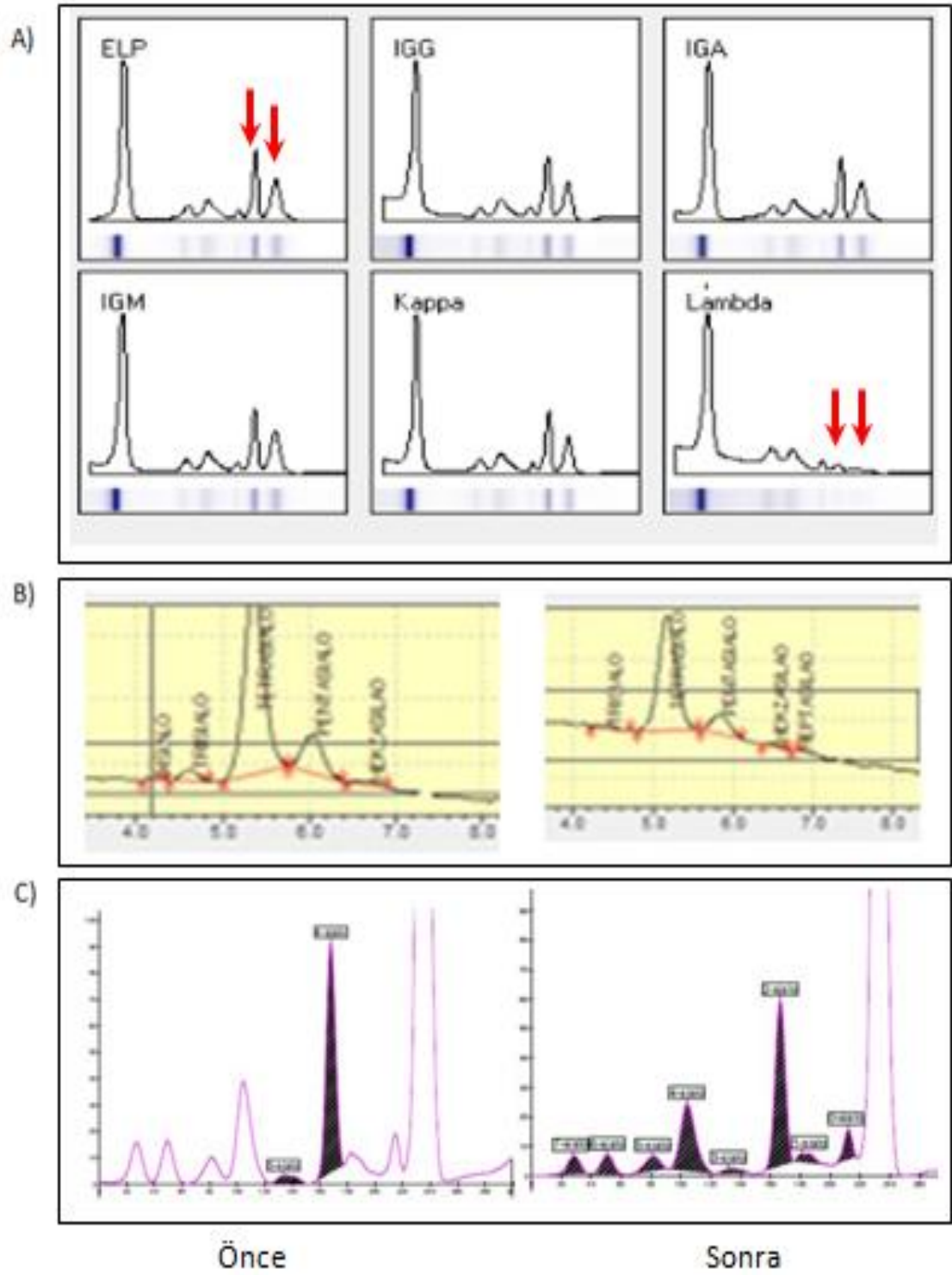
Monoklonal gammopatili 6. hastamız (M.Ö.)'in serum immün tiplendirme elektroforezinde beta-2 bölgesinde Ig A-kappa piki mevcuttur. Bu serum 1. CE sistemi ile Tf izoform analizine alındığında Tf izoformlarının elektroforetik paternine değerlendirilemeyecek şekilde interferansa neden olduğu ve işlem sonrası düzelme olmadığı izlenirken, HPLC sistemi ile Tf izoform analizine bu monoklonal pikin girişim yapmadığı izlendi ve dolayısıyla ile işlem sonrasında herhangi bir değişim saptanmadı (Şekil 4.13).



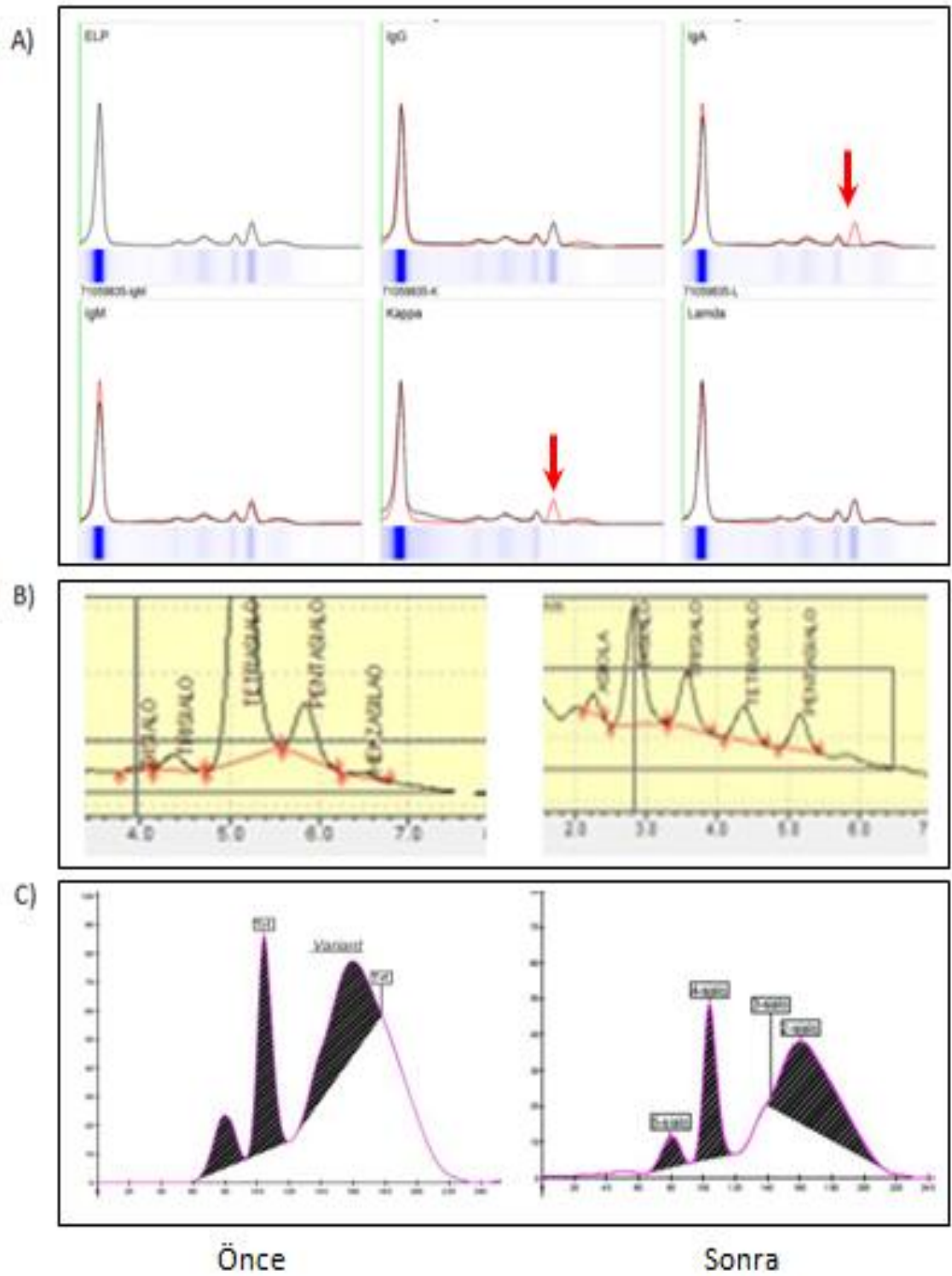
**Şekil 4.9. 2.** Monoklonal gammopati hastası (A.Ç.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve C) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.



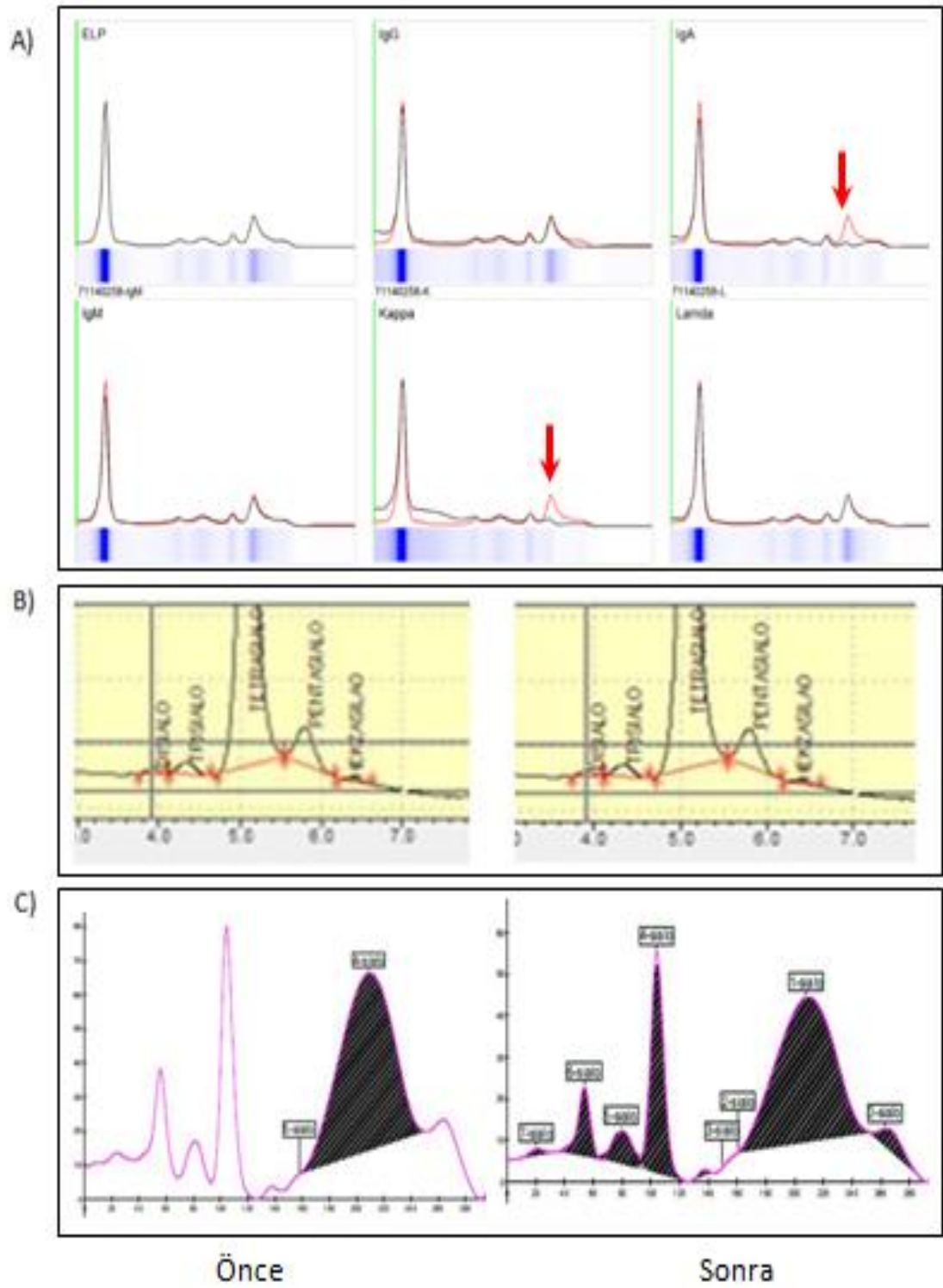
**Şekil 4.10** 3. Monoklonal gammopati hastası (C.Y.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve C) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.



**Şekil 4.11** 4.Monoklonal gammopati hastası (E.K.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve C) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.



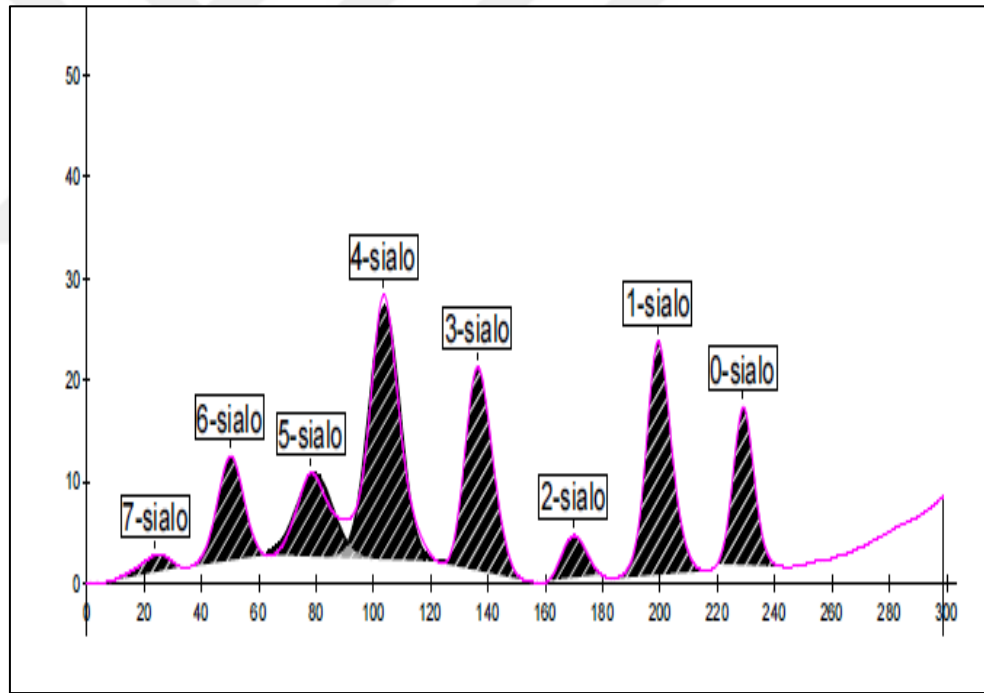
**Şekil 4.12 5** Monoklonal gammopati hastası (H.D.A.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve C) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.



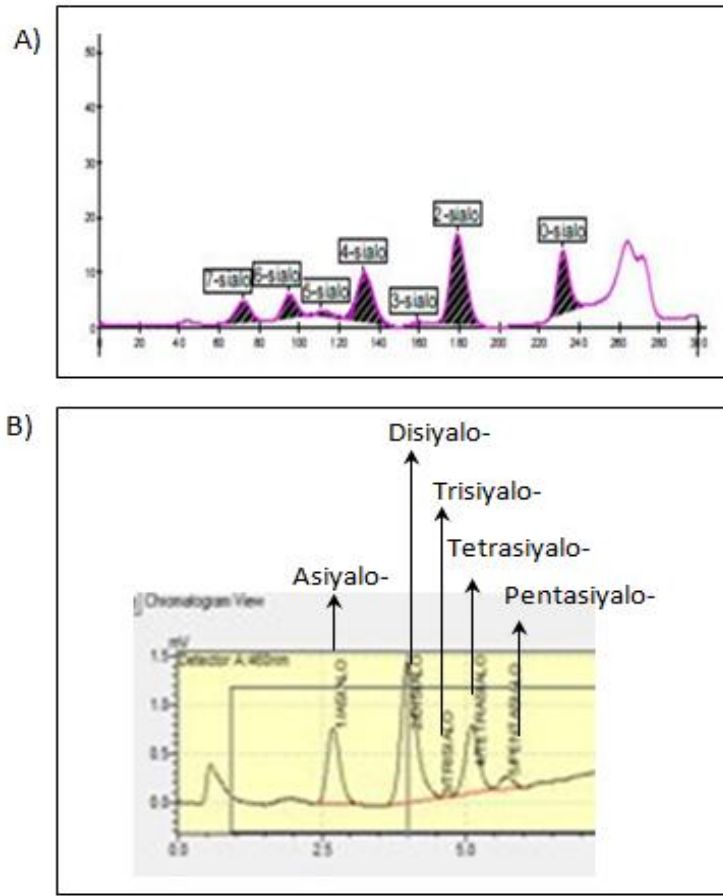
**Şekil 4.13** 6. Monoklonal gammopati hastası (M.Ö.) ile yapılan monoklonal pik interferans çalışması. A) Serum immun tiplendirme elektroforezi, B) HPLC sistemi ile ve c) 1. CE sistemi ile elde edilen Tf izoform analiz sonuçları.

#### 4.5. Konjenital Glikozilasyon Defekti Saptanan Hasta Bulguları

Transferrin izoformları analizi CDG hasta taraması amacıyla 1. CE sistemi ile laboratuvarımızda rutin olarak çalışılmaktadır. Nöraminidaz ile hazırlanan ve Tf'nin tüm izoformlarını içeren serum ile sistem kalibrasyonu yapıldı ve böylece tanıda önemli yeri olan Tf'nin hiposiyale izoformları ve geliş zamanları optimize edildi (Şekil.4.14). Rutin karşılaştırma çalışması sürecinde 1. CE sistemi ile CDG şüphesi olan numuneler HPLC sistemi ile de çalışılarak karşılaştırıldı. Bu hasta sonuçları Şekil 4.15-18 ve Tablo 4.11-14'de verildi. Bu hastaların saptandığı çalışma döneminde 2. CE sisteminin laboratuvarında kurulu olmaması nedeni ile karşılaştırma mümkün olamadı.



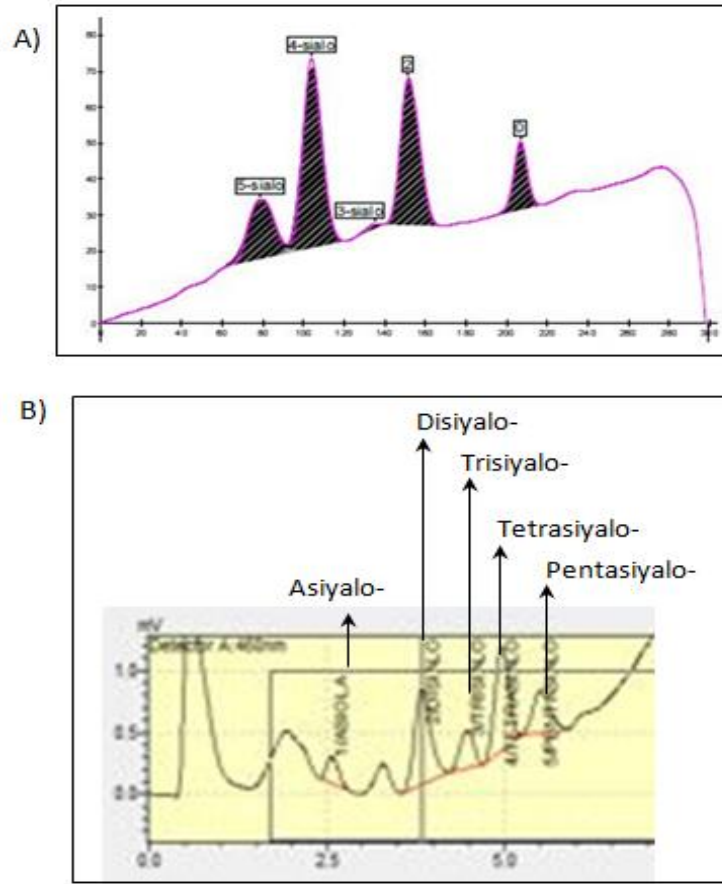
**Şekil 4.14.** Nöraminidaz ile hazırlanan ve Tf'nin tüm izoformlarını içeren serumun 1. CE sistemindeki analiz sonucu



**Şekil 4.15.** 1. CDG hastası (B.A) için Tf izoform elektroforez paterni ve A) 1. CE sistemi ile B) HPLC sistemi kromatogramı.

**Tablo 4.11.** 1. CDG hastası (B.A) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Transferrin izoformları.

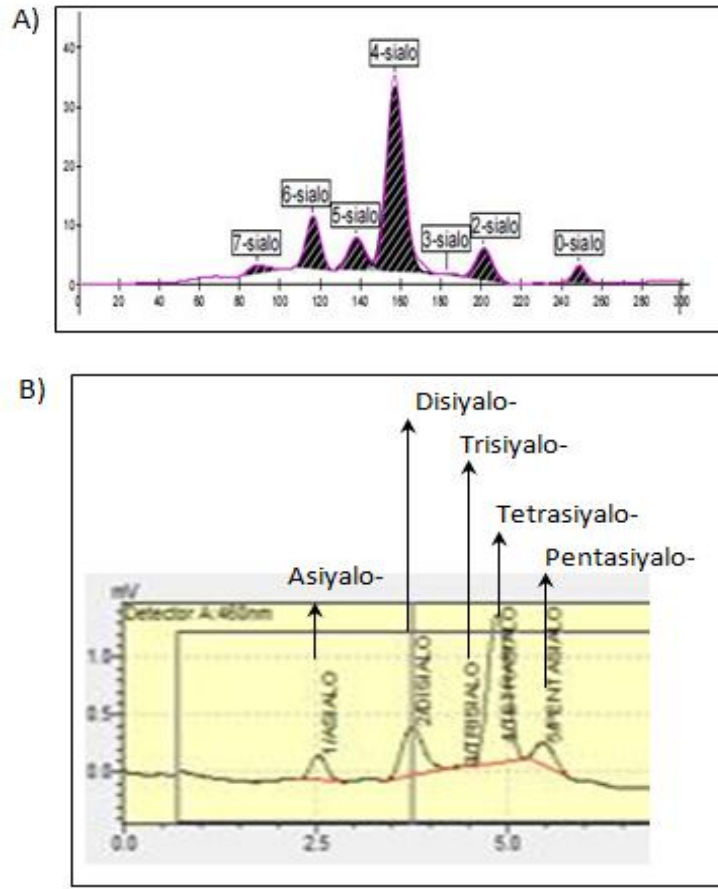
	1. CE Sistemi	HPLC Sistemi
Asiyalo-Tf	20,5	23,0
Monosiyalo-Tf	-	-
Disiyalo-Tf	36,6	51,8
Trisiyalo-Tf	0,9	0,2
Tetراسiyalo-Tf	21,7	21,6
Pentاسiyalo-Tf	2,6	3,4
Hekzasiyalo-Tf	8,5	-
Heptاسiyalo-Tf	9,2	-



**Şekil 4.16.** 2. CDG hastası (B.Ç) için Tf izoform elektroforez paterni ve A) 1. CE sistemi ile B) HPLC sistemi kromatogramı.

**Tablo 4.12.** 2. CDG hastası (B.Ç) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Transferrin izoformları.

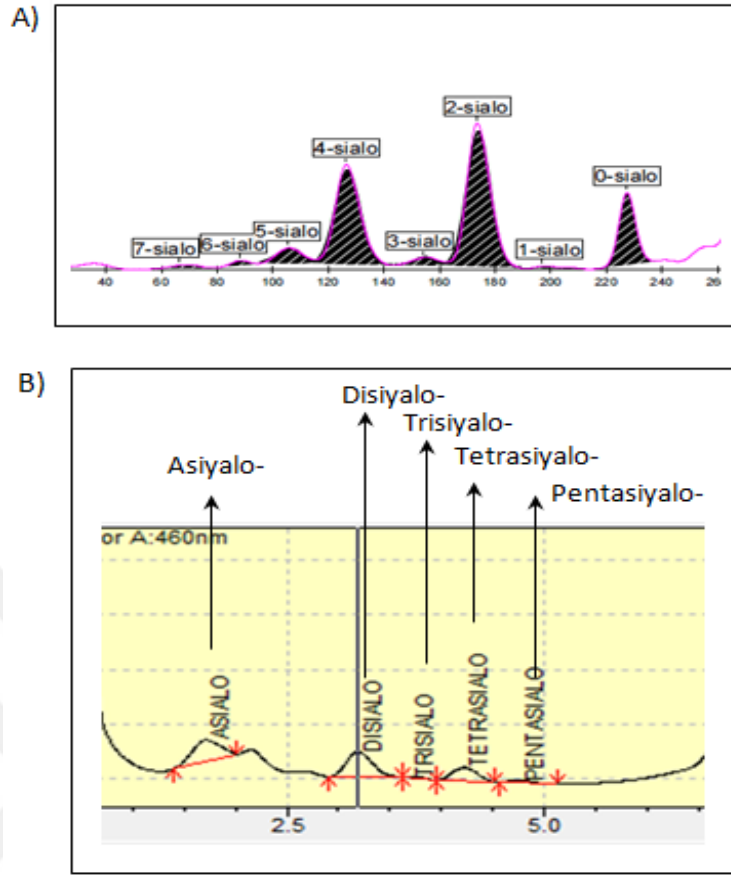
	1. CE Sistemi	HPLC Sistemi
<b>Asiyalo-Tf</b>	10,4	6,4
<b>Monosiyalo-Tf</b>	-	-
<b>Disiyalo-Tf</b>	31,2	33,9
<b>Trisiyalo-Tf</b>	0,6	11,3
<b>Tetrasiyalo-Tf</b>	40,6	33,1
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	17,2	15,3
<b>Hekzasiyalo-Tf</b>	-	-
<b>Heptasiyalo-Tf</b>	-	-



Şekil 4.17. 3. CDG hastası (E.B.) için Tf izoform elektroforez paterni ve A) 1. CE sistemi ile B) HPLC sistemi kromatogramı.

Tablo 4.13. 3. CDG hastası (E.B.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Transferrin izoformları.

	1. CE Sistemi	HPLC Sistemi
Asiyalo-Tf	3,7	8,1
Monosiyalo-Tf	-	-
Disiyalo-Tf	9,5	21,5
Trisiyalo-Tf	0,6	0,3
Tetراسiyalo-Tf	60,4	61,3
Pentاسiyalo-Tf	9,8	8,8
Hekzasiyalo-Tf	13,2	-
Heptاسiyalo-Tf	2,8	-



**Şekil 4.18.** 4. CDG hastası (M.Ö.Ş.) için Tf izoform elektroforez paterni ve A) 1. CE sistemi ile B) HPLC sistemi kromatogramı.

**Tablo 4.14.** 4.CDG hastası (M.Ö.Ş.) için 1.CE ve HPLC sistemlerinde saptanan Tf izoformları.

	1. CE Sistemi	HPLC Sistemi
<b>Asiyalo-Tf</b>	15,6	37
<b>Monosiyalo-Tf</b>	0,6	-
<b>Disiyalo-Tf</b>	42,7	39,2
<b>Trisiyalo-Tf</b>	2,6	0,9
<b>Tetراسiyalo-Tf</b>	31,6	19,7
<b>Pentasiyalo-Tf</b>	5,1	3,2
<b>Hekzasiyalo-Tf</b>	0,9	-
<b>Heptasiyalo-Tf</b>	0,9	-

## 5. TARTIŞMA

Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarına Mayıs 2015 - Mayıs 2016 tarihleri arasında CDG taraması amacı ile transferrin izoformlarının analizi için kabul edilen numuneler yöntem karşılaştırma çalışmasında kullanıldı. Toplam 36 numune 1. CE sistemi ile çalışılırken, 29 numune 2. CE sistemi ile ve 35 numune HPLC sistemi ile çalışıldı. Tüm numuneler, çalışmaların tümüne yetecek hacimde olmaması nedeni ile tüm sistemlerde eşit sayıda çalışılmadı. CDG tarama hasta profilinde erkek hasta yüzdesinin (%64) kadın hasta (%36) yüzdesine göre belirgin olarak fazla olduğu izlendi (Tablo 4.1). Hastaların tamamına yakınının pediatri kliniklerinden geldiği ve yaş ortalamasının 14'ün altında olduğu saptandı. Bu hastaların yaş ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandığında 1.CE, 2. CE ve HPLC sistemlerine ait değerler sırasıyla 14,4 ( $\pm 19,69$ ), 11,7 ( $\pm 15,4$ ) ve 13,3 ( $\pm 18,7$ ) olarak bulundu. Standart sapmaların bu kadar büyük olması hastaların büyük çoğunluğunu çocuk kliniklerinden gelen numuneler oluşturmalarına rağmen erişkin yaşta (46, 51, 71 ve 81 yaş) birkaç hastanın bulunmasından kaynaklanmaktadır. Çocuk hastalardan rutin laboratuvar tetkiklerinde minimal düzeylerde kan alınması, çalışmamız için rutin dışında ilave kan istemi yapılamaması nedeni ile tüm numunelerin her üç sistemde çalışılması mümkün olmadı.

Her üç sistemin analitik performansını değerlendirmek amacı ile yapılan gün içi ve günler arası varyasyon (%CV) çalışmasında özellikle disiyalo-Tf için çok yüksek değerler bulundu (Tablo 4.5). Tetrasiyalo-Tf izoformları gün içi %CV değerleri 1.CE, 2. CE ve HPLC sistemlerinde sırası ile 0,85, 2,36 ve 2,93 olarak ve günler arası %CV değerleri de sırası ile 3,72, 1,61 ve 5,28 olarak bulundu. Trisiyalo-Tf %CV değerleri 1. CE sisteminde diğer sistemlerden düşük bulunurken; pentasiyalo-Tf %CV değerleri 2. CE sisteminde diğer sistemlerden daha düşük olarak bulundu. Disiyalo-Tf için bulunan yüksek sonuçların, çalışmada kullanılan serum havuzunda disiyalo-Tf izoformunun yüzde değerinin çok düşük olmasından (ortalama %0,53-0,63) kaynaklandığı düşünüldü. Tetrasiyalo-Tf için bulunan %CV tüm yöntemlerde düşük olarak bulundu. Çalışılan serum havuzu için, tetrasiyalo-Tf en yüksek yüzdeye sahip (ortalama %78-85) izoformdu. 2008 yılında yapılan bir çalışmada bizim çalıştığımız 1. CE sistemi farklı bir HPLC sistemi ile

karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada da bizim bulgularımızla uyumlu olarak, gün içi ve günler arası %CV değerleri düşük yüzdeye sahip Tf izoformları için %9-19 olarak yüksek %CV değerler bildirilmiştir. Öte yandan, yüksek yüzdeye sahip Tf izoformları için %CV değerleri %1,43-2,9 arasında bulunmuştur. Sebia 2 capillarys ile Helena Biosciences' V8 kapiller sistemlerini CDT ölçüü açısından karşılaştıran bir çalışmada gün içi varyasyon hesaplamaları sonucunda bu iki sistemden elde edilen gün içi iki sonuç arasında çok küçük fark gözlemlenmiş (%CV değerleri sırasıyla %0,9 ( $\pm 0,08$ ) ve %0,8 ( $\pm 0,06$ )) ve günler arası varyasyon çalışmasında da benzer sonuçlar elde edilmiştir (%CV değerleri sırasıyla %0,9 ( $\pm 0,08$ ) ve %0,7 ( $\pm 0,09$ )) (130). Bizim çalışmamızda, bu çalışmadan farklı olarak CDT değerleri yerine her bir izoform tek tek değerlendirildi. Disiyalo-Tf düzeyleri için elde %CV değerleri bu çalışmadaki CDT için elde edilen sonuçlar karşılaştırıldığında, daha yüksek (disiyalo-Tf için gün içi ve günler arası %CV değerleri sırasıyla 1.CE sistem için %14,60- %23,57 ve 2. CE %22,46- %21,55) olduğu görüldü. CE (Beckman Coulter) ve HPLC (Shimadzu Europe) sistemleri ile Tf izoformları analizinde CDT değerlerinin karşılaştırıldığı başka bir çalışmada, hesaplanan gün içi varyasyonlar CE için < %3 iken HPLC için ise < %2,9 olarak bildirilmiştir. (131). Gün içi ve günler arası varyasyon (%CV) çalışmamızda, 1.CE sisteminin performansının diğer sistemlere göre üstünlük gösterdiği izlendi. Bunun nedeninin 1. CE sisteminde izoform ayırımlarının yazılım ile otomatik olarak yapılması olduğu düşünüldü. Diğer iki sistemde (HPLC sisteminde ve 2.CE sisteminde) Tf izoformları ayırımı manuel olarak yapıldı. Tf izoformlarının otomatik belirlenmesinin düşük %CV değerlerini sağladığı sonucuna varıldı.

Hasta numunelerinin Tf izoformları analiz sonuçları incelendiğinde sınıf içi korelasyon analizi ile her üç sistemin birbirleri ile ve de ikişerli olarak karşılaştırıldı (Tablo 4.3 ve Tablo 4.4). Üç sistemin sınıf içi korelasyon analizi ile elde edilen korelasyon katsayıları bu yöntemlerden elde edilen sonuçların birbirleri ile uyumlu olmadığını gösterdi. Sistemlere ikişerli olarak sınıf içi korelasyon analizi uygulandığında ise en kabul edilebilir sonucun trisiyalo-Tf değerlendirmesinde 1.CE ve 2.CE sistemleri arasında olduğu (sınıf içi korelasyon değeri: 0,688) diğer karşılaştırma sonuçlarının birbirleriyle uyumlu olmadıkları görüldü. Bunun yanında üç sistemden elde edilen sonuçlar aynı zamanda Bland-Altman analizi ile de

değerlendirildi. Sonuçlar incelendiğinde disiyalo-Tf için sistemler arasında uyum izlendi (Şekil 4.1). Trisiyalo-, tetraşiyo- ve pentasiyalo-Tf izoformları için sistemler arasında uyum izlenmedi. Yöntemler arasında disiyalo-Tf izoformlarının uyumluluğu bu sistemlerin özellikle CDT analizleri için geliştirilmiş olmasına bağlı olduğu düşünüldü. CDT analizlerinde asiyo-Tf, monosiyo-Tf ve disiyalo-Tf izoformları değerlendirilmekte ve bu amaçla geliştirilen yöntemlerin de birbiri ile bu izoformları belirlemede uyumlu sonuçlar vermesi beklenmektedir. Öte yandan, disiyalo-Tf için izlenen uyum diğer izoformlar için saptanmadı. Bu farklılığın, 2. CE sistemi ve HPLC sisteminde analizlerin manuel yapılmasından kaynaklandığı düşünüldü. Manuel pik ayırımlarının standardize edilememesi nedeni ile bir dezavantaj olduğu sonucuna varıldı. Özellikle tüm Tf izoform paterninin birlikte yorumlanmasının gerektiği CDG tarama analizleri için 1.CE gibi otomatize analizlerin tercih edilmesi gerektiği düşünüldü. Sebia 2 capillarys CE sistemi ile Helena Biosciences V8 CE sistemlerini karşılaştıran bir çalışmada 150 hasta numunesi bu iki sistem ile çalışılmış ve elde edilen CDT sonuçları değerlendirilmiştir. Bu çalışmada sonuçlar t testi ile karşılaştırıldığında iki sistem arasında belirgin farklılık gözlenmiştir ( $p=0,015$ ). Regresyon analizi ile iki metod arasında korelasyon ( $r^2=0.9336$   $y=0.985x-0.557$ ) saptanmıştır. Helena CE sisteminin negatif biası görülmüştür. hasta numuneleri ve kalite kontrol materyallerinin sonuçları Helena Biosciences V8 CE sisteminde düşük olduğu bildirilmiştir. Bu çalışma ile her iki analizörle yapılan CDT ölçümlerinin klinik konsantrasyon ile korele olduğu gösterilmiştir (130). Çalışmamızda da iki kapiller sistem sonuçları arasında disiyalo-Tf hariç uyumluluk bulunmaması bu çalışma ile uyumlu olarak değerlendirildi.

Bir başka çalışmada ise, Sebia 2 kapiller sistemi, Beckman Coulter kapiller sistemi ve Shimadzu HPLC sisteminin CDT ölçümü için karşılaştırılmıştır. HPLC sistemi ile Sebia CE sistemi arasında düşük korelasyon saptanmıştır. Yazarlar, bu farklılığı sistemlerin farklı analitik ayırma mekanizmaları ve farklı dedeksiyon koşulları ile ilişkilendirilmiştir. Bu çalışmada, Sebia 2 multikapiller sisteminin CDT analizinde yüksek verimlilikle çalıştığını ve analitik performans ve tekrarlanabilirliğin oldukça iyi olduğunu belirtmektedirler. Bu sistemin immünassay metoduna göre interferanstan daha az etkilendiğini, klinik laboratuvarlarda rutin

tarama amaçlı kullanıma uygun olduğu belirtilmiş, yine de başka bir yöntem ile doğrulanması gerektiğini de eklemiştir. Yazarlar, teorik olarak HPLC sisteminin analitik ayırıştırma tekniğinin kapiller sistemlere göre üstün olduğunu da ileri sürmüşlerdir (132).

Transferrin izoformlarının ölçümünde CDG tanısında tüm izoformların analizine olanak tanıyan İEO önerilen yöntem olmasına rağmen zaman alıcı ve uğraş gerektirmesinden dolayı rutin analize uygun değildir. Bu nedenle, bunun yerine CE sisteminin kullanılıp kullanılmayacağını araştırmak amacıyla yapılan bir çalışmada 792 serum numunesi CE (Beckman Coulter P/ACE 5000 sistemi ve 214 nm'de absorbans dedektörü) ile taranmış ve anormal profil veya beklenmeyen pik sergileyen numuneler İEO ile tekrar analiz edilmiştir. Çalışmanın sonucunda hastaların %95'inde normal profil izlenmiştir. Hastaların %5'inde ise CDG şüpheli transferrin paterni saptanmıştır. Bu %5 numune İEO ile analiz edildiğinde CE ile benzer sonuçlar elde edilmiş ve tanı için ileri basamak analiz yöntemleri uygulanmıştır. Bu çalışmada kullanılan CE sisteminin İEO'ya alternatif iyi bir sistem olduğu sonucuna varılmıştır (133). Ancak bu CE sistemi otomatize bir sistem değildir. Bizim çalışmamızda bu sistemden farklı iki CE sistemi değerlendirilmiştir. İki CE sisteminin interferans yönünden birbirinden büyük farklılıklar gösterdiği bulunmuştur. Kapiller elektroforez sistemleri arasında kullanılan sistemlerin tampon, elektroforez voltajı, ayırım süresi ve dedeksiyonlarındaki farklılıkların performansları belirgin olarak etkilediğini göstermiştir.

Sebia CE (Capillarys 2™ sistemi, SEBIA, France) sistemi ile HPLC sistemini (iyon değiştirici kolon SOURCE®15Q PE 4.6/100 anyon değiştirici, GEHealthcare) karşılaştıran başka bir çalışmada bu iki sistem arasındaki korelasyonun oldukça iyi olduğu gösterilmiştir (134). CDT ölçümünde Sebia ve Helena CE analizörlerinin IFCC referans metodu olan HPLC ile iyi korelasyon gösterdiği görülmüştür (135).

Transferrin izoformlarının analizinde HPLC ve CE sistemlerinin ayrı ayrı ICP-MS (Inductively coupled plasma mass spectrometry) ile kombine edilerek yapılan karşılaştırma çalışmasında HPLC sistemi ile yapılan analizin selektivitesi ve analitik performansları açısından karşılaştırıldığında Tf izoformlarını değerlendirmek için daha uygun olduğu sonucuna varılmıştır (136).

Yine bir başka çalışmada, CDT ölçümü yönünden CE (Beckman Coulter) ve HPLC (Shimadzu Europe) sistemleri karşılaştırılmıştır. Saptama sınırı yönünden HPLC ile CE karşılaştırılmış, HPLC sisteminin daha duyarlı olduğu saptanmıştır. HPLC sisteminin CE sistemine olan bu üstünlüğü dedeksiyonda kullanılan dalga boyunun CE sisteminin proteine özgü dalga boyu olan 200 nm iken HPLC sisteminde ferrik iyonun özgü 460 nm olmasına bağlanmıştır. Gün içi varyasyon çalışmasında CE sisteminde SD < %3 ve HPLC sisteminde SD < %2,9 olarak bildirilmiştir. CDT değerleri yüksek olan 97 hastanın CE sistemi ile HPLC sistemleri arası iyi bir korelasyon ( $r=0.9849$ ;  $P<0.001$ ) bulunmuştur (131). Ancak, biz çalışmamızda HPLC ve 2.CE sisteminde disiyalo-Tf için yüksek %Cv ve kötü bir korelasyon izledik. Bunun nedeninin disiyalo-Tf değerlerinin düşük olmasına bağlı olduğunu düşündük.

Analitik yöntemlerde interferanslar analiz sonuçlarının hastalığı saptama olasılığını azaltabilmekte veya sağlıklı bireylerin hasta olarak değerlendirilmesine neden olabilmektedir. Yöntemlerin validasyon çalışmalarında bu nedenle interferans çalışmalarının da yapılması gerekmektedir. Genel olarak hemoglobin, bilirubin veya trigliserid gibi etkenlerin analizlerde interferans yaptığı bilinmektedir. Konjenital glikozilasyon bozukluğu tarama analizleri genel olarak yenidoğan ve bebeklik döneminde yapılmaktadır ve bu yaş grubundaki hastalarda kan alımında yaşanan zorluklar nedeni ile hemolizli numuneler sıklıkla karşımıza çıkmaktadır. Yine çocuk hastalarda açlık kanı alınmadığından lipemi ve özellikle yenidoğanlarda sıkça karşılaştığımız bilirubineminin yöntemlere olan etkileri değerlendirildi. Serum protein elektroforezinde Tf beta bölgesinde ilerlemektedir. Bu nedenle bir diğer interferans etkeni olarak beta bölgesinde izlenen monoklonal piklerin sistemlere etkileri de çalışmamızda değerlendirildi.

İnterferans çalışma sonuçları CDT için belirlenen CLIA'88 kriterine göre değerlendirildi. Çalışılan hemoglobin, bilirubin veya trigliserid içeren interferans numuneleri ile yapılan analizlerde %10'dan fazla (negatif veya pozitif yönde) değişim saptanması durumunda ölçümün etkilediği kabul edildi.

Hemoglobin interferansının özellikle disiyalo-Tf üzerinde negatif yönde etkisi saptandı (Şekil 4.6). CDT analizlerinde kesinlikle hemolizin 125 mg/dL

düzeylerinden itibaren kabul edilmemesi gerektiği sonucuna varıldı. Disiyalo-Tf diğer formlara göre daha düşük oranlarda bulunduğu için % Değişim diğer izoformlara göre daha fazla izlenmektedir. Yine CDG analizlerinde özellikle hiposiyale izoformların yanlış yorumlanmasına neden olacağı için analiz öncesi Hb konsantrasyonun ölçümünün de gerekli olduğu düşünüldü. Özellikle 125 mg/dL ve üzerinde Hb bulunan numunelerde analiz yapılmaması gerektiği sonucuna varıldı. Çalışmada ele aldığımız iki farklı kapiller elektroforez sisteminin Hb interferansından farklı yönlerde etkilendiği saptandı. 1. CE sistemi tetrasiyalo-Tf değerlendirmesinde etkilenme göstermezken, 2. CE sisteminin negatif yönde etkilendiği saptandı. Bu farklılığın, kapiller elektroforez sistemlerinde, farklı dalga boylarının (1.CE sisteminin 200 nm ve 2. CE sisteminin 220 nm) kullanılmasından, kullanılan tampon içeriklerinden, elektroforez koşul ve sürelerinden kaynaklandığı düşünüldü.

Hemoliz interferans çalışmasında, HPLC sisteminin de belirgin olarak etkilendiği belirlendi (Şekil 4.6 ve Tablo 4.7). Bu etkilenmenin sistemin 460 nm dalga boyunda okuma yapmasına bağlı olduğu düşünüldü. 2009 yılında yapılan bir çalışmada demir içeren moleküllere spesifik dalga boyu 460 nm’de ölçüm yapan bir başka HPLC sisteminin hemoglobin-haptoglobulin gibi moleküllerin interferansına açık olduğu bildirilmektedir. Yazarlar, hemoglobin interferansından kaçınılması için 200 nm dalga boyunda ölçüm yapan CE sisteminin kullanılmasını önermektedirler (137). Yine bizim çalışmamızdaki 2. CE sistemi ile CDT ölçümünde hemoglobin etkisinin incelendiği bir çalışmada 150 mg/dL Hb konsantrasyonundan itibaren doğru ölçümler yapılamayacağı bildirilmiştir (126). Çalışma sonuçlarımız litertür ile uyumlu bulunmuştur.

Hemolizin etkisine baktığımız interferans çalışmasında, 1. CE sisteminde disiyalo-Tf için 125 mg/dL Hb konsantrasyonlarından itibaren negatif yönde etkileşim olduğu saptandı. 2. CE sisteminde ise 250 mg/dL Hb konsantrasyonlarından itibaren etkileşim olduğu izlendi. 2008 yılında yapılan bir çalışmada da bizim çalıştığımız 1. CE sistemi farklı bir HPLC sistemi ile CDT analizleri yönünden karşılaştırılmış ve 200 mg/dL Hb düzeylerinden itibaren yöntemlerin etkilendiği ve disiyalo-Tf ölçümünün mümkün olmadığı bildirilmiştir (138).

Hemoliz etkisi için tüm izoformlar bir arada değerlendirildiğinde, en az değişimin 1.CE sisteminde olduğu saptandı. Ayrıca 1. CE ve HPLC yöntemleri için hemolizden en az etkilenen izoformun tetrasiyalo izoformu olduğu saptandı. Özellikle CDT analizleri söz konusu olduğunda 125 mg/dL Hb düzeylerinden itibaren hemolizin negatif interferansa neden olduğu saptandı. Yine CDG taramalarında da yanlış negatif sonuçlara neden olabileceği düşünüldü. Bu nedenle, hemolizli numunelerin kesinlikle red edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

Lipeminin, çalışmada karşılaştığımız sistemlere etkisi değerlendirildiğinde, en kabul edilebilir sonuçların 1.CE sistemi ile elde edildiği görüldü (Şekil 4.6 ve Tablo 4.7). Bu sistem ile analizde sadece disiyalo-Tf 750 mg/dL trigliserid konsantrasyonunda %20 ve pentasiyalo-Tf 3000 mg/dL trigliserid konsantrasyonunda %14 pozitif yönde değişim gösterdiği saptandı. 2. CE sistemi ile analizde tetrasiyalo-Tf izoformunda etkilenme görülmedi. Bunun yanında lipemiden disiyalo- ve trisiyalo-Tf izoformları negatif yönde etkilenirken pentasiyalo-Tf izoformunun pozitif yönde etkilendiği saptandı. Ölçülen Tf izoformlarından tetrasiyalo-Tf analizlerinde üç sistemde de etkilenme izlenmedi. HPLC sisteminde, 2. CE sisteminde göre daha yüksek oranda etkilenme gösterdiği saptandı. Lipemik serumların 300-700 nm arasında spektrofotometrik interferansa neden olduğu bilinmektedir (139). Bu nedenle, lipemiden en fazla HPLC yönteminin etkilenmesinin bu sistemin 460 nm dalga boyunda dedeksiyon yapmasından kaynaklandığı sonucuna varıldı. Lipemik numunelerde 1.CE sisteminin diğer sistemlere kıyasla tercih edilebilir olduğu sonucuna varıldı. Bunun yanında CDT ve CDG taramaları amacıyla laboratuvarlara gelen numunelerde en fazla önem arz eden izoform olan disiyalo-Tf ölçümü olması nedeniyle HPLC sistemi kullanılıyorsa 750 mg/dL, 2. CE sistemi kullanılıyorsa 1500 mg/dL ve üzeri trigliseridi olan numunelerle yapılan analiz sonuçlarının güvenilir olmadığı sonucuna varıldı. 1.CE sisteminin bizim çalışmamızdan farklı bir HPLC sistemi ile karşılaştırıldığı başka bir çalışmada bu iki sistemin CDT ölçümünde lipemiden etkilenmediği bildirilmiştir (138). Değişen trigliserid düzeylerinin 2. CE sistemi ile CDT ölçümüne etkisinin incelendiği çalışmada 9,41 mmol/L (832 mg/dL) trigliserid konsantrasyonuna kadar ölçümün etkilenmediği saptanmıştır (126).

Bilirubin interferans çalışmamızda, 1.CE sisteminin disiyalo-Tf için 11,5 mg/dL düzeylerinden başlayarak etkilendiğini ve diğer izoform analizlerinin etkilenmediği belirlendi (Şekil 4.7 ve Tablo 4.8). 2.CE sisteminin, tetrasiyalo-Tf için sadece 20 mg/dL'de, diğer tüm izoformlar için 6 mg/dL bilirubin düzeylerinden başlayarak negatif %Değişim gösterdiği saptandı. Total bilirubin düzeylerinin 2. CE sistemi ile CDT ölçümünde olan etkisinin incelendiği bir çalışmada 15 mg/dL (256,5 µmol/L) trigliserid konsantrasyonuna kadar ölçümün etkilenmediği saptanmıştır (126). Bizim çalışmamızda bu sistemin 6 mg/dL düzeylerinden itibaren etkilendiği saptanmıştır. HPLC sisteminin tetrasiyalo-Tf hariç 6 mg/dL bilirubin düzeylerinden sonra etkilenmeye başladığı izlendi. 2008 yılında yapılan bir çalışmada 1. CE sistemi farklı bir HPLC sistemi ile karşılaştırılmış ve her iki yöntemin de bilirubinemiden etkilenmediği bildirilmiştir (138). Bizim çalışmamızda karşılaştırılan farklı bir HPLC sistemi olup bilirubin interferansı göstermiştir. Bu HPLC sistemi için bizim çalışmamız dışında bir interferans çalışması literatürde bulunamamıştır. Bu HPLC sistemi için çalışmamızın bu yönden bir katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

Serum protein elektroforezinde Tf beta bölgesinde ilerlemektedir. Kapiller elektroforez ile Tf izoform analizlerinde, beta bölgesinde birlikte ilerleyen komponentlerin etkileşimleri söz konusu olabilmektedir. Bu nedenle beta-1 ve beta-2 bölgesinde artmış düzeyde başka bir protein bulunması Tf izoform analizinde yanlış değerlendirmelere neden olabilmektedir (68). Transferrin izoformları analizinde hastalarda monoklonal pik olması durumunda ölçümler etkilenmektedir. Bu bölgede özellikle monoklonal bantların interferansı bilinmekte ve önlem olarak bu numunelerin immün eksiltme uygulamaları ile bir ön işlemden geçirilmesi önerilmektedir (133). Çalışmamızda bu nedenle, serum protein elektroforezinde beta bölgesinde monoklonal piki olan bir grup numune ile de interferans çalışması yapıldı. Pik türüne göre ayırım yapılmadan, beta-1 veya beta-2 bölgelerinde monoklonal piki olan hastaların serum numuneleri çalışmaya dahil edildi. Bu nedenle monoklonal pik grupları eşit olarak seçilemedi. Yine bu çalışmada hastaların laboratuvara gönderilen numune miktarları ile kısıtlı numune miktarı nedeniyle her üç sistemle de çalışma tamamlanmaya çalışılmıştır. Bu nedenle toplam çalışılan hasta sayıları arasında farklar meydana gelmiştir (Tablo 4. 9). Pik çeşitleri ve Tf izoform analizindeki profil üzerindeki etkileri değerlendirildi (Şekil 4.8-14 ve Tablo

4.10). Pik patterni değerlendirilemeyen hastalar “*etkilenme olan*” olarak gruplandırıldı. Ardından, 1. CE sisteminin geliştirdiği "Tetravalent/IS" immün eksiltme solüsyonu ile (insan immünglobülin ağır ve hafif zincir antiserumu içermektedir) muamele sonrası analiz tekrar edildi. Çalışmanın bu kısmı, 2.CE sistemi laboratuvarımızda kısıtlı süre kurulmuş olması nedeni ile sadece 1. CE ve HPLC sistemlerinde gerçekleştirilebildi. Bu çalışmada hacim yetersizliği nedeni ile monoklonal pikten etkilenen numunelerin tamamı antiserum ile muamele edilememiştir. 1.CE sistemi ile toplam 29 hasta numunesi değerlendirildi. Bunlardan %62'sinde etkilenme saptanırken %38'inde etkilenme saptanmadı. 2.CE sistemi ile 26 hasta numunesi değerlendirildi bunlardan %73'ünde etkilenme saptanırken %27'sinde etkilenme saptanmadı HPLC sisteminde 29 hasta numunesi değerlendirildi bunlardan %21'inde etkilenme saptanırken %79'unda etkilenme saptanmadı. (Tablo 4.10). Bu çalışmada, beta bölgesindeki monoklonal piklerin en az HPLC sistemini etkilediği saptandı. Monoklonal pikler elektroforezde buldukları bölgeye göre beta-1 ve beta-2 olmak üzere iki gruba ayrıldı. Pik bölgeleri ve türleri Tablo 4.10'da görülmektedir. Tf izoform analizinde etkilenme saptanan numuneler immün eksiltme işlemisörası tekrar analiz edilerek Tf paterninde düzelme olup olmadığı incelendi. Buna göre, 1. CE sistemi ile etkilenme saptanan 18 hastadan 7'sinde düzelme saptanmazken, HPLC sisteminde etkilenme olan 6 hastadan 4'ünde düzeltme saptandı (HPLC sisteminde etkilenme olan diğer iki numune ise hacim yetersizliği nedeniyle bu işleme tabi tutulamadı). HPLC yönteminin de beta bölgesindeki monoklonal bantlardan etkilendiği ve kapiller elektroforez kiti için geliştirilen numune işleme reaktifi ile bu etkilenmenin uzaklaştırıldığı saptandı. Yaptığımız literatür araştırmasında bu konuda bir çalışmaya rastlanmadı. Bu tür interferanslarda HPLC yöntemi için de bu anti-serum uygulamasının yararlı olduğu sonucuna varıldı. Anti-serumun beta bölgesinde monoklonal komponentler için yetersiz kaldığı ve bu nedenle bu numunelerde 1.CE sisteminde başarılı sonuçlar elde edilemediği düşünöldü. Yapılan bir çalışmada, 2. CE ile CDT ölçümünde monoklonal piklerin analiz üzerine etkilerinin incelenmiş, beta bölgesinde yer alan monoklonal komponentlerin interfere edici etkisi bildirilmiştir (68). Başka bir çalışmada ise artmış Ig A düzeylerinin Tf ölçümünde etkileşime neden olduğu bildirilmiştir (140).

Çalışmamızda monoklonal piklerin konsantrasyonları ile etkileşimler arasında bir ilişki saptanmamıştır.

Transferrin izoformları analizinde CDG şüpheli olarak saptan numuneler 1.CE sistemine ek olarak HPLC sistemi ile değerlendirildi. Her iki sistem ile uyumlu paternler elde edildi (Şekil 4.15-18 ve Tablo 4.11-14) . Belirgin olarak disiyalo-Tf ve asiyalo-Tf artışı saptanan hastalarda Tip I CDG düşünüldü. Bu hastalar kesin tanı, hastalık tiplendirmesi amacıyla genetik tanı merkezlerine yönlendirildi.

Transferrin izoformları analizinde kullanılan farklı pekçok yöntem bulunmaktadır. Bu yöntemlerin birbirlerine olan üstünlük ve dezavantajlarını saptamak amacıyla birçok çalışma yapılmıştır. 2007 yılında CDG tanısındaki yöntem karşılaştırma çalışmasında kromatografik yöntemlerin doğruluk ve kesinliğinin elektroforetik yöntemlere kıyasla daha iyi olmakla beraber duyarlılık ve özgüllüklerinin daha düşük olduğu bildirilmiştir (42). Başka bir çalışmada CE sisteminin analitik metodlarda aranan kriterleri yerine getirmesi, yüksek analitik performansa sahip olması gibi nedenlerle laboratuvarlarda tarama testi olarak kullanılabilceği sonucuna varılmıştır (126).

Yapılan bir çalışmada bir HPLC sistemi (SOURCE® 15Q anion-exchange column Amersham Biosciences) farklı bir CE (CEofix™ CDT assay, Europe 844111046 from Analis Belgium) sistemi ile karşılaştırılmıştır. Bu çalışmada her iki sistemin de tekrarlanabilirliğinin iyi olduğu, tek tek Tf izoformlarının kantitasyonuna olanak sağlayan benzer pik paternlerinin izlendiği bildirilmiştir. HPLC ile sonuçların biraz daha yüksek olduğu saptanmıştır. Bu durum HPLC yönteminde pik alanının bir baseline göre hesaplama yapılırken, CE'de ise vadiler arasından yapılması ile açıklanmıştır. Ayrıca, CE sisteminin HPLC'ye göre daha az duyarlı olduğu belirtilmiştir. Neden olarak elektroforez dedeksiyonun 200 nm de peptid bağına spesifik iken, HPLC sisteminde Tf-ferrik iyonuna spesifik dalga boyunda ölçüm yapılması olarak gösterilmiştir (141). Kapiller elektroforez ile 200 nm'de yapılan nonspesifik peptid bağı UV dedeksiyonunun yanlış sonuçlara neden olabileceği ileri sürülmüştür. Bu nedenle ileri analiz yöntemi olarak CE' den sonra HPLC yönemi ile tekrar doğrulamanın yapılması tavsiye edilmektedir (142). Günümüz teknolojisi, her geçen gün varolan tekniklerin geliştirilmesi ve bunun

yanında yeni metodların kullanıma girmesi ile daha hassas ölçümlere olanak sağlamaktadır. Transferrin izoformları analizinde de LC-MS kullanımını üzerine çalışmalar yapılmaktadır. Bu metod ile analizde numune hazırlığının olmaması, analiz süresinin oldukça kısa olduğu (10 dk/örnek), 5 mL serum örneği kullanılarak veya kuru kan örneğinde çalışma yapılabileceği diğer metodlar (İEO, HPLC ve CE) gibi demir ile saturasyon gerekmediği ve pI noktada kayma gibi (sialik asit sayı eksikliği gibi) problemlerle karşı karşıya kalınmadığı dolayısıyla yanlış pozitif CDG sonucunun önüne geçmesi gibi avantajları mevcuttur (82).

Yapılan tüm bu çalışmalarda, bizim çalışmamızda da olduğu gibi hiçbir yöntemin kusursuz olmadığı görülmektedir. Birçok değişkenin sistemler üzerinde farklı etkilere neden olduğu izlenmektedir. Klinik kullanımda, tüm bu kısıtlılıkların göz önünde bulundurulması ve uygun red kriterlerinin belirlenmesi ile doğru sonuçlar elde etmek mümkün olabilecektir.

## 6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda iki farklı kapiller elektroforez sistemi (1. CE sistemi: Sebia 2 Capillary<sup>TM</sup> Sebia, France ve 2. CE sistemi: Helena Biosciences V8® E-class analizörü) HPLC sistemi ile (CDT test kiti UV/VIS-FAST EUREKA reagent/ Shimadzu, Europe) transferrin izoformları analiz performansları ve çeşitli interferanslar (hemoliz, lipemi, bilirubin ve betada ilerleyen monoklonal pik) yönünden karşılaştırıldı. Buna göre:

1) Gün içi ve günler arası %CV değerleri 1. CE sisteminde diğer sistemlerden daha düşük bulundu. 1.CE sisteminde Tf izoformlarının otomatize olarak belirlenmesinin düşük %CV değerlerinin sağlanmasında önemli bir etken olduğu sonucuna varıldı.

2) Disiyalo-Tf izoformları her üç sistemde birbiri ile uyumlu bulundu. Trisiyalo-, tetrasiyalo-, pentasiyalo-Tf izoformları arasında uyum bulunamadı. CDT analizleri için yöntemler arasında uyumlu sonuçlar alınması mümkün olsa da CDG değerlendirmeleri için izoform paternlerinin tümünün birlikte değerlendirilmesinin gerekli olduğu sonucuna varıldı. Özellikle tüm Tf izoform paterninin birlikte yorumlanmasının gerektiği, CDG tarama analizlerinde 1.CE gibi otomatize analizlerin tercih edilmesi gerektiği sonucuna varıldı.

3) İnterferens çalışmalarında:

Hemolizden etkilenmeye bakıldığında, tüm izoformlar için en az değişimin 1.CE sisteminde olduğu saptandı. Ayrıca 1. CE ve HPLC yöntemleri için hemolizden en az etkilenen izoformun tetrasiyalo izoformu olduğu saptandı.

Hemoglobin interferansının disiyalo-Tf üzerinde belirgin negatif yönde etkisi saptandı. Özellikle CDT analizleri için hemolizin 125 mg/dL Hb düzeylerinden itibaren negatif etkisinin göz önünde bulundurulmasının gerektiği sonucuna varıldı. Yine, CDG taramalarında da hemolizli numunelerin yanlış negatif sonuçlara neden olabileceği bu nedenle hemolizli numunelerin kesinlikle red edilmesi gerektiği düşünüldü.

Kapiller elektroforez yöntemlerinin lipemiden etkilenmediği, öte yandan HPLC yönteminin belirgin olarak etkilendiği belirlendi.

Genel olarak değerlendirildiğinde, 1. CE sistemi hemoliz, lipemi ve bilirübinden en az etkilenen yöntem olarak saptandı.

HPLC sisteminin beta-bölgesindeki monoklonal piklerden en az etkilenen yöntem olduğu saptandı. Ayrıca, anti-serum uygulamasının beta-bölgesindeki monoklonal piklerden kaynaklanan etkileşimleri 1. CE sisteminde değiştirmezken HPLC sisteminde yararlı olduğu saptandı. Monoklonal pik şüphesi bulunan hastalar için serum protein elektroforezi ile monoklonal pik değerlendirmesi yapılmasının uygun olduğu sonucuna varıldı.

4) Tip 1 CDG düşünölen hasta sonuçları 1.CE ve HPLC sistemleri arasında uyumlu olarak izlendi.



## 7. KAYNAKÇA

1. Yang F, Lum JB, McGill JR, Moore CM, Naylor SL, van Bragt PH, et al. Human transferrin: cDNA characterization and chromosomal localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1984;81(9):2752-6.
2. GL H. Amino acids, peptides, and proteins. In: Burtis CA AE, Bruns DE, editor. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5 ed: Elsevier; 2012. p. 509-63.
3. Crichton RR, Charlotheaux-Wauters M. Iron transport and storage. *European journal of biochemistry*. 1987;164(3):485-506.
4. Hackler R, Arndt T, Helwig-Rolig A, Kropf J, Steinmetz A, Schaefer JR. Investigation by isoelectric focusing of the initial carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and non-CDT transferrin isoform fractionation step involved in determination of CDT by the ChronAlcoI.D. assay. *Clinical chemistry*. 2000;46(4):483-92.
5. Nelson DL CM. *Lehninger Principles of Biochemistry*. In: DL Nelson CM, editor. Sixth ed: Macmillan International Edition; 2013. p. 243-80.
6. Varki A. Factors controlling the glycosylation potential of the Golgi apparatus. *Trends in cell biology*. 1998;8(1):34-40.
7. Nakayama Yoshiaki NN, Tsuji Daisuke , Itoh Koji, Kurosaka Akira. Genetic Diseases Associated with Protein Glycosylation Disorders in Mammals. 2013 Available from: <http://www.intechopen.com/books/genetic-disorders/genetic-diseases-associated-with-protein-glycosylation-disorders-in-mammals>. In: Genetic Disorders [Internet].
8. Jaeken J. Komrower Lecture. Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's all in it! *Journal of inherited metabolic disease*. 2003;26(2-3):99-118.

9. Varki A, Sharon N. Historical Background and Overview. In: Varki A, Cummings RD, Esko JD, Freeze HH, Stanley P, Bertozzi CR, et al., editors. *Essentials of Glycobiology*. 2nd ed. Cold Spring Harbor (NY)2009.
10. David A, Bender P.A.M, Botham K.M., Murray R.K. Glycoproteins. . In: Murray RK, editor. *Harper's Illustrated Biochemistry*. 26 ed2003.
11. Jaeken J, Matthijs G. Congenital disorders of glycosylation. *Annual review of genomics and human genetics*. 2001;2:129-51.
12. David L. Nelson MMC. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 5 ed: W. H. Freeman And Company; 2009.
13. Bertozzi CR, Kiessling LL. Chemical glycobiology. *Science*. 2001;291(5512):2357-64.
14. van Eijk HG, van Noort WL, de Jong G, Koster JF. Human serum sialo transferrins in diseases. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1987;165(2-3):141-5.
15. Jaeken J, Carchon H. Congenital disorders of glycosylation: a booming chapter of pediatrics. *Current opinion in pediatrics*. 2004;16(4):434-9.
16. Pronicka E, Adamowicz M, Kowalik A, Ploski R, Radomyska B, Rogaszewska M, et al. Elevated carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and its normalization on dietary treatment as a useful biochemical test for hereditary fructose intolerance and galactosemia. *Pediatric research*. 2007;62(1):101-5.
17. Piagnerelli M, Boudjeltia KZ, Nuyens V, De Backer D, Su F, Wang Z, et al. Rapid alterations in transferrin sialylation during sepsis. *Shock*. 2005;24(1):48-52.

18. Arndt T. Carbohydrate-deficient transferrin as a marker of chronic alcohol abuse: a critical review of preanalysis, analysis, and interpretation. *Clinical chemistry*. 2001;47(1):13-27.
19. Stibler H, Borg S. Carbohydrate composition of serum transferrin in alcoholic patients. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1986;10(1):61-4.
20. Reif A, Fallgatter AJ, Schmidtke A. Carbohydrate-deficient transferrin parallels disease severity in anorexia nervosa. *Psychiatry research*. 2005;137(1-2):143-6.
21. Morava E, Wevers RA, Cantagrel V, Hoefsloot LH, Al-Gazali L, Schoots J, et al. A novel cerebello-ocular syndrome with abnormal glycosylation due to abnormalities in dolichol metabolism. *Brain : a journal of neurology*. 2010;133(11):3210-20.
22. Krawitz PM, Murakami Y, Riess A, Hietala M, Kruger U, Zhu N, et al. PGAP2 mutations, affecting the GPI-anchor-synthesis pathway, cause hyperphosphatasia with mental retardation syndrome. *American journal of human genetics*. 2013;92(4):584-9.
23. Scott K, Gadomski T, Kozicz T, Morava E. Congenital disorders of glycosylation: new defects and still counting. *Journal of inherited metabolic disease*. 2014;37(4):609-17.
24. Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2010;1214:190-8.
25. Guillard M, Morava E, van Delft FL, Hague R, Korner C, Adamowicz M, et al. Plasma N-glycan profiling by mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation type II. *Clinical chemistry*. 2011;57(4):593-602.

26. Theodore M, Morava E. Congenital disorders of glycosylation: sweet news. *Current opinion in pediatrics*. 2011;23(6):581-7.
27. Schachter H. Congenital disorders involving defective N-glycosylation of proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2001;58(8):1085-104.
28. Mohamed M, Guillard M, Wortmann SB, Cirak S, Marklova E, Michelakakis H, et al. Clinical and diagnostic approach in unsolved CDG patients with a type 2 transferrin pattern. *Biochimica et biophysica acta*. 2011;1812(6):691-8.
29. Jaeken J V-LM, Casaer P, L Snoeck, Corbeel L, Eggermont E, Eeckels R. Familial psychomotor retardation with markedly fluctuating serum prolactin, FSH and GH levels, partial TBG-deficiency, increased serum arylsulphatase A and increased CSF protein: a new syndrome?: 90. *Pediatric research*. 1980;14:179.
30. Van Schaftingen E, Jaeken J. Phosphomannomutase deficiency is a cause of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type I. *FEBS letters*. 1995;377(3):318-20.
31. de Zegher F, Jaeken J. Endocrinology of the carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1 from birth through adolescence. *Pediatric research*. 1995;37(4 Pt 1):395-401.
32. Marquardt T, Denecke J. Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies. *European journal of pediatrics*. 2003;162(6):359-79.
33. Imtiaz F, Worthington V, Champion M, Beesley C, Charlwood J, Clayton P, et al. Genotypes and phenotypes of patients in the UK with carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type 1. *Journal of inherited metabolic disease*. 2000;23(2):162-74.

34. Jaeken J, Stibler H, Hagberg B. The carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. A new inherited multisystemic disease with severe nervous system involvement. *Acta paediatrica Scandinavica Supplement*. 1991;375:1-71.
35. Varki AS, N. *Essentials of Glycobiology*. Second ed. The Consortium of Glycobiology Editors LJ, California, editor: Cold Spring Harbor NY; 2009.
36. Keir G, Winchester BG, Clayton P. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: inborn errors of protein glycosylation. *Annals of clinical biochemistry*. 1999;36 ( Pt 1):20-36.
37. Jaeken J. Disialotransferrin developmental deficiency syndrome and olivopontocerebellar atrophy. *Archives of disease in childhood*. 1989;64(5):764-5.
38. Pancho C, Garcia-Cazorla A, Varea V, Artuch R, Ferrer I, Vilaseca MA, et al. Congenital disorder of glycosylation type Ia revealed by hypertransaminasemia and failure to thrive in a young boy with normal neurodevelopment. *Journal of pediatric gastroenterology and nutrition*. 2005;40(2):230-2.
39. de Koning TJ, Dorland L, van Diggelen OP, Boonman AM, de Jong GJ, van Noort WL, et al. A novel disorder of N-glycosylation due to phosphomannose isomerase deficiency. *Biochemical and biophysical research communications*. 1998;245(1):38-42.
40. Niehues R, Hasilik M, Alton G, Korner C, Schiebe-Sukumar M, Koch HG, et al. Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type Ib. Phosphomannose isomerase deficiency and mannose therapy. *The Journal of clinical investigation*. 1998;101(7):1414-20.
41. Babovic-Vuksanovic D, Patterson MC, Schwenk WF, O'Brien JF, Vockley J, Freeze HH, et al. Severe hypoglycemia as a presenting symptom of

- carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome. *The Journal of pediatrics*. 1999;135(6):775-81.
42. Marklova E, Albahri Z. Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;385(1-2):6-20.
  43. Dobrowolski SF, Banas RA, Suzow JG, Berkley M, Naylor EW. Analysis of common mutations in the galactose-1-phosphate uridyl transferase gene: new assays to increase the sensitivity and specificity of newborn screening for galactosemia. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2003;5(1):42-7.
  44. Sturiale L, Barone R, Fiumara A, Perez M, Zaffanello M, Sorge G, et al. Hypoglycosylation with increased fucosylation and branching of serum transferrin N-glycans in untreated galactosemia. *Glycobiology*. 2005;15(12):1268-76.
  45. Charlwood J, Clayton P, Keir G, Mian N, Winchester B. Defective galactosylation of serum transferrin in galactosemia. *Glycobiology*. 1998;8(4):351-7.
  46. Stibler H, von Döbeln U, Kristiansson B, Guthenberg C. Carbohydrate-deficient transferrin in galactosaemia. *Acta paediatrica*. 1997;86(12):1377-8.
  47. Friedman G, Silva E, Vincent JL. Has the mortality of septic shock changed with time. *Critical care medicine*. 1998;26(12):2078-86.
  48. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *The New England journal of medicine*. 1999;340(6):448-54.
  49. Robert M. Kliegman REB HBJ, Bonita F. Stanton. Defects in Metabolism of Carbohydrates. In: Priya S KY-T, editor. *Nelson Textbook of Pediatrics*. 18 ed: Saunders-Elsevier; 2007. p. 601-20.

50. Sillanaukea P, Strid N, Jousilahti P, Vartiainen E, Poikolainen K, Nikkari S, et al. Association of self-reported diseases and health care use with commonly used laboratory markers for alcohol consumption. *Alcohol and alcoholism*. 2001;36(4):339-45.
51. Gruszewska E, Chludzinska A, Chrostek L, Cylwik B, Gindzienska-Sieskiewicz E, Szmitkowski M, et al. Carbohydrate-deficient transferrin depends on disease activity in rheumatoid arthritis and systemic sclerosis. *Scandinavian journal of rheumatology*. 2013;42(3):203-6.
52. Feelders RA, Vreugdenhil G, de Jong G, Swaak AJ, van Eijk HG. Transferrin microheterogeneity in rheumatoid arthritis. Relation with disease activity and anemia of chronic disease. *Rheumatology international*. 1992;12(5):195-9.
53. de Jong G, van Noort WL, Feelders RA, de Jeu-Jaspars CM, van Eijk HG. Adaptation of transferrin protein and glycan synthesis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1992;212(1-2):27-45.
54. Reif A, Keller H, Schneider M, Kamolz S, Schmidtke A, Fallgatter AJ. Carbohydrate-deficient transferrin is elevated in catabolic female patients. *Alcohol and alcoholism*. 2001;36(6):603-7.
55. Arndt T, Erkens M, Holtkamp K, Keller T, Gressner AM. High prevalence of increased trisialotransferrin concentrations in patients with anorexia nervosa: implications for determination of carbohydrate-deficient transferrin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;379(1-2):150-3.
56. Murawaki Y, Sugisaki H, Yuasa I, Kawasaki H. Serum carbohydrate-deficient transferrin in patients with nonalcoholic liver disease and with hepatocellular carcinoma. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1997;259(1-2):97-108.

57. Ramdani B, Nuyens V, Codden T, Perpete G, Colicis J, Lenaerts A, et al. Analyte comigrating with trisialotransferrin during capillary zone electrophoresis of sera from patients with cancer. *Clinical chemistry*. 2003;49(11):1854-64.
58. Stibler H. Carbohydrate-deficient transferrin in serum: a new marker of potentially harmful alcohol consumption reviewed. *Clinical chemistry*. 1991;37(12):2029-37.
59. Arndt T, Guessregen B, Hallermann D, Nauck M, Terjung D, Weckesser H. Forensic analysis of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) by HPLC--statistics and extreme CDT values. *Forensic science international*. 2008;175(1):27-30.
60. Sillanaukee P, Strid N, Allen JP, Litten RZ. Possible reasons why heavy drinking increases carbohydrate-deficient transferrin. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2001;25(1):34-40.
61. Arndt T, Meier U, Nauck M, Gressner AM. Primary biliary cirrhosis is not a clinical condition for increased carbohydrate-deficient transferrin: experience with four independent CDT analysis methods. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2006;372(1-2):184-7.
62. Behrens UJ, Worner TM, Lieber CS. Changes in carbohydrate-deficient transferrin levels after alcohol withdrawal. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1988;12(4):539-44.
63. Stibler H, Borg S. Glycoprotein glycosyltransferase activities in serum in alcohol-abusing patients and healthy controls. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation*. 1991;51(1):43-51.

64. Ponnio M, Alho H, Nikkari ST, Olsson U, Rydberg U, Sillanaukee P. Serum sialic acid in a random sample of the general population. *Clinical chemistry*. 1999;45(10):1842-9.
65. Martensson O, Schink E, Brandt R. Diurnal variability and in vitro stability of carbohydrate-deficient transferrin. *Clinical chemistry*. 1998;44(10):2226-7.
66. Appenzeller BM, Wennig R. Altered distribution of transferrin isoforms according to serum storage conditions. *Clinical chemistry*. 2005;51(11):2159-62.
67. Helander A, Husa A, Jeppsson JO. Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum. *Clinical chemistry*. 2003;49(11):1881-90.
68. Oberrauch W, Bergman AC, Helander A. HPLC and mass spectrometric characterization of a candidate reference material for the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin (CDT). *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;395(1-2):142-5.
69. Jeppsson JO, Arndt T, Schellenberg F, Wielders JP, Anton RF, Whitfield JB, et al. Toward standardization of carbohydrate-deficient transferrin (CDT) measurements: I. Analyte definition and proposal of a candidate reference method. *Clin Chem Lab Med*. 2007;45(4):558-62.
70. De Feo TM, Fargion S, Duca L, Mattioli M, Cappellini MD, Sampietro M, et al. Carbohydrate-deficient transferrin, a sensitive marker of chronic alcohol abuse, is highly influenced by body iron. *Hepatology*. 1999;29(3):658-63.
71. Jensen PD, Peterslund NA, Poulsen JH, Jensen FT, Christensen T, Ellegaard J. The effect of iron overload and iron reductive treatment on the serum concentration of carbohydrate-deficient transferrin. *British journal of haematology*. 1994;88(1):56-63.

72. Bergstrom JP, Helander A. HPLC evaluation of clinical and pharmacological factors reported to cause false-positive carbohydrate-deficient transferrin (CDT) levels. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2008;389(1-2):164-6.
73. Sharpe PC, McBride R, Archbold GP. Biochemical markers of alcohol abuse. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*. 1996;89(2):137-44.
74. Tamaro G, Perticarari S, Princi T, Accardo A, Donato M, Vascotto F, et al. A problem solving in driving tests which method for carbohydrate-deficient transferrin (cdt) in adolescents affected by celiac disease? *Biomedical sciences instrumentation*. 2008;44:525-30.
75. Stauber RE, Vollmann H, Pessler I, Jauk B, Lipp R, Halwachs G, et al. Carbohydrate-deficient transferrin in healthy women: relation to estrogens and iron status. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1996;20(6):1114-7.
76. Lott JA, Curtis LW, Thompson A, Gechlik GA, Rund DA. Reported alcohol consumption and the serum carbohydrate-deficient transferrin test in third-year medical students. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1998;276(2):129-41.
77. Sillanaukee P, Alho H, Strd N, Jousilahti P, Vartiainen E, Olsson U, et al. Effect of hormone balance on carbohydrate-deficient transferrin and gamma-glutamyltransferase in female social drinkers. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 2000;24(10):1505-9.
78. Meerkerk GJ, Njoo KH, Bongers IM, Trienekens P, van Oers JA. The specificity of the CDT assay in general practice: the influence of common chronic diseases and medication on the serum CDT concentration. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1998;22(4):908-13.

79. Mundt MP, Kraus CK, Fleming MF. Potential drug interactions with the percent carbohydrate-deficient transferrin (%CDT) test, a new alcohol biomarker. *Pharmacotherapy*. 2004;24(7):831-7.
80. de Jong G, van Dijk JP, van Eijk HG. The biology of transferrin. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1990;190(1-2):1-46.
81. Hackler R, Arndt T, Kleine TO, Gressner AM. Effect of separation conditions on automated isoelectric focusing of carbohydrate-deficient transferrin and other human isotransferrins using the PhastSystem. *Analytical biochemistry*. 1995;230(2):281-9.
82. Lacey JM, Bergen HR, Magera MJ, Naylor S, O'Brien JF. Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry. *Clinical chemistry*. 2001;47(3):513-8.
83. Kamboh MI, Ferrell RE. Human transferrin polymorphism. *Human heredity*. 1987;37(2):65-81.
84. Chasteen ND. [updated <https://ceps.unh.edu/faculty/chasteen2016>, 12, 12]. Available from: <https://ceps.unh.edu/faculty/chasteen>.
85. CK Wong CL. Available from: <http://www.medicine.org.hk/hkscs/communication/v5n1/img00035.gif>.
86. Goreta SS, Dabelic S, Dumic J. Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation. *Biochimica medica*. 2012;22(2):156-70.
87. Stibler H, Allgulander C, Borg S, Kjellin KG. Abnormal microheterogeneity of transferrin in serum and cerebrospinal fluid in alcoholism. *Acta medica Scandinavica*. 1978;204(1-2):49-56.

88. Stibler H, Kjellin KG. Isoelectric focusing and electrophoresis of the CSF proteins in tremor of different origins. *Journal of the neurological sciences*. 1976;30(2-3):269-85.
89. Bean P, Peter JB. Allelic D variants of transferrin in evaluation of alcohol abuse: differential diagnosis by isoelectric focusing-immunoblotting-laser densitometry. *Clinical chemistry*. 1994;40(11 Pt 1):2078-83.
90. Grunewald S, Matthijs G, Jaeken J. Congenital disorders of glycosylation: a review. *Pediatric research*. 2002;52(5):618-24.
91. Jaeken J, van den Heuvel L. Congenital Disorders of Glycosylation. In: Blau N, Duran M, Gibson KM, Dionisi-Vici C, editors. *Physician's guide to the diagnosis, treatment, and follow-up of inherited metabolic diseases*. New York: Springer; 2014. p. 483-514.
92. Fang J, Peters V, Assmann B, Korner C, Hoffmann GF. Improvement of CDG diagnosis by combined examination of several glycoproteins. *Journal of inherited metabolic disease*. 2004;27(5):581-90.
93. Lefeber DJ, Morava E, Jaeken J. How to find and diagnose a CDG due to defective N-glycosylation. *Journal of inherited metabolic disease*. 2011;34(4):849-52.
94. Timal S, Hoischen A, Lehle L, Adamowicz M, Huijben K, Sykut-Cegielska J, et al. Gene identification in the congenital disorders of glycosylation type I by whole-exome sequencing. *Human molecular genetics*. 2012;21(19):4151-61.
95. Tegtmeier LC, Rust S, van Scherpenzeel M, Ng BG, Losfeld ME, Timal S, et al. Multiple phenotypes in phosphoglucomutase 1 deficiency. *The New England journal of medicine*. 2014;370(6):533-42.

96. Wada Y. Mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG. *Journal of chromatography B, Analytical technologies in the biomedical and life sciences*. 2006;838(1):3-8.
97. Güler T. Protein izolasyonu, Analizi ve Saflaştırılması. In: Temizkan Güler AN, editor. *Moleküler Biyolojide Kullanılan Yöntemler*. 3 ed. İstanbul: Nobel Tıp Kitabevleri 2008. p. 161-273.
98. Karcher R, Landers J. Electrophoresis. In: Burtis C, Ashwood E, Bruns D, editors. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 5 ed: Elsevier; 2012. p. 287-305.
99. Bean P, Peter JB. A new approach to quantitate carbohydrate-deficient transferrin isoforms in alcohol abusers: partial iron saturation in isoelectric focusing/immunoblotting and laser densitometry. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1993;17(6):1163-70.
100. Kapur A, Wild G, Milford-Ward A, Triger DR. Carbohydrate deficient transferrin: a marker for alcohol abuse. *Bmj*. 1989;299(6696):427-31.
101. Vesterberg O, Petren S, Schmidt D. Increased concentrations of a transferrin variant after alcohol abuse. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 1984;141(1):33-9.
102. Xin Y, Lasker JM, Rosman AS, Lieber CS. Isoelectric focusing/western blotting: a novel and practical method for quantitation of carbohydrate-deficient transferrin in alcoholics. *Alcoholism, clinical and experimental research*. 1991;15(5):814-21.
103. Schmalzing D, Nashabeh W. Capillary electrophoresis based immunoassays: a critical review. *Electrophoresis*. 1997;18(12-13):2184-93.

104. Bao JJ. Capillary electrophoretic immunoassays. *Journal of chromatography B, Biomedical sciences and applications*. 1997;699(1-2):463-80.
105. Moser AC, Hage DS. Capillary electrophoresis-based immunoassays: principles and quantitative applications. *Electrophoresis*. 2008;29(16):3279-95.
106. Phillips TM, Wellner EF. Analysis of inflammatory biomarkers from tissue biopsies by chip-based immunoaffinity CE. *Electrophoresis*. 2007;28(17):3041-8.
107. Tao L, Kennedy RT. On-line competitive immunoassay for insulin based on capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. *Analytical chemistry*. 1996;68(22):3899-906.
108. Apori A, Herr A. Capillary Electrophoresis. In: Phillips T, Kalish H, editors. *Clinical Applications of Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*. New York: humana; 2013.
109. Tagliaro F, Crivellente F, Manetto G, Puppi I, Deyl Z, Marigo M. Optimized determination of carbohydrate-deficient transferrin isoforms in serum by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*. 1998;19(16-17):3033-9.
110. Caslavaska J, Allemann D, Thormann W. Analysis of urinary drugs of abuse by a multianalyte capillary electrophoretic immunoassay. *Journal of chromatography A*. 1999;838(1-2):197-211.
111. Kenan N, Husand S, Helander A. Importance of HPLC confirmation of problematic carbohydrate-deficient transferrin (CDT) results from a multicapillary electrophoresis routine method. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(23-24):1945-50.
112. Stibler H, Borg S, Joustra M. Micro anion exchange chromatography of carbohydrate-deficient transferrin in serum in relation to alcohol consumption

- (Swedish Patent 8400587-5). Alcoholism, clinical and experimental research. 1986;10(5):535-44.
113. Jeppsson JO, Kristensson H, Fimiani C. Carbohydrate-deficient transferrin quantified by HPLC to determine heavy consumption of alcohol. *Clinical chemistry*. 1993;39(10):2115-20.
114. Wuhrer M. Glycomics using mass spectrometry. *Glycoconjugate journal*. 2013;30(1):11-22.
115. Novotny MV, Alley WR, Jr., Mann BF. Analytical glycobiology at high sensitivity: current approaches and directions. *Glycoconjugate journal*. 2013;30(2):89-117.
116. Perez B, Medrano C, Ecay MJ, Ruiz-Sala P, Martinez-Pardo M, Ugarte M, et al. A novel congenital disorder of glycosylation type without central nervous system involvement caused by mutations in the phosphoglucomutase 1 gene. *Journal of inherited metabolic disease*. 2013;36(3):535-42.
117. Landberg E, Astrom E, Kagedal B, Pahlsson P. Disialo-trisialo bridging of transferrin is due to increased branching and fucosylation of the carbohydrate moiety. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2012;414:58-64.
118. Neususs C, Demelbauer U, Pelzing M. Glycoform characterization of intact erythropoietin by capillary electrophoresis-electrospray-time of flight-mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2005;26(7-8):1442-50.
119. Gimenez E, Benavente F, Barbosa J, Sanz-Nebot V. Analysis of intact erythropoietin and novel erythropoiesis-stimulating protein by capillary electrophoresis-electrospray-ion trap mass spectrometry. *Electrophoresis*. 2008;29(10):2161-70.

120. Peter J, Unverzagt C, Engel WD, Renauer D, Seidel C, Hosel W. Identification of carbohydrate deficient transferrin forms by MALDI-TOF mass spectrometry and lectin ELISA. *Biochim Biophys Acta* 1998 Aug 24;1381(3):356. *Biochimica et biophysica acta*. 1998;1380(1):93-101.
121. Wopereis S, Morava E, Grunewald S, Adamowicz M, Huijben KM, Lefeber DJ, et al. Patients with unsolved congenital disorders of glycosylation type II can be subdivided in six distinct biochemical groups. *Glycobiology*. 2005;15(12):1312-9.
122. Clinical and Laboratory Standards Institute. Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline-Second Edition. CLSI document EP7-A2 (ISBN 1-56238-584-4). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
123. Meites S. Letter: Reproducibly simulating hemolysis, for evaluating its interference with chemical methods. *Clinical chemistry*. 1973;19(11):1319.
124. CDT TEST IN SERUM BY UV / VIS- FAST – Code Z68110 Release N° 003 March 2012. EUREKA srl – LAB DIVISION 60033 Chiaravalle (AN) ITALY.
125. Schellenberg F, Wielders JP. Evaluation of capillary electrophoresis assay for CDT on SEBIA's Capillarys System: intra and inter laboratory precision, reference interval and cut-off. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2010;411(23-24):1888-93.
126. Marinova M, Artusi C, Baggio S, Zaninotto M, Plebani M. First evaluation of a multi-capillary electrophoresis CDT assay on Helena Biosciences' V8 analyser. *Clinical biochemistry*. 2014;47(16-17):228-32.
127. Sebia I. Capillarys CDT Training Manual Version 5.20 (1-800-835-6497) Sebia Inc. Norcross, Georgia 30093; 2005.

128. C. A, D. Ö, Y. G. Sağlık Araştırmalarında Sınıf İçi Korelasyon Katsayısının Kullanımı. *Türkiye Klinikleri Journal of Biostatistics*, . 2009;1(2):59-64.
129. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;1(8476):307-10.
130. Woolley T, Allen P, Fitzgerald L, Izzard L, Rutter E. Sebia Capillarys 2 versus the Helena Biosciences V8 capillary electrophoresis analyser for carbohydrate-deficient transferrin measurement: comparison and analytical evaluation. *British journal of biomedical science*. 2015;72(1):23-7.
131. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Trevisan MT, Floreani M, Tagliaro F. Analysis of carbohydrate-deficient transferrin: comparative evaluation of turbidimetric immunoassay, capillary zone electrophoresis, and HPLC. *Clinical chemistry*. 2005;51(12):2368-71.
132. Bortolotti F, De Paoli G, Pascali JP, Tagliaro F. Fully automated analysis of Carbohydrate-Deficient Transferrin (CDT) by using a multicapillary electrophoresis system. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2007;380(1-2):4-7.
133. Carchon HA, Chevigne R, Falmagne JB, Jaeken J. Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin. *Clinical chemistry*. 2004;50(1):101-11.
134. Barlow IM, Kemp ML. Evaluation of the Sebia Capillarys zone electrophoresis system for monoclonal paraprotein analysis. *British journal of biomedical science*. 2010;67(3):150-3.
135. Weykamp C, Wielders J, Helander A, Anton RF, Bianchi V, Jeppsson JO, et al. Harmonization of measurement results of the alcohol biomarker carbohydrate-deficient transferrin by use of the toolbox of technical procedures of the

International Consortium for Harmonization of Clinical Laboratory Results. *Clinical chemistry*. 2014;60(7):945-53.

136. Arizaga Rodriguez S, Blanco Gonzalez E, Alvarez Llamas G, Montes-Bayon M, Sanz-Medel A. Detection of transferrin isoforms in human serum: comparison of UV and ICP-MS detection after CZE and HPLC separations. *Analytical and bioanalytical chemistry*. 2005;383(3):390-7.
137. Delanghe JR, De Buyzere ML. Carbohydrate deficient transferrin and forensic medicine. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*. 2009;406(1-2):1-7.
138. Schellenberg F, Mennetrey L, Girre C, Nalpas B, Pages JC. Automated measurement of carbohydrate-deficient transferrin using the Bio-Rad %CDT by the HPLC test on a Variant HPLC system: evaluation and comparison with other routine procedures. *Alcohol and alcoholism*. 2008;43(5):569-76.
139. Nikolac N. Lipemia: causes, interference mechanisms, detection and management. *Biochemia medica*. 2014;24(1):57-67.
140. Lanz C, Kuhn M, Deiss V, Thormann W. Improved capillary electrophoresis method for the determination of carbohydrate-deficient transferrin in patient sera. *Electrophoresis*. 2004;25(14):2309-18.
141. Helander A, Wienders JP, Te Stroet R, Bergstrom JP. Comparison of HPLC and capillary electrophoresis for confirmatory testing of the alcohol misuse marker carbohydrate-deficient transferrin. *Clinical chemistry*. 2005;51(8):1528-31.
142. Marti U, Joneli J, Caslavskaja J, Thormann W. Determination of carbohydrate-deficient transferrin in human serum by two capillary zone electrophoresis methods and a direct immunoassay: comparison of patient data. *Journal of separation science*. 2008;31(16-17):3079-87.





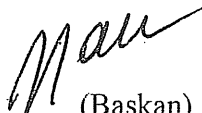




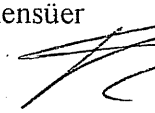
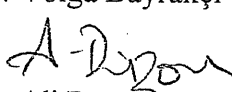

**T.C.**  
**HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurulu**

Sayı : 16969557 - 480

**ARAŞTIRMA PROJESİ DEĞERLENDİRME RAPORU**

**Toplantı Tarihi** : 15.04.2015 ÇARŞAMBA  
**Toplantı No** : 2015/08  
**Proje No** : GO 15/262 (Değerlendirme Tarihi: 01.04.2015)  
**Karar No** : GO 15/262 - 08

Üniversitemiz Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerinden Doç.Dr. Aslı PINAR'ın sorumlu araştırmacısı olduğu, Arş.Gör.Dr. Arzu ALYAKUT'un uzmanlık tezi olan, Prof.Dr. Filiz AKBIYIK ile birlikte çalışacakları GO 15/262 kayıt numaralı ve "*Transferrin İzofomları Analizinde Elektroforez ve Sıvı Kromatografisi Yöntemlerinin Karşılaştırılması*" başlıklı proje önerisi araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş olup, etik açıdan uygun bulunmuştur.

- |                                           |                                                                                     |        |                                          |
|-------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------|------------------------------------------|
| 1. Prof. Dr. Nurten Akarsu (Başkan)       |  | İZİNLİ | 9 Prof. Dr. Rahime Nohutçu (Üye)         |
| 2. Prof. Dr. Nüket Örnek Buken (Üye)      |  | İZİNLİ | 10. Prof. Dr. R. Köksal Özgül (Üye)      |
| 3. Prof. Dr. M. Yıldırım Sara (Üye)       |  |        | 11. Prof. Dr. Ayşe Lale Doğan (Üye)      |
| 4. Prof. Dr. Sevda F. Müftüoğlu (Üye)     |  |        | 12. Doç. Dr. S. Kutay Demirkan (Üye)     |
| 5. Prof. Dr. Cenk Sökmensüer (Üye)        |  |        | 13 Prof. Dr Leyla Dinç (Üye)             |
| 6. Prof. Dr. Volga Bayrakçı Tunay (Üye)   |  |        | 14. Prof. Dr. Hatice Doğan Buzoğlu (Üye) |
| 7. Prof. Dr. Ali Düzova (Üye)             |  |        | 15. Av. Meltem Onurlu (Üye)              |
| 8. Yrd. Doç. Dr. H. Hüsrev Turnagöl (Üye) |  |        |                                          |

## ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU

### *(Hekimin Açıklaması)*

“Transferrin izoformları analizinde elektroforez ve sıvı kromatografisi yöntemlerinin karşılaştırılması” adı altında yeni bir araştırma yapmaktayız.

Sizin de bu araştırmaya katılmanızı öneriyoruz. Ancak hemen söyleyelim ki bu araştırmaya katılıp katılmamakta serbestsiniz. Çalışmaya katılım gönüllülük esasına dayalıdır. Kararınızdan önce araştırma hakkında sizi bilgilendirmek istiyoruz. Bu bilgileri okuyup anladıktan sonra araştırmaya katılmak isterseniz formu imzalayınız.

Bu araştırmayı yapmak istememizin nedeni, konjenital glikozilasyon defekti taramasında kullanılan testin şuan hali hazırda kullandığımız yöntem olan kapiller elektroforez yöntemi ile bir başka yöntem olan yüksek basınçlı sıvı kromatografisi yöntemlerini karşılaştırarak bu hastalık için her iki yöntemin avantaj ve dezavantajlarını belirlemektir. Bu çalışmaya katılımınız araştırmanın başarısı için önemlidir.

Bu çalışma; hastanemize başvurunuz ve yine sizin başvurduğunuz kliniğin hastalığa dair herhangi bir şüphesi durumunda “transferrin izoformları analizi” test istemini yapması ve sizden alınan onay doğrultusunda sadece test isteminiz için alınan kan örneği (4 ml - 1 tüp) ile bu çalışma yapılacaktır. Eğer araştırmaya katılmayı kabul ederseniz, sizden bu çalışma için fazladan kan vermeniz istenmeyecektir ve daha sonra çalışmanın herhangi bir aşamasında gelip kan vermeniz istenmeyecektir. Alınan kanda doktorunuzun istemini yaptığı test dışında başka test çalışılmayacaktır. İleride yapılacak başka bir çalışma için saklanmayacaktır. Ancak örneğinizin artması durumunda yine onayınız olursa artan diğer tüm hasta örnekleri ile birleştirilip bir serum havuzu oluşturularak testi etkileyebilecek bazı parametrelerin (hemoliz, lipemi ve bilirübin) test üzerindeki olası etkileri incelenecektir.

### *Kan alınması sırasında oluşabilecek riskler:*

- 1-) İğne batmasına bağlı olarak az bir acı duyabilirsiniz.
- 2-) Az bir ihtimal de olsa iğne batması sonrasında kanamanın uzaması veya enfeksiyon riski vardır.

Bu çalışmaya katılmanız için sizden herhangi bir ücret istenmeyecektir. Çalışmaya katıldığınız için size ek bir ödeme de yapılmayacaktır.

Sizinle ilgili tıbbi bilgiler gizli tutulacak, ancak çalışmanın kalitesini denetleyen görevliler, etik kurullar ya da resmi makamlarca gereği halinde incelenebilecektir.

Bu çalışmaya katılmayı reddedebilirsiniz. Bu araştırmaya katılmak tamamen isteğe bağlıdır ve reddettiğiniz takdirde size uygulanan tedavide herhangi bir değişiklik olmayacaktır. Yine çalışmanın herhangi bir aşamasında onayınızı çekmek hakkına da sahipsiniz.

### *(Katılımcının/Hastanın Beyanı)*

Sayın Doç.Dr. Aslı Pınar tarafından Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında tıbbi bir araştırma yapılacağı belirtilerek bu araştırma ile ilgili yukarıdaki bilgiler bana aktarıldı. Bu bilgilerden sonra böyle bir araştırmaya “katılımcı” olarak davet edildim.

Eğer bu araştırmaya katılırsam hekim ile aramda kalması gereken bana ait bilgilerin gizliliğine bu araştırma sırasında da büyük özen ve saygı ile yaklaşılabileceğine inanıyorum. Araştırma sonuçlarının eğitim ve bilimsel amaçlarla kullanımı sırasında kişisel bilgilerimin ihtimamla korunacağı konusunda bana yeterli güven verildi.

Projenin yürütülmesi sırasında herhangi bir sebep göstermeden araştırmadan çekilebilirim. (*Ancak araştırmacıları zor durumda bırakmamak için araştırmadan çekileceğimi önceden bildirmemim uygun olacağına bilincindeyim*) Ayrıca tıbbi durumuma herhangi bir zarar verilmemesi koşuluyla araştırmacı tarafından araştırma dışı tutulabilirim.

Araştırma için yapılacak harcamalarla ilgili herhangi bir parasal sorumluluk altına girmiyorum. Bana da bir ödeme yapılmayacaktır.

İster doğrudan, ister dolaylı olsun araştırma uygulamasından kaynaklanan nedenlerle meydana gelebilecek herhangi bir sağlık sorunumun ortaya çıkması halinde, her türlü tıbbi müdahalenin sağlanacağı konusunda gerekli güvence verildi. (Bu tıbbi müdahalelerle ilgili olarak da parasal bir yük altına girmeyeceğim).

Bu araştırmaya katılmak zorunda değilim ve katılmayabilirim. Araştırmaya katılmam konusunda zorlayıcı bir davranışla karşılaşmış değilim. Eğer katılmayı reddedersen, bu durumun tıbbi bakımına ve hekim ile olan ilişkiye herhangi bir zarar getirmeyeceğini de biliyorum.

Bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılarıyla anlamış bulunmaktayım. Kendi başıma belli bir düşünme süresi sonunda adı geçen bu araştırma projesinde "katılımcı" olarak yer alma kararımı aldım. Bu konuda yapılan daveti büyük bir memnuniyet ve gönüllülük içerisinde kabul ediyorum.

İmzalı bu form kağıdının bir kopyası bana verilecektir.

**Katılımcı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

**Katılımcı Veli/Vasi**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza

**Görüşme tanığı**

Adı, soyadı:

Adres:

Tel.

İmza:

**Katılımcı ile görüşen hekim**

Adı soyadı, unvanı:

Adres:

Tel.

İmza

**Görüşme tarihi ve saati:**

- Tarafımdan alınan kodlanmış\* örneğin yalnızca önerilen çalışma için kullanımını onaylıyorum; ileride yapılması olası diğer çalışmalar için onay vermiyorum.
- Tarafımdan alınan kodlanmış örneğin, araştırma konusuyla bağlantılı olarak diğer hasta örnekleri ile birleştirilip havuz oluşturularak kullanılmasını onaylıyorum .

**\*Kodlanmış örnek:** Sizden alınan örneğine bir kod numarası verilir. Kod numarasını yalnızca araştırmacı bilir ve sizin kimlik bilgilerine yalnızca araştırmacı ulaşabilir. Böylece kimlik bilgileriniz gizli tutulmuş olur.

**ARAŞTIRMA AMAÇLI ÇALIŞMA İÇİN ÇOCUK RIZA FORMU**

Sevgili Kardeşim,

Benim adım Dr.Aslı PINAR doğuştan olan bir hastalığın tanısını en doğru şekilde koyabilmek amacıyla bir çalışma yapmaktayız. Böylece hastalarımıza hastalık tanısı koymak amacıyla hangi test yöntemi ile çalışacağımıza karar verebileceğiz. Araştırma ile yeni bilgileri öğreneceğiz. Bu araştırmaya katılmanı öneriyoruz.

Araştırmayı ben, Dr. Aslı PINAR ve başka bazı doktorlar birlikte yapıyoruz. Bu araştırmaya katılacak olursan senden kan alınacak, kan alınırken canın biraz acıyabilir ama çabuk geçecektir.

Bu araştırmanın sonuçları senin gibi doğuştan gelen bu hastalığa sahip çocuklar için yararlı bilgiler sağlayacaktır. Bu araştırmanın sonuçlarını başka doktorlara da söyleyeceğiz, sonuçları bildireceğiz ama senin adını söylemeyeceğiz.

Bu araştırmaya katılıp katılmamak için karar vermeden önce anne ve baban ile konuşup onlara danışmalısın. Onlara da bu araştırmadan bahsedip onaylarını/izinlerini alacağız. Anne ve baban tamam deseler bile sen kabul etmeyebilirsin. Bu araştırmaya katılmak senin isteğine bağlı ve istemezsen katılmazsın. Bu nedenle hiç kimse sana kızmaz ya da küsmez. Önce katılmayı kabul etsen bile sonradan vazgeçebilirsiniz, bu tamamen sana bağlı. Kabul etmediğin durumda da doktorlar muayene ve diğer işlemlerde sana önceden olduğu gibi iyi davranır, önceye göre farklılık olmaz.

Aklına şimdi gelen veya daha sonra gelecek olan soruları istediğin zaman bana sorabilirsin. Telefon numaram ve adresim bu kağıtta yazıyor. Bu araştırmaya katılmayı kabul ediyorsan aşağıya lütfen adını ve soyadını yaz ve imzanı at. İmzaladıktan sonra sana ve ailene bu formun bir kopyası verilecektir.

Çocuğun adı, soyadı:

Çocuğun imzası:

Tarih:

Velisinin adı, soyadı:

Velisinin imzası:

Tarih:

Araştırmacının adı, soyadı, ünvanı:

Adres :

Tel:

İmza:

Tarih:

## P33

## THE TRANSFERRIN ISOFORM ANALYSIS INTERFERENCE STUDY

Alyakut A<sup>1</sup>, Pinar A<sup>2</sup>, Akbıyık F<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry, Ankara, Turkey

<sup>2</sup> Hacettepe University, Faculty of Medicine, Department of Medical Biochemistry and Hacettepe University Hospitals, Clinical Pathology Laboratory, Ankara, Turkey

E-mail: drarzuycinkaya@gmail.com

**Key Words:** CDGs, transferrin isoforms, capillary electrophoresis, HPLC

**Background:** The congenital disorders of glycosylation (CDG) were originally called carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes, affecting primarily N-glycans. In CDG, serum glycoproteins have altered glycosylation. Transferrin is reliable, sensitive, and simplest indicator. Therefore the current diagnostic test for CDG is analysis of serum transferrin isoforms. Transferrin glycoforms can be identified by using isoelectric focusing electrophoresis (IEF), high performance liquid chromatography (HPLC), capillary zone electrophoresis (CZE) and by mass spectrometric analysis. Our aim was to compare HPLC and two different CZE methods' performances in presence of hemolysis, bilirubinemia, and lipemia interferences according to determination of percentage of transferrin isoforms.

**Materials and Methods:** Interference samples were prepared for bilirubinemia (total bilirubin concentrations: 11.628–377.91  $\mu\text{mol/L}$ ), lipemia (triglyceride concentrations: 1.08–33.4 mmol/L) and hemolysis (hemoglobine concentrations: 0.0 g/L to 5.0 g/L). HPLC analysis was performed on a gradient HPLC (Shimadzu Europe, Germany), using column and reagents provided in kit (EUREKA-CDT test in serum by UV/VIS-FAST) with spectrophotometric detection at 470 nm. CZE analyses carried out with The Helena Biosciences' V8@ E-class analyser (Helena Biosciences Europe, UK) and with Sebia 2 Capillarys™ (Capillarys™, Sebia, France). Statistical calculations were performed using Microsoft Excel 2010.

**Results:** All isoforms percentage were compared with their zero concentrations in all samples. We observed that Helena CZE system were affected by samples with hemolysis. Analysis with HPLC system were affected by samples with lipemia (except tetrasialo transferrin). CZE systems have been influenced minimal by lipemia. We observed Helena CZE and HPLC systems had significant interferences with all concentrations of bilirubinemia (except tetrasialo transferrin).

**Conclusions:** We demonstrated some interferences which have not been reported previously about transferrin isoform analysis. The conscious implementation for interferences on these methods would provide more accurate results for CDG diagnosis.

## P34

## DOES RE-CENTRIFUGATION OF GEL-SEPARATOR TUBES AFFECT METABOLIC PANEL ANALYTES' DETERMINATION?

Milevoj Kopcnovic L, Pavic M.

University Hospital Centre Sestre Milosrdnice, University Department of Chemistry, Draskoviceva 19, Zagreb, Croatia

E-mail: laramilevoj@gmail.com

**Key Words:** re-centrifugation, gel-separator tubes

**Background:** Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines and manufacturers do not recommend the re-centrifugation of gel tubes. Re-centrifugation can affect measurement of metabolic panel analytes, especially potassium, leading to potentially erroneous results. Our aim was to investigate the effect of short-term re-centrifugation of gel-separator tubes on metabolic panel analytes.

**Materials and Methods:** Samples from 40 participants were collected in gel-separator tubes, mixed immediately by inverting 5-10 times and stored at room temperature for 30 minutes allowing complete clot formation. Immediately after centrifugation at 2000xg/10 minutes/20°C baseline glucose, urea, creatinine, potassium, sodium, chloride and calcium concentrations were measured. Tubes were recapped and stored at room temperature for 4 hours. After storage, serum was aliquoted; original tubes and aliquots were re-centrifuged under the same conditions. Metabolic panel analytes concentrations measured in original tubes and aliquots after re-centrifugation were compared to respective baseline concentrations. The Kruskal-Wallis test was used for statistical comparisons. The level of statistical significance was set at  $P < 0.05$ . Mean absolute bias from baseline concentrations was compared to desirable specifications for total error to define clinically relevant variations.

**Results:** Baseline concentrations of metabolic analytes were: glucose 6.0 (5.5–7.0) mmol/L, urea 6.4 (4.7–7.8) mmol/L, creatinine 67 (56–77)  $\mu\text{mol/L}$ , potassium 4.3 (4.0–4.5) mmol/L, sodium 138 (134–140) mmol/L, chloride 104 (100–105) mmol/L and calcium 2.21 (2.11–2.36) mmol/L. No significant differences were found comparing baseline concentrations of all analytes tested to concentrations measured in original tubes and aliquots after re-centrifugation ( $P > 0.05$ ). Mean absolute biases for all analytes tested in original tubes and aliquots after short term re-centrifugation did not exceed the set criteria for clinical significance.

**Conclusions:** No statistically or clinically significant differences were observed comparing baseline concentrations of metabolic panel analytes to concentrations measured in original gel-separator tubes and aliquots stored at room temperature and re-centrifuged 4 hours after collection.