

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ



TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ERİTROSİT GALT ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN LC-MS/MS
METODU GELİŞTİRİLMESİ, OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Dr. Muhammet TOPBAŞ

DANIŞMAN

Doç. Dr. Ebru SEZER

İZMİR

2020

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**ERİTROSİT GALT ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN LC-MS/MS
METODU GELİŞTİRİLMESİ, OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU**

Dr. Muhammet TOPBAŞ

DANIŞMAN
Doç. Dr. Ebru SEZER

İZMİR

2020

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, desteğini her zaman hissettiğim, tez danışmanım ve değerli hocam Doç. Dr. Ebru Sezer'e şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez sürecinde kıymetli görüşlerinden yararlandığım değerli hocalarım Prof. Dr. Eser Yıldırım Sözmen'e, Prof. Dr. Mahmut Çoker'e, Prof. Dr. Sema Kalkan UÇAR'a, değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Erhan CANBAY'a, metabolizma polikliniğinin kıymetli yan dal asistanlarına ve çalışmalarında bana yardımını esirgemeyen metabolizma laboratuvarı çalışanlarına,

Üniversiteye adım attığım günden beri bilgi, birikim ve deneyimlerini esirgemeyen, beni her konuda destekleyen, gelişimimde sonsuz katkıları olan Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ve Klinik Biyokimya Bilim Dalı'ndaki tüm değerli hocalarıma,

Birlikte gülüp eğlendiğim, çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarıma, doktora ve yüksek lisans öğrencilerine,

Ailemden uzak olduğum dönemde kendimi evimde gibi hissettiren, Klinik Biyokimya'nın değerli sağlık teknisyeni kadrosuna ve diğer tüm çalışanlara,

Bugünlere gelmemde büyük emekleri olan, sevgi ve desteklerini hayatım boyunca hissettiğim sevgili aileme sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Muhammet TOPBAŞ

İZMİR

2020

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ

İÇİNDEKİLER.....	I
ÖZET.....	V
ABSTRACT	VII
TABLolar LİSTESİ.....	IX
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	XI
KISALTMALAR LİSTESİ	XIII
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Fizyolojik Öneme Sahip Karbonhidratlar.....	2
2.1.1. Monosakkaritler.....	3
2.1.2. Şekerlerin Yapısal Fonksiyonları	6
2.2. Galaktoz Metabolizması	7
2.3. Galaktoz Metabolizması Bozuklukları	10
2.4. Leloir Yolu Enzimlerinin Moleküler ve Kimyasal Özellikleri	11
2.4.1. GALT Geni.....	11
2.4.2. GALK ve GALE Genleri	13
2.5. GALT Eksikliği.....	13
2.5.1. Klasik Galaktozemi (Tip1).....	13
2.5.1.1. Patogenez ve Klinik.....	13
2.5.1.2. Laboratuvar Bulguları	15
2.5.1.3. Tanı	16
2.5.1.4. Tedavi ve Prognoz.....	17
2.5.2. Galaktozeminin Farklı Klinik Tipi.....	17
2.5.3. Galaktozeminin Farklı Biyokimyasal Tipi	18

2.6. Galaktozemi Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler.....	19
2.6.1. Yöntemlerin Tarihçesi ve Özellikleri.....	19
2.6.1.1. Spektrofotometrik ve Florometrik Yöntemler.....	19
2.6.1.2. Radyoaktif Yöntemler	20
2.7. Kuru Kan Damlası (KKD) Örneği.....	22
2.8. KKD Örneğinin Kullanıldığı Yenidoğan Taramaları	24
2.8.1. KKD Örneğinin Kütle Spektrometrisinde Kullanımı.....	29
2.8.2. Dünyada Galaktozemi Taraması	29
2.9. LC-MS/MS.....	30
2.9.1. Sıvı Kromatografisi	31
2.9.2. MS.....	32
3. GEREÇ VE YÖNTEM	35
3.1. Gereç	35
3.2. Yöntem.....	37
3.2.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ön Hazırlıklar	37
3.2.2. Örneklerin Toplanması.....	38
3.2.3. Analiz Yöntemleri	39
3.2.3.1. LC-MS/MS Yöntemi.....	39
3.2.3.1.1. MSMS Parametreleri	42
3.2.3.1.2. UPLC Parametreleri	43
3.2.3.2. Florometrik Yöntem	43
3.2.4. EDTA ve Heparinli Örnek Toplama Tüplerinin GALT Aktivite Ölçümüne Etkisi	44
3.2.5. LC-MS/MS Metot Validasyon Çalışmaları	45
3.2.5.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi.....	45
3.2.5.2. Ölçüm Aralığının Alt-Üst Sınırlarının (LLMI-ULMI) Belirlenmesi ve Doğrusallık	47

3.2.5.3. Recovery (Geri Elde) ve Matriks Etkisi Çalışmaları	47
3.2.5.3.1. Matriks Etkisi Çalışmaları	48
3.2.5.3.2. Recovery (Geri Elde) Çalışmaları	50
3.2.5.4. Tekrarlanabilirlik ve Stabilite	51
3.2.5.4.1. KKD Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilite Çalışmaları	51
3.2.5.4.2. Hemolizat Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilite Çalışmaları	52
3.2.5.5. Seçicilik	52
3.2.5.6. Carryover (Taşıma etkisi)	54
3.2.5.7. Referans Aralık Çalışması	54
3.2.5.7.1. Katılımcı Seçimi	54
3.2.5.7.2. İstatiksel Analiz	55
3.2.6. Klasik Galaktozemi Hastalarının LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi	56
3.2.6.1. Hastaların Florometrik GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	56
3.2.6.2. Hastaların LC-MS/MS GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi	56
3.2.7. Sağlıklı Bireylerin KKD Örneklerinin LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi	57
3.2.8. Etik Kurul	57
4. BULGULAR	57
4.1. LC Koşullarının Optimizasyonu	57
4.1.1. Mobil Faz Optimizasyonu	57
4.1.2. Amonyum Format ve Formik Asit Optimizasyonu	58
4.1.3. Akış Hızı ve Enjeksiyon Hacmi Optimizasyonu	59
4.1.4. Kromatogramlar	60
4.2. EDTA ve Heparinli Örnek Toplama Tüplerinin GALT Aktivite Ölçümüne Etkisi ..	61
4.2.1 Hemolizat Yöntemi	61
4.2.2. KKD Yöntemi	62

4.3. Yöntem Validasyon Çalışmaları	63
4.3.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi	63
4.3.2. Ölçüm Aralığının Alt ve Üst Sınırlarının Belirlenmesi ve Doğrusallık	65
4.3.3. Recovery ve Matriks Etkisi Çalışmaları.....	69
4.3.4. Tekrarlanabilirlik ve Stabilitate	71
4.3.4.1. KKD Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilitate Çalışmaları	71
4.3.4.2. Hemolizat Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilitate Çalışmaları	72
4.3.5. Seçicilik.....	73
4.3.6. Taşıma etkisi.....	76
4.3.7. Referans Aralık Çalışması	77
4.4. Klasik Galaktozemi Hastalarının LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi ...	88
4.4.1. Hastaların Florometrik GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	88
4.4.2. Hastaların LC-MS/MS GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi.....	89
4.5. Sağlıklı Bireylerin KKD Örneklerinin LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi	90
5. TARTIŞMA.....	93
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	99
7. KAYNAKLAR	101
8. EKLER.....	111

ÖZET

ERİTROSİT GALT ENZİM AKTİVİTESİNİN BELİRLENMESİ İÇİN LC-MS/MS METODU GELİŞTİRİLMESİ, OPTİMİZASYONU VE VALİDASYONU

Amaç: Galaktozemi, genellikle galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) eksikliğine bağlı gelişen bir karbonhidrat metabolizması hastalığıdır. GALT eksikliğinin tanısı eritrosit içi enzim aktivitesinin belirlenmesiyle mümkündür. Enzim aktivitesinin belirlenmesine yönelik birçok yöntem tanımlanmıştır. Radyoaktif yöntemler, zahmetli ve tehlikeli olduğu için tercih edilmemektedir. Florometrik yöntemler ise günümüzde tanı ve yenidoğan tarama programlarında en sık kullanılan yöntem olmasına rağmen analitik açıdan yetersiz kalmaktadır. Erken tanı ve tedavinin kritik olduğu bu hastalıkta, enzim aktivitesinin yüksek doğruluk ve güvenirlilik ile belirlenmesi, etkin bir tarama programı ve hastalığın ayırıcı tanısı için oldukça önemlidir. Bu çalışmada, hemolizat ve kuru kan damlası (KKD) örneklerinde GALT aktivitesinin tayinine yönelik, analitik açıdan güçlü, sıvı kromatografi-kütle spektrometri (LC-MS/MS) temelli bir yöntem geliştirilmesi; geliştirilen yöntemin valide edilmesi ve florometrik yöntem ile yöntem performansları açısından karşılaştırılması amaçlandı. Ayrıca yöntem için en uygun örnek toplama tüpünün belirlenmesi amacıyla K₂EDTA'lı ve lityum heparinli örnek toplama tüplerinin enzim aktivitesine olan etkisi incelendi.

Gereç ve Yöntem: Geliştirilen yöntemde izotop işaretli [¹³C₆]-galaktoz-1-fosfat substrat, UDP-N-asetilglukozamin internal standart (İS) olarak kullanıldı. Kromatografik ayrıştırma, Acquity UPLC HSS T3 (1.8 µm, 2.1x50 mm) kolon ile sağlandı. 5 mM amonyum format içeren %50-%50 asetonitril/su çözgen sistemleri mobil faz olarak kullanıldı. Enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan izotop işaretli [¹³C₆]-UDP-Gal'un (571/323) kantitasyonu, İS (606/385) pik alanına göre sağlandı ve enzim aktivitesi hesaplandı. Yöntem validasyon parametreleri kapsamında ölçüm limitleri, geri elde, tekrarlanabilirlik, matriks etkisi, seçicilik, taşıma etkisi ve referans aralık çalışmaları yapıldı. Analiz için en uygun örnek tüpünün belirlenmesi ve yöntem performanslarının karşılaştırılması amacıyla, farklı antikoagülan içeren kan tüplerinden elde edilen hemolizat ve KKD örneklerinin enzim aktiviteleri belirlendi ve sonuçlar yorumlandı.

Bulgular: Hemolizat örneklerinin GALT aktivitesinin ortalama±SD değeri 12.04±3.68, KKD örneklerinin 3.46±2.07 µmol/grHb/saat olarak belirlendi. Hemolizat yönteminde doğrusal aralık 0.4-100 µM (normalin %1.1-%280'i), KKD yönteminde 0.4-50 µM (normalin %2.4-%310'u) arasındaydı. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında %varyasyon katsayısı

(%CV) değerleri <15 bulundu. Geri elde çalışmalarında %90'nın üzerinde geri elde sağlandı. Genel anlamda matriks kaynaklı iyon baskılama tespit edilmedi. KKD rnekleri farklı saklama koşullarında 31 gün boyunca oldukça stabil iken hemolizat örnekleri oda sıcaklığı ve +4 C'de enzim aktivitesinin yaklaşık %50'sini kaybettiği izlendi. EDTA'lı tüplerden elde edilen KKD örneklerinde ortalama enzim aktivitesi, heparinli tüplerden elde edilen örneklere göre yaklaşık 1.6 kat yüksek tespit edildi. Klasik galaktozemi hastalarının LC-MS/MS ile analizinde herhangi bir enzim aktivitesi saptanmadı. Florometrik yöntem ile <3.5 U/gHb (eşik değer) olarak ölçülen enzim aktivitesi, çok daha düşük konsantrasyonlarda LC-MS/MS yöntemiyle kantitatif olarak belirlendi.

Sonuç: Hemolizat ve KKD örneklerinde, eritrosit içi GALT aktivitesinin yüksek güvenirlilik ve doğruluk ile tayin edilebileceği LC-MS/MS temelli bir yöntem geliştirildi. Yöntem validasyon çalışmaları doğrultusunda ulaşılan performans verileri tatmin edicidir. Çalışmalarda, GALT aktivitesinin tayini için en uygun rneğin K₂EDTA içeren tam kan rneği olduğu belirlendi. Geliştirilen yöntem, analitik açıdan karşılaştırılan florometrik yönteme göre üstündür. GALT eksikliğinde enzim aktivitesinin belirlenmesinde LC-MS/MS metodunun kullanılması, hastalığın teşhisinde ve ayırıcı tanısında büyük kolaylıklar sağlayacağı gibi yenidoğan taramalarının etkinliğini artıracakı öngörülmektedir.

Anahtar Sözcükler: GALT; LC-MS/MS; yenidoğan taramaları; kuru kan damlası

ABSTRACT

DEVELOPMENT, OPTIMIZATION AND VALIDATION OF LC-MS/MS METHOD FOR THE DETERMINATION OF ERYTHROCYTE GALT ENZYME ACTIVITY

Aim: Galactosemia is a carbohydrate metabolism disease that usually develops due to galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) deficiency. The diagnosis of GALT deficiency is possible by determining the intra-erythrocyte enzyme activity. Many methods for determining enzyme activity have been described. Radioactive methods are not preferred because they are laborious and threatening. Nowadays fluorometric methods are the most frequently used methods in diagnosis and newborn screening programs (NBS) although they are insufficient analytically. As early diagnosis and treatment is critical for galactosemia, determination of enzyme activity with high accuracy and reliability is crucial for an effective screening program and differential diagnosis of the disease. In this study, it was aimed to develop an analytically powerful liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) based method for the determination of GALT activity in hemolysate and dried blood spot (DBS) samples, to validate the developed method and compare it with the performance of fluorometric method. In addition, the effect of K₂EDTA and lithium heparin tubes on enzyme activity was examined in order to determine the most appropriate sample collection tube for the method.

Material and Method: In the developed method, the isotope labeled [¹³C₆]-galactose-1-phosphate as a substrate and UDP-N-acetylglycosamine was used as internal standard (IS). Chromatographic separation was achieved with Acquity UPLC HSS T3 (1.8 µm, 2.1 x 50 mm) column. 50%-50% acetonitrile/water solvent systems containing 5 mM ammonium formate were used as mobile phase. Quantitation of the isotope labeled [¹³C₆]-UDP-Gal (571/323) formed, as a result of the enzymatic reaction, was achieved according to the peak area of the IS (606/385) and enzyme activity was calculated. In the scope of method validation parameters, measurement limits, recovery, repeatability, matrix effect, selectivity, carryover and reference interval studies were performed. In order to determine the most appropriate sample collection tube for the analysis and to compare the performances of methods, the enzyme activities of both hemolysate and DBS samples obtained from blood tubes containing different anticoagulants were measured and the results were interpreted.

Results: The mean ± SD value for GALT activity of hemolysate samples was determined as 12.04±3.68 and 3.46±2.07 µmol/grHb/hour for DBS samples. The linear range was 0.4-100 µM

(1.1-280% of normal) in the hemolysate method and 0.4-50 μM (2.4-310% of normal) in the DBS method. The %coefficient of variation (%CV) values were less than 15 for intra-day and inter-day repeatability studies. In recovery studies over 90% recovery was achieved. In general terms, ion suppression from matrix was not detected. While DBS samples were quite stable for 31 days under different storage conditions, hemolysate samples lost approximately 50% of enzyme activities at room temperature and +4 °C. Mean enzyme activity for DBS samples obtained from K₂EDTA tubes was found approximately 1.6 times higher than samples obtained from heparinized tubes. No enzyme activity was detected with the analysis of classical galactosemia patients' samples by LC-MS/MS. Enzyme activity results reported as <3.5 U/gHb (cut off value) by fluorometric method, were quantitatively determined for even very low concentrations by LC-MS/MS method.

Conclusion: In the hemolysate and DBS samples a LC-MS/MS based method has been developed in which the intra-erythrocyte GALT activity can be determined with high reliability and accuracy. Performance data obtained in relation with studies of validation method are satisfactory. In the studies, the most appropriate sample for the determination of GALT activity was determined as a whole blood sample containing K₂EDTA. The developed method is quite superior to analytical fluorometric methods. It is predicted that the use of LC-MS/MS method in the determining enzyme activity in GALT deficiency will provide great conveniences in diagnosis and differential diagnosis of the disease and increase the effectiveness of newborn screenings.

Keywords: GALT; LC-MS/MS; newborn screening; dried blood spot

TABLÖLAR LİSTESİ

Tablo 1. Wilson ve Jungner kriterleri	25
Tablo 2. ACMG önerileri	25
Tablo 3. HHS'nin önerdiği yenidoğan tarama paneli	26
Tablo 4. İyonizasyon teknikleri	33
Tablo 5. MSMS parametreleri	42
Tablo 6. [¹³ C ₆]-UDP-Gal ve UDP-N-asetilglukozamine ilişkin MSMS parametreleri	43
Tablo 7. UPLC parametreleri	43
Tablo 8. Kan alma tüplerinin karşılaştırılması (hemolizat).....	61
Tablo 9. Kan alma tüplerinin karşılaştırılması (KKD)	62
Tablo 10. KKD yöntemi için ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri	66
Tablo 11. Hemolizat yöntemi için ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri	66
Tablo 12. KKD yöntemi için ölçüm aralığının alt limitlerinde %CV değerleri	67
Tablo 13. Hemolizat yöntemi için ölçüm aralığının alt limitlerinde %CV değerleri	67
Tablo 14. EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları	69
Tablo 15. EDTA'lı tüplerden elde edilmiş hemolizat örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları	69
Tablo 16. Heparinli tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları	70
Tablo 17. Heparinli tüplerden elde edilmiş hemolizat örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları	70
Tablo 18. KKD yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması	71
Tablo 19. KKD yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması.....	71
Tablo 20. KKD yöntemi stabilite çalışması	72
Tablo 21. Hemolizat yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması	72
Tablo 22. Hemolizat yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması	73
Tablo 23. Hemolizat yöntemi stabilite çalışması.....	73
Tablo 24. KKD yönteminde girişim etkisi (%)	75
Tablo 25. Hemolizat yönteminde girişim etkisi (%).....	75

Tablo 26. KKD yönteminde taşıma etkisi çalışması.....	76
Tablo 27. Hemolizat yönteminde taşıma etkisi çalışması	76
Tablo 28. GALT aktivitesi referans aralığı (hemolizat)	82
Tablo 29. GALT aktivitesi referans aralığı (KKD)	83
Tablo 30. GALT aktivitesi (KKD) ve yaş arasındaki korelasyon	85
Tablo 31. Hemolizat yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyon	85
Tablo 32. Hemolizat yönteminde kadın ve erkeklerin GALT aktivitelerinin karşılaştırılması.....	86
Tablo 33. KKD yönteminde kadın ve erkeklerin GALT aktivitelerinin karşılaştırılması	87
Tablo 34. Referans bireylerin hemolizat ve KKD yöntem sonuçları arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi	87
Tablo 35. Hastaların florometrik yöntem ile belirlenen GALT aktiviteleri	88
Tablo 36. 19 adet KKD örneğinin florometrik ve LC-MS/MS yöntemleriyle ölçülen GALT aktiviteleri.....	91
Tablo 37. LC-MS/MS ve florometrik yöntem sonuçları (KKD) arasındaki korelasyon	92

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1. Sırasıyla aldoz ve ketoz şekerler	3
Şekil 2. Glikozun epimerleri.....	4
Şekil 3. Sırasıyla D-gliseraldehit ve L-gliseraldehit	5
Şekil 4. α ve β anomerler.....	5
Şekil 5. Galaktozun galaktitole indirgenmesi.....	6
Şekil 6. Galaktoz metabolizması ve Leloir yolu.....	9
Şekil 7. GALT geni.....	11
Şekil 8. Beutler spot testi.....	20
Şekil 9. LC-MS/MS sistemi	31
Şekil 10. UPLC sistemi	32
Şekil 11. Elektrosprey iyonizasyon	34
Şekil 12. Kuadropol.....	34
Şekil 13. α -D-[UL-13C6]-galaktopiranozil 1-fosfat (dipotasyum tuzu).....	36
Şekil 14. UDP- α -D-[UL-13C6]-UDP-Gal (disodyum tuzu)	36
Şekil 15. UDP- α -N-asetil-D-glikozamin (disodyum tuzu)	36
Şekil 16. KKD yöntemi çalışma prosedürü.....	42
Şekil 17. Mobil faz optimizasyonu	58
Şekil 18. Amonyum format ve formik asit optimizasyonu	59
Şekil 19. Enjeksiyon hacmi optimizasyonu	60
Şekil 20. Kromatogramlar	61
Şekil 21. EDTA'lı ve heparinli kan tüplerinde ölçülen analit miktarları (hemolizat)	62
Şekil 22. EDTA'lı ve heparinli kan tüplerinde ölçülen analit miktarları (KKD)	63
Şekil 23. Hemolizat matriksinde kalibrasyon grafiği	64
Şekil 24. KKD matriksinde kalibrasyon grafiği	64
Şekil 25. Matriks içermeyen kalibrasyon grafiği.....	65
Şekil 26. Ölçüm aralığının alt sınırında hazırlanmış KKD kalibratöründe (0.4 μ M) sinyal/gürültü oranı	67
Şekil 27. Ölçüm aralığının alt sınırında hazırlanmış hemolizat kalibratöründe (0.4 μ M) sinyal/gürültü oranı	68
Şekil 28. Hemolizat yönteminde doğrusallık grafiği	68
Şekil 29. KKD yönteminde doğrusallık grafiği.....	69

Şekil 30. KKD matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri.....	74
Şekil 31. Hemolizat matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri.....	74
Şekil 32. Ölçüm aralığının alt sınırında KKD kalibratörlerinde [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri....	74
Şekil 33. Ölçüm aralığının alt sınırında hemolizat kalibratöründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri	75
Şekil 34. Ölçüm aralığının üst sınırından sonra analiz edilen KKD matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri.....	77
Şekil 35. Ölçüm aralığının üst sınırından sonra analiz edilen hemolizat matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri.....	77
Şekil 36. Referans bireylerin yaş dağılımı kutu grafiği	78
Şekil 37. Referans bireylerin yaş dağılım histogramı	78
Şekil 38. Referans bireylerin tam kan Hb konsantrasyonlarını gösteren histogram.....	79
Şekil 39. İlk 20 bireyin tam kan ve hemolizat Hb konsantrasyonunu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik	80
Şekil 40. Referans bireylerin GALT aktivitelerini (hemolizat) gösteren histogram	81
Şekil 41. Referans bireylerin GALT aktivitelerini (KKD) gösteren histogram	81
Şekil 42. Referans bireylerde hemolizat ve KKD örneklerinin GALT aktivitelerini gösteren kutu grafiği (ortalamalar, %95 güven aralığı)	82
Şekil 43. GALT aktivitesi referans aralıklarını gösteren kutu grafiği (hemolizat).....	83
Şekil 44. GALT aktivite referans aralıklarını gösteren kutu grafiği (KKD)	84
Şekil 45. KKD yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı.....	85
Şekil 46. Hemolizat yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı.....	86
Şekil 47. Referans bireylerin hemolizat ve KKD yöntem sonuçları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı.....	88
Şekil 48. KKD yöntemi ile analiz edilen 1, 2 ve 3 numaralı hastaların kromatogramı	90
Şekil 49. 44'den 58'e kadar numaralandırılmış sağlıklı bireylerin LC-MS/MS ve florometrik yöntem ile analiz sonuçlarını içeren serpilme diyagramı.....	90
Şekil 50. 7 ve 19 numaralı KKD örneklerine ait kromatogramlar	92
Şekil 51. KKD örneklerinin LC-MS/MS ve florometrik yöntem ile analiz sonuçlarını içeren serpilme diyagramı.....	93

KISALTMALAR LİSTESİ

%CV	: %Coefficient of variation; %varyasyon katsayısı
6PGD	: 6-fosfo-glukonat dehidrogenaz
ACMG	: American College of Medical Genetics; Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği
ACN	: Asetonitril
CLSI	: Clinical & Laboratory Standards Institute; Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü
DTT	: DL-Ditiyoeritrol
ESI	: Elektrosprey iyonizasyon
FKÜ	: Fenilketonüri
G6PD	: Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz
GAG	: Glikozaminoglikan
Gal-1-P	: Galaktoz-1-fosfat
GALE	: Üridin difosfat-galaktoz-4-epimeraz
GALK	: Galaktokinaz
GALT	: Galaktoz-1-fosfat üridil transferaz
Glu-1-P	: Glikoz-1-fosfat
GLUT-2	: Galaktoz glikoz taşıyıcısı 2
Hb	: Hemoglobin
HHS	: Department of Health and Human Services; Sağlık ve İnsan Hizmetleri Departmanı
HPLC	: High performance liquid chromatography; yüksek performanslı sıvı kromatografisi

İS	: İnternal standart
KF	: Kistik fibrozis
KH	: Konjenital hipotiroidi
KKD	: Kuru kan damlası
LC	: Liquid chromatography; sıvı kromatografisi
LC-MS/MS	: Liquid chromatography/mass spectrometry- mass spectrometry; sıvı kromatografisi/ kütle spektrometrisi- kütle spektrometrisi
LLMI	: Lower Limit of the Measuring Interval; ölçüm aralığının alt sınırı
MS	: Mass spectrometry; Kütle spektrometrisi
MSMS	: Tandem kütle spektrometrisi
RUSP	: Recommended Uniform Screening Panel; önerilen tarama paneli
SF	: Serum fizyolojik
SGLT1	: Sodyum/glikoz-galaktoz taşıyıcısı 1
UDP-Gal	: UDP-galaktoz
UDP-Glu	: UDP-glukoz
UGP	: Glikoz/galaktoz pirofosforilaz
ULMI	: Lower Limit of the Measuring Interval; ölçüm aralığının üst sınırı
UPLC	: Ultra performans liquid chromatography; yüksek performanslı sıvı kromatografisi
YDT	: Yenidoğan taramaları

1. GİRİŞ

Galaktozemi, galaktoz metabolizmasında rol oynayan üç farklı enzimden birinin eksikliği sonucu gelişen otozomal resesif geçişli, kalıtsal bir karbonhidrat metabolizması hastalığıdır. Bu enzimler: Galaktokinaz (GALK), galaktoz-1-fosfat üridil transferaz (GALT) ve üridin difosfat (UDP)-galaktoz-4-epimeraz'dır (GALE). Galaktozemi, en sık GALT eksikliğine bağlı gelişir. GALT aktivitesinin %0–1 arasında olması “klasik galaktozemi”, %1-13 arasında olması “galaktozeminin farklı klinik tipi”, %13-38 arasında olması ise “galaktozeminin farklı biyokimyasal tipi” olarak sınıflandırılır. GALT eksikliğinin klinik seyri (fenotipi), rezidüel enzim aktivitesine ve hastalığa sebep olan genetik mutasyona göre çeşitlilik gösterir (1). Bu sebeple rezidüel enzim aktivitesinin kantitatif olarak belirlenmesi oldukça önemlidir.

Klasik galaktozeminin dünyada görülme sıklığı 1/40000–1/60000 arasında değişirken ülkemizde akraba evliliğinin yaygın olması sebebiyle bu oran 1/23775'tir (2). Yenidoğan döneminde anne sütü alımından sonra gelişen sarılık, kusma, hepatomegali, beslenme güçlüğü, letarji, ishal, karaciğer yetmezliği, hipoglisemi, renal tübüler disfonksiyon, kas hipotonisi ve katarakt ile karakterizedir. Zamanında tanı konulmadığında sepsis ve multiorgan tutulumuna bağlı mortalite oranı oldukça yüksektir. Ayrıca bu hastalarda uzun dönemde overleri, kemikleri ve santral sinir sistemini etkileyen birçok komplikasyon görülebilir. GALT eksikliğinde erken tanıya odaklanılmalıdır. Tanı konulduğu an uygulanan laktoz kısıtlı diyet yenidoğan döneminde hayat kurtarıcıdır (3,4). Birçok gelişmiş ülkede klasik galaktozemi diğer kalıtsal metabolik hastalıklar ile birlikte yenidoğan tarama programları içerisinde yer almakta ve hastalığın erken dönemde tespiti mümkün olmaktadır (5). Ülkemizde ise klasik galaktozemi taraması Ulusal Yenidoğan Tarama Programı kapsamında yer almamaktadır (6).

GALT eksikliğinin tanısı eritrosit içi enzim aktivitesinin belirlenmesiyle sağlanır. GALT aktivitesinin belirlenmesine yönelik birçok yöntem tanımlanmıştır (5). Bu yöntemler arasında bir dönem altın standart olarak kabul edilen radyoaktif yöntemler zaman alıcı, zahmetli ve tehlikeli olduğu için artık tercih edilmemektedir (7). Florometrik yöntemler ise tanıda ve klasik galaktozemi taramalarında en fazla kullanılan yöntem olmasına rağmen birçok dezavantajı içinde barındırmaktadır (8). Bu yöntem ile kuru kan damlası (KKD) örneklerinde GALT aktivitesi semikantitatif olarak belirlenmektedir ve düşük enzim aktivitelerinde analitik olarak yetersiz kalmaktadır. Bu durum özellikle florometrik yöntemle yapılan yenidoğan taramalarında yanlış pozitiflik oranını artırmakta ve zaman kaybına yol açmaktadır (9). Son yıllarda enzim aktivitesinin belirlenmesinde alternatif yöntem arayışları hız kazanmış ve sıvı kromatografi-kütle

spektrometri (LC-MS/MS) yöntemleri ön plana çıkmıştır. Dünya üzerinde LC-MS/MS ile GALT aktivitesinin belirlendiği laboratuvar sayısı çok azdır ve bu analizlerde EDTA'lı tam kan örneklerinden elde edilen hemolizat örneği kullanılmaktadır (5,10). GALT aktivitesi ülkemizde bazı laboratuvarlar tarafından analiz edilmektedir ancak hiçbirinde LC-MS/MS yöntemi kullanılmamaktadır.

Bu bilgiler ışığında, bu tezin ana amacı hemolizat ve KKD örneklerinde GALT aktivite düzeyinin tespitine yönelik LC-MS/MS temelli bir yöntem geliştirilmesi, geliştirilen yöntemin validasyonunun sağlanması ve neonatal GALT kiti (PerkinElmer, florometrik yöntem) ile yöntem performanslarının karşılaştırılmasıdır. Çalışmanın diğer amacı ise farklı antikoagülan içeren örnek toplama tüplerinden (lityum heparinli ve EDTA) elde edilen hemolizat ve KKD örneklerinin GALT aktivitelerinin karşılaştırılması ve bu doğrultuda analiz için en uygun örnek toplama tüpünün belirlenmesidir. GALT aktivitesinin yüksek hassasiyet ve doğruluk ile tespit edilmesiyle hastalığın erken teşhisinde, fenotipinin belirlenmesinde, yenidoğan taramalarında, klasik galaktozeminin ve diğer durumların ayırıcı tanısında büyük kolaylıklar sağlanacağı öngörülmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fizyolojik Öneme Sahip Karbonhidratlar

Karbonhidratlar insan diyetinin en önemli kısmını oluşturan makromoleküllerdir. Hücreler için temel enerji sağlayıcısı olmalarının yanı sıra yapısal ve koruyucu elemanlar olarak fonksiyon görürler.

Karbon atomu, eşleşmemiş 4 elektronu sayesinde değişik elementlerle bağ yapabilmesine karşın en çok hidrojen, oksijen ve azot ile bağ yapar. Yapısında C ve H içeren bileşiklere hidrokarbonlar denir. Hidrokarbon zincirler basit, dallı veya halkasal olabilir.

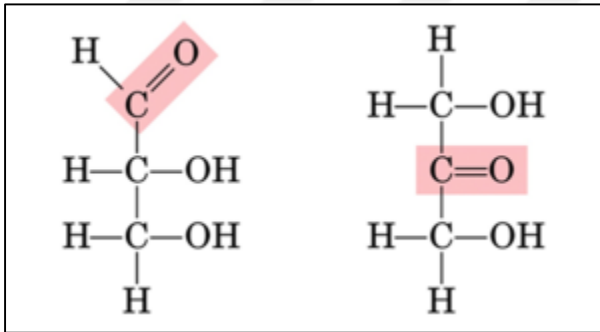
Karbonhidratlar C, H ve O'den oluşmuş hidrokarbon türevleridir. Basit karbonhidratlarda her C için 2 H ve 1 O bulunur. Bütün karbonhidratlar glikozdan sentezlenebilir veya glikoza çevrilebilir. Karbonhidratlar karbon sayılarına göre 4 sınıfa ayrılabilir (11):

1. Monosakkaritler: Sahip oldukları C sayısına göre trioz, tetroz, pentoz, heksoz v.s. şeklinde adlandırılırlar. Glikoz, galaktoz, fruktoz ve mannoz heksozlara örnektir.
2. Disakkaritler: İki monosakkarit biriminin glikozidik bağ ile birleşmesiyle oluşurlar. Glikozidik bağ kovalent bir bağdır ve şekerler kendi aralarında bir oksijeni ortak kullanarak O-glikozidik bağ kurar.

- Maltoz → Glikoz + Glikoz, α -1.4 glikozidik bağ içerir.
 - Sükroz → Glikoz + Fruktoz, α -1.2 glikozidik bağ içerir.
 - Laktoz → Glikoz + Galaktoz, β -1.4 glikozidik bağ içerir.
3. Oligosakkaritler: 3 ile 10 arası monosakkarit biriminin glikozidik bağ ile bağlanmasıyla meydana gelir.
4. Polisakkaritler: 10'dan fazla monosakkarit birimi içerirler. Düz veya dallanmış yapıda olabilirler.

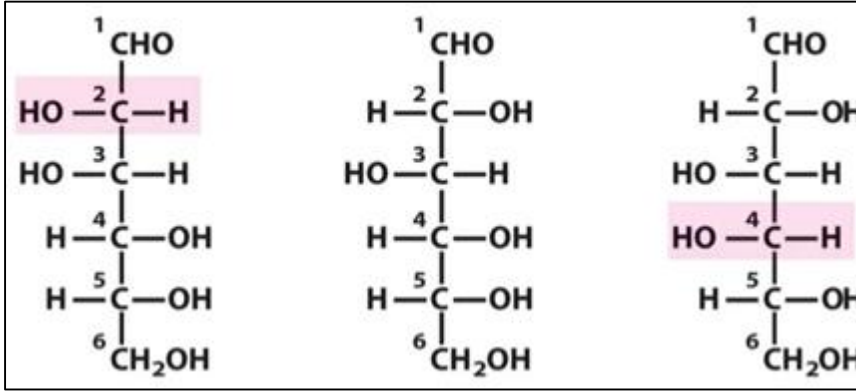
2.1.1. Monosakkaritler

Monosakkaritler aldehit veya keton grubu taşımalarına göre aldoz veya ketoz olarak alt sınıflara ayrılır. Açık zincir formunda C atomlarının bir tanesi O atomuna çift bağla bağlanarak bir karbonil grubu oluştururken diğer C atomları ise bir OH grubu taşır. Eğer karbonil grubu karbon zincirinin sonunda terminal bir karbon atomunda ise bu monosakkarit aldoz olarak adlandırılırken karbonil grubu diğer herhangi bir karbon atomunda ise bu monosakkarit ketoz olarak adlandırılır (Şekil 1).



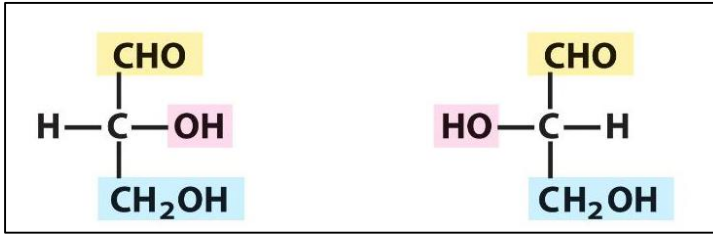
Şekil 1. Sırasıyla aldoz ve ketoz şekerler

Aynı atomik içeriğe ve aynı kapalı moleküler formüle sahip fakat farklı atomik dizilişe sahip olan bileşiklere birbirinin izomeri bileşikler denir. Fruktoz, galaktoz, glikoz ve mannoz birbirinin izomeri olup hepsi $C_6H_{12}O_6$ kapalı formülü ile gösterilirler. Epimer ise bir çeşit izomerdir. Eğer birbirinin izomeri olan iki monosakkarit sadece bir karbon atomunda H ve OH dizilimi açısından bir konfigürasyon değişikliği taşıyorsa iki monosakkarit birbirinin epimeridir. Glikozun önemli iki epimeri vardır. Glikozun 2. karbonundaki değişiklik mannozu, 4. karbonundaki değişiklik ise galaktozu oluşturur (Şekil 2).



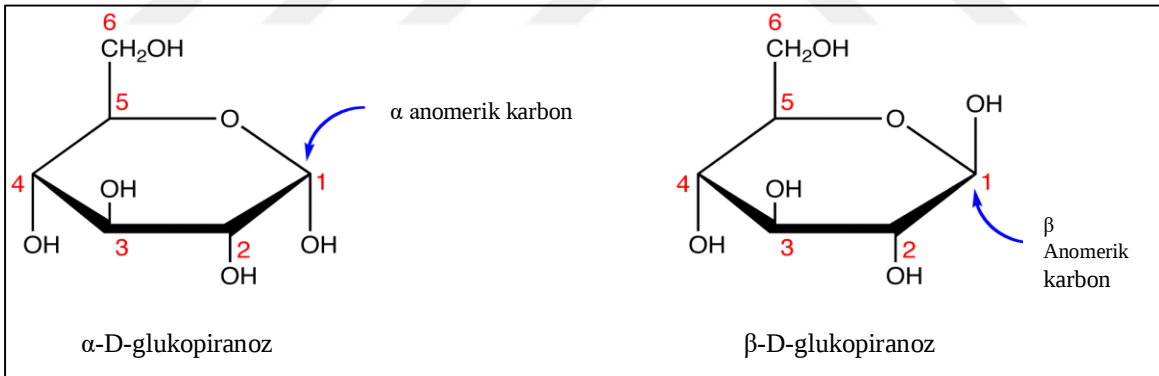
Şekil 2. Glikozun epimerleri

Bir karbonhidrat içindeki herhangi bir karbon atomuna 4 farklı grup bağlanmışsa bu karbon atomuna asimetric karbon atomu denir. Asimetric karbon atomu taşıyan karbonhidratlar stereoizomerizm gösterir. Bir monosakkaritin asimetric karbon atomu sayısı “n” ile gösterilirse bu monosakkaritin 2^n sayısı kadar izomeri bulunur. 4 adet asimetric karbon atomu bulunan glikozun $2^4 = 16$ izomeri bulunur. Bir bileşikte asimetric karbon varlığı o bileşiğe optik aktivite kazandırır ve bu bileşiklere optikçe aktif bileşikler denir. Bir bileşik polarize ışığı sağa çeviriyorsa dekstrorotator (+), sola çeviriyorsa levorotator (-) denir. Glikozun çözeltilerdeki optik rotasyonu dekstrarotatuardır ve bu nedenle klinikte dekstroz olarak adlandırılır. Ayrıca karbonhidratların D ve L izomeri vardır. D ve L izomer kavramında 3 karbonlu bir şeker olan gliseraldehit (gliseroz) referans alınır ve karbonil grubuna en uzak olan C atomundaki H ve OH’in durumuna göre belirlenir. OH sağ tarafta ise bu D-izomer, sol tarafta ise bu bir L-izomerdir (Şekil 3). Memelilerdeki şekerlerin tamamına yakını D-izomerken bunları metabolize eden enzimler de D-şekerlere özgüdür. Şekerlerin iki L-izomer istisnası bulunur. L-fukoz glikoprotein yapısında bulunurken L-iduronik asit ise glikozaminoglikanların (GAG) yapısında yer alır.



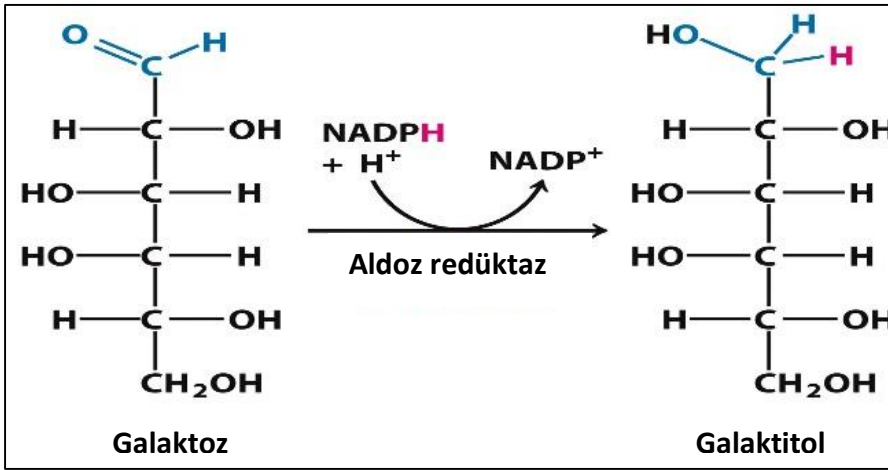
Şekil 3. Sırasıyla D-gliseraldehit ve L-gliseraldehit

Beş veya daha fazla karbon içeren monosakkaritler düz zincir yerine halkasal yapıda olmayı tercih ederler. Eğer halkanın 6 üyesi varsa (5 C ve 1 O₂) piranoz halkası, eğer 5 üyesi varsa (4 C ve 1 O₂) furanoz halkası adı verilir. Burada halka yapısını oluşturan bir aldehit ise bağ hemiasetal bağı, bir ketoz ise hemiketal bağı olarak adlandırılır. Monosakkaritlerin hemiketal ve hemiasetal karbon atomlarının konfigürasyon farkı (OH grubunun yukarıda ya da aşağıda oluşuna göre) farklı izomerik formlar yaratır ki bunlara anomer denir. OH grubu altta yer alırsa bu bir α-anomerken OH grubu üstte yer alırsa bu bir β-anomerdir (Şekil 4). α ve β anomerler mutarotasyon denen bir işlemle birbirlerine dönüşebilirler (11).



Şekil 4. α ve β anomerler

Hekzosların aldehit veya keton gruplarının indirgenmesiyle polialkoller oluşur. Glikozdan sorbitol, galaktozdan galaktitol, fruktozdan sorbitol ve mannitol oluşur (Şekil 5).



Şekil 5. Galaktozun galaktitole indirgenmesi

Monosakkaritler demir ve bakır gibi ajanlarla oksitlenebilir. Demir ve bakır gibi metalleri indirgeyebilen glikoz gibi şekerlere indirgeyici şekerler adı verilir. İndirgenme esasına dayalı Fehling testi uzun yıllar hastalarda kan ve idrar şeker miktarının tayini için kullanılmıştır. Altı karbonlu monosakkaritlerin hepsi, disakkaritlerin ise sukroz hariç diğerleri indirgen özelliğe sahiptir.

Glikozun aldehit grubundaki karbonun karboksil grubuna oksitlenmesiyle glukonik asit oluşurken diğer aldozlardan farklı aldonik asitler oluşur.

Glikoz, galaktoz ve mannozun 6. karbonunun oksitlenmesiyle glukuronik, galakturonik, mannuronik asit gibi üronik asitler oluşur. Bunlar asidik şekerlerdir (11).

2.1.2. Şekerlerin Yapısal Fonksiyonları

Heksozların karbon zincirlerindeki bir hidroksil grubunun yerini başka bir grup alırsa veya bir karbon atomu bir hidroksil grubuna oksitlenirse şeker türevleri oluşur. Glikoz, galaktoz ve mannozda ana karbon zincirindeki 2. hidroksil grubu yerine bir amino grubu gelirse sırasıyla glikozamin, galaktozamin, mannozamin oluşur. Bu amino gruplarının hepsi N-asetil-glikozaminde olduğu gibi asetik asitle kondanse olur. Bağ dokusunda aminoşeker sentez yolu çok aktiftir. Aminoşekerler, GAG, glikoprotein ve glikolipitlerin önemli bir içeriğini oluşturur.

GAG'lar heteropolisakkarit olup aminoşekerler (İki monosakkaritten biri mutlaka N-asetil-glikozamin ya da N-asetilgalaktozaminidir.) veya üronik asitten oluşan tekrarlayan lineer disakkarit birimlerdir. GAG'lar negatif yüklü yapılardır. Tüm şekerlerin fizyolojik pH'da negatif yüklü olan karboksilat grupları ve sülfat grupları ile asidik şekerler yapıya negatif yük sağlar. GAG'ların yapım ve yıkımı denge halindedir.

Glikoproteinler polipeptit iskeletlerine kovalent olarak bağlı oligosakkarit zincirleri içeren proteinlerdir. Oligosakkarit zincirlerini glikoz, galaktoz, mannoz, fukoz, ksiloz, N-asetilglikozamin, N-asetilgalaktozamin ve N-asetilnöraminik asit oluşturur. Glikoproteinler kollajen, musin, immunoglobulin, enzim, antijen, antikor gibi bir çok yapının içinde yer alır. Ayrıca hücre-hücre etkileşimlerinde önemli rol oynar. Proteinlere karbonhidrat parçalarını nükleotit şekerlerle ekler. UDP, guanozin difosfat ve sitidin monofosfat nükleotit şekerlerdir.

Glikolipitler (glikosfingolipit) sinir hücresi başta olmak üzere tüm hücre membranlarının dış yüzünde bulunur ve hücre yüzeyi karbonhidratlarını oluşturur. Glikolipitler hücre adezyonunda ve hücreler arası iletişimde önemlidir. Tüm glikolipitler seramitten türer. Seramit yapısındaki sfingozinin primer alkol grubuna bir galaktoz/glikoz bağlanmasıyla galaktozilseramit (galaktozilsfingolipit) ya da glikozilseramit (glikozilsfingolipit) oluşur. Galaktozilseramit myelinin ana lipidi iken glikozilseramit ekstrasöronal dokuların ana lipididir (11).

2.2. Galaktoz Metabolizması

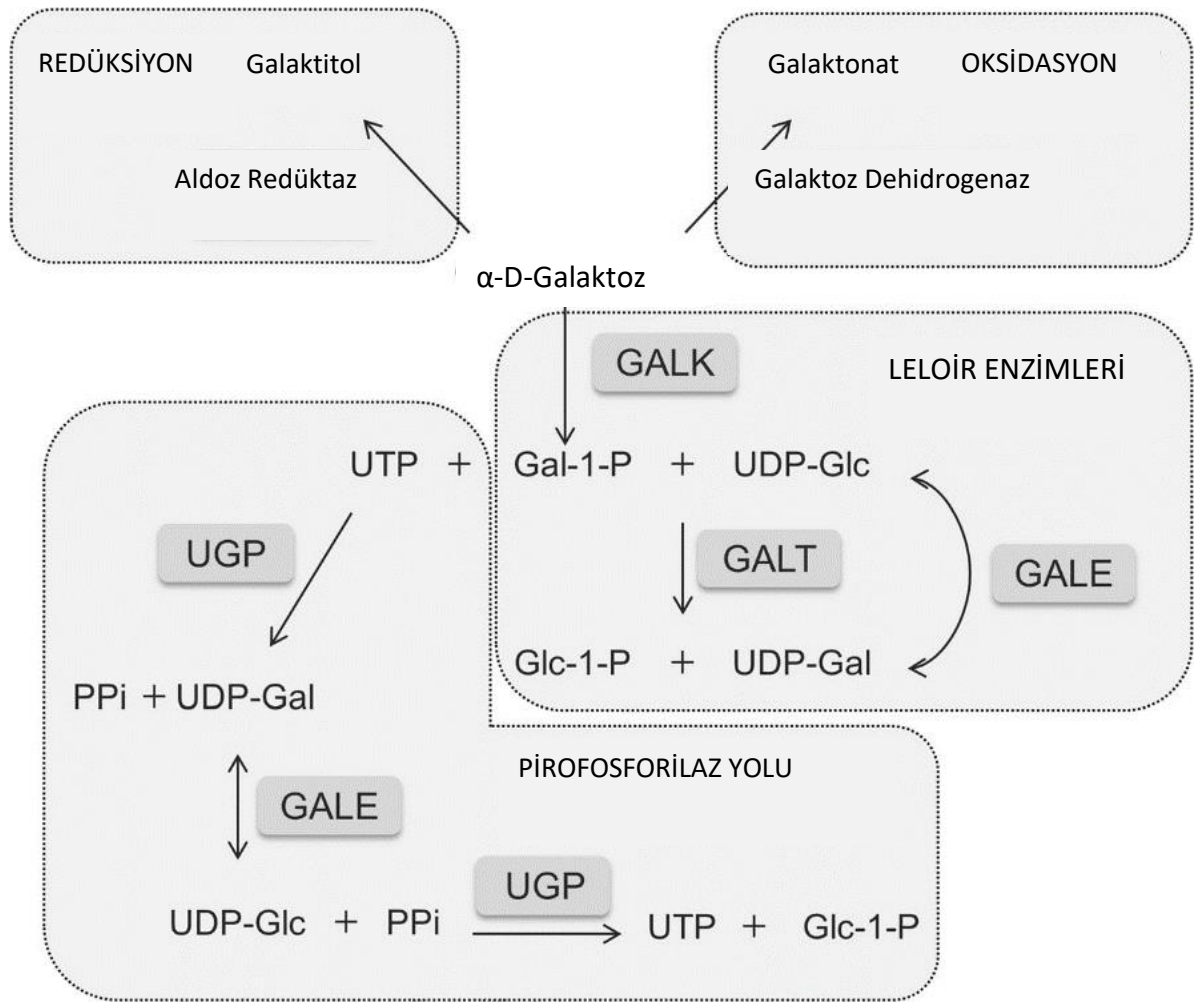
Galaktoz, insan vücudu için hayati öneme sahip olan, metabolik ve yapısal fonksiyonları olan, tüm canlı organizmalarda bulunan doğal bir aldohexozdur (11). Galaktozun diyetteki başlıca kaynağı süt ve süt ürünlerinde bulunan laktozdur. Diyet ile alınan laktoz, laktaz enzimi ile galaktoz ve glikoza ayrıldıktan sonra kullanılır. Bazı sebze ve meyvelerde serbest halde galaktoz bulunur. Önemli miktarda galaktoz endojen olarak karmaşık karbonhidratların (glikoproteinler, glikolipitler ve proteoglikanlar) hidrolizi ile elde edilir (4,12).

Galaktoz vücudun çeşitli dokularında enerji üretimi için kaynak sağlamasının yanı sıra bazı GAG'ların, glikoproteinlerin ve glikolipitlerin önemli bir yapısal bileşenini oluşturur. Galaktozun yapısal fonksiyonları şunlardır (11,13–16):

- Kondroitin sülfatın yapısına katılarak kemik, kıkırdak ve nöron gelişiminde rol oynar.
- Keratan sülfat yapısına katılarak kornea, kıkırdak, kemik, saç, tırnak yapılarına katılır.
- Dermatan sülfat yapısına katılarak derinin esneklik ve yumuşaklığına katkıda bulunur.
- Heparin ve heparan sülfat gibi GAG'ların sentezi ile ilişkili olup birçok görev ve fonksiyonu bulunur.
- Bir glikoprotein olan müsinin yapısına katılarak respiratuvar sistemde enfeksiyonlara karşı bir direnç oluşturur.

- İmmunglobulin G'nin Fc kısmının galaktozilasyonu için gereklidir. İmmün sistemi güçlendirir.
- Galaktozilseramit ve sülfatit yapısına katılarak sinir dokunun önemli bir bileşenini oluşturur.
- Fertilizasyonda önemlidir.
- Gastrointestinal sistem için prebiyotik kaynağıdır.

Diyet ile alınan galaktoz, sodyum/glikoz-galaktoz taşıyıcısı (SGLT1) adı verilen özgün bir protein ile ince bağırsağın fırçamsı kenar membranından sekonder aktif transport ile enterosit içine alınır. Enterosit içindeki galaktoz glikoz taşıyıcısı-2 (GLUT-2) ile kapillere geçer. Karaciğere portal ven yoluyla taşınır ve GLUT-2 ile tekrar hücre içine alınır (17,18). Diyet ile alınan toplam galaktozun yaklaşık %88'i karaciğere, kalan kısmı doğrudan diğer dokulara taşınır (19). Karaciğerde Leloir yolunu oluşturan üç enzimin sıralı etkisiyle metabolize edilir. Bu yol Luis Federico Leloir tarafından 1949 ve 1953 yılları arasında tanımlanmıştır (Şekil 6). Galaktoz, yolun ilk enzimi olan GALK ile galaktoz-1-fosfata (Gal-1-P) dönüştürülür. Yolun ikinci enzimi olan GALT, bir yer değiştirme reaksiyonu ile UDP-glukoz (UDP-Glu) ve Gal-1-P'ı, glikoz-1-fosfat (Glu-1-P) ve UDP-galaktoza (UDP-Gal) çevirir. Oluşan Glu-1-P enerji eldesinde kullanılır. GALE, Leloir yolunun üçüncü enzimidir (4). Bu enzim UDP-Gal/UDP-Glu ve UDP-N-asetilglikozamin/UDP-N-asetilgalaktozamin arasındaki dönüşümü katalize eder. Bu sayede glikozilasyon reaksiyonlarında zorunlu şeker donörlerinin hücre içi havuzları korunur (11,16).



Şekil 6. Galaktoz metabolizması ve Leloir yolu

Leloir yolu enzimleri birçok dokuda ve hücre tipinde bulunur. Bir Leloir yolu enziminin eksikliğinde galaktoz metabolizmasında alternatif yollar ön plana çıkar, galaktitol ve galaktonat gibi metabolitlerin artışına neden olur. Galaktoz polyol yolunda aldoz redüktaz ile galaktitole indirgenir fakat galaktitol sorbitol dehidrogenaz tarafından metabolize edilemez. Galaktitolün permeabilitesi düşük olduğu için hücre zarını geçemez ve hücrelerde birikir (20). Galaktitolün hücre içi yüksekliği hiperosmotik ve oksidatif etki gösterir (16). GALT ve GALK eksikliğinde gelişen katarakta, galaktitolün hiperosmotik etkisi neden olmaktadır. Ayrıca bazı hastalarda gelişen psödotümör serebriden de beyin omurilik sıvısında artmış galaktitol konsantrasyonları sorumlu tutulmuştur (21). Tedavi almayan galaktozemi hastalarının idrarında yüksek konsantrasyonlarda galaktitol tespit edilir. Galaktoz, galaktoz dehidrogenaz ile galaktonata yükseltgenebilir. Galaktonat metabolize edilerek idrar ve solunum yolu ile vücuttan atılır (22).

Galaktonat ve galaktitol oluşumuyla karakterize alternatif yollara ek olarak pirofosforilaz yolundan da söz edilebilir. Bu yol GALK ile oluşan Gal-1-P'nin glikoz/galaktoz pirofosforilaz (UGP) enzimi ile UDP-Gal'a dönüştürülmesini ve sonrasında GALE ile UDP-Glu'a epimerize edilmesini kapsar. Endojen galaktoz üretimine pirofosforilaz yolu katkıda bulunur (4).

2.3. Galaktoz Metabolizması Bozuklukları

Kanda galaktoz artışı anlamına gelen galaktozemi ilk kez 1908'de Von Ruess tarafından fizik muayenesinde hepatosplenomegali olan bir bebeğin idrarında galaktoz atılımının tespit edilmesiyle keşfedilmiştir. Von Ruess, bebeğin diyetinden süt ürünlerinin çıkarılmasıyla idrarda galaktoz atılımının sona erdiğini gözlemlemiştir. Tanının doğrulanması o dönemde mümkün olmamakla birlikte, Von Ruess'un galaktozemili bir hastayı ilk kez rapor eden kişi olduğu kabul edilmiştir. Galaktozemi ilk olarak 1935 yılında Mason ve Turner tarafından ayrıntılı olarak tanımlanmıştır. Leloir, 1950'li yılların başlarında galaktozun glikoza dönüşme sürecini açıklamış ve 1970 yılında Nobel Kimya ödülünü kazanmıştır. Her ne kadar hastalık tanımlanmış olsa da bu hastalığa neden olan kusurlu gen 1956'ya kadar bulunamamıştır (23). Bir diğer önemli gelişme ise Gutrie ve Paigen'in 1963'te yenidoğan tarama yöntemleriyle galaktozemi tespit etmiş olmalarıdır. Galaktozemi, yenidoğan tarama yöntemleriyle tespit edilebilen fenilketonüriden (FKÜ) sonra ikinci bozukluktur (24).

Galaktozemi, GALK (EC 2.7.1.6), GALT (EC 2.7.7.12) ve GALE (EC 5.1.3.2) enzimlerinden birinin eksikliği sonucu gelişir. Tanı, eritrositlerde azalmış ya da tamamen yok olmuş enzim aktivitesinin gösterilmesi esasına dayanır. GALT, GALK 1 ve GALE genlerinin analizleri tanının bir parçası olarak kullanılır (5).

Galaktoz metabolizmasında rol oynayan üç enzim ve eksiklikleri şu şekildedir:

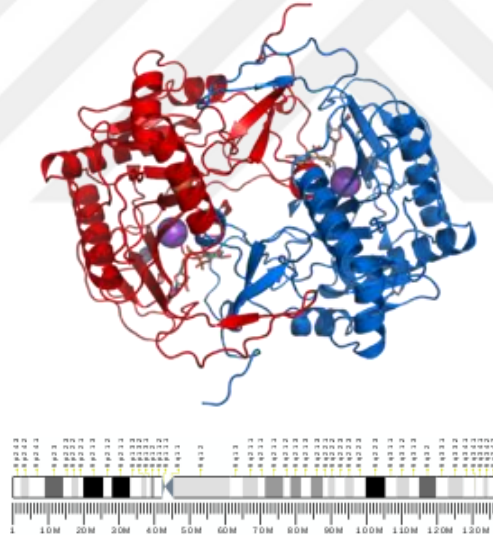
1. GALT eksikliği: GALT aktivitesindeki tam ya da tama yakın eksiklik “klasik galaktozemi” olarak bilinir. GALT eksikliği çoğu zaman “klasik galaktozemi”, “galaktozemi”, “kalıtsal galaktozemi” olarak da adlandırılır. GALT aktivitesinin tamamen eksik olmadığı kısmen aktivite gösterdiği birçok GALT eksikliği tipi vardır. Bu çeşitliliğin sebebi GALT geninde şimdiye kadar tanımlanmış yüzlerce mutasyonun varlığıdır (25). GALT aktivitesinin %0–1 arasında olması “klasik galaktozemi”, %1-13 arasında olması “galaktozeminin farklı klinik tipi”, %13-38 arasında olması ise “galaktozeminin farklı biyokimyasal tipi” olarak sınıflandırılır (1).

2. GALK eksikliği: GALK eksikliği sadece katarakt oluşumuna yol açar (4).
3. GALE eksikliği: GALE eksikliğinde defekt çoğu zaman eritrosit ve lökositlerde sınırlı kalan periferik epimeraz enzimindedir. Bu eksikliğin görüldüğü hastaların büyüme gelişmeleri normaldir fakat enzim defektinin lokalize kalmayıp diğer dokularda da görüldüğü jeneralize formunda hastalık klasik galaktozemiye benzer şekilde seyreder (4).

2.4. Leloir Yolu Enzimlerinin Moleküler ve Kimyasal Özellikleri

Galaktoz metabolizmasında kullanılan enzimler kromozom üzerinde farklı gen bölgelerinde, aynı isimli genler tarafından kodlanır. Genlerde olabilecek çeşitli mutasyonlar nedeniyle enzim aktiviteleri azalabilir veya tamamen yok olabilir.

2.4.1. GALT Geni



Şekil 7. GALT geni

GALT geni 9. kromozomun p13.3 lokasyonunda bulunur (Şekil 7). Histidin triad süperaillesindendir. 11 ekzon içerir ve 379 aminoasit uzunluğunda bir protein kodlar. Günümüzde GALT geninde 200'den fazla anlamsız, yanlış anlamlı ve çerçeve kayması mutasyonları, kırpılma bölgesi farklılıkları ve delesyonları içeren birçok patolojik varyant tespit edilmiştir (26). Büyük çoğunluğu (%85) şiddetli enzim eksikliğine yol açar ve klasik galaktozemi ile karakterizedir. Klasik galaktozeminin %61'ini yanlış anlamlı mutasyonlar oluşturur (27). En yaygın görülen mutant aleller aşağıdaki gibidir (1,23):

- Q188R: 188. aminoasit pozisyonuna glutamin yerine arjinin gelir ve yanlış anlamalı bir mutasyona yol açar. Kafkas ve İspanyol kökenli Amerikalılarda, Avrupa toplumlarında en yaygın görülen klasik galaktozemi alelidir. Bu mutasyonu taşıyan hastalar ağır bir klinik seyir göstermektedir.
- K285N: 285. aminoasit pozisyonuna lizin yerine asparajin gelir ve yanlış anlamalı bir mutasyona yol açar. Doğu Avrupalılarda sıkça rastlanan bir klasik galaktozemi alelidir. Ciddi hastalık ile ilişkilidir.
- S135L: 135. aminoasit pozisyonuna serin yerine lösin gelir ve yanlış anlamalı bir mutasyona yol açar. Bu mutasyon neredeyse tamamen Afrika kökenli ırklarda görülür. Hastaların fenotipik özellikleri klasik galaktozemi kadar ağır değildir. Çünkü karaciğer ve diğer dokularda bir miktar GALT aktivitesi mevcuttur. Galaktozeminin farklı klinik tipinde S135L homozigotluğuna sık rastlanır.
- N314D (Duarte aleli, D2, Duarte2): 314. aminoasit pozisyonuna asparajin yerine aspartat gelir ve yanlış anlamalı bir mutasyona yol açar. Duarte aleli iki intronik bölge değişikliği, dört baz çiftlik promotor bölge delesyonu ve N314D yanlış anlamalı mutasyonu içerir. Duarte galaktozemi adı verilen özel bir GALT eksikliği ile karakterizedir ve galaktozeminin farklı biyokimyasal tipine neden olur. GALT aktivitesi azalır fakat tamamen ortadan kalkmaz. Belirti ve semptomlar daha hafif olma eğilimindedir. Bu alelin Avrupa popülasyonlarında, Afrika veya Asya ırklarından daha yaygın olduğu düşünülmektedir.

GALT geninde klasik galaktozemiye neden olan alel “G” (patolojik alel), Duarte aleli “D”, GALT mutasyonu göstermeyen alel “N” olarak tanımlanır. Galaktozemiden hiç etkilenmeyen bireyin genotipi “N/N” olarak ifade edilir ve sağlıklı bir GALT aktivitesi gösterirler. Klasik galaktozemi hastaları iki patolojik GALT aleline sahiptir (G/G). Ebeveynlerin her birinden patolojik aleller çocuğa aktarılır. Klasik galaktozemide Q188R homozigotluğuna ve K285N homozigotluğuna çok sık rastlanır. “D/G” galaktozemili bireyler birleşik heterozigottur; biri Duarte aleli, diğeri ise klasik galaktozemi alelidir (D/G). Böyle bir durumda ebeveynlerde moleküler değerlendirme yapılmalıdır. Anne ve babanın her biri çocuktaki bir aleli gösteriyorsa çocuktaki D aleli ve patolojik alel farklı kromozomlarda trans konfigürasyonundadır ve çocuğun tanısı Duarte galaktozemi (D/G). Anne-babadan birinde hem “D” hem de patolojik alel varsa, diğeriinde mutasyon saptanmamışsa; çocuktaki D ve patolojik alel aynı kromozom üzerinde cis konfigürasyonundadır. Bu durumda çocuk Duarte galaktozemi değil galaktozemi taşıyıcısıdır

(G/N). Homozigot Duarte taşıyıcısı ise “D/D” olarak ifade edilir. “D/N”, “D/D”, “D/G” genotipleri sırasıyla yaklaşık normalin %75’i, %50’si, %25’i kadar rezidüel GALT aktivitesi gösterir (28).

Rezidüel GALT aktivitesi ile birlikte GALT geninde meydana gelen farklı mutasyon tipleri GALT eksikliğinin klinik seyrini belirler. GALT genotipi, GALT eksikliği olan hastaların fenotipinin belirlenmesinde en önemli faktördür (1).

GALT geninin değerlendirilmesi her zaman enzim aktivitesi ile birlikte yapılmalıdır. D alelinin varlığı ile Duarte galaktozemi tanısı konulamaz ya da klasik galaktozemi dışlanamaz. Galaktozemi tanısında biyokimyasal ve moleküler sonuçların entegre edilmesi patojenik ve patojenik olmayan varyantlar arasında ayırım yaparak tanının hızını ve doğruluğunu artırır (1,27).

2.4.2. GALK ve GALE Genleri

Galaktokinazı kodlayan GALK1 geni 17. kromozomun q25.1 lokasyonunda bulunur. İnseriyon, delesyon ve tek baz değişimlerini içeren çeşitli GALK patolojik varyantları vardır. GALK’daki yetersizlik tip 2 galaktozemi olarak da adlandırılır (23).

GALE’yi kodlayan GALE geni 1. kromozomun p36.11 lokasyonunda bulunur. GALE dimer yapıdadır ve her bir subuniti 1 molekül NAD⁺ bağlama bölgesi içerir. GALE’deki yetersizlik tip 3 galaktozemi olarak da tanımlanır (23).

2.5. GALT Eksikliği

GALT eksikliği, rezidüel enzim aktivitesine göre üç kategoride sınıflandırılabilir:

- 1.Klasik galaktozemi
- 2.Galaktozeminin farklı klinik tipi
- 3.Galaktozeminin farklı biyokimyasal tipi

2.5.1. Klasik Galaktozemi (Tip1)

Klasik galaktozemi şiddetli seyreden ve en sık görülen galaktozemi tipidir. Bu hastalarda eritrositlerde ve karaciğerde enzim aktivitesi ya hiç yoktur ya da nadiren çok az bir aktivite bulunabilir. Dünyada görülme sıklığı 1/40000–1/60000 arasında değişir. Akut dönemde tanı konulamaz ve tedavi edilemez ise ölümcüldür (26). Ülkemizde akraba evliliğinin yaygın olması sebebiyle bu oran daha yüksektir (2,23). Klasik galaktozeminin Asya popülasyonlarında bildirilen sıklığı çok daha düşüktür (24).

2.5.1.1. Patogenez ve Klinik

Klasik galaktozemili hasta doğumda tamamen asemptomatiktir. Klinik bulgular yaşamın ilk günlerinde yenidoğanın anne sütüyle veya formül mama ile beslenmesinden hemen sonra

başlar. İnce bağırsaklarda laktatın hidrolizi ile oluşan galaktoz, karaciğerde leloir yoluna girer. Galaktokinaz, galaktozu Gal-1-P'a çevirir fakat Gal-1-P kusurlu olan GALT tarafından UDP-Gal ve Glu-1-P'a metabolize edilemez. Çeşitli organlarda ve vücut sıvılarında galaktoz, Gal-1-P, galaktitol konsantrasyonları artar. Yaşamın erken döneminde ortaya çıkan belirti ve bulgular ile uzun dönemde görülen komplikasyonlar bu metabolitlerin birikimiyle ilişkilidir. Gal-1-P karaciğer, beyin, böbrek, kan hücreleri, over ve sinir sisteminde birikerek toksik etki gösterir. Galaktitolün lenste birikimi hücrelerin şişmesine ve ölümüne yol açarak katarakta neden olur (29). Klasik galaktozemili hastalar enfeksiyona yatkındır. Yenidoğan döneminde Escherichia coli'ye bağlı gelişen sepsis ölümcüldür (30). Sepsise yatkınlığın galaktozun nötrofil fonksiyonlarını bozması ve immun sistemin zayıflamasından kaynaklandığı düşünülmektedir (16).

Klasik galaktozemili hastalarda diyetle rağmen overleri, kemikleri ve santral sinir sistemini etkileyen uzun dönem komplikasyonlar görülebilir (1,20,31). Bu komplikasyonlardan UDP-Gal ve UDP-Glu arasındaki oranın bozulması sorumlu tutulur. Glikoziltransferazlar için şeker verici olan bu metabolitlerin sağlıklı bir oran dahilinde vücutta bulunmaması glikoprotein ve glikolipit üretiminin kusurlu olmasına yol açar. Ayrıca endojen galaktoz üretiminin tedaviye rağmen devam etmesi de bu komplikasyonların gelişiminde etkilidir (15).

Klinik bulgular çoğu zaman bebeğin anne sütü ile beslenmesinden hemen sonra başlar (27). Spesifik belirti ve semptomlar farklı sıklıkla görülebilir. En sık görülenler:

- Sarılık (%74),
- Kusma (%47),
- Hepatomegali (%43),
- Büyüme gelişme bozukluğu (%29),
- Beslenme güçlüğü (%23),
- Letarji (%16),
- İshal (%12),
- Sepsis (%10)'tir (32).

Fizik muayenede genellikle hepatomegali, letarji ve hipotoniye eşlik eden sarılık tespit edilir. Ödem, asit, fontanellerde bombelik, ensefalopati, aşırı morarma veya kanama bulguları olabilir (33). Katarakt doğumda bulunabilir ancak genellikle doğumdan iki hafta sonra ortaya çıkar (21,34).

Yaşamın erken döneminde tedavi edilen bebekler, sağlıklı bebeklerden 1.5-3 yaşına kadar ayırt edilemez (35). Bu dönemde dil ve konuşma problemlerinde bir gecikme belirginleşebilir. Erken tanı ve tedavinin uygulanmasına rağmen hastalarda beyin ve gonadları etkileyen uzun dönem komplikasyonlar gelişebilmektedir (36). Klasik galaktozemi hastalarının klinik özellikleri, belirti ve bulguları değişkenlik gösterebilir (1).

Beyin, galaktozemiden etkilenen başlıca hedef organlardan biridir. Etkilenme şiddeti aynı genotipli hastalarda bile değişkenlik gösterebilir. Hastalar öğrenme güçlüğü çeker, konuşma ve dil problemleri yaşar. Ayrıca motor hareketleri kısıtlıdır (37,38). Okul başarıları düşüktür. Hastaların sosyal beceri gelişimi zayıftır, birçok hasta bekindir ve ebeveynleri ile birlikte yaşamaktadır (39). Depresyon, obsesif-kompulsif bozukluk gibi psikiyatrik rahatsızlıklara bu hastalarda sık rastlanır. Titreme, ataksi, distoni, dismetri ve dizatri gibi nörolojik komplikasyonlar gelişebilir (40). Mevcut kılavuzlar hastaların bilişsel yeteneklerinin, yürütücü işlevlerinin, dil gelişimlerinin ve psikiyatrik belirtilerinin periyodik olarak değerlendirilmesini, gerektiği zaman hastanın özel eğitime yönlendirilerek sosyal becerilerinin geliştirilmesini önermektedir (41).

Primer over yetmezliği ile sonuçlanan over hasarı ve hipergonadotropik hipogonadizm klasik galaktozemili kadınların neredeyse tamamında görülür (42). Gecikmiş pubertal gelişim, primer amenore, sekonder amenore veya oligomenore, erken menopoz karşılaşılan problemlerdir (43,44). Bununla birlikte primer over yetmezliği olan hastalar infertilite riski altında olmalarına rağmen çok düşük anti-Müllerian hormon seviyelerinde bile spontan gebelikler yaşayabilir (45). Galaktozemili erkeklerde üreme sağlığının bozulduğu düşünülmemektedir. Kriptorşidizm prevalansı genel popülasyondan daha yüksektir (46).

Over yetersizliği, sınırlı fiziksel aktivite ve hastalık ile ilişkili diğer faktörler bu hastaları kemik sağlığı açısından risk altına sokmaktadır. Klasik galaktozemili hastalarda kemik mineral yoğunluğu Z-skoru genel popülasyona kıyasla daha düşüktür (47). Erişkin dönemde nihai boy normal olmasına rağmen, çocukluk döneminde büyüme gecikir (48).

2.5.1.2. Laboratuvar Bulguları

- Total galaktoz: Tedavi edilmeyen klasik galaktozemi hastalarında plazma total galaktoz konsantrasyonu genellikle 10 mg/dL'den yüksektir (sağlıklılarda genelde <10 mg/dL).
- Gal-1-P: Klasik galaktozemili hastaların eritrosit Gal-1-P konsantrasyonları 120 mg/dL'ye kadar yükselebilir. Terapötik aralığa (2-4 mg/dL) 2-3 ayda düşürülebilir. Diyet tedavisinden sonra bile sağlıklı bireylerde olduğu gibi (<1 mg/dL) tespit edilemez (27). Gal-1-P

konsantrasyonlarının kısmi ve tam GALT eksikliklerinin ayırıcı tanısında kullanılması doğru değildir (5). Gal-1-P rutinde hastaların tedaviye verdiği cevabı gözlemlemek adına takipte kullanılır (49).

- Eritrosit GALT aktivitesi: Hastaların tamamına yakınında tespit edilemez.
- Kan ve idrar galaktitol seviyeleri: Hastaların tamamına yakınında artar (30). Hastalar arasındaki bazal galaktitol konsantrasyonları yaş ve vücut ağırlığına bağlı olarak büyük farklılıklar gösterir. Üriner galaktitol konsantrasyonları tedaviye verilen cevabın değerlendirilmesi için takiplerde kullanılır (5).
- Diğer bulgular: Klasik galaktozemide en çok etkilenen organ karaciğerdir. Karaciğer tutulumuna bağlı direkt ve/veya indirekt hiperbilirubinemi, yükselmiş karaciğer fonksiyon testleri, koagülopati, yükselmiş plazma aminoasitleri (özellikle fenilalanin, tirozin ve metyonin), azalmış serum fibrinojeni dikkati çeker (50). Renal tübüler hasar nedeniyle hiperkloremik metaboliz asidoz, galaktozüri, glikozüri, aminoasidüri, albüminüri, fosfatüri ve fosfatemi görülebilir (16).

2.5.1.3. Tanı

Klasik galaktozemi, sarılık, kusma, hepatomegali, beslenme bozukluğu, letarji, ishal ve sepsis gibi klinik bulguları, anormal laboratuvar sonuçları ve/veya pozitif yenidoğan taraması olan bebeklerde mutlaka düşünülmesi gerekir. Yenidoğan tarama sonuçları henüz raporlanmamışken çoğu zaman hastalık semptomatik hale gelmiş olur. Bu sebeple tarama sonuçları beklenilmeden klasik galaktozemiden şüphelenildiği an gerekli tedaviye başlanmalıdır (30).

Birçok olguda, eritrosit GALT aktivitesi ve total galaktoz (Gal-1-P + serbest galaktoz) ölçümü ile birlikte yaygın görülen mutasyonların analizi tanı için yeterli olmaktadır (51). Tanısal testler nispeten basit olmakla birlikte, test sonuçları preanalitik ve analitik süreçten önemli ölçüde etkilenebilir (5).

Eritrositlerde GALT aktivitesinin ölçülmesi tanı için altın standarttır. Son 3 ay içinde yapılmış eritrosit transfüzyonu yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Böyle durumlarda DNA analizleri tercih edilmelidir. DNA analizleri yaygın görülen gen mutasyonlarına yönelik uygulanır. Negatif bir sonuç hastalığı dışlamaz ve derin intronik bölgeler dahil tam gen dizilimi gerekli olabilir (4). Sadece tam gen sekanslama (enzim aktivite tespiti veya diğer biyokimyasal testler olmadan) çok sayıda GALT mutasyonunun olması ve nadir mutasyonların patojenitelerinin değerlendirilmesindeki zorluk nedeniyle bir teşhis sağlamayabilir. GALT

mutasyon analizi birçok laboratuvarında en yaygın varyasyonlar için uygulanmaktadır ve bazı yenidoğan tarama programlarında tanıyı kolaylaştırmak için kullanılmaktadır (31,52).

İnvaziv bir yöntem olmasına rağmen gerektiğinde prenatal tanı sağlanabilir. Prenatal tanı amniyotik sıvı / koryonik villus biyopsisi / koryonik villus biyopsisinden ekstrakte edilen DNA analizi ile yapılabilir (33). Ailede galaktozemi öyküsü olan veya daha önce etkilenmiş bir çocuğa sahip ebeveynlere gebelik öncesi danışmanlık verilmelidir (50).

2.5.1.4. Tedavi ve Prognoz

Yenidoğan döneminde klasik galaktozemiden şüphelenildiği an anne sütü ve formül mamalar diyetten çıkarılmalıdır. Yenidoğan döneminde laktozsuz beslenme ile karaciğer ve böbrek fonksiyonları normale döner, mortalite engellenir. Galaktoz kısıtlaması yenidoğan ve süt çocukluk döneminde kabul görmüş tedavi şekliyle uzun dönemde beslenme tedavisi konusunda net bir fikir birliği yoktur. Prenatal tanı almış ve tedavisine başlanmış, çok sıkı şekilde takip edilmiş hastalarda dahi uzun dönem komplikasyonların ortaya çıkmış olması galaktozun uzun dönemde ne derece kısıtlanması gerektiği konusunda tartışmalara yol açmıştır. Buna rağmen bazı merkezler uzun dönemde sıkı galaktoz diyeti tercih ederken, bazı merkezler sadece laktozsuz diyet uygulamaktadır (3,53).

Çocukluk döneminde mutlak galaktozsuz beslenmek mümkün değildir. Süt dışı kaynaklar (birçok sebze, meyve ve bakla grubu) oldukça az miktarda galaktoz içerir ve diyetle alımına izin verilir (53,54). Hastaların serbest galaktoz miktarının nispeten az olduğu olgunlaşmamış meyve ve sebzeleri tercih etmeleri tavsiye edilmelidir (41). Aileler mutlaka bilinçlendirilmeli, laktoz ve galaktoz içeren gıdaları öğrenmeleri gerekmektedir. Diyet tedavisi planında deneyimli bir diyetisyen ile konsültasyon yapılmalıdır.

Katarakt cerrahisi yaşamın ilk yıllarında nadiren gerekebilir. Hastalarda uzun dönemde meydana gelebilecek konuşma defektleri için konuşma terapisine başlanması oldukça faydalıdır. Primer amenore ve puberte gelişiminde gecikme durumlarında hormon replasman tedavisi uygulanır. Kalsiyum, K vitamini, D vitaminini takviyesi kadınlarda osteoporoz riskini azaltır. Bir yaşını dolduranlar çocuklara kalsiyum takviyesi yapılmalıdır (53).

Klasik galaktozemi hastalarının yakın takibi gereklidir. Hastaların takiplerinde mutlaka motor, dil ve bilişsel işlevler yakından izlenmelidir.

2.5.2. Galaktozeminin Farklı Klinik Tipi

Galaktozeminin farklı klinik tipi S135L homozigotluğu ile örneklendirilebilir. S135L mutasyonu Güney Afrikada ve Afrikalı Amerikalılarda en yaygın görülen mutasyondur (55).

Yenidoğan taramalarında tespit edilen ve yaşamın erken döneminde tedavi altına alınan S135L/S135L genotipine sahip hastaların çoğunda uzun dönemde herhangi bir komplikasyon gözlenmez (56). Buna rağmen klinik farklı tip galaktozemili hastalar yenidoğan döneminde risk altındadır ve diyet kısıtlaması ile tedavi edilirler. S135L homozigotluğu taşıyan hastalarda eritrositlerde ve lenfoblastlarda GALT aktivitesi tespit edilemezken lökositlerde tespit edilebilir. Galaktoz oksidasyonu hakkında bilgi veren galaktoz nefes testinde ^{13}C -galaktozun $^{13}\text{CO}_2$ 'e oksidasyonu bu hastalarda normaldir. Bu durum Afrikalı Amerikalıların karaciğer ve ince bağırsak dokusunda normalin %8 ile %12'si kadar GALT aktivitesine sahip olmalarıyla açıklanabilir (57,58). Tanı esnasında genellikle eritrosit Gal-1-P konsantrasyonu >10 mg/dL bulunur ancak klasik galaktozemi hastalarının aksine diyetle Gal-1-P seviyeleri <1 mg/dL'ye düşer (59).

Eritrositlerde normalin %1-13'ü kadar GALT aktivitesi gösteren S135L dışında mutasyon tespit edilen hastalar, yenidoğan döneminde S135L homozigotluğunda olduğu gibi risk altındayken bu hastalarda uzun dönem komplikasyonlar nadiren görülebilir (1).

2.5.3. Galaktozeminin Farklı Biyokimyasal Tipi

Galaktozemin farklı biyokimyasal tipi hafif-aseptomatik seyreden Duarte galaktozemi (D/G) ile ilişkilidir. Duarte galaktozemi birçok otör tarafından gerçek bir hastalık olarak kabul edilmez. Klasik galaktozemiye göre yaklaşık 10 kat daha sık görülür (1:3500). Diyetle alınan galaktoz tolere edilebilir çünkü bu grup galaktozemide enzim aktivitesi az da olsa etkinlik gösterir (26,28).

Yenidoğan taramalarında total galaktoz konsantrasyonlarında orta derecede yükselme ve azalmış eritrosit GALT aktiviteleri Duarte galaktozemi açısından uyarıcıdır. Günümüzde DNA analizleri ile tanı kesinleştirilir. Plazma total galaktoz konsantrasyonu genellikle 10 mg/dL'den yüksektir. Eritrosit Gal-1-P konsantrasyonları yaşamın ilk günlerinde 30 mg/dL'nin üstünde olabilir fakat diyet tedavisi almasalar bile bir yıl içinde sağlıklı insanlarda olduğu gibi 1 mg/dL'nin altına düşer. Çoğu zaman eritrosit Gal-1-P ve idrar galaktitol konsantrasyonları klasik galaktozemide olduğu kadar yüksek bulunmaz (28,60,61).

Duarte galaktozeminin herhangi bir klinik bulguya neden olduğu düşünülmemektedir. 1-6 yaş arasındaki Duarte galaktozemili çocuklarda klinik ve gelişimsel sorun saptanmamıştır. Over yetmezlik gözlenmez (60).

Galaktozemi tedavisi için uluslararası klinik kılavuzlar, S135L dahil olmak üzere GALT geninin her iki alelinde eritrosit aktivitesi %10'un altında olan patojenik varyantları tedavi etmeyi

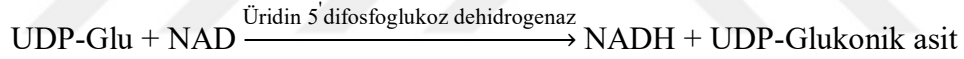
önerir. Eritrosit GALT aktivitesi normalin %10-15'i olan bireyler için şu anda tedavi edilip edilmemeleri gerektiğine karar verecek yeterli kanıt yoktur. Duarte galaktozemide galaktoz kısıtlaması yapılması gerekip gerekmediği net olmamakla birlikte yaygın görüş tedavi gerektirmediği yönündedir (41). Uzun süreli prognoz ve yaşamın ilk yılında galaktoz alımının prognozu etkileyip etkilemeyeceği konusunda daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

2.6. Galaktozemi Tanısında Kullanılan Biyokimyasal Yöntemler

Eritrosit GALT aktivite ölçümü için tanımlanmış birçok yöntem bulunmaktadır (7,8,62–69). Enzimatik yöntemlerin genelinde olduğu gibi GALT aktivite ölçümünde de amaç oluşan ürün miktarını (UDP-Gal) ya da biriken substrat miktarını (UDP-Glu) tespit etmeye yöneliktir. GALT'ın katalizlediği reaksiyon şu şekildedir:



Substrat birikimine dayalı yöntemlerde, tam kandan elde edilen hemolizat UDP-Glu ve Gal-1-P ile inkübe edilerek GALT'ın katalizlediği enzimatik reaksiyonun gerçekleşmesi sağlanır. Kullanılmayan (artakalan, rezidüel) UDP-Glu, ortamda bulunan NAD⁺'ın kullanıldığı, üridin-5'-difosfoglikoz dehidrogenazın katalize ettiği reaksiyon ile NADH oluşumunu sağlar:



NADH 340 nm'de ışığı absorblar. Artmış absorbans rezidüel UDP-Glu ile doğru orantılı, GALT aktivitesi ile ters orantılıdır. Her bir reaksiyon için Gal-1-P'ı yoksayabilmek amacıyla kör hazırlanır. Bu yöntemde ortamda bulunan endojen NAD⁺ yanlış negatif sonuçlara neden olabilir. Bu durum özellikle NADaz aktivitesi henüz fonksiyonel olmayan yenidoğanlar açısından hata kaynağı olabilir (5).

Ürün miktarının tespit edilerek enzim aktivitesinin ölçüldüğü yöntemler şu şekilde özetlenebilir:

1. Florometrik yöntemler
2. Radyoaktif yöntemler
3. LC-MS/MS yöntemleri

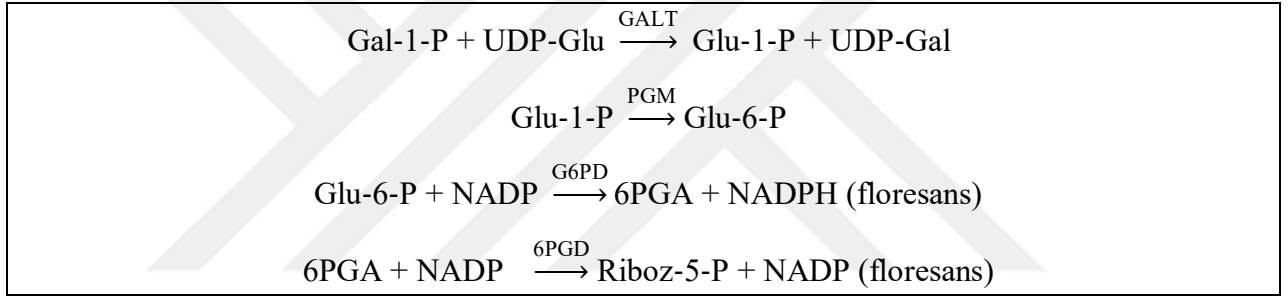
2.6.1. Yöntemlerin Tarihçesi ve Özellikleri

2.6.1.1. Spektrofotometrik ve Florometrik Yöntemler

GALT aktivite ölçümü ilk kez 1964 yılında Beutler'in metilen mavisinin indirgenmesine dayanan yöntemi tarif etmesiyle yapılmıştır. Daha sonra 1965 ve 1966 yıllarında Beutler tarafından UDP-Glu'un birikim prensibine dayanan spektrofotometrik ve fosfoglukomutaz

(PGM), Glikoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) ve 6-fosfo-glukonat dehidrogenaz (6PGD) enzimlerinin katalizlediği reaksiyonların sonucunda oluşan NADPH'nın ultraviyole ışık altında floresansının görsel olarak değerlendirilmesi prensibine dayanan yöntemler tanımlanmıştır. Bu yöntem "Beutler spot test" olarak bilinir (Şekil 8). Hızlı teşhis olanağı sağlar fakat birçok dezavantajı vardır (8,70). Beutler spot testinin dezavantajları şu şekilde özetlenebilir:

- Yöntem hemoglobin, yüksek sıcaklık ve nemden etkilenir. Bu faktörler yanlış pozitiflik oranını artırır.
- G6PD eksikliği olan hastalarda reaksiyon gerçekleşmez ve bu durum yanlış pozitiflik oranını artırır.
- Kalitatif bir yöntemdir.



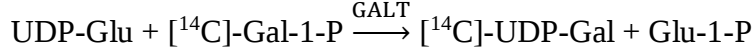
Şekil 8. Beutler spot testi

Bundan sonraki süreç Beutler spot testinin farklı şekillerde modifiye edilmesiyle devam etmiştir. 1969 ve 1974'de florometrik dedektörlerin kullanılmasıyla semikantitatif florometrik yöntemler geliştirilmiştir (63,64). 1989 yılında yüksek hassasiyetli florometrik mikropalak okuyucu kullanılarak floresan okuma ile KKD örneğinde total galaktoz ve GALT aktivite ölçümü yapılmıştır (66,71). Günümüzde modifiye florometrik yöntemler yenidoğan galaktozemi taramalarında ve klasik galaktozemi tanısında diğer yardımcı testler ile birlikte kullanılmaktadır fakat GALT aktivitesinin normalin %5'inden az olduğu durumlarda analitik olarak yetersiz kalmaktadır (8). Bu yöntemle yapılan yenidoğan taramalarında yanlış pozitiflik ve yanlış negatifliğe oldukça sık rastlanır (34). Yanlış pozitiflik ve negatifliğin sebebi analitik performansın düşük olmasıdır.

2.6.1.2. Radyoaktif Yöntemler

Radyoaktif yöntemler 1964 yılından itibaren GALT aktivitesinin belirlenmesinde altın standart olarak kullanılmıştır. Radyoaktif işaretli [^{14}C]-Gal-1-P kullanılarak ortamda bulunan

GALT aktivitesi ile [^{14}C]-UDP-Gal oluşumu sağlanır. Ölçüm öncesi, substrat ve ürün ayrışımı kağıt kromatografisi/iyon değiş tokuş kromatografisi/ince tabaka kromatografisi yöntemlerinin biriyle yapılır. Daha sonra sintilasyon dedektörleri kullanılarak ürün miktarı tayin edilir. Enzimatik reaksiyon şu şekildedir:



Radyoaktif yöntemler zahmetli, tehlikeli, zaman alıcı olduğu gibi radyoaktif maddenin saflık sorunu sebebiyle düşük enzim aktivitelerinin ölçümünde yeterli analitik performans göstermemektedir (7). Normalin %5'inden düşük GALT aktivitesini ölçebilen tarihte sadece bir radyoaktif yöntem tanımlanmıştır. Bu yöntemde hemolizat içinde radyoaktif işaretli UDP-Gal oluşumuna neden olan küçük moleküllerin yok edilmesi için gece boyu süren diyaliz işlemi uygulanır. Radyoaktif işaretli [^{14}C]-Gal-1-P çoğu zaman bir miktar [^{14}C]-Glu-1-P ile kontamine olur. Oluşan ürün olan [^{14}C]-UDP-Gal, kontaminasyon kaynaklı oluşan [^{14}C]-UDP-Glu'dan ayrılamaz. Dolayısıyla aslında hiç GALT aktivitesi olmayan bir örnekte bir miktar enzim aktivitesi tespit edilebilir. Ayrıca gece boyu devam eden diyaliz sonrasında GALT aktivitesi azalabilir. Bu yöntem düşük aktivitelerin tespiti için tasarlandığı için normalin %10'undan büyük GALT aktivitelerini saptayamaz (65).

2.6.1.3. LC-MS/MS yöntemi

2010'lu yıllarda GALT aktivite ölçümü için LC-MS/MS'in kullanıldığı yöntemler tanımlanmış ve popüler hale gelmiştir (72–75). Bu yöntem radyoaktif yöntemle benzer bir yaklaşıma sahiptir. LC-MS/MS ile yapılan aktivite ölçümlerinde tam kan örneklerinden elde edilen hemolizatlar kullanılır. Hemolizatlardaki hemoglobin (Hb) miktarı ölçülür. Substratlar ve internal standart (İS) ortama eklenir, kromatografik ayırtırmadan sonra oluşan analit sinyali tandem kütle spektrometrisinde (MSMS) belirlenir. Reaksiyon denklemi şu şekildedir:



LC-MS/MS yönteminin avantajları şunlardır:

- Enzim aktivitesi hızlı bir şekilde kantitatif olarak tespit edilir. Normalin %5'inin altındaki GALT aktivitelerinin ölçümüne olanak sağlar.
- G6PD enzim eksikliğinden etkilenmez.
- Florometrik yöntemlere göre daha az reaktif kullanılır ve kalite kontrol süreçleri daha kolay yönetilir.
- Radyoaktif yöntemlere göre daha kullanışlı ve güvenlidir.

2.7. Kuru Kan Damlası (KKD) Örneği

Tam kanın kağıda damlatılıp kurutulmasıyla elde edilen KKD örneğinin kimya analizlerinde alternatif bir yöntem olarak kullanılması fikri ilk kez 1913 yılında Ivar Bang tarafından öne sürülmüştür. 1963'te Gutrie, tam kan damlasını absorbe edebilen bir filtre kağıdı geliştirmiş ve bakteriyel inhibisyon testi yöntemi ile FKÜ taraması yapmıştır. Bu filtre kağıdı “kurutulmuş kan damlası kartı (DBS kartı)” ya da “Gutrie kartı” olarak ifade edilir. Gutrie'nin KKD örneği ile yaptığı bu alternatif örnek toplama yaklaşımı çeşitli metabolik kalıtsal hastalıkların yenidoğan döneminde taranmasına olanak sağlamış, yenidoğan tarama programlarının temelini oluşturmuştur (76). Yenidoğan tarama programlarında konjenital kalp hastalığı ve işitme taraması dışında kalan taramaların tamamı KKD örneği ile yapılır. Tam kan örneğini KKD örneği şeklinde toplamak klasik yöntemlere göre önemli avantajlar sağlar:

- Daha az invazivdir.
- Taşınması ve depolanması kolaydır.
- Düşük maliyetlidir.
- Çok az miktarda kan hacmi ile bir çok parametrenin analizine olanak sağlar.

KKD örneği ile yapılan analizlerde, analiz öncesi dönem oldukça önemlidir ve aşağıdaki basamaklardan oluşur (77–79):

1. Hastadan kan toplama: KKD örneği, parmak ucunun ya da topuk bölgesinin lanset yardımıyla delinerek büyük bir damla tam kanın filtre kağıdına damlatılmasıyla elde edilir. Kapiller kan tercih edilir. Venöz örnek alınmasına göre oldukça basit bir işlemdir.
2. Kanın filtre kağıdına uygulanması: İki farklı tip filtre kağıdı vardır; farklı kalitelerde pamuk filtre kağıtları ve cam mikrofiber filtre kağıtları. Klinik ve Laboratuvar Standartları Enstitüsü (CLSI) rehberi pamuk filtre kağıtlarının kullanımını önerir. “Whatman 903” ve “Ahlstrom 226” en sık kullanılan pamuk filtre kağıtlarıdır. Mikrofiber cam filtre kağıtlarının kan absorblama kapasitesi düşük olduğu için tercih edilmez. Kartların üzerinde kan damlasının damlatılacağı hedef bölgeler daire şeklinde belirtilmiştir ve 50-75 µL arası örnek alır. Kan damlası bu halkanın tam merkezine damlatılmalı ve radial şekilde dağılması için zaman tanınmalıdır. Kan örneği halkalarının ön ve arka tarafı tamamen dolmuş olmalıdır. Ölçülecek olan analit, halkanın periferinde merkeze göre daha az bulunur. Çünkü KKD örneklerinin fiziksel özelliği hasta hematokrit değerinden etkilenir. Hematokriti yüksek olan örnek, aynı miktarda damlatılan düşük hematokritli örneğe göre kart üzerinde daha

dar bir alana yayılır. Bu yüzden hastanın hematokrit değerinin tespit edilmesi doğru bir ölçüm için gereklidir.

3. Kuruma: Taşıma ve depolama işlemleri öncesinde KKD örneklerinin emici özelliği olmayan bir yüzeyde tamamen kurummasına müsaade edilmelidir. Kuruma işleminin süresi oda sıcaklığı ve nem gibi ortam şartlarının durumu ve filtre kağıdının türü ile ilişkilidir. 90 dk ile ideal olarak 4 saat arası örnekler kurutulmalıdır. Süreci hızlandırmak için saç kurutucu veya güneş ışığı kullanılmamalıdır. Kurutulan KKD örnekleri su geçirmez kurutucu ve nem göstergesi olan bir plastik çantaya aktarılır. Kurutucu ajanın özelliği kuruma sürecini tamamlamaktır. Bu işlem ayrıca KKD örneği ile ilişkili enfeksiyon riskini en aza indirir.
4. Taşıma ve depolama: KKD örneklerinin boyutları ve şekli, taşıma ve depolama işlemlerini kolaylaştırır. Taşıma esnasında örnekler birbiri ile temas etmemeli, olası kontaminasyon engellenmelidir. Örnekler uzun dönem stabil bir şekilde depolanabilmesine rağmen ışık, sıcaklık ve nem gibi birçok durumdan etkilenebilir. Oda sıcaklığında depolanabilme süreleri; proteinler için 1 hafta, nükleik asitler için 1 yıldır. Eğer uzun süreli bir depolama yapılacak ise KKD örnekleri -20°C ya da -80°C'de muhafaza edilmelidir.

KKD örneği analiz edileceği zaman bir kısmı standart bir çap ölçüsünde (2-8 mm arası; genelde 3 mm) otomatize ya da manuel delgeç yardımıyla kesilir (punchⁱ). Filtre kağıdında merkezden perifer doğru gidildikçe kan yoğunluğu azaldığı için, delgeçle kesilen KKD bölgesi yöntem biası için önemlidir. Çalışma esnasında merkez ya da perifer yakın bir bölgeden pançlama yapılabilir. Bu işlemde önemli olan tutarlı olmaktır.

KKD örneğinin kendisi birçok analitik yöntem ile uyumlu değildir. Öncelikle, uygun ekstrakte edici bir tampon kullanılarak ilgilenilen analitin filtre kağıdından serbestleştirilmesi ve çözünebilir hale getirilmesi gerekir. Salin/fosfat tamponları, şelatörler, metanol, asetonitril (ACN) ve etanol elüsyon ajanı olarak kullanılabilir. Verimsiz bir elüsyon analit kaybına yol açar. Ayrıca bu işlem sırasında su kullanımı, filtre kağıdındaki selüloz ile analit arasındaki hidroksil gruplarının zayıflamasına neden olarak elüsyona katkıda bulunur.

ⁱ “Punch” kelimesi ingilizcede Gutrie kartında kurumuş olan büyük kan damlası halkasının bir delgeç yardımıyla halka şeklinde (genelde 3 mm çapında) kesilmesi işlemini ya da elde edilen minik kuru kan damlası örneklerini ifade etmek için kullanılır.

KKD ekstraktı hemolizli tam kan örneği (hemolizat) gibi düşünülebilir. Kan hücrelerinin bütünlüğü bozulduğu için hücre sayımını içeren hematolojik testler KKD örneği ile değerlendirilemez. Hemoglobine ve hücre içi komponentlere bağlı interferanslar olabilir (77–79).

2.8. KKD Örneğinin Kullanıldığı Yenidoğan Taramaları

Yenidoğan tarama programları tüm dünyada gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde halk sağlığı programları içerisinde çok önemli yeri olan koruyucu sağlık hizmetleridir. Amaç, hastalığı erken dönemde semptomatik hale gelmeden tespit etmek, gerekli tedaviyi sağlamak ve hastalığa bağlı mortalite, morbiditenin önüne geçmektir. Yenidoğan taramaları (YDT) ile yenidoğanların yaşamın ilk günlerinde tedavi edilebilir genetik, endokrinolojik, kardiyolojik, immünolojik, metabolik hastalıklar ve işitme kaybı açısından test edilmeleri sağlanır. İşitme testi ve kardiyolojik testler hasta başında yapılan taramalar iken diğer testler yenidoğan döneminde KKD örneği kullanılarak kolorimetrik, florometrik, immunassay ve MSMS gibi farklı biyokimyasal yöntemler ile taranır. Anormal bir tarama sonucunda hızlı bir şekilde tanı koydurucu testler uygulanmalı, tanı kesinleşinceye kadarki süreçte bebeğin değerlendirilmesi yapılmalı ve tedaviye başlanmalıdır (80,81).

Yenidoğan tarama programlarının ilk hedefi doğumsal metabolik hastalıklar olmuştur. Gutrie'nin 1963 yılında filtre kağıdını tasarlayıp FKÜ izlem ve tanısında bakteriyel inhibisyon yöntemini geliştirmesiyle ilk kez FKÜ tarama programı Massachusetts'te başlamıştır (82,83). Bakteriyel inhibisyon yöntemi galaktozemi, akçaağaç şurubu hastalığı ve homosistinüri taramasında kullanılsa da FKÜ taramasında olduğu kadar geniş çaplı kullanılmamıştır. 1970'li yıllarda hızlı immunassaylerin gelişimiyle konjenital hipotiroidi (KH), YDT paneline eklenmiştir. Diğer hastalıklar daha sonra panele dahil olmuştur. Hangi hastalıkların YDT panelinde yer alması gerektiği konusu her zaman tartışma konusu olmasına rağmen FKÜ, KH ve kistik fibrozis (KF) taramasının mutlaka yapılması gerektiği konusunda genel bir fikirbirliği vardır. Bu konu hakkında Wilson ve Jungner 1986 yılında 10 maddeden oluşan bir metin yayınlamıştır (Tablo 1). Amerikan Tıbbi Genetik ve Genomik Birliği (ACMG) ise 2006'da taranacak hastalığın/durumun özellikleri ile ilgili 3 madde yayınlamıştır (81) (Tablo 2).

Tablo 1. Wilson ve Jungner kriterleri

- 1 Taranacak durum önemli bir sağlık sorunu olmalıdır.
- 2 Taranacak durumun kabul edilmiş, iyi bilinen bir tedavisi olmalıdır.
- 3 Taranacak durumun tanı ve tedavi olanakları mevcut olmalıdır.
- 4 Taranacak durumun tanı konulabilen latent veya erken semptomatik aşaması olmalıdır.
- 5 Tarama testi çalışma için uygun bir test olmalıdır.
- 6 Tarama testi toplum tarafından kabul edilebilir bir test olmalıdır.
- 7 Taraması yapılacak durumun doğal gelişim süreci çok iyi anlaşılmış olmalıdır.
- 8 Kimlerin hasta olarak tedavi edileceği konusunda mutabık kalınan bir politika olmalıdır.
- 9 Maliyet hesabı yapılmalıdır.
- 10 Sürdürülebilir olmalıdır.

Tablo 2. ACMG önerileri

- 1 Taraması yapılacak durum, doğumdan 24–48 saat sonra tanımlanabilmeli ve klinik olarak tespit edilememelidir.
- 2 Uygun hassasiyet ve özgünlükte teşhise olanak sağlayan bir test ile tespit edilebilmelidir.
- 3 Durumun erken teşhisi, zamanında müdahalesi ve etkili tedavisi ile elde edilecek kazanç tanımlanmalıdır.

1990’lardan sonra tek örnekten birçok hastalığın tanısında kullanılabilen, hızlı, ucuz MSMS teknolojilerinin kullanılmasıyla yenidoğan taramalarında devrim yaşanmış, taranan hastalıkların sayısı hızlı bir şekilde artış göstermiştir (81).

Yenidoğan taramaları kesin tanı koydurucu testler olarak kullanılamaz. Tanıyı kesinleştirmek için mutlaka doğrulama testlerine ihtiyaç vardır. Pozitif bir tarama sonucunun ardından yapılan doğrulama testi ile hastalığın kesin tanısı sağlanırsa tarama testinin doğru pozitifliğinden söz edilir. Tam tersi durumda, pozitif bir tarama sonucunun ardından yapılan

doğrulama testi ile hastalık ihtimali kesin olarak dışlanırsa tarama testinin yalancı pozitifliğinden söz edilir. Yalancı pozitiflik ebeveynlerin endişesini artıran bir durumdur. Ayrıca ileri tanı testleri gerektirdiği için ek mali yük oluşturur. Bazı durumlarda pozitif prediktif değeri göreceli olarak düşük olan YDT testlerini iyileştirmek adına ikinci aşama test uygulanır. KF taraması pozitif sonuçlandığında uygulanan DNA analizi, ikinci aşama teste örnek olarak verilebilir. Yalancı negatiflik ise gerçekten hasta olan bir yenidoğanın tarama testleri ile tespit edilememesi durumudur. Yalancı negatiflik hiç istenmeyen bir durumdur. Diğer klinik testlerin aksine yenidoğan taramaları referans aralık belirtilerek raporlanmaz. Burada önemli olan eşik değerdir (cut-off). Eşik değerin altında ya da üstünde kalan değerler anormal/pozitif (taranan analite göre) olarak değerlendirilir. Laboratuvarlar her analit için eşik değerlerini belirlemelidir (84).

YDT programları birçok gelişmiş ülkede başarılı bir şekilde uygulanmaktadır. Taramalar merkez laboratuvarlarda yapılır. Gutrie kartları birçok yerde posta yoluyla merkeze iletilir. Prematürite, doğum ağırlığı, neonatal beslenme, parenteral beslenme, transfüzyonlar, beslenme şekli gibi durumlar tarama sonuçlarını etkileyebilir. Yenidoğan ile ilgili bu bilgiler mutlaka Gutrie kartı üzerine yazılmalıdır. İyi iletişim, başarılı bir tarama programının en önemli parçasıdır. Bir tarama testi pozitif sonuçlandığı zaman merkez laboratuvarlar durumu birinci basamak sağlık kurumlarına iletir. Daha sonra sonuçlar aileye bildirilir ve bebek gerekli uzmana yönlendirilir. Ebeveynlere yenidoğan taramasının doğası, çocuklarındaki sonuçlar ve olası klinik çıkarımlar konusunda uygun ve aydınlatıcı şekilde bilgi verilmelidir. Ebeveynlere tarama sonuçlarının kesin tanı olmadığı vurgulanması gerekir (81).

Amerika Birleşik Devletleri Sağlık ve İnsan Hizmetleri Sekreterliği (HHS) 34 çekirdek bozukluğu/hastalığı içine alan bir tarama paneli (Recommended Uniform Screening Panel, RUSP) önermiştir. 34 bozukluğun 32'si KKD örnekleri ile analiz edilir (diğer ikisi işitme ve konjenital kalp hastalığı içindir). HHS ayrıca RUSP sonucuna göre ilişkili hastalığın ayırıcı tanısının daha iyi yapılabilmesi adına gerektiği durumda uygulanabilen ikincil bir tarama paneli daha önermiştir (85) (Tablo 3).

Tablo 3. HHS'nin önerdiği yenidoğan tarama paneli

RUSP çekirdek paneli	Kısaltma	Metot	Hastalık türü
Propiyonik asidemi	PROP	MS/MS	Organik asidemi
Metilmalonik asidemi (mutaz eksikliği)	MUT	MS/MS	Organik asidemi

Metilmalonik asidemi (Cb1 A,B)	Cbl A,B	MS/MS	Organik asidemi
İzovalerik asidemi	IVA	MS/MS	Organik asidemi
3-Metilkrotonil-koa karboksilaz eksikliği	3-MCC	MS/MS	Organik asidemi
3-hidroksi 3-metil glutarik asidüri	HMG	MS/MS	Organik asidemi
Holokarboksilaz sentaz eksikliği	MCD	MS/MS	Organik asidemi
B-ketotiolaz eksikliği	BetaKT	MS/MS	Organik asidemi
Glutamik asidemi tip 1	GA1	MS/MS	Organik asidemi
Karnitin alım defekti	CUD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Orta zincirli açıl-koa dehidrogenaz eksikliği	MCAD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Çok uzun zincirli açıl-koa dehidrogenaz eksikliği	VLCAD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Uzun zincirli açıl-koa dehidrogenaz eksikliği	LCHAD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Trifonksiyonel protein eksikliği	TFP	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Arjininosüksinik asidüri	ASA	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Sitrilünemi tip 1	CIT	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Akçaağaç şurubu hastalığı	MSUD	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Homosistinüri	HCY	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Fenilketonüri	PKU	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Tirozinemi tip 1	TYR I	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Primer konjenital hipotiroidi	CH	İmmunassay	Konjenital hipotiroidi
Konjenital adrenal hiperplazi	CAH	immünassay	Konjenital adrenal hiperplazi
Orak hücreli anemi	Hb Sss	Kapiller elektroforez	Hemoglobinopatiler
S-B talasemi	Hb S/betaTh	Kapiller elektroforez	Hemoglobinopatiler
Orak hücre-C hastalığı	Hb S/C	Kapiller elektroforez	Hemoglobinopatiler
Biyotinidaz eksikliği	BIOT	Kolorimetrik	Biyotinidaz eksikliği
Kistik fibrozis	CF	immunassay	Kistik fibrozis
Klasik galaktozemi	GALT	Kolorimetrik	Galaktozemi
Şiddetli kombine immün yetmezlik	SCID	ddPCR	Şiddetli kombine immün yetmezlik
Mukopolisakkaridoz tip 1	MPS I	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Glikojen depo hastalığı tip 2 (pompe)	GSD II	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Adrenolökodistrofi	X-ALD	MS/MS	Adrenolökodistrofi
Spinal musküler atrofi	SMA	ddPCR	Spinal musküler atrofi

RUSP ikincil panel

Metilmalonik asidemi ve homosistinemi (Cbl C,D)	Cbl C,D	MS/MS	Organik asidemi
Malonil-koa dekarboksilaz eksikliği	MAL	MS/MS	Organik asidemi
İzobütiril-koa dehidrogenaz eksikliği	IBG	MS/MS	Organik asidemi
2-Metilbütiril-koa dehidrogenaz eksikliği	2MBG	MS/MS	Organik asidemi
2-Metil-3-hidroksibütirik asidüri	2M3HBA	MS/MS	Organik asidemi
3-Metilglutakonik asidemi	3MGA	MS/MS	Organik asidemi

Kısa zincirli açıl-coa dehidrogenaz eksikliği	SCAD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Orta/Kısa-zincirli 3-hidroksiaçıl-coa dehidrogenaz eksikliği	M/SCHAD	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Glutarik asidemi tip 2 (Multipl açıl-coa dehidrogenaz eksikliği)	GA2	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Orta zincirli 3-ketoaçıl-coa tiyolaz eksikliği	MCAT	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
2,4-Dienoil-coa redüktaz eksikliği	DE RED	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Karnitin palmitoiltransferaz tip 1 eks.	CPT IA	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Karnitin palmitoiltransferaz tip 2 eks.	CPT II	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Karnitin-açilkarnitin translokaz eksikliği	CACT	MS/MS	Yağ asidi oksidasyon bozukluğu
Arjininemi	ARG	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Sitrilünemi tip 2	CIT II	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Hipermetioninemi	MET	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Benign hiperfenilalaninemi	H-PHE	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Kofaktör biyosentez veya rejenerasyonda bipterin defekti	BIOPT (BS/REG)	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Tirozinemi tip 2	TYR II	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Tirozinemi tip 3	TYR III	MS/MS	Aminoasit bozuklukları
Diğer hemoglobinopati varyantları	Var Hb	Kapiller elektroforez	Hemoglobinopatiler
GALE eksikliği	GALE	Kolorimetrik	Galaktozemi
GALK eksikliği	GALK	Kolorimetrik	Galaktozemi
T hücre ilişkili lenfosit eksiklikleri	SCID	ddPCR	Şiddetli kombine immün yetmezlik
Peroksisomal açıl-coa oksidaz eksiklikleri	Acyl-CoAOx	MS/MS	Adrenolökodistrofi
D-bifonksiyonel protein eksikliği	BFP	MS/MS	Adrenolökodistrofi
Peroksisomal biyogenezis bozuklukları (Zellweger spektrum bozuklukları)	PBD	MS/MS	Adrenolökodistrofi
Tarama yapılacak olan bölgeye göre opsiyonel taramalar			
Metilmalonik asidemi ve homosistinüri, cbl D tipi	Cbl D-var1	MS/MS	Organik asidemi
Homosistinüri-megaloblastik anemi, cbl E tipi	Cbl E	MS/MS	Organik asidemi
Homosistinüri-megaloblastik anemi, cbl G tipi	Cbl G	MS/MS	Organik asidemi
Homosistinüri-MTHFR eksikliğine bağlı	MTHFR	MS/MS	Organik asidemi
Glukoz-6-fosfat dehidrogenaz (G6PD) eksikliği	G6PD	Florometrik	G6PD eksikliği
Fabry hastalığı	Fabry	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Gaucher hastalığı	Gaucher	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Niemann-Pick hastalığı tip A ve tip B	NPA/B	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Krabbe hastalığı	Krabbe	MS/MS	Lizozomal depo hastalığı
Guanidinoasetat metiltransferaz (GAMT) eksikliği	GAMT	MS/MS	Kreatin metabolizma bozukluğu

Türkiye’de Sağlık Bakanlığı 1986 yılında YDT programını başlatmış ve daha sonra bu tarama programı genişletilmiştir. 1994 yılında program “Ulusal Fenilketonüri Tarama Programı”na dönüştürülmüş ve tüm ülkeyi kapsamıştır. KH’nin 25 Aralık 2006 tarihinde FKÜ tarama programına eklenmesiyle programın ismi “Ulusal Yenidoğan Tarama Programı” olarak değiştirilmiştir. Programa, Ekim 2008 itibarıyla biyotinidaz eksikliği, 1 Ocak 2015 tarihi itibarıyla da KF eklenmiştir. Bu taramaların tamamı yenidoğan döneminde topuktan alınan KKD örneği ile yapılmaktadır (6,86).

2.8.1. KKD Örneğinin Kütle Spektrometrisinde Kullanımı

KKD tekniği, klasik venöz örnek toplama tekniğine bir alternatif olarak görünse de rutin kullanımı kısıtlıdır. Az miktarda kurutulmuş tam kan analiz işlemlerinde kullanıldığı için hassas ve spesifik sistemler gerektirir. Kütle spektrometrisi (MS), DBS örneği kullanılarak yapılan yenidoğan taramalarında en yaygın kullanılan yöntemdir. 1990'larda elektrosprey iyonizasyon (ESI) kullanımı ile birlikte yenidoğan tarama laboratuvarlarında kullanımı yaygınlaşmaya başlamıştır. Kısa sürede sonuç veren, kromatografik ayırtırmaya veya saflaştırmaya gerek kalmadan kompleks örneklerin analizini sağlayan, bir damla kanda çok sayıda hastalığın taranabilmesine olanak sağlayan, yalancı pozitiflik ve yalancı negatiflik oranlarının düşük olduğu güvenilir ve düşük maliyetli bir yöntemdir. Günümüzde aminoasitler ve açilkarnitinler KKD örneğinde MSMS yöntemi ile taranarak primer aminoasidemiler, üre döngü bozuklukları, organik asidemiler ve yağ asidi oksidasyon bozukluklarını içeren birçok kalıtsal metabolik hastalık tespit edilebilmekte fakat hastadan alınan kan ve idrar örneklerinde ilgili metabolitlerin kantitasyonu ve hastalığın klinik olarak değerlendirmesi ile tanının doğrulanması gerekmektedir (87,88).

2.8.2. Dünyada Galaktozemi Taraması

Galaktozemi için YDT programlarında eritrosit GALT aktivitesinin ve/veya total galaktoz konsantrasyonlarının belirlenmesi hedeflenir (89). Tarama spesifikliğini artırmak için yaygın görülen patolojik alelleri hedefleyen DNA testleri ikinci basamak olarak kullanılabilir. Tarama programlarının uygulanış şekli farklılıklar gösterebilmektedir (5).

Birçok gelişmiş ülkede galaktozemi taraması YDT programları içinde yer alır. Galaktozemi için yenidoğan taraması birçok Avrupa ülkesinde (Avusturya, Almanya, Macaristan, İrlanda, İsveç, İsviçre, Hollanda) tarama programları kapsamında yer alırken İtalya ve Belçika pilot programlar sunmaktadır (9,32). İrlanda’da 1972’den beri klasik galaktozemi için yenidoğan taraması yapılmaktadır ve yüksek bir klasik galaktozemi insidansı (1:16.476) vardır. Fransa ve Portekiz’de galaktozemi için tarama programı yoktur. Norveç, Danimarka ve İskoçya gibi bazı

lkeler ise galaktozemi için yapılan taramaları durdurmuştur. Amerika Birleşik Devleti'nde Şu anda tüm eyaletlerde galaktozemi taraması yapılmakta iken Kanada'da sadece iki eyalette tarama yapılmaktadır (90,91).

YenidoĒan taraması bebeĒin semptom ve bulguları ortaya çıkmadan önce yaŒamın ilk günlerinde yapılırsa tanı için bir fırsat sunar. Erken teŒhis, erken uygulanan diyet ve destek tedavisi fulminan karaciĒer yetmezliĒi ve E.coli sepsis riskini azaltır. YenidoĒan taramalarının uygulanmasıyla birlikte galaktozemili çocuklarda mortalite 10 kattan daha fazla azalmaktadır. Ayrıca galaktozemiye baĒlı yoğun bakım yatılıŒları azalmakta ve hastane harcamaları dŒmektedir (21).

Eritrosit GALT aktivitesi birçok YDT programında florometrik yöntem ile (semikantitatif modifiye Beutler spot test) taranır. Bazı programlarda GALT aktivitesine ek olarak total galaktoz taraması da yapılmaktadır. Pozitif raporlanan tarama testi daha sonra tekrarlanır. EĒer florometrik yöntem ile ölçüm pozitifse ya da negatif bir sonuca raĒmen klinik olarak güçlü bir hastalık Œphesi varsa eritrosit GALT aktivite ölçümü ve DNA analizleri için yeni bir kan rneĒi alınarak yenidoĒan tarama laboratuvarları dıŒında herhangi bir laboratuvara gönderilir. Klasik galaktozemili yenidoĒanlar tarama programları sayesinde %100 tanı alırlar (5,8,68).

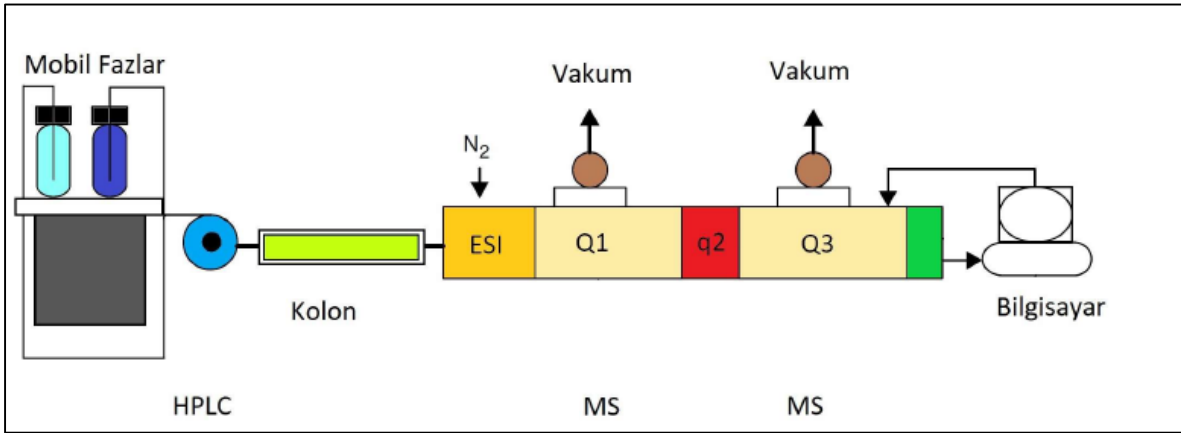
Tanıda idrarda indirgen madde taraması yapılabilir fakat bu güvenli bir tarama yöntemi deĒildir ve günümüzde yenidoĒan taramalarında kullanılmaz. Hastanın beslenmesi bozuksa ve intravenöz destek alıyorsa idrarda galaktoz atılımına rastlanmaz. Üstelik anne sütü ile beslenen yenidoĒanda, beslendikten bir kaç saat sonra bile idrarında galaktoz bulunmayabilir. Ayrıca bazı karaciĒer hastalıklarında da idrarda galaktoz atılımı görülebilir. DiĒer indirgen Œekerlerin de idrarda bulunabileceĒi olasılıĒı hesaba katıldığında, pozitif saptanan indirgen madde tarama testi sonrasında mutlaka monosakkarit ince tabaka kromatografisi yapılmalıdır (5).

Ülkemizde galaktozemi taraması yapılmamaktadır (6). Klinik ve laboratuvar bulguları ile hastalıktan ŒphelenildiĒi takdirde florometrik yöntem ile GALT aktivitesi ve total galaktoz ölçümleri ile tanı konulmaktadır.

2.9. LC-MS/MS

LC-MS (ya da HPLC-MS), sıvı kromatografisinin karıŒımları fiziksel olarak ayırabilme yeteneĒi ile kütle spektrometrisinin kütle analiz edebilme yeteneĒini birleŒtiren analitik bir kimya tekniĒidir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), kompleks bileŒenleri birbirinden ayırırken; MS manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden iyonları kütle/yük (m/z)

oranlarına göre tespit eder. MS üstün özelliklere sahip olmasından kaynaklı tek başına bir yöntem veya cihaz olarak anılsa da aslında HPLC ile birlikte kullanılan bir dedektördür. Sürekli bir sıvı akışı içeren HPLC tekniği ile vakum sistemine bağlı MS'in bir araya getirilmesi kolay olmamıştır. ESI arayüzünün geliştirilmesiyle birbirinden tamamen farklı iki cihazın birlikte kullanılması mümkün olmuştur. Bu sayede LC-MS'in klinik laboratuvarlarda kullanımı artış göstermiştir. MSMS'in HPLC ile birleştirilmesiyle elde edilen LC-MS/MS sistemleri dedektör olarak MSMS'in kullanıldığı bir HPLC tekniği olarak tanımlanabilir (87) (Şekil 9).



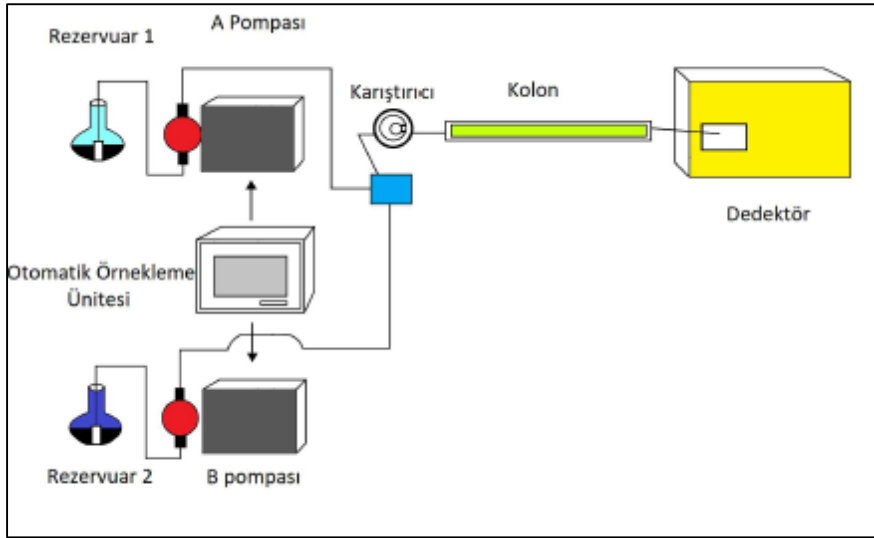
Şekil 9. LC-MS/MS sistemi

LC-MS/MS günümüzde biyolojik kaynaklı kompleks örneklerde biyokimyasal, organik ve inorganik birçok farklı bileşikler yüksek hassasiyet ve özgüllük ile analiz etmek için kullanılır. Klinik biyokimyada ve mikrobiyolojide immunsupresif ilaçlar, biyojenik aminler, plazma aminoasitleri, 25 OH-D vitamini, antiretroviral ilaçlar, psikotrop maddeler, metilmalonik asit, tiroid hormonları, steroidler LC-MS/MS ile analiz edilebilir (87).

2.9.1. Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografisi (LC), sıvı halde bulunan karışımların bir sabit ve mobil faz kullanılarak aralarındaki tutunma dengesine göre ayrıştırılması prensibine dayanır. Pratikte beş farklı kategoride sınıflandırılır: Adsorpsiyon kromatografisi, partiyon kromatografisi, iyon değiş-tokuş kromatografisi, boyuta bağlı kromatografi, afinite kromatografisi. Bunlar arasında en sık kullanılanı bir partiyon kromatografi türü olan ters faz kromatografi tekniğidir. Ters faz kromatografide hidrofobik bir sabit faz (kolon) ve polar bir mobil faz kullanılır. Mobil faz, su ve metanol, izopropanol, ACN gibi polar çözümlerden oluşan bir karışımdır. Karışımları sabit faz boyunca taşır. HPLC'de ilgili analiti içeren örnek mobil faz akımına enjekte edilerek mobil faz

ile birlikte yüksek basınç altında sabit fazı içeren kolona gönderilir. Analitleri içeren mobil faz, sabit fazın üzerinde hareket eder. Karışım içindeki bileşenler mobil faz ve sabit faz arasında kimyasal özelliklerine göre ayrılarak kolondan farklı zamanlarda ayrılırlar (elüe olurlar). Kolon, LC sisteminin en önemli kısmıdır ve içindeki sıvının yüksek basıncına dayanıklı olacak şekilde tasarlanır. LC kolonları 100-300 mm uzunluğunda, dış çapı 6.4 mm, iç çapı 30-50 μm olan ve 3-5 μm boyutlarında partikül içeren silindirik yapılardır. Ayrıca ayrıştırma yeteneğini iyileştirmek ve verimliliği artırmak için HPLC yerine ultra performans sıvı kromatografisi (UPLC) sistemleri kullanılabilir. UPLC de bir çeşit HPLC'dir ve daha küçük çaplı silika partikülleri kullanıldığı için daha yüksek basınçta çalışabilme özelliğine sahiptir (87) (Şekil 10).



Şekil 10. UPLC sistemi

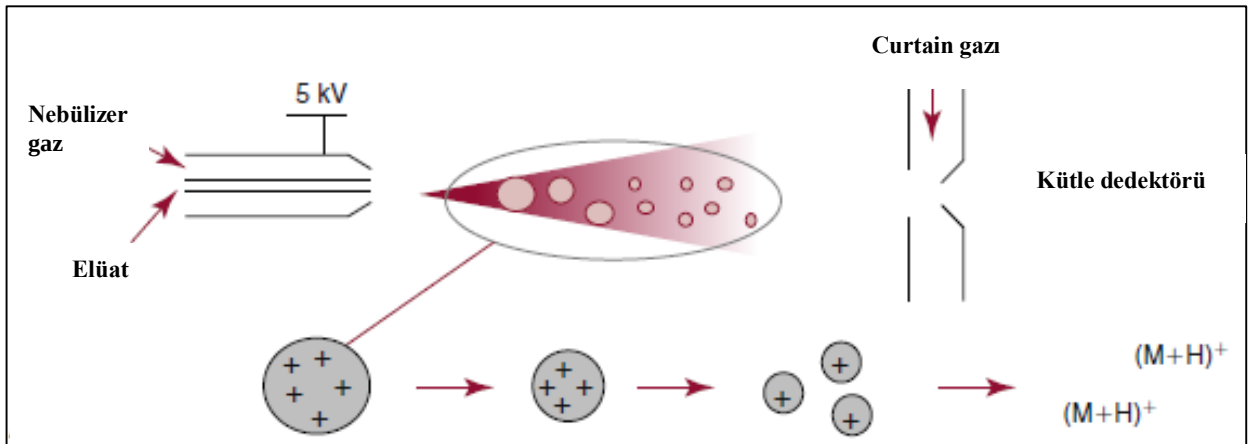
2.9.2. MS

MS'in temel bileşenleri: İyon kaynağı, kütle analizörü, dedektör, veri sistemi ve vakum sistemidir. Bir analitin MS'de m/z oranına göre tespit edilebilmesi için öncelikle mutlaka bir iyonlaştırma tekniği ile gaz halinde yüklü iyonlar haline getirilmelidir. Bir çok iyonizasyon tekniği vardır (87) (Tablo 4).

Tablo 4. İyonizasyon teknikleri

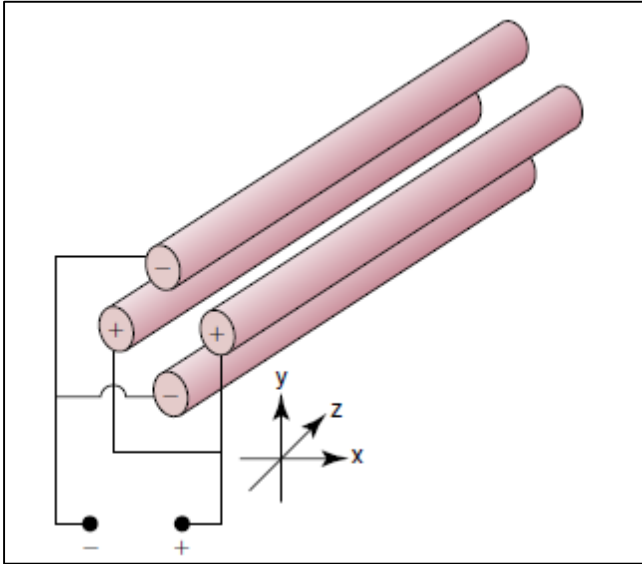
- 1 Elektron iyonizasyon
- 2 Kimyasal iyonizasyon
- 3 Hızlı atom bombardımanı
- 4 Sıvı ikincil iyon kütle spektrometresi
- 5 Atmosferik basınç iyonizasyon
- 6 Matris destekli lazer desorpsiyonu/iyonizasyonu

Sıvı kromatografisi kütle spektrometrisi için ESI, atmosferik basınç kimyasal iyonizasyonu gibi atmosferik basınç iyonizasyon teknikleri günümüzde yaygın olarak kullanılır. Bunlar yüksek basınçlı HPLC ortamından, yüksek vakum altında çalışan MS'e geçişi kolaylaştıran iyon kaynaklarıdır. ESI tekniği atmosferik basınçta çalışan yumuşak bir iyonizasyon tekniğidir (Şekil 11). Kolondan çıkan sıvı (elüat) 1 ile 5 Kv arası voltajın uygulandığı metal kapillerin arasından geçirilir. Sıvı ve kapiller arasında gerçekleşen parsiyel şarj sıvıda değişime yol açarak kapillerin uç kısmında bulunan taylor konisinden yüklü damlacıkların atılması ile sonuçlanır. Damlacıklar kapillerden çıkarken yüklüdür. Solvent buharlaşırken yüklü analit moleküllerini bırakır ve damlalar kaybolur. ESI'nin birçok tipinde kolondan gelen sıvıya paralel nebulize edici bir gaz bulunur ve yüklü damlacıkların karşı elektroda yönlendirilmesine ve evaporasyon sürecine yardımcı olur. Daha sonra yüklü hale gelmiş partiküller MS'in yüksek vakum odasına aktarılır. ESI ile pozitif ve negatif yüklü iyonlar tespit edilebilir ve negatif/pozitif çalışma modları arasında geçiş yapmak mümkündür. Polar ve uçucu olmayan bileşikler için ideal bir iyonizasyon yöntemidir.



Şekil 11. Elektrosprey iyonizasyon

MS’de birçok farklı kütle analizörü ve bunların kombinasyonları kullanılabilir. Sıvı kromatografisi ile birlikte kuadropol, uçuş zamanı, iyon tuzaklama ve hibrit kuadropol-uçuş zamanı analizörleri yaygın olarak kullanılır. Kuadropol, birbirine paralel olan yerleştirilmiş dört silindirik, iletken, ortasında bir boşluk bulunduran metal çubuklardan oluşur (Şekil 12). Karşılıklı çubuklar birbirine elektriksel olarak bağlıdır ve metal çubuk çiftlerine doğru akım ve radyo frekans uygulanır. Böylece elektriksel alan yaratılır. İyonlar metal çubukları arasında seyahat ederler ancak sadece belli bir m/z değerine sahip yüklü partiküller yörüngelerinden çıkmadan dedektöre ulaşabilir. Diğer yüklü partiküller ise yörüngelerinden çıkar ve metal çubuklara çarparak kaybolur. Voltajlar değiştirilerek iyonların m/z değerlerine göre taranmasına veya seçilmesine olanak sağlar (87).



Şekil 12. Kuadropol

MSMS ise iki kütle analizörünün tek bir cihazda kombine edilmesidir. İki kütle analizörü içerir: MS1 ve MS2. İki kütle analizörü arasında bir çarpışma odacığı vardır. Kompleks yapılar içindeki polar maddeler ESI ile iyonize edilir ve MS 1’de bu iyonlar kütle ve yüklerine göre analiz edilerek sadece istenen iyon ya da iyonlar seçilir. Bu seçilen iyon, prekürsör (ana, öncül) iyon olarak ifade edilir. Prekürsör iyonun çarpışma odacığında parçalanmasıyla ürün iyonlar (fragman, yavru) oluşur. Parçalanma argon ya da azot gazı ile sağlanır. MS 2’de ise ürün

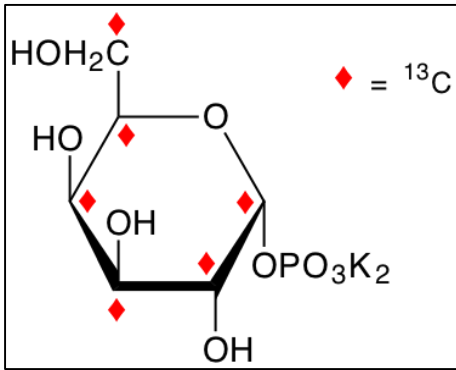
iyonlar kütle ve yüklerine göre analiz edilerek dedektöre sunulur. Bilgisayar ortamında, MS 2’de ayrılarak dedektörde sinyal oluşturan ürün iyonlar başlangıçta MS 1 tarafından seçilmiş olan prekürsör iyonlar ile ilişkilendirilir. Prekürsör iyon ve ürün iyon kantite edilecek analite spesifiktir. Hesaplamalar İS kullanılarak yapılır (87,88).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

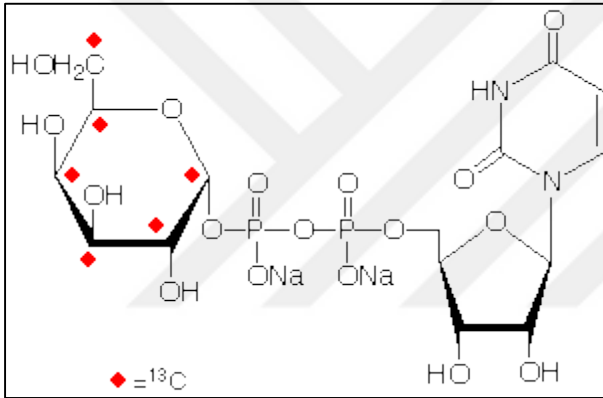
3.1. Gereç

Çalışmada kullanılan malzemeler

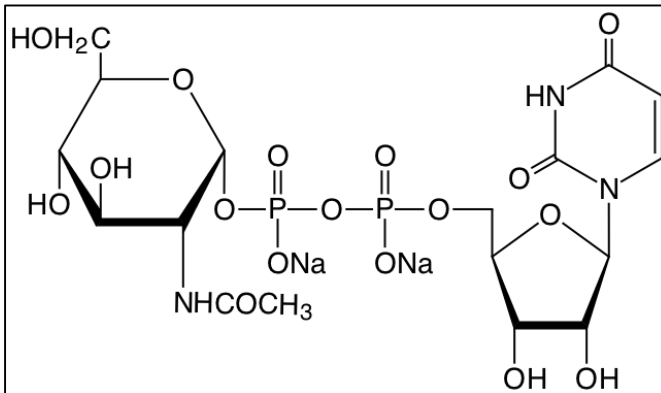
- α -D-[UL-¹³C₆]-galaktopiranozil-1-fosfat (dipotasyum tuzu), katalog no: GAL-039, Omicron (Şekil 13)
- UDP- α -D-[UL-¹³C₆]-UDP-Gal (disodyum tuzu), katalog no:NTS-005, Omicron (Şekil 14)
- UDP- α -N-asetil-D-glikozamin (disodium tuzu), 670107-50 mg, CAS 91183-98-1, Calbiochem (Şekil 15)
- UDP- α -D-glukoz (disodium tuzu), 670120-250 mg, CAS 117756-22-6, Calbiochem
- 0.5 mol/L glisin tamponu (pH: 8.7)
- 13.3 mmol/L NaH₂PO₄ tamponu (pH: 7)
- Serum fizyolojik (%0.9 NaCl, SF)
- DL-Ditiyoeritrol (DTT), 1 gr, %99, molekül ağırlığı:154.25, Sigma Aldrich
- Amonyum format, 17843-50 gr, fluka for HPLC
- MS grade su, Carlo Erba
- MS grade ACN, Carlo Erba
- MS grade formik asit, Lichrosolv
- MS grade metanol, Lichrosolv
- NaCl, Applichem
- Distile su



Şekil 13. α -D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]-galaktopiranozil 1-fosfat (dipotasyum tuzu)



Şekil 14. UDP- α -D-[UL- $^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal (disodyum tuzu)



Şekil 15. UDP- α -N-asetil-D-glikozamin (disodyum tuzu)

Çalışmada Kullanılan cihazlar ve ekipmanlar

- Florometre, Varioskan Flash Thermo Scientific, Model: MIB-5250030
- LC-MS/MS, Waters Acquity UPLC-Xevo TQD
- Kolon, Atlantis T3 (1.8 µm çap, 2.1 x 50 mm)
- Neonatal GALT kit, NG 11-00, PerkinElmer
- Hemoglobin standart, hemoglobin reaktif seti 1*500 mL, hemoglobin kontrolleri, Pointe Scientific
- Santrifüj cihazı, soğutmalı Nüve/NF400R
- Santrifüj cihazı, Universal 16R
- Hassas tartı, Scaltec SBC31
- -20, +4 °C buzdolabı, Arçelik
- -86 °C derin dondurucu, DF 590 Nüve
- Delgeç, manuel 3 mm
- Su banyosu, Memmert 767
- Gutrie kartı, Whatman no 903
- Vacuette® Tube 2 mL K₂EDTA 13x75 mor kapaklı tüp, referans no:454027
- Vacuette® Tube 4 mL LH Lityum Heparin 13x75 yeşil kapaklı tüp, referans no:454029
- Eppendorf tüpü, 2 mL
- Otomatik pipet, Eppendorf research plus 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL
- Pipet ucu, Eppendorf
- Vorteks, IKA MSI Minishaker
- Falkon tüpü, İsolab

Çalışmada kullanılan yazılımlar

- Analiz sonuçları Waters Masslynx 4.0 software yazılımı kullanılarak değerlendirildi.
- Elde edilen verilerin istatistiksel analizi Microsoft Office Excel 2016 ve Medcalc 15.8 programları kullanılarak yapıldı.

3.2. Yöntem

3.2.1. Çalışmada Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması ve Ön Hazırlıklar

- 2 mmol/L UDP-Glu çözeltisi: 12.20 mg UDP-Glu tartılır, 10 mL MS grade su içinde çözülmesiyle hazırlanır. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklanır.

- 8 mmol/L [$^{13}\text{C}_6$]-Gal-1-P çözeltisi: 4.27 mg [$^{13}\text{C}_6$]-Gal-1-P tartılır, 10 mL MS grade su içinde çözülmesiyle hazırlanır. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklanır.
- [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal stok çözeltisi: 2 mg [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal tartılır, 2 mL MS grade su içinde çözülmesiyle 1.62 mM'lık stok çözeltisi elde edilir. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklanır.
- UDP-N-asetilglukozamin (İS): 6.5 mg İS tartılır, 2 mL MS grade su içinde çözülmesiyle 5 mM'lık UDP-N-asetilglukozamin stok çözeltisi elde edilir. Stok çözelti ms grade su ile seyreltilerek 1 mM'lık İS'lar elde edilir. Porsiyonlanarak -20°C'de saklanır.
- [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal Standartları: [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal stok çözeltisi MS grade su ile seyreltilerek 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6, 3.125, 6.35, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standartları hazırlanır. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklanır.
- Substratlı miks: Eşit hacimlerde 0.5 mol/L glisin tamponu, 2 mmol/L UDP-Glu, 8 mmol/L [$^{13}\text{C}_6$]-Gal-1-P çözeltilerinin bir eppendorf tüpü içinde karıştırılmasıyla çalışma zamanında taze olarak hazırlanır.
- Substratsız miks: 1 hacim 0.5 mol/L glisin tamponu ile 2 hacim MS grade suyun bir eppendorf tüpü içinde karıştırılmasıyla çalışma zamanında taze olarak hazırlanır.
- ACN/Su çözeltisi: Eşit hacimde ACN ve ms grade suyun bir falkon tüpü içinde karıştırılmasıyla çalışma zamanında taze olarak hazırlanır.
- 0.1 mol/L DTT: 617 mg DTT tartılır, 8 mL MS grade su içinde çözülmesiyle hazırlanır. Porsiyonlanarak -20 °C'de saklanır.
- Eritrosit lizis tamponu: 26 hacim 13.3 mmol/L NaH_2PO_4 (pH 7.0) ile 1 hacim 0.1 mol/L DTT çözeltisinin karıştırılmasıyla çalışma zamanında taze olarak hazırlanır.

3.2.2. Örneklerin Toplanması

Bu çalışma Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi (EÜTF) Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilimdalı ve Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı tarafından ortak yürütüldü. Örneklerin tamamı iki aşamada toplandı.

İlk aşamada kan alma tüplerinin eritrosit GALT aktivite ölçümüne etkisinin araştırılması amacıyla herhangi bir sağlık sorunu olmayan 10 yetişkin sağlıklı bireyden gönüllülük esasına göre birer adet EDTA'lı ve heparinli tam kan örneği aynı gün içinde toplandı. Toplanan tam kan örnekleri ivedi bir şekilde buz üzerinde laboratuvara iletildi. Bu bireylere ait örneklerin hepsi 1'den 10'a kadar numaralandırıldı. Her bir tüpten 60 μL 'lik tam kan örneğinin Gutrie kartına damlatılıp, karanlık ve sıcak olmayan koşullarda cam bir yüzeyde 4 saat kurutulmaya bırakıldı. EDTA'lı ve heparinli tam kan örneklerinin her birinden eritrosit peletleri elde edildi ve

eppendorflara porsiyonlanarak KKD örnekleri ile birlikte -80 °C’de çalışma gününe kadar saklandı. Sonuç olarak ilk aşamada 1’den 10’a kadar numaralandırılmış bireylere ait EDTA’lı tüpten elde edilmiş eritrosit peleti ve KKD örneği, heparinli tüpten elde edilmiş eritrosit peleti ve KKD örneği toplandı. Çalışma günü eritrosit peletleri ve KKD örnekleri derin dondurucudan çıkarıldı. Eritrosit peletlerinden hemolizat örnekleri elde edildi. KKD ve hemolizat örnekleri normal çalışma prosedürleri ile analiz edildi. GALT aktiviteleri bu örneklerde Hb konsantrasyonları hesaba katılmadan sadece reaksiyon sonucu oluşturdukları analit ([¹³C₆]-UDP-Gal) miktarları göz önünde bulundurularak kıyaslandı. En yüksek analit miktarının elde edildiği antikoagülan tipi, çalışmaya en uygun antikoagülan tipi (EDTA) olarak kabul edildi. Bu örnekler ayrıca yöntem validasyon çalışmalarında kullanıldı.

İkinci aşamada ise seçilen antikoagülana uygun tam kan örnekleri ve bu tam kanlardan damlatılarak elde edilmiş KKD örnekleri sağlıklı gönüllülerden ve klasik galaktozemi hastalarından toplandı. Bu örnekler referans aralık belirleme çalışmalarında ve LC-MS/MS ile florometrik yöntem performanslarının değerlendirilmesi çalışmalarında kullanıldı. Bu örneklerin toplanmasına ait detaylı bilgiler referans aralık çalışmasında bahsedilmiştir.

3.2.3. Analiz Yöntemleri

Çalışmada tıbbi biyokimya laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazı ve metabolizma laboratuvarında bulunan florometre cihazı kullanıldı. Yöntem validasyon çalışmaları LC-MS/MS cihazında yapıldı. Yöntem performanslarının değerlendirilmesi çalışmalarında hasta ve sağlıklı gruba ait örnekler her iki yöntem ile analiz edilerek sonuçlar yorumlandı.

3.2.3.1. LC-MS/MS Yöntemi

LC-MS/MS yöntemiyle GALT aktivitesinin belirlenmesinde iki farklı örnek tipi ve yöntem kullanıldı: Hemolizat yöntemi, KKD yöntemi.

GALT aktivitesinin µmol/grHb/saat olarak belirlenebilmesi için hemolizat ve tam kan örneklerinin Hb miktarı Pointe Scientific kiti kullanılarak çalışma öncesinde kantitatif olarak ölçüldü. Bu testin prensibi potasyum siyanit ve potasyum ferri siyanit ile hemoglobinin siyanmethemoglobine dönüşmesine ve oluşan rengin 540 nm’de spektrofotometrede absorbasının ölçülmesi esasına dayanır. Hb’nin tam kanda ölçümü KKD yöntemi için, hemolizatta ölçümü ise hemolizat yöntemi için gereklidir.

Hemolizat yöntemi çalışma prosedürü: Öncelikle tam kan örnekleri SF ile yıkanarak eritrosit peletleri elde edilir . Daha sonra kimyasal olarak eritrositler parçalanır ve hemolizat örneği

GALT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılır. Bu işlemler sırasıyla aşağıda belirtilen basamaklar ile gerçekleştirilir(75):

1. Tam kan örneği 1278 g'de 5 °C'de 3 dakika santrifüjlenir ve üstte kalan plazma kısmı atılır.
2. Atılan plazma hacmi SF ile tamamlanır ve alt-üst edilir, 500 g'de 10 dk santrifüj edilir.
3. Üstte kalan supernatant faz atılır, atılan supernatant hacmi kadar SF ile tamamlanır, alt-üst edilir. Tekrar santrifüj edilir.
4. Bir önceki basamak tekrarlanır.
5. Örnek santrifüj edildikten sonra berrak hale gelen supernatant faz atılır ve eritrosit peleti elde edilir. Eritrosit peletleri eğer daha sonra kullanılacaksa porsiyonlanarak -80 °C'de saklanır.
6. Çalışılması planlanan eritrosit peletleri -80 °C'den çıkarılır. 7 hacim eritrosit lizis tamponu, 1 hacim eritrosit peleti ile karıştırılır. Karışım 10 saniye nazıkçe vorteksenir ve hemolizat elde edilir.

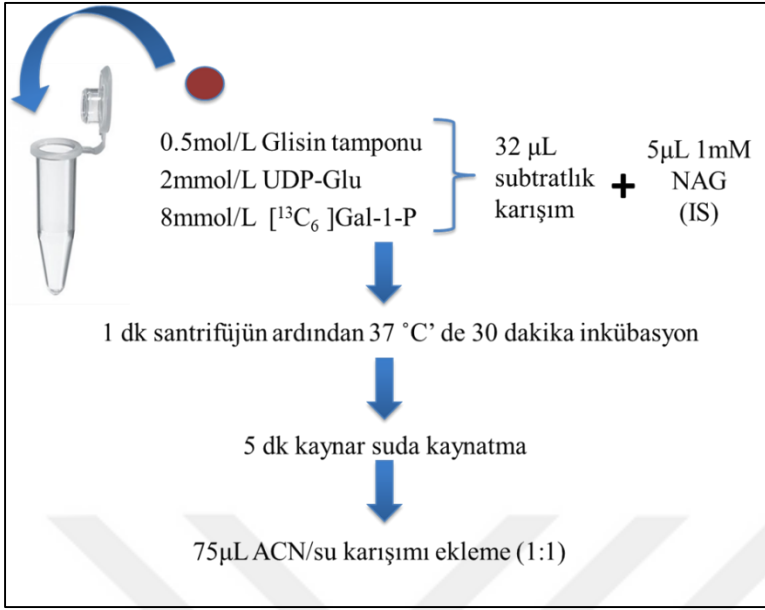
Tüm çalışmalar buz üzerinde yapılır.

1. Eşit hacimlerde 0.5 mol/L glisin tamponu, 2 mmol/L UDP-Glu, 8 mmol/L [¹³C₆]-Gal-1-P çözeltileri bir eppendorf tüpü içinde karıştırılır (substratlı miks). 10 saniye nazıkçe vorteksenerek karışımın eppendorf tüpü dibinde toplanması sağlanır.
2. Eritrosit peleti derin dondurucudan çıkarılır ve hemolizat elde edilir. Hemolizat Hb'i ölçülür.
3. 32 µL substratlı miks ve 8 µL hemolizat yeni bir eppendorf tüpünde karıştırılır. Bu orijinal eppendorf tüpüdür. Kör tüp için aynı işlem yinelenir.
4. Orijinal ve kör eppendorf tüplerine 5 µL 1 mM İS ilave edilir. 1 dk +4 °C 16000 g'de eppendorf tüpleri santrifüj edilerek tüp kenarlarında bulunan damlacıkların dipte toplanması sağlanır.
5. Orijinal eppendorf tüpü santrifüjden çıkar çıkmaz 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu sayede enzimatik reaksiyon gerçekleşir ve ürün ([¹³C₆]-UDP-Gal) oluşur. 30 dk'nın sonunda hızlıca kaynar suya alınarak 5 dk kaynatılır ve enzimin denatürasyonu sağlanarak reaksiyon durdurulur.
6. Kör eppendorf tüpü ise santrifüjden çıkar çıkmaz hızlıca kaynar suya alınarak 5 dk kaynatılır ve enzimin denatürasyonu sağlanır. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
7. İnkübasyon ve kaynatma işlemlerinden sonra orijinal ve kör eppendorf tüplerine 75 µL ACN/su çözeltisi eklenir ve tüpler 16000 g'de 10 dk santrifüj edilir.
8. Supernatantlar 50 µL'den az olmayacak şekilde LC-MS/MS plaklarına aktarılır.

9. [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS piklerinin belirlenen alıkonma zamanında elde edilen pik alanları oranlanarak kalibrasyon eğrisine göre [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonu μM olarak hesaplanır.
10. Enzim aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak hesaplanır. Formül: Ölçülen [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonu*0.34 (Hemolizat Hb konsantrasyonu ortalama olarak 3.3 g/dL olarak alınır)

KKD yöntemi çalışma prosedürü (Şekil 16): Tüm çalışmalar buz üzerinde yapılır.

1. Eşit hacimlerde 0.5 mol/L glisin tamponu, 2 mmol/L UDP-Glu, 8 mmol/L [$^{13}\text{C}_6$]-Gal-1-P çözeltileri bir eppendorf tüpü içinde karıştırılır (substratlı miks). 10 saniye nazıkçe vortekslenerek karışımın eppendorf tüpü dibinde toplanması sağlanır.
2. KKD örneği derin dondurucudan çıkarılır. Delgeç kullanılarak 3 mm'lik 2 adet panç elde edilir.
3. 32 μL substratlı miks ve 1 adet 3 mm'lik panç yeni bir eppendorf tüpünde karıştırılır. Bu orijinal eppendorf tüpüdür. Kör tüp için aynı işlem yinelenir.
4. Orijinal ve kör eppendorf tüplerine 5 μL 1 mM İS ilave edilir. 1 dk +4 °C 16000 g'de eppendorf tüpleri santrifüj edilerek tüp kenarlarında bulunan damlacıkların dipte toplanması sağlanır.
5. Orijinal eppendorf tüpü santrifüjden çıkar çıkmaz 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir. Bu sayede enzimatik reaksiyon gerçekleşir ve ürün ([$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal) oluşur. 30 dk'nın sonunda hızlıca kaynar suya alınarak 5 dk kaynatılır ve enzimin denatürasyonu sağlanarak reaksiyon durdurulur.
6. Kör eppendorf tüpü ise santrifüjden çıkar çıkmaz hızlıca kaynar suya alınarak 5 dk kaynatılır ve enzimin denatürasyonu sağlanır. Daha sonra 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
7. İnkübasyon ve kaynatma işlemlerinden sonra orijinal ve kör eppendorf tüplerine 80 μL ACN/su çözeltilisi eklenir ve tüpler 16000 g'de 10 dk santrifüj edilir.
8. Supernatantlar 50 μL 'den az olmayacak şekilde LC-MS/MS plaklarına aktarılır.
9. [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS piklerinin belirlenen alıkonma zamanında elde edilen pik alanları oranlanarak kalibrasyon eğrisine göre [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonu μM olarak hesaplanır.
10. Enzim aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak hesaplanır. Formül: $2.58 \times \text{Ölçülen } [^{13}\text{C}_6]\text{-UDP-Gal konsantrasyonu} / \text{tam kanda ölçülen Hb konsantrasyonu (g/dL)}$



Şekil 16. KKD yöntemi çalışma prosedürü

3.2.3.1.1. MSMS Parametreleri

Xevo TQD cihazında ototune algoritması kullanılarak $[^{13}\text{C}_6]$ -UDP-Gal ve İS'in m/z oranlarına göre ana ve ürün iyonları, çarpışma enerjileri belirlendi. En yüksek intensiteye sahip ana iyonlar ve ürün iyonlar sırasıyla $[^{13}\text{C}_6]$ -UDP-Gal için 571/323, UDP-N-asetilglukozamin (İS) için 606/385 olarak belirlendi (Tablo 5 ve 6).

Tablo 5. MSMS parametreleri

Sistem	Xevo TQD
İyonizasyon modu	ESI -
Kapiller voltajı	3.12 kV
Kaynak sıcaklığı	150 °C
Cone gaz akış hızı	40 L/dk
Desolvasyon gaz akış hızı	650 L/dk

Tablo 6. [¹³C₆]-UDP-Gal ve UDP-N-asetilglukozamine ilişkin MSMS parametreleri

Analitler	Ana iyon (m/z)	Ürün iyon (m/z)	Cone (V)	Collision enerji (V)
[¹³ C ₆]-UDP-Gal	571	323	41	25
UDP-N-asetilglukozamin	606	385	40	25

3.2.3.1.2. UPLC Parametreleri

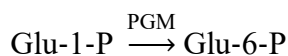
En iyi ayırım ve en yüksek intensiteye sahip pikler için denemeler yapıldı ve UPLC için optimum şartlar belirlendi (Tablo 7).

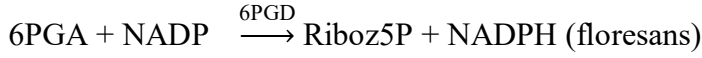
Tablo 7. UPLC parametreleri

Sistem	Acquity UPLC I Class
Kolon	Atlantis T3 (2.1 x 50 mm, 1.8 µm çap) ters faz
Mobil faz A	5 mmol/L amonyum format içeren ACN
Mobil faz B	5 mmol/L amonyum format içeren MS grade su
Akış hızı	0.4 mL/dk
Enjeksiyon hacmi	5 µL
Akış programı	İzokratik (%50 A- %50 B)
Akış süresi	3 dakika
Alınkonma zamanı	0.24 ± 0.01 dk

3.2.3.2. Florometrik Yöntem

Çocuk metabolizma laboratuvarında PerkinElmer neonatal GALT kiti kullanılarak KKD örneklerinde GALT aktiviteleri semikantitatif olarak ölçüldü. Testin prensibi Beutler ve Baluda'nın enzimatik yöntemine dayanır. GALT aktivitesi, bir dizi enzimatik reaksiyon sonucunda oluşan NADPH floresansının 355 nm – 460 nm dalga boylarında (eksitasyon ve emisyon dalga boyları) ölçülmesiyle U/gHb olarak belirlenir. Kitin kullandığı enzimatik reaksiyonlar sırasıyla şu şekildedir:



**Kit içeriği:**

- GALT kalibratörleri: Gutrie kartına emdirilmiş 1.8, 5, 8, 11, 14, 18 U/gHb GALT aktivitesi içeren KKD kalibratörleri her çalışmada kullanılarak kalibrasyon eğrisi çizilir.
- GALT kontrolleri: Gutrie kartına emdirilmiş 12.7 U/gHb (normal kontrol) ve 2.1 U/gHb (patolojik kontrol) GALT aktivitesi içeren KKD kontrolleri bulunur. Kalibratör ve kontroller hasta örnekleri gibi çalışılır.
- GALT substrat reaktifi: NADP, UDP-Glu, Gal-1-P ve DTT içerir. Liyofilize haldedir.
- GALT rekonstriksiyon tamponu: Tampon çözeltileri ve koruyucu maddeler içerir.
- Siyah mikropalak (uncoated, 96 wells)

Florometrik yöntem çalışma prosedürü:

1. Çalışma günü taze olarak GALT substrat reaktifi 11 mL GALT rekonstriksiyon tamponu ile çözülür ve rekonstriksiyon reaktifi elde edilir.
2. 3 mm'lik kalibratör, kontrol ve hasta pançları mikropale içindeki kuyucuklara aktarılır.
3. Her kuyucuğa 100 µL rekonstriksiyon reaktifi eklenir. Mikropale sağından ve solunda kibarca el ile vurularak karıştırılır.
4. Mikropalak 37 °C'de 30 dakika inkübe edilir.
5. İnkübasyon sonrası her kuyucuğa 200 µL etanol eklenir ve 1 saat oda sıcaklığında bekletilir.
6. Florometre cihazında oluşan NADPH'ın floresansı ölçülür.
7. Sonuçlar kalibrasyon eğrisi ile hesaplanır.

3.2.4. EDTA ve Heparinli Örnek Toplama Tüplerinin GALT Aktivite Ölçümüne Etkisi

Örnek toplama sürecinin ilk aşamasında toplanan sağlıklı gönüllülere ait örnekler analiz edilerek örnek toplama tüplerinde kullanılan antikoagülan tipinin GALT ölçümüne etkisi belirlendi. Bu amaçla: 1-10 numaralı EDTA'lı tam kan örnekleri ve 1-10 numaralı heparinli tam kan örnekleri; 1-10 numaralı EDTA'lı tam kanlardan elde edilmiş KKD örnekleri ve 1-10 numaralı heparinli tam kanlardan elde edilmiş KKD örnekleri analiz edildi.

Hem KKD yöntemi hem de hemolizat yöntemi için en yüksek analit piklerinin elde edildiği antikoagülan belirlenerek yöntem validasyon çalışmaları belirlenen antikoagülan tipini içeren örnek tüplerinden elde edilen KKD ve hemolizat örnekleri ile gerçekleştirildi.

3.2.5. LC-MS/MS Metot Validasyon Çalışmaları

Yöntem validasyon çalışmalarında Food and Drug Administration, European Medicines Agency ve CLSI'nın yöntem validasyon kılavuzlarından yararlanıldı (92–94). Yöntem validasyon çalışmalarında EDTA içeren tam kan örnekleri ve bunlardan elde edilmiş KKD örnekleri kullanıldı. KKD yöntemi ve hemolizat yöntemi için validasyon çalışmaları gerçekleştirildi.

3.2.5.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

Tıbbi karar sınırlarına ve yöntemde kullanılan örnek tipine (matriksine) uygun olarak hazırlanmış 6 seviyeden oluşan kalibratörler 2 kez analiz edildi. 0.4, 0.5, 0.6, 0.8, 1.6, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standartları ve 1 μM İS, kalibratörlerin hazırlanmasında ve kalibrasyon grafiklerinin çizilmesinde kullanıldı.

KKD matriksi kullanılarak kalibrasyon eğrisinin çizilmesi: Her seviye kalibratör aşağıda verilen prosedür ile 2 kez hazırlanır ve analiz edilir.

1. KKD yöntemi çalışma prosedüründen farklı olarak 32 μL substratlı miks yerine 20 μL [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı ve 12 μL substratsız miks eppendorfa eklenir.
2. 5 μL 1 μM İS eklenir.
3. Herhangi bir KKD örneğinden 3mm'lik panç eklenir. Bir pancın hacmi yaklaşık olarak 3 μL 'dir (toplam enzimatik reaksiyon hacmi yaklaşık = 40 μL). Karışım 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
4. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
5. 5 dk kaynar suda bekletilir.
6. 80 μL ACN/su çözeltisi eklenir (toplam hacim 120 μL).
7. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
8. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS piklerinin alanları hesaplanır.

Hemolizat matriksi kullanılarak kalibrasyon eğrisinin çizilmesi: Her seviye kalibratör aşağıda verilen prosedür ile 2 kez hazırlanır ve analiz edilir.

1. Hemolizat yöntemi çalışma prosedüründen farklı olarak 32 μL substratlı miks yerine 22.5 μL [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı ve 9.5 μL substratsız miks eppendorfa eklenir.
2. 5 μL 1 μM İS eklenir.

3. Herhangi bir hemolizat örneğinden 8 μL hemolizat eppendorfa eklenir (enzimatik reaksiyon hacmi = 45 μL) ve 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir,
4. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
5. 5 dk kaynar suda bekletilir.
6. 75 μL ACN/su çözeltisi eklenir (toplam hacim 120 μL).
7. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
8. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS piklerinin alanları hesaplanır.

Matriks kullanılmadan kalibrasyon eğrisinin çizilmesi: Her seviye kalibratör aşağıda verilen prosedür ile 2 kez hazırlanır ve analiz edilir.

1. 20 μL [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı ve 15 μL substratsız miks eppendorfa eklenir.
2. 5 μL 1 μM İS eklenir.
3. 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
4. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
5. 5 dk kaynar suda bekletilir.
6. 80 μL ACN/su çözeltisi eklenir.
7. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
8. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS piklerinin alanları hesaplanır.

Kalibratörlerin kromatogramda oluşturduğu analit pik alanları, internal standart pik alanlarına bölünerek y eksenine ([$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal alanı/İS alanı); standartların reaksiyon ortamında oluşturduğu konsantrasyonlar x eksenine (μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal) yerleştirilerek kalibrasyon eğrileri çizildi ve denklemler oluşturuldu.

Kalibrasyon grafikleri çizilirken enzimatik reaksiyonun gerçekleştiği toplam hacim KKD yöntemi için 40 μL , hemolizat yöntemi için 45 μL olarak esas alındı. Kalibrasyon eğrisinin çiziminde kullanılan [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standart hacmi, bu hacmin yarısını oluşturdu. Bu sebeple x ekseninde yer alan [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonları, çalışmada kullanılan standardın yarısına eşit oldu. Örneğin 100 μM 'lık [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardına karşılık gelen nokta kalibrasyon grafiğinin x ekseninde 50 μM olarak işaretlendi. Hasta/kontrol örneklerinin 40 ya da 45 μL 'lik enzimatik reaksiyon ortamında oluşturdukları ürün miktarı μM olarak hesaplandı. Hem kalibratörler hem de kontrol/hasta örnekleri çalışma prosedüründe ACN/su ile eşit hacimde seyreltildiği için ölçülen analit bu dilüsyondan etkilenmedi. μM olarak ölçülen ürün miktarı son

aşamada $\mu\text{mol/grHb/saat}$ birimine çevrilerek GALT aktiviteleri belirlendi. Bir başka ifadeyle reaksiyon ortamında oluşan μM ürün miktarı, 1 gram hemoglobinin 1 saatte oluşturduğu μmol cinsinden ürün miktarına dönüştürüldü. Bu formül oluşturulurken hemolizatlar için hemolizat Hb konsantrasyonu, KKD örnekleri için ise elde edildiği tam kanın Hb konsantrasyonu esas alındı. Reaksiyon ortamında bulunan KKD pancına ve hemolizat hacmine denk gelen Hb miktarı hesaplandı. Pançlanan 3 mm'lik KKD hacmi yaklaşık olarak 3 μL kabul edildi. Reaksiyon ortamında oluşan ürün μM olarak ölçüldüğü için LC-MS/MS'e çalışma prosedürleri sonunda verilen supernatantın hacmi 50 μL 'den küçük olmaması şartıyla bir önem arz etmedi. Kalibrasyon eğrileri çizilirken hemolizat ya da KKD matriks ortamından kaynaklanan girişim etkisinin engellenmesi için çalışma prosedürlerinde substrat içermeyen miks tercih edildi. Bu sayede sağlıklı bir bireyin matriks örneği kullanılmış olmasına rağmen isteğimiz dışında oluşabilecek ürünler engellendi.

3.2.5.2. Ölçüm Aralığının Alt-Üst Sınırlarının (LLMI-ULMI) Belirlenmesi ve Doğrusallık

Ölçüm aralığının alt ve üst aralığı KKD ve hemolizat yöntemi için ayrı ayrı belirlendi. Klinik karar verdirici düzeyler göz önünde bulundurularak kalibrasyon eğrilerinin çizilmesinde kullanılan [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standartları arasından 2 düşük, 2 yüksek seviye seçildi. Standartların reaksiyon ortamında oluşturduğu [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonları düşük seviyeler için 0.6 μM , 0.8 μM ; yüksek seviyeler için 50 μM ve 100 μM olacak şekilde KKD matriksinde ve hemolizat matriksinde kalibratörler hazırlandı. Her seviye kalibratör 5 kez analiz edildi. Ölçümler kalibratörlerin kromatogramda oluşturduğu analit pik alanı/İS pik alanı ile değerlendirildi. Ölçümlerin standart sapması ve ortalaması hesaplanarak %varyasyon katsayısı (%coefficient of variation, %CV) belirlendi. %CV değeri 20'den küçük olan en düşük konsantrasyon LLMI, en yüksek konsantrasyon ULMI değeri olarak kabul edildi.

$$\%CV = \left[\frac{\text{Ölçümlerin standart sapması}}{\text{Ölçümlerin ortalaması}} \right] \times 100$$

3.2.5.3. Recovery (Geri Elde) ve Matriks Etkisi Çalışmaları

Geri elde ve matriks etkisi çalışmaları EDTA'lı tüpten elde edilmiş KKD/hemolizat ve heparinli tüpten elde edilmiş KKD/hemolizat örneklerinin kullanıldığı yöntemler için ayrı ayrı yapıldı. EDTA'lı tam kan örneklerinin eşit hacimlerde karıştırılmasıyla EDTA'lı tam kan havuzu, heparinli tam kan örneklerinin eşit hacimlerde karıştırılmasıyla ise heparinli tam kan havuzu oluşturuldu. Bu havuzlardan 60'ar μL tam kan Gutrie kartlarına damlatılarak KKD örnekleri elde

edildi. Daha sonra EDTA'lı ve heparinli tüplerde kalan kan örneklerinden hemolizatlar elde edildi. Aynı antikoagülanlı tüpten elde edilmiş hemolizatlar eşit hacimde karıştırılarak hemolizat örnekleri oluşturuldu. Özetlemek gerekirse geri elde ve matriks etkisi çalışmalarında: EDTA'lı tüplerden elde edilmiş hemolizat örneği, heparinli tüplerden elde edilmiş hemolizat örneği, EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneği, Heparinli tüplerden elde edilmiş KKD örneği kullanıldı.

Standartların reaksiyon ortamında oluşturduğu [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal konsantrasyonları 1 μM (düşük) ve 20 μM (yüksek) olacak şekilde çalışma planı oluşturuldu. İki seviye için %matriks etkisi ve %geri elde hesaplandı.

3.2.5.3.1. Matriks Etkisi Çalışmaları

Matriks etkisi çalışmaları için çalışma örnekleri iki gruba ayrıldı. A grubu matriks içermeyen çalışma örneklerini, B grubu ise matriks içeren çalışma örneklerini temsil etti. Substratsız miks kullanılarak yapılan çalışma prosedürünün son aşamasında reaksiyon ortamında düşük (1 μM) ve yüksek (20 μM) konsantrasyonları sağlayacak [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standartları iki gruba da eklendi. Daha sonra çalışma örnekleri LC-MS/MS'e verilerek belirlenen alıkonma zamanında oluşturdukları [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal pik alanları hesaplandı. Matriks etkisi aşağıdaki formül kullanılarak her seviye ve her örnek tipi için hesaplandı:

$$\text{Matriks etkisi (\%)} = \left[\frac{B}{A} \right] \times 100 = \left[\frac{\text{B grubunda hesaplanan } [^{13}\text{C}_6]\text{-UDP-Gal alanı}}{\text{A grubunda hesaplanan } [^{13}\text{C}_6]\text{-UDP-Gal alanı}} \right] \times 100$$

KKD yöntemi

A grubu örneklerinin hazırlanması: Bu gruptaki örnekler içerdikleri standart seviyelerine göre “neat düşük” ve “neat yüksek” olarak adlandırıldı.

Neat düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 35 μL substratsız miks ve 5 μL 1 μM İS eppendorfa eklenir, 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 80 μL ACN/su çözeltisi eklenir ve 16000 g'de 10 dk santrifüjlenir.
5. Toplam 120 μL 'lik hacmin 90 μL 'si LC-MS/MS plağına alınır, üzerine neat düşük için 10 μL 10/3 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal, neat yüksek için 10 μL 200/3 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı eklenir.

6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

B grubu örneklerinin hazırlanması: Bu gruptaki örnekler içerdikleri standart seviyelerine göre “matriks düşük” ve “matriks yüksek” olarak adlandırıldı.

Matriks düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 32 μL substratsız miks, 5 μL 1 μM İS, 1 panç KKD örneği eppendorfa eklenir ve 1 dk 16000 g’de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C’de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 80 μL ACN/su çözeltisi eklenir ve 16000 g’de 10 dk santrifüjlenir.
5. Toplam 120 μL ’lik hacmin 90 μL ’si LC-MS/MS plağına alınır, üzerine matriks düşük için 10 μL 100/3 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal, matriks yüksek için 10 μL 200/3 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı eklenir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

Hemolizat yöntemi

A grubu örneklerinin hazırlanması: Bu gruptaki örnekler içerdikleri standart seviyelerine göre “neat düşük” ve “neat yüksek” olarak adlandırıldı.

Neat düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 40 μL substratsız miks ve 5 μL 1 μM İS eppendorfa eklenir, 1 dk 16000 g’de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C’de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 75 μL ACN/su çözeltisi eklenir ve 16000 g’de 10 dk santrifüjlenir.
5. Toplam 120 μL ’lik hacmin 90 μL ’si LC-MS/MS plağına alınır, üzerine neat düşük için 10 μL 3.75 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal, neat yüksek için 10 μL 75 μM [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal standardı eklenir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

B grubu örneklerinin hazırlanması: Bu gruptaki örnekler içerdikleri standart seviyelerine göre “matriks düşük” ve “matriks yüksek” olarak adlandırıldı.

Matriks düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 32 μL substratsız miks, 5 μL 1 μM İS, 8 μL hemolizat eppendorfa eklenir ve 1 dk 16000 g’de santrifüjlenir.

2. 30 dk 37 °C’de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 75 µL ACN/su çözeltisi eklenir ve 16000 g’de 10 dk santrifüjlenir.
5. Toplam 120 µL’lik hacmin 90 µL’si LC-MS/MS plağına alınır, üzerine matriks düşük için 10 µL 3.75 µM [¹³C₆]-UDP-Gal, neat yüksek için 10 µL 75 µM [¹³C₆]-UDP-Gal standardı eklenir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

3.2.5.3.2. Recovery (Geri Elde) Çalışmaları

Yöntem doğruluğu geri elde çalışmalarıyla değerlendirildi. Bu amaçla substratsız miks kullanılarak yapılan çalışma prosedürünün ilk aşamasında, reaksiyon ortamında düşük (1 µM) ve yüksek (20 µM) konsantrasyonları sağlayacak [¹³C₆]-UDP-Gal standartları eklenerek örnekler hazırlandı. Daha sonra çalışma örneklerinin belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal alanı/İS alanı oranına karşılık gelen konsantrasyonları hesaplandı. 1 µM ve 20 µM hedef değerler kabul edildi. %Geri elde aşağıdaki formül kullanılarak her seviye ve her örnek tipi için ayrı ayrı hesaplandı:

$$\% \text{Geri elde} = \left[\frac{\text{Ölçülen } [^{13}\text{C}_6]\text{-UDP-Gal konsantrasyonu}}{\text{Hedeflenen } [^{13}\text{C}_6]\text{-UDP-Gal konsantrasyonu}} \right] \times 100$$

KKD yöntemi: Düşük seviye “recovery düşük”, yüksek seviye “recovery yüksek” olarak adlandırıldı.

Recovery düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 28 µL substratsız miks, 5 µL 1 µM İS, 1 panç KKD örneği eppendorfa eklenir.
2. Recovery düşük için 4 µL 10 µM [¹³C₆]-UDP-Gal, recovery yüksek için 4 µL 200 µM [¹³C₆]-UDP-Gal standardı eklenir. 1 dk 16000 g’de santrifüjlenir.
3. 30 dk 37 °C’de inkübe edilir.
4. 5 dk kaynar suda bekletilir.
5. 80 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
6. 16000 g’de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS’e verilir.
7. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

Hemolizat yöntemi: Düşük seviye “recovery düşük”, yüksek seviye “recovery yüksek” olarak adlandırıldı.

Recovery düşük/yüksek (n=5) seviyenin hazırlanması:

1. 27.5 µL substratsız miks, 5 µL 1 µM İS, 8 µL hemolizat eppendorfa eklenir.
2. Recovery düşük için 4 µL 10 µM [¹³C₆]-UDP-Gal, recovery yüksek için 4 µL 200 µM [¹³C₆]-UDP-Gal standardı eklenir. 1dk 16000 g’de santrifüjlenir.
3. 30 dk 37 °C’de inkübe edilir.
4. 5 dk kaynar suda bekletilir.
5. 80 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
6. 16000 g’de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS’e verilir.
7. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

3.2.5.4. Tekrarlanabilirlik ve Stabilité

Tekrarlanabilirlik ve stabilité çalışmalarında bir sağlıklı gönüllünün KKD ve hemolizat örnekleri kullanıldı.

3.2.5.4.1. KKD Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilité Çalışmaları

Tekrarlanabilirlik çalışmaları

- Gün içi tekrarlanabilirlik: Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında EDTA’lı tam kan örneğinden hazırlanan %100’lük KKD örnekleri ve SF ile belirli oranlarda seyreltilip Gutrie kartına damlatılmasıyla hazırlanan %25 ve %5’lik KKD örnekleri kullanıldı. %100, %25 ve %5’lik KKD örnekleri 7 kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması, standart sapması ve %CV değeri hesaplandı.
- Günler arası tekrarlanabilirlik : Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması ardışık 5 gün boyunca yapıldı. Bu çalışma için EDTA’lı tam kan örneğinden hazırlanan ve -80 °C’de muhafaza edilen %100 ve %25’lik KKD örnekleri çalışma günü çıkarıldı. %100 ve %25’lik KKD örnekleri 3 kez çalışıldı. 5 günün sonunda, her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması, standart sapması ve %CV değeri hesaplandı.

Stabilité çalışması

- Stabilité çalışması 31 günlük süreci kapsayacak şekilde 4 farklı günde yapılan (0., 3., 10. ve 31. günler) analizler ile gerçekleştirildi. Bu amaçla EDTA’lı tam kan örneğinden hazırlanan KKD örneği ile 0. gün ilk ölçüm yapıldıktan sonra KKD örnekleri -20 °C, +4 °C ve oda

sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmek üzere farklı kısımlara ayrıldı. Her çalışma günü farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen KKD örneklerinden biri çıkarıldı ve 3 kez çalışıldı. Farklı saklama koşullarının GALT aktivite ölçümüne etkisi değerlendirildi.

3.2.5.4.2. Hemolizat Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilité Çalışmaları

Tekrarlanabilirlik çalışmaları

- Gün içi tekrarlanabilirlik: Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında eritrosit peletinden elde edilen hemolizat (%100) ve eritrosit lizis tamponuyla seyreltilmesi ile elde edilen %25 ve %5'lik hemolizatlar kullanıldı. %100, %25 ve %1'lik hemolizatlar 7 kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması, standart sapması ve %CV değeri hesaplandı.
- Günlük arası tekrarlanabilirlik: Günlük arası tekrarlanabilirlik çalışması ardışık 5 gün boyunca yapıldı. -80 °C'de muhafaza edilen eritrosit peletlerinden biri çalışma günü çıkarıldı. Bu eritrosit peletinden elde edilen hemolizat (%100) ve eritrosit lizis tamponuyla seyreltilmesi ile elde edilen %25, %5 ve %1'lik hemolizatlar çalışmada kullanıldı. %100, %25, %5 ve %1'lik hemolizatlar 3 kez çalışıldı. 5 günün sonunda her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması, standart sapması ve %CV değeri hesaplandı.

Stabilité çalışması

- Stabilité çalışmaları 35 günlük süreci kapsayacak şekilde 4 farklı günde yapılan (0., 3., 14. ve 35. günler) analizler ile gerçekleştirildi. Bu amaçla eritrosit peletinden elde edilen hemolizat ile 0. gün ilk ölçüm yapıldıktan sonra, eritrosit peletleri -20 °C, +4 °C ve oda sıcaklığında (25 °C) muhafaza edilmek üzere farklı kısımlara ayrıldı. Her çalışma günü farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen eritrosit peletlerinden biri çıkarıldı. Eritrosit peletlerinden elde edilen hemolizatlar 3 kez çalışıldı. Farklı saklama koşullarının GALT aktivite ölçümüne etkisi değerlendirildi.

3.2.5.5. Seçicilik

Seçicilik çalışmasında bir sağlıklı gönüllünün KKD ve hemolizat örneği kullanıldı. İki yöntem için analit ve İS seçiciliği belirlendi. LC-MS/MS'de arkaplan gürültünün belirlenmesi amacıyla analit ve İS içermeyen matriks körleri (blank) 6 kez çalışıldı. Bununla birlikte ölçüm aralığının alt sınırında hazırlanmış kalibratörler 6 kez analiz edildi. Matriks körleri ve kalibratörler şu şekilde plağa dizildi: Kör-kör-kör-kör-kör-kör-LLMI-LLMI-LLMI-LLMI-LLMI-LLMI.

Matriks körlerinde belirlenen alıkonma zamanında elde edilen arkaplan gürültü piklerinin alanları ortalamaları (analit ve İS pik alanları), LLMI değerinde hazırlanmış kalibratörlerin alıkonma zamanında elde edilen piklerin (analit ve İS pik alanları) alanları ortalamalarına oranlandı. Daha sonra 100 ile çarpılarak %girişim etkisi hesaplandı. [¹³C₆]-UDP-Gal için bu oranın ≤%20, İS için ise ≤%5 olması gerekir.

KKD matriks körünün hazırlanması:

1. 37 µL substratsız miks, 1 panç KKD örneği eppendorfa eklenir ve 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 80 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
5. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında arkaplan [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

Hemolizat matriks körünün hazırlanması:

1. 37 µL substratsız miks, 8 µL hemolizat eppendorfa eklenir ve 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 75 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
5. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında arkaplan [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

LLMI KKD kalibratörünün hazırlanması:

1. 20 µL 0.8 µM [¹³C₆]-UDP-Gal standardı, 12 µL substratsız miks, 5 µL 1 µM İS, 1 panç KKD örneği eppendorfa eklenir ve 1 dk 16000 g'de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 80 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
5. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

LLMI hemolizat kalibratörünün hazırlanması:

1. 22.5 µL 0.8 µM [¹³C₆]-UDP-Gal standardı, 9.5 µL substratsız miks, 5 µL 1 µM İS, 8 µL hemolizat örneği eppendorfa eklenir ve 1dk 16000 g'de santrifüjlenir.
2. 30 dk 37 °C'de inkübe edilir.
3. 5 dk kaynar suda bekletilir.
4. 75 µL ACN/su çözeltisi eklenir.
5. 16000 g'de 10 dk santrifüjlendikten sonra supernatant LC-MS/MS'e verilir.
6. Kromatogramda belirlenen alıkonma zamanında [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanları hesaplanır.

3.2.5.6. Carryover (Taşıma etkisi)

Taşıma etkisi çalışmasında sağlıklı bir gönüllünün KKD ve hemolizat örneği kullanıldı. İki yöntem taşıma etkisi açısından değerlendirildi. Ölçüm aralığının üst ölçüm sınırında (ULMI) hazırlanmış kalibratörlerin hemen ardından yapılan analit ve İS içermeyen matriks körleri analizinde alıkonma zamanında elde edilen analit ve İS piklerinin alanlarının ortalamaları, ölçüm aralığının alt sınırında (LLMI) hazırlanmış kalibratörün alıkonma zamanında elde edilen piklerin (analit ve İS pik alanları) alanlarına oranlandı. Kullanılan kalibratörler ve matriks körleri seçicilik çalışmasında olduğu gibi hazırlandı.

Matriks körlerinde elde edilen [¹³C₆]-UDP-Gal ve İS pik alanlarının, ölçüm aralığının alt sınırında (LLMI: 0.4 µM) hazırlanmış kalibratörde elde edilen analit ve İS pik alanlarından sırasıyla; %20 ve %5'inden fazla olmaması gerekir. Matriks körleri ve kalibratörler şu şekilde plağa dizildi: ULMI-ULMI-kör-kör-ULMI-ULMI-kör-kör-LLMI

3.2.5.7. Referans Aralık Çalışması

Yöntem validasyon çalışmalarının son aşamasında referans aralık çalışması yapıldı. LC-MS/MS'de GALT aktivitesinin belirlenmesinde kullanılan KKD ve hemolizat yöntemleri için iki farklı referans aralığı oluşturuldu.

3.2.5.7.1. Katılımcı Seçimi

Referans aralık çalışmasına katılacak bireyler hastaneye başvuran, örnek toplama merkezinde örnek verecek olan bireyler arasından rastgele seçildi. Toplam 120 birey çalışmaya dahil edildi. 18-79 yaş arası bireylerden ve çocuk hastanesi örnek toplama merkezinde 0-18 yaş arası bireylerden cinsiyet ve yaş dağılımına bakılmaksızın gönüllülük esasına göre örnekler toplandı. Bireylerden alınacak örnek için ilave kan alma girişimi yapılmadı. Genetik faktörler, transfüzyon durumu, alkol ve sigara kullanımı, açlık tokluk durumu, ilaç bağımlılığı gibi dışlama

kriterleri uygulanmadı. Katılımcılara sadece klasik galaktozemi hastası olup olmadığı soruldu. Klasik galaktozemi hastası olmayan tüm gönüllüler referans aralık çalışmasına dahil edildi. Her bireyden 1 adet mor kapaklı tüp örneği alındı.

Örnekler buz üzerinde aynı gün içinde Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarına hızlıca iletildi. Tüm örnekler 1'den 120'ye kadar numaralandırıldı. Her bireyin tam kan Hb konsantrasyonu ölçüldü. Daha sonra her bir EDTA'lı tüpten 60'ar µL tam kan örneği Gutrie kartına damlatılarak ışık ve nem içermeyen koşullarda bir cam yüzeyde kurutuldu. EDTA'lı tüplerden eritrosit peletleri elde edildi ve -80 °C'de çalışma gününe kadar saklandı. KKD örnekleri ise bir zarfa konarak -80 °C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. Sonuç olarak her bireye ait bir adet eritrosit peleti ve KKD örneği referans aralık çalışmasında kullanıldı. 120 adet KKD örneğinin ve eritrosit peletinin LC-MS/MS ile analizi ardışık 4 günde yapılan çalışmalar ile mümkün oldu. 1 numaralı sağlıklı gönüllünün -80°C'de saklanan örnekleri ve 84 numaralı sağlıklı gönüllünün eritrosit peleti zarar gördüğü için çalışmaya dahil edilmedi. Toplamda 118 hemolizat örneği ve 119 KKD örneği referans aralık çalışmasında kullanıldı.

Çalışma günü eritrosit peletleri ve KKD örnekleri derin dondurucudan çıkarıldı. Eritrosit peletlerinden hemolizat örnekleri elde edildi. Sadece ilk 20 bireyin hemolizat Hb konsantrasyonu ölçüldü (ortalama 3.3 g/dL). İkinci aşamada 20-40 numaralı bireylerin hemolizatlarından bir hemolizat havuzu oluşturuldu. Hemolizat havuzunun Hb konsantrasyonu ölçüldü (ortalama 3.3 g/dL). Tam kan örnekleri farklı konsantrasyonlarda Hb içerse de hemolizat Hb konsantrasyonları dar bir aralıkta değişkenlik gösterdiği için 41'den 120'ye kadar numaralandırılmış bireylerin hemolizat Hb konsantrasyonu ölçülmedi. Hemolizat GALT aktivite sonuçları 3.3 g/dL Hb konsantrasyonu içerdiği varsayılarak hesaplandı. KKD GALT aktivite sonuçları ise her bireyin tam kan Hb miktarına göre formülize edilerek hesaplandı. Enzim aktivitesi birimi µmol/grHb/saat olarak belirlendi.

3.2.5.7.2. İstatiksel Analiz

Çalışma verilerinin istatiksel çıktısı “MedCalc” programı kullanılarak sağlandı. İstatistiksel anlamlılık açısından $p < 0.05$ değeri seçildi. Çalışma ekranına her bireye ait aşağıdaki bilgiler girildi:

- Hemolizat GALT aktivite sonucu (µmol/grHb/saat)
- KKD GALT aktivite sonucu (µmol/grHb/saat)
- Tam kan Hb konsantrasyonu (g/dL)
- İlk 20 bireyin hemolizat Hb konsantrasyonu (g/dL)

- Cinsiyet
- Yaş

Normal dağılıma uygunluk histogramlar ve kolmogorov simirnov testi ile değerlendirildi. Hemolizat GALT aktivitesi ve KKD GALT aktivitesinin alt ve üst sınır referans aralıkları, uç değerlerin tukey yöntemi ile çıkarılmasından sonra parametrik yöntemler kullanılarak belirlendi. Ortalama $\pm$ 1.96*SD şeklinde alt ve üst sınırlar ifade edildi. Hemolizat GALT aktiviteleri ve KKD GALT aktiviteleri arasındaki korelasyon incelendi. Erkek ve kadınlarda GALT aktivite ölçüm farklılıkları bağımsız gruplar T testi ile değerlendirildi. GALT aktivite sonuçları ve yaş arasındaki ilişki için spearman korelasyon testi uygulandı.

3.2.6. Klasik Galaktozemi Hastalarının LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi

Yöntem validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra klasik galaktozemili hastalara ait hemolizat ve KKD örneklerinde GALT aktivitelerinin LC-MS/MS ile analiz edilerek belirlenmesi amaçlandı. Bu amaçla çocuk metabolizma hastalıkları arşivinde genetik, florometrik ve klinik olarak klasik galaktozemi tanısı almış 18 hasta belirlendi. Rutin randevularına gelen klasik galaktozemi hastalarından örnek verdikleri esnada gönüllülük esasına göre ilave 1 adet EDTA'lı tam kan örneği alındı. Örnekler 1'den 18'e kadar numaralandırıldı. KKD örnekleri ve eritrosit peletleri elde edildi ve -80°C'de çalışma gününe kadar muhafaza edildi. Hastaların hemolizat örnekleri LC-MS/MS yöntemi ile, KKD örnekleri ise florometrik ve LC-MS/MS yöntemleriyle eş zamanlı analiz edildi.

3.2.6.1. Hastaların Florometrik GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Metabolizma laboratuvarında PerkinElmer GALT kiti kullanılarak klasik galaktozemili hastaların KKD örneklerinde GALT aktiviteleri florometrik yöntemle semikantitatif olarak ölçüldü. Sonuçlar U/gHb olarak raporlandı. Enzim aktivitesi >3.5 U/gHb olanlar normal, <3.5 U/gHb olanlar ise patolojik olarak değerlendirildi.

3.2.6.2. Hastaların LC-MS/MS GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tıbbi Biyokimya Anabilimdalı laboratuvarında klasik galaktozemi hastalarının hemolizat ve KKD örnekleri LC-MS/MS ile kantitatif olarak ölçüldü. Hastaların kromatogramlarında analit ve İS pik alanları değerlendirildi.

3.2.7. Sağlıklı Bireylerin KKD Örneklerinin LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi

Referans aralık çalışması için toplanan LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilen 44'den 58'e kadar numaralandırılmış sağlıklı bireylere ait KKD örnekleri florometrik yöntem ile analiz edilerek LC-MS/MS ve florometrik yöntem arasındaki korelasyon incelendi. Bu amaçla -80°C'de bulunan KKD örnekleri çocuk metabolizma laboratuvarına iletildi ve PerkinElmer GALT kiti kullanılarak GALT aktiviteleri belirlendi.

Bir sonraki çalışmada LC-MS/MS'in florometrik yöntemle göre daha hassas ve daha spesifik ölçüm yapabildiğini, normalin %5'in altındaki enzim aktivitelerinde bile kantitatif sonuçlar verebildiğini kanıtlayabilmek için florometrik yöntemle çalışılmış, klasik galaktozemi tanısı almamış, florometrik yöntem sonucu eşik değere yakınlık gösteren KKD örnekleri tarandı. Bu kriterlere uyan 19 adet KKD örneği belirlendi. Bu örnekler LC-MS/MS ile analiz edilerek florometrik yöntemle arasındaki korelasyon incelendi.

3.2.8. Etik Kurul

Çalışmaların yapılabilmesi için Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 18-2.1/2 numaralı karar ile 19.2.2019 tarihinde onam alınmıştır.

Çalışmamız Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından finansmanı sağlanan TTU-2019-20812 numaralı proje kapsamında yürütülmüştür.

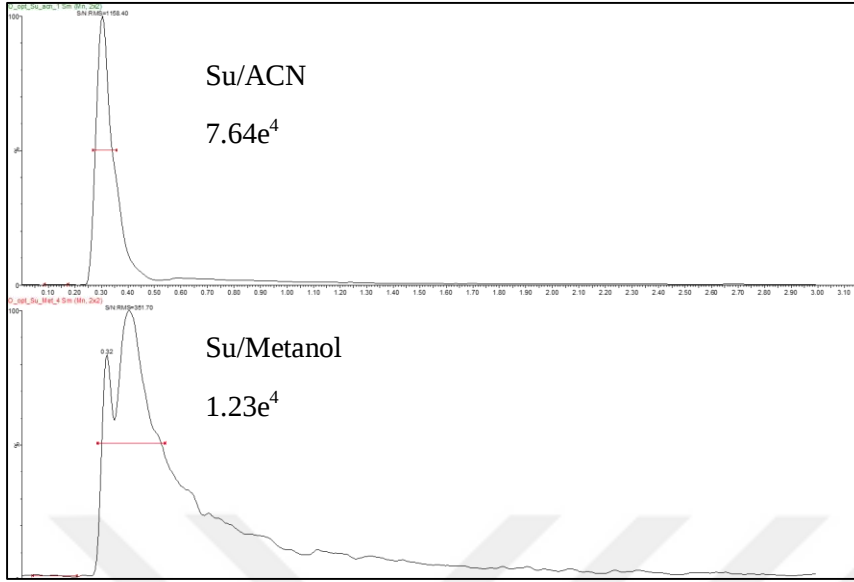
4. BULGULAR

4.1. LC Koşullarının Optimizasyonu

Çalışmamızda optimum LC parametreleri pik yoğunluğu ve sinyal/gürültü (S/N) oranı dikkate alınarak belirlendi.

4.1.1. Mobil Faz Optimizasyonu

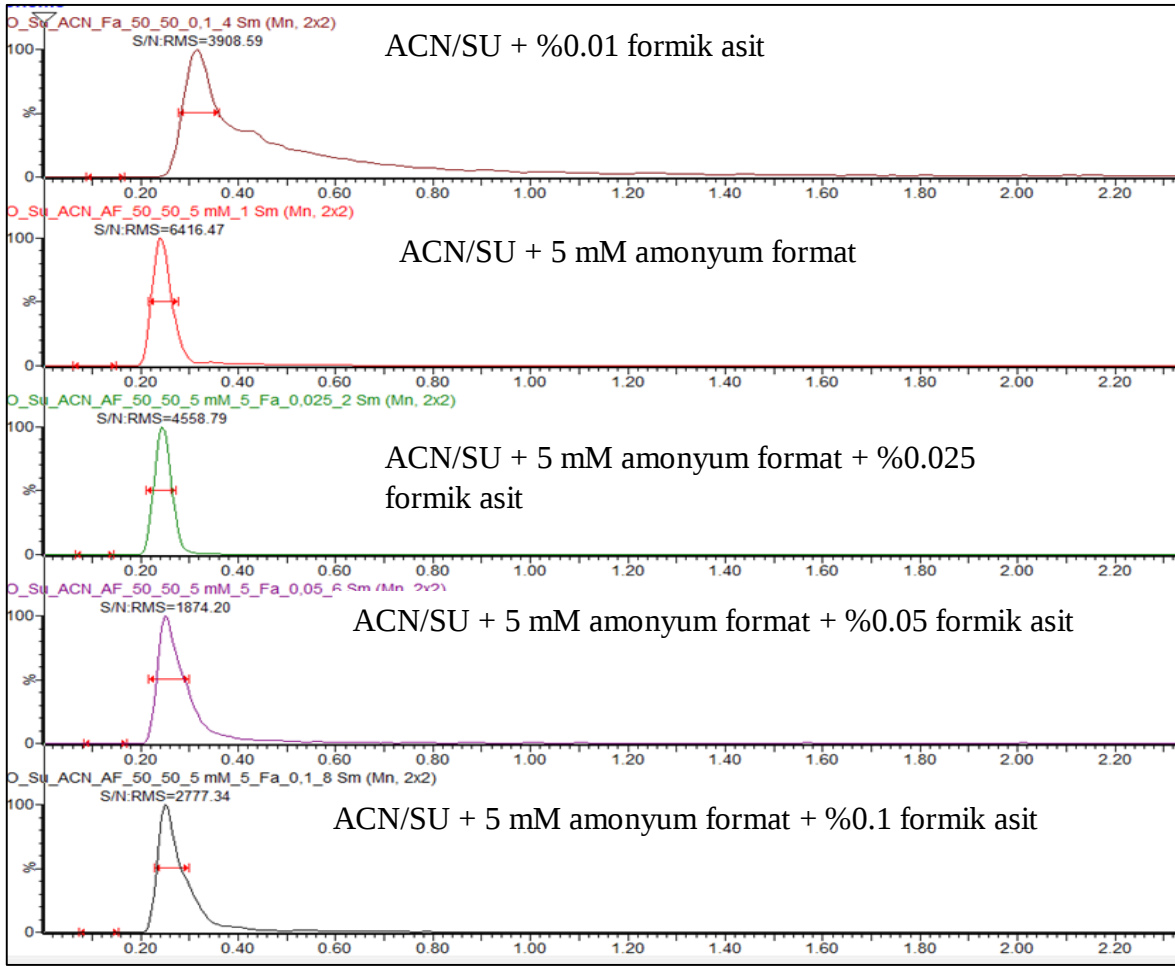
Mobil faz optimizasyonunda MS grade su sabit alınarak organik çözgenin değişken olduğu koşullar denendi. Mobil fazlar iki farklı şekilde hazırlandı; MS grade su-%100'lük metanol ve MS grade su-%100'lük ACN. Mobil faz ile uyumlu [¹³C₆]-UDP-Gal standartları bu çalışmalarda kullanıldı. MS grade su-%100'lük ACN'de daha kaliteli pikler elde edildi (Şekil 17). Akış programı %50-%50 izokratik olarak belirlendi.



Şekil 17. Mobil faz optimizasyonu

4.1.2. Amonyum Format ve Formik Asit Optimizasyonu

Formik asit ve amonyum formatın iyonlaştırmayı artırıcı etkilerinden yararlanmak için bu maddelerin farklı konsantrasyonları mobil fazlara eklendi. En yüksek pik yoğunluğu ve sinyal/gürültü oranı ACN/su + 5 mM amonyum formatın kullanıldığı mobil fazda elde edildi (Şekil 18). Artan formik asit konsantrasyonu piklerin yayvanlaşmasına sebep oldu.



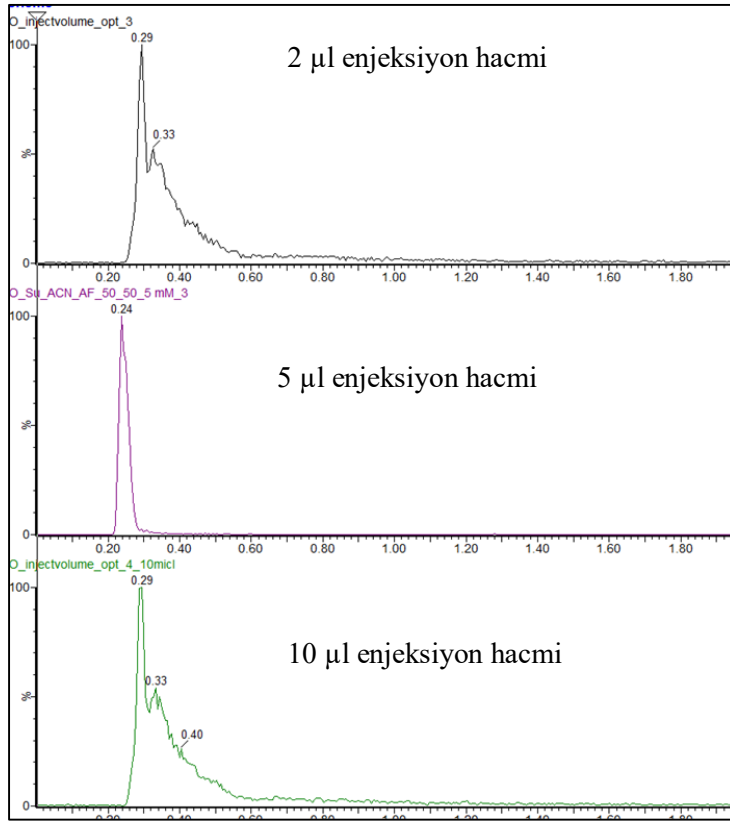
Şekil 18. Amonyum format ve formik asit optimizasyonu

Sonuç olarak en iyi intensitenin sağlandığı mobil fazlar akış programı %50-%50 izokratik olacak şekilde mobil faz (A) 5 mmol/L amonyum format içeren ACN; mobil faz (B) 5 mmol/L amonyum format içeren MS grade su olarak belirlendi.

4.1.3. Akış Hızı ve Enjeksiyon Hacmi Optimizasyonu

Mobil fazların akış hızı 0.4 mL/dk olarak belirlendi. Akış hızı düştükçe piklerin alıkonma zamanı uzadı. Piklerin alıkonma zamanı İS ve [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal için 0.24 ± 0.01 dk olarak tespit edildi. Kolonun tekrar şartlanması için enjeksiyonlar arası zaman 3 dk olarak belirlendi.

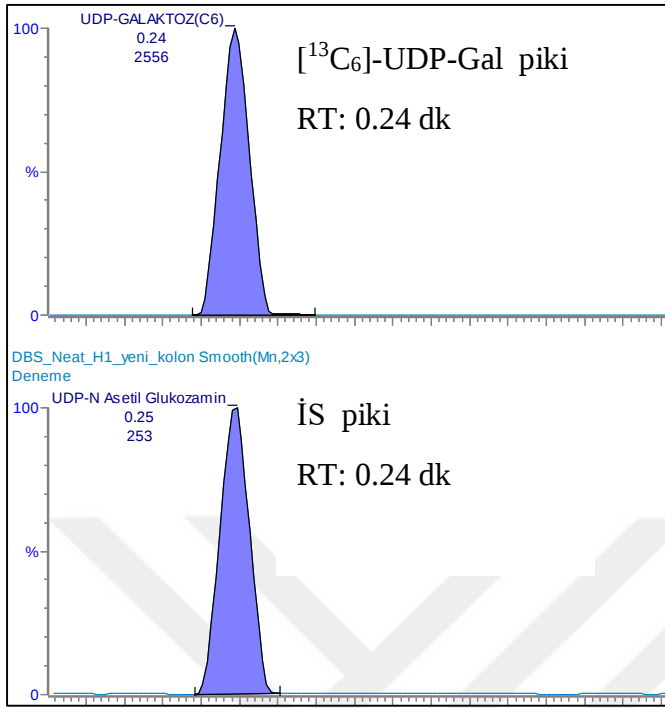
Enjeksiyon hacmi için 2 μL , 5 μL , 10 μL 'lık hacimler ile denemeler yapıldı ve en iyi pikin alındığı hacim 5 μL olarak belirlendi (Şekil 19).



Şekil 19. Enjeksiyon hacmi optimizasyonu

4.1.4. Kromatogramlar

Kromatogramlar, alıkonma zamanına bağlı göreceli yoğunluklar (Relative Abundance, %) olarak sunuldu. Çalışmada elde edilen [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve internal standarda ait LC-MS/MS pikleri şekilde gösterilmiştir (Şekil 20).



Şekil 20. Kromatogramlar

4.2. EDTA ve Heparinli Örnek Toplama Tüplerinin GALT Aktivite Ölçümüne Etkisi

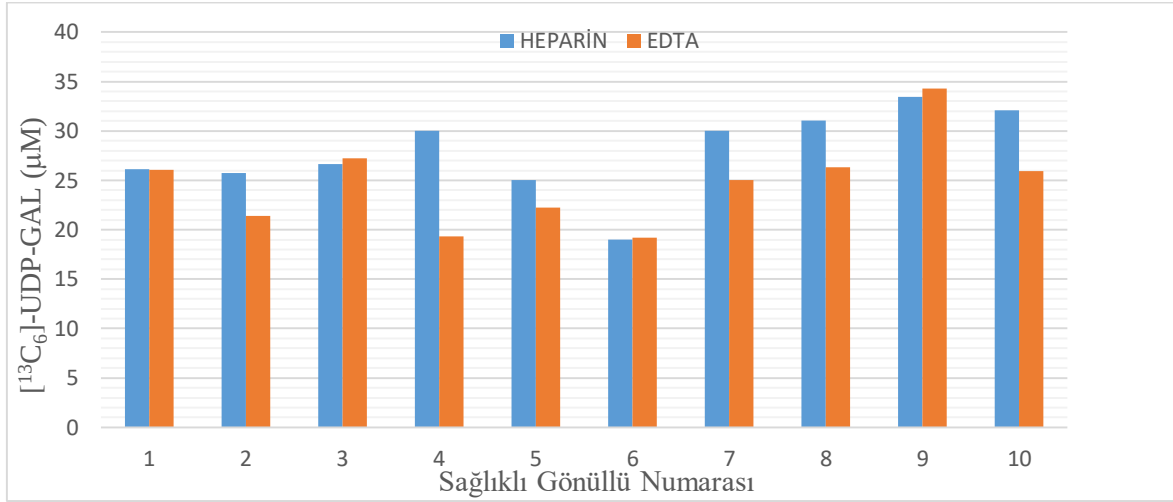
4.2.1 Hemolizat Yöntemi

1-10 numaralı tam kan örneklerinden hemolizatlar hazırlandı. Hemolizatlar 1'er kez çalışıldı (Şekil 21). EDTA'lı tam kanlardan elde edilmiş hemolizatlarda oluşan analit miktarının aritmetik ortalaması 24.71 μM , heparinli tam kanlardan elde edilmiş hemolizatlarda oluşan analit miktarının aritmetik ortalaması ise 27.92 μM olarak hesaplandı (Tablo 8). Bağımsız gruplar t testinde iki ölçüm arasında anlamlı fark tespit edilmedi ($p=0.11$).

Tablo 8. Kan alma tüplerinin karşılaştırılması (hemolizat)

	EDTA [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal (μM)	Heparin [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal (μM)
Örneklem boyutu	10	10
Aritmetik ortalama	24.7152	27.9216
Ortalama için 95% güven aralığı	21.5134 – 27.9170	24.8680 – 30.9751
Varyans	20.0331	18.2209
Standart sapma	4.4758	4.2686
Ortalamanın standart hatası	1.4154	1.3498

Eşit varyanslar için F testi	P = 0.89
Fark	3.2063
Standart hata	1.9559
Farkın 95% güven aralığı	-0.9028 7.3155
Test istatistik t	1.639
Serbestlik derecesi (DF)	18
2-tailed olasılık	P = 0.1185



Şekil 21. EDTA’lı ve heparinli kan tüplerinde ölçülen analit miktarları (hemolizat)

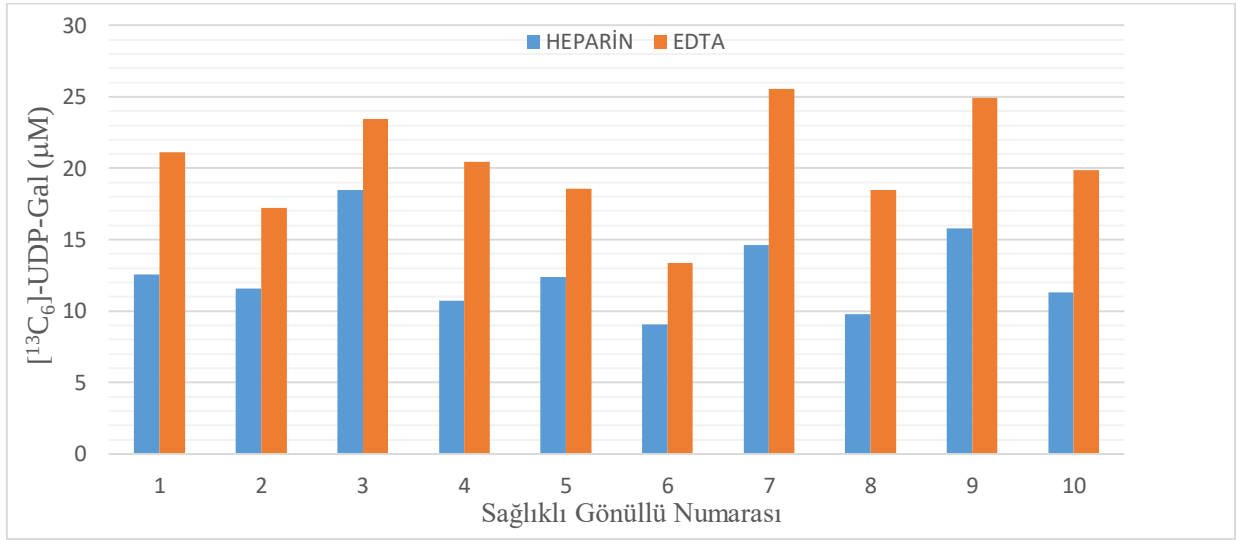
4.2.2. KKD Yöntemi

1-10 numaralı EDTA’lı ve heparinli tüplerden KKD örnekleri hazırlandı. KKD örnekleri 1’er kez çalışıldı. EDTA’lı tüplerden elde edilmiş KKD örneklerinde oluşan analit miktarının aritmetik ortalaması 20.30 µM, heparinli tam kanlardan elde edilmiş KKD örneklerinde oluşan ürün miktarının aritmetik ortalaması ise 12.63 µM olarak hesaplandı (Tablo 9). Bağımsız gruplar t testinde iki ölçüm arasında anlamlı fark tespit edildi (p=0.0001).

Tablo 9. Kan alma tüplerinin karşılaştırılması (KKD)

	EDTA [¹³ C ₆]-UDP-Gal (µM)	Heparin [¹³ C ₆]-UDP-Gal (µM)
Örneklem boyutu	10	10
Aritmetik ortalama	20.3004	12.6353
Ortalama için 95% güven aralığı	17.6547 – 22.9461	10.5601 – 14.7105
Varyans	13.6786	8.4152

Standart sapma	3.6985	2.9009
Ortalamanın standart hatası	1.1696	0.9173
Eşit varyanslar için F testi	P = 0.481	
Fark	-7.6651	
Standart hata	1.4864	
Farkın 95% güven aralığı	-10.7879 -4.5423	
Test istatistik t	-5.157	
Serbestlik derecesi (DF)	18	
2-tailed olasılık	P = 0.0001	



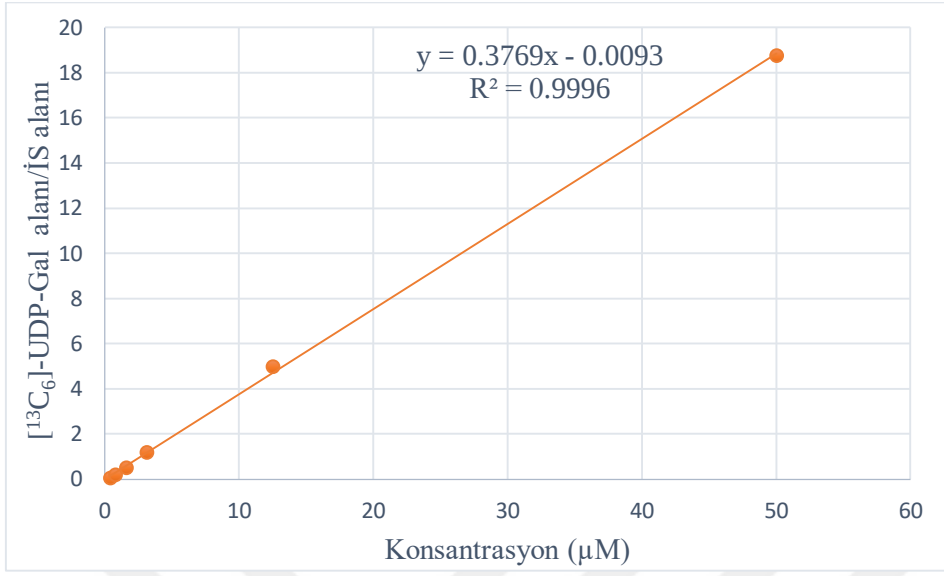
Şekil 22. EDTA'lı ve heparinli kan tüplerinde ölçülen analit miktarları (KKD)

Sonuç olarak hemolizat yönteminde antikoagülan çeşidinin analit sinyalini (pik alanı) anlamlı düzeyde etkilemediği, KKD yönteminde ise EDTA'lı tüplerde analit sinyalinin daha yüksek olduğu belirlendi. Yöntem validasyon çalışmalarında EDTA'lı tam kan örneklerinin kullanılmasına karar verildi. Ayrıca bu çalışmada kör örneklerde herhangi bir analit sinyali tespit edilmediği için çalışmanın devamında kör örnekler için çalışma yapılmadı.

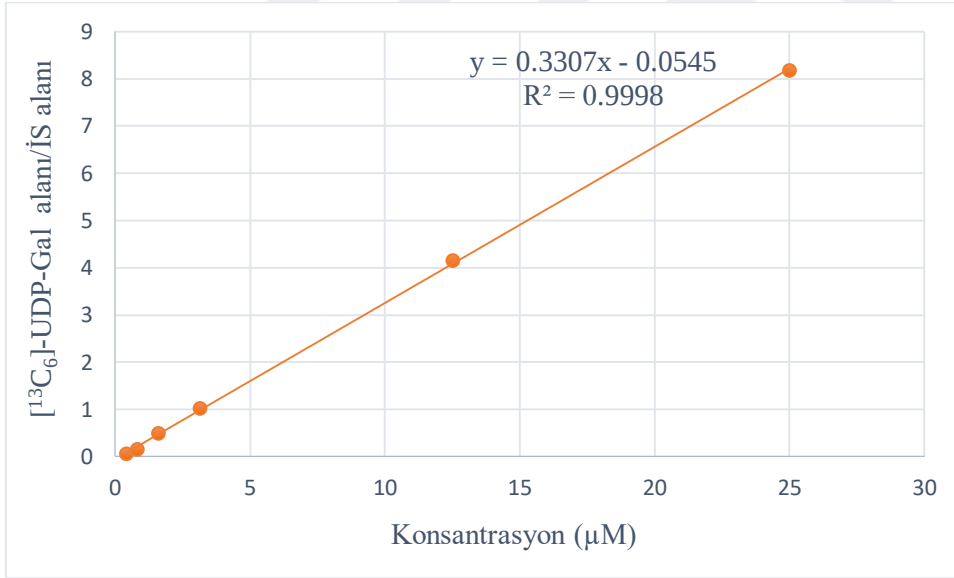
4.3. Yöntem Validasyon Çalışmaları

4.3.1. Kalibrasyon Eğrilerinin Çizilmesi

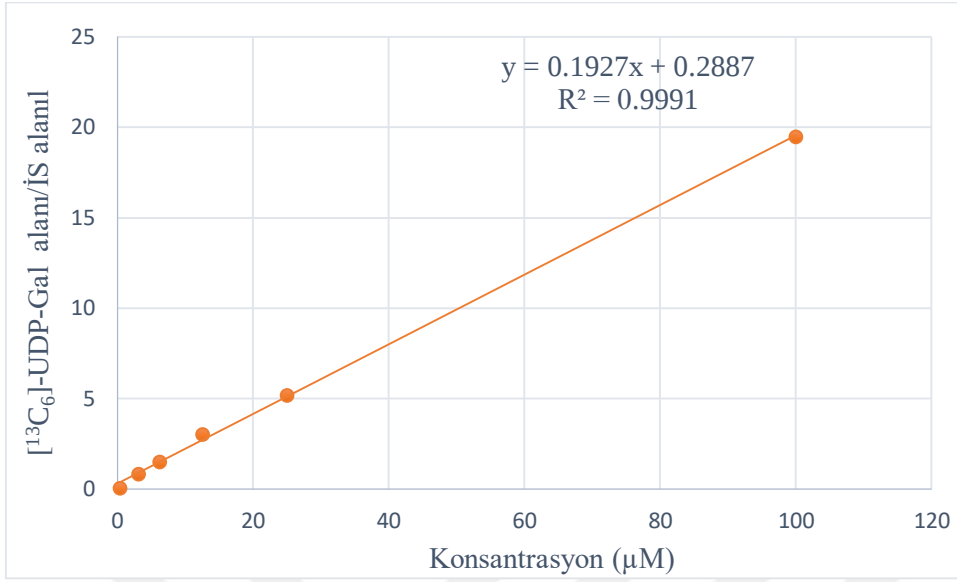
Analit pikinin eğri altında kalan alanı, İS pikinin eğri altında kalan alanına oranlanarak oluşturulan kalibrasyon eğrileri ve denklemleri şekil 23, 24 ve 25'te gösterilmiştir.



Şekil 23. Hemolizat matriksinde kalibrasyon grafiği



Şekil 24. KKD matriksinde kalibrasyon grafiği



Şekil 25. Matriks içermeyen kalibrasyon grafiği

4.3.2. Ölçüm Aralığının Alt ve Üst Sınırlarının Belirlenmesi ve Doğrusallık

KKD yöntemi için istediğimiz performans hedeflerini karşılayan 50 µM [¹³C₆]-UDP-Gal; hemolizat yöntemi için 100 µM [¹³C₆]-UDP-Gal son konsantrasyonu ölçüm aralığının üst sınırı kabul edildi (Tablo 10 ve 11). Daha yüksek konsantrasyonlara yönelik %CV çalışması yapılmadı.

En düşük seviyenin (0.6 µM) %CV'si her iki yöntemde 20'den küçük bulunduğu için 0.6 µM'dan daha düşük seviyeler hazırlanarak çalışma tekrarlandı. %CV'si 20'den küçük olan ve kromatogramda sinyal/gürültü (S/N) oranı >10 olan en düşük seviye ölçüm aralığının alt sınırı olarak kabul edildi (Şekil 26 ve 27).

KKD ve hemolizat yöntemi için istediğimiz performans hedeflerini karşılayan 0.4 µM [¹³C₆]-UDP-Gal son konsantrasyonu ölçüm aralığının alt sınırı (LLMI) kabul edildi (Tablo 12 ve 13). Daha düşük konsantrasyonlarda %CV değeri 20'den büyük olduğu için tabloya eklenmedi.

Tablo 10. KKD yöntemi için ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri

Kal. (μ M)	1.Ölçüm	2.Ölçüm	3.Ölçüm	4.Ölçüm	5.Ölçüm	Ortalama alan oranları	Standart sapma	%CV
Düşük seviye (0.6)	0.18	0.20	0.15	0.15	0.16	0.17	0.02	11.75
Düşük seviye (0.8)	0.22	0.24	0.21	0.17	0.18	0.20	0.03	15.04
Yüksek seviye (50)	11.10	13.13	12.56	11.44	12.67	12.18	0.86	7.11
Yüksek seviye (100)	30.10	24.45	31.54	37.78	22.95	29.36	5.94	20.24

Tablo 11. Hemolizat yöntemi için ölçüm aralığının alt ve üst limitlerinde %CV değerleri

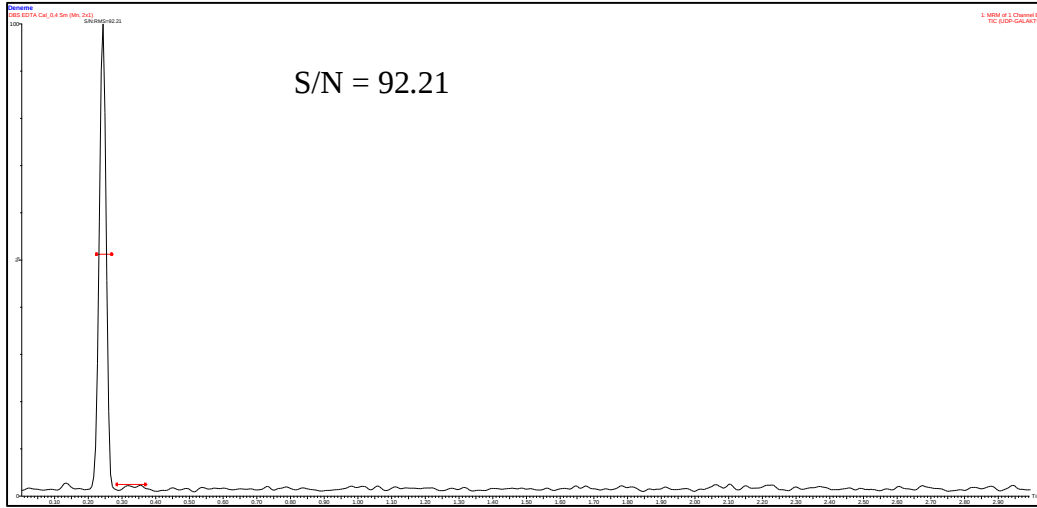
Kal. (μ M)	1.Ölçüm	2.Ölçüm	3.Ölçüm	4.Ölçüm	5.Ölçüm	Ortalama alan oranları	Standart sapma	%CV
Düşük seviye (0.6)	0.16	0.13	0.15	0.16	0.16	0.16	0.02	15
Düşük seviye (0.8)	0.18	0.26	0.22	0.23	0.21	0.22	0.03	12.8
Yüksek seviye (50)	19.4	15.78	18.45	16.67	15.17	17.09	1.79	10.45
Yüksek seviye (100)	34.56	26.79	30.35	33.97	26.13	30.36	3.92	12.91

Tablo 12. KKD yöntemi için ölçüm aralığının alt limitlerinde %CV değerleri

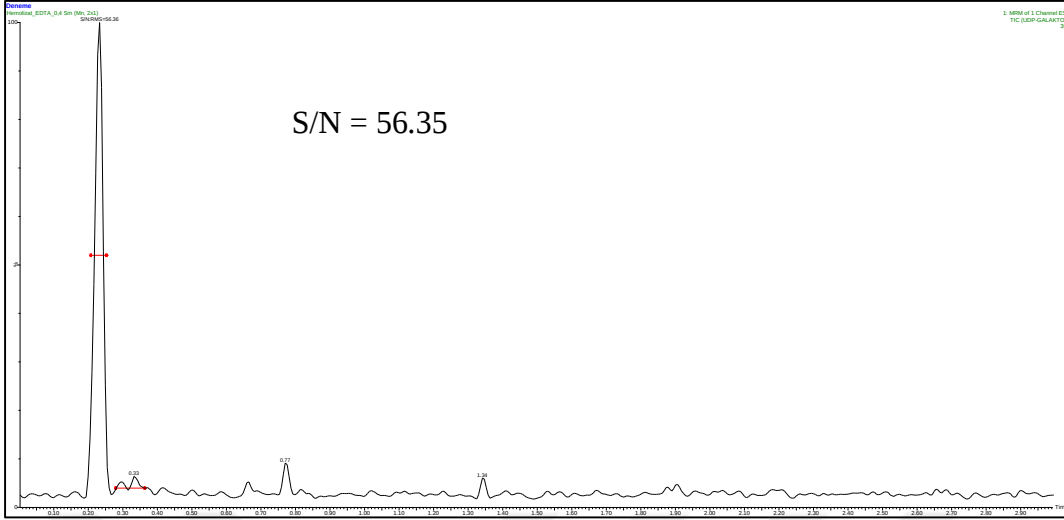
Kal. (μ M)	1.Ölçüm	2.Ölçüm	3.Ölçüm	4.Ölçüm	5.Ölçüm	Ortalama alan oranları	Standart sapma	%CV
Düşük seviye (0.4)	0.12	0.11	0.09	0.08	0.08	0.10	0.02	18.59
Düşük seviye (0.5)	0.17	0.14	0.13	0.11	0.11	0.13	0.02	17.63

Tablo 13. Hemolizat yöntemi için ölçüm aralığının alt limitlerinde %CV değerleri

Kal. (μ M)	1.Ölçüm	2.Ölçüm	3.Ölçüm	4.Ölçüm	5.Ölçüm	Ortalama alan oranları	Standart sapma	%CV
Düşük seviye (0.4)	0.09	0.10	0.11	0.14	0.10	0.11	0.02	18.26
Düşük seviye (0.5)	0.10	0.12	0.16	0.11	0.13	0.12	0.02	17.18

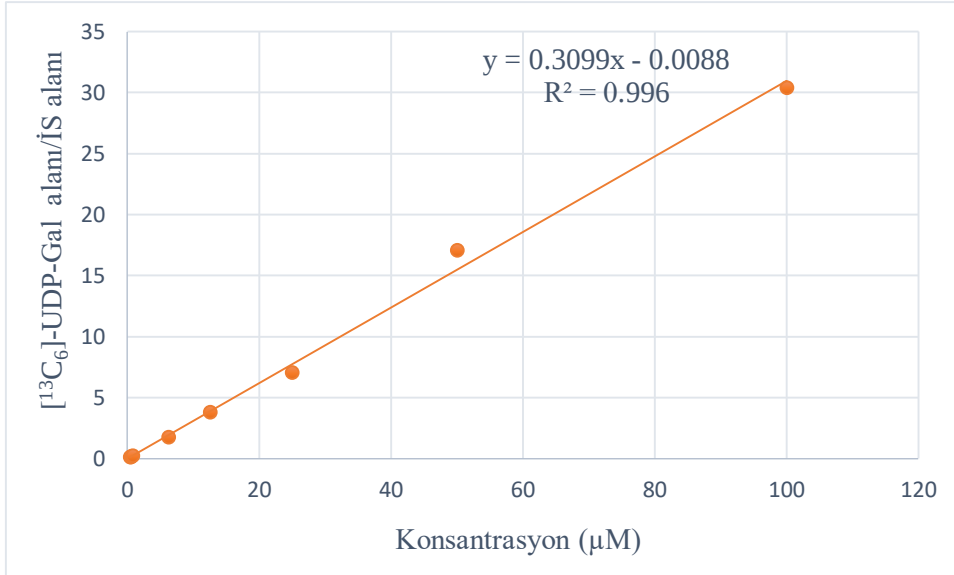


Şekil 26. Ölçüm aralığının alt sınırında hazırlanmış KKD kalibratöründe (0.4 μ M) sinyal/gürültü oranı

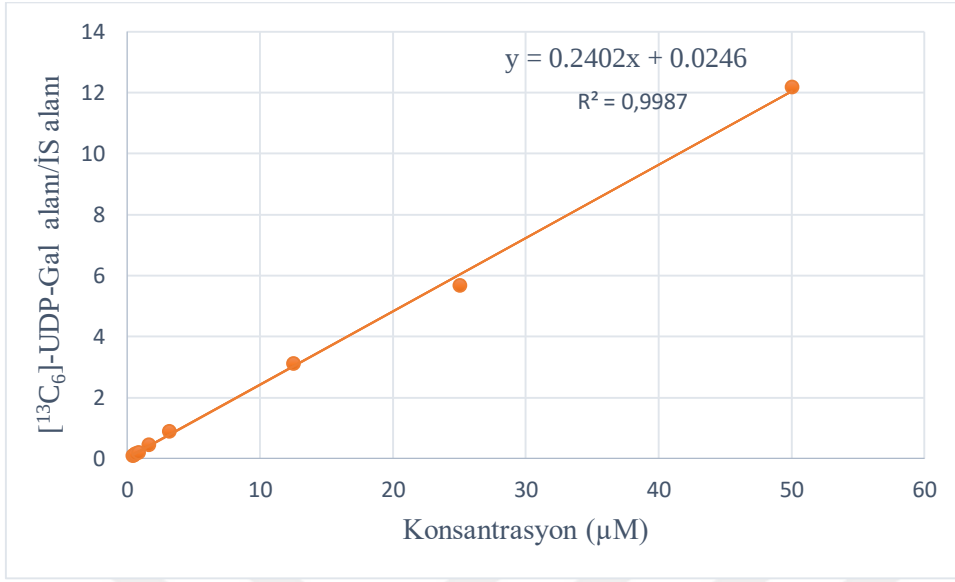


Şekil 27. Ölçüm aralığının alt sınırında hazırlanmış hemolizat kalibratöründe (0.4 μ M) sinyal/gürültü oranı

Doğrusallığın gösterilmesi için LLMI ve ULMI değerlerini içeren kalibrasyon grafikleri çizildi. Grafiklerin R^2 değerleri 0.985'ten büyük olduğu için hemolizat yöntemi 0.4-100 μ M arasında, KKD yöntemi 0.4-50 μ M arası doğrusal kabul edildi (Şekil 28 ve 29).



Şekil 28. Hemolizat yönteminde doğrusallık grafiği



Şekil 29. KKD yönteminde doğrusallık grafiği

4.3.3. Recovery ve Matriks Etkisi Çalışmaları

Her örnek tipi için iki seviye standardın matriks etkileri (%) ve geri eldeleri (%) hesaplandı (Tablo 14, 15, 16, 17).

Tablo 14. EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları

Seviyeler (μM)	Matriks etkisi (%)	Geri elde (%)
Düşük seviye (1 μM)	92.43	96.41
Yüksek seviye (20 μM)	87.26	91.07

Tablo 15. EDTA'lı tüplerden elde edilmiş hemolizat örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları

Seviyeler (μM)	Matriks etkisi (%)	Geri elde (%)
Düşük seviye (1 μM)	112.92	91.99
Yüksek seviye (20 μM)	113.12	93.94

Tablo 16. Heparinli tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları

Seviyeler (μM)	Matriks etkisi (%)	Geri elde (%)
Düşük seviye (1 μM)	105.57	100.23
Yüksek seviye (20 μM)	104.50	88.01

Tablo 17. Heparinli tüplerden elde edilmiş hemolizat örneğinin matriks etkisi (%) ve geri elde (%) sonuçları

Seviyeler (μM)	Matriks etkisi (%)	Geri elde (%)
Düşük seviye (1 μM)	115.04	100.80
Yüksek seviye (20 μM)	108.89	90.03

Sadece EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin düşük ve yüksek seviyede sırasıyla %7.57 ve %12.74 oranında iyonlaşmayı baskıladığı görüldü. Diğer matriks ortamlarının iyonlaşmayı baskılayıcı bir etkisi gözlemlenmedi.

EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD ve hemolizat örneğinde yapılan geri elde çalışmalarında düşük seviye için sırasıyla %96.41, %91.99; yüksek seviye için %91.07 ve %93.44 geri elde sağlandı.

Heparinli tüplerden elde edilmiş KKD ve hemolizat örneğinde yapılan geri elde çalışmalarında ise düşük seviye için yaklaşık %100; yüksek seviye için %88.01 ve %90.03 geri elde sağlandı.

4.3.4. Tekrarlanabilirlik ve Stabilit 

4.3.4.1. KKD  rneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilit   alışmaları

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için %100, %25 ve %5’lik KKD  rnekleri 7 kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması ( M), standart sapması ve %CV değeri Tablo 18’de verilmiştir.

Tablo 18. KKD yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik  alışması

KKD �rnekleri	Ortalama [¹³ C ₆]-UDP-Gal (�M)	Standart sapma	%CV
%100	33.58	1.21	3.62
%25	4.54	0.42	9.31
%5	0.46	0.08	18.94

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için %100 ve %25’lik KKD  rnekleri ardışık 5 gün boyunca günde 3’er kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması ( M), standart sapması ve %CV değeri Tablo 19’da verilmiştir.

Tablo 19. KKD yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

	%100’l�k KKD �rneği	%25’lik KKD �rneği
1.Gün ortalama analit miktarı (�M)	33.58	4.46
2.Gün ortalama analit miktarı (�M)	31.26	5.42
3.Gün ortalama analit miktarı (�M)	34.59	4.86
4.Gün ortalama analit miktarı (�M)	31.60	6.01
5.Gün ortalama analit miktarı (�M)	31.98	5.56
5 günün ortalaması (�M)	32.60	5.26
Standart sapma	1.42	0.60
%CV	4.35	8.77

Stabilite çalışması için farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen KKD örnekleri 0., 3., 10. ve 31. günlerde analiz edildi. 31 günün sonunda ölçülen analit miktarının (μM) ilk ölçüme göre %'lik değişimi Tablo 20'de verilmiştir.

Tablo 20. KKD yöntemi stabilite çalışması

	0.Gün (μM)	3.Gün (μM)	10.Gün (μM)	31.Gün (μM)	%'lik değişim
-20 °C	32.68	30.11	32.09	30.63	-%0.93
+4 °C	32.68	29.34	30.48	29.92	-%0.91
Oda sıcaklığı	32.68	31.86	32.9	30.75	-%0.94

4.3.4.2. Hemolizat Örneklerinin Tekrarlanabilirlik ve Stabilite Çalışmaları

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması için %100, %25 ve %1'lik hemolizat örnekleri 7 kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması (μM), standart sapması ve %CV değeri Tablo 21'de verilmiştir.

Tablo 21. Hemolizat yöntemi gün içi tekrarlanabilirlik çalışması

Hemolizat örnekleri	Ortalama [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal (μM)	Standart sapma	%CV
%100	52.22	3.04	5.82
%25	7.21	0.25	3.51
%1	0.81	0.03	4.46

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması için %100, %25, %5 ve %1'lik hemolizat örnekleri ardışık 5 gün boyunca günde 3'er kez çalışıldı. Her seviye için ölçülen analit miktarının ortalaması (μM), standart sapması ve %CV değeri Tablo 22'de verilmiştir.

Tablo 22. Hemolizat yöntemi günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

	%100'lük hemolizat örneği	%25'lik hemolizat örneği	%5'lik hemolizat örneği	%1'lik hemolizat örneği
1.Gün ortalama analit miktarı (µM)	40.81	10.35	2.57	0.39
2.Gün ortalama analit miktarı (µM)	49.76	12.71	2.20	0.38
3.Gün ortalama analit miktarı (µM)	40.18	10.29	2.34	-
4.Gün ortalama analit miktarı (µM)	44.73	13.95	2.37	0.32
5.Gün ortalama analit miktarı (µM)	48.64	13.89	2.59	0.39
5 günün ortalaması (µM)	44.82	12.24	2.41	0.37
Standart sapma	4.38	1.82	0.16	0.03
%CV	9.76	14.86	6.79	8.71

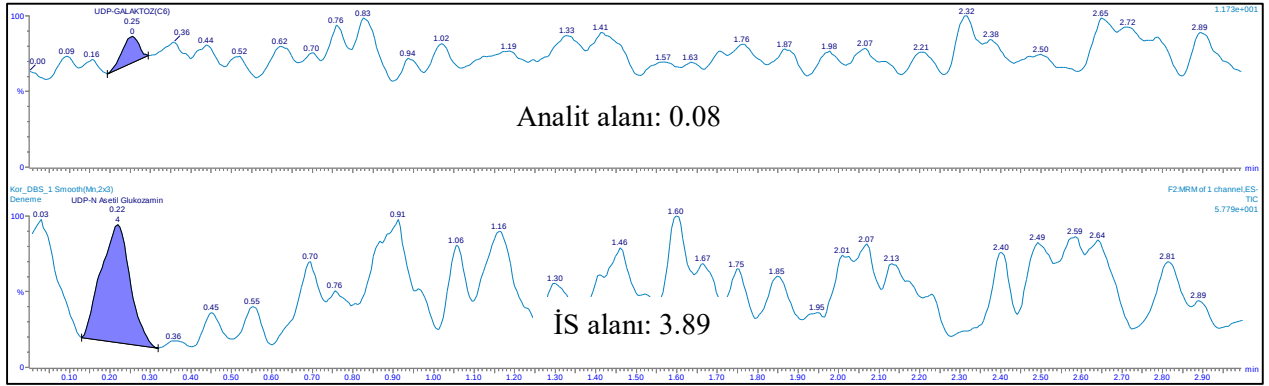
Stabilite çalışması için farklı sıcaklıklarda muhafaza edilen eritrosit peletleri 0., 3., 14. ve 35. günlerde analiz edildi. 35 günün sonunda ölçülen analit miktarının (µM) ilk ölçüme göre %'lik değişimi Tablo 23'te verilmiştir.

Tablo 23. Hemolizat yöntemi stabilite çalışması

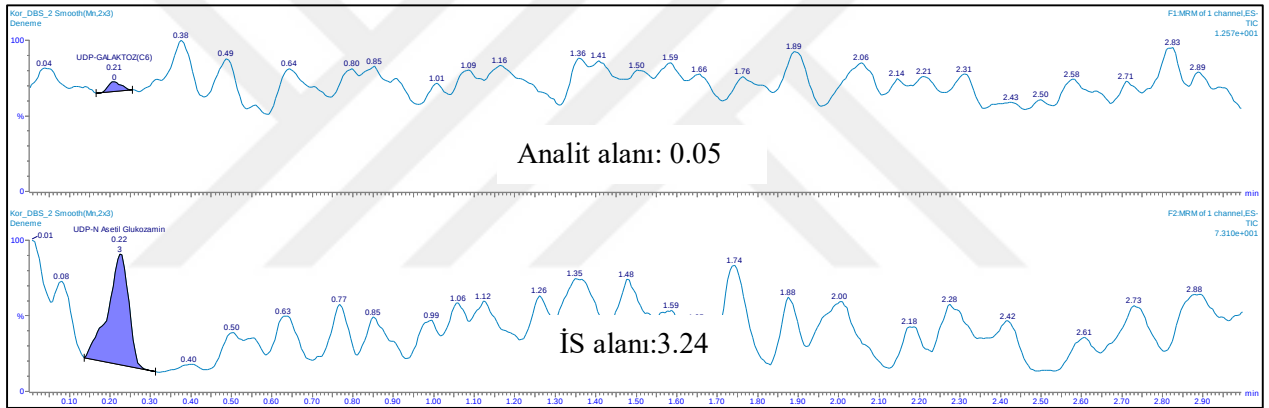
	0.Gün (µM)	3.Gün (µM)	14.Gün (µM)	35.Gün (µM)	%'lik değişim
-20 °C	52.65	52.24	52.12	52.12	-%0.01
+4 °C	52.65	45.82	41.34	28.06	-%46.7
Oda sıcaklığı	52.65	39.43	33.7	20.41	-%61.2

4.3.5. Seçicilik

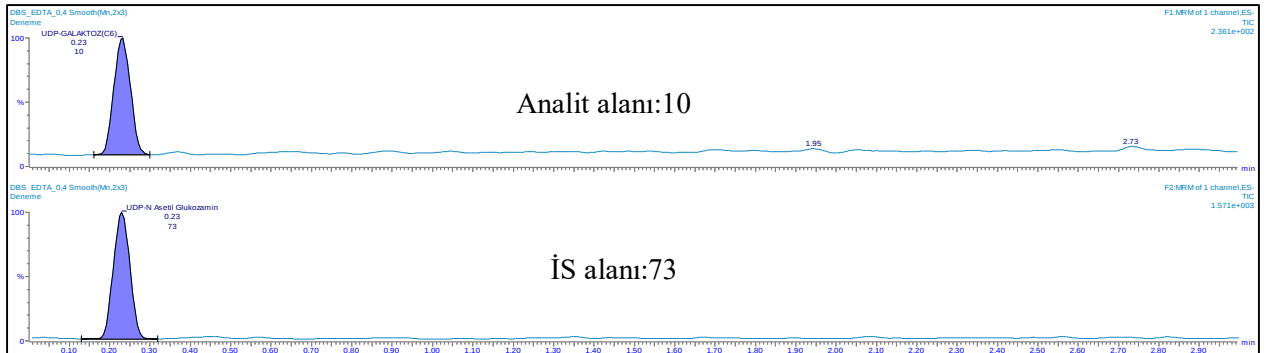
Şekil 30, 31, 32, 33'te matriks körlerine ve ölçüm aralığının alt sınırında kalibratörlere ait örnek kromatogramlar verilmiştir.



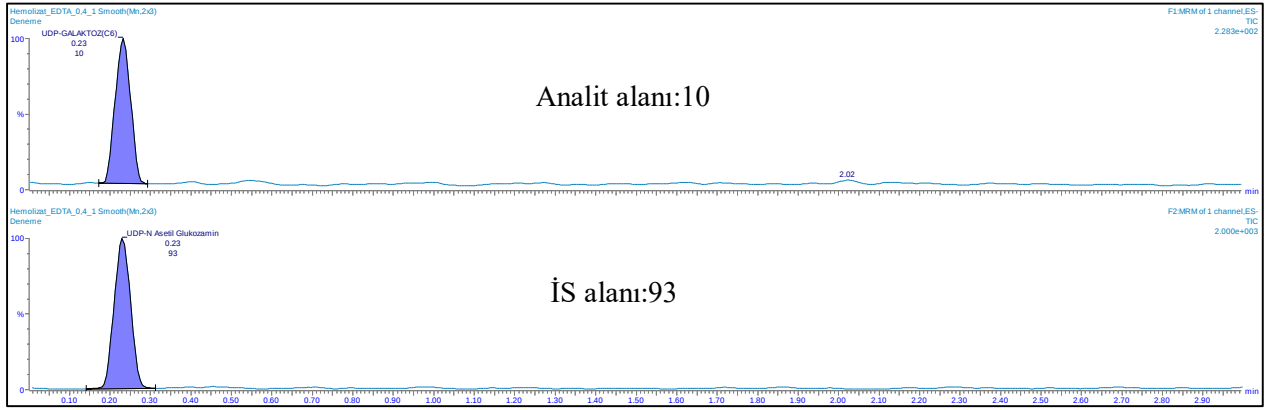
Şekil 30. KKD matrisi köründe $[^{13}\text{C}_6]$ -UDP-Gal ve İS pikleri



Şekil 31. Hemolizat matrisi köründe $[^{13}\text{C}_6]$ -UDP-Gal ve İS pikleri



Şekil 32. Ölçüm aralığının alt sınırında KKD kalibratörlerinde $[^{13}\text{C}_6]$ -UDP-Gal ve İS pikleri



Şekil 33. Ölçüm aralığının alt sınırında hemolizat kalibratöründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri

Girişim etkisi (%) iki örnek tipinde de analit için %20'den, İS için %5'ten küçük bulundu (Tablo 24 ve 25).

Tablo 24. KKD yönteminde girişim etkisi (%)

	KKD matrisi körü	LLMI KKD kalibratörü	Girişim etkisi (%)
[$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal alan ortamları	0.08	8.2	0.97
İS alan ortamları	2.64	82	3.21

Tablo 25. Hemolizat yönteminde girişim etkisi (%)

	Hemolizat matrisi körü	LLMI hemolizat kalibratörü	Girişim etkisi (%)
[$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal alan ortamları	0.09	10	0.90
İS alan ortamları	3.28	93	3.52

4.3.6. Taşıma (Carryover) etkisi

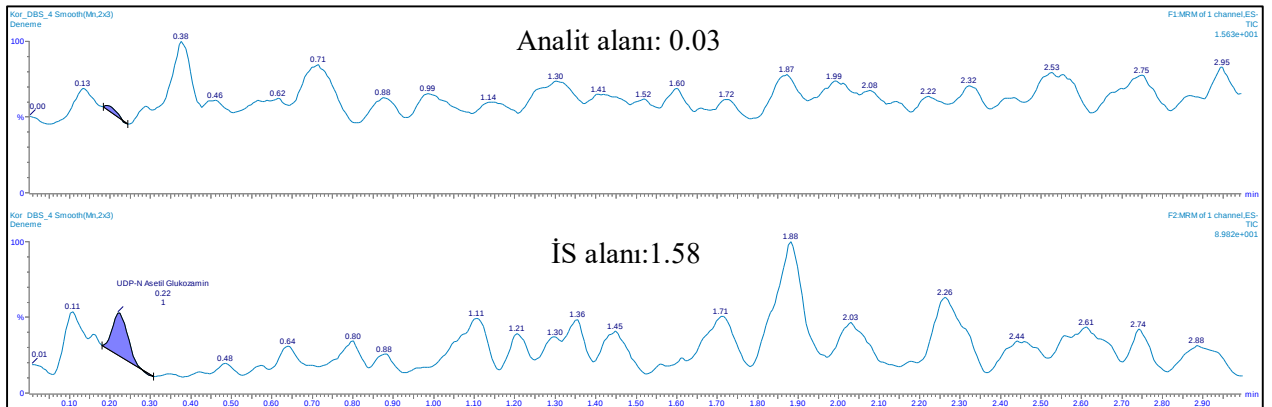
Ölçüm aralığının üst ölçüm sınırında (ULMI) hazırlanmış kalibratörlerin hemen ardından yapılan KKD/hemolizat örneği matrisi körleri analizinde elde edilen analit ve İS piklerinin alanlarının ortalamaları, ölçüm aralığının alt sınırında (LLMI:0.4 µM) hazırlanmış kalibratörde elde edilen analit ve İS pik alanlarının %1'inden ve %3'ünden küçük bulundu (Tablo 26 ve 27).

Tablo 26. KKD yönteminde taşıma etkisi çalışması

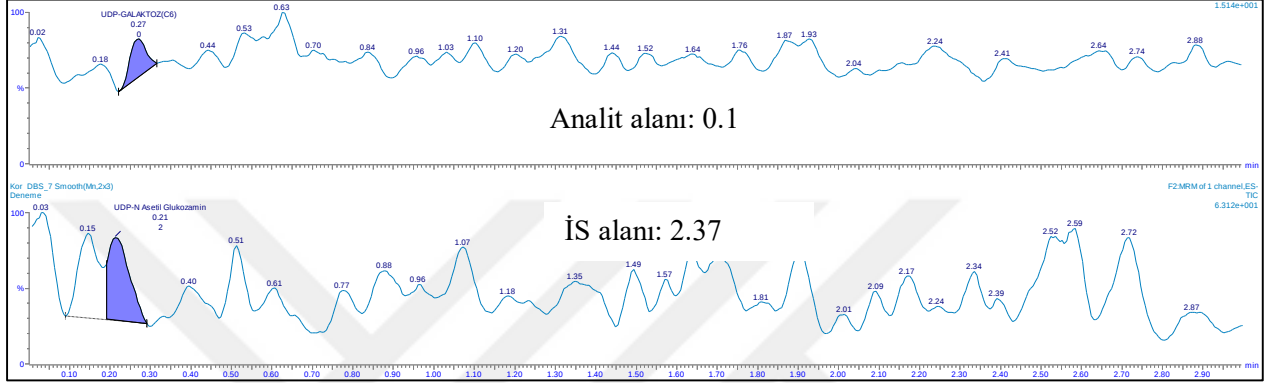
	ULMI'den sonra KKD matrisi körü	LLMI KKD kalibratörü
¹³ C ₆]-UDP-Gal alan ortalamaları	0.05	8.2
İS alan ortalamaları	1.85	82

Tablo 27. Hemolizat yönteminde taşıma etkisi çalışması

	ULMI'den sonra hemolizat matrisi körü	LLMI hemolizat kalibratörü
¹³ C ₆]-UDP-Gal alan ortalamaları	0.07	10
İS alan ortalamaları	2.25	93



Şekil 34. Ölçüm aralığının üst sınırından sonra analiz edilen KKD matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri



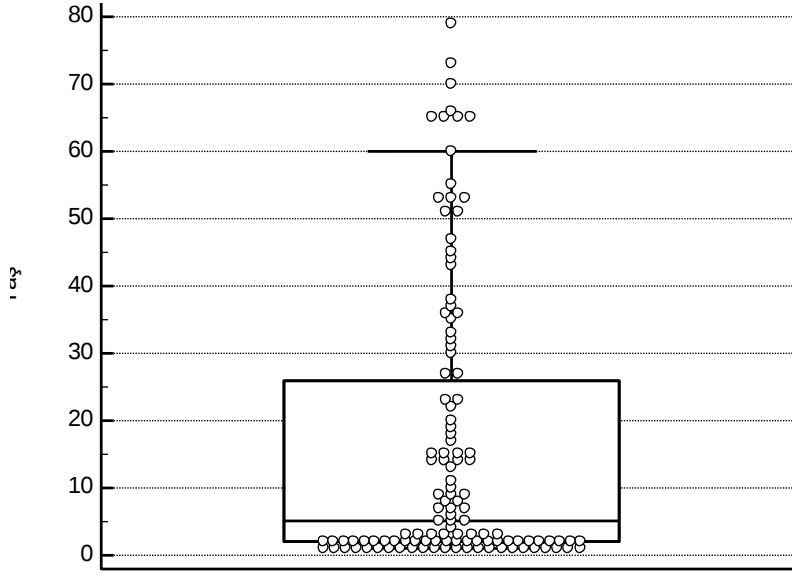
Şekil 35. Ölçüm aralığının üst sınırından sonra analiz edilen hemolizat matriks köründe [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve İS pikleri

4.3.7. Referans Aralık Çalışması

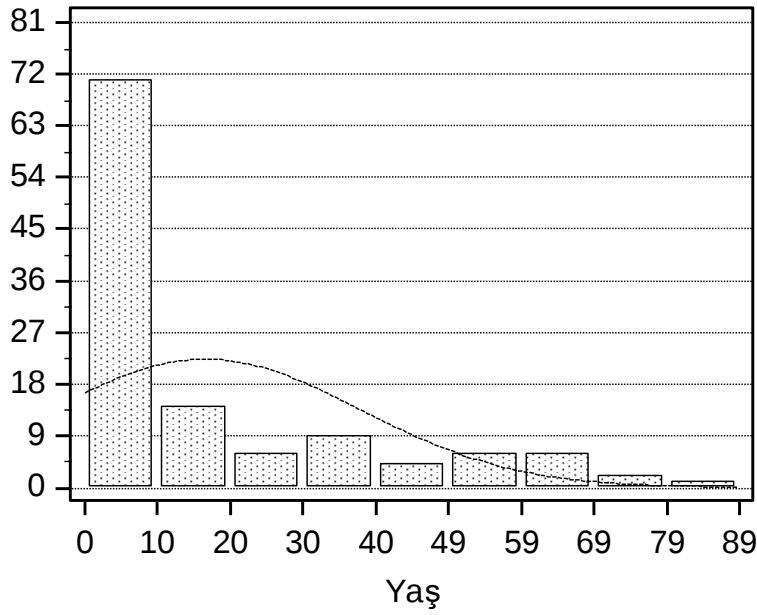
Referans bireylerin yaş ve cinsiyet özellikleri

Sağlıklı 119 bireyden oluşan çalışma grubunun yaş dağılımı ile ilgili histogram ve kutu grafiği Şekil 36 ve 37’de gösterilmiştir. Buna göre sağlıklı bireylerin :

- Yaş dağılımları normal dağılıma uygun değildir.
- Yaş aralığı 1 ile 79 arasında değişmektedir.
- Yaşlarının aritmetik ortalaması 16.35’tir (12.52-20.16 %95 güven aralığında).
- Yaşlarının median değeri 5’tir (2-9 %95 güven aralığında).
- Yarısından fazlası 0-10 yaş arasındadır.
- 63’ü erkek 56’sı kadındır.



Şekil 36. Referans bireylerin yaş dağılımı kutu grafiği

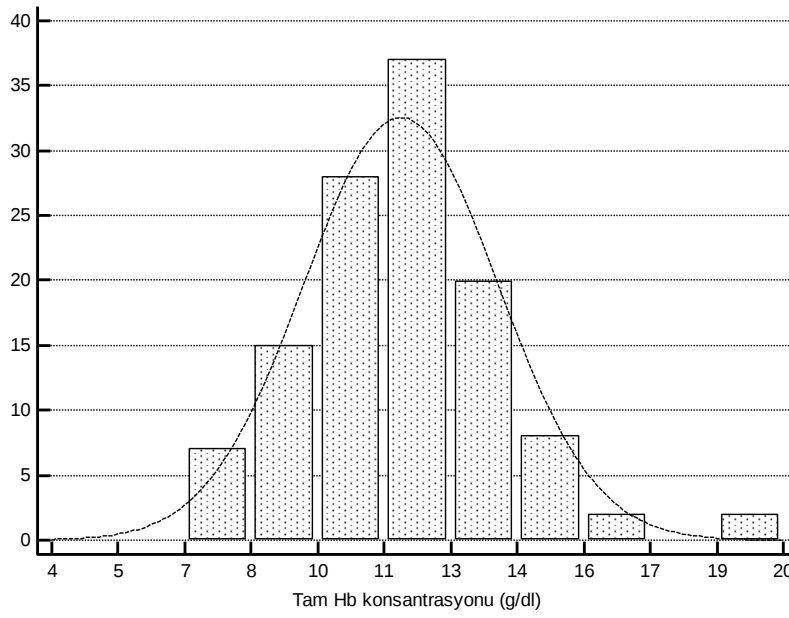


Şekil 37. Referans bireylerin yaş dağılımı histogramı

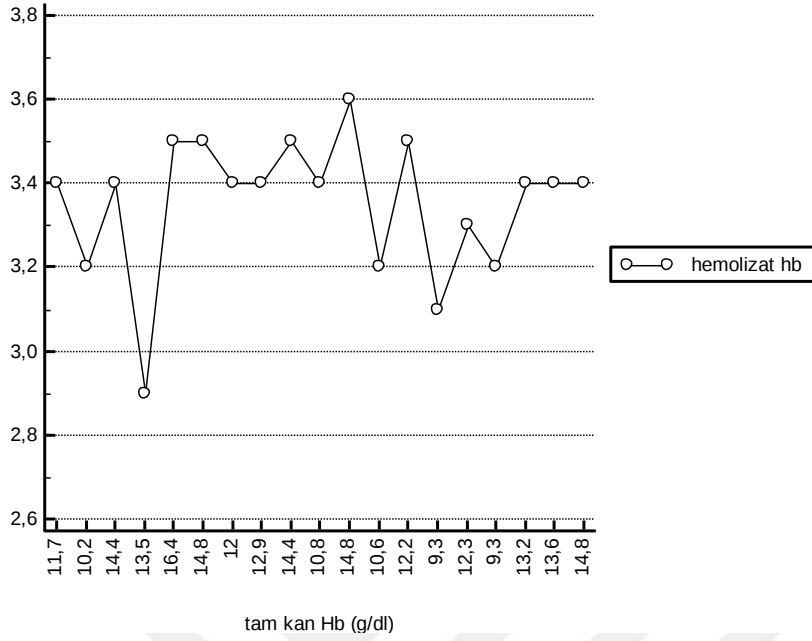
Bireylerin tam kan ve hemolizat Hb konsantrasyonları

Çalışma grubunun tam kan ve hemolizat Hb ölçümleri ile ilgili histogram Şekil 38 ve 39'da gösterilmiştir. Buna göre sağlıklı bireylerin:

- Tam kan Hb konsantrasyonları 7 ile 18.9 g/dL arasında değişmektedir.
- Tam kan Hb konsantrasyonlarının aritmetik ortalaması 11.3 g/dL'dir (11.25-12.02 %95 güven aralığında).
- Tam kan Hb konsantrasyonlarının median değeri 11.7 g/dL'dir (11.2-12.06 %95 güven aralığında).
- Tam kan Hb konsantrasyonları normal dağılım göstermektedir.
- Hemolizat Hb miktarları 2.9 ile 3.6 g/dL arasında değişmektedir.



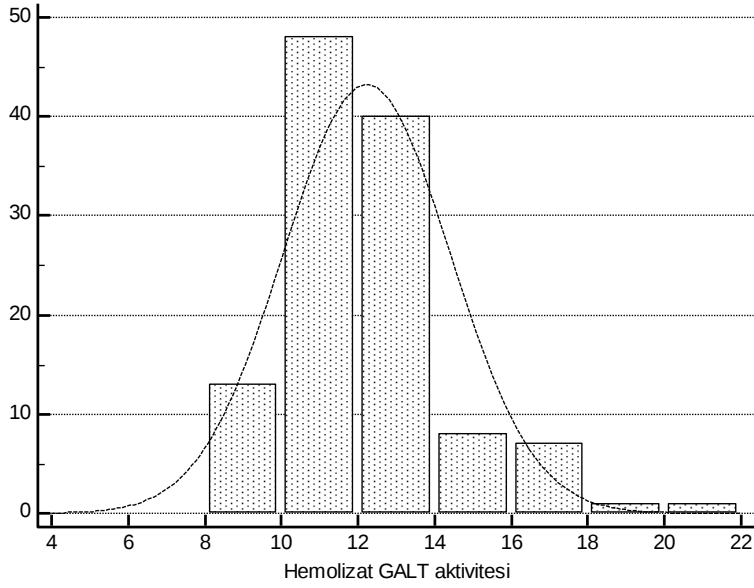
Şekil 38. Referans bireylerin tam kan Hb konsantrasyonlarını gösteren histogram



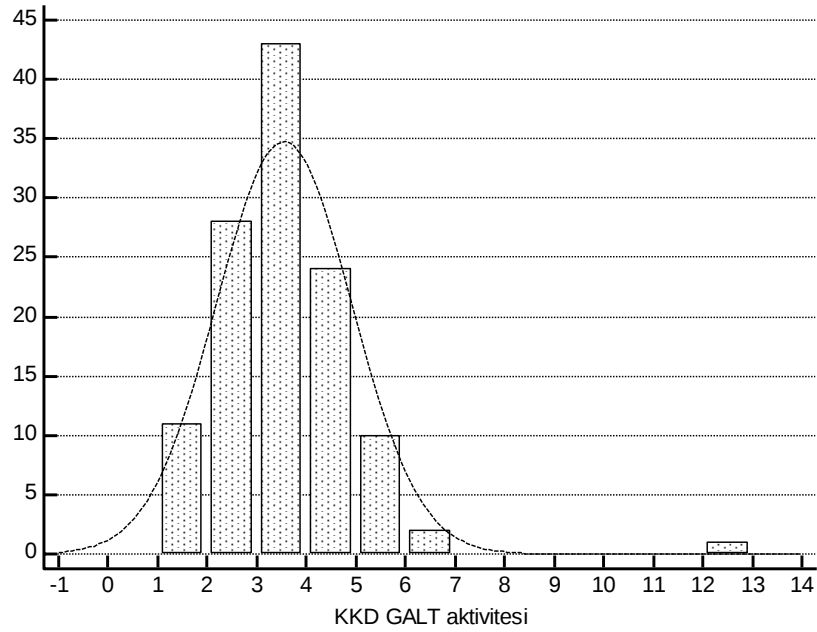
Şekil 39. İlk 20 bireyin tam kan ve hemolizat Hb konsantrasyonunu arasındaki ilişkiyi gösteren grafik

Bireylerin GALT aktivite ($\mu\text{mol/grHb/saat}$) ölçümleri

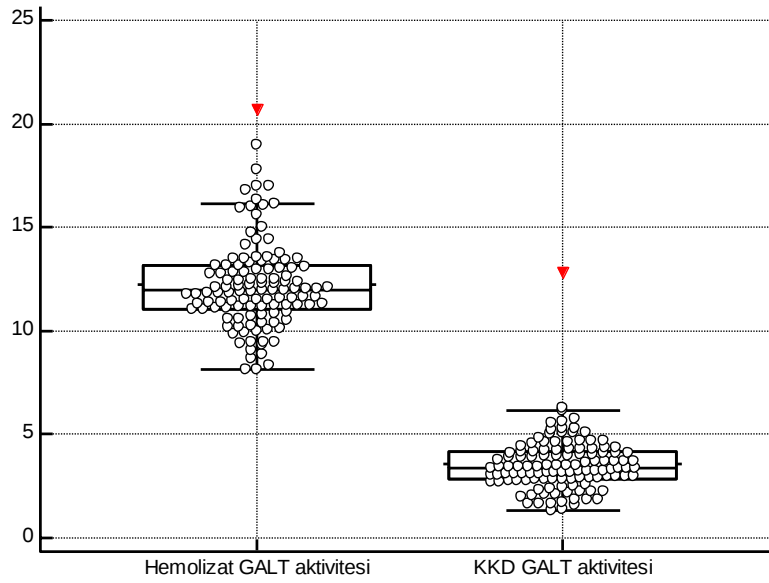
2'den 120'ye kadar olan bireylerin (uç değerler çıkarılmadan) hemolizat ve KKD örneklerinde GALT aktivitelerini gösteren histogramlar ve kutu grafiği Şekil 40, 41 ve 42'de verilmiştir. Histogramlar görsel açıdan normal dağılıma uygun gibi gözükse de test sonucu normal dağılıma uygun değildi.



Şekil 40. Referans bireylerin GALT aktivitelerini (hemolizat) gösteren histogram



Şekil 41. Referans bireylerin GALT aktivitelerini (KKD) gösteren histogram



Şekil 42. Referans bireylerde hemolizate ve KKD örneklerinin GALT aktivitelerini gösteren kutu grafiği (ortalamalar, %95 güven aralığı)

Hemolizate ve KKD yöntemi GALT aktivitesi için referans aralıklarının belirlenmesi

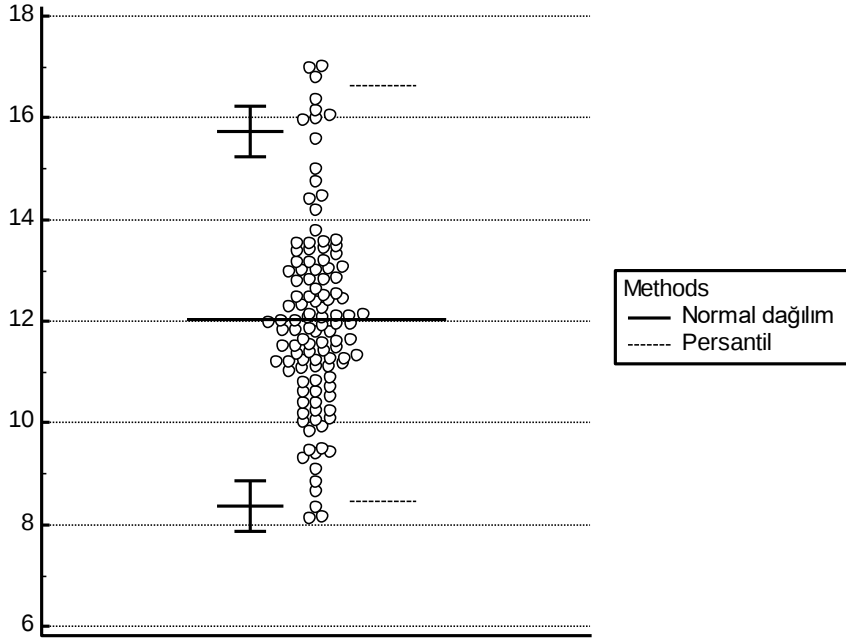
Normal dağılıma uygunluk göstermeyen uç değerler tukey metodu ile belirlendikten sonra hemolizate örneklerinden sağdan 3 bireye ait GALT aktivite ölçümü (20.68, 18.95, 17.78), KKD örneklerinden ise sağdan 1 bireye ait GALT aktivite ölçümü (12.86) dışlandı. Uç değerler çıkarıldıktan sonra parametrik yöntem kullanılarak referans aralıklar oluşturuldu. Hemolizate GALT aktivitesi ve KKD GALT aktivitesinin alt ve üst sınır referans aralıkları ortalama $\pm$ 1.96* SD olarak belirlendi.

Hemolizate GALT yöntemi referans aralığının alt sınırı 8.35 (%90 güven aralığı 7.85 ve 8.8), üst sınırı 15.73 (%90 güven aralığı 15.23 ve 16.23) olarak; KKD GALT yöntemi referans aralığı referans aralığının altı sınırı 1.38 (%90 güven aralığı 1.10 ve 1.66), üst sınırı 5.55 (%90 güven aralığı 5.27 ve 5.83) μ mol/grHb/saat olarak belirlendi (Tablo 28 ve 29, Şekil 43 ve 44).

Tablo 28. GALT aktivitesi referans aralığı (hemolizate)

Değerlendirilen	GALT aktivitesi μ mol/grHb/saat (hemolizate)
Örneklem boyutu	115
En düşük değer	8.1259
En yüksek değer	17.0094
Aritmetik ortalama	12.0449
Median	11.9284

Standart sapma	1.8828
Skewness (çarpıklık) katsayısı	0.5204 (P=0.0237)
Kurtosis (basıklık) katsayısı	0.5066 (P=0.2433)
Kolmogorov-Smirnov test	D=0.0784 (P=0.0793)
Normal dağılıma göre referans aralığı (%95, çift taraflı)	
Alt seviye	8.3547
90% Güven aralığı	7.8530 - 8.8563
Üst seviye	15.7351
90% Güven aralığı	15.2334 - 16.2367

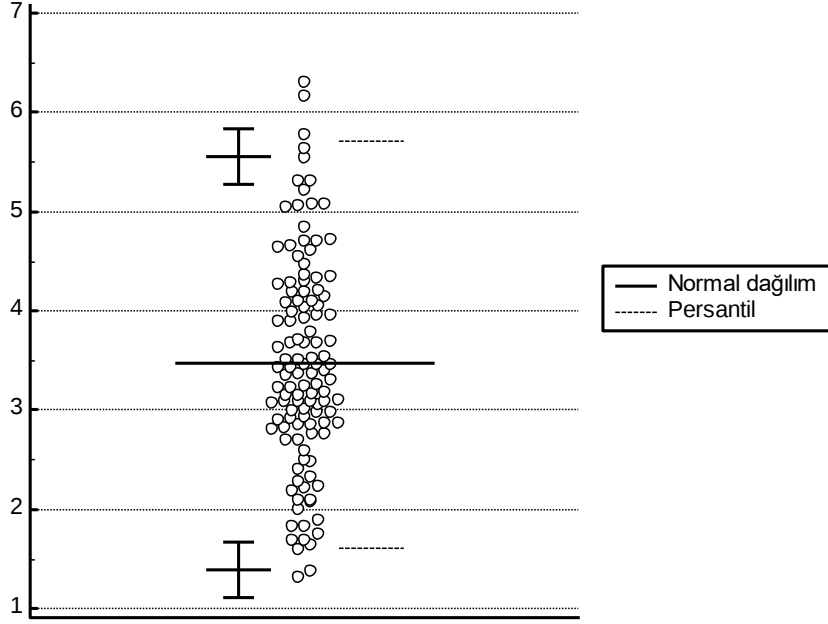


Şekil 43. GALT aktivitesi referans aralıklarını gösteren kutu grafiği (hemolizat)

Tablo 29. GALT aktivitesi referans aralığı (KKD)

Değerlendirilen	GALT aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ (KKD)
Örneklem boyutu	118
En düşük değer	1.3071
En yüksek değer	6.3022
Aritmetik ortalama	3.4694
Median	3.3820
Standart sapma	1.0651
Skewness (çarpıklık) katsayısı	0.2755 (P=0.2097)
Kurtosis (basıklık) katsayısı	-0.1705 (P=0.7959)

Kolmogorov-Smirnov test	D=0.0609 P>0.10
Normal dağılıma göre referans aralığı (%95, çift taraflı)	
Alt seviye	1.3820
90% Güven aralığı	1.1018 - 1.6621
Üst seviye	5.5569
90% Güven aralığı	5.2768 - 5.8370



Şekil 44. GALT aktivite referans aralıklarını gösteren kutu grafiği (KKD)

Yaş ve GALT aktiviteleri arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

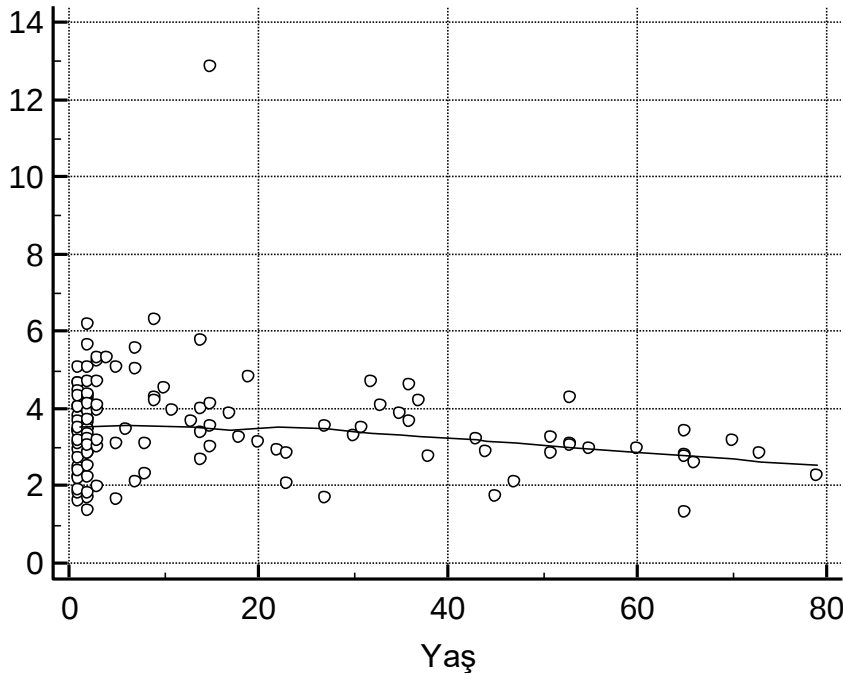
Yaş dağılımını normal dağılıma uygunluk göstermediği için bireylerin GALT aktiviteleri ve yaşları arasındaki korelasyonun gösterilmesinde spearman korelasyon testinden yararlanıldı (Tablo 30 ve 31; Şekil 45 ve 46). KKD örneklerinde, GALT aktivitesi ve yaş arasında anlamlı bir korelasyon yoktur ($p=0.27$). Hemolizat örneklerinde, GALT aktivitesi ve yaş arasında düşük derecede anlamlı negatif bir korelasyon vardır ($p=0.034$).

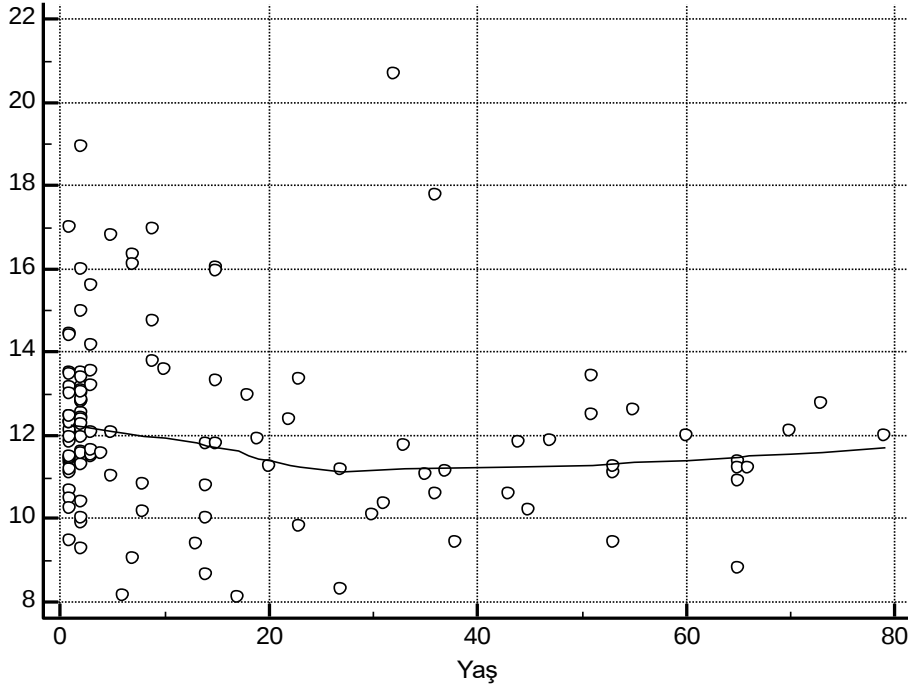
Tablo 30. GALT aktivitesi (KKD) ve yaş arasındaki korelasyon

Y değişkeni	GALT aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ (KKD)
X değişkeni	Yaş
Örneklem boyutu	119
Spearman'ın korelasyon katsayısı derecesi (ρ)	-0.102
P değeri	P=0.2717
ρ için 95% güven aralığı	-0.277 0.0799

Tablo 31. Hemolizat yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyon

Y değişkeni	GALT aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ (Hemolizat)
X değişkeni	Yaş
Örneklem boyutu	118
Spearman'ın korelasyon katsayısı derecesi (ρ)	-0.195
P değeri	P=0.0342
ρ için 95% güven aralığı	-0.363 -0.0149

**Şekil 45.** KKD yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı



Şekil 46. Hemolizat yönteminde bireylerin GALT aktivite sonuçları ve yaşları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı

Kadın ve erkeklerde GALT aktivitelerinin karşılaştırılması

Erkek ve kadınlar arasında enzim aktivitesi açısından anlamlı fark olup olmadığı bağımsız gruplar t test ile değerlendirildi. Bu teste göre hemolizat ve KKD yönteminde enzim aktivitesi açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir fark yoktur (Tablo 32 ve 33).

Tablo 32. Hemolizat yönteminde kadın ve erkeklerin GALT aktivitelerinin karşılaştırılması

	Hemolizat GALT akt.(Erkek) µmol/grHb/saat	Hemolizat GALT akt.(Kadın) µmol/grHb/saat
Örneklem boyutu	63	55
Aritmetik ortalama	12.5003	11.9104
Ortalama için 95% güven aralığı	11.9558 - 13.0448	11.3222 -12.4985
Varyans	4.6743	4.7331
Standart sapma	2.1620	2.1756
Ortalamanın standart hatası	0.2724	0.2934
Eşit varyanslar için F testi	P = 0.957	
Fark	-0.5899	

Standart hata	0.4001
Farkın 95% güven aralığı	-1.3824 0.2026
Test istatistik t	-1.474
Serbestlik derecesi (DF)	116
2-tailed olasılık	P = 0.1431

Tablo 33. KKD yönteminde kadın ve erkeklerin GALT aktivitelerinin karşılaştırılması

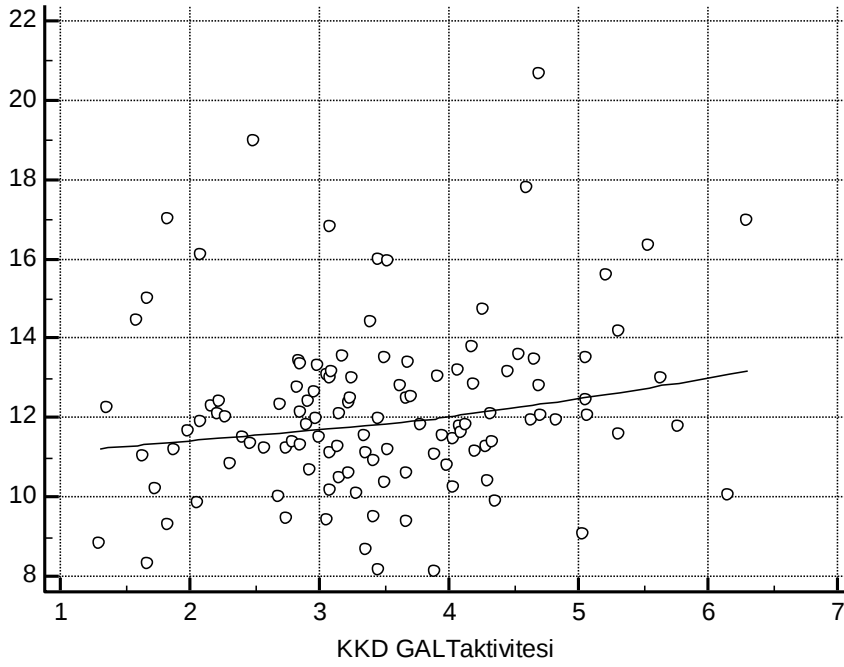
	KKD GALT akt.(Erkek) μmol/grHb/saat	KKD GALT akt.(Kadın) μmol/grHb/saat
Örneklem boyutu	63	55
Aritmetik ortalama	3.6241	3.2923
Ortalama için 95% güven aralığı	3.3668 - 3.8814	2.9962 - 3.5884
Varyans	1.0437	1.1996
Standart sapma	1.0216	1.0952
Ortalamanın standart hatası	0.1287	0.1477
Eşit varyanslar için F testi	P = 0.594	
Fark	-0.3318	
Standart hata	0.1950	
Farkın 95% güven aralığı	-0.7180 0.05436	
Test istatistik t	-1.702	
Serbestlik derecesi (DF)	116	
2-tailed olasılık	P = 0.0915	

Referans bireylerin hemolizat ve KKD yöntem sonuçları arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

Bireylere ait hemolizat ve KKD yöntem sonuçları varyans homojenliği göstermediği için Welch'in t-testi ile değerlendirildi. Ölçümler arasında anlamlı fark tespit edildi ($p < 0.0001$). Daha sonra pearson korelasyon analizi ile hemolizat ve KKD yöntemlerinin birbirleriyle olan korelasyonu incelendi ve serpilme diyagramı yapıldı (Şekil 47). İki yöntem arasında korelasyon saptanmadı ($p=0.0583$) (Tablo 34).

Tablo 34. Referans bireylerin hemolizat ve KKD yöntem sonuçları arasındaki korelasyonun değerlendirilmesi

Y değişkeni	Hemolizat GALT aktivitesi μmol/grHb/saat
X değişkeni	KKD GALT aktivitesi μmol/grHb/saat
Örneklem boyutu	117
Korelasyon katsayısı r	0.1756
P değeri	P=0.0583
r için 95% güven aralığı	-0.006153 0.3461



Şekil 47. Referans bireylerin hemolizat ve KKD yöntem sonuçları arasındaki korelasyonu gösteren serpilme diyagramı

4.4. Klasik Galaktozemi Hastalarının LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi

4.4.1. Hastaların Florometrik GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

Tablo 35’te, 1’den 18’e kadar numaralandırılmış klasik galaktozemi hastalarının KKD örneklerinin florometrik yöntem ile analiz sonuçları gösterilmiştir. Klasik galaktozemili hastaların tamamında GALT aktivitesi <3.5 U/gHb olarak belirlendi.

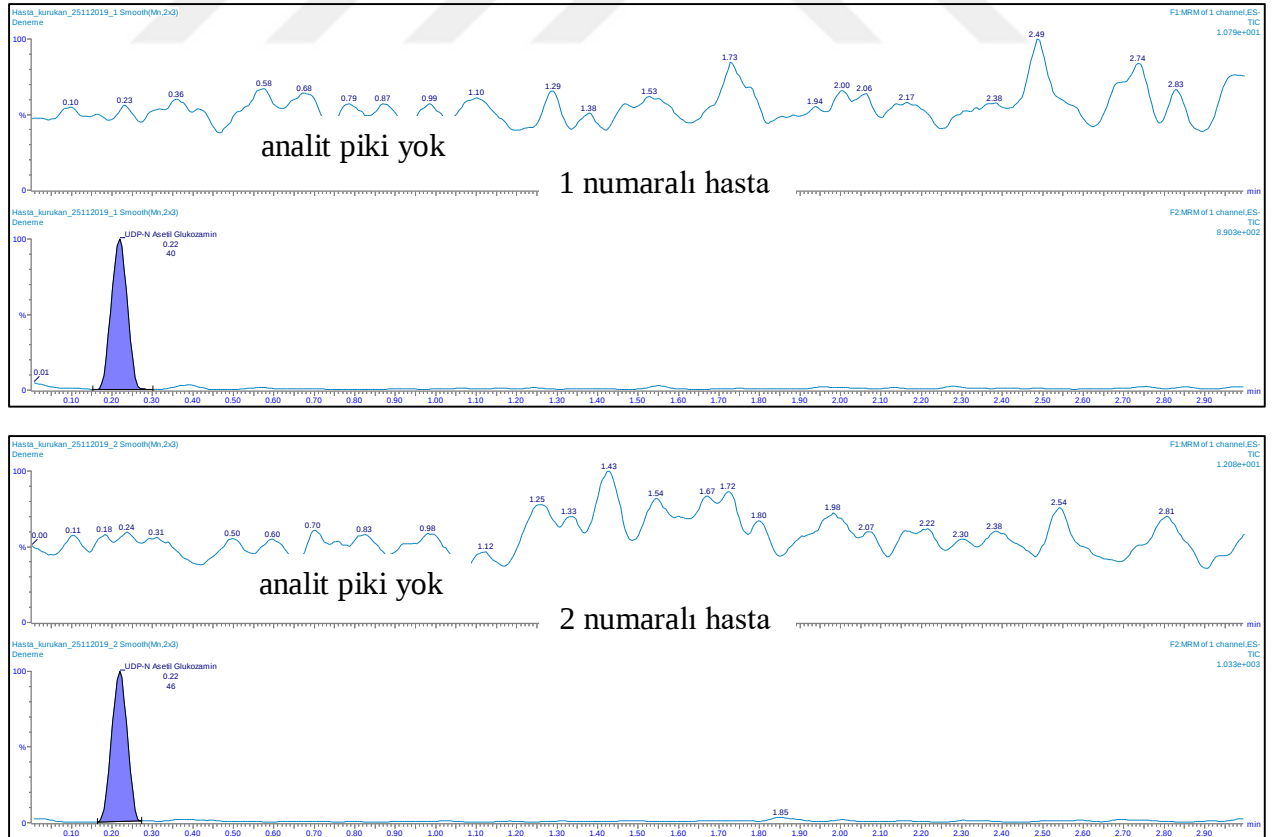
Tablo 35. Hastaların florometrik yöntem ile belirlenen GALT aktiviteleri

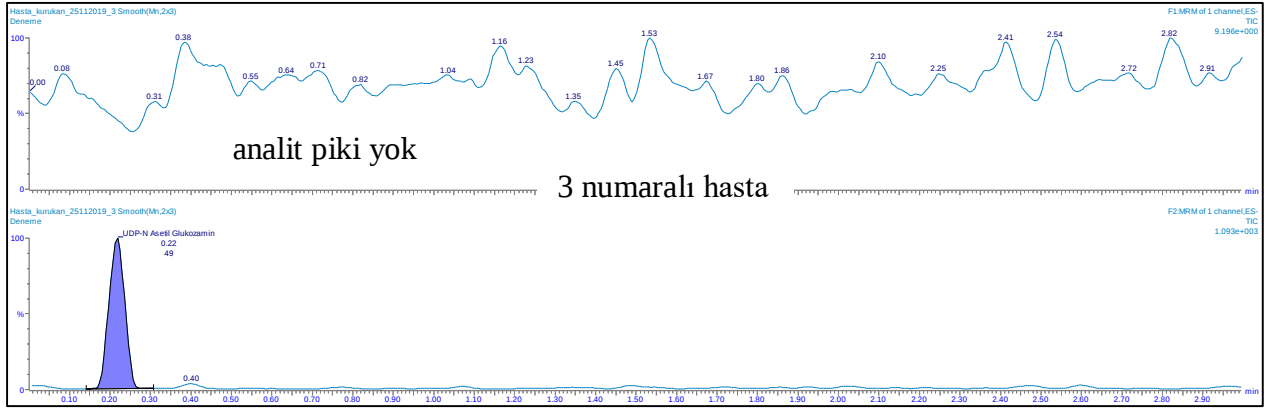
Hasta numarası	Florometrik GALT aktivitesi (U/gHb)
1	2.1
2	1.9
3	2.3
4	2.1
5	1.9
6	1.9
7	1.8
8	2

9	2.2
10	2
11	1.8
12	3.2
13	1.8
14	1.5
15	2
16	2
17	1.9
18	1.5

4.4.2. Hastaların LC-MS/MS GALT Aktivite Sonuçlarının Değerlendirilmesi

1'den 18'e kadar numaralandırılmış klasik galaktozemi hastalarının hemolizat ve KKD örnekleri, LC-MS/MS ile kantitatif olarak ölçüldü. Hastalarda KKD ve hemolizat yönteminde GALT aktivitesi saptanmadı. Şekil 48'de, KKD örneklerine ait 1, 2 ve 3 numaralı hastaların kromatogramı örnek amaçlı verilmiştir.

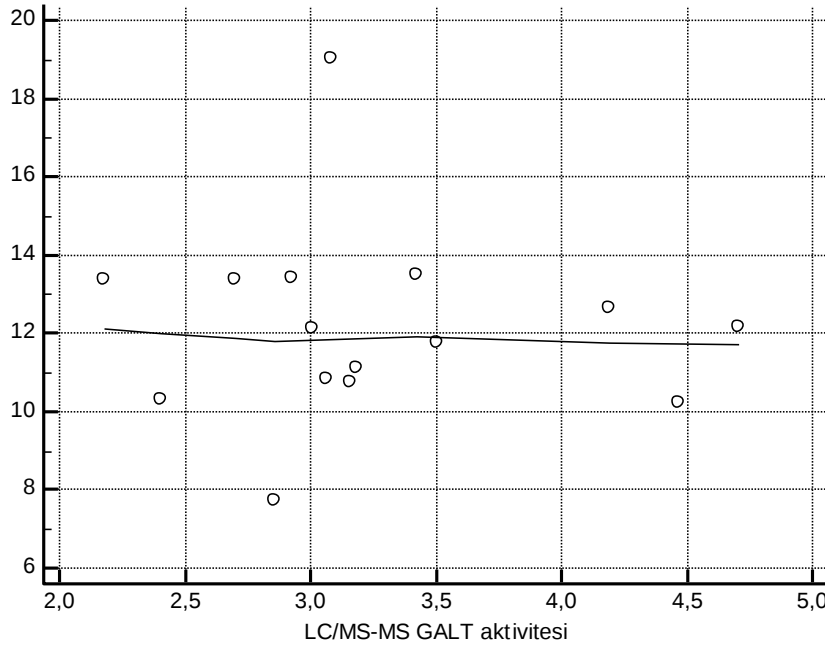




Şekil 48. KKD yöntemi ile analiz edilen 1, 2 ve 3 numaralı hastaların kromatogramı

4.5. Sağlıklı Bireylerin KKD Örneklerinin LC-MS/MS ve Florometrik Yöntem ile Analizi

44'den 58'e kadar numaralandırılmış sağlıklı bireylerin hemolizat ve KKD örneklerindeki enzim aktiviteleri, LC-MS/MS ve florometrik yöntem ile belirlendi. Sağlıklı bireylerin florometrik GALT aktivite sonuçları 3.5 U/gHb eşik değerinin çok üzerinde (aritmetik ortalama 12.16 U/gHb) tespit edildi. Eşik değere en yakın değer 7.74 U/gHb idi (Şekil 49).

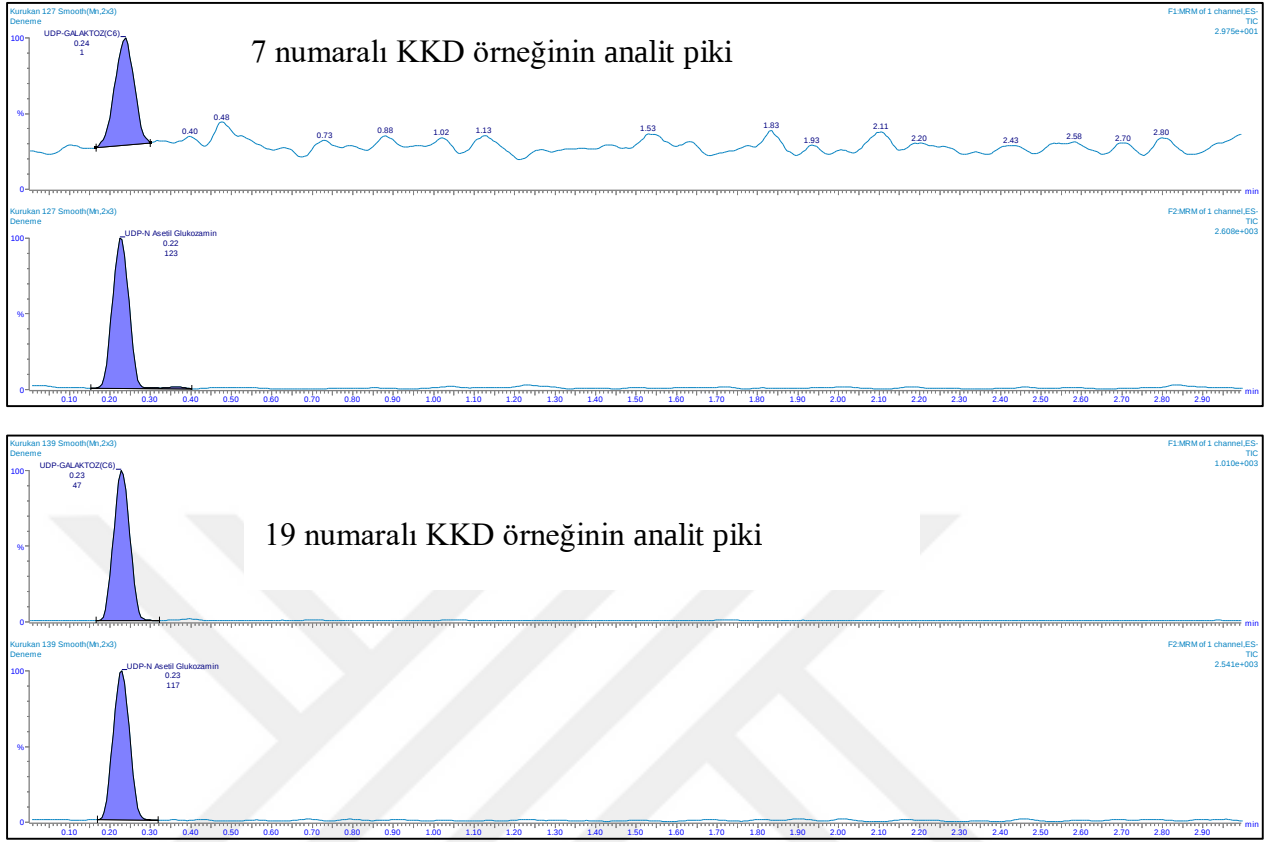


Şekil 49. 44'den 58'e kadar numaralandırılmış sağlıklı bireylerin LC-MS/MS ve florometrik yöntem ile analiz sonuçlarını içeren serpilme diyagramı

Bir sonraki çalışmada daha önce florometrik yöntemle çalışılmış ve sonucu eşik değere yakınlık gösteren 19 adet KKD örneği LC-MS/MS ile analiz edildi. Tablo 36'da florometrik ve LC-MS/MS yöntemleriyle analiz edilmiş 19 KKD örneğinin GALT aktivite sonuçları verilmiştir. 7 ve 19 numaralı örneklerin florometrik GALT aktivitesi 3.5 U/gHb'nin altında ölçüldü. Aynı örneklerin LC-MS/MS GALT aktiviteleri ise 0.04 ve 0.27 $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlendi (Şekil 50). Bu bireylerde rezidüel GALT aktiviteleri normalin %1.1 ve %7.7'si kadar tespit edildi. Rezidüel GALT aktiviteleri, enzim aktivitelerinin ortalama enzim aktivitesine oranlanıp 100 ile çarpılmasıyla hesaplandı (KKD yöntemi GALT referans aralığı ortalama değeri: 3.46 $\mu\text{mol/grHb/saat}$).

Tablo 36. 19 adet KKD örneğinin florometrik ve LC-MS/MS yöntemleriyle ölçülen GALT aktiviteleri

Taranan KKD örnekleri	Florometrik GALT aktivitesi (U/gHb)	LC-MS/MS GALT aktivitesi ($\mu\text{mol/grHb/saat}$)
1	6.3	4.03
2	4.19	1.97
3	4.72	2.13
4	8.80	3.88
5	6.05	3.14
6	5.92	2.33
7	1.77	0.04
8	6.78	1.38
9	9.29	3.52
10	7.17	4.42
11	7.72	2.92
12	8.89	6.34
13	8.44	3.26
14	10.54	4.37
15	5.13	3.19
16	6.61	2.45
17	7.37	2.10
18	7.63	2.36
19	2.65	0.27

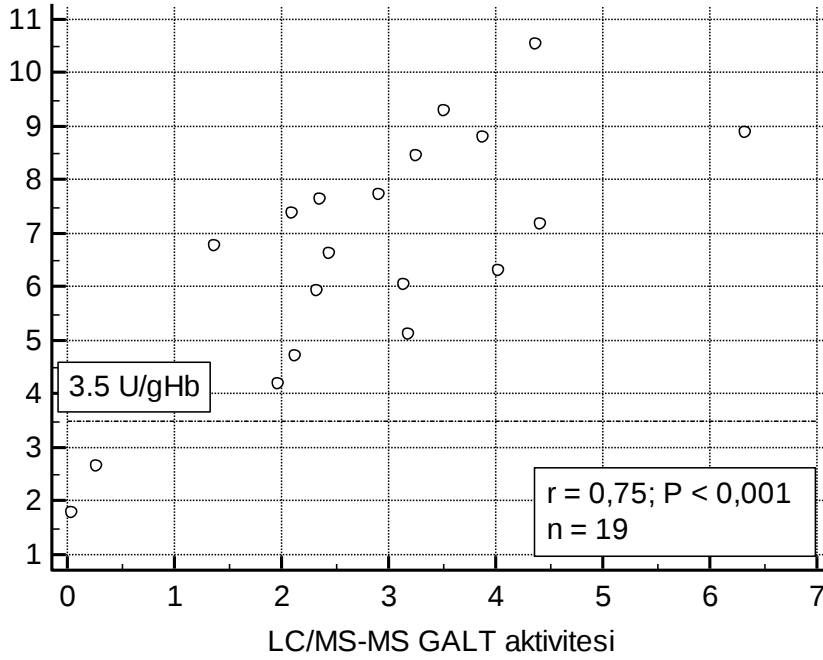


Şekil 50. 7 ve 19 numaralı KKD örneklerine ait kromatogramlar

1'den 19'a kadar numaralandırılmış KKD örneklerinin LC-MS/MS ile florometrik yöntem sonuçları arasındaki korelasyon için pearson korelasyon analizi uygulandı ve serpilme diyagramı oluşturuldu (Şekil 51). 44-58 numaralı sağlıklı bireylerin aksine eşik değere yakınlık gösteren florometrik yöntem sonuçlarını içeren örnekleme LC-MS/MS ile florometrik yöntem arasında yüksek derecede anlamlı korelasyon tespit edildi ($r=0.7519$) (Tablo 37).

Tablo 37. LC-MS/MS ve florometrik yöntem sonuçları (KKD) arasındaki korelasyon

Y değişkeni	Florometrik GALT aktivitesi
X değişkeni	LC-MS/MS GALT aktivitesi
Örnekleme boyutu	19
Korelasyon katsayısı r	0.7519
P değeri	P=0.0002
r için 95% güven aralığı	0.4521 0.8991



Şekil 51. KKD örneklerinin LC-MS/MS ve florometrik yöntem ile analiz sonuçlarını içeren serpilme diyagramı

5. TARTIŞMA

Klasik galaktozemi, GALT aktivitesinin tam ya da tama yakın eksikliği ile karakterize, otozomal resesif geçişli, kalıtsal bir karbonhidrat metabolizması bozukluğudur. Klasik galaktozemiye diğer Leloir yolu enzim eksiklerinde gelişen hastalık durumlarından ayıran en önemli özelliği, yenidoğan döneminde erken tanı konulamayan olgularda mortalitenin yüksek oranda görülmesidir. Eğer erken dönemde tanı konur ve laktoz diyetten çıkarılırsa akut dönemde görülen semptomlar hızla geriler ve mortalite önlenir. Geçmişten günümüze, GALT aktivitesinin belirlenmesi için birçok yöntem kullanılmıştır. Radyoaktif yöntemler, zaman alıcı, zahmetli ve tehlikeli olduğu için günümüzde tercih edilmemektedir. Florometrik yöntemler ise tanı ve yenidoğan taramalarında en sık tercih edilen yöntem olmasına rağmen analitik açıdan yetersiz kalmaktadır. Bu durum, son yıllarda GALT aktivite ölçümünde LC-MS/MS metodlarını ön plana çıkarmıştır (5). Bu bilgiler ışığında ve ihtiyaçlarımız doğrultusunda, GALT aktivitesinin KKD ve hemolizat örneklerinde yüksek güvenilirlik ve doğruluk ile tayin edilebileceği, LC-MS/MS temelli bir yöntem geliştirilmesi ve bu yöntemin validasyonu amaçlandı. Farklı antikoagülan içeren kan toplama tüplerinden elde edilen hemolizat ve KKD örneklerinde

belirlenen enzim aktivitelerinin karşılaştırılarak çalışmaya en uygun tüp belirlendi. Sağlıklı bireylerin ve klasik galaktozemi hastalarının enzim aktiviteleri, geliştirilen LC-MS/MS yöntemi ve metabolizma laboratuvarında rutin olarak kullanılan florometrik yöntem ile belirlenerek sonuçlar yorumlandı.

Hemolizat ve KKD yöntemleri için örnek hazırlama prosedürleri prensip olarak birbirine benzerdi. Bu kapsamda öncelikle, substratları, İS'ı ve çalışma örneğini içeren karışım, 30 dk inkübe edildi ve enzimatik reaksiyonun durdurulması için 5 dk kaynatıldı. Enzimatik reaksiyon sonucu kromatogramda elde edilen analit pik alanı, İS pik alanına oranlanarak kantitasyon sağlandı. Daha sonra çalışılan yöntemle göre enzim aktivitesi $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak hesaplandı. Enzim aktivitesinin hesaplanmasında karşılaşılan en büyük problem, reaksiyon ortamında bulunan Hb konsantrasyonunun hesaplanmasıydı. Hemolizat yönteminde, her çalışma örneğinin Hb konsantrasyonunun ayrı ayrı ölçülmesi yerine, ortalama hemolizat Hb konsantrasyonunun (3.3 g/dL) kullanılmasının daha uygulanabilir olduğunu düşünüldü. KKD yönteminde ise örneğin elde edildiği tam kanın Hb konsantrasyonu ile 3 mm'lik bir pançta bulunan Hb konsantrasyonu hesaplandı. Li ve arkadaşlarının geliştirdiği LC-MS/MS temelli hemolizat GALT aktivite yönteminde, çalışmamıza benzer şekilde ortalama hemolizat Hb konsantrasyonu (3.5 gr/dL) kullanılarak enzim aktivitesi hesaplanmıştır (75). Ko ve arkadaşları ise 3 mm'lik panç örneğinin deiyonize su ile ekstrakte edilmesinden sonra elde edilen elüatta ölçülen Hb konsantrasyonunu kullanarak KKD yönteminde enzim aktivitesini hesaplamıştır. (73). Örnek hazırlığında diğer çalışmalardan en önemli farklılık noktamız, İS'ın çalışma örneklerine substratlar ile birlikte inkübasyon öncesi ilave edilmiş olmasıdır. Genel olarak hemolizat yönteminin örnek hazırlığı, KKD yöntemine göre daha zahmetli ve yorucuydu. Çünkü tam kandan eritrosit peleti elde etme süreci çok fazla zaman alıcıydı. Üstelik eritrosit peletlerinin yoğunluğu yüksek olduğu için pipetleme işlemlerinde hata yapılma olasılığı daha yüksekti. Eppendorf tüpü, pipet ucu gibi malzemeler bu yöntemde daha fazla kullanıldı. Bu aşamada, KKD yönteminin daha uygulanabilir ve pratik olduğunu düşünmekteyiz.

Geliştirdiğimiz yöntemde, Xevo TQD cihazında ototune algoritması kullanılarak ESI–modda [$^{13}\text{C}_6$]-UDP-Gal ve UDP-N-asetilglukozaminin (İS) m/z oranlarına göre ana ve ürün iyonları tespit edildi. Optimum LC parametreleri, pik yoğunluğu ve sinyal/gürültü (S/N) oranı dikkate alınarak belirlendi. Acquity UPLC HSS T3 (1.8 μm , 2.1*50 mm) kolon kullanıldı. En iyi intensitenin sağlandığı mobil fazlar, akış programı %50-%50 izokratik olacak şekilde; mobil faz (A) 5 mmol/L amonyum format içeren ACN, mobil faz (B) 5 mmol/L amonyum format içeren

MS grade su olarak belirlendi. Analit ve İS için belirlenen alıkonma zamanı 0.24 ± 0.01 dk olmasına rağmen, kolonun tekrar şartlanması için enjeksiyonlar arası 3 dk'lık fark bırakıldı.

Preanalitik dönem ile ilişkili olarak heparinli ve EDTA'lı tüplerin enzim aktivitesine olan etkisinin incelenmesi için 10 farklı sağlıklı bireyden toplanmış hemolizat ve KKD örneklerinin GALT aktiviteleri belirlendi. Hemolizat örneklerinin analizinde, EDTA'lı ve heparinli tüpler arasında enzim aktivitesi açısından anlamlı fark tespit edilmezken; EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneklerinde analit miktarı, heparinli tüplerden elde edilene göre yaklaşık 1.6 kat yüksek tespit edildi. ACMG standartları ve rehberi GALT aktivite analizinde antikoagülan içeren tam kan örneklerinin kullanılabileceğini belirtmiştir fakat GALT aktivitesinin LC-MS/MS ile belirlenmesinde bugüne kadar sadece heparinli tüpten elde edilmiş hemolizat örnekleri kullanılmıştır (72,75).

Yöntem validasyon çalışmalarında kullanılan kalibratörlerin hazırlanmasında, sağlıklı bir bireyin hemolizat ya da KKD örneği kullanılarak çalışma örnekleriyle benzer matriks ortamı sağlandı. Örneklerdeki enzim aktivitesinin girişim etkisinin engellenmesi için normal çalışma prosedürlerinde kullanılan substratların yerine aynı hacimde su kullanıldı. Bu kapsamda, hiç enzim aktivitesi olmayan hasta örnekleri çalışmalarda kullanılabilirdi fakat toplanan hasta örnekleri sınırlı sayıda olduğu için tercih edilmedi. Bir diğer alternatif ise enzimin kaynatılarak denatüre edilmesi olabilirdi ancak iş yükünü artıracığı için bu alternatif de tercih edilmedi.

Geliştirdiğimiz hemolizat yönteminde doğrusal aralık $0.4-100 \mu\text{M}$ ($R^2=0.996$), KKD yönteminde ise $0.4-50 \mu\text{M}$ ($R^2=0.9987$) arasındaydı. Ölçüm aralığının alt sınırı her iki yöntem için $0.4 \mu\text{M}$; ölçüm aralığının üst sınırı hemolizat yönteminde $100 \mu\text{M}$, KKD yönteminde $50 \mu\text{M}$ olarak belirlendi. Bu değerler hemolizat yöntemi için normal GALT aktivitesinin %1.1 ile %280'i arasına, KKD yöntemi için ise normal GALT aktivitesinin %2.4 ile %310'u arasına denk gelmektedir. Başka bir ifadeyle hemolizat yönteminde, normal enzim aktivitesinin %1.1'inden; KKD yönteminde, %2.4'ünden küçük olduğu durumlar yüksek güvenirlik ve doğruluk ile tespit edilemedi. Çünkü LLMI değerinin altındaki konsantrasyonların %CV'leri 20'nin üzerindeydi. Li ve arkadaşları geliştirdikleri yöntemde, hemolizat GALT aktivitesinin doğrusal aralığını $0.045-50 \mu\text{M}$ ($R^2=0.9973$) arasında ve LLMI değerini normal enzim aktivitesinin %0.16'sı olarak belirlemişlerdir (75).

Matriks etkisi ve geri elde çalışmalarında düşük ($1 \mu\text{M}$) ve yüksek ($20 \mu\text{M}$) olmak üzere iki seviyede analit içeren örnekler kullanıldı. Sadece EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneğinin, düşük ve yüksek seviyede sırasıyla %7.57 ve %12.74 oranında iyonlaşmayı

baskıladığı tespit edildi. Genel anlamda matriks ortamının iyonlaşmayı baskılamadığı izlendi. EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD ve hemolizat örneğinde yapılan geri elde çalışmalarında, düşük seviye için sırasıyla %96.41, %91.99, yüksek seviye için %91.07 ve %93.44; heparinli tüplerden elde edilmiş KKD ve hemolizat örneğinde yapılan geri elde çalışmalarında ise düşük seviye için yaklaşık %100, yüksek seviye için %88.01 ve %90.03 geri elde sağlandı. Genel anlamda, geri elde oranlarımız %90'ın üzerindeydi diyebiliriz. Li ve arkadaşları beş farklı hemolizat örneğiyle yaptıkları geri elde çalışmasında düşük seviye için %98, yüksek seviye için %105 geri elde sağlamıştır (75). Ko ve arkadaşları ise hemolizat örneğinin iki seviyede yaklaşık %2 oranında iyonlaşmayı baskıladığını tespit etmiştir (72).

Tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapıldı. Bu çalışmalarda tam kan örneğinin SF ile seyreltilip Gutrie kartına damlatılmasıyla elde edilen KKD örnekleri ve tam kan örneğinden elde edilen eritrosit peletinin, eritrosit lizis tamponuyla seyreltilmesiyle hazırlanan hemolizat örnekleri kullanıldı. KKD örnekleri %100, %25, %5 ve %1 olarak hazırlanmış olmasına rağmen, %1'lik KKD örneğindeki GALT aktivitesinin değerlendirilmesinin sağlıklı olmadığı düşünüldüğü için çalışmadan çıkarıldı. Seyreltme işlemi örneğin hematokrit değerini çok düşürmesi, seyreltilmiş kan damlasının Gutrie kartında normalden daha geniş ve yüzeysel bir şekilde yayılmasına yol açtı. Seyreltilmiş kan damlası, kartın karşı yüzeyine ulaşmadığı için homojen olmayan KKD örnekleri elde edildi. %5 ve %25'lik KKD örneklerinde de aynı problemle karşılaşılrsa da tekrarlanabilirlik açısından değerlendirilmesinde bir sakınca görülmedi. Eğer tüm örneklerde hematokrit değerinin sabit tutularak sadece enzim miktarının seyreltilmesi başarabilseydi %25'lik KKD örneğinde oluşan analit miktarını %5'lik KKD örneğinde oluşan analit miktarının beş katı olarak bulunabilirdi. KKD gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25 ve %5'lik örneklerinin %CV'leri sırasıyla 3.62, 9.31, 18.94; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25'lik örneklerin ise 4.35 ve 8.77 olarak hesaplandı. Ko ve arkadaşları tekrarlanabilirlik çalışmalarında yenidoğan taramaları kapsamında toplanmış topuk kanı KKD örneklerini kullanmıştır. Bu çalışmalarda gün içi tekrarlanabilirlik (n=10) %CV'si 8.4, ardışık on günde yapılan günler arası tekrarlanabilirlik %CV'si ise 13.2 olarak hesaplanmıştır (73). Hemolizat örneklerinin gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25 ve %1'lik örneklerin %CV'leri sırasıyla 5.82, 3.51, 4.46; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25, %5 ve %1'lik örneklerin %CV'leri ise sırasıyla 9.76, 14.86, 6.79 ve 8.71 olarak hesaplandı. Ko ve arkadaşlarının hemolizat örneği (%100) ile gerçekleştirdikleri çalışmada, gün içi tekrarlanabilirlik (n=10) %CV'sini 9.9, ardışık beş günde

yapılan günler arası tekrarlanabilirlik %CV'sini ise 16.8 olarak hesaplanmıştır (72). Li ve arkadaşları, hemolizat tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25, %5 ve %0.5'lik hemolizat örneklerini kullanmış ve %CV değerlerini bizim çalışmamıza benzer bir şekilde bulmuştur (75).

Hemolizat ve KKD örneklerinin farklı saklama koşullarında (-20 °C, +4 °C ve oda sıcaklığı) stabilitesi, bir ay içinde yapılan dört farklı analiz ile değerlendirildi. Bir ay sonunda ölçülen analit miktarının ilk ölçüme göre %'lik değişimi hesaplandı. KKD örnekleri farklı saklama koşullarında oldukça stabildi. Oda sıcaklığında ve +4 °C'de muhafaza edilen eritrosit peletlerinin enzim aktiviteleri ilk ölçüme göre sırasıyla %61.2 ve %46.7 oranında azaldı. -20 °C'de saklanan eritrosit peleti ise 35 günün sonunda stabildi. ACMG kılavuzu +4 °C'de veya oda sıcaklığında saklanan tam kan örneğinin 2 hafta stabil olduğunu belirtmiş olsa da, ısıya duyarlı bazı patolojik alellerin etkilenmemesi açısından, tam kan örneklerinden derhal eritrosit peleti elde edilerek -20 °C'de ya da daha düşük bir sıcaklıkta saklanması gerektiğini önermiştir. Ayrıca KKD örneklerinin 2 haftaya kadar soğukta stabil olduğunu, daha yüksek sıcaklıkta ve nemli ortamda enzim aktivitesinin azaldığını vurgulamıştır (5). Adam ve arkadaşları, 32 gün 37 °C'de (düşük nem oranında) saklanan KKD örneğinin GALT aktivitesinin %60'dan fazla azaldığını belirtmiştir. Aynı çalışmada -20 °C'de nem kontrolü olmayan derin dondurucuda 6 ay saklanan örneğin enzim aktivitesinde azalma olmamıştır (95). Freer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada GALT aktivitesinin yaz aylarında, kış aylarına göre %20'den daha fazla azaldığı tespit edilmiştir (96). Stabilité çalışmasında oda sıcaklığı saklama koşullarındaki KKD örnekleri, ağzı kapalı, ışık almayan bir zarf içinde saklandı. Ekim ayında İzmir'de nem oranı ortalaması %67 olmasına rağmen KKD örneğinin enzim aktivitesi 31 günün sonunda sadece %0.94 oranında azaldı (97).

Seçicilik çalışması için analit ve İS içermeyen matriks körleri ve LLMI değerinde hazırlanan kalibratörler 6'şar kez analiz edildi. KKD ve hemolizat körlerinin hiçbirinde LLMI değerinde hazırlanmış kalibratörlerde elde edilen analit sinyalinin %20'sinden; İS sinyalinin %5'inden büyük, analit ya da İS sinyali elde edilmedi. Taşıma etkisi çalışması için ise ULMI değerinde hazırlanmış kalibratörlerin hemen ardından yapılan matriks körleri analizinde elde edilen analit sinyallerinin ortalaması, LLMI değerinde hazırlanmış kalibratörden elde edilen analit sinyalinin %1'inden; İS sinyallerinin ortalaması ise LLMI değerinde hazırlanmış kalibratörden elde edilen İS sinyalinin %3'ünden küçük bulundu. Bu değerler validasyon kriterlerine uygundur (92).

LC-MS/MS ile GALT aktivitesinin belirlenmesinde KKD ve hemolizat yöntemleri için iki farklı referans aralığı oluşturuldu. 63'ü erkek 56'sı kadın olmak üzere toplam 119 birey

çalışmaya dahil edildi. Hemolizat GALT aktivitesi referans aralığının alt sınırı 8.35 (%90 güven aralığı 7.85 ve 8.8), üst sınırı 15.73 (%90 güven aralığı 15.23 ve 16.23) olarak; KKD GALT aktivitesi referans aralığının alt sınırı 1.38 (%90 güven aralığı 1.10 ve 1.66), üst sınırı 5.55 (%90 güven aralığı 5.27 ve 5.83) $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlendi. Enzim aktivitesi analizlerinde cinsiyet açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadığından, erkek ve kadın için aynı referans aralık kullanıldı. KKD enzim aktivitesi ve yaş arasında anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi. Hemolizat enzim aktivitesi ve yaş arasında düşük derecede anlamlı negatif korelasyon tespit edilmesine rağmen, referans bireylerin yaş dağılımı homojen olmadığı için yaş aralıklarına göre referans aralık belirlenmedi. Bireylerin hemolizat ve KKD GALT aktiviteleri arasında bir ilişki ve korelasyon saptanmadı. Ortalama $\pm$ SD olarak ifade etmek gerekirse sırasıyla KKD ve hemolizat yönteminde GALT aktivitesi; 3.46 ± 1.06 , 12.04 ± 1.88 olarak belirlendi. İki yöntem arasındaki farkın 3 mm'lik KKD örneğinin yetersiz ekstraksiyonundan kaynaklandığı ve yöntemlerin kendi içindeki ölçümler ile değerlendirilmesinin daha doğru olduğu düşünüldü. Li ve arkadaşları rastgele toplanan 33 sağlıklı birey ile yaptıkları çalışmada, hemolizat GALT aktivitesinin ortalama değerini 23.3 ± 4.2 $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlemiştir (75). Bu değer bizim belirlediğimiz ortalama değer yaklaşık iki katıdır. ACMG ve CLSI kılavuzları her laboratuvarın kendi referans aralığını oluşturması gerektiğini, referans aralığın toplumdan topluma değişkenlik gösterebileceğini belirtmiştir (5). Bu farkın, toplumlar ya da referans bireylerler arasındaki farklılıklar ile ilişkili de olabileceği düşünüldü.

Yöntem validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra hasta ve sağlıklı bireyler hem geliştirilen LC-MS/MS yöntemiyle hem de metabolizma laboratuvarında kullanılan florometrik yöntemle analiz edildi. Enzim aktivite sonuçları yorumlandı ve iki yöntem arasındaki korelasyon araştırıldı. Bu analizlerde doğrudan metot karşılaştırılması yapılmamasının nedeniyse yöntem prensipleri ve enzim aktivite birimlerinin birbirinden farklı olmasıydı. Metabolizma laboratuvarında GALT aktivite ölçümlerinde PerkinElmer GALT kiti kullanıldı ve KKD örneklerinde enzim aktivitesi U/gHb olarak ifade edildi. Geliştirdiğimiz LC-MS/MS yönteminde ise enzim aktivitesi hem KKD hem de hemolizat örneklerinde $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlendi. LC-MS/MS ile analiz edilen klasik galaktozemi hastalarına ait KKD ve hemolizat örneklerinde herhangi bir enzim aktivitesine rastlanmadı. Bu hastaların florometrik yöntem ile belirlenen enzim aktiviteleri 1.5-3.2 U/gHb arasında değişmekte ve sonuçların tamamı kitta belirtilen eşik değer altındaydı (eşik değer: 3.5 U/gHb). Sağlıklı bireylerin analizlerinde ise klasik galaktozemi olmadığı bilinen iki bireyin enzim aktivite sonuçları dikkat çekiciydi. Florometrik

yöntem ile enzim aktiviteleri eşik değerin altında olan, genetik profilleri henüz belirlenmemiş bireylerin LC-MS/MS ile enzim aktiviteleri normalin %1.1'i ve %7.7'si olarak tespit edildi. Bu durum florometrik yöntemin düşük enzim aktivitelerinde yetersiz kaldığını ispatlar niteliktedir. Rezidüel enzim aktivitelerinin kantitatif olarak LC-MS/MS ile ölçülmesinin klinisyenlerin hastalığı değerlendirmeleri için daha yararlı olacağı fikrindeyiz. Korelasyon analizlerinde ise sadece düşük enzim aktivitelerinde iki yöntem sonuçlarının birbiriyle korelasyon gösterdiği belirlendi. Daha çok sayıda sağlıklı bireyin iki yöntem ile analiz edilmesiyle korelasyonun daha sağlıklı değerlendirilebileceği düşünüldü.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada hemolizat ve KKD örneklerinde, eritrosit içi GALT aktivitesinin, yüksek güvenilirlik ve doğruluk ile tayin edilebileceği LC-MS/MS temelli bir yöntem geliştirildi. Mevcut imkanlar ve kaynaklarla ulaştığımız performans verileri tatmin edicidir. Çalışmanın sonuçları kısaca şu şekilde özetlenebilir:

- LC koşullarının optimizasyonu sonucu akış gradienti izokratik (%50-50), 5mM amonyum format içeren ACN/su çözgenleri, en iyi intensitenin sağlandığı sistem olarak belirlendi. Analit ve İS için alıkonma zamanı 0.24 ± 0.01 dk, toplam ölçüm süresi 3 dk'ydı.
- Hemolizat yönteminde doğrusal aralık 0.4-100 μ M (normalin %1.1-%280'i), KKD yönteminde 0.4-50 μ M (normalin %2.4-%310'u) arasındaydı.
- İki farklı seviyede yapılan geri elde çalışmalarında yaklaşık %90'nın üzerinde geri elde sağlandı.
- EDTA'lı tüplerden elde edilmiş KKD örneği dışında, genel anlamda iyon baskılama tespit edilmedi.
- KKD gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25 ve %5'lik örneklerinin %CV'leri sırasıyla 3.62, 9.31, 18.94; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25'lik örneklerin ise 4.35 ve 8.77 olarak hesaplandı.
- Hemolizat gün içi tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25 ve %1'lik örneklerin %CV'si sırasıyla 5.82, 3.51, 4.46; günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında %100, %25, %5 ve %1'lik örneklerin ise 9.76, 14.86, 6.79 ve 8.71 olarak hesaplandı.
- KKD örnekleri farklı saklama koşullarında 31 gün boyunca oldukça stabildi. Oda sıcaklığında ve +4 °C'de muhafaza edilen eritrosit peletlerinin ilk ölçüme göre sırasıyla enzim aktiviteleri

%61.2 ve %46.7 oranında azaldı. -20 °C’de saklanan eritrosit peleti ise 35 günün sonunda stabildi.

- Seçicilik ve taşıma etkisi çalışmaları performans kriterlerine uygundu.
- Hemolizat yöntemi GALT aktivitesi referans aralığı 8.35-15.73, ortalama (SD) 12.04 (3.68) $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlendi.
- KKD yöntemi GALT aktivitesi referans aralığı 1.38-5.55, ortalama (SD) 3.46 (2.07) $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlendi.
- Hemolizat ve KKD yönteminde enzim aktivitesi açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.
- GALT aktivitesi ve yaş arasında genel anlamda anlamlı bir korelasyon tespit edilmedi.
- Hemolizat ve KKD yönteminde enzim aktivitesi açısından erkek ve kadınlar arasında anlamlı bir fark tespit edilmedi.
- LC-MS/MS ile analiz edilen klasik galaktozemi hastalarına ait örneklerinde herhangi bir enzim aktivitesine rastlanmadı.
- LC-MS/MS’in düşük enzim aktivitelerinde kantitatif sonuçlar verebildiği belirlendi.
- Çalışmalarda, GALT aktivitesinin tayini için en uygun örneğin K_2EDTA içeren tam kan örneği olduğu belirlendi.

Yaptığımız çalışmalar ışığında önerilerimiz ise şunlardır:

- UDP-N-asetilglukozamin (İS) yerine izotop işaretli bir İS kullanılması daha düşük enzim aktivitelerinin belirlenmesine olanak sağlayabilir.
- EDTA ve heparinin doğrudan kullanılmasıyla yapılacak olan interferans çalışmaları, bu antikoagülanların GALT aktivitesi üzerine olan etkilerinin anlaşılması adına faydalı olabilir.
- Tam kan örneğinden elde edilen eritrosit peletinin -20 °C’de muhafaza edilmesi enzim aktivitesinin korunması açısından daha doğru olacaktır.
- KKD yöntemi, hemolizat yöntemine göre daha pratik ve kullanışlıdır. Eğer KKD örnekleri topuk kanından doğrudan elde edilirse enzim aktivitesinin $\mu\text{mol/grHb/saat}$ olarak belirlenmesinde karşılaşılabilecek en büyük problem, Hb konsantrasyonunun ölçülmesi olacaktır. Bu sorun, Hb konsantrasyonunun, KKD örneğinin ekstrakte edilmesinden sonra ölçülmesiyle aşılabılır. Alternatif olarak enzim aktivitesinin, panç başına düşen analit miktarı (analit/panç) olarak belirlenmesi, yöntem pratikliğini artırabilir. Böylece Hb miktarının

ölçülmesine gerek kalmayacağını ve yenidoğan taramalarında kullanılması durumunda hız kazandıracağını düşünmekteyiz.

- Referans aralığı çalışmalarına daha fazla sayıda bireyin dahil edilmesi ve bu bireylere dışlama ve seçim kriterleri uygulanarak referans aralığın belirlenmesi daha sağlıklı bir değerlendirmenin önünü açacaktır.
- MSMS teknolojilerinin kullanılmasıyla yenidoğan taramalarında devrim yaşanmış ve taranan hastalıkların sayısı hızlı bir artış göstermiştir (81). HHS'nin önerdiği 34 hastalığı içine alan tarama panelinin 32'si KKD örnekleri ile yapılmakta ve bu örneklerin büyük bir çoğunluğunun analizinde MSMS kullanılmaktadır. Klasik galaktozemi, bu panel içinde yer alan metabolik hastalıklardan biridir. Günümüzde klasik galaktozemi taramalarında analitik olarak yetersiz olmasına rağmen GALT aktivitesinin belirlenmesinde florometrik yöntemler tercih edilmektedir (85). Eğer önümüzdeki yıllarda Ulusal Yenidoğan Tarama Programı genişletilirse klasik galaktozeminin geliştirdiğimiz yöntemle diğer metabolik hastalıklarla birlikte taranabilmesi mümkün olacaktır. Bu konuda maliyet etkinlik çalışmalarına ihtiyaç vardır. Geliştirdiğimiz yöntem tarama testi olarak kullanılsa dahi doğrulama testi olarak kullanılabilir. Yenidoğan taramalarında, florometrik yöntem ile belirlenmiş GALT aktivite ölçümlerinde düşüklük saptandığında, ilave örnek ihtiyacı olmaksızın aynı KKD örneğinden enzim aktivitesinin doğrulanması mümkün olacaktır. Bu sayede klasik galaktozemi tanısı erken ve hızlı bir şekilde sağlanabilir. Sonuç olarak bu çalışmada geliştirilen yöntemin yenidoğan taramalarının bir parçası olarak kullanılabileceği ve taramaların etkinliğini artıracakı düşünülmektedir.
- Geliştirdiğimiz yöntem hastanemizde klasik galaktozeminin ve GALT eksikliğinin ayırıcı tanısında güvenle kullanılabilecek ve tanı sürecini kolaylaştıracaktır.
- Diğer metabolik hastalıklarda olduğu gibi galaktozemi de genetik heterojenlik gösterir (59). Çok düşük konsantrasyonlardaki rezidüel GALT aktivitesinin geliştirilen yöntemle kantitatif olarak tespit edilmesi moleküler yöntemlerle birlikte bu hastalığın fenotipik özelliklerinin aydınlatılmasına katkı sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

1. Demirbas D, Huang X, Daesety V, Feenstra S, Haskovic M, Qi W, et al. The ability of an LC-MS/MS-based erythrocyte GALT enzyme assay to predict the phenotype in subjects with GALT deficiency. Mol Genet Metab [Internet]. 2019;126(4):368–76. Available from:

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2019.01.016>

2. Atik SU, Gürsoy S, Koçkar T, Önal H, Adal SE. Galaktozemi tanılı olgularımızın klinik ve genetic değerlendirilmesi. *Turk Pediatr Ars*. 2016;51(4):204–9.
3. Bosch AM. Classical galactosaemia revisited. *J Inherit Metab Dis*. 2006;29(4):516–25.
4. Coelho AI, Rubio-Gozalbo ME, Vicente JB, Rivera I. Sweet and sour: an update on classic galactosemia. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(3):325–42.
5. Pasquali M, Yu C, Coffee B. Laboratory diagnosis of galactosemia: A technical standard and guideline of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG). *Genet Med* [Internet]. 2018;20(1):3–11. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/gim.2017.172>
6. Yenidoğan Metabolik ve Endokrin Hastalık Tarama Programı (NTP) [Internet]. [cited 2020 Mar 2]. Available from: https://hsgm.saglik.gov.tr/tr/cocukergen-tp-liste/yenidogan_tarama_programi.html
7. Shin-Buehring YS, Schaub J. Pitfalls in the radioactive method of galactose-1-phosphate uridyltransferase activity measurement. *Clin Chim Acta*. 1980;106(2):231–4.
8. Fujimoto A, Okano Y, Miyagi T, Isshiki G, Oura T. Quantitative Beutler test for newborn mass screening of galactosernia using a fluorometric microplate reader. *Clin Chem*. 2000;46(6):806–10.
9. Ohlsson A, Guthenberg C, von Döbeln U. Galactosemia screening with low false-positive recall rate: The Swedish experience. In: *JIMD Reports*. Springer; 2012. p. 113–7.
10. GALT - Specimen: Galactose-1-Phosphate Uridyltransferase, Blood [Internet]. [cited 2020 Mar 2]. Available from: <https://www.mayocliniclabs.com/test-catalog/Specimen/8333>
11. Bhagavan N V., Ha CE. *Essentials of Medical Biochemistry*. Essentials of Medical Biochemistry. 2011.
12. Berry GT, Nissim I, Gibson JB, Mazur AT, Lin Z, Elsas LJ, et al. Quantitative assessment of whole body galactose metabolism in galactosemic patients. *Eur J Pediatr*. 1997;156(13).
13. Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA. The sphingolipid salvage pathway in ceramide metabolism and signaling. Vol. 20, *Cellular Signalling*. 2008. p. 1010–8.

14. Henderson H, Leisegang F, Brown R, Eley B. The clinical and molecular spectrum of galactosemia in patients from the Cape Town region of South Africa. *BMC Pediatr.* 2002 Sep 2;2.
15. Coelho AI, Berry GT, Rubio-Gozalbo ME. Galactose metabolism and health. Vol. 18, *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care*. Lippincott Williams and Wilkins; 2015. p. 422–7.
16. Kotb MA, Mansour L, Shamma RA. Screening for galactosemia: Is there a place for it? *Int J Gen Med.* 2019;12:193–205.
17. Augustin R. The protein family of glucose transport facilitators: It's not only about glucose after all. *IUBMB Life* [Internet]. 2010 [cited 2019 Dec 17];NA-NA. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/iub.315>
18. Leturque A, Brot-Laroche E, Le Gall M. GLUT2 mutations, translocation, and receptor function in diet sugar managing. Vol. 296, *American Journal of Physiology - Endocrinology and Metabolism*. 2009.
19. Goresky CA, Bach GC, Nadeau BE. On the uptake of materials by the intact liver. The transport and net removal of galactose. *J Clin Invest.* 1973;52(5):991–1009.
20. Berry GT. The role of polyols in the pathophysiology of hypergalactosemia. *Eur J Pediatr.* 1995 Feb;154(2 Supplement).
21. Berry GT, Hunter J V., Wang Z, Dreha S, Mazur A, Brooks DG, et al. In vivo evidence of brain galactitol accumulation in an infant with galactosemia and encephalopathy. *J Pediatr.* 2001;138(2):260–2.
22. Wehrli SL, Berry GT, Palmieri M, Mazur A, Elsas L, Segal S. Urinary galactonate in patients with galactosemia: Quantitation by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *Pediatr Res.* 1997;42(6):855–61.
23. Prasad R, Singh R, Thapa BR. molecular biology and molecular genetics of galactosemia. Vol. 37, *Molecular Biology and Molecular Genetics of Genetic Disorders*.
24. History of Galactosemia — Galactosemia Foundation [Internet]. [cited 2020 Jan 1]. Available from: <http://www.galactosemia.org/history-of-galactosemia>

25. Novelli G, Reichardt JKV. Molecular basis of disorders of human galactose metabolism: Past, present, and future. *Mol Genet Metab.* 2000;71(1–2):62–5.
26. Carney AE, Sanders RD, Garza KR, McGaha LA, Bean LJH, Coffee BW, et al. Origins, distribution and expression of the Duarte-2 (D2) allele of galactose-1-phosphate uridylyltransferase. *Hum Mol Genet.* 2009;18(9):1624–32.
27. Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia - GeneReviews® - NCBI Bookshelf [Internet]. [cited 2019 Dec 18]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1518/>
28. Fernhoff PM. Duarte galactosemia: How sweet is it? Vol. 56, *Clinical Chemistry*. 2010. p. 1045–6.
29. Janzen N, Illsinger S, Meyer U, Shin YS, Sander J, Lücke T, et al. Early Cataract Formation Due to Galactokinase Deficiency: Impact of Newborn Screening. *Arch Med Res.* 2011 Oct;42(7):608–12.
30. Berry GT. Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? Vol. 106, *Molecular Genetics and Metabolism*. 2012. p. 7–11.
31. Lak R, Yazdizadeh B, Davari M, Nouhi M, Kelishadi R. Newborn screening for galactosaemia. Vol. 2017, *Cochrane Database of Systematic Reviews*. John Wiley and Sons Ltd; 2017.
32. Karadag N, Zenciroglu A, Eminoglu FT, Dilli D, Karagol BS, Kundak A, et al. Literature review and outcome of classic galactosemia diagnosed in the neonatal period. *Clin Lab.* 2013;59(9–10):1139–46.
33. Berry GT. Classic Galactosemia and Clinical Variant Galactosemia [Internet]. GeneReviews®. 1993 [cited 2019 Dec 17]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20301691>
34. Morell-Garcia D, Bauça JM, Barceló A, Perez-Esteban G, Vila M. Usefulness of Benedict's test for the screening of galactosemia. *Clin Biochem.* 2014;47(9):857–9.
35. Berry GT, Elsas LJ. Introduction to the Maastricht workshop: lessons from the past and new directions in galactosemia. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2011 Apr 30 [cited 2019

- Dec 18];34(2):249–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-010-9232-1>
36. Waisbren SE, Potter NL, Gordon CM, Green RC, Greenstein P, Gubbels CS, et al. The adult galactosemic phenotype. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2012 Mar 21 [cited 2019 Dec 18];35(2):279–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-011-9372-y>
 37. Potter NL, Nievergelt Y, Shriberg LD. Motor and speech disorders in classic galactosemia. In: *JIMD Reports*. Springer; 2013. p. 31–41.
 38. Hughes J, Ryan S, Lambert D, Geoghegan O, Clark A, Rogers Y, et al. Outcomes of Siblings with Classical Galactosemia. *J Pediatr*. 2009 May;154(5):721–6.
 39. Bhat M, Haase C, Lee PJ. Social outcome in treated individuals with inherited metabolic disorders: UK study. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2005 Dec [cited 2019 Dec 19];28(6):825–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-005-0159-x>
 40. Coss KP, Doran PP, Owoeye C, Codd MB, Hamid N, Mayne PD, et al. Classical Galactosaemia in Ireland: incidence, complications and outcomes of treatment. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2013 Jan 3 [cited 2019 Dec 19];36(1):21–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-012-9507-9>
 41. Welling L, Bernstein LE, Berry GT, Burlina AB, Eyskens F, Gautschi M, et al. International clinical guideline for the management of classical galactosemia: diagnosis, treatment, and follow-up. *J Inherit Metab Dis*. 2017;40(2):171–6.
 42. Kaufman FR, Kogut MD, Donnell GN, Goebelsmann U, March C, Koch R, et al. Hypergonadotropic Hypogonadism in Female Patients with Galactosemia. *N Engl J Med*. 1981 Apr 23;304(17):994–8.
 43. Gubbels CS, Land JA, Evers JLH, Bierau J, Menheere PPCA, Robben SGF, et al. Primary ovarian insufficiency in classic galactosemia: role of FSH dysfunction and timing of the lesion. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2013 Jan 23 [cited 2019 Dec 19];36(1):29–34. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-012-9497-7>
 44. Levy HL, Driscoll SG, Porensky RS, Wender DF. Ovarian Failure in Galactosemia. Vol. 310, *New England Journal of Medicine*. 1984. p. 50.
 45. Gubbels CS, Kuppens SMI, Bakker JA, Konings CJAM, Wodzig KW, de Sain-van der

- Velden MGM, et al. Pregnancy in classic galactosemia despite undetectable anti-Müllerian hormone. *Fertil Steril*. 2009;91(4):1293.e13-1293.e16.
46. Rubio-Gozalbo ME, Panis B, Zimmermann LJI, Spaapen LJ, Menheere PPCA. The endocrine system in treated patients with classical galactosemia. *Mol Genet Metab*. 2006 Dec;89(4):316–22.
 47. van Erven B, Welling L, van Calcar SC, Doulgeraki A, Eyskens F, Gribben J, et al. Bone health in classic galactosemia: Systematic review and meta-analysis. In: *JIMD Reports*. Springer; 2017. p. 87–96.
 48. Gubbels CS, Welt CK, Dumoulin JCM, Robben SGF, Gordon CM, Dunselman GAJ, et al. The male reproductive system in classic galactosemia: Cryptorchidism and low semen volume. *J Inherit Metab Dis* [Internet]. 2013 Sep 11 [cited 2020 Mar 2];36(5):779–86. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1007/s10545-012-9539-1>
 49. Hennermann JB, Schadewaldt P, Vetter B, Shin YS, Mönch E, Klein J. Features and outcome of galactokinase deficiency in children diagnosed by newborn screening. *J Inherit Metab Dis*. 2011 Apr;34(2):399–407.
 50. Fridovich-Keil J, Bean L, He M, Schroer R. Epimerase Deficiency Galactosemia [Internet]. *GeneReviews®*. 1993 [cited 2019 Dec 19]. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21290786>
 51. Berry GT, Segal S, Gitzelmann R. Disorders of galactose metabolism. *Inborn Metab Dis Diagnosis Treat*. 2006;121–30.
 52. Freer DE, Ficicioglu C, Finegold D. Newborn screening for galactosemia: A review of 5 years of data and audit of a revised reporting approach. Vol. 56, *Clinical Chemistry*. 2010. p. 437–44.
 53. Van Calcar SC, Bernstein LE, Rohr FJ, Scaman CH, Yannicelli S, Berry GT. A re-evaluation of life-long severe galactose restriction for the nutrition management of classic galactosemia. Vol. 112, *Molecular Genetics and Metabolism*. Academic Press Inc.; 2014. p. 191–7.
 54. Tyfield L, Reichardt J, Fridovich-Keil J, Croke DT, Elsas LJ, Strobl W, et al. Classical galactosemia and mutations at the galactose-1-phosphate uridyl transferase (GALT) gene.

Hum Mutat. 1999;13(6):417–30.

55. Manga N, Jenkins T, Jackson H, Whittaker DA, Lane AB. The molecular basis of transferase galactosaemia in South African negroids. *J Inherit Metab Dis.* 1999;22(1):37–42.
56. Lai K, Elsas LJ. Structure-function analyses of a common mutation in blacks with transferase-deficiency galactosemia. *Mol Genet Metab.* 2001;74(1–2):264–72.
57. Elsas LJ, Lai K. The molecular biology of galactosemia. *Genet Med [Internet].* [cited 2020 Jan 4];1(1):40–8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11261429>
58. Berry GT, Singh RH, Mazur AT, Guerrero N, Kennedy MJ, Chen J, et al. Galactose breath testing distinguishes variant and severe galactose-1-phosphate uridylyltransferase genotypes. *Pediatr Res.* 2000;48(3):323–8.
59. Waggoner DD, Buist NRM, Donnell GN. Long-term prognosis in galactosaemia: Results of a survey of 350 cases. *J Inherit Metab Dis.* 1990;13(6):802–18.
60. Carlock G, Fischer ST, Lynch ME, Potter NL, Coles CD, Epstein MP, et al. Developmental outcomes in duarte galactosemia. *Pediatrics.* 2019;143(1).
61. Ficicioglu C, Thomas N, Yager C, Gallagher PR, Hussa C, Mattie A, et al. Duarte (DG) galactosemia: A pilot study of biochemical and neurodevelopmental assessment in children detected by newborn screening. *Mol Genet Metab.* 2008 Dec;95(4):206–12.
62. Beutler E, Mitchell M. New rapid method for the estimation of red cell galactose-1-phosphate uridylyl transferase activity. *J Lab Clin Med [Internet].* 1968 Sep [cited 2020 Jan 3];72(3):527–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5674083>
63. Hochella NJ, Hill JB. Fluorometric screening procedure for galactosemia utilizing the autoanalyzer. *Clin Chem.* 1969;15(10):949–60.
64. Pesce MA, Bodourian SH, Harris RC, Nicholson JF. Enzymatic micromethod for measuring galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity in human erythrocytes. *Clin Chem.* 1977;23(9).
65. Xu YK, Kaufman FR, Donnell GN, Ng WG. Radiochemical assay of minute quantities of galactose-1-phosphate uridylyltransferase activity in erythrocytes and leukocytes of

- galactosemia patients. Clin Chim Acta. 1995;235(2):125–36.
66. Yamaguchi A, Fukushi M, Mizushima Y, Shimizu Y, Takasugi N, Arashima SI, et al. Microassay for screening newborns for galactosemia with use of a fluorometric microplate reader. Clin Chem. 1989;35(9):1962–4.
 67. Beutler E. Galactosemia: screening and diagnosis. Clin Biochem. 1991;24(4):293–300.
 68. Frazier DM, Clemons EH, Kirkman HN. Minimizing false positive diagnoses in newborn screening for galactosemia. Biochem Med Metab Biol. 1992;48(3):199–211.
 69. Rhode H, Elei E, Taube I, Podskarbi T, Horn A. Newborn screening for galactosemia: Ultramicro assay for galactose-1-phosphate-uridylyltransferase activity. Clin Chim Acta. 1998;274(1):71–87.
 70. Stuhrman G, Perez Juanazo SJ, Crivelly K, Smith J, Andersson H, Morava E. False-positive newborn screen using the beutler spot assay for galactosemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. In: JIMD Reports [Internet]. Springer; 2017 [cited 2020 Mar 2]. p. 1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28078493>
 71. Greenberg CR, Dilling LA, Thompson R, Ford JD, Seargeant LE, Haworth JC. Newborn Screening for Galactosemia: A New Method Used in Manitoba. Pediatrics. 1989;84(2).
 72. Ko DH, Jun SH, Park HD, Sang HS, Park KU, Kim JQ, et al. Multiplex enzyme assay for galactosemia using ultraperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Clin Chem. 2010;56(5):764–71.
 73. Ko DH, Jun SH, Park KU, Song SH, Kim JQ, Song J. Newborn screening for galactosemia by a second-tier multiplex enzyme assay using UPLC-MS/MS in dried blood spots. J Inherit Metab Dis. 2011;34(2):409–14.
 74. Lindhout M, Rubio-Gozalbo ME, Bakker JA, Bierau J. Direct non-radioactive assay of galactose-1-phosphate: Uridylyltransferase activity using high performance liquid chromatography. Clin Chim Acta. 2010 Jul;411(13–14):980–3.
 75. Li Y, Ptolemy AS, Harmonay L, Kellogg M, Berry GT. Ultra fast and sensitive liquid chromatography tandem mass spectrometry based assay for galactose-1-phosphate uridylyltransferase and galactokinase deficiencies. Mol Genet Metab [Internet]. 2011 Jan

[cited 2020 Feb 23];102(1):33–40. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20863731>

76. Zakaria R, Allen KJ, Koplin JJ, Roche P, Greaves RF. Advantages and Challenges of Dried Blood Spot Analysis by Mass Spectrometry Across the Total Testing Process. *Ejifcc* [Internet]. 2016;27(4):288–317. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28149263><http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5282914>
77. Hall EM, Flores SR, De Jesús VR. Influence of hematocrit and total-spot volume on performance characteristics of dried blood spots for newborn screening. *Int J Neonatal Screen*. 2015;1(2):69–78.
78. Jager NGL, Rosing H, Schellens JHM, Beijnen JH. Procedures and practices for the validation of bioanalytical methods using dried blood spots: A review. *Bioanalysis*. 2014;6(18):2481–514.
79. Ji QC, Liu G, Darienzo CJ, Olah T V., Arnold ME. What is next for dried blood spots? *Bioanalysis*. 2012;4(16):2059–65.
80. Watson MS, Mann MY, Lloyd-Puryear MA, Rinaldo P, Howell RR, Cordero J, et al. Newborn screening: Toward a uniform screening panel and system - Executive summary. *Pediatrics*. 2006 May;117(5).
81. El-Hattab AW, Almannai M, Sutton VR. Newborn Screening: History, Current Status, and Future Directions. *Pediatr Clin North Am* [Internet]. 2018;65(2):389–405. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.pcl.2017.11.013>
82. GUTHRIE R, SUSI A. A SIMPLE PHENYLALANINE METHOD FOR DETECTING PHENYLKETONURIA IN LARGE POPULATIONS OF NEWBORN INFANTS. *Pediatrics*. 1963 Sep;32:338–43.
83. Bakar KER. Genişletilmiş Yenidoğan Taraması. 2012;1(4).
84. Schmidt JL, Castellanos-Brown K, Childress S, Bonhomme N, Oktay JS, Terry SF, et al. The impact of false-positive newborn screening results on families: A qualitative study. *Genet Med*. 2012 Jan;14(1):76–80.

85. Recommended Uniform Screening Panel | Official web site of the U.S. Health Resources & Services Administration [Internet]. [cited 2020 Mar 2]. Available from:
<https://www.hrsa.gov/advisory-committees/heritable-disorders/rusp/index.html>
86. Dan MK, Peker C. Türkiye ' de Neonatal Tarama Programı.
87. Pitt JJ. Principles and applications of liquid chromatography-mass spectrometry in clinical biochemistry. Clin Biochem Rev [Internet]. 2009;30(1):19–34. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19224008>
<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2643089>
88. Mittal RD. Tandem Mass Spectroscopy in Diagnosis and Clinical Research. Indian J Clin Biochem. 2015;30(2):121–3.
89. Berry GT. Galactosemia: When is it a newborn screening emergency? Mol Genet Metab [Internet]. 2012;106(1):7–11. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2012.03.007>
90. Hansen TW, Lie SO. Galactosemia--to screen or not to screen? Pediatrics [Internet]. 1988 Feb [cited 2019 Dec 19];81(2):327–8. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3340488>
91. Shah V, Friedman S, Moore AM, Platt BA, Feigenbaum AS. Selective screening for neonatal galactosemia: an alternative approach. Acta Paediatr [Internet]. 2001 Aug [cited 2019 Dec 19];90(8):948–9. Available from:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11529548>
92. Whitmire M, Ammerman J, Lisio P de. LC-MS/MS Bioanalysis Method Development, Validation, and Sample Analysis: Points to Consider When Conducting Nonclinical and Clinical Studies in Accordance with Current Regulatory Guidances. J Anal Bioanal Tech. 2011;01(01):1–10.
93. Spectrometry LC, Guideline A. C62-A. 2014.
94. Smith G. European medicines agency guideline on bioanalytical method validation: What more is there to say? Bioanalysis. 2012;4(8):865–8.
95. Adam BW, Flores SR, Hou Y, Allen TW, De Jesus VR. Galactose-1-phosphate

uridyltransferase dried blood spot quality control materials for newborn screening tests. Clin Biochem [Internet]. 2015 Apr 1 [cited 2020 Mar 2];48(6):437–42. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25528144>

96. Freer DE. Observations on Heat/Humidity Denaturation of Enzymes in Filter-Paper Blood Spots from Newborns. Clin Chem [Internet]. 2005 Jun 1 [cited 2020 Mar 2];51(6):1060–2. Available from: <https://academic.oup.com/clinchem/article/51/6/1060/5629920>
97. Meteoroloji Genel Müdürlüğü [Internet]. [cited 2020 Mar 2]. Available from: <https://www.mgm.gov.tr/veridegerlendirme/il-ve-ilceler-istatistik.aspx?m=IZMIR>

8. EKLER

EK 1. ETİK KURUL ONAY BELGESİ



EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. : Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel: 0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr, www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ASLI GİBİ
Sumru ERSOĞLU
EÜTF Klinik Araştırmaları
Etik Kurulu Sekreteri

ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU		Ve Optimizasyonu:				
KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 19-2.1/2				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayşe EROL Başkan	Tıbbi Farmakoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Mine HEKİMGİL Başkan Yardımcısı	Tıbbi Patoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Bülent SEMERCİ Üye	Üroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Üroloji AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Ayça Arzu SAYINER Üye	Mikrobiyoloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Mikrobiyoloji AD, Tıbbi Viroloji BD	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Şebnem PIRILDAR Üye	Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı Ve Hastalıkları AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Murat PEHLİVAN Üye	Biyofizik	E.Ü. Tıp Fakültesi Biyofizik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Mine DÜNDAR ÇÖMLEKOĞLU Üye	Protetik Diş Tedavisi	E.Ü. Diş Hek. Fakültesi Protetik Diş Tedavisi AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Nevin ORUÇ Üye	Gastroenteroloji	E.Ü. Tıp Fakültesi Gastroenteroloji BD	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Şafak TANER Üye	Halk Sağlığı	E.Ü. Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Çağatay ÜSTÜN Üye	Tıp Tarihi ve Etik	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıp Tarihi ve Etik AD.	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Prof. Dr. Sema KALKAN UÇAR Üye	Çocuk Metabolizma Hastalıkları	E.Ü. Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD.	K	☒ E ☐ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Prof. Dr. Aynur UYSAL TORAMAN Üye	Halk Sağlığı Hemşireliği	E.Ü. Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Av. Ufuk Bahar KURU Üye	Hukuk	B&B Hukuk Bürosu	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Uzm. Ecz. Ebru BEDİR Üye	Eczacı	E.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji AD.	K	☐ E ☒ H	☐ E ☒ H	TOPLANTIYA KATILMADI
Fatma BÜYÜKAKKUŞ Üye	Ziraat Mühendisi	Emekli	K	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	
Doç. Dr. Samim ÖZEN Danışman***	Pediyatrik Endokrinoloji	EÜ. Çocuk Hastalıkları ve Sağlığı AD, Çocuk Pediyatrik Endokrinoloji BD	E	☐ E ☒ H	☒ E ☐ H	

* Araştırma ile İlişki

** Toplantıda Bulunma

*** Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı olan Kurul Üyesi sorumlu araştırmacı olduğunda, Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik Madde 8/c bendi gereğince araştırma ile ilişkisi bulunmayan Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Uzmanı dosyanın değerlendirilmesi için Kurul tarafından atanmıştır.

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Ayşe EROL	İMZA	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / Nö.su:	Sayfa
			22	28.09.2011/05	2/2



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritrosit GALT Enzim Aktivitesi Tayinine İlişkin Biyoanalitik Yöntem Geliştirilmesi Ve Optimizasyonu		
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Ebru SEZER		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Tıbbi Biyokimya		
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı		
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI			
	DESTEKLEYİCİ	TÜBİTAK		
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ			
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1 ☐	FAZ 2 ☐	FAZ 3 ☐
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☒ ÇOK MERKEZLİ ☐ ULUSAL ☒ ULUSLARARASI ☐		
	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	06.02.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.02.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	HASTA/KONTROL ÇOCUKLARIN EBEVEYN/YASAL TEMSİLCİLERİ İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.02.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	12-18 YAŞ VE ÜZERİ GÖNÜLLÜLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.02.2019		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	6-12 YAŞ GÖNÜLLÜLER İÇİN BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	06.02.2019		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı	Açıklama	
SİGORTA Police Süresi / Police Nu		☐		
ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒ İmza Tarihi: 06.02.2019		
BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU		☐		
İLAN		☐		
YILLIK BİLDİRİM		☐		
SONUÇ RAPORU		☐		
GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ		☐		
DİĞER:		☒ "Eritrosit GALT Enzim Aktivitesinin Belirlenmesi İçin LC MS/MS Metodu Geliştirilmesi, Optimizasyonu ve Validasyonu." şekli ile çalışma adı değişikliği, Destekleyici Değişikliği (Tübitak Yerine Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu)		
06.02.2018 tarihli Etik Kurul Bilgilendirme Formu ile başvurusu yapılan bildirim.				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 19-2.1/2	Tarih: 19.02.2019		
	Kurulumuzdan 11.09.2018 tarih ve 18-9/24 numaralı karar ile onay alınan yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumundan izin alınması gerekmektedir.			
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU				
ÇALIŞMA ESASI	İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu, Tıbbi Cihaz Klinik Araştırmaları Yönetmeliği			
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:	Prof. Dr. Ayşe EROL			
ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritrosit GALT Enzim Aktivitesi Tayinine İlişkin Biyoanalitik Yöntem Geliştirilmesi			
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı:	İMZA	Araştırma-Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:
Prof. Dr. Ayşe EROL			22	30.04.2018/07
				Sayfa
				1/2