

İSTANBUL TEKNİK ÜNİVERSİTESİ ★ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**METABOLİK HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE KAPİLER
ELEKTROFOREZ**

**DOKTORA TEZİ
Mehmet Şerif CANSEVER
(509002205)**

Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 02.02.2010

Tezin Savunulduğu Tarih : 21.04.2010

Tez Danışmanı : Prof. Dr. F. Bedia ERİM BERKER (İTÜ)
Diğer Jüri Üyeleri : Prof. Dr. Ahmet AYDIN (İÜ)
Prof. Dr. Güleren DÖNER (İTÜ)
Prof. Dr. Ahmet BELCE (İÜ)
Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN (İTÜ)

NİSAN 2010

ÖNSÖZ

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak, analitik kimyanın yanısıra hayatta da analitik düşünmemi sağlayan , her konuda manevi desteğini esirgemeyen , uzun doktora eğitimim boyunca düştüğüm zorluklara rağmen yardımlarını hiçbir zaman eksik etmeyen değerli bilim insanı, hocam Prof. Dr. Bedia ERİM BERKER' e,

Tezimin konusu olan metabolizma hastalıkları konusunda bilgi ve deneyimlerine sürekli olarak başvurduğum İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD' da beraber mesaisini paylaştığım Çocuk Metabolizma Hastalıkları ve Beslenme uzmanı değerli büyüğüm, hocam Prof. Dr Ahmet AYDIN ve değerli kardeşim Uzm. Dr. A. Çiğdem AKTUĞLU-ZEYBEK' e,

Çalışmam süresince desteklerini esirgemeyen çalışma arkadaşlarım, Uzm. Dr. Erdoğan SOYUÇEN, Kim. Yük. Müh. Gülsev KAVUNOĞLU, laborant Mevlüt EROL, Hem. Tülay Şimşek ve , Dyt. Dr. İ. Süheyla ALTAY' a,

Bana İstanbul Teknik Üniversitesi' ndeki çalışma ortamının kapısını açarak koşulsuz yardımlarını gördüğüm ve bu tezde çok büyük katkıları olan Doç. Dr. Nevin ÖZTEKİN, Arş. Gör. Selda BAŞKAN ve Arş. Gör. Filiz TEZCAN' a,

Aileme,

Dolaylı veya direkt olarak bu tezin tamamlanmasında katkıları olan herkese ama herkese,

Teşekkürü bir borç bilirim...

Nisan 2010

Mehmet Şerif CANSEVER

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER	v
KISALTMALAR	vii
ÇİZELGE LİSTESİ.....	ix
ŞEKİL LİSTESİ.....	xi
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ	1
2. TİROZİNEMİ TİP I	5
2.1 Klinik Bulgular.....	7
2.2 Genetik	9
2.3 Laboratuvar Bulguları ve Tanı	9
3. NTBC (2-(2-nitro-4-triflorometilbenzoyl)-1,3-sikloheksanedion)	13
3.1 NTBC' nin Yan Etkileri	14
4. ETİLMALONİK ASİDÜRİ	15
4.1 Klinik Bulgular.....	16
4.2 Genetik ve Patogenez	17
4.3 Tedavi	19
5. KAPİLER ELEKTROFOREZ.....	21
5.1 Kapiler Elektroforez Türleri.....	21
5.2 Elektroforetik Göç.....	22
5.3 Elektroosmotik Akış	23
5.4 Elektroosmotik Akışa Etki Eden Faktörler	24
5.5 Band Genişlemesi.....	25
5.6 Kapiler Elektroforez Cihazının Bölümleri	26
5.6.1 Voltaj kaynağı.....	26
5.6.2 Kapiler	26
5.6.3 İnjesiyon	27
5.6.4 Dedeksiyon	28
6. DENEYSEL KISIM.....	29
6.1 Kullanılan Cihazlar	29
6.2 Kimyasallar	29
6.3 PEI kaplı kolonun hazırlanması	29
6.4 Örneklerinin Hazırlanması	30
6.4.1 İdrarda süksinilaseton tayini için	30
6.4.2 Serumda NTBC tayini için	30
6.4.3 İdrarda etilmalonik asit tayini için.....	30
6.5 Tampon Konsantrasyonları	30
6.5.1 İdrarda süksinilaseton tayini için	30
6.5.2 Serumda NTBC tayini için	30
6.5.3 İdrarda etilmalonik asit tayini için.....	30
6.6 Çalışılan Dalga Boyları, injeksiyon hacmi, injeksiyon tipi, uygulanan voltaj.....	31
6.7 Kolon Boyları.....	31

7. SONUÇLAR	32
7.1 İdrarda Süksinilaseton Teşhis ve Tayini İçin CE Yöntemi Geliştirilmesi	32
7.1.1 Analiz yönteminin validasyonu	34
7.1.1.1 Kalibrasyon denklemleri.....	34
7.1.1.2 Pik alanı ve pik geliş süresi tekrarlanabilirlik değerleri.....	35
7.1.1.3 Yöntemin minimum dedeksiyon sınırı (LOD).....	35
7.1.1.4 Analiz yönteminin hasta idrar örneklerine uygulanması.....	36
7.2 Serumda NTBC miktarının tayini için CE yöntemi geliştirilmesi	36
7.2.1 Metod validasyonu.....	37
7.2.1.1 Kalibrasyon doğrusu.....	37
7.2.1.2 Tekrarlanırlık.....	38
7.2.1.3 LOD ve LOQ değerleri.....	38
7.2.1.4 Metodun doğruluğu.....	38
7.2.1.5 Yöntemin hasta serumunda NTBC tayinine uygulanması.....	39
7.3 İdrarda etilmalonik asit teşhis ve tayini için CE yöntemi geliştirilmesi	39
7.3.1 Metod validasyonu.....	40
7.3.1.1 Kalibrasyon doğrusu.....	40
7.3.1.2 Tekrarlanırlık.....	41
7.3.1.3 LOD ve LOQ değerleri.....	41
7.3.1.4 Metodun doğruluğu.....	41
7.3.1.5 Yöntemin hasta idrarında etilmalonik asit tayinine uygulanması.....	42
8. SONUÇLAR	43
8.1 Tartışma.....	43
KAYNAKLAR.....	45

KISALTMALAR

FAH	: Fumarilasetoasetat hidrolaz
TAT	: Tirozin aminotransferaz
4-HFPA	: 4-Hidroksifenilpiruvikasit
4-HFLA	: 4-hidroksifenillaktik asit
4-HFAA	: 4-hidroksifenilasetik asit
4-HFPD	: 4-hidroksifenilpurivat dioksigenaz
4-HSAA	: 4- OH-sikloheksilasetik asit
SA	: Süksinilaseton
SAA	: Süksinilasetoasetat
AFP	: Alfa-fetoprotein
TT1	: Tirozinemi tip I
GC-MS	: Gaz kromatografisi kütle spektrometresi
NTBC	: 2-(2-nitro-4-triflurometilbenzoil)-1,3-sikloheksanodion
EMA	: Etilmalonik asit
CTAB	: Setil tri metil amonyum bromid
PDCA	: 2,6- piridin dikarboksilik asit.
SDS	: Sodyum dodesil sülfat
LC	: Sıvı (Likit) Kromatografisi
CE	: Kapiler Elektroforez
KMH	: Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları
ALT	: Alanin transaminaz
AST	: Aspartat transaminaz
GGT	: Gama glutamil transpeptidaz
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografi

ÇİZELGE LİSTESİ

Sayfa

Çizelge 1.1.: Bazı kalıtsal metabolizma hastalıklarının (KMH) dünyadaki ortalama görülme sıklıkları.....	3
Çizelge 2.1. Tirozin Metabolizması.....	6
Çizelge 4.1 : EOF'e etki eden faktörler	24
Çizelge 4.2 : Band genişlemesine neden olan diğer etkenler	26
Çizelge 4.3 : CE'de kullanılan dedeksiyon yöntemleri	28
Çizelge 6.1 : Çalışılan Dalga Boyları, injeksiyon hacmi, injeksiyon tipi, uygulanan voltaj	31
Çizelge 6.2 : Kolon Boyları	31
Çizelge 7.1 : Süksinilasetonun tekrarlanabilirlik değerleri.....	35
Çizelge 7.2 : NTBC için validasyon değerleri.....	39
Çizelge 7.3 : Etilmalonik asidin tekrarlanabilirlik değerleri	41
Çizelge 7.4 : Etilmalonik asit için validasyon değerleri	42

ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1 : Süksinilasetonun molekül yapısı	10
Şekil 3.1 : NTBC' nin molekül yapısı.	16
Şekil 3.2 : NTBC' nin etki mekanizması.....	16
Şekil 4.1 : Etilmalonik asidürinin metabolizmadaki oluşum mekanizması.....	16
Şekil 4.2 : Etilmalonik asidin molekül yapısı.....	17
Şekil 5.1 : EOF'nin şematik gösterimi	23
Şekil 5.2 : CE'nin şematik görüntüsü	26
Şekil 7.1 : PEI kaplı kolonda 50 µM süksinilaseton standardı eklenmiş, 1/5 oranında seyreltilmiş sağlıklı bir idrar örneğinin elektroferogramı. SA:Süksinilaseton piki.....	33
Şekil 7.2 : a) 1/5 oranında seyreltilmiş sağlıklı bir insanın idrar örneği; b) 50 µM süksinilaseton standardı eklenmiş idrar örneği (1/5); c) Bir Tirozin Tip 1 hastasının 1/5 oranında seyreltilmiş idrar örneği. SA:Süksinilaseton piki....	34
Şekil 7.3 : PEI kaplı kolonda süksinilasetonun kalibrasyon doğrusu.....	34
Şekil 7.4 : CTAB ile dinamik olarak kaplanan kolonda süksinilasetonun kalibrasyon doğrusu	35
Şekil 7.5 : Bir serum örneğinin elektroferogramı(A); NTBC eklenmiş serum örneği (B); NTBC kullanan Tirozinemi tip I hasta serumu (C)..	37
Şekil 7.6 : NTBC nin kalibrasyon doğrusu.....	38
Şekil 7.7 : A) Sağlıklı bir kişinin idrar numunesinin elektroforeogramı ; B) Etilmalonik asit eklenmiş idrar numunesinin elektroforeogramı ; C) Etilmalonik asidüri tanılı bir hastanın idrar numunesinin elektroforeogramı..	40
Şekil 7.8 : Etilmalonik asitin kalibrasyon doğrusu.....	41

METABOLİK HASTALIKLARIN TEŞHİSİNDE KAPİLER ELEKTROFOREZ

ÖZET

“Kalıtsal Metabolizma Hastalıkları” (KMH), anne ve babadan kalıtsal olarak geçen ve çok nadir görülen hastalıklardır. Ancak çok sayıda değişik tipte kalıtsal metabolik hastalık bulunduğundan, hepsi birlikte değerlendirildiğinde dünyada yılda doğan metabolik hastalıklı çocuk sayısı oldukça fazladır. Türkiye’de akraba evliliklerinin fazla olması nedeni ile kalıtsal metabolizma hastalıkları 'nın bir bölümünün sıklığı dünya ortalamalarının üzerindedir.

Kalıtsal metabolizma hastalıklarına erken tanı konması çok önemlidir. Klinik belirtilerin çoğu kez özgün olmaması nedeni ile KMH 'nın birçoğunun tanısı atlanmaktadır. Son yıllarda yeni analiz cihazlarının ve yöntemlerinin geliştirilmesi ile bu açık kapatılmaktadır. Metabolik hastalıkların hızlı tanısı gereksinimine bağlantılı olarak; hızlı, güvenilir ve ekonomik alternatif analiz yöntemlerinin geliştirilmesi önem kazanır. Kapiler elektroforez, hızlı yöntem gelişimi, az madde kullanımı, ayırma kolonlarının ucuzluğu, cihaz maliyetinin uygunluğu ve yüksek ayırma etkin bir analiz tekniğidir. Bu çalışmada bu tekniğin farklı metabolik hastalıkların tanısına uygulanması amaçlanmıştır.

Tirozinemi tip I ve etilmalonik asidüri kalıtsal metabolik hastalıklar arasında gerek tanıda yaşanan güçlükler gerekse tedavi edilebilirlik güçlükleri açısından önem taşıyan iki önemli Kalıtsal Metabolizma Hastalığı türüdür. Bu çalışmada, 1: Tirozinemi tip I’ in tanısı için bu hastalığın belirleyicisi bir metabolitin süksinilaseton’un idrarda tayini; 2: Etilmalonik asidüri’ nin belirleyicisi olan bir metabolitin, etilmalonik asidin idrarda tayini; 3: Son on senedir Tirozin tip I li bebekler üzerinde kullanılan ancak halen deneme aşamasında olan ve serumdaki miktarı bu hastalık nedeniyle oluşan metabolitleri bastırmada ve ağır karaciğer tahribatını önlemede dikkatle tayin edilmesi gereken 2-(2-nitro-4-triflorometilbenzoyl)-1,3-sikloheksanedion, (NTBC)’ isimli ilacın hasta serumunda tayini için kapiler elektroforetik yöntemler geliştirilmiştir.

Yöntem validasyonu yapılarak, geliştirilen kapiler elektroforez yöntemlerin uygulaması hasta idrar ve serum örnekleri üzerinde uygulanarak, iki kalıtsal metabolizma hastalığının teşhisinde ve ilaç tedavisi süresince hasta izlenmesinde hızlı, kolay, ucuz, basit ve klinik çalışmalar için uygun teknikler olduğu ortaya konmuştur.

DIAGNOSIS OF METABOLIC DISEASES BY CAPILLARY ELECTROPHORESIS

SUMMARY

“Inborn metabolic diseases” are rare diseases which are mostly paternally inherited. There are many different kinds of inborn metabolic diseases and many children born with this type of disease every year. Because of the relatively high incidence of consanguineous marriages in Turkey, prevalence of some inborn metabolic diseases is higher than the rest of the world. Early diagnosis is very important in inborn metabolic diseases. Because of nonspecific clinical signs, the patients are mostly misdiagnosed with other more frequent diseases. Improvements in the diagnosis of inborn metabolic diseases have been achieved with newly developed equipments and methods. With the need of quick diagnosis, fast, safe, and economic analytic methods have gained importance. Capillary electrophoresis is an effective analysis technique with quick improvement in method, use of lesser material, inexpensive separating columns, favorable cost of equipment, and high separation rates. In this study, we aimed to apply this method to the diagnosis of different metabolic diseases.

Tyrosinemia type I and ethylmalonic aciduria are two important metabolic diseases which present difficulties both in diagnosis and treatment. In this study, we describe new capillary electrophoretic techniques for 1: Succinylacetone, a diagnostic metabolite of tyrosinemia, 2- Ethylmalonic acid, a diagnostic metabolite of ethylmalonic aciduria; 3: Serum levels of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione, NTBC, a drug used for the treatment of tyrosinemia type I which suppresses the toxic metabolites and prevents hepatocellular destruction.

With the validation of the method in patients’ blood and urine samples, the newly described capillary electrophoretic techniques are proven to be fast, easy, inexpensive, and appropriate for clinical techniques that can be applied both in the diagnosis and the follow-up of these two inborn metabolic diseases.

1. GİRİŞ

Metabolizma, canlıda yaşamın sürdürülmesi sırasında gerçekleşen tüm kimyasal tepkimelerdir. Her organizma, büyüme, gelişme, ısı, hareket, üreme gibi yaşamsal etkinlikleri sürdürebilmek için dış çevreden bazı maddeler ve enerji almak zorundadır. Bu maddeler ve enerji, yaşamsal etkinliklerin sürdürülebilmesi için gereken organik moleküllerin sentezlenmesinde kullanılacaktır. Dış çevreden alınan organik ya da inorganik moleküller, ya önce parçalanarak, yıkıma uğratılarak ya da yıkıma gerek kalmadan gerekli moleküllerin sentezlenmesinde kullanılır [1-4].

Daha karmaşık yapıdaki moleküllerden oluşan maddelerin organizmada, daha basit yapıli moleküllere yıkımı süreçlerine metabolizmanın katabolizma süreçleri denilir. Daha basit yapıdaki moleküllerin, daha karmaşık yapıdaki moleküllerin sentezinde kullanılması ise anabolizma tepkimeleridir. Organizmada bir reaksiyonun başlangıç maddesinden ürüne dönüşmesi süresince meydana gelen kimyasal değışikliklere ara metabolizma, bu değışiklikler sırasında meydana gelen ara ürünlere metabolitler adı verilir [1-3].

İnsan genomunda yani hücresinin çekirdeklerinde ve mitokondrilerinde 30,000'e yakın gen bulunmaktadır. İnsan hayatının herhangi bir evresinde bazı genler değışime (mutasyon) uğrayabilir. Mutasyonların bir bölümü canlıların sağlığını bozmaz; hatta evrim sürecinin oluşu ve genetik farklılığın sağlanması için bu mutasyonların varlığı bir zorunluluktur. Mutasyonların bir bölümü ise hafiften ağıra kadar birçok yapı ve fonksiyon bozukluğuna yol açar [1-4].

Genetik hastalıklar mutasyona uğrayan gen sayısı ve çevresel faktörlerden etkilenme durumuna göre üç ana gruba ayrılır; 1. Kromozomal hastalıklar, 2. Poligenik multifaktöriyel hastalıklar ve 3. Monogenik hastalıklar.

Monogenik hastalıklarda tek gen bozuktur. Bu hastalıkların çok büyük bir bölümü Mendelyen kalıtım şekillerinden biri ile (otozomal resesif, otozomal dominant, X' e bağıli resesif, X' e bağıli dominant) geçer. En çok otozomal resesif geçiş söz konusudur. [1-3]. Kalıtsal metabolizma hastalıkları (KMH) monogenik hastalıklar grubuna dahildir. Bu hastalıklar çok nadir görülmelerine karşın, bir arada düşü-

nüldüklerinde önemli bir yekün oluştururlar (Çizelge 1). Toplam görülme sıklıkları %1 dolaylarındadır. Aslında klinik belirtilerin çoğu kez özgün olmaması nedeni ile KMH'nın birçoğunun tanısı atlanmaktadır. Bu nedenle gerçek sayısı tespit edilenden çok daha fazladır. Ayrıca Türkiye'de akraba evliliklerinin fazla olması nedeni ile KMH'nın bir bölümünün sıklığı dünya ortalamalarının üzerindedir [1]. Tirozinemi tip I ve etilmalonik asidüri kalıtsal metabolik hastalıklar arasında gerek tanıda yaşanan güçlükler gerekse tedavi edilebilirlik güçlükleri açısından önem taşıyan iki önemli KMH türüdür.

Doğumsal metabolizma bozuklukları kavramı ilk olarak 1908 yılında Garrod tarafından ortaya atılmıştır [2]. Garrod öncelikle albinizm, alkaptonüri, sistinüri ve pentozüri gibi metabolizma bozukluklarını tanımlamış, bu klinik tabloların bir enzim eksikliği sonucu geliştiklerini ve kalıtsal olduklarını ileri sürmüştür. Daha sonra bu alanda büyük aşamalar olmuş ve metabolik bozuklukların bir çoğu ayrıntılı olarak tanımlanmıştır [2].

Gelişen teknoloji ile beraber metabolik hastalıkların tanı şansları daha da artmaktadır. Geçtiğimiz 50 yılda gelişmiş analitik yöntemlerin metabolik hastalıkların tanısı ve tedavi sürecindeki rolüyle önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Kromatografik, spektrometrik ve elektroforetik yöntemlerin gelişmesi klinik çalışmalarda önemli rol oynamıştır. Kapiler elektroforez, diğer kromatografik yöntemlere göre yeni ve metabolik hastalıkların tanısında önemli katkıları olan hızlı, güvenilir ve ucuz bir analitik yöntemdir.

Bu çalışmada, kalıtsal metabolizma hastalıklarından tirozinemi tip I' in tanısı için idrarda süksinilaseton (SA) tayini; Bu hastalığın tedavisinde kullanılan 2-(2-nitro-4-triflorometilbenzoyl)-1,3-sikloheksanedion (NTBC)' nun hasta serumunda tayini ve bir diğer kalıtsal metabolik hastalık olan etilmalonik asidüri'nin tanısı için idrarda etilmalonik asit (EMA) tayini için, zaman ve test başına maliyet açısından önemli ekonomi getirecek yeni kapiler elektroforetik analiz yöntemleri geliştirilmesi hedeflenmiştir.

Çizelge 1.1: Bazı kalıtsal metabolizma hastalıklarının (KMH) dünyadaki ortalama görülme sıklıkları [1].

Hastalık	Sıklık	Hastalık	Sıklık
Kistik fibroz	1: 2,000	Mukopolisakkaridozla	1: 45,000
Kongenital hipotiroidi*	1: 4,500	Biotinidazyetersizliği****	1: 60, 000
Adrenal hiperplazi	1: 5,000	Klasik galaktozemi	1: 60, 000
Fenilketonüri**	1:10,000	Hipofosfatazya	1: 100,000
Histidinemi	1:12,000	Glisinüri	1: 100,000
Sistinüri***	1:12,000	Hiperglisinemi	1: 100,000
İmmioglisinüri	1:13,000	Cori Hastalığı	1: 125,000
Hartnup Hastalığı	1:18,000	Homosistinüri	1: 160,000
Glikojen depo hastalıkları	1:20,000	Pompe Hastalığı	1: 175,000
Üre siklusu defektleri	1:30,000	AkçaağaçŞurubuHast.	1: 175,000
Menkes Hastalığı	1:35,000	Wilson hastalığı	1: 200,000
Metakromatik lökodistrofi	1:40,000	Alkaptonüri	1: 250,000

Türkiyedeki bazı hastalıkların sıklıkları (Kongenital hipotiroidi: 1:3000, **Fenilketonüri: 1:4000, ***Sistinüri: 1:1000, ****Biotinidaz yetersizliği: 1:10,000)

2. TİROZİNEMİ TİP I

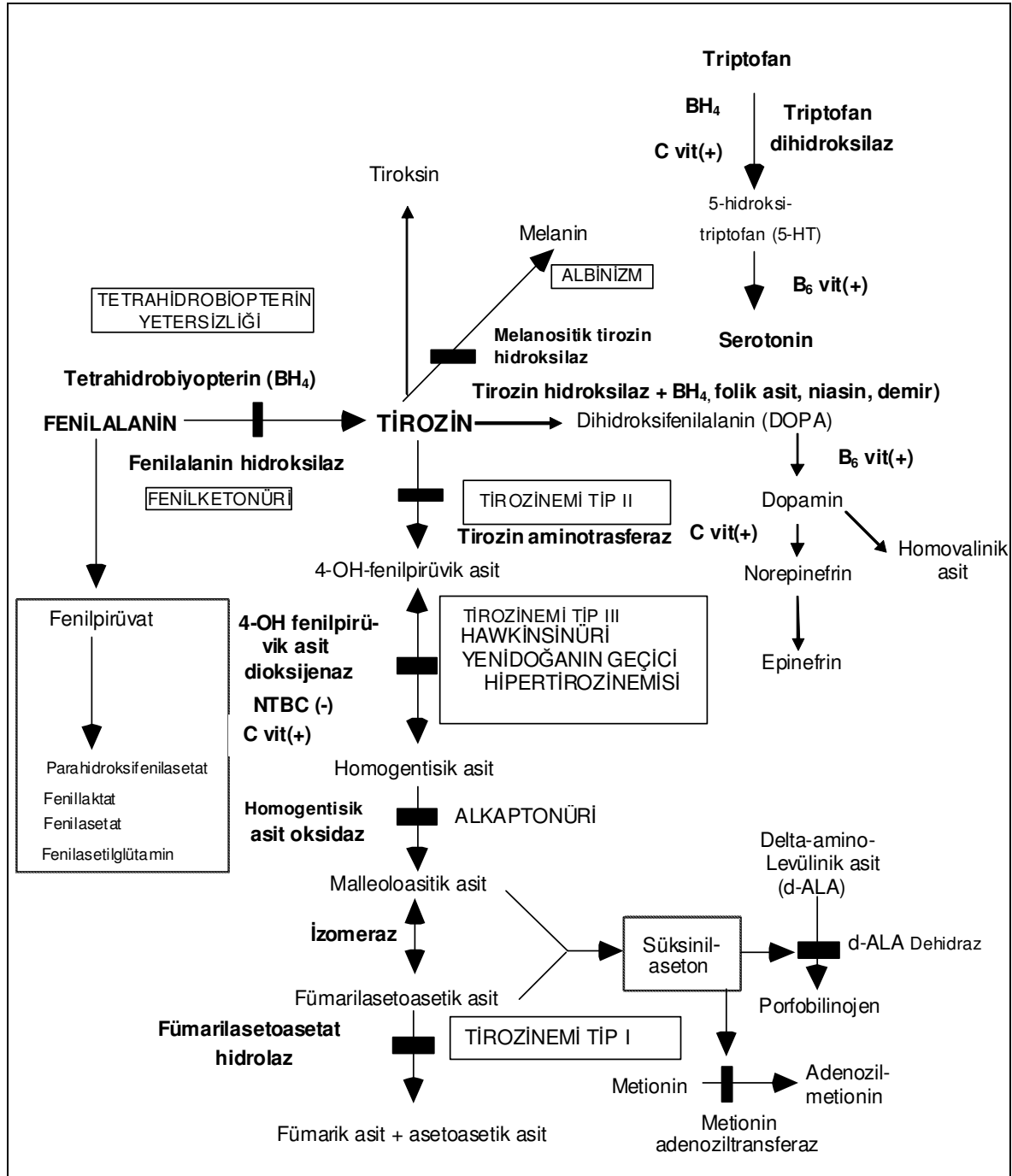
(Hereditör Tirozinemi; Hepatorenal Tirozinemi; Konjenital Tirozinoz; Fumarilasetoasetat hidrolaz eksikliği)

Tirozin, 181.2 molekül ağırlıklı, çözünürlüğü son derece düşük olan ve yüksek yoğunluklarda kristaller oluşturan yarı esansiyel, aromatik bir aminoasittir [6]. Memelilerde L-tirozin halinde bulunur; diyet ile alınan proteinlerin ve doku proteinlerinin hidrolizi ya da esansiyel bir aminoasit olan fenilalaninin hidroksilasyonu ile elde edilir [6,7]. Tirozin sadece protein sentezinde kullanılan bir amino asit olmayıp dopamin, katekolamin, tiroksin ve melanin gibi çok önemli maddelerin de ön maddesidir [5].

Tirozinin yıkımı sırasında ortaya çıkan ara ürünlerin plazma yoğunlukları oldukça düşüktür. Transaminasyon sonucu oluşan 4-hidroksifenilpiruvik asit (4-HFPA) ($< 2.8 \mu\text{mol/L}$) renal tubüler hücreler tarafından temizlenir. 4-hidroksifenilpiruvat “laktat dehidrogenaz”ın etkisi ile 4-hidroksifenillaktik asite (4-HFLA) çevrilir. Kanda 4-HFPA’nın arttığı durumlarda 4-hidroksifenilasetat (4-HFAA), 4-HFLA, N-asetilfeniltirozin ve tiramin miktarlarında da artış saptanır [5,6].

Normal idrarda 4-HFPA, 4-HFLA ve N-asetil tirozin düzeyleri 2 mmol/mol kreatinin düzeyinin altındadır. 4-hidroksifenilasetat düzeyi ise 6-28 mmol/mol kreatinin’dir [8]. Sağlıklı normal kontrollerde idrar süksinilaseton (SA) düzeyi 0.01-0.14 $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin, plazma düzeyi ise 0.005-0.163 $\mu\text{mol/L}$ olarak belirlenmiştir [9]. Tirozin metabolizması Çizelge 2.1’de gösterilmektedir.

Çizelge 2.1. Tirozin Metabolizması [1].



Tirozinemi tip I (TTI) (McKusick 27670; OMIM 276700), tirozin yıkımının son basamağında yer alan fumarilasetoasetat hidrolaz (FAH) enzim eksikliği sonucu gelişen doğumsal metabolik bir hastalıktır. Otozomal resesif kalıtım gösterir. Görülme sıklığı 1/100000-1/120000 olarak belirlenmiştir. Kanada'nın Quebec Saguenay Lac Saint Jean bölgesinde taşıyıcılık 1/20 olarak bildirilmiştir [7, 11].

Hastalığın klinik ve biyokimyasal özellikleri ilk olarak, Sakai ve arkadaşları tarafından ilerleyici karaciğer hastalığı ve D vitaminine dirençli raşitizmi olan bir hastada tanımlanmıştır [12, 13]. Bu hastanın idrarında p-hidroksifenillaktik asit, p-hidroksifenilasetik asit ve tirozin varlığı gösterilmiştir.

1977’de Lindbald ve arkadaşları tirozinemili hastaların idrar organik asit analizinde “süksinilaseton” adı verilen bir bileşiğin varlığını saptamış, ardından hastaların karaciğerlerinde “fumarilaseoasetat hidrolaz” aktivitesinin düşük olduğunu göstermişlerdir [14,15].

2.1 Klinik Bulgular

TT1’de klinik bulgular çok çeşitli olup, yenidoğan döneminden adolesan hatta erişkin döneme kadar herhangi bir zamanda ortaya çıkabilir. Başlangıç bulguları aynı aile fertlerinde bile birbirinden farklılıklar gösterebilir [6, 7, 16].

TT1, klasik olarak bulguların başlama yaşına ve klinik seyrine göre üç ana grupta sınıflandırılır [6,7,17]:

1-Akut tip: 6 aylıktan küçük bebeklerde akut karaciğer yetersizliği bulguları ile başlayan tip

2-Subakut tip: 6 ay-1 yaş arası sütçocuklarında karaciğer hastalığı, gelişme geriliği, pıhtılaşma bozuklukları, hepatosplenomegali, raşitizm, hipotoni bulguları ile seyreden tip

3-Kronik tip (İskandinav tipi): 1 yaşından büyük çocuklarda kronik karaciğer hastalığı, böbrek hastalığı, raşitizm ve/ya da porfiri benzeri ataklarla seyreden tip [5]

Klinik seyir sırasında grup özelliklerinin birbiri içerisine geçtiği görülebilmektedir [16,18].

1994 yılında van Spronsen ve arkadaşları yenidoğan tarama programı ile erken dönemde saptanan olgular dışında kalan ve sadece tirozin kısıtlı diyet uygulanan tirozinemi tip I tanılı hastaların 1 yıllık mortalite oranlarını, hastalığın belirtilerin başlangıç yaşına göre: 2 aylıktan önce ortaya çıkan hastalarda % 60, 2-6 ay arası ortaya çıkanlarda % 23, 6 aydan sonra ortaya çıkanlarda ise % 4 olarak bildirilmiştir [17].

Yenidoğan taramalarının yaygınlaştırılması, genetik taramalar, erken dönemde diyetle başlanması ve tedavisinde 2-(2-nitro-4-triflurometilbenzoil)-1,3-sikloheksanodion (NTBC) kullanımı hastalığın seyrinde belirgin değişikliklere neden olmuştur [7, 16].

Hastalığın ana hedef organları karaciğer ve böbreklerdir. Bunun dışında nörolojik sistem, kardiyovasküler sistem ve ender olarak da pankreasla ilgili bulgular saptanabilir [6, 7, 10, 16, 18].

Karaciğer, tirozinemi tip I'in ana hedef organıdır ve hem mortalite hem morbidite üzerine etkisi büyüktür. Hastalarda karaciğer fonksiyonları üzerine toksik etkinin anne karnında başladığı düşünülmektedir [19].

Hastalarda karaciğer bulguları üç ana tabloya neden olabilmektedir:

Akut karaciğer yetersizliği,

Kronik karaciğer hastalığı ve siroz

Hepatoselüler karsinom [5].

Bir hastada sırayla her üç tablo da gelişebilir. Hastalığın ağır akut formları süt çocukluğu döneminde kusma, ishal, kanama bozuklukları, hepatomegali, sarılık, hipoglisemi, ödem ve asit bulguları ile başlar. İdrarda karnabahar kokusu saptanabilir [6,16,20]. Sadece tirozin kısıtlı diyet uygulanan hastalarda ölüm oranı yüksektir [17].

Kronik form TT 1'de ise karaciğerde kronik karaciğer hastalığı ve siroz bulguları saptanır. Aslında siroz hastalığın doğal seyrinin bir parçasıdır [7,21-23]. Kronik TT 1'in en korkulan komplikasyonu hepatoselüler karsinom gelişimidir. Weinberg ve arkadaşları 1976'da yaptıkları bir araştırmada hastalığın doğal seyri içerisinde 2 yaşından büyük TT-I'li hastaların % 37'sinde hepatoselüler karsinom geliştiğini gözlemiştir [24].

Fumarilastoasetat hidrolaz eksikliği sadece karaciğerde değil böbreklerde özellikle proksimal tübülüs hücrelerinde toksik metabolit birikimine yol açar [25]. Hastaların çoğunda hafif tübüler disfonksiyondan böbrek yetersizliğine kadar gidebilen çeşitli derecelerde böbrek tutulumu bulguları gözlenir [6,7,18]. Tirozin ve fenilalanin kısıtlı diyet ağır böbrek hastalığı riskini azaltabilmektedir [6,7,18].

NTBC ile tedavi görmeyen ya da organ nakli uygulanmayan hastalarda ana morbidite nedenlerinden biri de genellikle akut intermittan porfiri atakları benzeri nörolojik

krizlerdir. van Spronsen ve arkadaşları hasta ölümlerinin %10'unun nörolojik krizlere bağlı olduğunu bildirmişlerdir [17].

Kalp, tirozinemi tip I hastalarında sıklıkla etkilenebilen organlardan biridir. Kalpte en sık saptanan bulgu hastaların çoğunda septal hipertrofi bir kısmında ise konsantrik hipertrofi şeklindedir, klinik bulguya neden olmaz ve genellikle tanı sırasında yapılan ekokardiyografik inceleme sonucunda saptanır [26-28].

2.2 Genetik

İnsan FAH geni 15q23-25 kromozomu üzerinde bulunur [30]. İnsan FAH cDNA'sı 419 aminoasitten oluşur ve 1,260 bp'lik bir mRNA tarafından kodlanır. Gen yaklaşık 35 kbp boyutundadır ve 14 ekson içerir. FAH geninde tip I tirozinemiye neden olan 33 farklı mutasyon tanımlanmıştır [30,31].

Aynı genotipe sahip hastalar arasında bile farklı klinik özelliklerin gözlenebilmesi hastalığın fenotipinin belirlenmesinde epigenetik ya da çevresel etmenlerin önemli rol oynadığını düşündürmüştür [32].

2.3 Laboratuvar Bulguları ve Tanı

Tirozinemi tip I'in tarama programı içerisinde olmadığı ülkelerde tanı klinik ve laboratuvar bulgularına dayanmaktadır. Hastalık; hepatoselüler yıkım, siroz ya da karaciğer sentez fonksiyonlarında, özellikle pıhtılaşma işlevinde bozulma saptanan tüm süt çocukları ve çocuklarda ayırıcı tanıda yer almaktadır [20].

Klinik olarak tip I tirozinemi düşünülen hastalarda serum-plazma aminoasit kromatografisinde çeşitli derecelerde tirozin artışı saptanır. Ancak tirozin yüksekliği tek başına tip I tirozinemiye özgün değildir [18]. İdrarda bulunan tirozin bileşiklerinden en fazla dikkati çeken p-hidroksifenillaktik asittir; ayrıca p-hidroksifenilpiruvik asit ve p-hidroksifenilasetik asitte de artış saptanır [5,6,7,14,18]. Fumarilasetoasetik asid hidrolazın eksikliğinin doğrudan etkisi ile hem serum hem de idrarda suksinilasetoasetik asit ve suksinilaseton artar [14,33,34]. İdrarda süksinilaseton saptanması tanı koydurucu olduğu için hastalığın teşhisinde idrarda organik asit analizi, yapılması gereken tek ve en önemli testtir [34,35].

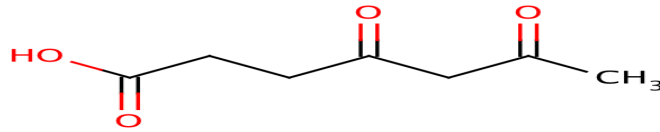
Serum alfa-fetoprotein düzeyinde belirgin artış saptanabilir. Pıhtılaşma bozuklukları sıklıkla. Plazma transaminaz düzeyleri (ALT ve AST) hafif artış gösterebilir ve

koagülopati derecesi ile uyumsuzluğu dikkati çeker [20]. δ -aminolevulinik asitten porfobilinojen sentezinin engellenmesi sonucunda idrarda δ -aminolevulinik asit atımını artırır [14, 29,34].

Tanıyı kesinleştirmek için doku fibroblastlarında, lenfositlerde ya da karaciğer dokusunda fumarilasetoasetat hidrolaz düzeyi ölçülebilir [6,7,33,36].

Prenatal tanı için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Amniotik sıvıda süksinilaseton düzeyinin ölçümü prenatal tanıda tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir [47-50]. Bunun dışında amniosit ya da koryon villus kültürlerinde enzim aktivitesinin bakıldığı çalışmalar ve mutasyonu önceden saptanmış ailelerde doğrudan mutasyon analizi ile ya da bağıntı analizleri ile DNA temelli tanımlar mümkün olabilmektedir [35,53-55].

Süksinilaseton (4,6-dioxoheptanoik asit) 158.152 g/ mol molekül ağırlıklı kısa zincirli ketoasidik bir bileşiktir.



Şekil 2.1 : Süksinilasetonun molekül yapısı.

Tanıyı kesinleştirmek için doku fibroblastlarında, lenfositlerde ya da karaciğer dokusunda fumarilasetoasetat hidrolaz düzeyi ölçülebilir [1,2,106,109]. Karaciğer enzim aktivitesi tayinindeki en önemli problem karaciğer hastalığı varlığında karaciğerde yer alan birçok enzim aktivitesinde düşüklük saptanmasıdır [36].

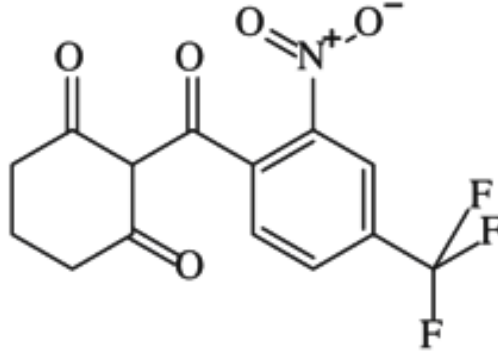
Çoğu yenidoğan tarama programı tirozinemi tip I'i Guthrie kartlarında kurutulmuş kan örneklerinde tirozin düzeylerini ölçerek taramaktadır [38-39]. Ancak tek başına tirozin ölçümü özgün olmaması nedeniyle taramada yetersiz kalmaktadır [40,41]. Ayrıca tirozin düzeyi normal ya da hafif artmış olması nedeniyle yenidoğan taramasında atlanmış olgular bildirilmiştir [37,42,43]. Bu nedenlerle çeşitli tarama merkezleri tarafından Guthrie kart örneklerinde hastalığa özgü metabolit olan süksinilasetonun araştırıldığı yöntemler geliştirilmiştir [44-46]. Günümüzde hastalığın çok sık görüldüğü Quebec bölgesinde süksinilaseton hastalığının birincil belirteci olarak tarama programına yerleştirilmiştir [46].

Prenatal tanı için çok çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Amniotik sıvıda süksinilaseton düzeyinin ölçümü prenatal tanıda tercih edilen yöntemlerin başında gelmektedir [47-50]. Şimdiye kadar amnios sıvısında süksinilaseton düzeyi normal olmakla beraber hastalığı taşımakta olan bir hasta bildirilmiştir [51]. Bu hastanın doğumdan sonra yapılan mutasyon araştırmasında bilinen 2 mutasyon için “compound heterozigot” olduğu saptanmış ve amnios sıvısındaki süksinilaseton düzeyinin normal olma nedeni açıklanamamıştır [52].

Bunun dışında amniosit ya da koryon villus kültürlerinde enzim aktivitesinin bakıldığı çalışmalar ve mutasyonu önceden saptanmış ailelerde doğrudan mutasyon analizi ile ya da bağlantı analizleri ile DNA temelli tanımlar mümkün olabilmektedir [35,53-55].

3. NTBC (2-(2-nitro-4-triflorometilbenzoyl)-1,3-sikloheksanedion)

NTBC, günümüzde TT1' in tedavisinde kullanılan ve daha öncesinde bir herbisit olarak geliştirilmiş 329.228 g/mol molekül ağırlıklı triketonik bir bileşiktir. Rutin toksikolojik çalışmalarda yüksek doz NTBC verilen sıçanlarda uzun dönemde korneal lezyon geliştiği gözlenmesinin ardından NTBC'nin 4HPPD'i inhibe ederek sıçanlarda kan tirozin düzeyinde artışa ve idrarlarında yüksek miktarda 4-hidroksifenillaktat ve 4-hidroksifenilpiruvat atımına yol açtığı gösterilmiştir [56].



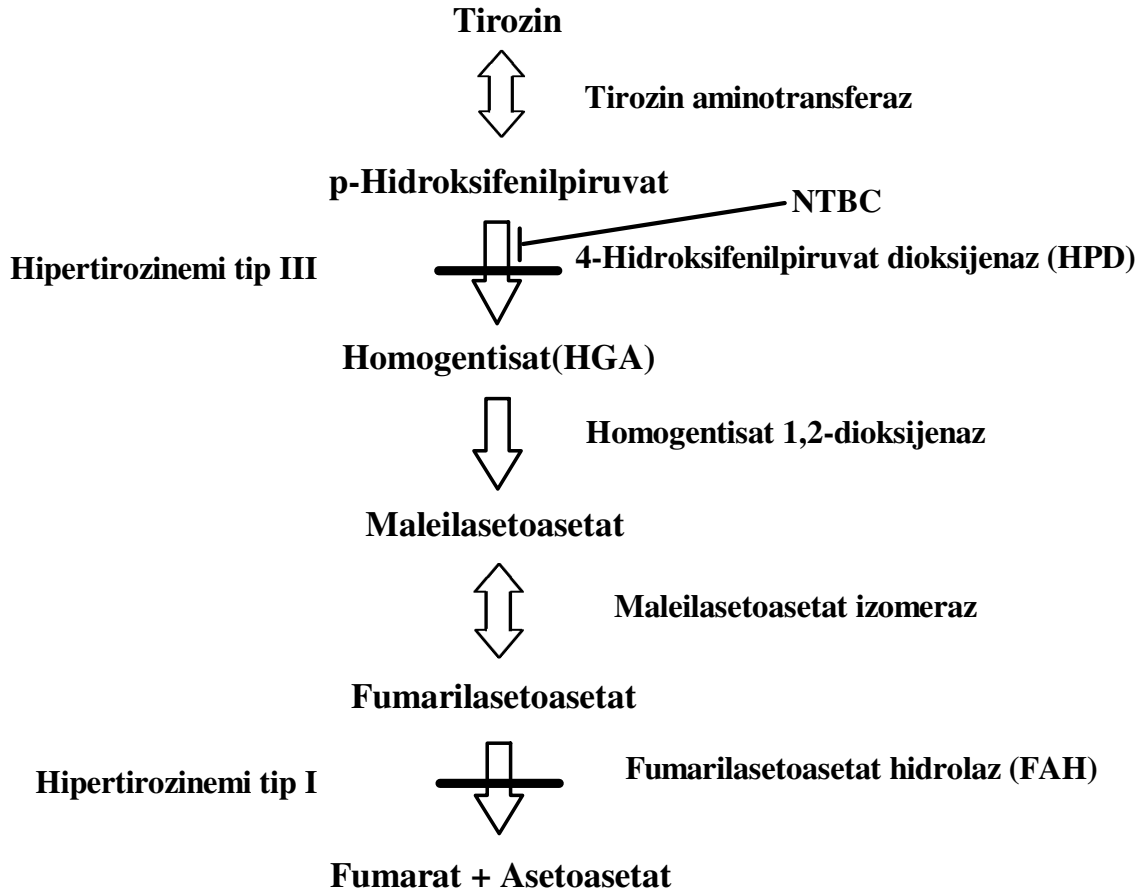
Şekil 3.1 : NTBC' nin molekül yapısı.

NTBC gastrointestinal sistemden hızla emilerek dolaşıma geçer ve karaciğer, böbrekler ve gözyaşı bezleri tarafından tutulur. Karaciğerde hidroksilasyona uğrayarak idrar ve dışkıda eşit miktarlarda atılır [58-59]. Sağlıklı gönüllülerde serum yarılanma ömrü 50 saatin üzerinde saptanmıştır [60].

Günümüzde NTBC tedavisine başlanma dozu 1-2 mg/kg/gün olarak önerilmektedir. Tedavi süresince plazma NTBC düzeyinin 30 µmol/L üzerinde olması yeterli kabul edilmektedir. Bu düzey plazma ve idrar süksinilaseton atımının önlendiği doz olarak kabul edilmektedir [28, 57].

NTBC tirozin katabolik yolunun ikinci enzimi olan 4-hidroksifenilpiruvatın etkin bir inhibitörüdür. İlaç tirozin katabolik yolunu durdurarak toksik metabolitler olan süksinilaseton, aminolevulinik asit, maleyilasetoasetat ve fumarilasetoasetat düzeyinde azalmaya neden olmaktadır [57]. İlacın bu denli etkin olması genellikle uygulanan faz II ve faz III çalışmalarını bile beklemeden klinik kullanıma girmesine

neden olmuştur. NTBC, 2002 yılında Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) ve 2005 yılında Avrupa İlaç Ajansı (EU Drug Agency) tarafından da onaylanmıştır [57].



Şekil 3.2 : NTBC’ nin etki mekanizması [1]

3.1 NTBC’ nin Yan Etkileri

NTBC sağaltımının yan etkileri oldukça azdır. 4- hidroksifenilpiruvat düzeyindeki inhibisyon serum tirozin düzeyinde belirgin artışa yol açar [58]. NTBC kullanan hastalarda kaşıntı, batma, yanma, fotofobi, korneal erozyon ve korneal bulanıklaşma gibi geçici göz bulguları bildirilmiştir [61]. Ender olarak geçici trombopeni ve lökopeni bildirilmiştir [28].

4. ETİLMALONİK ASİDÜRİ

Etilmalonik asidüri en fazla glutarik asidüri tip II'nin daha hafif formu olan etilmalonik-adipik asidüri ya da elektron taşıma flavoproteinleri (ETF) / ETF dehidrogenaz eksikliğine bağlı gelişen multipl açılkoA dehidrogenaz enzimi eksikliğinde görülür [62-63]. Aynı zamanda kısa zincirli açılkoA dehidrogenaz enzimi eksikliğinde saptanabilir (Şekil 4.1) [65]. Bu hastalarda yağ asidi oksidasyon bozukluklarının karakteristik özellikleri olan hipoketotik hipoglisemi, miyopatik güçsüzlük ya da kardiyomiyopati saptanır .

1991 ve 1994'te etilmalonik asidürinin çok farklı fenotipik özelliklerle bağlantılı olan ancak yağ asidi oksidasyonunun normal olduğu çok farklı bir tipi tanımlanmıştır [66-68]. Bu hastalığın en belirgin özellikleri ensefalopati, akrosiyanoz ve peteşiler olarak tanımlanmıştır. Sütçocukluğu döneminde ölüm karakteristiktir.

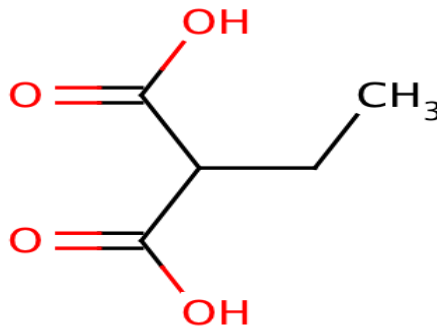
Vasküler bozukluklar hastalığın alışılmadık bulgularıdır [66-69]. Akrosiyanoz ve ekstremitelerde ödem saptanabilir. Hastalarda aynı zamanda periodik olarak ve genellikle enfeksiyonların tetiklediği, yaygın peteşi gelişimi gözlenir.

3-4 aylıktan itibaren retinal damarlarda genişleme ve kıvrılmalar saptanabilir. 5 hastada hematüri ve iki hastada beyin omurilik sıvısında eritrosit varlığı bildirilmiştir [68,70]. Hastaların yüzlerinde hafif dismorfizm vardır [68-70]. Bu hastaların yüzleri birbirine benzer. Bazılarında epikantal kıvrımlar saptanır. Çoğunda burun kökü geniş ve basıktır. Nöroradyolojik bulgular frontotemporal atrofi ve geçikmiş miyelinizasyonu gösterir. Sinir ileti çalışmalarında bacaklarda duysal nöropati saptanabilir [69].

Laktik asidemi ve hafif hipogliseminin eşlik ettiği akut metabolik krizler saptanabilir. Ataklar arasında laktat ve piruvat düzeyleri yüksek kalabilir; metabolik asidoz kompanse edilir. Akut ataklar sırasında laktatın 17 mmol/L'ye kadar yükselebildiği ve ketoz olmaksızın pH değerlerinin 7,05-7,10 düzeyine kadar inip, baz açığının -192 a kadar arttığı saptanmıştır. Karaciğer fonksiyon testleri bozulabilir. Kreatinin fosfokinaz normal ya da yüksek (200 IU/L'ye kadar) artabilir [69]. Kan amonyak düzeyi normaldir.

4.2 Genetik ve Patogenez

Hastalık otozomal resesif kalıtım gösterir. Aynı ailede hem kızlarda hem erkeklerde görülebilir [66,68]. En temel metabolik bozukluk idrarda "etilmalonik asit" atılımıdır. Bildirilen atım miktarı 54 ile 2270 mmol/mol kreatinin (normal <17) arasında değişmektedir. Etilmalonik asit (2-ethylpropanedioic acid) 132,115 g/mol molekül ağırlıklı kısa zincirli dikarboksilik asittir.



Şekil 4.2 : Etilmalonik asidin molekül yapısı

Bazı hastalarda, 266 mmol/mol kreatinine ulaşan etilmalonik asit atımı ($N<12$) da bildirilmiştir. Adipik asidüri bildirilmemiş, ancak bir hastada 335 $\mu\text{mol/mol}$ kreatinin düzeyine kadar yükseldiği gözlenmiştir. İdrar ve kanın tandem mass spektrometri ile incelenmesi C4 ve C5 karnitin esterlerinde artış saptamış, karnitin tedavisi bunların atımında daha da artışa neden olmuştur. Kan ve idrarda serbest karnitin düzeyleri ise düşük saptanmıştır. İdrarda hem butiril hem de isobutirilglisin atımları yüksek saptanmıştır [67].

İdrarda inorganik tiosülfat atımında artışa rağmen sülfat saptamayan Duran ve arkadaşları, bu sendrom ile sülfürlü aminoasit metabolizmaları arasında bir bağ olabileceğini öne sürmüşlerdir [71]. Ek olarak nonenzimatik olarak tiosulfat ve sisteinden elde edilemeyen s-sulfosistein ve s-sulfotiosistein adlı iki sülfür içeren asidik aminoasit varlığını bildirmişlerdir. Metiyonin normalde homoserin ve sisteine çevrilir. Homoserin ise etilmalonik asit için bir kaynak olabilecek olan 2-oksobutirik asite çevrilir. Sistein ise 2-merkaptopürivik aside çevrilir. 2-merkaptopürivik asit ise piruvik asit+tiosulfata ve sonunda sülfat'a metabolize edilir. Etilmalonik asit butirilko A'nın propoil koA karboksilaz [72] ile karboksilasyonu sonucu elde edilebilir (Şekil 3.1), bu kısa zincirli açılkoA dehidrogenaz ve multipl açılkoA dehidrogenaz eksikliklerinde saptanan etilmalonikasitin kaynağı olabilir. Etilmalonik asit izolösin metabolizmasının alloizolösinin öncülü olan 2-okzo-3-metilvalerik asitin rasemizasyonundan sonra gelişen R yolunun bir ürünü olabileceği düşünülmektedir [68]. Alloizolösin daha sonra 2-metilbutirilkoA, 2-etil-3-hidroksipropionil koA ve etilmalonik semialdehid ve son olarak da etilmalonik aside çevrilebilir.

Etilhidrakrilik asit de potansiyel bir etilmalonik asit kaynağıdır. Bakterilerde etilmalonik asitten metilsüksünik asit üretildiği gösterilmiştir [73]. İzovalerilkoA dehidrogenaz eksikliğine bağlı gelişen glutarik asidüri tip II'de 4-hidroksiizovalerik asitten metilsüksünik asit oluşturulabilir. Bu hastalığın bir mitokondriyal elektron taşıma bozukluğu olma ihtimali artmıştır [74] ancak hem kan hem de kas mitokondriyal DNA'sı üzerinde yapılan çalışmalar hem de kas ve fibroblastların elektron taşıma zinciri enzimleri üzerinde yapılan çalışmalar normal bulunmuştur [67-69].

Bu hastalığın geni 9q13 kromozomu üzerinde uzun kolun orta bölümüne yakın bir yerde bulunmuştur [75]. Fiziksel ve fonksiyonel genomik veriler ve mutasyon analizleri genin tanımlanmasını sağlamış ve ETHE1 adı verilmiştir. Etilmalonik ensefalopatisi olan çocuklarda şimdiye kadar 20'nin üzerinde mutasyon tanımlanmıştır [75,76].

4.3 Tedavi

Bu hastalık sütçocukluğu ya da erken çocukluk döneminde öldürücüdür. Şimdiye kadar bildirilmiş olan hastalardan sadece ikisi hayatta kalmıştır [67,68]. Riboflavin, karnitin, glisin, askorbik asit ve vitamin E tedavilerinin belirgin bir etkisi olmamıştır.

Metiyonin kısıtlı diyet etilmalonik asit ve metilmalonik asit atımlarında azalmaya ve laktik asit ve bikarbonat düzeylerinin normalleşmesini sağlamıştır.

5. KAPİLER ELEKTROFOREZ

Elektroforez, yüklü taneciklerin bir elektrik alan içinde göç etmesi esasına dayanır. Partiküllerin göçü esasına dayanan ilk elektroforetik metod protein araştırmaları için Tisellus tarafından 1937 yılında kullanılmış ve Tisellus bu buluşuyla Nobel almıştır. Daha sonra yöntem geliştirilmiş ve günümüzde çok çeşitli tipleri kullanıma sunulmuştur. Kapiler elektroforez bu tiplerden birisidir. 1981 yılında Jongerson ve Lukacs 75 µm iç çaplı kapilerde ayırma yaparak yöntemin teorisini ortaya koymuşlardır [77]. Kapiler Elektroforez (CE) hızlı ve güvenilir bir analitik ayırma yöntemidir. CE yöntemi, klasik elektroforezin ayırma tekniği ile kromatografik yöntemlerin aletsel tasarımının birleşmesinden oluşmaktadır. Bu yöntem ile inorganik katyon ve anyonlar gibi en küçük iyonlardan, DNA gibi büyük molekül ağırlığına sahip moleküllere kadar çeşitli maddelerin kantitatif ve kalitatif olarak tayini mümkündür.

5.1 Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforezin en sık kullanılan şekli “Kapiler Zone Elektroforez”dir (CZE). CZE’de ayırım, elektrolit çözeltisi ile dolu olan kapilerde, uygulanan elektrik akım altında, maddelerin farklı göç zamanlarına sahip olmasına dayanır. Kapilerin bir polimer veya jel çözeltisi ile dolu olduğu CE şekli ise “Kapiler Jel Elektroforez”dir (CGE). CGE’de ayırım makromoleküllerin moleküler büyüklüklerine göre gerçekleşmektedir. Yüksüz maddelerin ayırımı için kullanılan CE türleri genel olarak kapiler elektrokinetik kromatografi (CEKC) ismini alır. En yaygın elektrokinetik kromatografi türü “Misel Elektrokinetik Kromatografi”dir (MEKC). MEKC’de ayırımın esası elektrolit çözeltisine katılan yüzey aktif maddenin oluşturduğu misel adı verilen kümeler ile çözücü arasında yüksüz maddelerin paylaşım farklılıklarına dayanır. İzoelektrik odaklanma kapiler elektroforez yöntemi proteinlerin ayırımında kullanılır. Bu yöntemde ayırım, proteinlerin farklı pH’larda izoelektrik noktaya sahip olmalarından yararlanarak yapılır. Kapiler elektrokromatografi tam bir kromatografidir. Kapilerin içi yaklaşık 1µm çaplı sabit fazla doldurulur. Analitler

uygulanan elektrik voltaj altında sabit fazda tutunmalarına göre ayrılırlar. Bir diğer CE yöntemi izotakoforezdir (ITP). ITP’de örnek farklı iyon mobilitesine sahip iki elektrolit çözeltisi arasında injekte edilir.

5.2 Elektroforetik Göç

İyonlar elektrik alan altında sabit bir hızla hareket ederler. Elektrik alan kuvvetini arttırmak her zaman iyonların göç hızlarını da artırır, dolayısıyla daha hızlı ayırım sağlanır. Elektroforetik mobilite ve elektrik alan arasındaki ilişki aşağıdaki eşitlikteki gibidir:

$$v = \mu_e \cdot E \quad (5.1)$$

v = İyonun hızı

μ_e = Elektroforetik mobilite

E = Elektrik Alan

Elektrik alan; kullanılan kapiler boyu (L) ve uygulanan voltaja (V) göre değişir.

$$E = V/L \text{ (Volt/cm)} \quad (5.2)$$

İyonların sahip oldukları elektroforetik mobilite, elektrik alan kuvveti (F_E) ile doğru orantılı iken ortamdaki sürtünme kuvvetiyle (F_F) ters orantılıdır.

Elektrik alan kuvvet,

$$F_E = q \cdot E \quad (5.3)$$

ve küresel olduğu varsayılan bir iyonun sürtünme kuvveti

$$F_F = -6\pi\eta r v \text{ eşitlikleri ile verilir.} \quad (5.4)$$

q =iyonun yükü

η =çözeltinin vizkositesi

r =iyonun yarıçapı

v =iyonun hızı

Elektroforetik göç boyunca bu iki kuvvet birbirine eşit fakat zıttır.

$$F_E = F_F$$

$$q \cdot E = -6\pi\eta r v \quad (5.5)$$

Denklem 4.1 ve 4.5 in birleştirilmesi ile elektroforetik mobilite aşağıdaki gibi tanımlanabilir:

$$\mu_e = q / 6\pi\eta r \quad (5.6)$$

Bu eşitlikten görüldüğü gibi maddenin elektroforetik mobilitesi sabit viskoziteli ortamda yük/büyüklik oranına bağlıdır. Kısaca küçük ve yükü fazla olan maddeler daha hızlı hareket ederler.

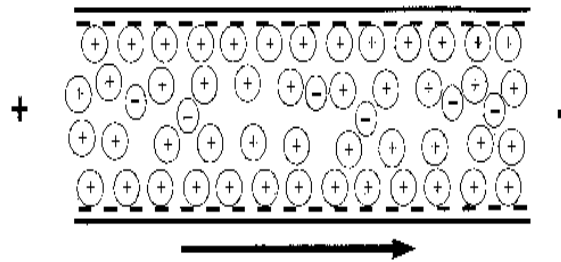
5.3 Elektroosmotik Akış

Elektrik alan altında, kapilerin içinde bulunan tampon çözeltisi bir elektroosmotik akış oluşmasını sağlar. pH 2'nin üzerinde bir elektrolitle temasta olan silika kapilerin iç duvarı negatif yüklenir. Bunun nedeni, camın yapısında bulunan silanol gruplarının disosiyasyonu olmasıdır.



Tampon çözelti içindeki pozitif yükler elektrostatik çekimle duvarın negatif yüküyle bir çift tabaka oluşturur ve zeta potansiyeli denilen bir potansiyel farkı oluşur.

Bu sisteme yüksek voltaj uygulanması ile çift tabakanın pozitif iyonları hızla negatif elektroda doğru hareket ederler. İyonlar sulu çözeltide hidratize halde olduklarından çözücüyü de sürüklerler ve kapiler içinde bir elektroosmotik akış (EOF) oluşur. EOF hızı genel olarak injekte edilen analitlerin elektroforetik mobilitelerinden büyüktür. Bu sebeple EOF ile, kapilerin anod ucundan injekte edilen bütün maddeler, yüklerine bakılmaksızın, katoda doğru sürüklenirler [Şekil 5.1].



Şekil 5.1 : EOF'nin şematik gösterimi.

Pozitif ve negatif iyonların hızları elektroforetik mobilitelerine, ortamdaki elektroosmotik mobiliteye ve uygulanan elektrik alana bağlı olarak aşağıdaki eşitlikteki gibi değişir. Nötral partiküllerin hızlarını, elektrik alan ve elektroosmotik mobilite belirler.

$$v_+ = (\mu_0 + \mu_+).E$$

$$v_0 = \mu_0.E \quad (5.7)$$

$$v_- = (\mu_0 - \mu_-).E$$

v_+ = Pozitif yüklü iyonun hızı

v_0 = Nötral maddenin hızı

v_- = Negatif yüklü iyonun hızı

Maddelerin göç zamanları sadece elektroforetik mobiliteleri ile değişmez. Aşağıdaki eşitlikde de görüldüğü gibi göç zamanları, kapilerin boyu ve uygulanan voltaj ile de alakalıdır. Kapilerin etkin boyu, injeksiyon noktasından dedektöre kadar olan kısmının uzunluğudur.

$$t = lL / ((\mu_{eof} \pm \mu_i)V) \quad (5.8)$$

t = geliş süresi

L = Kapilerin tam boyu

l = Kapilerin etkin boyu

V = voltaj

5.4 Elektroosmotik Akışa Etki Eden Faktörler

EOF'e etki eden faktörler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

EOF'e etki eden faktörler [78].

Ayrırma sistemindeki değişiklik	EOF'e etkisi
Tamponun pH değeri arttığında	EOF ↑
Tampon konsantrasyonu arttığında	EOF ↓
Sıcaklık arttığında	EOF ↑ (η değişimi nedeniyle)
Organik çözücü ilavesi ile	EOF ↓ ↑
Pozitif yüklü yüzey aktif ilavesi ile	EOF terse çevrilir
Elektrik alan arttığında	EOF ↑

5.5 Band Genişlemesi

Ayırma etkinliği (rezolüsyon) HPLC de olduğu gibi CE’de de teorik plaka sayısı ile gösterilir. Aşağıdaki denklem Gaussian pikleri için kullanılır.

$$w_b = 4\sigma \quad (5.9)$$

w_b = Pikin taban genişliği

σ = Pikin standart sapması

$$N = 5.54 \cdot (t / w_{1/2})^2 \quad (5.10)$$

N = Teorik plaka sayısı

t = Pikin geliş zamanı

$w_{1/2}$ = Yarı yükseklikteki pik genişliği

Eşitlik 4.10’den de görüldüğü gibi band genişliğinin artması ayırma etkinliğini düşürür. Band genişlemesine neden olan etkenlerden en önemlisi difüzyondur. Kapilerin çapı küçük olduğu için, kapiler çapı boyunca difüzyon ihmal edilebilir ancak kapiler boyunca difüzyon oluşabilir. Difüzyon ve N arasındaki eşitlik şöyledir:

$$\sigma^2 = 2Dt = 2DL / \mu_e \cdot V \quad (5.11)$$

D = Analitin difüzyon katsayısı

Eşitlik 4.10 ve 4.11 yardımıyla teorik plato sayısı ve difüzyon arasında bir eşitlik verilebilir.

$$N = \mu_e \cdot V \cdot l / 2DL = \mu_e \cdot E \cdot L / 2D \quad (5.12)$$

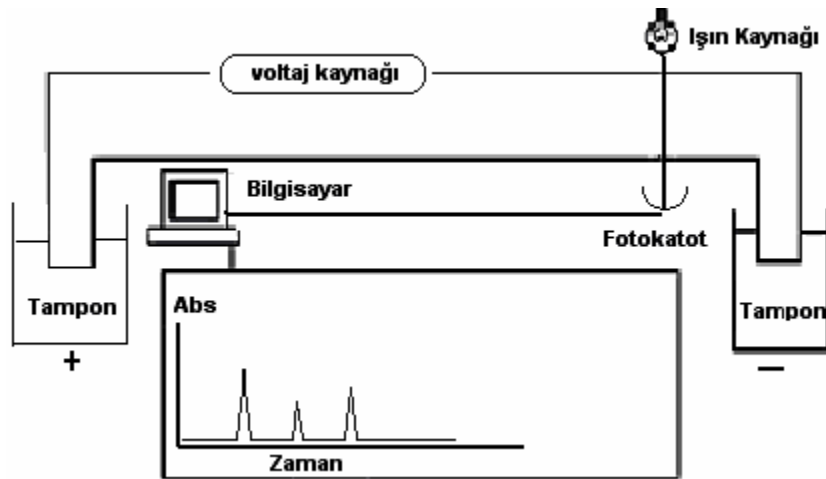
Bu denklemden de görüleceği gibi teorik plaka sayısı difüzyon katsayısı arttıkça azalır. Büyük molekül ağırlığına sahip maddeler daha küçük difüzyon katsayılarına sahip oldukları için daha yüksek plaka sayıları ile ayrılabilirler. Ayrıca denklem 4.11’de görüldüğü gibi analiz süresi kısaltıldıkça difüzyon nedeniyle pik genişlemesi azalacaktır. Kapiler elektroforezde yüksek voltaj altında ayırmalar genellikle çok kısa sürede tamamlandığından pikler dik ve simetrik. Band genişlemesine neden olan diğer parametreler Çizelge 4.2’de verilmektedir.

Band genişlemesine neden olan diğer etkenler [78].

Termal Etkiler	Tampon vizkositesinde lokal değişimlerin yarattığı konveksiyon
İnjesiyon Hacmi	Büyük hacimlerde Difüzyon
Örneklerin duvara adsorpsiyonu	Pik şekillerinde kuyruklanma, zaman ve alanda tekrarlanırlığın düşmesi
Elektrodispersiyon (iletkenlik farklılıkları)	Pik şekillerinin üçgen halinde görülmesi
Tampon seviyelerindeki fark	Göç zamanlarının ve rezolüsyonun düşmesi

5.6 Kapiler Elektroforez Cihazının Bölümleri

Kapiler Elektroforez cihazının şematik gösterimi Şekil 5.2’de verilmiştir.



Şekil 5.2 : CE'nin şematik görüntüsü [79]

5.6.1 Voltaj kaynağı

Tipik bir CE sisteminde uygulanan voltaj en fazla 30 kV'dur. Yapılan çalışmanın güvenilirliği uygulanan voltajın kararlılığıyla yakından alakalıdır. Denklem 4.2'den de görülebileceği gibi voltaj değişimiyle elektrik alan da değişir. Elektrik alanın değişimi göç zamanından alan tekrarlanırlığına bir çok önemli parametrenin değişmesine neden olur.

5.6.2 Kapiler

CE'de kullanılan silika kapilerlerin iç çapı 25-100 μm ; dış çapı 150-520 μm arasında değişir. Kapilerin etkin boyu 50-75 cm arasında, tam boyu ise, cihazın tipine göre 5-20 cm daha uzun olarak kullanılır. Kapilerin iç çapının ve boyunun değişmesi göç zamanı, sıcaklık, adsorpsiyon, dedeksiyon limiti, injeksiyon hacmi, ayırma etkinliğinin değişmesine neden olur. Genelde silika kapiler kullanılmakla beraber

cam veya plastik kapiler kullanılabilir. Fakat cam ve plastik kapilerin UV geçirgenlikleri silika kapilere göre daha düşüktür. Poliimid ile kaplanarak esnek bir yapıya kavuşan silika kapilerde dedeksiyon penceresi polimer tabakası yakılarak açılabilir. İlk defa kullanılacak bir silika kapiler ilk önce 1M NaOH ile 10-30 dk ardından su ve çalışma tamponuyla da yıkanarak şartlandırılır.

5.6.3 İnjektasyon

İnjektasyon hacmi 2-20 nL arasında değişir. Aşırı hacimlerde çalışmak pik şeklinin bozulmasına, band genişlemesine, rezolüsyonun azalmasına sebep olur. 2 tip injektasyon şekli vardır.

1-Hidrokinamik İnjektasyon :

Bu tür injektasyon en yaygın kullanılan injektasyon türüdür. Kendi arasında 3 değişik şekilde gerçekleştirilebilir. Kapilerin dedektör tarafına vakum uygulanarak, kapilerin injektasyon kısmına basınç uygulanarak ya da injektasyon kabının yükseltilmesiyle bir sifon etkisi yaratılarak injektasyon yapılabilir. Hidrokinamik injektasyon için Poiseuille'nin denkleminde injektasyon hacmi hesaplanabilir.

$$V = \Delta P \pi r^4 / 8 \eta L \quad (5.13)$$

ΔP = kapiler boyunca basınç farkı (dyn.cm⁻²)

r = kapilerin iç çapı (cm)

t = injektasyon süresi (s)

η = tamponun viskozitesi (dyn.s.cm⁻²)

L = kapilerin toplam boyu

Sifonik injektasyon için ΔP aşağıdaki eşitlikten hesaplanabilir:

$$\Delta P = \rho g \Delta h \quad (5.14)$$

ρ = örneğin yoğunluğu (kg.m⁻³)

g = yerçekimi ivmesi katsayısı (9,82 N.kg⁻¹)

Δh = örnek ve tampon kabı arasındaki yükseklik farkı (m)

2-Elektrokinetik İnjesiyon:

Elektrokinetik injesiyon, örnek kabı ile çıkış tampon kabı arasına çok kısa süreli ve çalışma voltajından daha düşük bir voltaj uygulanarak yapılır. Elektrokinetik injesiyonun tekrarlanırlığı hidrodinamik injesiyona göre daha azdır. İnjekte edilen madde miktarı analitlerin elektroforetik mobilitelerine bağlıdır [80].

5.6.4 Dedeksiyon

CE'de en sık kullanılan dedektörler UV-VIS ve floresans dedektörlerdir. Diğer dedeksiyon yöntemleri ve uygulamaları Çizelge 5.3'de verilmiştir.

CE'de kullanılan dedeksiyon yöntemleri [81].

Dedeksiyon Türü	LOD (mol/L)	Tipik Uygulamaları
UV absorpsiyon	10^{-5} - 10^{-8}	Aromatik bileşikler, proteinler, nükleik asitler
İndirek UV	10-100 kat<UV	Aminler, şekerler, org. , inorganik iyonlar
Floresans	10^{-7} - 10^{-9}	Aminoasitler, DNA, peptidler
Amperometri	10^{-10} - 10^{-11}	Kolay indirgenebilen ve yükseltgenebilen maddeler
Kütle spektrometrisi	10^{-8} - 10^{-9}	Protein, peptid, ilaç
Alev Fotometrisi	10^{-3} - 10^{-5}	iyonik organik bileşikler

6. DENEYSEL KISIM

6.1 Kullanılan Cihazlar

Ayırma ve tayinler Diod array dedektörle kombine Agilent marka kapiler elektroforez cihazı kullanılarak yapıldı. pH ölçümlerinde Metrohm (654 pH meter) marka pH-metre kullanıldı. Kullanılan kapiler kolonlar Polymicro Technologies firmasına aittir. İç çapı 75 ve 50 µm, olan kapiler kolonlar seçildi. Kapilerler ilk kullanımda yarım saat 1mol/L NaOH ile ve her injeksiyon arasında 3 dakika 0.1 mol/L NaOH, 3 dakika distile su ve ardından 2 dakika çalışma tamponu ile yıkandı. Otomatik kapiler yıkaması, örnek injeksiyonu ve voltaj uygulaması ve verilerin değerlendirilmesi Agilent ChemStation yazılım programına sahip bir PC bilgisayarla kontrol edildi.

6.2 Kimyasallar

Süksinilaseton Sigma (St.Louis, MO, USA), etilmalonik asit (Aldrich), NTBC (Swedish Orphan AB, Sweden), 2,6-piridin dikarboksilik asit, fosforik asit, sodyum borat, SDS ve NaCl Merck (Darmstadt,Germany), CTAB ve polietilenimin Fluka (Buchs, Switzerland), asetronitril J.T. Baker (Deventer, Holland), firmalarından temin edildi. Tüm çözeltiler, Elgacan C114 filtrasyon sisteminden elde edilen destile su ile hazırlandı.

6.3 PEI Kaplı Kolonun Hazırlanması

Kaplama işlemi yapılmadan önce kapiler kolon önce 1 mol/ L NaOH ile 30 dakika 1×10^{-1} MPa basınçta daha sonra distile su ile 15 dakika aynı basınçta yıkandı ve kolon temiz hale getirildi. Daha sonra suda hazırlanan % 10' luk PEI çözeltisi kolon içine 10 dakika ve 1.5×10^{-1} MPa basınç uygulanarak dolduruldu. Bu PEI çözeltisi bir saat kolon içerisinde bırakıldı. Daha sonra PEI çözeltisi ile doldurulan ardı sıra bekletilen kolon 1.5×10^{-1} MPa basınç ile 15 dakika su ve çalışma tamponu ile yıkanarak analize uygun hale getirilmiştir [92].

6.4 Örneklerinin Hazırlanması

6.4.1 İdrarda süksinilaseton tayini için

Süksinilaseton standard çözeltileri suda çözülerek hazırlandı. İdrar örnekleri 1 / 5 (v/v) oranında distile su ile seyreltilerek injekte edildi.

6.4.2 Serumda NTBC tayini için

NTBC % 99.8 (w/w) saflıktaki bilinen miktarda NTBC içeren ve nişasta ile jelatinleştirilmiş Orfadin (Swedish Orphan AB, Sweden) kapsüllerinin 5 mol/L NaOH ile çözülmesi ile elde edildi. Nişasta santrifüjle uzaklaştırıldı. İstenen konsantrasyona suyla seyreltikten sonra 0.45 µm lik mikrofiltreden süzülerek doğrudan kolona injekte edildi. Serum örnekleri 1: 1.5 (v/v) oranında (serum/asetonitril) asetonitril ile muamele edildi. Deproteinizasyon işlemi tamamlandı. Daha sonra vortekslenip 3000 rpm' de 5 dakika santrifüj edildi. Oluşan süpernatant alındı ve 0.45 µm lik mikrofiltreden süzülerek injekte edildi.

6.4.3 İdrarda etilmalonik asit tayini için

Standard etilmalonik asit çözeltileri suda çözülerek hazırlandı. İdrar örnekleri 1 / 20 (v/v) oranında distile su ile seyreltildi ve 0.45 µm lik mikrofiltreden süzülerek injekte edildi.

6.5 Tampon Konsantrasyonları

6.5.1 İdrarda süksinilaseton tayini için

Tampon (1): 50mmol/ L Borat pH: 9.2 (PEI kaplı kolon için)

Tampon (2): 50mmol/ L Borat , 20 mmol/ L NaCl, 0.05 mmol /L CTAB pH: 9.2 (CTAB kaplı kolon için)

6.5.2 Serumda NTBC tayini için

20 mmol/ L Fosfat , 40 mmol/ L SDS, pH: 12.

6.5.3 İdrarda etilmalonik asit tayini için

5 mmol/L 2,6-piridin dikarboksilik asit, 0.1 mmol/L CTAB , pH: 5.74

6.6 Çalışılan Dalga Boyları, injeksiyon hacmi, injeksiyon tipi, uygulanan voltaj

Çizelge 6.1 : Çalışılan dalga boyları, injeksiyon hacmi, injeksiyon tipi, uygulanan vol

	Dalga Boyu λ (nm)	injeksiyon hacmi (MPa, saniye)	İnjeksiyon tipi	Uygulanan Voltaj (kV)
Süksinilaseton	295	$5 \cdot 10^{-3}$, 5	Hidrodinamik	- 28*
NTBC	278	$5 \cdot 10^{-3}$, 5	Hidrodinamik	25
Etilmalonik Asit	200 (indirekt)	$5 \cdot 10^{-3}$, 5	Hidrodinamik	-28*

* - işareti injeksiyonun negatif elektrottan yapıldığının ve kapiler içindeki elektroosmotik akış yönünün negatif kutuptan pozitif kutba doğru olduğunu göstermektedir.

6.7 Kolon Boyları

Çizelge 6.2 : Kolon boyları.

	Toplam Uzunluk (cm)	Etkin Uzunluk (cm)
Süksinilaseton	48	40
NTBC	65	57
Etilmalonik Asit	57	49

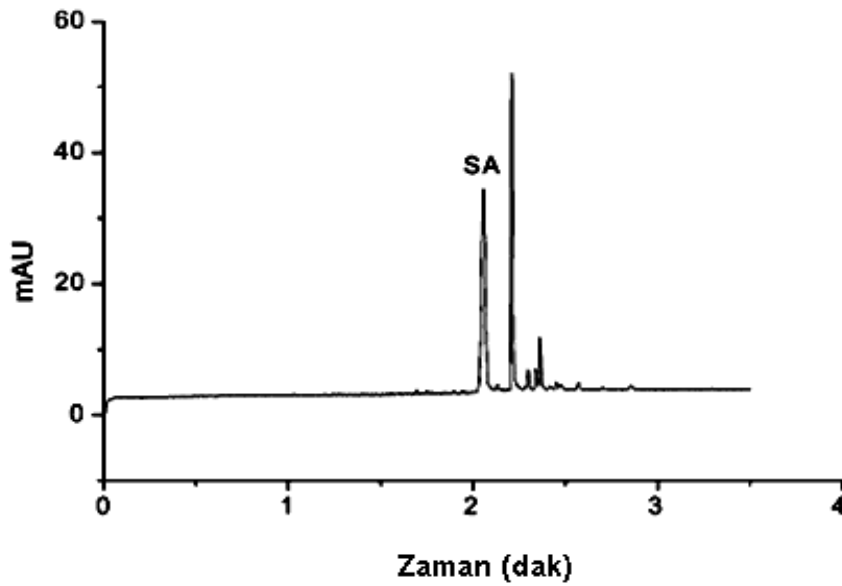
7. SONUÇLAR

7.1 İdrarda Süksinilaseton Teşhis ve Tayini İçin CE Yöntemi Geliştirilmesi

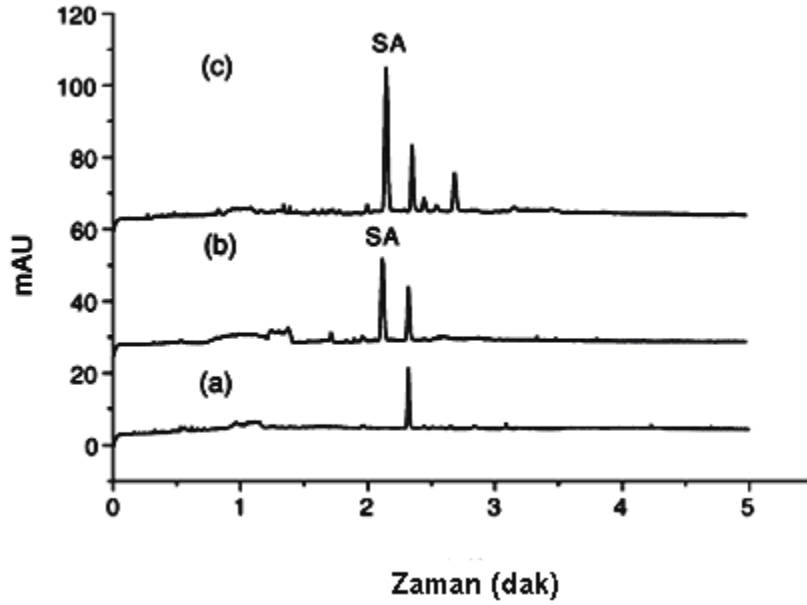
Teorik bölümde açıklandığı gibi kalıtsal metabolik hastalıklarından Tirozinemi Tip I in tanısı idrarda süksinilaseton atımı ile belirlenir. Süksinilasetonun formülü Bölüm 2, Şekil 2.1' de verilmiştir. Yapısında bulunan çift bağlar nedeniyle, bu metabolitin kapiler elektroforez ayrımı sonucunda UV detektörle tespitinin mümkün olacağı öngörülebilir. Ayrıca yapısında bulunan karboksil grubu nedeniyle bazik ortamda negatif yüklü olacağı ve elektrik alan altında serbest çözeltide bir elektroforetik mobiliteye sahip olacağı da öngörülür. Bu ön görüler sonucu bu analitin kapiler zon elektroforez yöntemiyle idrar matriksi içinden ayrılabilmesi ve direkt UV dedeksiyon yöntemiyle tayin edilebileceği düşünülerek bu amaçla gerekli şartlar geliştirilmeye başlanmıştır.

Kapiler Zon Elektroforezde, genel uygulama örneğinin pozitif kutuptan injekte edilerek, analitlerin negatif kutba yerleştirilen detektör tarafına elektroosmotik akışla sürüklenmesi ve bu sürüklenme esnasında yük/büyüklik oranlarına göre ayrılmasıdır. Genel olarak kapiler içinde oluşan elektroosmotik akışın mobilitesi türlerin elektroforetik mobilitelerinden çok büyük olduğundan tüm analitler yüklerine bakılmaksızın detektör yönüne yani negatif kutba göç ederler. Bu genel kurala iki istisna, inorganik anyonlarla, küçük organik asitlerdir. Bu türlerin kendi elektroforetik mobiliteleri oldukça yüksek olduğundan elektroosmotik akışın bu türleri detektöre sürüklemesi uzun zaman alır. Bu nedenle bu türler için kapilerin iç yüzeyini pozitif yükle kaplıyarak, elektroosmotik akışın yönünü negatif elektrottan pozitif elektroda doğru çevirmek ve polariteyi değiştirerek injeksiyonu da negatif kutuptan yapmak tercih edilir. Bu şekilde bu iyonların elektroforetik mobilitelerinin göç yönleri ile elektroosmotik mobiliteler aynı yönde olacağından çok hızlı bir ayırma sağlanır. Süksinilasetonun molekül yapısı elektroforetik mobilitelerinin yüksek olacağını göstermektedir. Yapılan ön denemeler bu ön yargıyı destekleyince bu analitin ayrımının kaplı kapiler kolanda gerçekleştirilmesine karar verildi. Süksinilaseton standardı ile yapılan optimizasyon çalışmalarında iki tür kaplı kolon

kullanıldı. Bunlardan biri pozitif yüklü bir polielektrolit olan PEI kullanarak deneysel kısımda açıklandığı şekilde kalıcı bir kaplama yapılarak, diğeri ise ayırma tamponu içine pozitif yüklü bir yüzey aktif madde ilave edilerek geçici bir kaplama yapılmasıdır. Çalışma tamponu, çalışma voltajı ve çalışma sıcaklığı, süksinilaseton pikinin mümkün olan en kısa sürede ve en simetrik şekilde elektroferogramda görüntüleneceği şekilde optimize edildi. Süksinilaseton için tespit edilen ayırma şartları, deneysel kısım Çizelge 6.1 ve 6.2' de verilmiştir. PEI kaplı kolonda 50 mmol/L borat tamponu ile (pH:9.2), CTAB kaplı kolonda ise 50 mmol/ L Borat , 20 mmol/ L NaCl, 0.05 mmol /L CTAB Tampon (pH: 9.2) bileşimi ile optimal pik şekli ve süresi elde edilmiştir. Her iki kaplama yönteminde, süksinilaseton standart pikinin 2.1 dakika gibi çok kısa sürelerde geldiği saptandı. Şekil 7.1'de PEI kaplı kolonda, Şekil 7.2 b'de CTAB kaplı kolonda süksinil aseton standart çözeltisi ilave edilmiş normal insan idrarının elektroferogramı görülmektedir.



Şekil 7.1 : PEI kaplı kolonda 50 μ M süksinilaseton standardı eklenmiş, 1/5 oranında seyreltilmiş sağlıklı bir idrar örneğinin elektroferogramı.
SA:Süksinilaseton piki Kullanılan tampon, 50mmol/ L Borat pH: 9.2.

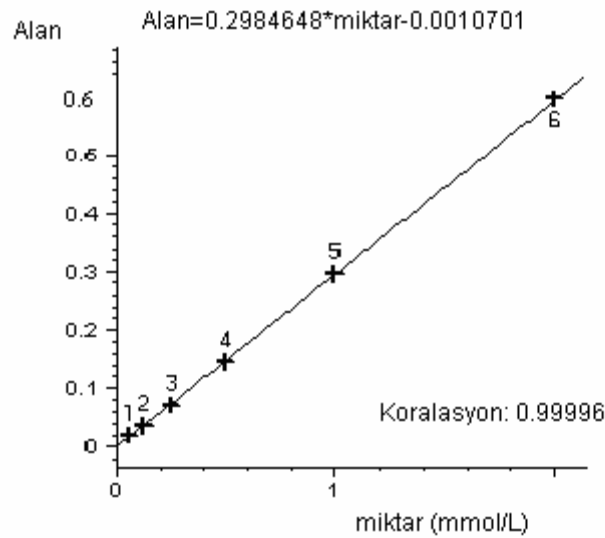


Şekil 7.2 : a) 1/5 oranında seyreltilmiş sağlıklı bir insanın idrar örneği; b) 50 µM süksinilaseton standardı eklenmiş idrar örneği (1/5); c) Bir Tirozinemi Tip 1 hastasının 1/5 oranında seyreltilmiş idrar örneği. SA:Süksinilaseton piki. Kullanılan tampon, 50mmol/ L Borat , 20 mmol/ L NaCl, 0.05 mmol /L CTAB pH: 9.2.

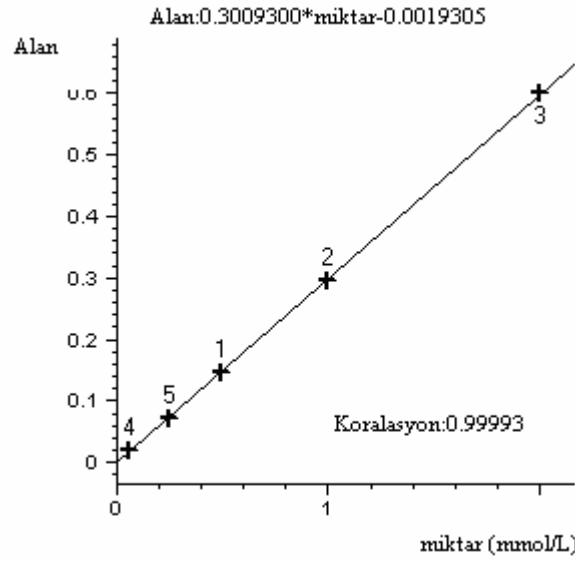
7.1.1 Analiz yönteminin validasyonu

7.1.1.1 Kalibrasyon denklemleri

Süksinilaseton için 0.0625, 0.125, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0 mmol/L konsantrasyon aralığında doğrusal kalibrasyon grafiği hem PEI kaplı kolon için (Şekil 7.3) hemde CTAB ile dinamik kaplanmış kolon için (Şekil 7.4) çizildi.



Şekil 7.3 : PEI kaplı kolonda süksinilasetonun kalibrasyon doğrusu.



Şekil 7.4 : CTAB ile dinamik olarak kaplanan kolonda süksinilasetonun kalibrasyon doğrusu.

PEI ile kaplanmış kolondan elde edilen kalibrasyon denklemi $y = 2.98465 \cdot 10^{-1} x - 1.07010 \cdot 10^{-3}$ ve doğrusal korelasyon değeri ise 0.99996 dir. CTAB ile dinamik olarak kaplanmış kolondan elde edilen kalibrasyon denklemi $y = 3.060011 \cdot 10^{-1} x + 8.64116 \cdot 10^{-3}$ ve korelasyon değeri $r = 0.99993$ dir.

7.1.1.2 Pik alanı ve pik geliş süresi tekrarlanabilirlik değerleri

Analiz yönteminin tekrarlanırlığı, süksinilaseton örneğinin, ardarda yedi kez injekte edilmesi ile kontrol edilmiştir. Geliş süresi ve pik alanlarının % RSD olarak tekrarlanabilirlik değerleri Çizelge 7.1’de görülmektedir.

Çizelge 7.1 : Süksinilasetonun tekrarlanabilirlik değerleri.

	A(Pik Alanı) % RSD	t (geliş süresi) % RSD
PEI kaplı kolonda	7.6	0.7
CTAB kaplı kolonda	10.9	1.6

7.1.1.3 Yöntemin minimum dedeksiyon sınırı (LOD)

Yöntemin LOD değeri elektroferogramın farklı bölgelerinden hesaplanan taban çizginin ortalama gürültü miktarının üç katı sinyal kabul edilerek hesaplanmıştır. Buna göre süksinilaseton çalışmasında CTAB ile kaplanan kolon için LOD değeri

0.042 mmol/L , PEI ile kaplanmış kolon için ise 0.027 mmol/L olarak saptanmıştır. PEI kaplı kolon 75µm olduğundan, LOD değeri daha düşük çıkmıştır.

7.1.1.4 Analiz yönteminin hasta idrar örneklerine uygulanması

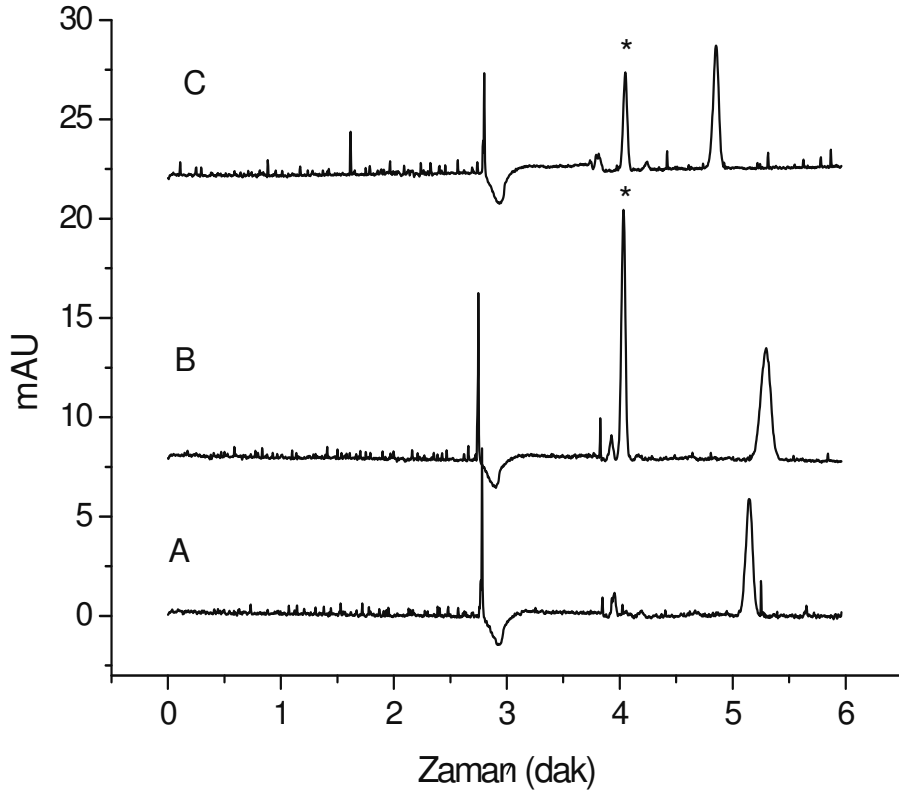
İdrar numuneleri 1/5 (v/v) oranında suyla seyreltildi. Normal insan idrarında süksinilaseton bulunmamaktadır ve süksinilaseton pikinin geliş zamanında herhangi bir matriks piki görülmemiştir. İdrar örneğine spike yapılarak injekte edilen süksinilaseton piki standartla aynı geliş süresinde ve pik alan boyutlarında gelmiştir. Süksinilaseton pikinin idrar içinde tekrarlanırlık değerlerinde bir değişim görülmemiştir. Sonuç olarak 1/5 oranında seyreltilmiş idrar matriksi pik alanı ve tekrarlanırlık değerlerini etkilememiştir. Uygulama, deneysel kolaylık açısından CTAB ile dinamik kaplanmış kolonda yapılmıştır. Şekil 7.1' de 1/5 oranında seyreltilmiş normal insan idrarı (a); Bu idrara süksinilaseton standardı eklenerek elde edilen elektroferogram(b); Ve 1/5 oranında seyreltilmiş hasta idrarının (c) elektroferogramı görülmektedir. Hasta idrar örneğindeki süksinilaseton pikinin teşhisi, idrar örneğine standart ekleme yöntemiyle ve muhtemel süksinilaseton pikinin on-line alınan spektrumunun, standart madde spektrumu ile karşılaştırılması ile yapılmıştır.

Tirozinemi Tip I in teşhisi için idrarda süksinilaseton tanısı yeterlidir çünkü normal insan idrarında bu analit bulunmaz. Ancak tedavi amaçla süksinilaseton miktarının bilinmesi önemlidir. İncelediğimiz hasta örneğinde süksinilaseton miktarı 35 µmol/L olarak bulunmuştur.

7.2 Serumda NTBC Miktarının Tayini İçin CE Yöntemi Geliştirilmesi

NTBC bir triketondur. Molekülün, Bölüm 3, Şekil 3.1 de verilen formülü, molekülün yüklü olmadığını ve kapiler zon elektroforez koşullarında ayırlamayacağını göstermektedir. Bu nedenle bu çalışmada MEKC yöntemi geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla fosfat tamponu içine SDS yüzey aktif maddesi ilavesi ile NTBC pikinin en uygun göç zamanı ve pik şekli elde edilmeye çalışılmıştır. Fosfat tampon konsantrasyonu 20 ile 50 mmol/L arasında ve SDS konsantrasyonu 20 ile 40 mmol/L arasında çalışılmıştır. En uygun karışım olarak 20 mmol/L fosfat ve 40 mmol/L SDS konsantrasyonu ve pH değeri olarak pH 12 seçilmiştir. Ayırma şartları toplu olarak, Deneysel kısım Çizelge 6.1 ve 6.2 de gösterilmiştir. Bu şartlarda NTBC

4.1 dakika gibi çok kısa bir sürede gelmiştir. Şekil 7.5 de bir serum örneğinin, NTBC ile spike yapılmış serum örneğinin ve NTBC kullanan bir hasta serum örneğinin elektroferogramları verilmektedir.

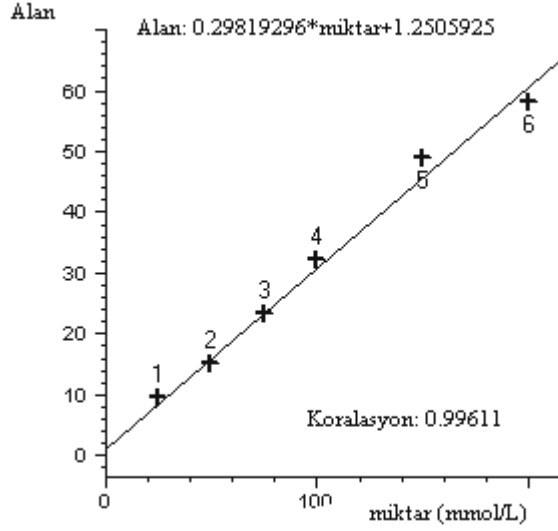


Şekil 7.5 : Bir serum örneğinin elektroferogramı(A); NTBC eklenmiş serum örneği (B); NTBC kullanan Tirozinemi tip I hasta serumu (C). * NTBC pikini göstermektedir.

7.2.1 Metod validasyonu

7.2.1.1 Kalibrasyon doğrusu

Kalibrasyon doğrusu 25 ve 200 $\mu\text{mol/L}$ NTBC konsantrasyon aralığında düzeltilmiş pik alanlarına (A/t) karşı çizilmiştir. Bu sınırlarda kalibrasyon denklemi $y = 0.00101585x - 0.0006789$ ve regrasyon değeri 0.99611(r) olarak bulunmuştur. Kalibrasyon doğrusu Şekil 7.6’da verilmiştir.



Şekil 7.6 : NTBC nin kalibrasyon doğrusu

7.2.1.2 Tekrarlanırlık

Metodun kesinliği 100 µmol/L NTBC çözeltisinin artarda 5 kez injeksiyonu ile kontrol edildi. Geliş süresi ve düzeltilmiş pik alanı (A/t) tekrarlanırlığı sırasıyla 0.73 ve 1.99 % RSD olarak tespit edildi. Günler arası tekrarlanırlık üç farklı günde peşpeşe 5 kez injeksiyon ile hesaplandı. Pik alanı için günler arası tekrarlanırlık 2.43 % RSD olarak bulundu.

7.2.1.3 LOD ve LOQ değerleri

Kalibrasyon çözeltisi, 25 ile 200 µmol/L NTBC konsantrasyonu aralığında çizildi. Kalibrasyon doğrusunun denklemleri ve korelasyon katsayısı 0.99611(r) olarak bulundu.

Üç farklı temel çizgiden tespit edilen gürültünün üç katı LOD değeri olarak 3.17 µmol/L for NTBC olarak tespit edildi. LOQ değeri gürültü sinyalinin 10 katı olarak 10.6 µmol/L olarak bulundu.

7.2.1.4 Metodun doğruluğu

Metodun doğruluğu, üç farklı konsantrasyonda , 50, 100, and 150 µmol/L NTBC konsantrasyonlarında NTBC yi serum örneğine ilave ederek 6 farklı ölçüm alınarak yapıldı. Geri kazanım değerleri % 74 ile 84 arasında bulundu.

Validasyon değerleri toplu olarak izelge 7.2’de verilmiştir.

Çizelge 7.2 : NTBC için validasyon değerleri.

Günii iki injeksiyon arası (n=5) kesinlik: Düzeltilmiş pik alanı (A/t)	1.99
Günler arası (n= 5x3 gün) kesinlik: Düzeltilmiş pik alanı (A/t)	2.43
LOD (μmol/L)	3.17
LOQ (μmol/L)	10.6
NTBC eklenmiş serum örnekleri (μmol/L)	Geri Kazanım (%)
50	74± 7
100	84± 5
150	84± 4

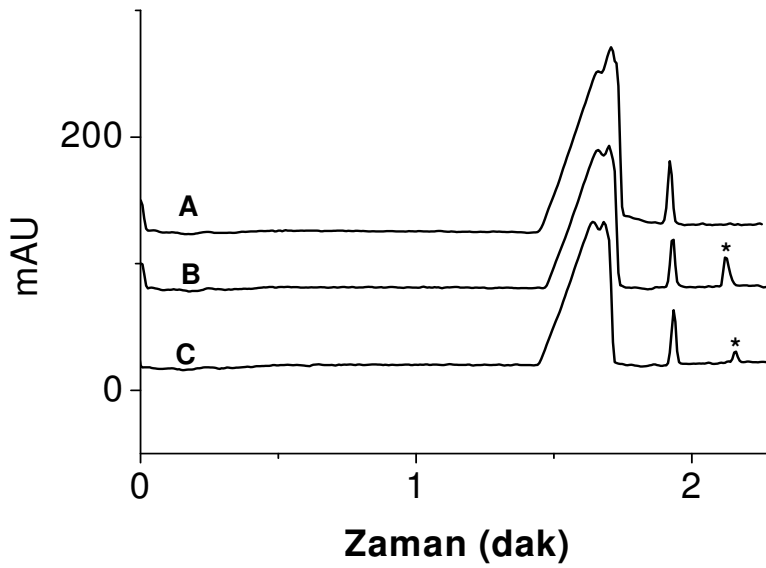
7.2.1.5 Yöntemin hasta serumunda NTBC tayinine uygulanması

Yöntemin uygulanması NTBC tedavisi gören bir tirozinemi tip I hastasının serum örneğinde bu ilacın tayinine uygulandı. şekil 7.5 –C’ de günde kg başına 1 mg NTBC alan bir hastanın serum elektroferogramı görölmektedir. Bu örnekte serum NTBC konsantrasyonu 38.43 μmol/L NTBC olarak tespit edilmiştir.

7.3 İdrarda Etilmalonik Asit Teşhis ve Tayini İçin CE Yöntemi Geliştirilmesi

Etil malonik Asitin Bölüm 4, şekil 4.2 de gösterilen formülü, süksinilasetona benzer şekilde bu molekülünde asit grubu içerdiğinden, bazık alanda yük kazanacağı ve CZE ile ayrılabilceğini öngörür. Süksinilasetonda olduğu gibi küçük bir organik asit olan bu molekülün elektroforetik mobilitesi yüksek olacağından kapiler duvarını pozitif olarak kaplayarak elektroosmotik akış yönü ile, etilmalonik asidin elektroforetik göç yönünü aynı yöne çevirerek hızlı bir ayırma ulaşılabileceği düşünölmüştür. Bu amaçla CTAB kullanılarak dinamik bir kaplama yoluna gidildi. Ancak etilmalonik asit süksinilasetonun aksine UV aktif bir molekül değildir. Bu nedenle bu çalışmada CZE ayırma ve indirek UV deteksiyon yöntemi seçilmiştir. İndirek deteksiyonun prensibi kapiler içinde bulunan tampon çözeltiye uygun bir kromofor madde ilave etmektir. Kromoforun mobilitesi ile analitlerin mobilitesi birbirlerine yakın ise analitler UV detektörün karşısından geçerken detektörün gördüğü kromoforun geri sinyalinde bir düşüş olur. Elde edilen negatif piklerin alanları analit konsantrasyonu ile orantılıdır. Bu çalışmada analitle mobilitesi uyumlu olan ve molar absorptivitesi çok yüksek olan bir kromofor, 2,6- piridin karboksilik asit tampon içine ilave edilmiştir. Yapılan ön çalışmalar sonucu en uygun tampon

bileşimi olarak 5 mmol/L 2,6-piridin dikarboksilik asit, 0.1 mmol/L CTAB , pH: 5.74 olarak seçilmiştir. Kullanılan kromofor aynı zamanda zayıf bir asit olduğundan aynı zamanda tampon görevi yapmaktadır. Ayırma şartları toplu olarak deneysel kısımda Çizelge 6.1 ve 6.2’de verilmiştir. Şekil 7.7’de sağlıklı bir kişinin idrar numunesinin elektroforeogramı (A), Etilmalonik asit eklenmiş idrar numunesinin elektroforeogramı (B) ve Etilmalonik asidüri tanılı bir hastanın idrar numunesinin elektroforeogramı (C) toplu olarak verilmiştir. Elektroferogramda negatif pikler integrasyon kolaylığı açısından görüntü olarak pozitif piklere dönüştürülmüştür.

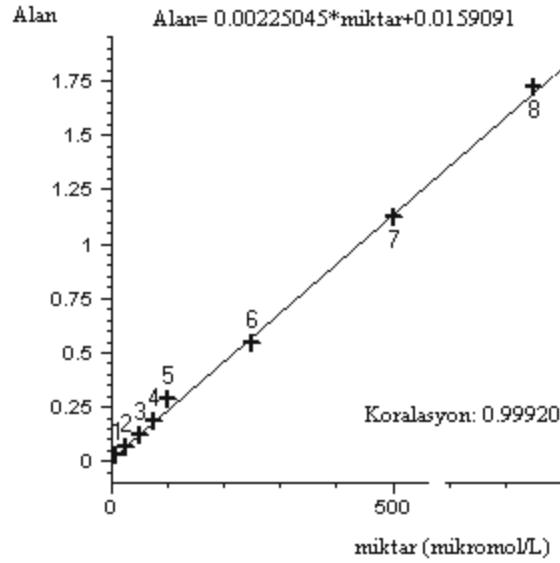


Şekil 7.7 : A) Sağlıklı bir kişinin idrar numunesinin elektroforeogramı ;
B) Etilmalonik asit eklenmiş idrar numunesinin elektroforeogramı ;
C) Etilmalonik asidüri tanılı bir hastanın idrar numunesinin elektroforeogramı. * etilmalonik asit pikini göstermektedir.

7.3.1 Metod validasyonu

7.3.1.1 Kalibrasyon doğrusu

Etilmalonik asit için 10, 25, 50, 75, 100, 250, 500, 750 $\mu\text{mol/L}$ konsantrasyon değerlerinde doğrusal kalibrasyon grafiği çizildi. Kalibrasyon doğrusunun denklemi $y = 2,25045 \cdot 10^{-3} x + 1.59091 \cdot 10^{-2}$ olarak korelasyon değeri 0.99920 (r) olarak tespit edildi. Kalibrasyon doğrusu Şekil 7.8’de verilmiştir.



Şekil 7.8 : Etilmalonik asitin kalibrasyon doğrusu.

7.3.1.2 Tekrarlanırlık

Metodun kesinliği 50 $\mu\text{mol/L}$ etilmalonik asit çözeltisinin artarda 6 kez injeksiyonu ile kontrol edildi. Geliş süresi ve düzeltilmiş pik alanı (A/t) tekrarlanırlığı sırasıyla 0.17 ve 0.89 % RSD olarak tespit edildi (Çizelge 7.3). Günler arası tekrarlanırlık üç farklı günde peş peşe 6 kez injeksiyon ile hesaplandı. Pik alanı için günler arası tekrarlanırlık 1.91 % RSD olarak bulundu.

Çizelge 7.3 : Etilmalonik asidin tekrarlanabilirlik değerleri

A/ t (Pik Alanı) %RSD	t (geliş süresi) %RSD
0,89	0,17

7.3.1.3 LOD ve LOQ değerleri

Etilmalonik asit için LOD değeri 11.78 $\mu\text{mol/L}$ ve LOQ değeri 39.3 $\mu\text{mol/L}$ olarak saptanmıştır.

7.3.1.4 Metodun doğruluğu

Metodun doğruluğu, üç farklı konsantrasyonda 25, 50 ve 100, $\mu\text{mol/L}$ EMA konsantrasyonlarında EMA' yı idrar örneğine ilave ederek 6 farklı ölçüm alınarak yapıldı. Geri kazanım değerleri % 96.6 olarak bulundu.

Validasyon değerleri toplu olarak Çizelge 7.4'de verilmiştir.

Çizelge 7.4 : Etilmalonik asit için validasyon değerleri.

Gün içi iki injeksiyon arası (n=6) kesinlik:	
Düzeltilmiş pik alanı (A/t)	0.89
Günler arası (n= 5x3 gün) kesinlik:	
Düzeltilmiş pik alanı (A/t)	1.91
LOD (µmol/L)	11.78
LOQ (µmol/L)	39.30
EMA eklenmiş normal idrar örnekleri (µmol/L)	Geri Kazanım (%)
25	96±2
50	96±2
100	98±2

7.3.1.5 Yöntemin hasta idrarında etilmalonik asit tayinine uygulanması

Yöntemin uygulanması etilmalonik asidüri tanısı konulmuş ve henüz tedavi altına alınmamış hasta idrar örneğinde geliştirdiğimiz yöntem ile etilmalonik asit tayini yapıldı. yapılan tayin sonrası gören bir tirozinemi tip I hastasının serum örneğinde bu ilacın tayinine uygulandı. Şekil 7.7 –C’ de etilmalonik asidürili bir hastanın idrar elektroferogramı görülmektedir. Bu örnekte idrar EMA konsantrasyonu 78.4 µmol/ L olarak tespit edilmiştir.

8. SONUÇLAR

8.1 Tartışma

Bu çalışmanın birinci ayağında, kalıtsal metabolizma hastalıklarından olan tirozinemi tip I' in tanısı için gerekli olan idrarda süksinilaseton düzeyi 2.17 dakika gibi kısa bir sürede herhangi bir ön işleme gerek duymaksızın yeni bir kapiler elektroforetik yöntem ile analiz edilmiştir [86]. Süksinilasetonun tanısı şimdiye kadar GC analizi ile yapılmaktaydı [87]. GC analizi için uzun zaman ve reaktif gereken ön türevlendirme işlemi uygulanmaktadır. CE çalışmasında idrar örnekleri seyreltilerek doğrudan injekte edilmiş ve çok kısa bir sürede süksinilaseton piki teşhis edilmiştir. Normal insan idrarında süksinilaseton bulunmadığı ve süksinilasetonun geliş süresi yakınlarında idrar matrisine ait bir pik görülmediği için CE yöntemiyle idrarda süksinilaseton pikinin görünümü tirozinemi tip 1 hastalığının hızlı ve ekonomik bir analiz yöntemiyle teşhisini sağlamaktadır.

Çalışmamızın ikinci ayağında, Tirozinemi tip I' in tedavisinde kullanılan NTBC' ilaç maddesinin serumda miktar tayinini hedeflemiştir. Tirozinemi Tip 1 hastaları için karaciğer nakli tek seçenekken, 1992 yılında NTBC nin bu hastalığın tedavisi için kullanılmaya başlanması bu genetik bozukluğa sahip çocuklar için büyük bir umut olmuştur. NTBC hala araştırma altında bir ilaçtır. NTBC kullanımına ait farklı ülkelerden ve farklı hastahanelerden klinik çalışmalar muntazam olarak raporlanmaktadır. Her yıl Avrupa ilaç organizasyonu (European Medicines Agency, EMA) NTBC uygulamaları hakkında yenilikleri tarayıp rapor etmektedir. Şu anda tavsiye edilen günlük doz vücut ağırlığı (kg) başına 1 mg dır. NTBC tedavisine cevabı az olan hastalarda bu doz arttırılabilmektedir. Ancak NTBC nin yan etkilerini minimumda tutmak için serum NTBC düzeyinin 40-50 $\mu\text{mol/L}$ de tutulması tavsiye edilir [28, 61, 87, 88]. Kişisel doz ayarlaması kişinin biyokimyasal cevabına ve serum NTBC seviyelerine göre ayarlanmaktadır. Serum NTBC seviyelerinin rutin olarak tespiti birçok laboratuvar için mümkün değildir. Şimdiye kadar bir kolon likid kromatografik metod [90] ve daha pahalı cihaz donanımı gerektiren bir LC-MS/MS

metod [91] literatürde rapor edilmiştir. Çalışmamızda gene serum örneğinin basit bir operasyonla deproteinize edilmesinden sonra direk injeksiyonu ile 4.1 dak. gibi çok kısa sürede NTBC teşhisi yapılmıştır [89].

Çalışmanın üçüncü ve son ayağında ise, etilmalonik asidüri teşhisi için, idrarda etilmalonik asit düzeyi 2.1 dakikalık bir zamanda herhangi bir ön işleme gerek duymaksızın indirekt dedeksiyon yardımıyla kolayca tespit edilmiştir.

Her üç yöntemde de minumum dedeksiyon limitleri hastalıkların teşhisi ve tedavi sürecindeki seyri açısından yeterli düzeydedir. Geliştirilen yöntemlerin her üçü de tekrarlanabilir sonuçlar vermektedirler.

CE'in biyolojik örneklerinin analizinde GC, GC- MS, HPLC'ye göre avantajı ön saflaştırma gerektirmeksizin örneklerin kolona injekte edilmesi ve çok az madde tüketimidir. Silika kolonlar farklı çözücülerle yıkanarak rejenere edilebilir ve HPLC kolonlara göre kıyaslanmayacak ölçüde ekonomiktir. CE yöntemlerinin, kısa analiz süreleri hem zaman hem de para yönünden ekonomi sağlamaktadır. Ayrıca cihazın kendi fiyatı ve sarf malzelerinin maliyeti düşünüldüğünde test başına maliyette önemli avantajlar sağlamaktadır.

Sonuç olarak, kapiler elektroforez, idrarda süksinilaseton tayini, serumda NTBC tayini ve idrarda etilmalonik asit tayini için hızlı, kolay, ucuz, basit ve klinik çalışmalar için uygun bir teknik olarak önerilmektedir.

KAYNAKLAR

- [1]-**Onat T**, 1996, *Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları*, İstanbul. Eksen Yayınları, Cilt 1, s: 294- 319
- [2]-**Hasanoğlu E, Düşünel R, Bideci A**, 2010, *Temel Pediatri*, Ankara, Güneş Tıp Kitabevi, s: 515-61
- [3]-**William L. Nyhan, Pınar T Ozand**, 1998, *Atlas of Metabolic Diseases*. London, Chapman & Hall Medical, p: 1,153, 646.
- [4]-**Fernandes F**, 2006, *Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment*. Heidelberg, Springer, Fourth, Revised Edition, p: 3,5,237,238.
- [5]-**Aktuğlu- Zeybek AÇ**, 2009, Tip 1 Tirozinemili Çocukların Klinik ve Laboratuvar Özellikleri İle Uzun Süreli İzlem Sonuçlarının Geriye Yönelik İncelenmesi, *Yan Dal Uzmanlık Tezi*, İstanbul Üniversitesi, Cerrahpaşa Tıp Fakültesi, İstanbul.
- [6]- **Mitchell G, Grompe M, Lambert M, Tanguay R**, 2001, *Hypertyrosinemia*. In: Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Vale D eds. *The Metabolic Basis of Inherited Disease*, 8th ed. New York: McGraw-Hill, 1777-1806
- [7]- **Russo PA, Mitchell GA, Tanguay RM**, 2001, *Tyrosinemia: A review*. *Pediatr Dev Pathol*. 4: 212-21.
- [8]-**Sweetman L**, 1991, *Organic acid analysis. In Hommes FA ed. Techniques in diagnostic Human Biochemical Genetics: A Laboratory Manual*. New York: Wiley-Liss, p 143
- [9]-**Jakobs C, Dorland L, Wikkerink B, Kok RM, de Jong AP, Wadman SK**, 1988, Stable isotope dilution analysis of succinylacetone using electron capture negative ion mass fragmentography: an accurate approach to the pre- and neonatal diagnosis of hereditary tyrosinemia type I. *Clin Chim Acta* **171** (2-3):223-231.
- [10]-**Mitchell GA, Rezvani Iraj**, 2007, *Tyrosine*. In: Kliegman RM, Behrman RE, Jenson HB, Stanton FB eds. *Nelson Textbook of Pediatrics* 18th ed. United States of America: Saunders, 532-536
- [11]-**Paradis K**, 1996, *Tyrosinemia: The Quebec experience*. *Clin Invest Med*. 19:311-6
- [12]-**Sakai K, Kitagawa T**, 1957, An atypical case of tyrosinosis (1-parahydroxyphenyllactic aciduria): I. Clinical and laboratory findings. *Jikei Med J*, 4: 1
- [13]-**Sakai K, Kitagawa T, Yoshioka K**, 1957, An atypical case of tyrosinosis (1-parahydroxyphenyllactic aciduria): III. The outcome of the patient: pathological and biochemical observations of the organ tissues. *Jikei Med J*, 6: 15

- [14]-**Lindblad B, Lindstedt S, Steen G**, 1977, On the enzymic defects in hereditary tyrosinemia. *Proc Natl Acad Sci USA* **74**:4641-4645
- [15]- **Falström SP, Lindblad B, Lindstedt S, Steen G**, 1979, Hereditary tyrosinemia-fumarylacetoacetate deficiency. *Pediatr Res*, **13**:78
- [16]-**Chakparani A, Holme E**, 2006, *Disorders of Tyrosine Metabolism*. In: Fernandes J, Saudubray JM, van den Berghe G, Walter JH eds. Inborn Metabolic Diseases Diagnosis and Treatment, 4th ed. Spinzer Medizin Verlag Heidelberg, 235-238
- [17]-**Van Spronsen FJ, Thomasse Y, Smit GPA, Leonard JV, Clayton PT, Fidler V, Berger R, Hugo S, Heymans HS**, 1994, Hereditary tyrosinemia type I: a new clinical classification with difference in prognosis on dietary treatment. *Hepatology*. **20**:1187-91
- [18]-**Nyhan WL, Bashop AB, Ozand PT**, 2005, *Hepatorenal tyrosinemia/fumarylacetoacetate hydrolase deficiency*. In: Nyhan WL, Bashop AB, Ozand PT eds. Atlas of Metabolic Diseases 2nd ed: London, Hodder Education 175-182
- [19]-**Hostetter MK, Levy HL, Winter HS, Knight GJ, Haddow JE**, 1983, Evidence for liver disease preceding amino acid abnormalities in hereditary tyrosinemia. *N Engl J Med*. **308**:1265-7
- [20]-**Croffie JM, Gupta SK, Chong SK, Fitzgerald JF**, 1999, Tyrosinemia type I should be suspected in infants with severe coagulopathy even in the absence of other signs of liver failure. *Pediatrics*, **103**:675-8
- [21]-**Dehner LP, Snover DC, Sharp HL, Ascher N, Nakhleh R, Day DL**, 1989, Hereditary tyrosinemia type I (chronic form): pathological findings in liver. *Hum Pathol*, **20**:149-158
- [22]-**Mitchell GA, Russo P, Dubois J, Alvarez F**, 2001, *Tyrosinemia*. In: Suchy FJ, ed. Liver Disease in Children, 2nd edition. St. Louis: Mosby-Year Book, 667-686
- [23]-**Larochelle J, Mortezaei A, Belanger M, Tremblay M, Claveau JC, Aubin G**, 1997, Experience with 37 infants with tyrosinemia. *Canad. Med. Ass. J*. **97**:1051-1054
- [24]-**Weinberg AG, Mize CE, Worthen HG**, 1976, The occurrence of hepatoma in the chronic form of hereditary tyrosinemia. *J Pediatr* **88**: 434-. 438
- [25]-**Fellman JH, Fujita TS, Roth ES**, 1972, Assay, properties and tissue distribution of p-hydroxyphenylpyruvate hydroxylase. *Biochim Biophys Acta* **284**: 90-100
- [26]-**Lindblad B, Fallström SP, Höyer S, Nordborg C, Solymar L, Velandar H**, 1987, Cardiomyopathy in fumarylacetoacetate deficiency (hereditary tyrosinemia): a new feature of the disease *J Inherited Metab Dis* **10**(Suppl 2):**319**-322
- [27]-**Arora N, Stumper O, Wright J, Kelly DA, McKiernan PJ**, 2006, Cardiomyopathy in tyrosinemia type I is common but usually benign. *J Inher Metab Dis* **29**:54-57

- [28]-**Santra S, Baumann U**, 2008, Experience of nitisinone for the pharmacological treatment of hereditary tyrosinaemia type I. *Expert Opin Pharmacother*, **9**:1229-36.
- [29]-**Sassa S, Kappas A**, 1983, Hereditary tyrosinemia and the heme biosynthetic pathway. Profound inhibition of δ -aminoalevulinic acid dehydratase activity by succinylacetone. *J Clin Invest*, **71**: 625-634
- [30]-**St-Louis M, Tanguay RM**, 1997, Mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene causing hereditary tyrosinemia type I: overview. *Hum Mutat*, **9**:291–299
- [31]-**Bergman AJIW, van den Berg IET, Brink W, Poll-The BT, Ploos van Amstel JK, Berger R**, 1998, Spectrum of mutations in the fumarylacetoacetate hydrolase gene of tyrosinemia type 1 patients in northwestern Europe and Mediterranean countries. *Hum Mutat*, **12**:19–26.
- [32]-**Poudrier J, Lettre F, Scriver CR, Larochelle J, Tanguay RM**, 1998 Different clinical forms of hereditary tyrosinemia (type I) in patients with identical genotypes. *Mol Genet Metab*, **64**:119–125
- [33]-**Kogut MD, Shaw KN, Donnell GN**, 1967, *Tyrosinosis*. *Am J Dis Child* **113**: 47-53.
- [34]-**Christensen E, Jacobsen BB, Gregersen N, Hjeds H, Pedersen JB, Brandt NJ, Baekmark UB**, 1981, Urinary excretion of succinylacetone and delta-aminolevulinic acid in patients with hereditary tyrosinemia. *Clin Chim Acta*, **116** (3):331-41.
- [35]-**Grompe M**, 2001, The pathophysiology and treatment of hereditary tyrosinemia type 1. *Semin Liver Dis*, **21**:563-71.
- [36]-**Kvittingen EA, Halvorsen S, Jellum E**, 1983, Deficient fumarylacetoacetate fumarylhydrolase activity in lymphocytes and fibroblasts from patients with hereditary tyrosinemia. *Pediatr Res*, **17**: 541-544.
- [37]-**Frazier DM, Millington DS, McCandless SE, Koeberl DD, Weavil SD, Chaing SH, Muenzer J**, 2006, The tandem mass spectrometry newborn screening experience in North Carolina: 1997-2005. *J Inherit Metab Dis*. **29** (1):76-85.
- [38]-**Zytkovicz TH, Fitzgerald EF, Marsden D, Larson CA, Shih VE, Johnson DM, Strauss AW, Comeau AM, Eaton RB, Grady GF**, 2001, Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program. *Clin Chem*. **47**(11):1945-55.
- [39]-**Han LS, Ye J, Qiu WJ, Gao XL, Wang Y, Gu XF**, 2007, Selective screening for inborn errors of metabolism on clinical patients using tandem mass spectrometry in China: a four-year report. *J Inherit Metab Dis*. **30**(4):507-14.
- [40]-**Laberge C, Grenier A, Valet JP, Morissette J**, 1990, Fumarylacetoacetase measurement as a mass-screening procedure for hereditary tyrosinemia type I. *Am J Hum Genet*. **47**(2):325-8.

- [41]-**Kvittingen EA, Rootwelt H, van Dam T, van Faassen H, Berger R**, 1992, Hereditary tyrosinemia type I: lack of correlation between clinical findings and amount of immunoreactive fumarylacetoacetase protein. *Pediatr Res*. **31**(1):43-6.
- [42]-**Schulze A, Frommhold D, Hoffmann GF, Mayatepek E**, 2001, Spectrophotometric microassay for delta-aminolevulinate dehydratase in dried-blood spots as confirmation for hereditary tyrosinemia type I. *Clin Chem*. **47**(8):1424-9.
- [43]-**Allard P, Grenier A, Korson MS, Zytkevich TH**, 2004, Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia by tandem mass spectrometry: analysis of succinylacetone extracted from dried blood spots. *Clin Biochem*. **37**(11):1010-5.
- [44]-**Magera MJ, Gunawardena ND, Hahn SH, Tortorelli S, Mitchell GA, Goodman SI, Rinaldo P, Matern D**, 2006, Quantitative determination of succinylacetone in dried blood spots for newborn screening of tyrosinemia type I. *Mol Genet Metab*. **88**(1):16-21.
- [45]-**Sander J, Janzen N, Peter M, Sander S, Steuerwald U, Holtkamp U, Schwahn B, Mayatepek E, Trefz FK, Das AM**, 2006, Newborn screening for hepatorenal tyrosinemia: Tandem mass spectrometric quantification of succinylacetone. *Clin Chem*. **52**(3):482-7.
- [46]-**Turgeon C, Magera MJ, Allard P, Tortorelli S, Gavrillov D, Oglesbee D, Raymond K, Rinaldo P, Matern D**, 2008, Combined newborn screening for succinylacetone, amino acids, and acylcarnitines in dried blood spots. *Clin Chem*. **54**(4):657-64.
- [47]-**Pettit BR, MacKenzie F, King GS, Leonard JV**, 1984, The antenatal diagnosis and aid to the management of hereditary tyrosinaemia by use of a specific and sensitive GC-MS assay for succinylacetone. *J Inher Metab Dis*. **7** Suppl 2:135-6.
- [48]-**Jakobs C, Stellaard F, Kvittingen EA, Henderson M, Lilford R**, 1990, First-trimester prenatal diagnosis of tyrosinemia type I by amniotic fluid succinylacetone determination. *Prenat Diagn*. **10**:133-4.
- [49]-**Jakobs C, Dorland L, Wikkerink B, Kok RM, de Jong AP, Wadman SK**, 1988, Stable isotope dilution analysis of succinylacetone using electron capture negative ion mass fragmentography: an accurate approach to the pre- and neonatal diagnosis of hereditary tyrosinemia type I. *Clin Chim Acta*. **171**:223-31.
- [50]-**Gagné R, Lescault A, Grenier A, Laberge C, Mélançon SB, Dallaire L**, 1982, Prenatal diagnosis of hereditary tyrosinaemia: measurement of succinylacetone in amniotic fluid. *Prenat Diagn*. **2**:185-8.
- [51]-**Grenier A, Cederbaum S, Laberge C, Gagné R, Jakobs C, Tanguay RM**, 1996, A case of tyrosinaemia type I with normal level of succinylacetone in the amniotic fluid. *Prenat Diagn*. **16**(3):239-42.
- [52]-**Poudrier J, Lettre F, St-Louis M, Tanguay RM**, 1999, Genotyping of a case of tyrosinaemia type I with normal level of succinylacetone in amniotic fluid. *Prenat Diagn*. **19** (1):61-3.

- [53]-**Kvittingen EA, Brodtkorb E**, 1986, The pre- and post-natal diagnosis of tyrosinemia type I and the detection of the carrier state by assay of fumarylacetoacetase. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* **184**:35-40.
- [54]-**Kvittingen EA, Steinmann B, Gitzelmann R, Leonard JV, Andria G, Borresen AL, Mossman J, Micara G, Lindblad B**, 1985, Prenatal diagnosis of hereditary tyrosinemia by determination of fumarylacetoacetase in cultured amniotic fluid cells. *Pediatr Res.* **19**:334-7.
- [55]-**Kvittingen EA, Guibaud PP, Divry P, Mandon G, Rolland MO, Domenichini Y, Jakobs C, Christensen E**, 1986, Prenatal diagnosis of hereditary tyrosinaemia type I by determination of fumarylacetoacetase in chorionic villus material. *Eur J Pediatr.* **144**(6):597-8)
- [56]-**Lock EA, Ellis MK, Gaskin P, Robinson M, Auton TR, Provan WM, Smith LL, Prisbylla MP, Mutter LC, Lee DL**, 1998, From toxicological problem to therapeutic use: the discovery of the mode of action of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione (NTBC), its toxicology and development as a drug. *J Inherit Metab Dis.* **21**(5):498-506.
- [57]-**McKiernan PJ**, 2006, Nitisinone in the treatment of hereditary tyrosinaemia type 1. *Drugs.* **66**(6):743-50.
- [58]-**Lock EA, Gaskin P, Ellis MK, Provan WM, Robinson M, Smith LL, Prisbylla MP, Mutter LC**, 1996, Tissue distribution of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)cyclohexane-1-3-dione (NTBC): effect on enzymes involved in tyrosine catabolism and relevance to ocular toxicity in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* **141**(2):439-47.
- [59]-**Lock EA, Gaskin P, Ellis MK, Robinson M, Provan WM, Smith LL**, 1998, The effect of a low-protein diet and dietary supplementation of threonine on tyrosine and 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)cyclohexane-1,3-dione-induced corneal lesions, the extent of tyrosinemia, and the activity of enzymes involved in tyrosine catabolism in the rat. *Toxicol Appl Pharmacol.* **150**(1):125-32.
- [60]-**Hall MG, Wilks MF, Provan WM, Eksborg S, Lumholtz B**, 2001, Pharmacokinetics and pharmacodynamics of NTBC (2-(2-nitro-4-fluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione) and mesotrione, inhibitors of 4-hydroxyphenyl pyruvate dioxygenase (HPPD) following a single dose to healthy male volunteers. *Br J Clin Pharmacol.* **52**(2):169-77.
- [61]-**Holme E, Lindstedt S**, 1998, Tyrosinemia type I and NTBC (2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanodione. *J Inherit Metab Dis* **21**:507-517.
- [62]-**Nyhan WL**, 1984, *Ethylmalonic aciduria*: in Abnormaities in Amino Acid Metabolisam in Clinical Medicine. Appleton Century Crofts, Norwalk CN, 118.
- [63]-**Tanaka K, Mantago S, Genel M, et al**, 1977, New defect in fatty acid metabolism with hypoglycemia and organic aciduria. *Lancet* **2**:986.

- [64]-**Goodman SI, Frerman FE, Loehr JP**, 1987, Recent progress in understanding glutaric acidurias. *Enzyme* **38**:76.
- [65]-**Bennet MJ, Gray RGF, Isherwood DM, et al**, 1985, The diagnosis and biochemical investigation of a patient with short chain fatty oxidation defect. *J Inherit Metab Dis* **8**:135.
- [66]-**Burlina AB, Zachello F, Donisi-Vici C, et al.**, 1991, New clinical phenotype of branched-chain acyl-co A defect. *Lancet* **338**:1522.
- [67]-**Burlina AB, Dionisi-Vici C, Bennett MJ, et al.**, 1994, A new syndrome with ethylmalonic aciduria and normal fatty acid oxidation in fibroblasts. *J Pediatr* **124**:79.
- [68]-**Ozand PT, Rashed M, Millington DS, Sakati N, Hazzaa S, Rahbeeni Z, al Odaib A, Youssef N, Mazrou A, Gascon GG, et al.**, 1994, Ethylmalonic aciduria: an organic acidemia with CNS involvement and vasculopathy. *Brain Dev.* **16** Suppl:12-22.
- [69]-**McGowan KA, Nyhan WL, Barshop BA, Naviaux RK, Yu A, Haas RH, Townsend JJ**, 2004, The role of methionine in ethylmalonic encephalopathy with petechiae. *Arch Neurol.* **61**(4):570-4.
- [70]-**Chen E, Jerucki ER, Rinaldo P, et al.**, 1994, Nephrotic syndrome and dysmorphic facial features in a new family of three affected siblings in ethylmalonic encephalopathy. *Am J Hum Genet* **55**:A2000.
- [71]-**Duran M, Dorland L, van den Berg IET, et al.**, 1997, The ethylmalonic acid syndrome is associated with dearranged sulfur amino acid metabolism leading to urinary excretion of thiosulfate and sulfothiocysteine. *Vienna VII th International Congress on Inborn Errors of Metabolism*. Abstract 048.
- [72]- **Hegre CS, Halenz DK, Lane MD**, 1959, The enzymatic carboxylation of butyryl coenzyme A. *J AM Chem Soc* **81**:6526
- [73]- **Rétey J, Smith EH, Zagalak B**, 1978, Investigation of the mechanism of the methylmalonyl-CoA mutase reaction with the substrate analogue: ethylmalonyl-CoA. *Eur J Biochem.* **83**(2):437-51.
- [74]- **Garavaglia B, Colamaria V, Carrara F, Tonin P, Rimoldi M, Uziel G**, 1994, Muscle cytochrome c oxidase deficiency in two Italian patients with ethylmalonic aciduria and peculiar clinical phenotype. *J Inherit Metab Dis.* **17**(3):301-3.
- [75]- **Zeviani M, Tiranti V, D'Aadamo P, et al.**, 2004, Ethylmalonic encephalopathy is due to mutations in ETHE1. *J Inherit Metab Dis* **27**: (suppl1) :177-O.
- [76]- **Bischoff C, Vang S, Burlina A, et al.**, 2004, High levels of EMA in suspected SCAD patients are in certain cases due to defects in ETHE1 gene. *J Inherit Metab Dis* **27**: (Suppl 1) : 176-P
- [77]- **Jongerson JW and Lukacs KD**, 1891, Zone Electrophoresis in Open- Tubular Glass Capillaries. *Anal Chem.* **53**, 1298.
- [78]-**Engelhardt, H. and Beck, W., Schmitt, T**, 1994. *Capillary Electrophoresis* , *Lengericher Handelsdruckerei*, Lengerich.

- [79]- <http://ull.chemistry.uakron.edu/chemsep/electrophoresis>.
- [80]-**Bjergegaard, C. And Michaelsen, S.**, 1999, *Chromatography and Capillary Electrophoresis in Food Analysis*, Paston Prepress, Denmark.
- [81]-**Heigher, D.N.**, 1992, *High Performance Capillary Electrophoresis*, Hewlett Packard GmbH, Germany.
- [82]-**García A, Barbas C, Aguilar R**, 1998, Castro M. Capillary electrophoresis for rapid profiling of organic acidurias. *Clin Chem.* **44**(9):1905-11.
- [83]-**García A, Barbas C**, 2003, Capillary electrophoresis for the determination of organic acidurias in body fluids: a review. *Clin Chem Lab Med.* **41**(6):755-61. Review.
- [84]-**Baena B, Cifuentes A, Barbas C**, 2005. Analysis of carboxylic acids in biological fluids by capillary electrophoresis. *Electrophoresis.* **26**(13):2622-36. Review.
- [85]-**Barbas C, Vallejo M, García A, Barlow D, Hanna-Brown M**, 2008, Capillary electrophoresis as a metabolomic tool in antioxidant therapy studies. *J Pharm Biomed Anal.* **9**;47(2):388-98.
- [86]-**Cansever MS, Erim FB**, 2005, Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* **818**(2):309-11.
- [87]-**Crone J, Möslinger D, Bodamer OA, Schima W, Huber WB, Holme E, Stöcker Ipsiroglu S**, 2003, Reversibility of cirrhotic regenerative liver nodules upon NTBC treatment in a child with tyrosinemia type I. *Acta Paediatr* **92**:625-628
- [88]-**Pitkänen S, Salo MK, Vettenranta K, Näntö-Salonen K, Heikinheimo M**, 1999, Serum type III procollagen in children with type I hereditary tyrosinemia. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* **29**:38-41
- [89]- **Cansever MS. , Aktuğlu-Zeybek AC, Erim FB**, 2009, Determination of NTBC in serum samples from patients with hereditary tyrosinemia type I by capillary electrophoresis. *Talanta*. Online publication complete:14-NOV-2009 DOI :10.1016/j.talanta. 10.032
- [90]-**Bielenstein M., Astner L., Ekberg S.**, 1999, Determination of 2-(2-nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)-1,3-cyclohexanedione in plasma by direct injection into a coupled column liquid chromatographic system. *J.Chromatogr.B*, 730 (2)) 177-82.
- [91]-**Herebian D, Spiekerkötter U., Lamshöft M., Thimm E., Laryea M, Mayatepek E.**, 2009, Liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantitation of NTBC (2-(nitro-4-trifluoromethylbenzoyl)1,3-cyclohexanedione) in plasma of tyrosinemia type 1 patients. *J.Chromatogr.B*, 877 1453
- [92]-**Erim FB, Cifuentes A, Poppe H, Kraak JC**, 1996, Selectivity change in the separation of proteins and peptides by capillary electrophoresis using high-molecular-mass polyethyleneimine. *J Chromatogr B Biomed Appl.* **31**;681(1):21-7.

ÖZGEÇMİŞ

Ad Soyad: Mehmet Şerif Cansever

Doğum Yeri ve Tarihi: Birecik, 25.01.1970

Adres: Bahçelievler mah. Celal Nuri Sk. No:27 Daire:22 – Bahçelievler/
İSTANBUL

Lisans: Cumhuriyet Üniversitesi, Kimya Bölümü, 1995

Yüksek Lisans: İstanbul Üniversitesi, Adli Tıp Enstitüsü, Adli Fen Bilimleri, 1998

Yayın Listesi:

- **Cansever MS**, Erim FB. Determination of urinary succinylacetone by capillary electrophoresis for the diagnosis of tyrosinemia type I. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2005 Apr 25;818(2):309-11.
- Bozkurt P, Arslan I, Bakan M, **Cansever MS**. Free plasma levels of bupivacaine and ropivacaine when used for caudal block in children. *Eur J Anaesthesiol.* 2005 Aug;22(8):640-1
- Altintas F, Gumus F, Kaya G, Mihmanli I, Kantarci F, Kaynak K, **Cansever MS**. Interscalene brachial plexus block with bupivacaine and ropivacaine in patients with chronic renal failure: diaphragmatic excursion and pulmonary function changes. *Anesth Analg.* 2005 Apr;100(4):1166-71.
- Anaç O, Sezer Ö, Candan Ö, Güngör FŞ and **Cansever M.Ş.** Carbonyl ylide reactions of α -benzylidene- β -dicarbonyl compounds: competitive formation of dihydrofurans and dihydrobenzoxepines. *Tetrahedron Letters.* 2008 February ; 46(6): 1062-1065
- Anaç O, Güngör FŞ, Kahveci C and **Cansever MŞ.** Reaction of α - β –Enones with diazo Compunds. Reaction pathways from (Z)- and (E)- α - β –enones with dimethyl diazomalonate. *Helvetica Chimica Acta.* 2004; 87: 408-415.
- **Cansever MS.** , Aktuğlu-Zeybek AC, Erim FB, 2009, Determination of NTBC in serum samples from patients with hereditary tyrosinemia type I by capillary electrophoresis. *Talanta.* Online publication complete:14-NOV-2009 DOI :10.1016/j.talanta. 10.032

