



**ALFA-GALAKTOZİDAZ A EKSİKLİĞİ TANI VE TAKİBİNDE
KULLANILMAK ÜZERE LİZO-GLOBOTRİOZİL SERAMİD (LİZO-GB3)
DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ İÇİN LİKİT KROMATOĞRAFİSİ -ARDIŞIK KÜTLE
SPEKTROMETRİSİ (LC-MS/MS) METODU GELİŞTİRİLMESİ VE
VALİDASYONU**

Elif ERKAN KURDOĞLU

**DOKTORA TEZİ
BİYOKİMYA ANABİLİM DALI**

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

OCAK 2023

ETİK BEYAN

Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- Tez içinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
 - Tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
 - Tez çalışmada yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi,
 - Kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı,
 - Bu tezde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir,
- aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim.

Elif ERKAN KURDOĞLU

30/01/2023

ALFA-GALAKTOZİDAZ EKSİKLİĞİ TANI VE TAKİBİNDE KULLANILMAK
ÜZERE LİZO-GLOBOTRIOZİLSFİNGOZİN (Gb3) DÜZEYİ ÖLÇÜMÜ İÇİN LİKİT
KROMATOĞRAFİSİ -ARDIŞIK KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (LC-MS/MS) METODU
GELİŞTİRİLMESİ VE VALİDASYONU
(Doktora Tezi)

Elif ERKAN KURDOĞLU

GAZİ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Ocak 2023

ÖZET

Fabry hastalığı, α -galaktozidaz A (α -Gal A) enzim eksikliği ile sonuçlanan GLA genindeki mutasyonların neden olduğu, X'e bağlı nadir bir lizozomal depo hastalığıdır. Yetersiz α – galaktozidaz A aktivitesi glikosfingolipidler, globotriozilseramid (Gb3) ve globotriozilsfingozinin (Lizo-Gb3) lizozomlar içinde vasküler endotel, podositler, arteriyel düz kas hücreleri ve kardiyomiyositler dahil olmak üzere çeşitli hücre tiplerinde ilerleyici birikimine yol açar. Bu çalışmada Fabry hastalığı için en umut vadeden biyobelirteç, ikincil tarama hedefi olan Lizo-Gb3'ün plazma ve kuru kanda (DBS) ölçümü için basit, hızlı ve hassas bir yöntem önerilmiştir. Ön işlem olarak basit protein çöktürme metodu uygulanarak plazma ve kuru kan Lizo-Gb3 konsantrasyonları, UPLC-MS/MS'te pozitif elektrosprey iyonizasyonunda, Multiple reaction monitoring (MRM) kullanılarak ölçülmüştür. Yöntem geçerli kılma çalışmalarında, kalibrasyon aralığını 0,50 -100 ng/mL olarak elde edilmiştir. Gün- içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik (%CV) <10 olarak hesaplanmıştır. Tespit limiti (tayin alt sınırı) ve ölçüm limiti (teşhis sınırı) sırasıyla 0,1 ng/mL ve 0,3 ng/mL olarak saptanmıştır. Geri kazanım %95'in üzerinde saptanmıştır. Yöntem 97 adet sağlıklı kontrol grubunda ve 88 adet Fabry Hastalığı tarama grubunda uygulanmıştır. Lizo-Gb3 konsantrasyonları hem erkek hem de kadın Fabry hastalarında, sağlıklı kontrollere kıyaslandığında oldukça yüksek saptanmıştır ($p < 0,001$). Bu veriler yöntemin Fabry hastalarında plazma ve kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 tespiti için uygun olduğunu, tarama, tanı ve terapötik monitörizasyon için kullanılabileceğini göstermektedir.

Bilim Kodu : 1010.1
Anahtar Kelimeler : Lizo-Gb3, Fabry hastalığı, α -galaktozidaz A, UPLC-MS/MS
Sayfa Adedi : 120
Danışman : Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN

DEVELOPMENT OF LIQUID CHROMATOGRAPHY-TANDEM MASS
SPECTROMETRY (LC-MS/MS) QUANTIFICATION METHOD FOR LYSO-
GLOBOTRIAOSYLSPHINGOSINE (LYSO-GB3) FOR THE USAGE OF DIAGNOSIS
AND FOLLOW-UP OF ALPHA-GALACTOSIDASE A DEFICIENCY

(Ph. D. Thesis)

Elif ERKAN KURDOĞLU

GAZİ UNIVERSITY
GRADUATE SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

January 2023

ABSTRACT

Fabry disease is a rare X-linked lysosomal storage disease caused by mutations in the GLA gene resulting in α -galactosidase A (α -Gal A) enzyme deficiency. Insufficient α -galactosidase A activity leads to the progressive accumulation of glycosphingolipids, globotriaosylceramide (Gb3) and globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) within lysosomes in various cell types, including vascular endothelium, podocytes, arterial smooth muscle cells, and cardiomyocytes. In this study, a simple, rapid and sensitive method is proposed for the measurement of Lyso-Gb3, the most promising biomarker for Fabry disease, the secondary screening target, in plasma and dry blood (DBS). Plasma and dried blood sample (DBS) Lyso-Gb3 concentrations were measured using multiple reaction monitoring (MRM) in positive electrospray ionization in UPLC-MS/MS using the simple protein precipitation method as a pretreatment. In method validation studies, calibration range was obtained as 0.50 -100 ng/mL. Intra-day and inter-day accuracy and precision (%CV) were calculated as <10%. Limit of detection and limit of quantification were determined as 0.1 ng/mL and 0.3 ng/mL, respectively. Recovery was over 95%. The method was applied in 97 healthy control group and 88 Fabry Disease screening group. Lyso-Gb3 concentrations were found to be quite high in both male and female Fabry patients compared to healthy controls ($p < 0.001$). These data show that the method is suitable for detection of Lyso-Gb3 in plasma and dried blood samples (DBS) from Fabry patients and can be used for screening, diagnosis and therapeutic monitoring.

Science Code : 1010.1

Key Words : Lyso-Gb3, Fabry disease, α -galactosidase A, UPLC-MS/MS

Page Number : 120

Supervisor : Prof. Dr. Yeşim Özkan

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim süresince, değerli yardım ve katkılarıyla bana rehberlik eden ve anlayışını hiç esirgemeyen saygıdeğer hocam Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN'a,
Tez İzleme Komitesi üyeleri olan, bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım Prof. Dr. Aymelek GÖNENÇ'e, Prof. Dr. Uğur TAMER'e, Prof. Dr. Sevgi AKAYDIN'a,
doktora çalışmam için bana koşulsuz destek veren Düzen Laboratuvarlar Grubu kurucusu ve yöneticisi sayın Prof. Dr. Yahya Rauf LALELİ'ye,
Bu süreçte bana destek veren arkadaşlarıma, beni yetiştiren, her zaman yanımda olan, koşulsuz destekleyen, sevgiyle sarmalayan canım annem, babama ve kardeşlerime,
güzel enerjileriyle bana güç veren çocuklarım Duru, Can Kuzey ve eşim Nazım KURDOĞLU'na sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ÖZET	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
İÇİNDEKİLER	vii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	xi
ŞEKİLLERİN LİSTESİ	xiv
RESİMLERİN LİSTESİ	xvi
SİMGELER VE KISALTMALAR.....	xvii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Doğumsal Metabolik Hastalıklar	3
2.2. Lizozomal Depo Hastalıkları	6
2.2.1. Lizozom	6
2.2.2. Lizozomal depo hastalıkları genel bilgi.....	7
2.2.3. Sfingolipidozlar	8
2.2.4. Fabry hastalığı	12
2.2.5. Fabry hastalığı sınıflandırması	24
2.2.6. Fabry hastalığı tanısı.....	25
2.2.7. Fabry hastalığının teşhisindeki zorluklar ve güncel sorunlar	28
2.2.8. Fabry hastalığının tedavisi.....	29
2.2.9. Biyobelirteçler	33
2.2.10. Biyolojik örnekler için ayırma teknikleri	41
3. GEREÇ VE YÖNTEM	51
3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	51

	Sayfa
3.2. Kullanılan Kimyasallar	51
3.3. Kullanılan Cam ve Plastik Malzemeler/Sarflar.....	52
3.4. Etik Onay ve Çalışma Grubu	53
3.4.1 Çalışma grubunun işleme ve dışlama kriterleri	53
3.5. Metot Geliştirme Çalışmaları	53
3.5.1. Standart /reaktif /çözeltilerin hazırlanması.....	53
3.5.2. MS/MS metot geliştirme çalışmaları.....	55
3.5.3. UPLC metot geliştirme çalışmaları	56
3.5.4. Lizo-Gb3 Kalibrasyon standartlarının hazırlanması.....	58
3.5.5. Lizo-Gb3 plazma örnekleri ekstraksiyon metodu	59
3.5.6. Lizo-Gb3 kuru kan örnekleri ekstraksiyon metodu	60
3.6. Lizo-Gb3 Plazma Metot Geçerli Kılma Çalışmaları.....	60
3.6.1. Lizo-Gb3 plazma metodu doğrusalılık çalışması	60
3.6.2. Lizo-Gb3 plazma metodu tekrarlanabilirlik çalışması	62
3.6.3. Lizo-Gb3 plazma metodu geri kazanım çalışması	63
3.6.4. Lizo-Gb3 plazma metodu tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) çalışması.....	64
3.6.5. Lizo-Gb3 plazma metodu interferans çalışması	65
3.7. Lizo-Gb3 kuru kan metot geçerli kılma çalışmaları	66
3.7.1. Lizo-Gb3 kuru kan metodu doğrusalılık çalışması.....	66
3.7.2. Lizo-Gb3 kuru kan metodu tekrarlanabilirlik çalışması.....	67
3.7.3. Lizo-Gb3 kuru kan metodu tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) çalışması ...	68
3.7.4. Lizo-Gb3 kuru kan metodu geri kazanım çalışması	69
3.7.5. Lizo-Gb3 kuru kan metodu stabilite çalışması	69
3.8. Alfa-galaktozidaz A enzim aktivitesi ölçümü:.....	70
3.8.1. Standart /reaktif /çözeltilerin hazırlanması.....	70
3.8.2. Alfa-galaktozidaz A enzim analizi test çalışma talimatı	71

	Sayfa
3.9. GLA dizi analizi	73
3.10. İstatiksel Analiz.....	73
4. BULGULAR	75
4.1. Metot Geliştirme	75
4.2. Seçicilik.....	75
4.3. Linearite	76
4.3.1. Plazma Lizo-Gb3 kalibrasyon standartları	76
4.3.2. Kuru kan Lizo-Gb3 kalibrasyon standartları	77
4.4. Tekrarlanabilirlik (Presizyon)	77
4.4.1. Plazma Lizo-Gb3 tekrarlanabilirlik	77
4.4.2. Kuru kan Lizo-Gb3 tekrarlanabilirlik.....	78
4.5. Geri Kazanım (Recovery)	79
4.5.1. Plazma Lizo-Gb3 geri kazanım	79
4.5.2. Kuru kan Lizo-Gb3 geri kazanım	79
4.6. Tespit limiti (LOD), Ölçüm limiti (LOQ).....	79
4.7. Stabilitate Çalışması.....	80
4.8. İnterferans Çalışması.....	80
4.9.1. Arşiv örnekleri ile yapılan çalışma	81
4.9.2. Dış merkezle yapılan karşılaştırma çalışması (Doğruluk).....	82
4.9.3. Arşiv kuru kan örnekleri ile yapılan Lizo-Gb3, α -gal A analizleri	83
4.10. İstatistik Çalışmaları.....	84
4.10.1 Lizo-Gb3 ve α -galaktozidaz A enzim aktivite testlerinin korelasyonu ...	86
4.10.2. Lizo-Gb3 ve α -galaktozidaz A ROC eğrileri ve değerlendirmeleri	89
5. TARTIŞMA	97
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	103
KAYNAKÇA.....	105

	Sayfa
EKLER.....	115
ÖZGEÇMİŞ.....	119



ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 2.1. Doğumsal metabolik hastalıkların klinik sınıflandırması.....	5
Çizelge 2.2. SSIEM sınıflandırmasındaki ana gruplar.....	5
Çizelge 2.3. Sfingolipidozlar	8
Çizelge 2.4. Fabry Hastalığı Prevalansı	15
Çizelge 2.5. Fabry Hastalığının erken işaretleri ve semptomları.....	17
Çizelge 2.6. Yaşa göre Fabry hastalığının tipik belirti ve semptomları.....	18
Çizelge 2.7. Fabry hastalığı tanısında altın-standart metotlar.....	26
Çizelge 3.1. Araç ve Gereçler	51
Çizelge 3.2. Kimyasallar.....	52
Çizelge 3.3. Cam ve plastik malzemeler/sarflar	52
Çizelge 3.4. Kütle dedektörü (MS/MS) ayarlama (tüne) parametreleri.....	55
Çizelge 3.5. MSMS metot MRM parametreleri.....	55
Çizelge 3.6. UPLC metot-1 parametreleri	56
Çizelge 3.7. UPLC metot-1 gradient programı	56
Çizelge 3.8. UPLC metot-2 parametreleri	57
Çizelge 3.9. UPLC metot-2 gradient programı.....	57
Çizelge 3.10. Plazma kalibrasyon standartları.....	58
Çizelge 3.11. Kuru kan kalibrasyon standartları.....	59
Çizelge 3.12. Lizo-Gb3 plazma kalibrasyon standartları günler-arası değişimi.....	61
Çizelge 3.13. Lizo-Gb3 kuru kan ortalama standart konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri.....	61
Çizelge 3.14. Plazma kontrolü QC1, gün içi tekrarlanabilirlik.....	62
Çizelge 3.15. Plazma kontrolü QC2, gün içi tekrarlanabilirlik.....	62
Çizelge 3.16. Plazma kontrolü QC3, gün içi tekrarlanabilirlik.....	62
Çizelge 3.17. Plazma kontrolü EC1/EC2, gün içi tekrarlanabilirlik.....	63

Çizelge	Sayfa
Çizelge 3.18. Plazma kontrolleri QC1, QC2 ve QC3 günler arası tekrarlanabilirlik.....	63
Çizelge 3.19. Lizo-Gb3 plazma geri kazanım çalışması.....	64
Çizelge 3.20. Plazma Lizo-Gb3 tespit/ölçüm limiti çalışması.....	64
Çizelge 3.21. Plazma Lizo-Gb3 interferans çalışması	65
Çizelge 3.22. Plazma Lizo-Gb3 stabilite çalışması	65
Çizelge 3.23. Lizo-Gb3 kuru kan kalibrasyon standartları günler-arası değişimi	66
Çizelge 3.24. Lizo-Gb3 kuru kan ortalama standart konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri.....	67
Çizelge 3.25. Kuru kan kontrolü QC-01 gün içi tekrarlanabilirlik	68
Çizelge 3.26. Kuru kan kontrolü QC-2 gün içi tekrarlanabilirlik	68
Çizelge 3.27. Kuru kan kontrolleri QC-01ve QC-02 günler arası tekrarlanabilirlik	68
Çizelge 3.28. Kuru kan Lizo-Gb3 tespi/ölçüm limiti çalışması.....	69
Çizelge 3.29. Kuru kan Lizo-Gb3 geri kazanım çalışması	69
Çizelge 3.30. Kuru kan Lizo-Gb3 stabilite çalışması	70
Çizelge 3.29. Alfa-galaktozidaz kuru kan kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	71
Çizelge 3.30. Alfa-galaktozidaz lökosit kalibrasyon standartlarının hazırlanışı	72
Çizelge 4.1. Lizo-Gb3 plazma kalibrasyon verileri	77
Çizelge 4.2. Lizo-Gb3 kuru kan kalibrasyon verileri	77
Çizelge 4.3. Lizo-Gb3 plazma QC1, QC2 ve QC3 gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik.....	78
Çizelge 4.4. Lizo-Gb3 plazma EC1, EC2 gün içi tekrarlanabilirlik	78
Çizelge 4.5. Lizo-Gb3 kuru kan QC-01, QC-02 gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik	78
Çizelge 4.6. Lizo-Gb3 plazma geri kazanım çalışmaları	79
Çizelge 4.7. Lizo-Gb3 kuru kan geri kazanım çalışmaları	79
Çizelge 4.7. Lizo-Gb3 tespit/ölçüm limiti	80
Çizelge 4.9. Lizo-Gb3(plazma) sağlıklı birey çalışmaları	81

Çizelge	Sayfa
Çizelge 4.10. Sağlıklı bireylerin kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 ve α -Gal A çalışmaları.....	82
Çizelge 4.11. Dış merkezle paralel kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 çalışmaları.....	82
Çizelge 4.12. Çalışma grubu detayları.....	85
Çizelge 4.11. Vaka işleme özeti Lizo-Gb3 (kuru kan)	89
Çizelge 4.12. Lizo-Gb3 kuru kan ROC eğrisi açıklamaları.....	90
Çizelge 4.13. ROC eğrisi koordinatları.....	90
Çizelge 4.14. Vaka işleme özeti Lizo-Gb3 (plazma).....	91
Çizelge 4.15. Lizo- Gb3(plazma) ROC eğrisi açıklamalar.....	91
Çizelge 4.16. ROC eğrisi koordinatları.....	91
Çizelge 4.17. Vaka işleme özeti α -gal A (kuru kan).....	93
Çizelge 4.18. α -gal A (kuru kan) ROC eğrisi açıklamaları	93
Çizelge 4.19. ROC eğrisi koordinatları.....	93
Çizelge 4.20. Vaka işleme özeti α -gal A (lökosit).....	94
Çizelge 4.21. α -gal A (lökosit) ROC eğrisi açıklamaları.....	94
Çizelge 4.22. ROC eğrisi koordinatları.....	94
Çizelge 5.1. Yayınlanmış plazma Lizo-Gb3 metotları	98

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 2.1. Metabolizma sürecinin doğuştan gelen hataları:	4
Şekil 2.2. Lizozom	7
Şekil 2.3. Sfingolipidozların Metabolik Yolakları.....	9
Şekil 2.4. Birtakım sfingolipidlerin ortak yapıları	11
Şekil 2.5. Gb3 metabolik yolağı	13
Şekil 2.6. Fabry hastalığından etkilenen bir anneden hastalığın kalıtımı	16
Şekil 2.7. Fabry hastalığından etkilenen bir babadan hastalığın kalıtımı	17
Şekil 2.8. Fabry Hastalığı tanı algoritması.....	28
Şekil 2.9. Seramid yoluna ve Fabry hastalığına ait onaylı tedavilerin ve gelecekteki tedavilerin terapötik hedefleri	33
Şekil 2.10. Gb3 kimyasal yapısı Sağlıklı bireylerde α -galaktosidaz A enziminin Gb3'ten ayırdığı üçüncü şeker bölgesi kırmızı ok ile işaretlenmiştir	36
Şekil 2.11. Gb-3 nasıl parçalanır.....	37
Şekil 2.12. Globotrioilsfingozine (Lizo-Gb3) kimyasal yapısı.....	38
Şekil 2.13. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bileşenleri.....	42
Şekil 2.14. Kütle spektrometresinin bileşenleri	45
Şekil 2.15. ESI iyonizasyon ana bileşenler.....	46
Şekil 2.16. Ardışık kütle spektrometresinin (MS/MS) şematik gösterimi.....	48
Şekil 3.1. Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3	57
Şekil 3.2. Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3	58
Şekil 3.3. Standart Lizo-Gb3 (plazma) kalibrasyon grafiği.....	61
Şekil 3.4. Standart Lizo-Gb3 (kuru-kan) kalibrasyon grafiği	67
Şekil 3.5. Alfa-galaktozidaz A kuru kan analizi 4-MU kalibrasyon grafiği.....	72
Şekil 3.6. Alfa-galaktozidaz A lökosit analizi 4-MU kalibrasyon grafiği	73
Şekil 4.1. Std 100 μ g/L (Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3)	75

Şekil	Sayfa
Şekil 4.2. Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3 (Blank) Kör örnek.....	76
Şekil 4.3. Fabry hastası (Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3)	76
Şekil 4.4. α -gal A – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Erkek).....	83
Şekil 4.5. α -gal A – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Kadın)	84
Şekil 4.6. α -gal A (DBS) – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Erkek)	86
Şekil 4.7. α -gal A (DBS) – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Kadın)	87
Şekil 4.8. α -gal A (lökosit) – Lizo-Gb3 (plazma) korelasyon grafiği (Erkek)	88
Şekil 4.9. α -gal A (lökosit) – Lizo-Gb3 (plazma) korelasyon grafiği (Kadın)	88
Şekil 4.10. Lizo-Gb3 (kuru kan) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileri	90
Şekil 4.11. Lizo-Gb3 (plazma) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileri.....	92
Şekil 4.12. α -galaktozidaz A (kuru kan) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileri	93
Şekil 4.13. α -galaktozidaz A (lökosit) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğri.....	95
Şekil 5.1. Fabry hastalığı tanı algoritması	101

RESİMLERİN LİSTESİ

Resim	Sayfa
Resim 2.1. Böbrek biyopsisi; glomerüler podositlerin lizozomlarının görüntüsü	19
Resim 2.2. İletim dokusunun bir parçasını gösteren sol ventrikül endomiyokardiyal biyopsisi.....	20
Resim 2.3. Sağ posteromedial orta beyinde lezyon gösteren beyin.....	21
Resim 2.4. Kornea verticillata okla işaretli.....	22
Resim 2.5. Deri biyopsisi (ışık mikroskobu)	23



SİMGELER VE KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Simgeler

Açıklama

µg	mikrogram
µL	mikrolitre
dk	dakika
L	Litre
m/z	kütle/yük
mg	miligram
mL	mililitre
mm	milimetre
ng	nanogram
nmol	nanomol
rpm	dakikadaki devir sayısı (revolutions per minute)
s	saat

Kısaltmalar

Açıklama

ACE	Anjiotensin dönüştürücü enzim (Angiotensine converting enzyme)
AÇSAP	Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması
APcI	Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu
API	Atmosferik Basınç İyonizasyonu
APPI	Atmosferik Basınç Foto-İyonizasyon
ARB	Anjiotensin reseptör blokerleri
ARSA	Arilsülfataz A
ASAH1	Açılsfingosin deaçilaz
ATP	Adenozin trifosfat
AUC	Eğri altındaki alan (Area under curve)
CI	Kimyasal İyonizasyon

Kısaltmalar**Açıklama**

CID	Çarpışma Kaynaklı Ayrışma (Collision Induced Dissociation)
CRF	Chronic renal failure (Kronik böbrek yetmezliği)
CV	Varyasyon katsayısı (Coefficient of variation)
DBS	Kuru kan örneği (Dried Blood Sample)
DMH	Doğumsal Metabolizma Hastalıklar
DNA	Deoksiribonükleik asit
EI	Elektronik İyonizasyon
EKG	Elektrokardiografi
EMA	Avrupa İlaç Kurumu (European Medicines Agency)
ER	Endoplazmik retikulum
ERT	Enzim replasman tedavisi
ESI	Elektrosprey iyonizasyon
ESRD	Son dönem böbrek yetmezliği (End stage renal disease)
FDA	Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (U.S. Food and Drug Administration)
FH/FD	Fabry Hastalığı (Fabry Disease)
GALC	Galaktozilseramidaz geni
Gb3	Globotriozilseramid
GBA	Glukoseramidaz beta geni
GFC	Jel filtrasyon kromatografisi (Gel filtration Chromatography)
GFR	Glomüler filtrasyon hızı (Glomular filtration rate)
GLA	Alfa-galaktozidaz geni
GLB1	Asit beta galaktozidaz geni
GM1	GM1 Gangliosidoz
GM2	GM2 Gangliosidoz
GPC	Jel Geçirgenlik kromatografisi (Gel Permeation Chromatography)
GSL	Glikosfingolipid
H⁺	Hidrojen iyonu
HEXA	Beta-hekzosaminidaz A
HEXAB	Beta-hekzosaminidaz A+B
HGMD	İnsan Gen Mutasyonu Veritabanı (Human Gene Mutation Database)

Kısaltmalar	Açıklama
HM	Yüksek kütle (High mass)
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
LDH	Lizozomal Depo Hastalıkları
LM	Düşük kütle (Low mass)
LOD/LOQ	Tespit/ölçüm limiti (Limit of detection/quantification)
LVH	Left ventricular hypertrophy (Sol ventriküler hipertrofi)
Lizo-Gb3	Globotriosilsfingozin
MALDI	Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu
MRM	Çoklu reaksiyon izleme (Multiple reaction monitoring)
mRNA	Mesajcı ribonükleik asit
MS/MS	Ardışık kütle spektrometresi (Tandem mass spectrometry)
MS1	1. Kütle dedektörü
MS2	2. Kütle dedektörü
MSUD	Akçağaç Şurubu İdrar Hastalığı (Maple Syrup Urine Disease)
NGS	Yeni Nesil Dizileme (Next-generation sequencing)
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
OPA	orto-fitalaldehit
PCR	Polimeraz zincirleme tepkimesi (Polymerase Chain Reaction)
RNA	Ribonükleik asit
ROC	Alıcı işletim karakteristiği (Receiver operating characteristic)
RSHMB	Refik Saydam Hıfzısıhha Merkezi Başkanlığı
RVH	Sağ ventriküler hipertrofisi (Right ventricular hypertrophy)
SD	Standart sapma (Standart deviation)
SER	Seramid
SM	Sfingomiyelin
SMPD1	Asit singomiyelinaz
SRT	Substrat azaltma terapisi (Substrate reduction therapy)
SSIEM	Society for The Study of Inborn Errors of Metabolism
TOF	Uçuşlu zamanlı dedektör
UPLC	Ultra Performans Sıvı Kromatografisi
VUS	Önemi belirsiz bir varyant (Variance of unknown significance)
α-Gal A	Alfa-galaktozidaz A enzimi

1. GİRİŞ

Fabry hastalığı, α -galaktozidaz A genindeki (GLA) mutasyonlara bağlı, α -galaktozidaz A (α -GalA) enzimatik aktivitesinin yokluğu veya belirgin bir şekilde azalmasıyla sonuçlanan, X bağlantılı nadir bir lizozomal depo bozukluğudur.

Alfa-galaktozidaz A eksikliği, vasküler endotelde ve diğer dokularda ağırlıklı olarak globotriozilseramid (Gb3) ve globotriozilsfingozin (Lizo-Gb3) olmak üzere glikolipitlerin sistemik lizozomal birikimine neden olur [1, 2]. Fabry hastalığı klasik ve de geç-başlangıçlı olarak sınıflandırılabilir [3]. Klasik fenotip, α -Gal A aktivitesinin azalması veya hiç olmaması sebebiyle erkek hastalarda daha şiddetli semptomlarla karakterize edilir [4]. Etkilenen erkeklerde çocukluk veya ergenlikte başlayan akroparesteziler, anjiyokeratom, korneal opasiteler ve hipohidroz gibi erken belirtiler ilerleyen glikosfingolipit birikimi sebebiyle yetişkinlikte kardiyomiyopati, böbrek yetmezliği ve erken felçlere dönüşür. Geç başlangıçlı fenotip, tipik olarak erken semptomlardan yoksun, ancak yetişkinlikte kardiyomiyopati ve kronik böbrek hastalığı ile kendini gösteren daha az şiddetli belirtiler ve önemli rezidüel α -galaktozidaz A aktivitesi gösterir [5]. Kadın fenotipleri, aynı genotipi taşıyan hastalar arasında bile, erkek Fabry fenotiplerinden daha heterojendir. Erken embriyonik gelişim sırasında rastgele X-kromozomal inaktivasyona bağlı olarak asemptomatikten ciddi hastalık belirtilerine kadar değişirler [6, 7]. Geç-başlangıçlı fenotipe sahip hastaların çoğu, hemodiyaliz, kalp ve felç klinikleri taranarak veya daha yakın zamanda yenidoğan taraması yapılarak tanımlanmıştır [8]. Fabry hastalığı için standart tedavi, rekombinant enzim ile enzim replasman tedavisidir (ERT). Faz- 3 klinik denemeler ve son çalışmalar klasik erkeklerde erken müdahalenin ve dozun önemini vurgulamıştır [8].

Fabry hastalığı biyobelirteci olarak plazma Gb3 yaygın bir şekilde kullanılmıştır [9, 10]. Ancak plazma Gb3 ölçümünün birtakım sınırlamaları vardır, çünkü çoğu geç- başlangıçlı Fabry erkekleri ve Fabry dişileri plazmada herhangi bir Gb3 birikimi göstermez, bu sebeple Gb3 bir biyobelirteç olarak zayıf hassasiyet sağlar [11].

Fabry hastalığında tanı için ilk adım α -galaktozidaz A aktivitesinin hem erkek hem de kadınlarda ölçülmesidir. Bununla birlikte, heterozigot kadınlarda enzim aktivitesinin normal aralıkta olabileceği bilinmektedir.

Son zamanlarda, Gb3'ün deasile formu olan Lizo-Gb3'ün serum veya plazma konsantrasyonu, hastalık aktivitesi ve enzim replasman tedavisinin (ERT) terapötik izlenmesi için kolayca ölçülen bir biyobelirteç haline gelmiştir [12, 13]. Ayrıca Lizo-Gb3 değerleri, tedavi için heterozigotların değerlendirilmesinde faydalı olabilir [7].

Bununla beraber biyobelirteçlerin ideal olarak toplanması, taşınması ve analizinin kolay olması gerektiğinden, önceki çalışmalar Lizo-Gb3'ü ölçmek için kuru kan örneklerinin de (DBS) kullanımını değerlendirmiştir [14, 15].

Plazma Lizo-Gb3 için son on yılda farklı bir takım ekstraksiyon protokolleri gerektiren çalışmalar yayınlanmıştır. Bu yöntemler zaman alıcı, birçok adımdan oluşan sıvı-sıvı ekstraksiyonu [12, 16, 17], katı faz ekstraksiyonu (SPE) [18, 19, 20], zayıf hassasiyete sahip protein çöktürme [21] veya zararlı kimyasallar [22] [23] içeren ekstraksiyon protokollerinden oluşan analiz metotlarını içermektedir.

Tez çalışmamız Lizo-Gb3 miktar tayini için LC-MS/MS analiz metodu geliştirmeyi, geçerli kılmayı ve biyolojik örneklerde uygulanabilirliğini göstermeyi hedeflemektedir. Geliştirilecek metodun klinik laboratuvarında, rutin analizlerde, kolayca uygulanabilir, farklı örnek türlerinde (plazma, kuru kan) kullanılabilecek, yüksek numune sayıları için uygun ve yüksek hassiyette bir metot olması amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

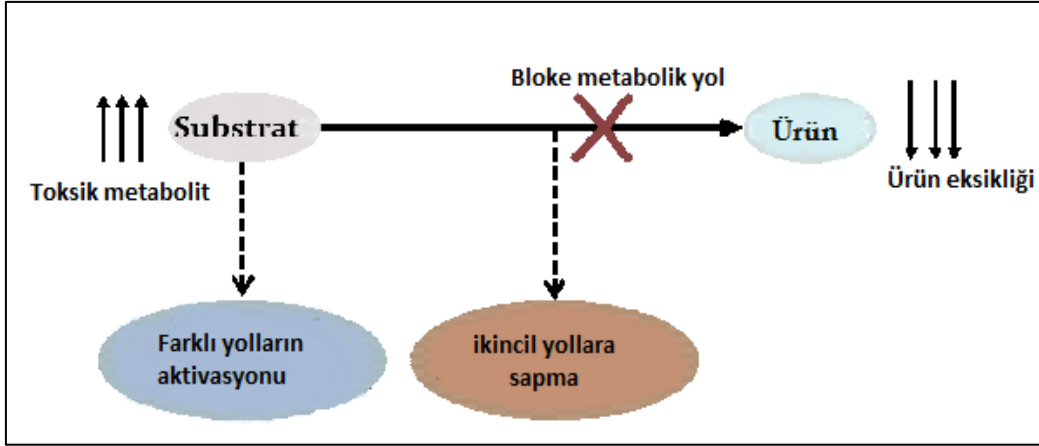
2.1. Doğumsal Metabolik Hastalıklar

Kalıtsal metabolik hastalıklar olarak da bilinen doğumsal metabolik hastalıklar, bireysel olarak nadir olmakla birlikte, toplu olarak bakıldığında oldukça yaygındır. Bir enzimin kofaktörünün veya taşıyıcısının eksikliğinden veya anormalliğinden kaynaklanan, bir substratın birikmesine veya ürünün eksikliğine neden olan, kalıtsal tek gen bozukluklarıdır. Bozuklukların çoğu otozomal resesif olarak kalıtılırken otozomal dominant ve X-bağımlı hastalıklar da mevcuttur [24].

Bu katalitik enzimler, karbonhidratlar, proteinler, yağlar ve diğer metabolitler gibi çeşitli metabolik substratların parçalanmasından sorumludur [25]. Kusurlu metabolik yol, öncelikle metabolik bir substratın birikmesiyle sonuçlanır. Sonrasında, bu birikim hücre için doğrudan toksik olabilir veya katabolik yolda bir blokaj veya alternatif metabolik yollar yoluyla anormal metabolik ara ürünlerin üretimine yol açabilir [26].

Bunlara ek olarak, doğumsal metabolik hatalar, metabolitlerin hücrelere taşınmasındaki veya enerji üretimi ve kullanımındaki kusurlardan kaynaklanabilir. Tüm bu metabolik anormallikler, doğumsal metabolik hastalıkların çeşitli klinik etkilerinin ana nedenleri olarak kabul edilir [27].

Kimyasal substrat (metabolit) canlı hücreye taşınır. Dolayısıyla, doğumsal metabolik hastalık (DMH) taşıyıcı eksikliğinden kaynaklanabilir. Normal koşullarda, substrat bir ürün metabolitine katalize edilir, bu nedenle enzimdeki veya ko-faktördeki herhangi bir eksiklik DMH'ya yol açabilir. Enzim eksikliğinden kaynaklanan substrat birikimi DMH'ya neden olur. Bazı durumlarda biriken substrat, toksik metabolitler üreten ve DMH'a (metabolik bozukluklar) yol açan alternatif metabolizma yolunu takip eder (Şekil 2.1.).



Şekil 2.1. Metabolizma sürecinin doğuştan gelen hataları

Doğumsal metabolik hastalıkların insidansı ve prevalansı her ülkede farklılık göstermektedir. Özellikle akraba evliliklerinin oranının yüksek olduğu ülkelerde veya bölgelerde doğumsal metabolik hastalıkların sıklığı artmaktadır [28]. Suudi Arabistan'da kümülatif DMH insidansının 1: 666 olduğu bildirilmiştir [29]. Almanya'da MSMS tekniği ile yapılan pilot tarama programında DMH sıklığı 1:2920 olarak saptanmıştır. ABD'de fenilketonüri insidansı 1:23080 iken Türkiye'de 1:4500 olarak rapor edilmiştir [3-8].

Doğumsal metabolik hastalıklar için biriken substrata, etkilenen enzim gruplarına ve kusurlu yolağa veya klinik belirtilere sahip organelle bağlı olarak çeşitli sınıflandırmalar yapılmıştır. Klinik sınıflandırma doğumsal metabolik hastalıklara patofizyolojik bakış açısından yaklaşmaktadır (Çizelge 2.1.).

Bunlardan en yaygın olarak kabul gören Society for The Study of Inborn Errors of Metabolism (SSIEM) tarafından ortaya konulan ve temelde etkilenen ana substrata odaklanan sınıflandırma biçimidir (Çizelge 2.2.).

Çizelge 2.1. Doğumsal metabolik hastalıkların klinik sınıflandırması (3)

Tür	Tanım	Örnek
İntoksikasyon	Ana patoloji toksik substratın birikmesinden kaynaklanır	-Aminoasidopatiler (fenilketonüri, MSUD, tirozinemi vb.) -Organik asidüriler (propionik, izovalerik, glutarik asidüri tipI, vb) -Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (galaktozemi, hereditör fruktoz intoleransı)
Enerji eksikliği	Ana patoloji ürünün eksikliğinden kaynaklanır	-Karbonhidrat metabolizması bozuklukları (Glikojen depo hastalığı tipIa -Mitokondriyal bozukluklar (Solunum zinciri kusurları, Krebs döngüsü defektleri) Yağ asidi oksidasyon defektleri
Depolama	Ana patoloji kompleks moleküllerin kusurlu katabolizması neticesinde hücrel organellerde biriken metabolitlerden kaynaklanır	-Lizozomal depo hastalıkları (Fabry hastalığı, Gaucher hastalığı, Niemann-Pick Ave B, vb.) -Peroksizomal bozukluklar (Zellweger sendromu, adrenolökodistrofi)

Çizelge 2.2. SSIEM sınıflandırmasındaki ana gruplar [24]

Amino asit ve peptid metabolizması bozuklukları
Karbonhidrat metabolizması bozuklukları
Yağ asidi ve keton cisimleri metabolizması bozuklukları
Enerji metabolizması bozuklukları
Purin, primidin ve nükleotid metabolizması bozuklukları
Sterol metabolizması bozuklukları
Porfirin ve hem metabolizması bozuklukları
Lipid ve lipoprotein metabolizması bozuklukları
Konjenital glikolizasyon bozuklukları ve diğer protein modifikasyon bozuklukları
Lizozomal bozukluklar
Peroksizomal bozukluklar
Nörotransmitter metabolizması bozuklukları
Vitaminler ve (non-protein) kofaktör metabolizması bozuklukları
Eser element ve metal metabolizması bozuklukları
Ksenobiyotiklerin metabolizmasındaki bozukluklar ve varyantlar

Genel olarak, DMH'nın kesin teşhisi için bir dizi özel araştırmaya ihtiyaç vardır. Özellikle nonspesifik belirti ve bulgularla başvuran hastalarda adım adım yaklaşım tercih edilirken, daha spesifik klinik tabloyla başvuran hastalarda hedefli bir yaklaşım kullanılabilir [24].

Doğuştan gelen metabolizma hataları, gen ürünleri veya amino asitler, organik asitler, açilkaritinler, enzimler ve proteinler gibi metabolitlerin biyokimyasal analizlerini içeren biyokimyasal genetik disiplini ile ilişkilidir [29]. Ön saftaki hekimlerin tedavi edilebilir bir bozukluğu kaçırmaması için, DMH'nın klinik tanısı az sayıda önemli ilkeye dayanmalıdır. Tandem kütle spektrometresi yenidoğan taraması ve prenatal tanı uygulamaları bazı DMH'larında presemptomatik tanıya imkan vermektedir [30]. Bu sayede bazı metabolik hastalıkların erken teşhisine ve tedavisine imkan sağlandığı gibi gereksiz soruşturmanın önlenmesi, doğru tanı konulduktan sonra prognoz tahmini ve aile planlaması ve genetik danışmanlık için değerli bilgilerin edinilmesi gibi tartışılmaz sağlık yararları sağlanmaktadır [29]. Günümüzde birçok gelişmiş ülkede yenidoğan tarama programları uygulanmaktadır. Ülkemizde 25 Aralık 2006 tarihinde Sağlık Bakanlığı Refik Saydam Hıfzıssıhha Enstitüsü Merkez Başkanlığı (RSHMB) ile Ana Çocuk Sağlığı ve Aile Planlaması Genel Müdürlüğü (AÇSAP) tüm ülkeyi kapsayan Yenidoğan Tarama Programını başlatmıştır. Program kapsamında; Konjenital Hipotiroidi, Fenilketonüri, Biyotinidaz Eksikliği ve Kistik Fibrozis taramaları yapılmaktadır [31].

2.2. Lizozomal Depo Hastalıkları

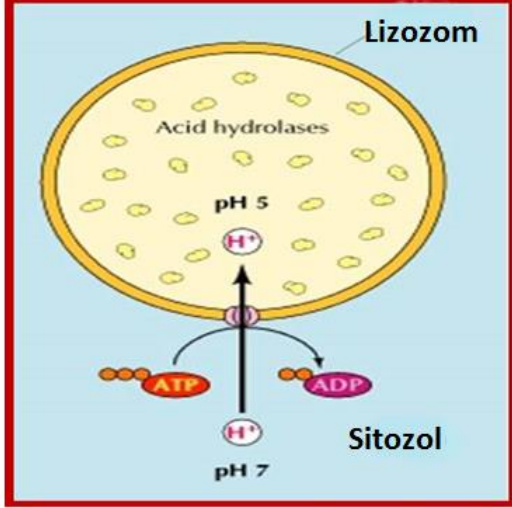
2.2.1. Lizozom

Lizozom De Duve ve ark. tarafından 1955 yılında ilk olarak tanımlanmış, tüm çekirdekli ökaryotik hücrelerde bulunan sitoplazmik organeldir. Tek katmanlı bir lipid membran ile sınırlanmıştır ve bir adenosin trifosfat (ATP) bağımlı proton pompası ile korunan 4.5-5.0 asidik iç pH'a sahiptir (Şekil 2.2.). Morfolojik olarak oldukça heterojen bir organeldir. Hücre tiplerine göre lizozom boyutu, şekli ve hücre başına sayısı değişkendir. Küresel, oval veya bazen boru şeklinde olabilir ve boyut olarak 0.1 ila 2 um arasında değişebilir. Lizozomlar, hem hücrenin dışından alınan malzemenin yıkımına hem de hücrenin eski bileşenlerini sindirmeye hizmet eden, hücrenin sindirim sistemi olarak işlev görür.

Lizozomlar proteinler, DNA, RNA, polisakkaritler ve lipidleri hidroliz edebilen 60 farklı degradative enzim içerirler [32].

Diğer bir deyişle lizozomlar, çeşitli glikosfingolipidlerin, glikozaminoglikanların, glikoproteinlerin ve oligosakkaritlerin hücreden geri dönüştürülebilir veya atılabilir daha

basit maddelere parçalandığı hücresel organellerdir. Lizozom içinde tutulan asidik pH'da aktif olan ancak sitozolün nötr pH'ında olmayan çeşitli asit hidrolazları içerir [32].



Şekil 2.2. Lizozom

2.2.2. Lizozomal depo hastalıkları genel bilgi

Lizozomal depo hastalıkları lizozomun işlevini etkileyen, kalıtsal metabolizma hatalarıdır. Lizozomal depo hastalıkları çoğu otozomal resesif olarak kalıtılan (sadece 3 tanesi X'e bağlı kalıtılan) lizozomal disfonksiyon ile karakterize 70'in üzerinde hastalıktan oluşan bir gruptur. Bu bozukluklar bireysel olarak nadir olmakla birlikte, toplu olarak değerlendirildiğinde 5.000 canlı doğumda 1 tanesini etkilerler. Lizozomal depo hastalıkları tipik olarak bebeklik ve çocukluk döneminde bulunur, ancak yetişkin başlangıçlı formlarda da ortaya çıkar. Diğer organ sistemlerinde semptomlar sık görülse de, çoğu lizozomal depo hastalığının ilerleyici bir nörodejeneratif klinik seyri vardır. Bu bozukluklara, lizozomal glikozidazlar, proteazlar, integral membran proteinleri, taşıyıcılar, enzim değiştiriciler veya aktivatörler gibi lizozomal proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonlar neden olur. Lizozomal genlerdeki mutasyonlar, kodlanan proteinin işlevini etkiler, sonuç olarak lizozomal işlev bozukluğu ve lizozom içinde substratların kademeli olarak birikmesi ('depolaması') neticesinde hücresel işlev bozukluğuna ve hücre ölümüne yol açar. Sonuç olarak, bu hastalıkların hücresel patogenezi karmaşıktır ve şu anda tam olarak anlaşılamamıştır.

Lizozomal fonksiyonda yer alan yaklaşık 1.300 genin dahil olduğu birçok monojenik bozukluk tanımlanmıştır. Bunlar depolanan materyalin biyokimyasal tipine göre 50 adet enzim eksikliği (örneğin, sfingolipidozlar, mukopolisakkaridozlar, glikoproteinozlar) 7 adet integral membran proteinlerine ait bozukluk, 12 adet lizozomla ilgili organellere ait bozukluk ve 14 adet lipofuscin üretimini içeren bozukluk olarak alt sınıflara ayrılabilir [33].

2.2.3. Sfingolipidozlar

Sfingolipidozlar, sfingolipidlerin lizozomal bozunumundaki kusurların neden olduğu bir grup kalıtsal lizozomal depolama bozukluğudur [22]. Bu bozukluklarda, kemik iliği, karaciğer ve dalaktaki fagositik lizozomlar, histiyositler veya makrofajlar gibi sfingolipid katabolizma bölgeleri etkilenir [34].

Sfingolipid katabolizması, lizozomlarda bulunan hidrolazlar tarafından yapısal bileşenler sırayla çıkarılarak gerçekleştirilir. Bu yolla yer alan birçok farklı enzim arasında galaktozidazlar, glukozidazlar, nöraminidaz, sfingomiyelinaz, heksozaminidaz, sülfataz ve seramidaz bulunur (Şekil 2.3.). Bu enzimler tarafından katalize edilen geri dönüşümsüz reaksiyonlar ile molekül yapı taşlarına ayrılır.

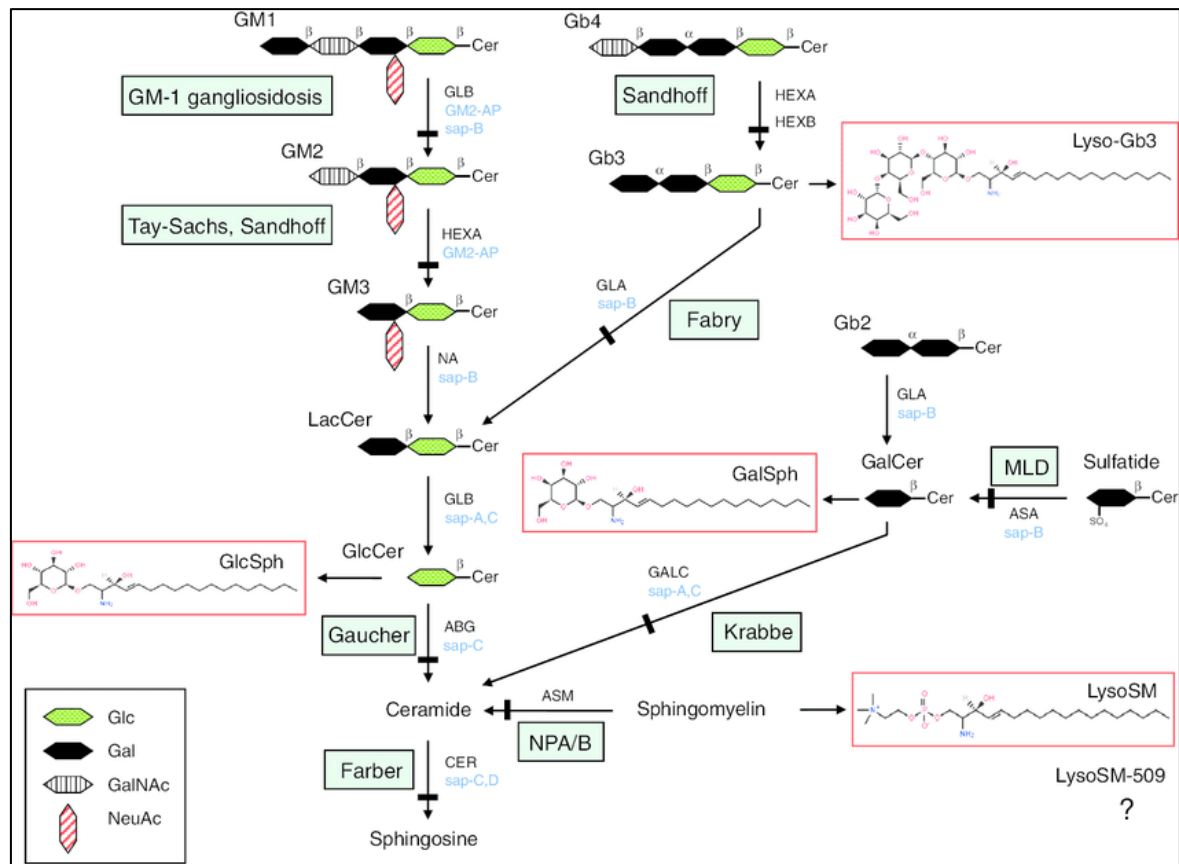
Sfingolipidozlarla ilgili detaylar Çizelge 2.3.'te verilmiştir [35].

Çizelge 2.3. Sfingolipidozlar

OMIM	Hastalık	Hasarlı Protein	Depolanan ana moleküller	Gen sembolü
301500	Fabry	α -galaktozidaz A	Globotrioilseramid	<i>GLA</i>
228000	Farber	Asit seramidaz	Seramid	<i>ASAH1</i>
230500 230600 230650	GM1 gangliosidoz GM1 (Tip I, II, III)	GM1- β -galaktozidaz	GM1 ganliosid, keratan sülfat, oligolar, glikolipidler	<i>GLB1</i>
272800	GM2 gangliosidoz Tay-Sachs	β -Heksozaminidaz A	GM2 ganliosid, oligolar, glikolipidler	<i>HEXA</i>

Çizelge 2.3. (devam) Sfingolipidozlar

268800		GM2 gangliosidoz Sandhoff	β -Heksozaminidaz A+B	GM2 ganliosid, oligolar	<i>HEXAB</i>
230800 23100	230900	Gaucher (Tip I, II, III)	Glukozilseramidaz	Glukozilseramid	<i>GBA</i>
245200		Krabbe	β -Galaktozilseramidaz	Galaktozilseramid	<i>GALC</i>
250100		Metakromatik lökodistrofi	Ariksülfataz A	Sülfatidler	<i>ARSA</i>
257200 607616		Niemann-Pick tip A ve tip B	Sfingomiyelinaz	Sfingomiyelin	<i>SMPD1</i>



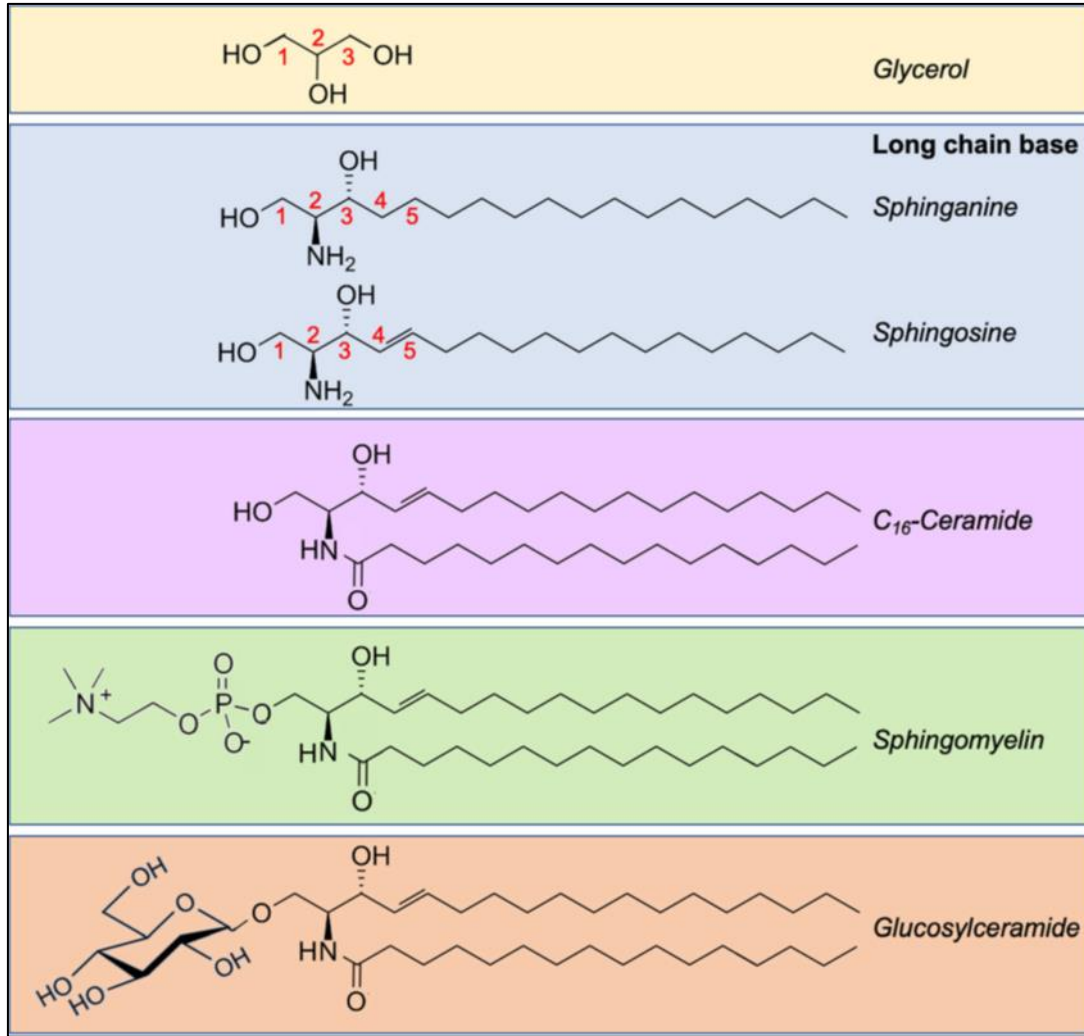
Şekil 2.3. Sfingolipidozların Metabolik Yolakları [22]

Sfingolipidler

Sfingolipitler, fosfolipitler ve kolesterol ökaryotik hücre membranlarının esas bileşenleridir. Aynı zamanda çeşitli sinyal kaskadlarında hayati roller oynayan zarların temel bileşenleri olarak sfingolipidler, metabolik araştırmaların sıcak bir konusunu temsil eder [36]. Sfingolipitler, sfingozin, sfinganin veya fitosfin gibi bir sfingoid baz içeren lipidlerdir [37]. Sfingolipitler amfipatik moleküllerdir. Bir takım hidrofobik ve hidrofilik parçaları bulunur.

Hidrofobik kısım 18 karbon uzunluğunda, amid bağıyla yağ asidine bağlı sfingoid bazdan, hidrofilik kısım ise en basit sfingolipitlerde sadece hidroksil grubundan oluşurken, daha kompleks sfingolipitlerde fosfat, alkol yapıda moleküller veya şeker birimlerinden oluşur [38]. Bu temel yapının modifikasyonu, membran biyolojisinde önemli roller oynayan ve hücre fonksiyonunu düzenleyen birçok biyoaktif metabolit sağlayan geniş sfingolipid ailesinin ortaya çıkmasına neden olur [39]. Sfingolipidlerin yapı ve işlev çeşitliliğine rağmen, yaratılmaları ve yok edilmeleri ortak sentetik ve katabolik yollar tarafından yönetilir. Bu bağlamda, sfingolipid metabolizması, tek bir ortak giriş noktasından ayrılan ve tek bir ortak bozunma yolunda birleşen birbirine bağlı ağlar dizisi olarak düşünülebilir [39]. Sfingolipitlerin birçoğunda sfingoid bazlar bir yağ asidi ile açillenir. Seramid (SER) diğer sfingolipitlerin üretimi için metabolik merkez olarak hizmet edebilen ana sfingolipittir.

Memelilerde hücreler zincir uzunlukları 14 ila 32 karbon arasında değişen birçok SER türü üretir. Bu durum sfingolipitler arasındaki ilk heterojenite katmanına katkıda bulunur. Başka bir varyasyon katmanı da farklı bağlanan baş gruplarından kaynaklanır. Baş gruplarına bağlı olarak sfingolipidler fosfosfingolipidler (örneğin: sfingomiyelin (SM) ve glikosfingolipidler (GSL'ler) olarak sınıflandırılabilir. SM'ler, sinir hücrelerinin aksonal bölgelerini çevreleyen miyelin kılıfında oldukça yoğun miktarda bulunur. Seramidler hidrofilik başlıklar taşıyabilir, bunlar özellikle sfingomiyelin söz konusu olduğunda fosforilkolin, glikosfingolipitler durumunda karbonhidrat kalıntıları ve seramid-1-fosfat durumunda ise bir fosfat parçasıdır. Şekil 2.4.'te bazı sfingolipid yapılarına örnekler verilmiştir. Seramid, sfingosin, sfinganin, sfingomiyelin ve glukozilseramid gösterilmiştir [36].



Şekil 2.4. Bazı sfingolipidlerin ortak yapıları [36]

Glikosfingolipitler

Ökaryotlar (ve birkaç bakteri türü), glikosfingolipit adı verilen heterojen bir lipit sınıfı içerirler [40]. Glikosfingolipitler, bir sfingolipid parçasına, genellikle bir seramide, ancak nadir durumlarda da bir sfingoid bazına bağlanan bir veya daha fazla şeker içerirler. Glikosfingolipitlerdeki büyük yapısal heterojenlik, karbonhidrat kalıntılarının sayısı, tür, bağlantı ve anomerik konfigürasyonundaki farklılıklardan ve ayrıca hidrofobik kısımdaki (SER) yapısal farklılıklardan kaynaklanır [41]. Memeli hücrelerinde en yaygın olarak bağlı şekerler glukoz, galaktoz, N-asetilglukozamin, N-asetilgalaktozamin, sialik asit ve fukozdur. GSL'ler dört alt tipe ayrılabilir: serebrositler, sülfatitler, globositler ve gangliositler [36]. GSL'ler, farklılaşma aşamasına bağlı olarak hücresel yüzeylerde hücre tipine özgü bir düzende eksprese edilir [42].

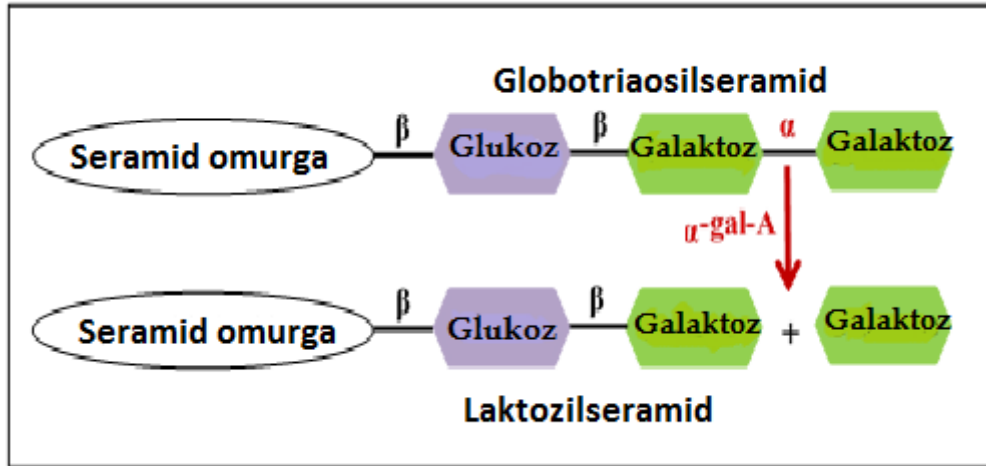
2.2.4. Fabry hastalığı

Genel bakış

Fabry hastalığı (FD, OMIM 301500), kalıtsal, X'e bağlı, alfa-galaktozidaz enzim eksikliğinden kaynaklanan bir lizozomal depo hastalığıdır [1, 43, 44].

Lizozomal ekzoglukohidrolaz α -galaktozidaz A (α -D-galaktozid galaktohidrolaz, EC 3.2.1.22; α -gal A) enzimini kodlayan Alfa Galaktozidaz genindeki (GLA) mutasyonlar, α -Gal'in sentezini, hücre içi trafiğini, katlanmasını, bozunmasını ve enzimatik aktivitesini etkileyerek, ilerleyici hücre içi globotriozilseramid (Gb3) ve diğer ilgili sfingolipidlerin birikimine yol açar (Şekil 2.5.). Hücre içi Gb3 ve buna bağlı glikosfingolipid birikimi, kardiyovasküler, renal, gastrointestinal, serebrovasküler, nörolojik, işitsel, oküler ve kutanöz sistemleri potansiyel olarak etkileyen organ / doku hasarına yol açar [1, 43]. Globotriozilsfingozin (Lizo-Gb3) bir deasile Gb3 formu ve vazoendotel hücrelerinde yüksek seviyelerde biriken, hastalığın biyobelirteci olarak kullanılan ikincil depolama metabolitidir [12].

Birincil hastalık süreci bebeklik döneminde veya hatta gelişimin fetal evresinde başlar. Bununla birlikte, diğer birçok lizozomal depo hastalığının aksine, çoğu hasta yaşamın ilk yıllarında klinik olarak asemptomatik kalır. Çocuğun sağlığını ve performansını etkileyen ilk klinik semptomlar 3 ila 10 yaşları arasında ve genellikle kızlarda erkeklerden birkaç yıl sonra ortaya çıkar. Yaşla birlikte, her iki cinsiyette de hayati organ sistemlerine ilerleyici hasar gelişir ve organ yetmezliğine yol açar. Son dönem böbrek hastalığı ve hayatı tehdit eden kardiyovasküler veya serebrovasküler komplikasyonlar yaşam beklentisini sınırlar. Fabry hastalığı, geniş, heterojen ve progresif klinik fenotip spektrumuna sahip bir hastalık olarak tanımlanabilir. Bu spektrum, erkeklerde “klasik” şiddetli fenotipten, kadınlarda bazen gözlenen ve aralarında çeşitli klinik prezentasyonlar bulunan, görünüşte asemptomatik bir hastalık seyrine kadar uzanır. Aslında çoğu dişi heterozigot, henüz belirlenmemiş mekanizmalar nedeniyle semptomlar geliştirir ve kadınların yüksek bir yüzdesi, erkeklerden yaklaşık on yıl sonra böbrekler, kalp ve/veya beyin dahil olmak üzere hayati organ tutulumu geliştirir.



Şekil 2.5. Gb3 metabolik yolağı

Tarihçe

Fabry hastalığının tanımlanması genel cerrah William Anderson ve dermatolog Johannes Fabry tarafından 1898 yılında birbirlerinden bağımsız olarak “anjiokeratoma corporis diffuzium” (kırmızı-pembe makülopapüler cilt lezyonu) adıyla gerçekleşmiştir [45, 46]. Hastalık tipik dermatolojik bulgulardan sonra 'anjiokeratoma corporis diffuzium' ve 'purpura haemorrhagica nodularis' olarak adlandırılmıştır.

Ruiter ve çalışma arkadaşları 1947 yılında, Fabry hastalığı olan iki erkek çocukta otopsi sonrası, bu bozukluğun sadece dermatolojik bir hastalık olmadığını aynı zamanda sistemik bir damar hastalığı olduğunu rapor ettiler [47]. Daha sonra 1953 yılında bu hastalık lipid depo hastalığı olarak sınıflandırıldı [48].

Belçikalı bilim insanı Christian de Duve, 1955'te hücreler içinde sindirim işlevine sahip görünen farklı hücre içi parçacıkları keşfetti [49]. 1974'te Nobel Fizyoloji ve Tıp Ödülü'ne layık görüldüğü bu parçacıklara lizozomlar adını verdi. Glikojen metabolizması üzerine araştırma yapan çalışma arkadaşlarından Henri-Gery Hers Pompe hastalığından sorumlu enzim eksikliğini keşfetti [50]. Bu enzimin asidik pH'ta en iyi şekilde çalıştığı gerçeği enzimin lizozomda lokalize olabileceğini düşündürdü. Hers 1965 yılında Pompe hastalığı üzerine yaptığı araştırmalara dayanarak lizozomal depo bozuklukları kavramını kurdu. Hastalığın X'e bağlı doğası ilk olarak 1965 yılında tanınmış ve Xq22'deki alfa-galaktozidaz A geninin yeri Hamers ve ark. tarafından belirlenmiştir [51]. Brady ve ark. 1967'de Fabry

hastalarının lizozomal enzim seramid-triheksosidaz aktivitesinde eksik olduğunu gösterdi, Kint ve ark. daha sonra bu enzimin aslında bir alfa-galaktosidaz olduğunu gösterdi [52, 2]. Bu sayede enzim analizi ile erkek Fabry hastalarının güvenilir bir şekilde teşhis edilebileceği gösterilmiştir Desnick 1972'de, bir Fabry hastasında enzim eksikliğinin böbrek nakli yoluyla düzeltilmesini amaçlayan ilk çalışmayı gerçekleştirdi [53]. Bu, Fabry hastalığı tarihinde daha yeni bir ayırt edici özelliğe giden ilk adımdı: hedeflenen bir tedavi olarak enzim takviyesi tedavisinin geliştirilmesi olarak tanımlanabilir. [54, 55]. Potansiyel olarak hastalığı modifiye eden bu tedavinin tanıtılması, bu hastalık üzerine araştırmalar için muazzam bir itici güç oluşturdu ve bu da muazzam bir bilgi artışıyla sonuçlandı, ancak aynı zamanda birçok yeni soruyu da gündeme getirdi. Lizo-Gb3 ilk kez Johannes Aerts ve arkadaşları tarafından 2008 yılında tanıtıldı [12].

Epidemioloji

Fabry hastalığı tüm etnik popülasyonlarda mevcuttur (Çizelge 2.4), güç teşhis edilmesi ve nadirliği nedeniyle, hastalık sıklığını doğru bir şekilde belirlemek zordur. Fabry hastalığının prevalansı 1: 40.000 ile 1: 117.000 birey arasında tahmin edilmiştir [56, 57, 58]. Öte yandan yenidoğan tarama programları patolojik olmayan varyantları, polimorfizmi ve bilinmeyen önemi olan varyantları bulabilir ve böylece Fabry hastalığı prevalansını fazla tahmin edebilir [59]. Bununla birlikte, erkekler ve kadınlar arasında bildirilen istatistikler, kadınlarda çok sayıda asemptomatik veya teşhis edilmemiş vaka olduğunu göstermektedir [60, 61].

Klasik Fabry hastalığı ile ilişkili mutasyonlar 1: 22.000 ila 1: 40.000 erkekte bulunur ve atipik veya geç başlangıçlı Fabry hastalığı 1:1000 ila 1: 3000 erkekte bulunur [62]. Diyaliz gerektiren kronik böbrek yetmezliği (CRF) olan hastalar, sol ventrikül hipertrofisi (LVH) ve inme gibi yüksek riskli popülasyonlarda Fabry hastalığı sıklığı açıkça daha yüksektir [63]. İlginç bir şekilde Tayvan'da, 1:1600 erkek yenidoğanın olağanüstü yüksek prevalansı ile bir kardiyak varyant (IVS4 + 919G> A) mevcuttur [62].

Çizelge 2.4. Fabry Hastalığı Prevalansı [1]

Ülke/Çalışma Periyodu	Kaynak	Metot	Toplam vaka sayısı	No 1/100000	Referans
Türkiye 1997-2002	İki ana referans merkezde LDH'dan şüphelenilen 5 yaşın altındaki hastaların enzim analizi ile sfingolipidoz tanısı	Doğum prevalansı (belirli bir süre içinde doğan vaka sayısı, aynı dönemdeki toplam canlı doğum sayısına bölünür)	1	0.015	[64]
Avustralya 1980-1996	Avustralya'da tüm enzim analizlerini yapan iki merkez	Doğum prevalansı (doğum sonrası ve prenatal enzimatik tanıların toplam sayısının doğum sayısına bölünür)	36	0.85	[56]
Hollanda 1970-1996	Hollanda'da LDH'larının pre- ve postnatal tanısını yapan tüm laboratuvarlar	Doğum prevalansı (belirli bir süre içinde doğan vaka sayısı, aynı dönemdeki toplam canlı doğum sayısına bölünür)	27	0.21	[57]
İngiltere(Kadın) 1980-1995	İngiltere'de AFD kayıtlı hastaların aile hikayeleri	Zorunlu taşıyıcıların prevalansı	60	0.29	[65]
İngiltere(Erkek) 1980-1995	Bölgesel genetik merkezlerin, referans enzim laboratuvarlarının kayıtlarından, bireysel doktor kayıtlarından	Prevalans	98	0.27	[66]
Kuzey Portekiz 1982-2001	Portekiz'de LDH'ları için pre- ve postnatal tanı hizmetleri sağlayan bir merkez	Doğum prevalansı (pre- ve postnatal enzimatik teşhislerin toplam sayısı, toplam canlı doğum sayısına bölünür) Kuzey Portekiz	1	0.12	[67]
İtalya 2004-2006	Kuzey İtalya	Yenidoğan taraması	12	30	[68]
Tayvan 2006-2008	Tayvan	Yenidoğan taraması	73	80	[69]

Patofizyoloji

Fabry hastalığında α -galaktozidaz A enzim aktivitesinin kantitatif/fonksiyonel eksikliği parçalanmamış substratların globotriozilseramid (Gb3) ve deasile türevi globotriozilsfingozinin (Lizo-Gb3) dokularda ve vücut sıvılarında ilerleyici birikimine yol açar [19]. Bunlar esas olarak böbreklerde, kardiyak miyositlerde, akciğerlerde, gangliyon hücrelerinde, kan damarlarında, özellikle vasküler endotel ve düz kas hücrelerinde ve Fabry hastalarının korneasında bulunur [70]. Bu sfingolipid birikimi ayrıca sitotoksik, proinflamatuvar ve profibrotik etkilerle de ilişkilidir [62]. Daha önce de bahsedildiği üzere

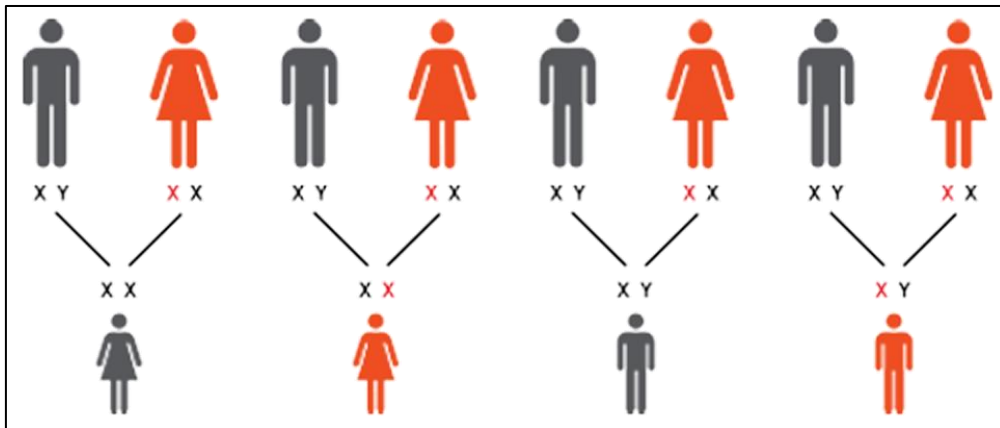
konsantrasyonu Fabry hastalarının farklı organlarında normal seviyeyi onlarca ya da yüzlerce kat aşabilir. Biriken glikosfingolipitler, böbreklerde, karaciğerde, vasküler endotelde, akciğerlerde ve eritrositlerde büyük miktarlarda bulunan membran glikosfingolipidlerinin metabolik döngüsünden kaynaklanır [71].

Alfa galaktozidaz (*GLA*) geni, X kromozomunun Xq22.1 bölgesi uzun kolunda bulunur. X'e bağlı bir bozukluk olduğu için, erkekler Fabry genetik bozukluğunu sadece kızlarına geçirebilirler. Bu sebeple heterozigot dişilerin Fabry gen mutasyonunu kızlarına ve oğullarına aktarma şansı yüzde ellidir. Binden fazla mutasyon tanımlanmıştır. Rezidüel enzim aktivitesi çok düşük ($< \% 3$) olan hastalar daha şiddetli klasik Fabry hastalığına sahipken, rezidüel aktivitesi yüzde 3 ila 30 arasında olan hastalar daha hafif veya geç başlangıçlı fenotiplere sahiptir [62].

Patojenik *GLA* varyantlarının çoğu özeldir ve yalnızca tek veya birkaç ailede görülür. Bir takım mutasyonların klasik Fabry hastalığı ile ilişkili olduğu ve diğerlerinin (çoğunlukla missense mutasyonları) daha hafif geç başlangıçlı fenotiplerle ilişkili olduğu bilinmektedir. Bununla birlikte, fenotiplerin şiddeti ailelerde muhtemelen diğer genlerin etkisiyle farklılık göstermektedir.

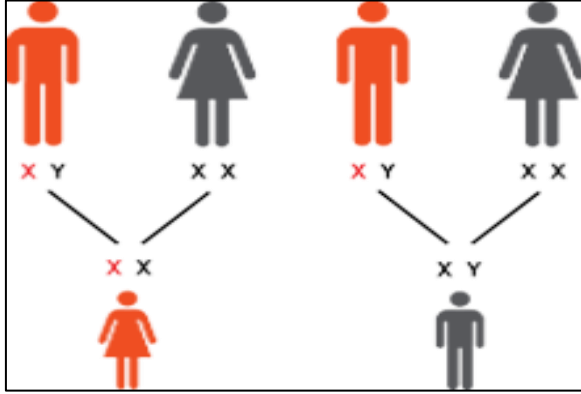
Dişiler sadece taşıyıcı olmakla kalmaz, aynı zamanda her hücrede bir X kromozomunun inaktivasyonuna bağlı olarak ikincil olarak da etkilenirler.

Şekil 2.6. ve 2.7'de Fabry hastalığının X'e bağlı kalıtım modeli şematize edilmiştir [1, 72].



Şekil 2.6. Fabry hastalığından etkilenen bir anneden hastalığın kalıtımı

Heterozigot genotipli etkilenmiş bir annenin kusurlu geni çocuklarından herhangi birine geçirme olasılığı %50'dir.



Şekil 2.7. Fabry hastalığından etkilenen bir babadan hastalığın kalıtımı

Babanın kızı, hatalı geni babasından miras alırken, oğul hatalı geni babasından miras almayacaktır.

Klinik belirtiler

Erken belirti ve semptomlar: Pediatrik yaşta Fabry hastalığı

Erken sinir hasarı öncelikle periferik somatik ve otonom sinir sistemlerinin küçük sinir liflerini içerir ve ilgili semptomların başlangıcı genellikle erkeklerde kızlardan daha erken yaşta ortaya çıkar [1]. Ağrı, klasik olarak etkilenen erkek ve kız çocuklarının %60-80'inde görülür ve FH'nın en erken semptomlarından biridir [1].

Çizelge 2.5.'te FH'nın pediatrik yaşta ortaya çıkan belirtileri özetlenmiştir.

Çizelge 2.5. Fabry Hastalığının erken belirti ve semptomları

Sinir sistemi	İşitme kaybı, tinnitus Sinir sağırlığı Isı intoleransı Akroparesteziler
Gastrointestinal sistem	Kilo almada güçlük Mide bulantısı, kusma, ishal Doğum sonrası şişkinlik ve ağrı, erken doyma
Deri	Anjiyokeratomlar Hipohidroz

Çizelge 2.5. (devam) Fabry Hastalığının erken işaretleri ve semptomları

Gözler	Kornea ve lentiküler opasiteler Vaskülopati (retina, konjonktiva)
Böbrekler	Mikroalbuminüri, proteinüri Hiperfiltrasyon Bozulmuş konsantrasyon yeteneği Artan idrar Gb3 atılımı
Kalp	Ritim bozuklukları Bozulmuş kalp atış hızı değişkenliği EKG anormallikleri (kısaltılmış PR aralığı) Hafif kapak yetmezliği

Erken sistemik bulguları olan hastalarda veya tek bir organ tutulumunda Fabry hastalığından şüphelenilebilir. Klasik Fabry hastalığında başlangıç yaşı genç olmakla birlikte, özellikle açıklanamayan hipertrofik kardiyomiyopatili hastalarda tanı daha geç konabilir [62]. Yaşa göre Fabry hastalığının tipik belirti ve semptomları Çizelge 2.6’da verilmiştir [73].

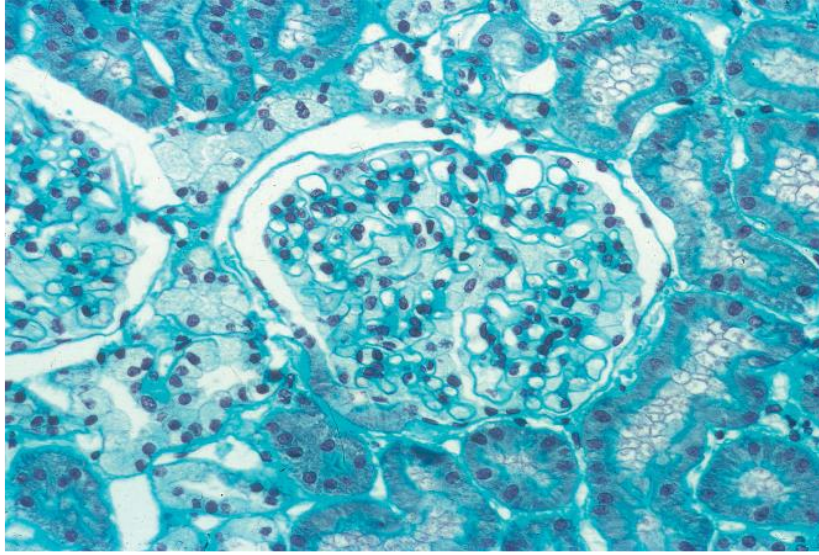
Çizelge 2.6. Yaşa göre Fabry hastalığının tipik belirti ve semptomları

Tanı Yaşı	Klinik Belirtiler
Çocukluk ve ergenlik (≤16 yaş)	Nöropatik ağrı Dishidroz (hipo ve hiperhidroz) Ateşli nöbet Böbrek ve kalp bulgularının başlangıcı(mikroalbuminüri, proteinüri, anormal kalp hızı değişkenliği) Oftalmolojik tutulum (kornea verticillata, dolambaçlı retina damarları) İşitme kaybı Anjiokeratom Gastrointestinal semptomlar Isıya ve soğuğa aşırı duyarlılık
Erken yetişkinlik (17-30 yaş)	Yukarıdakilerden herhangi birinin uzantısı Kardiyomiyopati İnme ve geçici iskemik atak Makroproteinüri ve progresif GFR kaybı Yüz dismorfizmi
İleri yetişkinlik (yaş> 30 yıl)	Yukarıdakilerden herhangi birinin kötüleşmesi Kalp hastalığı sol ventrikül hipertrofisi, anjina, aritmi ve dispne İnme ve geçici iskemik atak Osteopeni ve osteoporoz

Böbrek tutulumu

Hastalığın diğer birçok yönü gibi, böbrek patolojisi yaşla birlikte şiddetle artar. Klasik olarak etkilenen Fabry hastalarında böbrek lezyonları, glomerüler endotel mezanjiyal interstisyel hücrelerde ve podositlerde Gb3 birikiminin bir sonucu olarak ortaya çıkar. Fabry hastalığının temel özellikleri proteinüri ve böbrek fonksiyonunun değişmesidir (azaltılmış

glomerüler filtrasyon hızı). Böbrek yetmezliği genellikle mikroalbüminüri ile başlar ve yaşamın 2. ila 3. on yılında proteinürinin diyabetik nefropatide olduğu gibi, Fabry nefropatisinin ilerlemesine doğrudan katkıda bulunduğu inanılmaktadır. İlerleyen yaşla birlikte proteinüri kötüleşir. Fabry hastalığının nefrolojik yönleri, bozuklukla ilişkili morbidite ve mortaliteye önemli katkıda bulunur. Temelde üriner protein atılımı, Fabry hastalığı olan erkeklerde ve kadınlarda böbrek hastalığının ilerlemesi ile güçlü bir şekilde ilişkilidir [1, 62]. Hemodiyaliz tedavisi alan erkek hastaların %0,25 ila 3,5'inde Fabry hastalığı görülmüştür [62]. Böbrek biyopsisi ile elde edilen glomerüler podosit lizozomlarının görüntüsü Resim 2.1.'de verilmiştir.



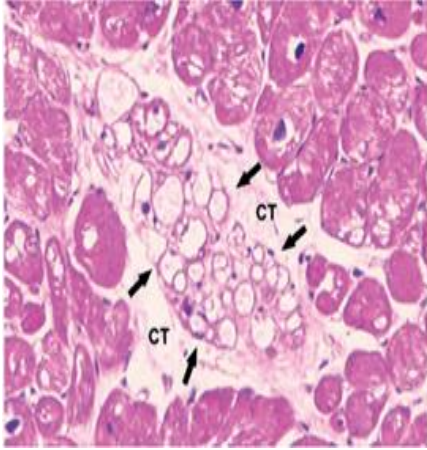
Resim 2.1. Böbrek biyopsisi; glomerüler podosit lizozomlarının görüntüsü [1]

Kardiak tutulumu

Kardiyak tutulumu Fabry hastalarının yaklaşık % 40 ila 60'ında görülür. Bunlar arasında sol ventrikül hipertrofisi, aritmi, anjina ve dispne gibi kardiyak semptomlar bildirilmiştir. Klasik sol ventrikül hipertrofisi (LVH) tedavi edilmeyen erkek ve kadın hastaların %53 ve % 33'ünde bulunur ve yaşla birlikte artar. Etiyolojisi bilinmeyen hipertrofik kardiyomiyopatili hastalarda, vakaların % 0.9 ila 3.9'unda Fabry hastalığı bulunur [62]. Koroner arter hastalığı ve miyokard enfarktüsü de ortaya çıkar ve muhtemelen koroner mikrovasküler disfonksiyon ile ilişkilidir. Fabry hastalığı olan hastalarda aritmi yaygındır ve sıklığı her iki cinsiyette de yaşla birlikte artar [1, 62, 72]. Normal oda büyüklüğüne ve korunmuş sistolik fakat bozulmuş diyastolik fonksiyona sahip sağ ventrikül hipertrofisi (RVH), Fabry hastalığındaki tipik sağ

ventrikül (RV) yapısal değişimini temsil eder. Elektrokardiyografik anormaliler ve değişiklikler Fabry hastalarında sık görülür. Kapak tutulumu; önceki çalışmalar Fabry hastalarında mitral kapak prolapsusu prevalansının yüksek olduğunu bildirmesine rağmen, bu bulgu son çalışmalarla doğrulanmamıştır. Koroner tutulum; Fabry hastalarında miyokard perfüzyon rezervinin anlamlı derecede azaldığı bulunmuştur. Fabry hastaları anormal koroner mikrovasküler fonksiyona sahiptir. Fabry hastalarında otonomik disfonksiyon vardır, ancak genellikle klinik olarak ortostatik düzensizlik belirtileri göstermezler. Aort kökü dilatasyonu; Fabry hastalığı erkek hastalarda aort kökü dilatasyonu gelişme riskinin artmasıyla ilişkilidir. Fabry hastalarında normatif popülasyon verilerinden tahmin edilene kıyasla egzersiz kapasitesi azalır.

Resim 2.2.'de hücre alanını işgal eden büyük vakuoller oklarla işaretlenmiştir, çalışan miyokardda sadece küçük perinükleer vakuoller bulunur.



Resim 2.2. İletim dokusunun bir parçasını gösteren sol ventrikül endomiyokardiyal biyopsisi [74]

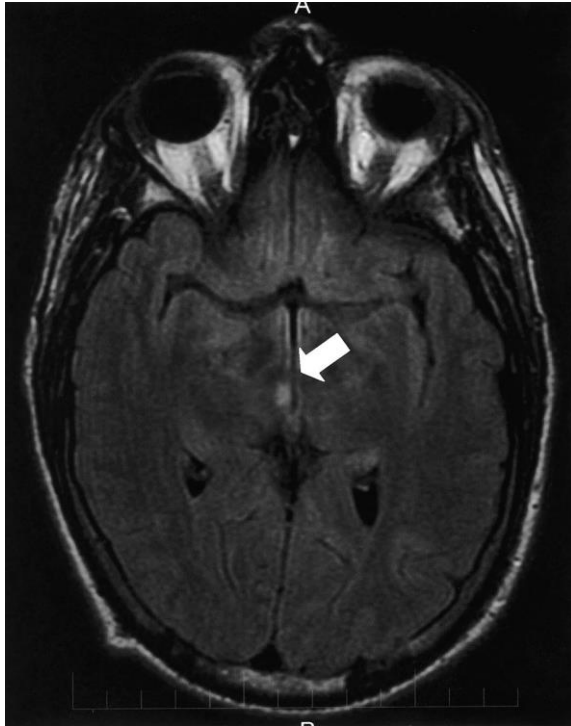
Serebrovasküler lezyonlar

Fabry hastalığının erken periferik nöropatik belirtilerini genellikle yetişkinlikte serebrovasküler komplikasyonlar ve otonomik disfonksiyon izler. Fabry hastalığının en yıkıcı nörolojik özelliklerinden bazıları küçük kan damarlarının multifokal tutulumunun sonucu oluşan serebrovasküler lezyonlardan kaynaklanır.

Serebrovasküler tutulum, hafiften şiddetliye kadar değişen çok çeşitli belirti ve semptomlara yol açabilir. Fabry hastalığında geçici iskemik atak ve inme sıklıkla görülür. Diğer belirtiler

vertigo / baş dönmesi, baş ağrısı ve daha nadiren vasküler demanstır. Kalp ve böbrek hastalıkları serebrovasküler hastalıklarla birlikte olabilir ve Fabry hastalığı olan hastaları nörolojik sakatlığa ve felce yatkın hale getirebilir [1, 62, 72]. Genç yaşta felç geçiren hastaların yaklaşık %1'inde Fabry hastalığı bulunur [75].

Resim 2.3.'te okla gösterilmiş bölgede lezyon gösteren beyin görüntüsü aksiyel sıvı zayıflatılmış inversiyon geri kazanım manyetik rezonans ile alınmıştır.



Resim 2.3. Sağ posteromedial orta beyinde lezyon gösteren beyin [44]

Otolojik anormallikler

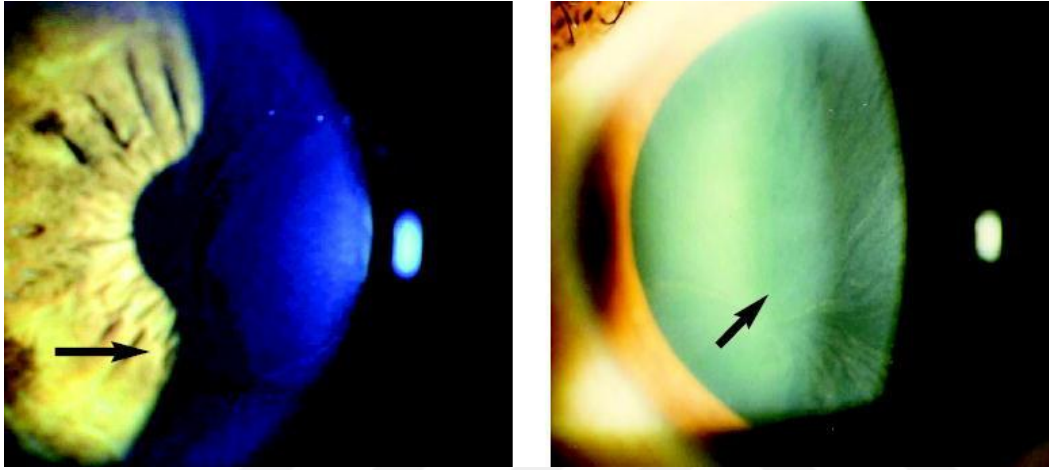
İşitsel ve vestibüler anormallikler Fabry hastalığında sık görülen eksikliklerdir. Fabry hastalığı, hastaların %18 ila %55'inde ilerleyici veya ani işitme kaybına neden olabilir [76].

Baş dönmesi, işitme kaybı ve kulak çınlaması gibi bir dizi semptomla sonuçlanır.

Klasik Fabry hastalığında erkek hastalarda hem ilerleyici işitme kaybı hem de ani sağırılık insidansının yüksek olduğu gösterilmiştir.

Oftalmolojik tutulum

Kornea verticillata Fabry hastalığı için tanısaldır ve erkeklerin ve kadınların % 70'inden fazlasında görülür [72]. Aseptomatiktir ve slit lamba göz muayenesi ile kolayca teşhis edilir (Resim 2.4.). Ayrıca katarakt, damar kıvrımı ve semptomatik konjonktival lenfanjektazi Fabry hastalığının oftalmolojik bulgularıdır [1].



Resim 2.4. Kornea verticillata okla işaretli [77]

Solunum tutulumu

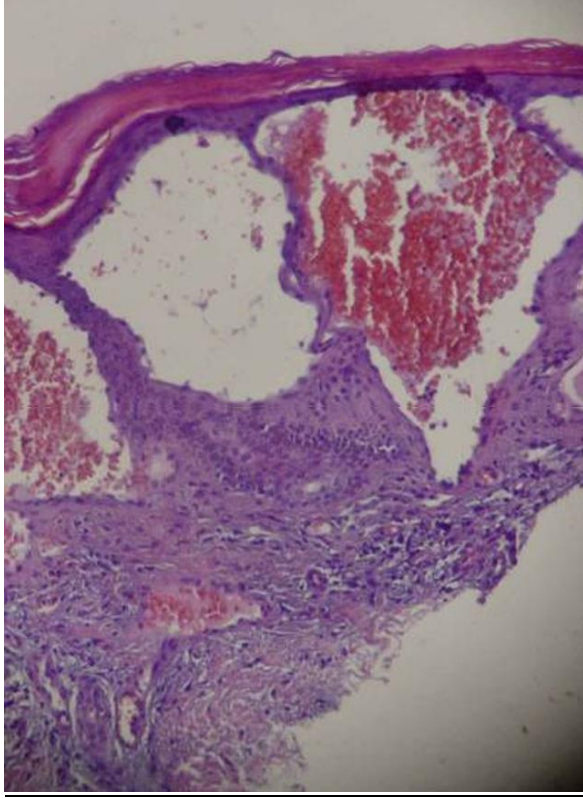
Fabry hastalığında her iki cinsiyette de nefes darlığı ile egzersiz ile kendini gösteren solunum tutulumu, kronik öksürük ve hırıltı sık görülür. Yapılan bir çalışmada FH'da hava yolu obstrüksiyonu prevalansının kadınlarda %26, erkeklerde %61 olduğu bulunmuştur [1].

Kutanöz tutulum

Anjiyokeratomlar Fabry hastalığının ayırt edici bir özelliğidir, ancak Fabry hastalığı için spesifik değildir. Anjiyokeratom, yüzeysel küçük kırmızımsı mor deri lezyonları şeklinde veya grupları halinde görülebilir. Diffüz anjiyokeratom tipik olarak alt gövdede bulunur. Klasik lokasyonlar ergenlik döneminde genital bölgeye yayılan göbek, eller, dizler, dirsekler ve gövdedir. İlerleyen yaşla birlikte boyutu ve sayıları artar.

Terleme bozukluğu (hipohidroz veya anhidroz) Fabry hastalığının bir diğer klasik özelliğidir. Hiperhidroz açıklanamayan hipertermiye ve zayıf egzersiz toleransına yol açar.

Erkeklerin yarısında ve kadınların dörtte birinde bulunur. Deri biyopsisinde elde edilen histolojik olarak tipik deri lezyonu ve yüzeysel anjiyom görüntüsü Resim 2.5.'te verilmiştir.



Resim 2.5. Deri biyopsisi (ışık mikroskobu) [1]

Kemik belirtileri

Aslında Fabry hastalığı, hastaların %50 ila %87'sinde prevalansı olan erken osteopeni ve osteoporozun yeterince tanınmayan bir nedenidir [62].

Depresyon ve yaşam kalitesi

Fabry hastaları, genel popülasyona kıyasla düşük bir yaşam kalitesine sahiptir [62].

Fabry hastalığında depresyon sık görülen ve az bildirilen bir sorundur. Bu hastalarda depresyon, yaşam kalitesini ciddi şekilde etkileyebilir. Ağrı, gastrointestinal semptomlar, işitme kaybı, asteni ve iki ayda bir intravenöz tedavi düşük yaşam kalitesi ile ilişkili faktörlerdir.

Küçük lif nöropatisi ve akroparestezi

Akroparestezi ve ağrı klasik Fabry hastalığına sahip erkek ve kızların % 60 ila 80'ini etkiler, ancak erkeklerde daha erken görülür. Yaşlanma ile azalır ve hatta kaybolur.

Gastrointestinal semptomlar

Genellikle hastaların % 50 ila 60'ında gastrointestinal semptomlar görülür [78]. Bunlar bağırsağın otonomik fonksiyonunun ve vaskülopatinin tutulumuna ikincildir. Karın ağrısı, şişkinlik, ishal, kabızlık, bulantı, kusma veya psödo-obstrüksiyon sendromu olarak ortaya çıkabilir. Denütrasyon, bağırsak villuslarında glikosfingolipid birikintileri nedeniyle besinlerin emilim bozukluğuna sekonder olarak tanımlanmıştır.

Çeşitli belirtiler:

Anemi, arteriyel yeniden şekillenme ve intima-media kalınlaşması, yüz dismorfizmi, azospermi, hipotiroidizm, priapizm, lenfödem, parapelvik böbrek kistleri Fabry hastalarında görülebilen çeşitli belirtilerdir [1].

2.2.5. Fabry hastalığının sınıflandırılması

Fabry hastalığı, klasik (şiddetli) FH, daha geç ve daha hafif bir fenotip ile klasik olmayan veya geç başlangıçlı FH ve FH'nın kardiyak varyantı olarak sınıflandırılır [5].

Klasik FH, çok düşük ($<3\%$) veya sıfır rezidüel enzim aktivitesine yol açan genetik varyantlarla ilişkilidir.

Bu hastalar genellikle nöropatik ağrı, kornea vertisillata ve anjiyokeratom ile başvururlar. Hipertrofik kardiyomiyopati, kalp ritmi bozuklukları, ilerleyici böbrek yetmezliği ve felç geliştirirler.

Klasik olmayan FH, genellikle daha az ciddi şekilde etkilenmiş veya tek bir organla sınırlı hastalık belirtileri olan daha fazla değişken bir hastalık seyri ile karakterize edilir. Erkeklerde rezidüel enzim aktivitesi $\geq 30\%$ altındadır. Bu hastalar genellikle inme, böbrek yetmezliği

veya kardiyomiyopatisi olan popülasyonlarda yapılan taramalarda belirlenir [5, 79]. FH'nın kardiyak varyantı en yaygın geç başlangıçlı varyanttır. Hastalar 50 yaşından itibaren kardiyomiyopati teşhisi konana kadar asemptomatik olabilir.

X'e bağlı kalıtım modeline rağmen, dişiler sıklıkla etkilenir ve şiddetli tutulumları olabilir. Genellikle erkeklerden daha hafif fenotiplere sahiptirler, ancak ciddi organ tutulumları olabilir [80]. Muhtemelen kadınlarda fenotiplerin değişkenliği çarpık X inaktivasyonu ile açıklanabilir [81].

2.2.6. Fabry hastalığı tanısı

FH'nın yönetimi, tanıdan uzun dönem takibe kadar referans bir lizozomal depo hastalıkları merkezi tarafından yapılmalı veya koordine edilmelidir.

Biyokimya uzmanı, pediatrist, nörolog, kardiyolog, nefrolog, dermatolog ve genetik uzmanı ile multidisipliner bir ekip yaklaşımı olmalıdır.

Fabry tanısı, başvuru şikayetlerinin spesifik olmayan doğası nedeniyle sıklıkla birkaç yıl gecikir. Son veriler Fabry hastalığının tanısındaki gecikmenin, her iki cinsiyet için de yaklaşık 15 yıl olduğunu göstermiştir [1]. Bu gecikmenin nedenleri arasında hastalığın nadirliği (ve buna bağlı olarak klinisyenler arasında farkındalık eksikliği) ve semptomların ortaya çıkmasının çeşitliliği ve özgüllüğü yer almaktadır.

İlk prezentasyon bir pratisyen hekime / aile hekimine, dermatoloğa, göz doktoruna, çocuk doktoruna, genetik uzmanına, nöroloğa, kardiyoloğa veya nefroloğa olabilir [72]. Klinik muayene Fabry hastalığı şüphesi uyandırır, biyokimyasal ve gerekirse genetik doğrulamaya ihtiyaç vardır [82].

Biyokimyasal tanı

Fabry hastalığının teşhisi, öncelikle enzim eksikliğinin ve bunun beraberinde hücre/organlarda tipik olarak lizozomlarda, globotriozilseramidde bir artış olduğunun gösterilmesini gerektirir [83].

Enzim analizi

Tanı için ilk adım α -galaktosidaz A aktivitesinin hem erkek hem de kadınlarda ölçülmesidir. Plazma, lökositlerde (beyaz kan hücreleri) (altın standart) veya kuru kan örneklerinde α -galaktosidaz A aktivitesi, florimetrik [84, 85, 86] veya LC-MS/MS metotları [87] ile kolayca ölçülebilir (Çizelge 2.7). Bu ölçümler mutlaka metabolik hastalıklar konusunda referans merkezlerde yapılmalıdır. Erkek hastalarda enzim aktivitesi tayini kesin sonuç vermektedir. Öte yandan etkilenen kadınlarda enzim aktivite değerleri normal sınırlar içinde saptanabilir. Bu sebeple, tüm kadınların durumları genotipleme (GLA gen mutasyonunun analizi) ile belirlenmelidir [83].

Çizelge 2.7. Fabry hastalığı tanısında altın-standart metotlar [60]

Kadın	-GLA gen dizilimi ile hastalığa neden olan mutasyon saptanır veya bilinen ailesel mutasyon test edilir (periferik lökositlerde yapılan α -galaktosidaz A enzim analizi tercih edilmez, plazma enzim seviyeleri güvenilir değildir)
Erkek	- Periferik lökositlerde veya plazmada yapılan α -galaktosidaz A enzim analizi - GLA gen dizilim ile hastalığa neden olan mutasyon saptanır veya bilinen tüm ailesel mutasyonlar test edilir
Prenatal-tanı	Bilinen bir ailesel mutasyon için GLA gen dizilimi değerlendirmesi

Glikosfingolipidlerin (Gb3, Lizo-Gb3) ölçümü

Kendi başına enzim eksikliğinden ziyade nihayetinde hasta semptomlarından sorumlu olan patolojik kaskadları başlatan substrat birikimidir. Bu nedenle, bu glikosfingolipidin artışının ilgili bir organ sisteminde mevcut olmasının tespiti, hastanın Fabry hastalığı olup olmadığı veya Fabry hastalığına bağlı komplikasyonlar açısından risk altında olup olmadığının tespitinin merkezinde yer alır. Başlangıçta Gb3 idrarda ölçümü yapılmış, ancak plazma ölçümlerinde Gb3'ün bozunma ürünü globotriosilsfingozinin (Lizo-Gb3) daha hassas ve spesifik sonuç verdiği gösterilmiştir [16]. Bu analit, hemizigot erkeklerin plazmasında ve klasik Fabry hastası yetişkin kadınların plazmasında daha az oranda yükselir ve Lizo-Gb3 enzim replasman tedavisini izlemek için faydalı görünmektedir [12, 13].

Doku biyopsisi

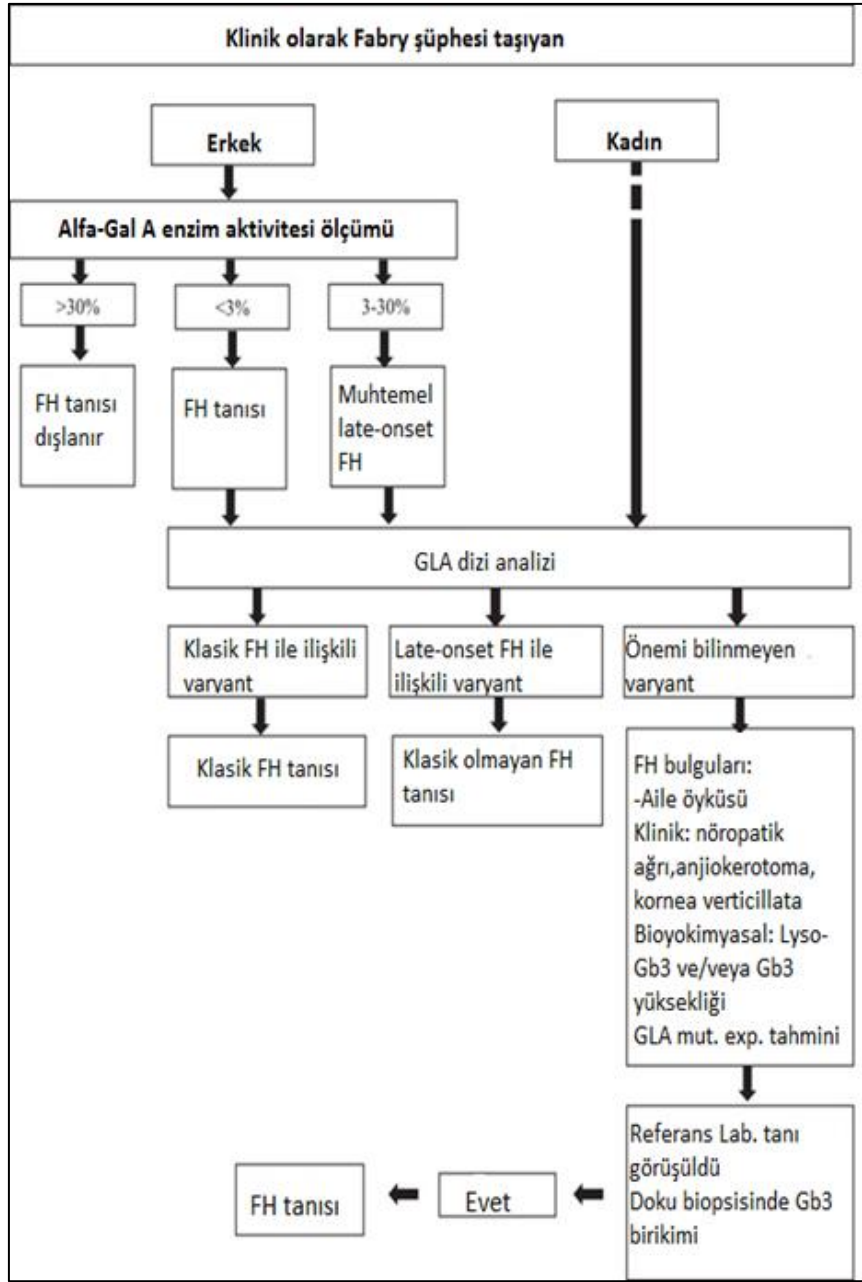
Günümüzde doku biyopsisi ihtiyacı nadirdir. FH tanısını kolaylaştıran glikolipid birikintilerini gösterebilir. Önemi bilinmeyen GLA varyantları ve tanıya katkısı olmayan sonuçsuz Lizo-Gb3 durumlarında kullanımı tartışılabilir [4]. Deri biyopsisi kolayca yapılır, ancak ilgili organlarda önemli birikintilerin varlığını doğrulayamaz. Renal biyopsi materyalinde, ışık mikroskopisi ile podositlerin vakuolasyonunun, tübüler, interstisyel, glomerüler ve vasküler Gb3 birikiminin ve podositlerin sitoplazmasında zebra cisimciklerinin varlığı Fabry hastalığını işaret eder [62]. Yine de Gb3 birikimi için spektrofotometrik tayin yapılması gereklidir. Elektron mikroskobu zebra cisimlerini gösterir. Endomiyokardiyal biyopsi, kardiyak varyantları veya önemi bilinmeyen varyantları olan hastalarda gerekli olabilir.

Genetik testler

GLA gen mutasyonu için genetik testler, neden olan mutasyonu tanımlamak için her zaman gereklidir. Aynı GLA varyantında fenotipik değişkenlikler mümkündür, ancak bir kısım varyantların klasik FH ile diğerlerinin geç başlangıçlı FH ile ilişkili olduğu bilinmektedir ve kalanlarda polimorfizm ve önemi bilinmeyenlerdir [79] Genetik testlere aile üyelerini taramak ve etkilenen kişileri belirlemek için de ihtiyaç vardır. Terapötik kararlar için de genetik testler gerekmektedir. Enzim aktivitesi düşük ancak ekzonik mutasyonu olmayan bir Fabry hastası, intronik mutasyonların değerlendirilmesine yol açmalıdır [62].

Tarama

Ailede FH öyküsü olan bireylerin taranması veya yenidoğan tarama programları semptomların gelişmesinden önce hastaları tanımlamak tek pratik yoldur. Herhangi bir tarama güvenilir, tercihen hızlı ve düşük maliyetli yöntem gerektirir. Kuru kan örneklerinde α -galaktosidaz A enzim aktivitesinin eksikliğinin belirlenmesi, FH için daha güvenilir bir tarama yöntemi olabilir ve bu yaklaşım erkeklerde doğrulanmıştır, ancak heterozigot kadınların yaklaşık üçte birini tespit edememektedir [1].



Şekil 2.8. Fabry Hastalığı tanı algoritması [62]

2.2.7. Fabry hastalığının teşhisindeki zorluklar ve güncel sorunlar

FH' daki semptomların spesifik olmayan doğası, klinik bulguları ile birleştiğinde FH tanısını zorlaştırır [83]. Bununla beraber FH'nın nadirliği, heterozigot Fabry dişilerinde X'e bağlı doğa, hastalığın genel farkındalık eksikliği ve FH'nın bazı erken belirtilerinin diğer daha genel patolojik durumlarla paylaşılması gibi faktörler tanıyı engellemektedir.

Lökositlerde α -gal A aktivitesinin ölçülmesi, yetişkin hemizigot Fabry erkeklerinin tanısında kullanılabilir [88, 89]. α -Gal A aktivite testi tek başına erkek hastalar için tanısaldır; bununla birlikte, hastalığa neden olan GLA mutasyonunun doğrulanması, hastalık fenotipinin oluşturulmasına yardımcı olmak, α -Gal A aktivitesinin azalmasına neden olan iyi huylu polimorfizmleri dışlamak için önemlidir ve risk altındaki aile üyelerinin test edilmesine izin verir [4]. Öte yandan bu yöntem, heterozigot Fabry dişileri ve kardiyak varyantları gibi geç başlangıçlı Fabry hastalarında, hastaların sağlıklı bireylerdekine benzer rezidüel enzim aktivitesi seviyeleri gösterebildiği durumlarda yetersiz kalmaktadır. Bu sebeble kadın hastalarda GLA geninde hastalığa neden olan bir mutasyonun varlığının gösterilmesi gerekir. Ek olarak, aile öyküsü bir GLA VUS'un patojenitesini tahmin edebilir. Yeni bir mutasyonun patojenik mi yoksa muhtemelen iyi huylu mu olduğunu netleştirmek için "altın standart", in vitro GLA mutasyon ekspresyon analizlerini içerir. Ailede FH öyküsü olan bireyler için moleküler analiz prosedürleri bir tanı aracı olarak yararlı olabilir.

Fabry hastalığının karakteristik klinik özellikleri (nöropatik ağrı, kardiyomiyopati, böbrek yetmezliği) değerlendirilmelidir.

2.2.8. Fabry hastalığının tedavisi

Moleküler biyoloji ve genetik mühendisliğindeki son gelişmeler, FH için tedavilerin geliştirilmesini sağlamıştır [4]. Fabry hastalığına ait tedaviler ve gelecekte uygulanabilecek tedavilerin terapötik hedefleri Şekil 2.9.'da verilmiştir.

Enzim Replasman Tedavisi (ERT)

ERT ile ilk denemeler, Brady ve meslektaşlarının iki FH hastasına saflaştırılmış insan plasental α -galaktosidaz A enzimini başarıyla uyguladıkları 1973'te gerçekleştirildi [90]. Enzim replasman tedavisi 2001 yılından beri rutin nedensel tedavi seçeneği olarak mevcuttur.

Günümüzde yaşam boyu tedavi için farklı dozajlarda iki preparat onaylanmıştır. Bunlardan ilki agalsidaz-alfa (Replagal-Takeda) insan hücre kültüründe genetik mühendislik teknolojisi ile üretilmekte, her iki haftada bir 0,2 mg/kg vücut ağırlığı dozunda onaylı ve 40 dakikalık sürede intravenöz infüzyonla uygulanmaktadır. Diğeri ise agalsidaz-beta

(Fabrazyme, Sanofi Genzyme), Çin hamsteri yumurtalık hücrelerinde üretilmekte ve her iki haftada bir 1,0 mg/kg'lık dozda onaylıdır ve önerilen infüzyon süresi yaklaşık 240 dakikadır [91, 92].

ERT, yaşam kalitesinin iyileştirilmesi ve yaşamı tehdit eden olayların azaltılması dahil olmak üzere hastalık yükünün stabilizasyonu ve hatta iyileştirilmesinde oldukça iyi etkinlik gösterir [93].

Maalesef, FH'lı kadınlar organ belirtilerine rağmen genellikle hala tedavi edilmemektedir [94], ancak tedavinin erken başlatılması özellikle erkeklerde ve kadınlarda tedavinin (uzun vadeli) başarısı için oldukça önemlidir.

Hastalara ve belirtilerine bağlı olarak, ERT ile aşağıdaki terapötik etkiler elde edilebilir:

- Böbrek fonksiyonunun stabilizasyonu veya terminal böbrek yetmezliğine ilerlemenin gecikmesi
- Kalp duvarının kalınlığının stabilizasyonu ve sol ventrikül hipertrofisinin işlevi veya azaltılması
- Nöropatik ağrının giderilmesi ve iyileşme
- Gastrointestinal şikayetler ve yetenekte iyileşme
- Terleme yeteneğinde gelişme

Fabry nefropatisi ile ilgili olarak, çocuklarda podositlerde Gb3 inklüzyonlarında doza bağlı bir azalma gösterildi, bu da böbrek fonksiyonunun stabilizasyonu açısından doza bağlı bir ERT etkinliği olduğunu düşündürdü [91].

Ayrıca günlük klinik uygulamada ERT'nin aşağıdaki nedenlerden dolayı bazı sınırlamaları vardır [95]:

- sınırlı dağıtım hacmi
- intravenöz uygulama erişimi gereksinimi
- anti-ilaç antikorlarının üretiminin uyarılmasının
- kardiyak fibrozisin devam eden ilerlemesi

- ERT’de beyaz madde hastalığının ilerlemesi

Şaperon tedavisi

GLA genindeki yanlış mutasyonlar genellikle dengesiz ve yanlış katlanmış bir proteinle sonuçlanır ve hücre içi α -galaktosidaz A aktivitelerin azalmasına neden olur. Yanlış katlanmış proteinler, endoplazmik retikulum (ER) içindeki protein kalite kontrol mekanizmasını geçmeyecek ve lizozomlara ulaşmadan önce erken bozulmaya neden olacaktır [93]. Proteinin katlanmasını ve stabilitesini eski haline getirmek için, proteinin aktif merkezine geri dönüşümlü olarak bağlanan farmakolojik şaperonlar kullanılabilir [96].

Farmakolojik şaperon tedavisi, yanlış katlanmış bir proteine spesifik olarak bağlanarak bu proteinin uygun katlanmasını ve/veya hücre içi trafiğini düzenleyen küçük moleküllerin kullanımına dayanan yeni bir moleküler terapötik yaklaşımdır. Farmakolojik şaperonların oral uygulama, geniş doku dağılımı ve daha az immünojenisite gelişmesi gibi avantajları vardır.

Mayıs 2016’dan bu yana farmakolojik şaperon migalastat (Galafold; 123 mg sert kapsül/gün; Amicus Therapeutics) FH için ilk oral tedavi olarak onaylanmıştır [97]. Migalastat uygulamasından sonra enzim aktivitesinde artış gösteren bir α -Gal A mutanını "uygun" olarak tanımlanır.

Migalastat şu anda FH için ABD Gıda İlaç İdaresi (FDA) ve Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından onaylanmış tek oral tedavidir.

Yakın tarihli bir çalışma, Migalastatin 6 aylık tedaviden sonra podositlerde Gb3 birikimini azaltabileceğini göstermiştir [92].

Lökosit α -galaktosidaz A aktivitesi, plazma Lizo-Gb3 değişiklikleri ve ayrıntılı klinik değerlendirmenin de dahil olduğu in vivo yanıtın dikkatli bir şekilde izlenmesi, Migalastat ile tedaviden yararlanma olasılığı en yüksek olan hastaların seçilmesine yardımcı olacaktır.

Substrat azaltma tedavisi

Substrat azaltma terapisinin (SRT) amacı, substratın indirgenmesi ve dolayısıyla hücrelerde Gb3 birikiminin müteakip inhibisyonudur.

Lucerastat (Idorsia) (Pharmaceutical Ltd, Allschwil, İsviçre) ve venglustat (Sanofi Genzyme, Cambridge, MA) gibi substrat azaltma tedavileri, glukosilseramid sentaz inhibitörü olarak işlev görür ve glikosfingolipite dönüştürülen seramid miktarını sınırlayarak Gb3 birikmesini önler [98].

Gen terapisi

Gen terapileri gen düzenlemeyi içerir;

- Ex vivo yaklaşımda, hastadan toplanan hematopoetik kök hücreler, gen düzenlemesinden sonra hastaya geri verilir.
- İn vivo yaklaşımda, gen düzenlemesine sahip bir vektör doğrudan hastaya aşılanır ve ardından karaciğer hücreleri gibi hastaya ait hücreler, eksik proteini eksprese etmek için doğrudan gen düzenlemesine tabi tutulur [95].

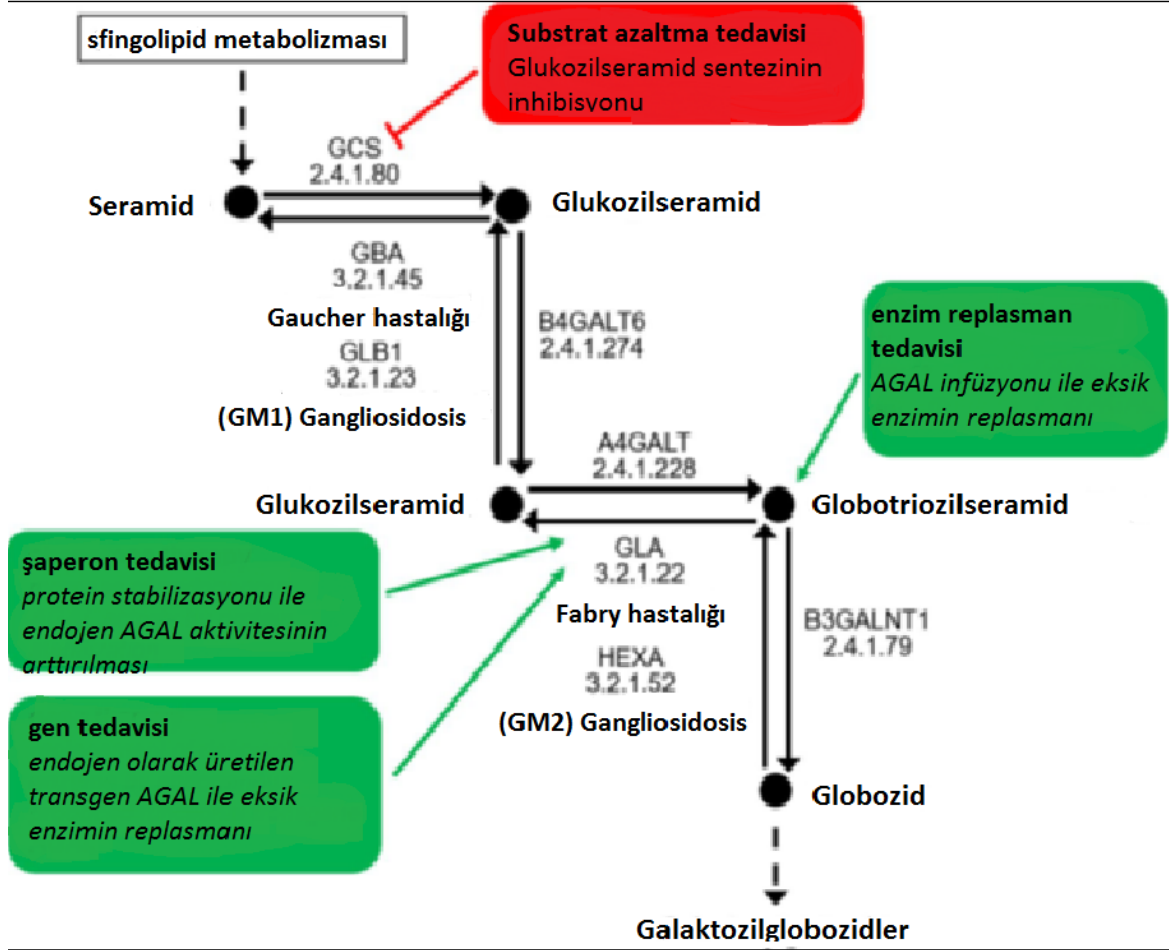
Öte yandan α -GAL mRNA uygulanması miyeloablatif terapi ya da gen transdüksiyonu için viral vektörlere ihtiyaç olmaksızın α -Gal'in üretimini mümkün kılmaktadır. Bu yöntem şu anda mevcuttur ve test altında olan başka bir terapötik yaklaşımdır [99].

Yardımcı tedaviler

FH'na özgü tedavinin yanı sıra, birçok hastada FH semptomlarının tedavisi için adjuvan ilaç veya müdahalelere ihtiyaç vardır.

İnce lif nöropatisi sebebiyle ağrısı olan hastalar en çok karbamazepin tedavisinden faydalanırlar. Proteinüri hastalarında antiproteinürik ile tedavi ACE veya ARB gibi ajanlar proteinüriyi azaltır ve böbrek yetmezliğini yavaşlatır. Düşük sodyumlu bir diyetle bağlılık, antiaritmik ve antikoagülan ajanlar ve D vitamini takviyesi (ihtiyaca göre) ve yaşam tarzı

değişiklikleri (örneğin: aşırı sıcaklıktan kaçınma), yine ESRD yaşayan hastalar için diyaliz veya böbrek nakli imkanları mevcuttur [95].



Şekil 2.9. Seramid yoluna ve Fabry hastalığına ait onaylı tedavilerin ve gelecekteki tedavilerin terapötik hedefleri [93]

2.2.9. Biyobelirteçler

Bir biyobelirteç, belirli bir hastalığın klinik belirtilerinden sorumlu olan bazı biyolojik durumları veya süreçleri gösteren ölçülebilir bir analittir. Biyobelirteçler, tanısal bir role sahip olmanın yanı sıra, tedaviye yanıtı değerlendirmek, terapötik stratejiyi seçmek ve zaman içindeki hastalık evrimini incelemek için faydalıdır.

Biyobelirteçlerin analizi kalitatif veya kantitatif yapılabilir: kalitatif analiz, düşük hassasiyet ve özgüllükle ilişkili elektroforez, nokta testleri ve ince tabaka kromatografisi ile

gerçekleştirilebilir. Kantitatif çalışmalar, umut verici ardışık kütle spektrofotometrik yöntemler ve çeşitli kolorimetrik teknikler kullanılarak gerçekleştirilebilir [100].

Fabry hastalığında tanı için altın standart hali hazırda genetik testlerle onaylanan α -gal A enzim aktivitesidir.

FH'da biyobelirteçler; tanı-patojenik mutasyonlar ile patojenik olmayan mutasyonlar veya polimorfizmler arasında ayırım yapmak; belirli bir organ tutulumunun veya hasarının erken tanımlanması; ve prognoz daha fazla ilerleme riski taşıyan hastaların belirlenmesi ve tedaviye yanıtın takibi gibi çeşitli amaçlar için yararlı olabilir [101].

FH tanı ve tedavi etkinliği için biyobelirteç olarak iki temel biyobelirteç Gb3 ve Lizo-Gb3 bildirilmiştir [12, 102]. Globotriozilseramid (Gb3) lizozomal birikimi, kalıtsal α -Gal A enzim eksikliğe bağlı Fabry hastalığını karakterize eden bir elementtir.

Gb3 birikimi, kalp problemleri, böbrek yetmezliği ve merkezi sinir sistemi patolojisi gibi çeşitli klinik belirti ve semptomlarla ilişkilidir. Dokuda farklı miktarlarda enzim ekspresyonu ve Gb3 oluşumu sebebiyle organ tutulumu ve hastalık progresyonunun dağılımı çeşitlilik gösterir. Hastalığın ilerlemesini ve tedavi rejimlerini anlamak için üç hastalık seviyesinin tanımlanması gerekir [103, 13].

- Hücresel tutulum (birincil seviye)
- Doku hasarı (ikincil seviye)
- Organ yetmezliği (üçüncül seviye)

Hücresel tutulum değiştirilmiş hücreler üzerinde doğrudan patolojik bir etkiye sahip gibi görünen Gb3 ve deasetile metaboliti Lizo-Gb3 birikimine dayanır [104]. Bu hücre hasarları veya hücre yapısındaki / işlevindeki değişiklikler, çevreleyen dokunun (iltihaplanma, hipertrofi, apoptoz, interstisyel fibroz ve replasman fibrozu) reaksiyonuna yol açabilir. Doku tutulumu böbrek fonksiyon bozukluğu ve kalp yetmezliği gibi organ işlev bozukluğuna yol açar. Böylece kalp tutulumu konjestif kalp yetmezliği, anjina pectoris, bradikardi, atriyal fibrilasyona, ardışık inme ve ani kardiyak ölüme yol açar.

Birincil düzeyde tutulum, spesifik tedaviye (ERT) iyi yanıt verir ve iyi bir prognoza sahiptir. İkincil düzeyde, doku reaksiyonu tersine çevrilebilir, ancak doku yapısındaki değişiklikler tedaviye yanıt vermiyor gibi görünmektedir.

Fabry hastalığında organ yetmezliğinin (üçüncül düzey) prognozu kötüdür ve terapötik etki, genel ilaçlarla semptomatik tedaviye ve cihazlara odaklanmalıdır.

Bu nedenle, hastalığın farklı aşamalarını tanımlamak gereklidir. Biyobelirteçler geçmişte Fabry hastalığında önemli bir klinik rol oynamadı [105]. Klinik uygulamada bir tarama aracı olarak, teşhis süreci bağlamında ve tedaviye yanıtın bir göstergesi olarak kullanılabilecek yeni belirteçleri tespit etmek için yıllar içinde yoğun araştırmalar yapılmıştır.

Gb3

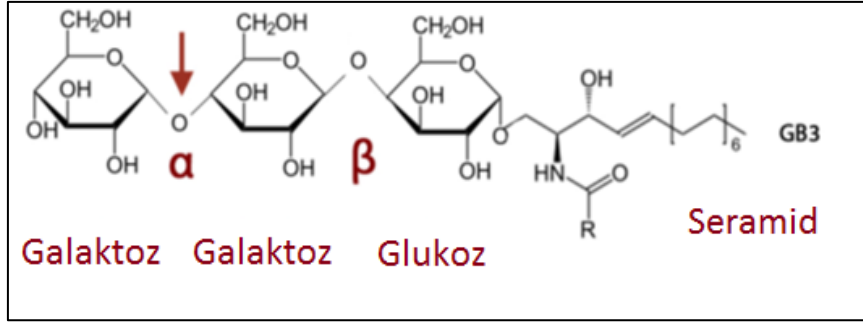
Alfa-galaktozidaz A eksikliği neticesinde, çeşitli vücut dokularındaki lizozomlar içinde patolojik olarak biriken ana öncü metabolik substrat seramid trihekzozid (CTH) olarak da bilinen Globotriozilseramid (Gb3)'tir.

Gb3'ün kimyasal yapısı

Gb3 bir oligosakkarite bağlı, bir lipit iskeletinin oluşturduğu bir glikosfingolipittir. Gb3'ün kimyasal yapısı ve sağlıklı bireylerde α -galaktosidaz A enziminin Gb3'ten ayırdığı üçüncü şeker bölgesi Şekil 2.10.'da verilmiştir.

Yapısının lipidik kısmı, bir seramid molekülü oluşturan, amid bağı yoluyla bir sfingosin ve bir yağ asidinin birleşmesinden oluşur. Gb3'ün kimyasal yapısı, memelilerde C16-C26 arasında değişen sfingoid baz (sfingosin kısmı) ve yağ asidi zinciri içeren seramid omurgası ve bir dizi üç karbonhidrat baş grubundan (galaktoz-galaktoz-glikoz) oluşur.

Gb3'ün canlı hücrelerdeki biyolojik rolü, esas olarak hücre yüzeyi antijenleri, bakteriyel protein toksinleri için reseptörler ve sinyal iletim rolleri gibi hücre yüzeyi işlevlerini içeren diğer glikosfingolipitlere benzer.



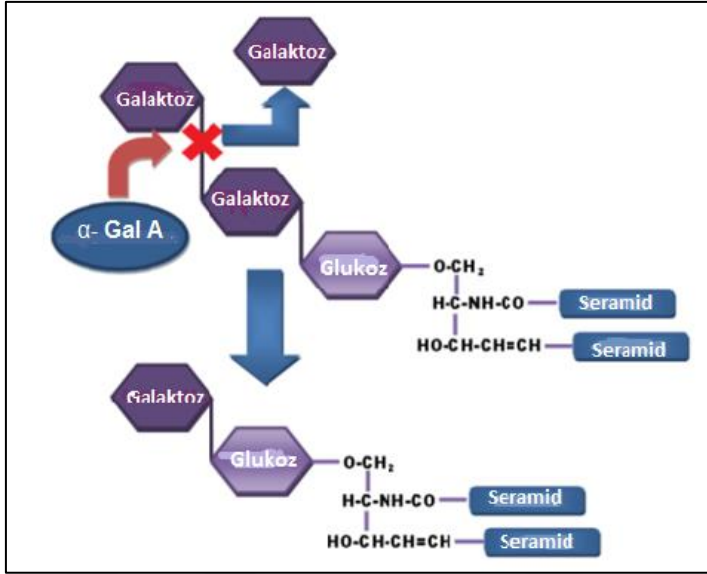
Şekil 2.10. Gb3 kimyasal yapısı sağlıklı bireylerde α -galaktosidaz A enziminin Gb3'ten ayırdığı üçüncü şeker bölgesi kırmızı ok ile işaretlenmiştir [105].

Fabry hastalığında Gb3 seviyelerinin yükseldiği, ilk olarak 2005 yılında bildirilmiştir [106], ancak rezidüel enzim aktivitesi olan hastalarda ve kadınlarda tutarlı değildir [107]. Fabry hastalığının ilerlemesini izlemek için plazma veya idrar Gb3'ün biyobelirteç olarak değeri sorgulanabilir. Çeşitli araştırmalarda, plazma veya idrar Gb3'ünün Fabry hastalığının tezahürünü ve terapötik sonucunu kötü yansıttığı bulunmuştur. Endojen α -galaktozidaz A'dan yoksun birçok erkek Fabry hastası, ERT sırasında nötralize edici antikorlar geliştirir. Bu tür antikorların oluşumuna, plazma Gb3 yüksekliğinin bir tekrarı eşlik eder, ancak bunun klinik önemi belirsizliğini korumaktadır [108].

Fabry hastalığı belirtileri için plazma veya idrar Gb3 seviyelerinin zayıf öngörü değeri tamamen şaşırtıcı değildir. Fabry hastalarının idrarında Gb3'ün yükseldiği bilinmektedir. Önemsiz mutasyonları olan veya rezidüel enzim aktivitesi olmayan hastalarda yüksek üriner Gb3 seviyeleri bulunur; kadın heterozigotlarda ve majör rezidüel α -galaktosidaz A aktivitesi olan hastalarda daha düşük seviyeler bildirilmiştir. Bununla birlikte, bu son hasta gruplarında normal üriner Gb3 seviyeleri de ölçülmüştür [100].

Üriner Gb3 ile genotip, cinsiyet ve tedavi arasında korelasyon bulunmuştur [109].

Gb3, belirli bir tedavinin yanıtını ve etkinliğini değerlendirmek için idrarda ölçülen geleneksel bir belirteçtir. ERT'e yanıt olarak azaldığı bulunmuştur; ancak, tedavi denemelerinde geçerli bir temsili belirteç değildir.



Şekil 2.11. Gb3'ün parçalanması [110].

Gb3 parçalanması α -galaktosidaz A'dan enziminin üçüncü şeker kalıntısını ayırması ile gerçekleşir (Şekil 2.11.). Fabry hastalığında bu enzim eksiktir ve bu nedenle Gb3 substratı hemen hemen tüm hücre tiplerinin lizozomlarında birikir.

Lizo-Gb3

Bir takım şaşırtıcı bulgular, Fabry hastalarında Gb3 ve metabolitlerini yeniden incelenmesine neden oldu. Fabry hastalarından alınan plazmada patojenik, potansiyel olarak vazoaktif bir metabolitin bulunabileceği düşüncesi Aerts ve arkadaşlarını Lizo-Gb3'ün varlığını aramaya sevk etti [12]. Bu araştırma sırasında Fabry hastalarının plazmasında belirgin şekilde artmış konsantrasyonlarda deasile globotriaosilseramid, (globotriozilsfingozin, Lizo-Gb3) bulunduğu keşfedildi. Bunun ardından, Auray-Blais ve meslektaşları Fabry hastalarında yüksek üriner Lizo-Gb3 seviyeleri gösterdi [111].

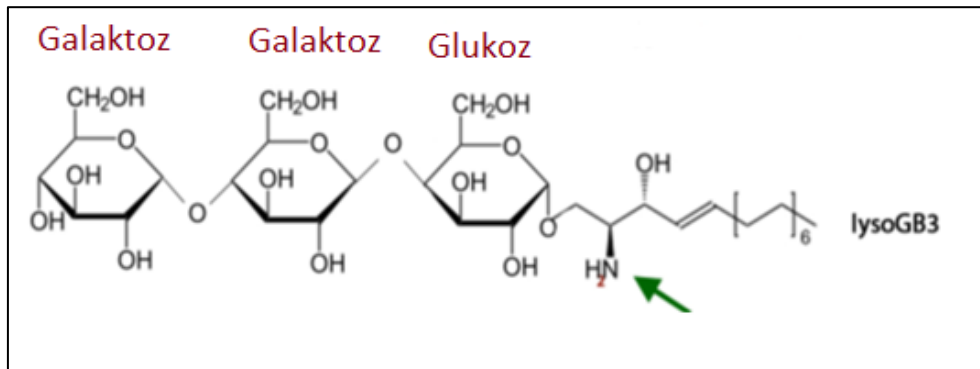
Rombach ve arkadaşları, plazma Lizo-Gb3 konsantrasyonunun tüm hemizigot Fabry erkeklerinde ve yetişkin heterozigot Fabry dişilerinde sağlıklı bireylere kıyasla anlamlı bir yükselme gösterdiğini bildirmiştir. Bununla birlikte genç heterozigot Fabry dişilerinde ise Lizo-Gb3'e rastlanmadığı gibi daha düşük seviyelerde yükseklik gözlemlendi [112]. Togawa ve arkadaşları, Lizo-Gb3'ün FH'da ERT'ni izlemek için yararlı bir biyobelirteç olmasının beklendiğini ve Fabry farelerinde Lizo-Gb3 seviyelerinin rekombinant α -gal-A ile ERT'den sonra Gb3 seviyelerinden daha fazla azaldığını gösterdiğini öne sürdü [16]. Lizo-Gb3'ün,

özellikle kadınlarda Gb3 düzeylerinin genellikle normal görüldüğü heterozigot dişilerde, FH için tanısal bir biyobelirteç olarak Gb3'ten üstün olduğu gösterilmiştir [17]. Önceki bir çalışma, plazma Lizo-Gb3'ün tanısal bir biyobelirteç olarak idrar Lizo-Gb3'ten üstün olduğunu ortaya koymuştur [17]. Çalışma, bazı tipik Fabry erkeklerinin plazmadaki Lizo-Gb3 seviyelerinin, idrardaki Lizo-Gb3 seviyelerinden 480 kat daha fazla olduğunu bildirdi. Öte yandan, Fabry hastalarında idrar Lizo-Gb3 konsantrasyonlarının, FH' nın klinik ciddiyeti ile korele olduğu bildirilmiştir [111, 109].

Lizo-Gb3'ün biyokimyasal ve fiziksel özellikleri

FH'daki etiyolojik rollerini incelemek için Lizo-Gb3'ün biyokimyasal özelliklerini anlamak çok önemlidir. Lizo-Gb3, büyük bir polar şeker parçasına sahip katyonik bir amfifildir ve bu onu nispeten hidrofilik ve suda çözünür hale getirir. Lizo-Gb3'ün kimyasal yapısı Şekil 2.12'de verilmiştir. Gb3, dokularda asit seramidaz tarafından Lizo-Gb3'e dönüştürülür ve biyolojik sıvılarda ölçülebilir, etkilenen organların histolojik örneklerinde saptanabilir [12]. Bu nedenle, serbest bir amin grubuna sahip olmasıyla karakterize edilen Lizo-Gb3'ün bu kimyasal yapısı, OPA kullanılarak türevlendirme işlemi gibi bazı ekstraksiyon prosedürlerinin uygulanmasına izin verir [12, 112, 13]. Lizo-Gb3'ün yapısı, bu bileşiğin hidrofilik doğasını, sıvı-sıvı ekstraksiyonu kullanılarak biyolojik örneklerden ekstraksiyonunu kolaylaştırmaktadır. Amin grubu Lizo-Gb3'ün pozitif modda LC-MS analizine izin veren protonlanma (H^+ iyonu) aviditesini yansıtır.

Genel olarak, bu biyokimyasal ve fiziksel özellikler sayesinde biyolojik numunelerdeki Lizo-Gb3'ü LC-MS/MS sistemleri ile tanımlamak ve ölçmek mümkün olmaktadır.



Şekil 2.12. Globotriozilsfingozin (Lizo-Gb3) kimyasal yapısı

Katyonik amfifilik lyso Gb3'ün plazma konsantrasyonlarındaki nispi artış, Gb3 artışından büyüklük olarak fazladır. Semptomatik erkek Fabry hastalarından alınan plazma örneklerinde oldukça yüksek nanomolar konsantrasyonlarda lizo-Gb3 olabilir. Ayrıca semptomatik kadın Fabry hastalarında, açıkça artmış Lizo-Gb3 seviyeleri tespit edilirken, eşzamanlı olarak Gb3 konsantrasyonları yüksek normal aralıkta saptandı [12]. Bu nedenle, plazma Lizo- Gb3 ölçümü, özellikle kadın Fabry hastalarında çok yararlı bir tanı aracı sunuyor gibi görünmektedir. Bu arada Fabry hastalığında Lizo-Gb3 bulguları bağımsız araştırmalarla doğrulandı [16, 111]

Hollandalı araştırmacılar, Lizo-Gb3'ün biyolojik etkisini ortaya koyarak, vasküler yeniden şekillenmede Lizo-Gb3'ün rolünü araştırdılar. Bu araştırmacı grubu in vitro olarak, semptomatik Fabry hastalarının salgıladığına benzer Lizo-Gb3 düzeylerinin kullanılmasının, vasküler yeniden şekillenmeden kaynaklanan karotid-intima ortamının kalınlığını artıran düz kas proliferasyonunu önemli ölçüde uyarabildiğini buldu [12]. Öte yandan, Lizo-Gb3'ün aksine, diğer GSL'in özellikle Lizo-Gb3 bozunma ürünü laktosilsfingosin ve diasile öncülü Gb3'ün küçük kasın çoğalmasında hiçbir etkisi olmadığı gösterilmiştir [12].

Lizo-Gb3'ün α -Galaktosidaz A tarafından dönüştürülmesi

Lizo-Gb3'ün bozunma mekanizmasını in vitro olarak Aerts ve arkadaşları incelendi [12]. Lizo-Gb3 α -galaktosidaz A için substrat görevi görerek laktozilsfingosine dönüşebilir. Nötr pH'ta rekombinant α -galaktosidaz A, optimum asit pH'ları nedeniyle Lizo-Gb3'ü güçlükle hidrolize eder [12]. Çalışma, rekombinant α -galaktozidaz-A kullanılarak in vitro Gb3 bozunma verimliliğinin, aynı hidroliz aktörlerini ve aynı fiziksel koşullarda kullanılan Lizo-Gb3 bozunmasına kıyasla 50 kat daha yüksek olduğunu bildirdi.

Birçok çalışma, Fabry deneklerinden alınan biyolojik numunelerdeki Lizo-Gb3 konsantrasyonlarının Gb3 seviyelerindeki artışla orantılı olarak yükseldiğini gösterdi ve bu nedenle, Lizo-Gb3'ün anahtar enzim α -galaktozidaz-A aktivitesinin inhibisyonunda önemli bir biyolojik rol oynadığı öne sürüldü [12]. Rekombinant α -galaktozidaz-A'nın Gb3 substratı üzerindeki aktivitesi, Lizo-Gb3'ün varlığıyla inhibe edildi. Lizo-Gb3'ün α -galaktozidaz-A aktivitesi üzerindeki inhibe edici rolünü kanıtlayan ve ardından Gb3 depolamasını

destekleyen çalışmada, Lizo-Gb3 eklendikten sonra sağlıklı kültürlenmiş fibroblastlarda önemli bir Gb3 birikimi gösterilmiştir.

İlk olarak Lizo-Gb3'ün inhibe edici özellikleri, Fabry hastalarında dolaşımdaki bir α -galaktosidaz A inhibitörüne zaten işaret eden önceki gözlemlerin renal transplantasyonlarda tekrarlanan Gb3 birikimi bulgusunu açıklamaya yardımcı olabilir [12].

İn vitro inhibisyon kapasitesinin, in vivo'dan 200 kat belirgin şekilde daha düşük olduğu öne sürülmüştür ve asidik pH ve Lizo-Gb3 intra-membranlarının absorptif karakteri ile karakterize edilen insan lizozomlarındaki Lizo-Gb3'ün fiziksel özelliklerinden kaynaklanabileceği varsayılmıştır.

Öte yandan, Gb3'ün hücresel düzeyinin yükselişi, katabolizma bozukluğuna bağlı olmak yerine, Gb3 sentezindeki artışa bağlı olabilir [111].

Fabry hastalarının biyolojik örneklerinde Lizo-Gb3 birikimi

Lizo-Gb3'ün FH'nın tespiti ve izlenmesi için plazma ve idrarda biyobelirteç olarak ölçümü ve potansiyel kullanımı gösterilmiştir [12, 111, 112]. Fabry fareleri üzerinde yapılan bir çalışmada, rekombinant α -gal-A ile ERT'den sonra Lizo-Gb3 seviyesinin Gb3 seviyesinden daha fazla azaldığı bildirilmiştir [113]. Auray-Blais ve çalışma arkadaşları, Fabry hastalarının üriner Lizo-Gb3'ü ile mutasyon tipi, ERT sonucu ve cinsiyeti arasında anlamlı bir ilişki olduğunu öne sürdüler [12]. Diğer taraftan, heterozigot Fabry dişilerinde plazma Lizo-Gb3 konsantrasyonları ile sol ventrikül kütlesi ve hemizigot Fabry erkeklerinde serebrovasküler beyaz cevher lezyonları arasında önemli bir korelasyon gösterilmiştir [112].

Geç başlangıçlı kardiyak varyant mutasyonları ve renal varyant mutasyonları olan Fabry hastalarının idrar Lizo-Gb3 ve Gb3 atılımlarında normal düzeyde veya hafif artış gösterdiği bildirilmiştir [111].

Hem semptomatik hemizigot Fabry erkeklerinin hem de yetişkin heterozigot Fabry dişilerinin yüksek plazma Lizo-Gb3 seviyeleri gösterdiği, genç heterozigot dişilerin ise hiç veya daha az yükselme gösterdiği bildirilmiştir. Ayrıca yetişkin heterozigot dişiler,

hemizigot erkeklere kıyasla daha düşük plazma ve idrar Lizo-Gb3 seviyeleri gösterir [12, 114, 103].

Öte yandan, R112H gibi geç başlangıçlı kardiyak varyant mutasyonları olan Fabry hastalarının normal plazma Gb3 ve çok düşük plazma Lizo-Gb3 düzeyi gösterdiği gösterilmiştir [12]. R112H ve P60L mutasyonları olan kardiyak varyant Fabry hastalarında yüksek Lizo-Gb3 seviyeleri gösterilmediğini bildirdi [112].

Kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 analizi

Günümüzde kuru kan örnekleri (DBS) farklı metabolik bozukluklar için yenidoğan taramasında dünya çapında kullanılmaktadır [15, 14]. Bir filtre kağıdında toplanan tek bir kan damlası Lizo-Gb3 konsantrasyonunu belirlemek için yeterli olabilir. Fabry hastalarında Lizo-Gb3 analizi için DBS kullanılması, yetişkin hemizigöz erkeklerde ve bazı heterozigot kadınlarda semptomatik hastalarda faydalı olabilir [14]. Bununla birlikte bu prosedür yenidoğan taraması ve geç başlangıçlı heterozigot dişiler için uygun görünmemektedir.

Fabry hastalığının taraması

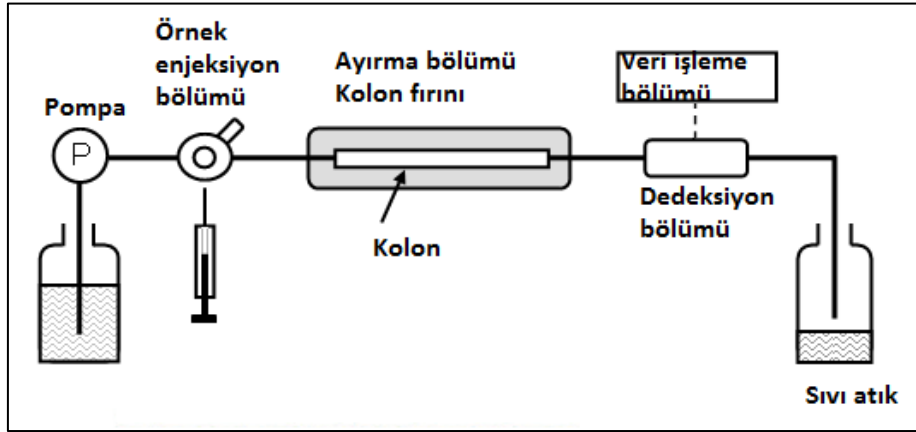
Genel olarak, metabolik bozukluklar için yenidoğan taramaları, hastalığın ilerlemesini yönetmek, etkilenen organın hasar görmesini engellemek ve ilerlemiş çeşitli kötü belirtileri en aza indirmek için temel olarak kabul edilir. Önceki birçok makale, LDH ve Fabry hastalığı için yenidoğan taramasının ulaşılabilir olduğunu ve tanı yaşını azaltabileceğini ve ardından hastalık izlemeyi geliştirebileceğini göstermiştir [115, 116]. Böbrek ve damar hastalığı olan yüksek riskli hastalarda FH için tarama protokolü önerildi [117]. Maruyama ve arkadaşları [118] plazma Lizo-Gb3'ün umut verici bir ikincil tarama hedefi olduğunu ortaya koydu. Bu biyobelirteç, ilk moleküler analiz tanısını doğrulamak veya yeni Fabry hastalığı vakalarını tespit etmek için kullanılabilir.

2.2.10. Biyolojik örnekler için ayırma teknikleri

Biyolojik örnekler karmaşık yapıya sahiptir ve bu sebeple analiz aşamasından önce genellikle bir tür ayırma işlemine ihtiyaç duyulur.

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC), düşük moleküler kütleden çok yüksek moleküler kütleye kadar farklı özelliklere sahip bileşikler için analiz etmek için uygulanabilen bir ayırma tekniğidir. Sıvı kromatografisi, ayrılacak bileşenlerin biri sabit (sabit faz), diğeri belirli bir yönde hareket eden bir sıvı (hareketli faz) olmak üzere iki faz arasında dağıldığı bir ayırma tekniğidir (Şekil 2.13) [119].



Şekil 2.13. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bileşenleri

HPLC tekniği kolay uyarlanabilir, sağlamdır, enstrümantasyon ve kolonlardaki gelişmeler sayesinde mükemmel çözünürlük ve tekrarlanabilirlik sağlar.

Kullanılan mobil faz, sabit faz (kolon) ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC teknikleri aşağıda belirtilen temel gruplarda toplanabilirler;

Normal faz kromatografisi

Sabit faz polar yapıda (silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış $-NH_2$, $-CN$ veya NO_2 gibi dolgu maddeleri) olabilir. Mobil faz non-polar ya da düşük polariteye sahip (hekzan, dietileter, kloroform, vb. çözücüler ve bunların karışımları) olabilir.

Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar

sabit fazla az etkileştiğinden kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

Ters faz kromatografi

Sabit faz apolar (silikajel-polimer ve üzerine bağlanmış C18, C8 veya fenil grupları, metil, etil ve $-NH_2$ gruplu dolgu maddeleri).

Hareketli faz polar (asetonitril, metanol, tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları).

Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit hareketli fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden kolonda kısa süre tutunabilir. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

İyon Değiştirme

İyonik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca suda çözünen organik maddelerin analizinde de kullanışlıdır. Katyonlar için negatif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar, anyonlar için pozitif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar kullanılır. İyonun molekül ağırlığı arttıkça kolonda tutunma gücü de artar.

Size Exclusion (Eleme)

Molekül ağırlıkları farkı çok büyük olan analitlerin bir arada analizleneceği karışımlar için kullanılan bir tekniktir. Bu teknikte analitler ve kolon dolgu maddesinde kimyasal değil fiziksel bir etkileşim vardır. Büyük molekül ağırlığı olan analit kolon dolgu maddesindeki porlara sığmadığı için kolonu önce terk eder. Genellikle polimer, şeker ve protein analizlerinde kullanılır. Eleme tekniğinde kullanılan mobilfaz organik çözücü ise GPC (Gel

Permeation Chromatography) sulu çözelti ise GFC (Gel Filtration Chromatography) adını alır.

Kiral ayırma

Fiziksel özellikleri aynı olan izomerlerin sabit fazla etkileşime girip izomer çifti olan diastereomere dönüştürülerek özel chiral kolonlar kullanılarak yapılan bir tekniktir.

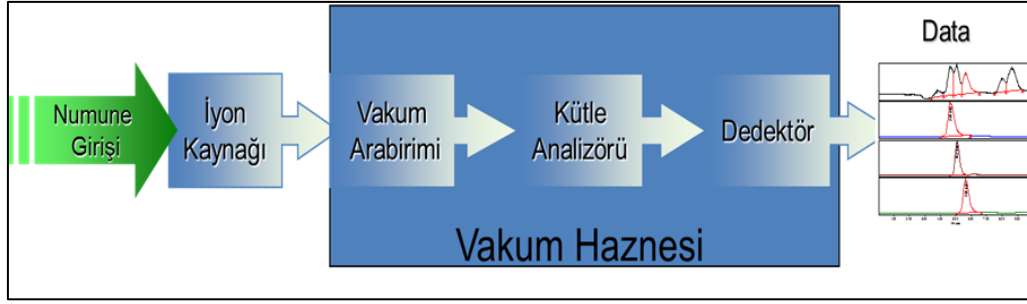
Biyolojik örneklerin analizinde ters faz kromatografi en yaygın türdür. Burada Lizo-Gb3 analitlerin kolona bağlanmasına yol açan hidrokarbonla modifiye edilmiş silikadan daha polar olan bir çözücüye yüklenir. Analitlerin kolondan elüsyonu genellikle çözücünün polaritesini adım adım veya gradyan bir şekilde azaltarak gerçekleştirilir.

Kütle spektrometresi

Kütle spektrometrisi, yüklü moleküler iyonların üretilip vakum altında manyetik ve/veya elektrik alanlar içerisinde kütle/yük (m/z) oranları doğrultusunda ayrılması için kullanılan bir tekniktir. Ayırmanın sağlanabilmesi için cihaz içinde elektrik ya da manyetik alanlar oluşturulmuştur. Bu alanlar iyonların uzaysal yörüngelerini, hızını ve/veya istikametini etkileyerek ayırma sağlarlar. Elektromanyetik alanlar iyon hareketini iyonun kütlesiyle ters orantılı ve iyonun yüküyle doğru orantılı olarak etkiler. Böylece moleküler kütlelerin tespit edilebildiği, iyon bolluğuna karşı m/z oranını gösteren kütle spektrumları elde edilir [120, 121].

Bu sistemler dört ana bölümden oluşur (Şekil 2.14):

- İyonizasyon
- Filtreleme
- Deteksiyon
- Data Analiz



Şekil 2.14. Kütle spektrometresinin bileşenleri

İyon kaynakları

İyon kaynağı, numunelerin gaz halindeki iyon demetlerine dönüştürüldüğü MS'nin ilk kısmıdır. Birçok farklı iyonizasyon teknikleri mevcuttur. En yaygın iyonizasyon yöntemleri, elektro sprey iyonizasyon (ESI) ve matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonudur (MALDI). Her iki teknik biyolojik numunelerin analizi için gerekli olan nispeten büyük, ısıya duyarlı, uçucu olmayan moleküllerden gaz fazı iyonları üretme yeteneğine sahiptir [120]. Farklı iyonizasyon teknikleri aşağıda verilmiştir.

Gaz bazlı arabağlantılar / iyonizasyon modları

- Elektronik İyonizasyon (EI)
- Kimyasal İyonizasyon (CI)

Sıvı bazlı arabağlantılar / iyonizasyon modları

- Atmosferik Basınç İyonizasyonu (API)
- Elektrospray (ESI)
- Atmosferik Basınç Kimyasal İyonizasyonu (APCI)
- Atmosferik Basınç Foto-İyonizasyon (APPI)

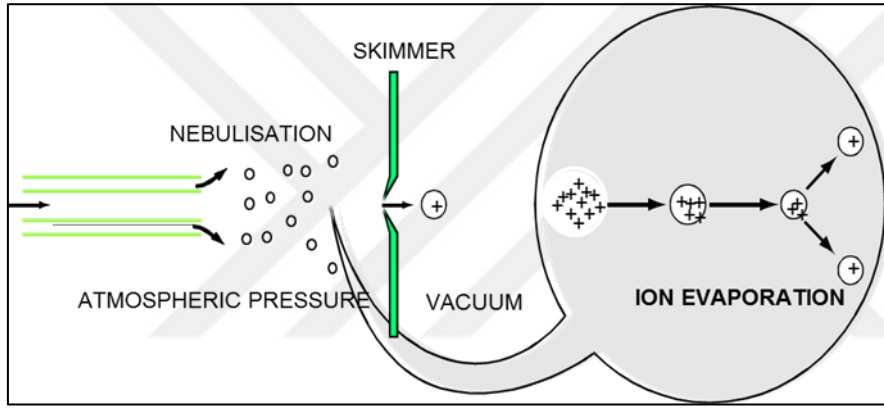
Katı bazlı arabağlantılar / iyonizasyon modları

- Matriks Destekli Lazer Desorpsiyon İyonizasyonu (MALDI)

Elektrosprey (ESI)

Elektrosprey iyonizasyonu solüsyon içerisindeki numunenin yüksek voltaj uygulanan metal bir kapilerden geçirilmesi ile elde edilir. Numunenin kapilerden çıkarken azot gazı akışı yardımıyla yüklü haldeki damlacık aerosolüne dönüşür.

Damlacıklar ısıtılmış azot gazı altında buharlaşırlar. Damlacıklar ebat olarak küçüldükçe, damlacık içindeki örnek iyonları beraber zorlanarak itme kuvveti ile damlacık yüzeyinden ayrılırlar (iyon evaporasyonu). Şekil 2.15'e gösterildiği üzere iyonlar daha sonra küçük bir delikten kütle spektrometresi vakumu içine girerler.



Şekil 2.15. ESI iyonizasyon ana bileşenleri

ESI'nun diğer yumuşak iyonizasyon tekniklerinde olduğu gibi önemli bir özelliği, ilgilenilen molekülün moleküler kütesinin belirlenmesine izin veren minimum parçalanmasının üretilmesidir. Bir kütle spektrometresine bağlandığında, diğer geleneksel tekniklerle analize uygun olmayan biyomolekülleri incelemek için hassas, sağlam ve güvenilir bir araç sağlar. ESI ayrıca, karmaşık bir biyolojik numunede çeşitli polaritelerdeki hem küçük hem de büyük moleküllerin analizine izin veren kütle spektrometrik analizden önce sıralı moleküler fraksiyonlama için UPLC ile birleştirilebilir [122].

Kütle analizörleri

Kütle analizörü, kütle spektrometresi analizleri için çok önemlidir. Temel parametreleri arasında hassasiyet, çözünürlük, kütle doğruluğu ve spektrum üretme yeteneği bulunur. Her

biri tasarım ve performans açısından farklıdır ve kendi güçlü ve zayıf yönlerine sahiptir. Günümüzde kullanılan beş ana tür kütle analizörü vardır [120];

1. Uçuş Zamanlı Kütle Analizörü (TOF)
2. Sektörlüler
3. Kutuplu (Quadrupole)
4. Modifiye dört kutuplular (Quadrupole ion trap)
5. Fourier dönüşümü iyon-siklotron rezonansı

Biyolojik çalışmalarda kullanılan en yaygın kütle analizörleri, uçuş zamanlı (TOF), dört kutuplular (quadrupole) ve bir iyon tuzağı olan modifiye dört kutuplulardır (quadrupole ion trap) [120].

TOF ile bir iyon kaynağında (genellikle MALDI veya ESI tarafından) bir iyon paketi üretilir ve tüm paket, dedektöre ulaşana kadar aynı anda bir uçuş tüpünden aşağı doğru sabit bir potansiyel boyunca hızlandırılır. Bu koşullar altında her iyon aynı kinetik enerjiye sahip olacağından, iyonlar ne kadar küçükse o kadar hızlı hareket ederler

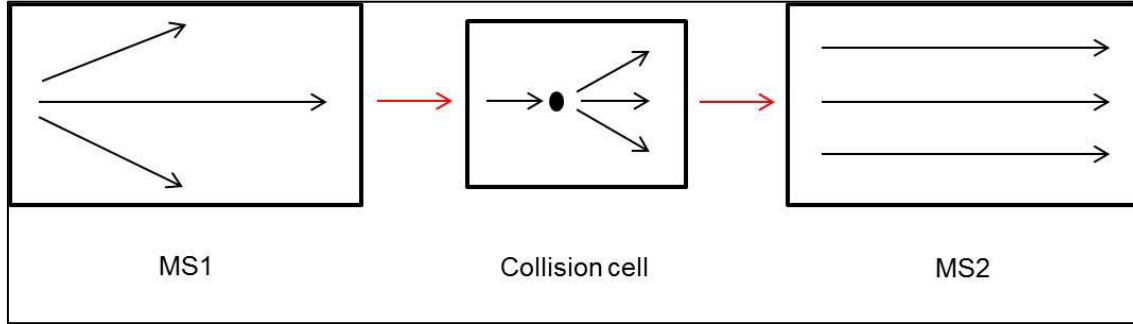
Ardışık kütle spektrometresi (MS/MS)

Tandem kütle spektrometresi (MS/MS), seri olarak birbirine bağlanmış iki dört kutuplu kütle analizörünü kullanır. Tipik bir MS/MS analizinde, seçilen bir kütlenin iyonları (öncü veya ana iyonlar), bir çarpışma hücresine iletilmeden önce ilk kütle analizörü (MS1) tarafından izole edilir. Çarpışmada hücre iyonları, genellikle inert bir gazın nötr atomlarıyla çarpışır; argon, helyum veya nitrojen iç enerjide bir artışa neden olarak molekülün çarpışma kaynaklı ayrışma (CID) adı verilen bir süreçte parçalanmasına neden olur. Üretilen sonraki parçalar (ürün veya yavru iyon) daha sonra ikinci kütle analizörü (MS2) tarafından analiz edilir.

Tandem kütle spektrometreleri, son derece düşük yoğunluktaki moleküllerin yüksek doğruluk derecesiyle tanımlanmasını ve miktarsal ölçümünü sağlayan oldukça spesifik ve hassas cihazlardır.

Birinci ve ikinci kütle analizörleri (MS1 ve MS2), yalnızca belirli bir kütledeki iyonların ölçüldüğü sabit kütle modunda veya belirli bir kütle aralığındaki iyonların sırayla ölçüldüğü

tarama modunda çalıştırılabilir (Şekil 2.16). MS1 ve MS2'yi çeşitli sabit kütle ve tarama modu kombinasyonlarında çalıştırarak, bir dizi farklı tipte tandem kütle spektrometrik analizi mümkündür.



Şekil 2.16. Ardışık kütle spektrometresinin (MS/MS) şematik gösterimi

Düz tarama modu (Scan mode)

Tandem kütle spektrometresi, tarama modunda yalnızca ilk kütle analiz cihazı kullanılarak basit, tek dört kutuplu bir kütle spektrometresi olarak çalıştırılabilir. Düz tarama modunda kütle analizörü iyonları sırayla tarar.

Ürün iyon taraması (Product ion scan)

Bir ürün iyon taramasında, ilk kütle analiz cihazında (MS1) CID'den geçmek üzere çarpışma hücresine odaklanacak bir ana (öncü) iyon seçilir. İkinci kütle analiz cihazı (MS2), elde edilen ürün iyonlarının karakteristik parçalanma spektrumlarını analiz etmek için tarama moduna ayarlanmıştır.

Öncü iyon taraması (Precursor ion scan)

Öncü iyon taramasında MS2, çarpışma hücresinde CID tarafından üretilen belirli bir ürün iyonu için sabitlenir. MS2 sabitken MS1'in taraması, analiz edilecek belirli bir ürün iyonu veya molekül sınıfı vermek için parçalanan tüm öncü iyonların analiz edilmesini sağlar.

Nötr kayıp taraması (Neutral loss scan)

Bir nötr kayıp taraması sırasında her iki kütle analiz cihazı (MS1 ve MS2) tarama moduna ayarlanır. Bununla birlikte, MS2, MS1'den nötr bir kayba karşılık gelen bir kütle ile dengelenir.

Seçili reaksiyon izleme (SRM) veya çoklu reaksiyon izleme (MRM)

Seçili veya çoklu reaksiyon izleme, MS1'de belirli bir öncü iyon veya iyonların seçilmesine ve çarpışma hücrendeki CID'yi takiben MS2'de belirli bir ürün iyonunun veya iyonlarının seçilmesine izin verir. Her iki kütle analizörünü de sabit kütle modunda çalıştırarak hassasiyet önemli ölçüde artar ve bu konfigürasyon, kantitatif proteomik ve metabolomik analizlerde kullanım için idealdir.





3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kullanılan Araç ve Gereçler

Deneyler süresince kullanılan analitik cihazların ve küçük laboratuvar cihazlarının listesi Çizelge 3.1.'de verilmiştir. Tüm deneylerde Waters Xevo TQ-S cihazı kullanılmıştır. Cihaz bir UPLC sistemi ile birleştirilmiş ardışık dört kutuplu kütle spektrometresi (MS/MS) kütle analizöründen oluşmaktadır. Veriler Masslynx yazılımı ile analiz edilmiştir.

Çizelge 3.1. Araç ve Gereçler

Cihaz	Marka/Model
LC-MS/MS	Waters Xevo TQ-S (WAB 1236)
Spektrofotometre (microplate reader)	BioTek Synergy H1
DBS puncher	Perkin-Elmer (DELFLIA 1296-071)
Hassas terazi	Mettler-Toledo (XS-105 D4)
Azot evaporatörü	Teknosem (TAB 40-WEL)
Santrifüj	Nüve 800R
Santrifüj	Nüve NF 048
Etüv	Nüve EN400
Ultrasonik banyo	Bandelin sonorex
Ultrasonik probe	Bandelin sonoplus
Otomatik pipet 10-100 µL	Eppendorf
Otomatik pipet 100-1000 µL	Eppendorf
Otomatik pipet 1-10 mL	Eppendorf
pH metre	Selecta (pH-2005)
Vorteks	IKA Vortex 3
Çoklu vorteks	Fisher-Scientific (Multi Tube Vortex Mixer)
Derin dondurucu -30 °C	Uğur (UED 7262 DTK)
Soğutucu 2-8 °C	Uğur (UES 520 /KNF)
İnkübatör	Ivymen (Microplate Thermo Shaker TRM4)
Cam filtrasyon/süzme vakumlu seti	LabTech VP30
BEH C18, 2.1x50 mm, 1.7µm	Waters

3.2. Kullanılan Kimyasallar

Metot geliştirme ve deneysel aşamalarda kullanılan bütün kimyasal maddelerin listesi aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.2.).

Çizelge 3.2. Kimyasallar

Lizoo-Gb3 (Globotriozilsfingozin)	Matreya LLC, CAS No. 126550-86-5
N-Glisin-lizo-Gb3	Matreya LLC, CAS No. 1360882-59-2
Metilumbeliferil α -D-galaktopiranozid	TRC M334475 CAS No. 38597-12-5
N-Asetil-D-galaktozamin	Sigma A2795 CAS No. 1811-31-0
4-Metilumbeliferon	Sigma M1381 CAS No 90-33-5
Metanol	Supelco 1.06007 CAS No. 67-56-1
Asetonitril	Supelco 1.00030 CAS No. 75-05-8
Aseton	SAFC 1.00013 CAS No. 67-64-1
Formik asit	Supelco 1.00264 CAS No. 64-18-6
Dimetilsülfoksit (DMSO)	Merck 802912 CAS No. 67-68-5
o-fosforik asit	SAFC 1.00563 CAS No. 7664-38-2
H ₂ O (LC-MS Grade)	Supelco1.15333 CAS No. 7732-18-5
Amonyak	SAFC 1.05422 CAS No. 1336-21-6
Amonyum format	Supelco 70221 CAS No. 540-69-2
Sodyum Asetat Trihidrat	Supelco 1.06267 CAS No. 6131-90-4
Glasiyel asetik asit	Supelco 1.00063 CAS No. 64-19-7
Glisin	Sigma-Aldrich G7403 CAS No. 56-40-6
Sodyum karbonat (Na ₂ CO ₃)	Supelco1.06392 CAS No 497-19-8

3.3. Kullanılan Cam ve Plastik Malzemeler/Sarflar

Metot geliştirme çalışmaları süresince, deneylerde kullanılan cam, plastik malzemeler ve sarfların listesi aşağıda verilmiştir. (Çizelge 3.3.)

Çizelge 3.3. Cam ve plastik malzemeler/sarflar

Polistiren deney tüpü 12x75 mm
Yivli kapak 12x75mm tüp için
Polistiren deney tüpü 16x100 mm
Yivli kapak 16x100 mm tüp için
Santrifüj tüpü 50 mL falcon tüp
Santrifüj tüpü-15 ml- falcon tüp
Cam deney tüpü 12x75 mm
Eppendorf tüp 1-5 mL
Balon joje A kalite 10 mL
Balon joje A kalite 25 mL
Balon joje A kalite 100 mL
Balon joje A kalite 500 mL
Balon joje A kalite 1000 mL
Cam mezür 10 mL
Cam mezür 50 mL
Cam mezür 100 mL
Cam mezür 250 mL
250 mL Borosilikat cam şişe
500 mL Borosilikat cam şişe
1000 mL Borosilikat cam şişe
1 mL recovery cam vial 12x32 mm
Pre-slit PTFE/silikon vial kapağı
Pastör pipet
Beyaz 96'lık microplate (Greiner-655075)

3.4. Etik Onay ve Çalışma Grubu

Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'ndan 09.12.2019 tarihinde 256 sayılı onay (EK1) alınmıştır. Etik kurulun kabulü sonrası isimsizleştirilmiş biyolojik örnekler (kuru kan, plazma) Düzen Laboratuvarlar Grubu Mart 2017- Mart 2019 yıllarına ait arşivlerinden sağlanmıştır (EK 2).

3.4.1 Çalışma grubunun işleme ve dışlama kriterleri

Çalışma grubunun işleme kriterleri şöyledir;

- İsimlendirilmiş arşiv örnekleri kullanılmıştır. Bu kuru kan örneklerinden alfa-galaktozidaz enzim seviyesi taramasına gelmiş olan 18 yaş üstü erişkin 51 kadın ve 18 yaş üstü erişkin 37 erkek vakalar araştırmaya dahil edilmiştir.
- Sağlıklı bireylerden elde edilmiş 55 plazma örneği ve 42 adet kuru kan örneği metot geliştirme çalışmalarında kullanılmıştır.

Çalışma grubunun dışlama kriterleri şöyledir;

- İsimlendirilmiş arşiv örnekleri kullanılmıştır. Bu kuru kan örneklerinden yeterli geri kazanım sağlanamayan bireylere ait örnekler araştırmadan dışlanmıştır.

3.5. Metot Geliştirme Çalışmaları

3.5.1. Standart /reaktif /çözeltilerin hazırlanması

Lizo -Gb3 stok standardı

Lizo-seramid triheksozid (Matreya LLC, CAS No. 126550-86-5) stok standardı 0,1 mg/mL konsantrasyonunda, 1 mL hacminde, %50 asetonitril ve %0,1 formik asit (V/V) içerecek şekilde hazırlanmıştır [103].

Lizo-Gb3 MS optimizasyon standardı :1,0 mg/L konsantrasyonunda %50 metanol-su içerisinde hazırlanmıştır.

- Lizo-Gb3
- Bilimsel isim: lizo-seramid triheksozid, lizo-globotriozilseramid
- Ortak isim: Globotriozilsfingozin, Lizo-Gb3, lizoCTH
- Ampirik formül: $C_{36}H_{67}NO_{17}$
- Formül ağırlığı: 785.9 g/mol

Lizo-Gb3 IS stok standardı

İnternal standart N-Glisin lizo-seramid triheksozid (Matreya LLC, CAS No. 1360882-59-2) stok standardı 0,1 mg/mL konsantrasyonunda, 1 mL hacminde, %50 asetonitril ve %0.1 formik asit içerecek şekilde hazırlanmıştır.

Çalışma internal standardı

N-Glisine Lizo-seramid triheksozid çalışma standardı 25 ng/mL konsantrasyonunda, 25 mL hacminde, %80 Metanol içerisinde hazırlanmıştır.

Lizo-N-Gly-Gb3 MS optimizasyon standardı: 1.0 mg/L konsantrasyonunda %50 metanol-su içerisinde hazırlanmıştır.

- N-Gly-Lizo-Gb3
- Bilimsel isim: N-Glisin lizo-seramid triheksozid, N-glisin- lizo-globotriozilseramid
- Ortak isim: N-Glisin globotriozilsfingozin
- Ampirik formül: $C_{38}H_{70}N_2O_{18}$
- Formül ağırlığı: 843.0 g/mol

Mobil faz A: 5 mM Amonyum format ACN içerisinde + %0.2 formik asit

Mobil faz B: 5 mM Amonyum format H₂O içerisinde + %0.2 formik asit

Mobil faz A1: H₂O:Formik asit (%0,1 V/V)

Mobil faz B1: ACN:Formik asit (%0,1 v/v)

Zayıf yıkama çözeltisi (Weak /Seal wash): ACN:H₂O (20:80, V/V)

Güçlü yıkama çözeltisi (Strong Wash): ACN:H₂O (80:20, V/V)

3.5.2. MS/MS metot geliştirme çalışmaları

Öncelikle 1,0 mg/L konsantrasyonunda hazırlanan Lizo-Gb3 ve N-Gly-Lizo-Gb3 (MS tuning) standartları kütle dedektörüne doğrudan gönderilmiştir ve ana kütleler taranmıştır. Ana kütlelerin belirlenmesinin ardından kullanılan enerji, azot gaz akışı ve sıcaklık değerleri optimize edilmiştir. Kütle dedektörü parametreleri Çizelge 3.4.'te verilmiştir

Çizelge 3.4. Kütle dedektörü (MS/MS) ayarlama parametreleri

Polarity	ES+
Source sıcaklığı (°C)	150
Capillary (kV)	0.50
Cone (V)	40.0
Desolvation sıcaklığı (°C)	450
Gas Flow	
Desolvation akış hızı (L/s)	500
Cone (L/s)	50
Analyser	
LM Resolution 1	12.5
HM Resolution 1	14.9
Ion Energy 1	0.6
LM Resolution 2	12.5
HM Resolution 2	14.9
Ion Energy 2	0.2
Collision gas akışı (mL/dk)	0.15

Ana moleküller için kütle/yük (m/z) MS düz tarama (Scan) metodu ile belirlenmiştir. Ardından parçalanma ürünlerinin kütle/yük (m/z) değeri ürün iyon tarama (Daughter Scan) metodu ile belirlenmiştir. Bu çalışmalarda parçalanma için gerekli enerji değerleri, kütle dedektöründe kullanılacak gaz akış hızları ve sıcaklıkları optimize edilmiştir. Collision enerji belirlenirken collision gradient oluşturularak en doğru enerji değeri belirlenmiştir. Bütün elde edilen bilgilerle çoklu reaksiyon izleme yöntemi (MRM, Multiple Reaction Monitoring) metodu oluşturulmuştur. MS/MS metot (Çizelge 3.5.) aşağıda verilmiştir.

Çizelge 3.5. MS/MS metot MRM parametreleri

Madde	Ana Kütle (m/z)	Parçalanma Ürünü Kütle (m/z)	Dwell (secs)	Cone enerji (V)	Collision enerji
Lizo-Gb3	786.5	282.3	0.165	50	38
Gly-Lizo-Gb3	843.5	264.3	0.165	50	50

3.5.3. UPLC metot geliştirme çalışmaları

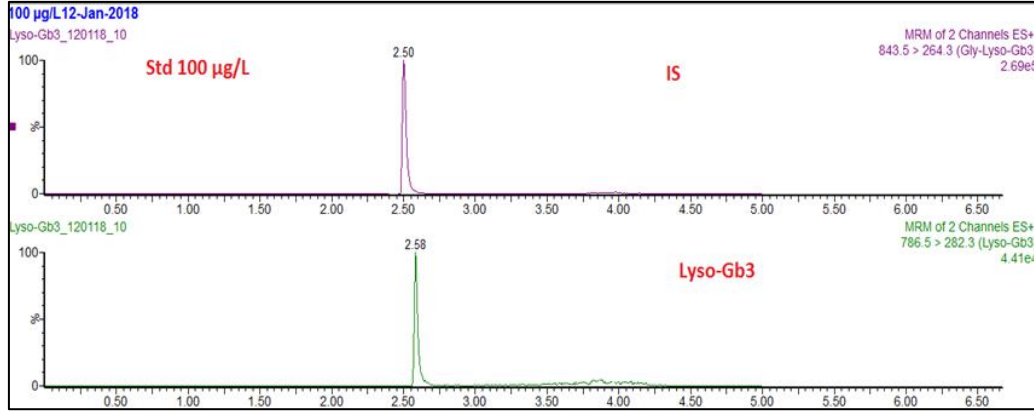
UPLC metodu kullanılacak yürütücü faz özellikleri, kolon türleri ve kolon sıcaklıkları üzerinde optimizasyon çalışmaları yapılmıştır. Farklı yürütücü fazların farklı kombinasyonları denenmiştir. İlk denemede mobil faz A ve mobil faz B olarak belirtilen iki farklı yürütücü faz kullanılarak gradient akış ile denemeler yapılmıştır. UPLC metot-1 detayları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.6.). Analitler Acquity BEH C18, 2,1x50 mm, 1,7µm partikül boyutlu kolonda ayrılmıştır. Lizo-Gb3 ve Gly-lizo-Gb3 pikleri için alıkonma zamanları ve rezolüsyon değerleri kaydedilmiştir. Gradient akış programı çizelge 3.7.'de verilmiştir. Şekil 3.1.'de Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3 için elde edilen kromatogramlar verilmiştir.

Çizelge 3.6. UPLC metot-1 parametreleri

Quaternary Solvent manager	
Solvents	
Mobil Faz A	5 mM Amonyum format ACN + %0,2 FA
Mobil Faz B	5 mM Amonyum format H ₂ O + %0,2 FA
Pressure limits	
Low	0 psi
High	15000 psi
Seal wash speed	2.0 min
Sample manager	
Wash solvent	ACN:H ₂ O (20:80, V/V)
Purge solvent	ACN:H ₂ O (80:20, V/V)
Pre-inject wash time	0.0 sec
Post-inject wash time	0.6 sec
Temp. Control	
Column	40 °C
Sample	25 °C
Column type	Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm)2.1x50 mm
Injection volume (µL)	20.0

Çizelge 3.7. UPLC metot-1 gradient programı

Süre	Akış Hızı (mL/dk)	A %	B %	Curve
0.0	0.5	100	0.0	6
1.0	0.5	65	35	6
3.0	0.5	0.0	100	6
3.5	0.5	65	35	6
5.0	0.5	100	0.0	6



Şekil 3.1. Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3

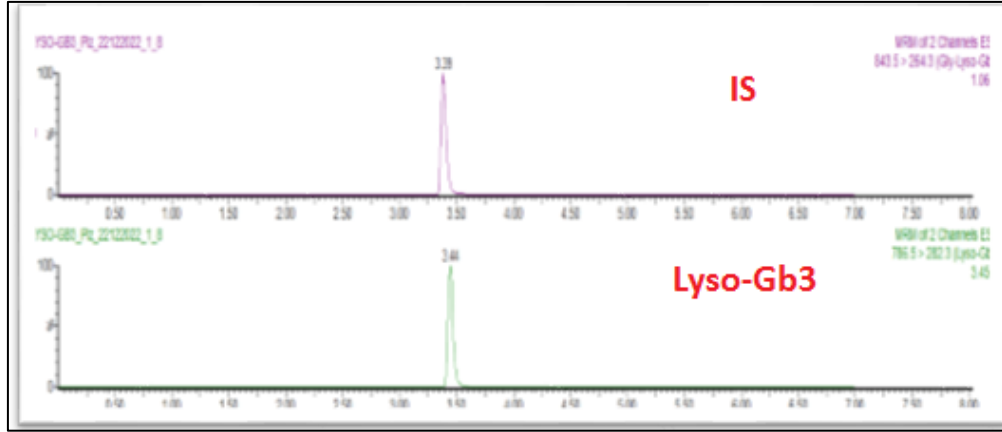
İkinci denemede mobil faz A1 ve mobil faz B1 olarak belirtilen iki farklı yürütücü faz kullanılarak gradient akış ile denemeler yapılmıştır. UPLC metot-2 detayları aşağıda verilmiştir (Çizelge 3.8.). Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3 pikleri için alıkonma zamanı ve rezolüsyon değerleri kaydedilmiştir. Gradient akış programı çizelge 3.9.'da verilmiştir. Şekil 3.2.'de Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3'e ait kromatogramlar verilmiştir.

Çizelge 3.8. UPLC metot-2 parametreleri

Quaternary Solvent manager	
Solvents	
Mobil Faz A1	H ₂ O:Formik asit (%0.1 V/V)
Mobil Faz B1	ACN:Formik asit (%0.1 V/V)
Pressure limits	
Low	0 psi
High	15000 psi
Seal wash speed	2.0 min
Sample manager	
Wash solvent	ACN:H ₂ O (20:80, V/V)
Purge solvent	ACN:H ₂ O (80:20, V/V)
Pre-inject wash time	0.0 sec
Post-inject wash time	0.6 sec
Temp. Control	
Column	40 °C
Sample	25 °C
Column type	Acquity UPLC BEH C18 (1.7 µm)2.1x50 mm
Injection volume (µL)	20.0

Çizelge 3.9. UPLC metot-2 gradient programı

Süre	Akış Hızı (mL/dk)	A1 %	B1 %	Curve
0.0	0.25	100	0.0	6
2.5	0.25	0.0	100	6
4.0	0.25	0.0	100	6
5.0	0.25	100	0.0	6
7.0	0.25	100	0.0	6



Şekil 3.2. Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3

3.5.4. Lizo-Gb3 Kalibrasyon standartlarının hazırlanması

Lizo-Gb3 (Matreya Cat. No. 1520) stok standartı 0.1 mg/mL konsantrasyonunda, 1 mL hacminde, %50 Asetonitril / %0.1 Formik Asit içerisinde hazırlanmıştır.

Lizo-Gb3 plazma kalibrasyon standartları

2.0 - 5.0 – 10 – 20 – 50 - 100 nmol/L konsantrasyonlarında havuz plazma (sağlıklı bireyden elde edilen EDTA'lı plazma) içerisinde hazırlanmıştır (Çizelge 3.10).

Ara stok dilüsyonları MeOH:H₂O (50:50) içerisinde yapılmıştır.

Çizelge 3.10. Plazma kalibrasyon standartları

Stok: 100 mg/L = 127.226 nmol/L		Lizo-Gb3 MW: 786.0 g/mol	
127.226 nmol/L _ 1/100 _ 1272 nmol/L _ 1/10 _ 127 nmol/L _ 1/10 _ 12.7 nmol/L			
STD-0	Kör örnek (referans plazma)		
STD1 (2.0) nmol/L	12.7 nmol/L x V1 = 2.0 nmol/L x 1 mL	V1 = 157 µL	
STD2 (5.0) nmol/L	127 nmol/L x V2 = 5.0 nmol/L x 1 mL	V2 = 39 µL	
STD3 (10) nmol/L	127 nmol/L x V3 = 10 nmol/L x 1 mL	V3 = 79 µL	
STD4 (20) nmol/L	127 nmol/L x V4 = 20 nmol/L x 1 mL	V4 = 157µL	
STD5 (50) nmol/L	1272 nmol/L x V5 = 50 nmol/L x 1 mL	V5 = 39 µL	
STD6 (100) nmol/L	1272 nmol/L x V6 = 100 nmol/L x 1 mL	V6 = 79 µL	

Lizo-Gb3 kuru kan kalibrasyon standartları

Çalışma Standartları: 0.5 –1 - 2.5 – 5.0 – 10 – 25 – 50 - 100 ng/mL konsantrasyon aralığında havuz EDTA'lı tam kan (sağlıklı bireyden elde edilen EDTA'lı tam kan) içerisinde hazırlanmıştır (Çizelge 3.11). GEHC Whatman CF12 Filtre kağıdına emdirilmiştir. Oda sıcaklığında, ışığa maruz bırakılmadan, yatay pozisyonda kurutulmuştur. Ara stok dilüsyonları MeOH:H₂O (50:50) içerisinde yapılmıştır.

Çizelge 3.11. Kuru kan kalibrasyon standartları

N-Glisin Lizo-seramid triheksozid			
Stok: 100 mg/L _ 100.000 ng/mL _ 1/100 _ 1000 ng/mL			
1000 ng/mL x V1 = 25 ng/mL x 25 mL	V1 = 0.625 mL		
STD-0 Kör örnek	Kör örnek (referans tam kan)		
STD1 (0.5) ng/mL	10 ng/mL x V1 = 0.5 ng/mL x 1 mL	V1 = 50 µL	
STD2 (1.0) ng/mL	100 ng/mL x V2 = 1.0 ng/mL x 1 mL	V2 = 10 µL	
STD3 (2.5) ng/mL	100 ng/mL x V3 = 2.5 ng/mL x 1 mL	V3 = 25 µL	
STD4 (5.0) ng/mL	100 ng/mL x V4 = 5.0 ng/mL x 1 mL	V4 = 50 µL	
STD5 (10) ng/mL	1000 ng/mL x V5 = 10 ng/mL x 1 mL	V5 = 10 µL	
STD6 (25) ng/mL	1000 ng/mL x V6 = 25 ng/mL x 1 mL	V6 = 25 µL	
STD7 (50) ng/mL	1000 ng/mL x V7 = 50 ng/mL x 1 mL	V7 = 50 µL	
STD8 (100) ng/mL	1000 ng/mL x V8 = 100 ng/mL x 1 mL	V8 = 100 µL	

Çalışma internal standartı

N-Glisin Lizo-seramid triheksozid (Matreya Cat. No. 1530) stok standartı 0.1 mg/mL konsantrasyonunda, 1 mL hacminde, %50 Asetonitril / %0.1 Formik Asit içerisinde hazırlanmıştır.

N-Glisin Lizo-seramid triheksozid çalışma standartı 25.0 ng/mL konsantrasyonunda, 25 mL hacminde, %80 Metanol:H₂O içerisinde hazırlanmıştır.

3.5.5. Lizo-Gb3 plazma örnekleri ekstraksiyon metodu

Kalibrasyon standartları, kontroller ve örneklerden 100 µL eppendorf tüplere pipetlenmiştir. Her bir tüpe 70 µL internal standart (%80 Metanol içerisinde, 25 ng/mL N-Gly-Lizo-Gb3) eklenmiştir, vorteksle kısa karıştırılmıştır. Her bir tüpe 1000 µL MeOH:Aseton (1:1 v/v) eklenmiştir. 10 dk sonike edilmiştir, ardından 1 dk vortekslenmiştir. 5 dk 10000 rpm de santrifüj yapıldıktan sonra 1000 µl süpernatant konik tüplere alınmıştır. Kuruluğa kadar azot

altında buharlaştırma yapılmıştır. Ekstraktlar 100 µl %70 MeOH:H₂O ile çözülür ve 2 dk vortekslenmiştir. Çözeltinin tamamı ependorf tüplere alınmıştır ve 10000 rpm'de 3 dk santrifüj edilmiştir. Süpernatant viallerine alınmıştır ve 10 µL LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir.

3.5.6. Lizo-Gb3 kuru kan örnekleri ekstraksiyon metodu

Kalibrasyon standartları, kontroller ve örneklerden 5 mm kuru kan (DBS) örneğinden puch alınmıştır. Bütün tüplere 100 µL internal standart (%80 Metanol içerisinde, 25 ng/mL Gly-Lizo-Gb3) eklenmiştir. Ardından 5 dakika süre ile 37°C'de sonike edilmiştir. 5 dakika 4000 g'de santrifüj edilmiştir. Süpernatant viallerine alınmıştır ve 10 µL LC-MS/MS sisteminde analiz edilmiştir.

3.6. Lizo-Gb3 Plazma Metot Geçerli Kılma Çalışmaları

MS/MS ve UPLC metot-1 kullanılarak oluşturulan Lzo-Gb3 plazma analiz metodu geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada aşağıda sıralanan geçerli kılma parametreleri kullanılmıştır:

- Doğrusallık (Linearite)
- Tekrarlanabilirlik (Presizyon)
- Geri kazanım (Recovery)
- Tespit/ölçüm Limiti (LOD/LOQ)
- Stabilite
- İnterferans

3.6.1. Lizo-Gb3 plazma metodu kalibrasyon çalışması

Plazma Lizo-Gb3 analizi için hazırlanan 6 adet kalibrasyon standardı analit konsantrasyonları ile eşleşen, (IS) internal standart pik alan oranlarına karşılık gelen değerlerinden kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Metot validasyonu çalışmalarında 5 gün

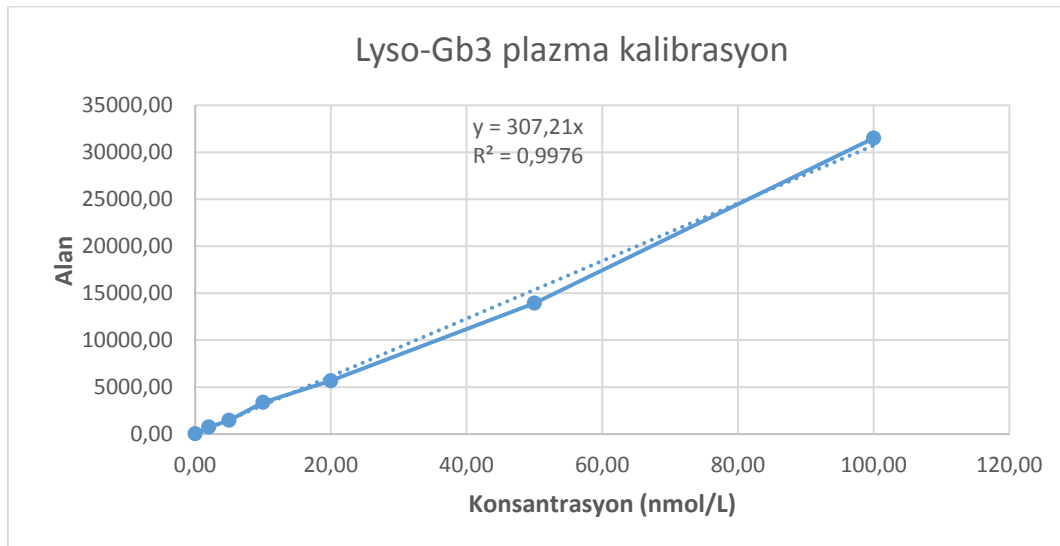
boyunca kalibrasyon yapılmıştır, standartların ortalama alan değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (Çizelge 3.12. ve Çizelge 3.13.) (Şekil 3.3.).

Çizelge 3.12. Lizo-Gb3 plazma kalibrasyon standartları

Std (nmol/L)	Alan					Alan	SD	CV
	1.Gün	2. Gün	3.Gün	4. Gün	5.Gün	ORT		
0,00	28,00	35,00	32,00	44,00	41,00	38,00	6,52	17,16
2,00	106,00	555,00	457,00	951,00	994,00	739,25	368,83	49,89
5,00	241,00	1348,00	1117,00	1751,00	1634,00	1462,50	599,74	41,01
10,00	1117,00	2195,00	1948,00	4030,00	5308,00	3370,25	1707,03	50,65
20,00	3942,00	5090,00	5150,00	6674,00	5794,00	5677,00	1004,76	17,70
50,00	6556,00	11997,00	11325,00	20023,00	12390,00	13933,75	4836,42	34,71
100,00	30205,00	26789,00	31843,00	37875,00	29490,00	31499,25	4133,16	13,12

Çizelge 3.13. Lizo-Gb3 kuru kan ortalama standart konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri

Konsantrasyon (nmol/L)	Alan (Ort.)
0,00	38,00
2,00	739,25
5,00	1462,50
10,00	3370,25
20,00	5677,00
50,00	13933,75
100,00	31499,25



Şekil 3.3. Standart Lizo-Gb3 (plazma) kalibrasyon grafiği

3.6.2. Lizo-Gb3 plazma metodu tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik kapsamında iki seviye QC1/QC2/QC3 ve EC1/EC2 kontrolleri çalışılmıştır. Validasyon çalışmaları kapsamında gün içi (Çizelge 3.14-Çizelge 3.17) ve günler arası (Çizelge 3.18) tekrarlanabilirlik verileri elde edilmiştir.

Gün içi tekrarlanabilirlik

Çizelge 3.14. Plazma kontrolü QC1, gün içi tekrarlanabilirlik

Gün-içi	QC1 (2,0 nmol/L)				
QC1	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
1. okutma	2,02	2,06	2,07	2,38	2,11
2. okutma	2,32	2,31	2,30	2,07	2,06
3. okutma	2,11	2,20	2,22	2,20	2,20
Ort	2,15	2,19	2,20	2,22	2,12
SD	0,15	0,13	0,12	0,16	0,07
CV	7,16	5,72	5,32	7,02	3,34

Çizelge 3.15. Plazma kontrolü QC2, gün içi tekrarlanabilirlik

Gün-içi	QC2 (20,0 nmol/L)				
QC2	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
1.okutma	22,5	22,5	21,9	22,0	22,3
2. okutma	22,6	22,4	22,5	21,9	22,0
3. okutma	22,1	22,4	22,5	22,5	22,1
ORT	22,4	22,4	22,3	22,1	22,1
SD	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1
CV	1,0	0,3	1,3	1,2	0,5

Çizelge 3.16. Plazma kontrolü QC3, gün içi tekrarlanabilirlik

Gün-içi	QC3 (45,0 nmol/L)				
QC3	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
1.okutma	48,0	47,5	44,9	45,7	46,2
2. okutma	45,9	49,2	44,9	45,7	47,5
3. okutma	46,1	48,9	45,2	47,1	45,4
ORT	46,6	48,5	45,0	46,1	46,4
SD	0,9	0,8	0,1	0,7	0,8
CV	2,0	1,6	0,3	1,4	1,8

Çizelge 3.17. Plazma kontrolü EC1/EC2, gün içi tekrarlanabilirlik

Gün-içi	Lizo-Gb3 (nmol/L)	
	EC-1(5,07)	EC-2 (71,3)
1.okutma	4,59	62,84
2.okutma	4,32	61,37
3.okutma	4,40	61,51
4.okutma	4,51	68,15
5.okutma	4,43	67,60
ORT	4,45	64,29
SD	0,10	3,32
CV	2,33	5,17

Günler arası tekrarlanabilirlik

Çizelge 3.18. Plazma kontrolleri QC1, QC2 ve QC3 günler arası tekrarlanabilirlik

	QC1	QC2	QC3
Günler arası	(2,0 nmol/L)	(20,0 nmol/L)	(45,0 nmol/L)
1.gün	2,38	21,9	44,9
2.gün	2,07	22,6	49,2
3.gün	2,02	22,5	45,7
4.gün	2,06	22,0	46,2
5.gün	2,08	22,0	45,9
ORT	2,12	22,21	46,39
SD	0,15	0,34	1,66
CV	6,88	1,55	3,58

3.6.3. Lizo-Gb3 plazma metodu geri kazanım çalışması

Geri kazanım çalışmaları için dört seviye örnek hazırlanmıştır. Bunlar iki seviye kalibrasyon standardı (10 nmol/L ve 50 nmol/L) ve iki farklı plazma (P1 ve P2) kullanılarak hazırlanmış ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır.

Geri kazanım R1, R2, R3 ve R4 örnekleri standartlar ve plazma örnekleri birebir karıştırılarak hazırlanmıştır (Çizelge 3.19). Geri kazanım çalışmasında % 95,0 güven aralığı değeri $94,52 \pm 3,73$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.19. Lizo-Gb3 plazma geri kazanım çalışması

R-1	Beklenen değer	5.06 nmol/L	% Geri kazanım
STD3 (10)+P1 (0.12)	1. Çalışma	5.06	100.00
	2. Çalışma	4.68	92.49
	3. Çalışma	5.06	100.00
R-2	Beklenen değer	25.06 nmol/L	% Geri kazanım
STD5 (50)+P1 (0.12)	1. Çalışma	23.02	91.86
	2. Çalışma	22.55	89.98
	3. Çalışma	22.25	88.79
R-3	Beklenen değer	5.01 nmol/L	% Geri kazanım
STD3 (10)+P2 (0.01)	1. Çalışma	5.41	108.09
	2. Çalışma	4.89	97.70
	3. Çalışma	4.49	89.71
R-4	Beklenen değer	25.01 nmol/L	% Geri kazanım
STD5 (50)+P2 (0.01)	1. Çalışma	23.89	95.54
	2. Çalışma	23.83	95.30
	3. Çalışma	20.99	83.94

3.6.4. Lizo-Gb3 plazma metodu tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) çalışması

Tespit/ölçüm limiti çalışması için hazırlanan 1,0 nmol/L Lizo-Gb3 ardışık olarak 5 kez enjektörde edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma değerinden yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.20).

Çizelge 3.20. Plazma Lizo-Gb3 tespit/ölçüm limiti çalışması

STD 10,0	Lizo-Gb3	S/N
(1/10 dilüe)	nmol/L	
1.okutma	1,01	101,8
2.okutma	1,02	101,6
3.okutma	0,92	140,4
4.okutma	0,98	154,8
5.okutma	1,00	101,0
ORT	0,99	
SD	0,04	
CV	4,03	
LOD	0,12	
LOQ	0,40	

3.6.5. Lizo-Gb3 plazma metodu interferans çalışması

İnterferans çalışmasında normal, hemolizli, lipemik ve ikterik plazma örnekleri kullanılmıştır. Öncelikle bütün örnekler tek tek çalışılmıştır. Ardından normal örnekle, hemolizli, lipemik ve ikterik örnek farklı oranlarda karıştırılarak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Bütün sonuçlar Çizelge 3.21’de verilmiştir.

Çizelge 3.21. Plazma Lizo-Gb3 interferans çalışması

	Lizo-Gb3	Lizo-Gb3	
	Ölçülen değer (nmol/L)	Beklenen değer (nmol/L)	% Geri kazanım
Normal örnek	0,51	0,51	100
Hemolizli örnek	1,02	1,02	100
Lipemik örnek	0,53	0,53	100
İkterik örnek	0,66	0,66	100
NH+Hem. (1/1)	0,67	0,76	88
NH+Hem. (1/2)	0,87	0,85	101
NH+Hem. (1/4)	0,90	0,92	99
NH+Lipem. (1/1)	0,52	0,52	100
NH+Lipem. (1/2)	0,51	0,52	98
NH+Lipem. (1/4)	0,52	0,53	98
NH+İkte. (1/1)	0,60	0,59	102
NH+İkte. (1/2)	0,62	0,61	102
NH+İkte. (1/4)	0,62	0,64	98

3.6.6. Lizo-Gb3 plazma metodu stabilite çalışması

Kısa süreli stabiliteyi değerlendirmek için kontrol örnekleri (düşük ve yüksek seviye) oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir, ardından ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır ve analiz edilmiştir. Autosampler stabilite çalışması için örnekler cihaz içerisinde 24 saat 4 derecede bekletilmiştir ve analiz edilmiştir. Uzun dönem stabilite çalışması için örnekler -25 °C’de 30 ve 90 gün bekleme süreleri sonrası hazırlanmış ve analiz edilmiştir (Çizelge 3.22) .

Çizelge 3.22. Plazma Lizo-Gb3 stabilite çalışması

Lizoo-Gb3 (nmol/L)	Stabilite testi	Lizo-Gb3 (nmol/L)	%değişim
0,60	2 saat (kısa süre stabilite)	0,58	-3,3
	24 saat (autosampler stabilite)	0,56	-6,7
	30 gün (-25 C uzun stabilite)	0,58	-3,3
	90 gün (-25 C uzun stabilite)	0,56	-6,7
14,0	2 saat (kısa süre stabilite)	14,0	-0,2
	24 saat (autosampler stabilite)	12,9	-7,7
	30 gün (-25 C uzun stabilite)	13,1	-6,4
	90 gün (-25 C uzun stabilite)	12,7	-9,3

3.7. Lizo-Gb3 kuru kan metot geçerli kılma çalışmaları

MS/MS ve UPLC metot-1 kullanılarak oluşturulan Lizo-Gb3 kuru kan analiz metodu geçerli kılma çalışmaları yapılmıştır.

Çalışmada aşağıda sıralanan geçerli kılma parametreleri kullanılmıştır:

- Doğrusallık (Linearite)
- Tekrarlanabilirlik (Presizyon)
- Geri kazanım (Recovery)
- Tespit/ölçüm Limiti (LOD/LOQ)
- Stabilitate

3.7.1. Lizo-Gb3 kuru kan metodu kalibrasyon çalışması

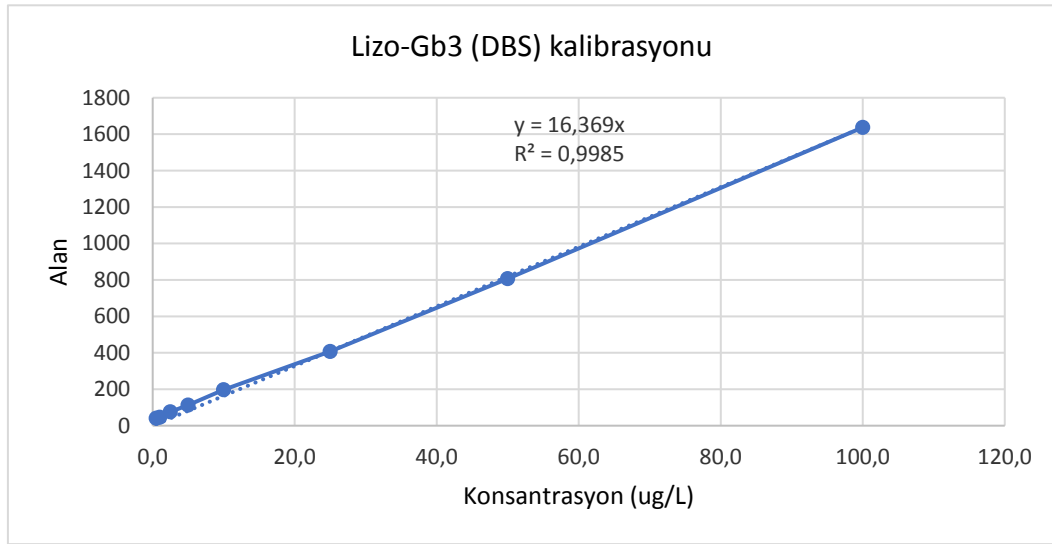
Kuru kan Lizo-Gb3 analizi için hazırlanan 8 adet kalibrasyon standardı konsantrasyonlara karşılık gelen analit alan değerlerinden kalibrasyon grafiği oluşturulmuştur. Metot validasyonu çalışmalarında 4 gün boyunca kalibrasyon standartları çalışılmış, standartların ortalama alan değerleri ile kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. (Çizelge 3.23. ve Çizelge 3.24.) (Şekil 3.4.).

Çizelge 3.23. Lizo-Gb3 kuru kan kalibrasyon standartları

STD	Alan						
(ng/mL)	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	ORT	SD	CV
STD-0,5	39	52,0	29	42	40,5	8,20	20,2
STD-1,0	49	48,0	36	49	45,5	5,50	12,1
STD-2,5	82	92,0	56	73	75,8	13,24	17,5
STD-5,0	135	107,0	87	122	112,8	17,87	15,8
STD-10	219	205,0	142	223	197,3	32,59	16,5
STD-25	467	430,0	340	391	407,0	47,10	11,6
STD-50	988	811,0	635	794	807,0	125,03	15,5
STD-100	1885	1619,0	1424	1620	1637,0	163,93	10,0

Çizelge 3.24. Lizo-Gb3 kuru kan ortalama standart konsantrasyonlarına karşılık gelen alan değerleri

Konsantrasyon (ng/mL)	Alan (Ort.)
0,5	41
1,0	46
2,5	76
5,0	113
10,0	197
25,0	407
50,0	807
100,0	1637



Şekil 3.4. Standart Lizo-Gb3 (kuru-kan) kalibrasyon grafiği

3.7.2. Lizo-Gb3 kuru kan metodu tekrarlanabilirlik çalışması

Tekrarlanabilirlik kapsamında iki seviye QC-01 ve QC-02 kuru kan kontrolleri çalışılmıştır. Validasyon çalışmaları kapsamında gün içi (Çizelge 3.25, Çizelge 3.26) ve günler arası (Çizelge 3.27) tekrarlanabilirlik verileri elde edilmiştir.

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışması

Çizelge 3.25. Kuru kan kontrolü QC-01 gün içi tekrarlanabilirlik

Gün içi	QC-01 (74,7 ng/mL)				
	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
1.okutma	68,8	75,1	74,1	82,6	76,5
2.okutma	66,6	77,1	75,9	70,7	82,4
3.okutma	71,4	77,4	83,0	70,6	79,1
ORT	68,9	76,5	77,7	74,6	79,5
SD	2,4	1,3	4,7	6,9	4,2
CV	3,5	1,7	6,0	9,2	5,3

Çizelge 3.26. Kuru kan kontrolü QC-2 gün içi tekrarlanabilirlik

Gün içi	QC-02 (6,2 ng/mL)				
	1.gün	2.gün	3.gün	4.gün	5.gün
1.okutma	6,4	7,59	5,86	5,05	5,16
2.okutma	5,8	6,51	5,56	4,97	5,60
3.okutma	5,7	7,95	4,58	5,16	5,31
ORT	6,0	7,35	5,00	5,06	5,38
SD	0,3	0,7	0,5	0,1	0,3
CV	5,8	10,2	10,1	1,9	5,8

Günler arası tekrarlanabilirlik çalışması

Çizelge 3.27. Kuru kan kontrolleri QC-01ve QC-02 günler arası tekrarlanabilirlik

Günler arası	QC-01	QC-02
	(74,7 ng/mL)	(6,2 ng/mL)
1.gün	68,8	4,86
2.gün	75,1	5,60
3.gün	74,1	4,97
4.gün	70,7	6,36
5.gün	76,5	5,51
ORT	73,0	5,5
SD	3,2	0,6
CV	4,4	11,0

3.7.3. Lizo-Gb3 kuru kan metodu tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) çalışması

Dedeksiyon limiti çalışması için kör örnekle spike edilen 0,5 ng/mL standart ardışık olarak 5 kez enjekte edilmiştir. Bu çalışmadan elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması ve standart sapması hesaplanmıştır. Standart sapma değerinden yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.28).

Çizelge 3.28. Kuru kan Lyso-Gb3 tespi/ölçüm limiti çalışması

	Lizo-Gb3	S/N
Blank spiked (0,5 ng/mL)	ng/mL	
1.okutma	0,50	48,9
2.okutma	0,48	46,9
3.okutma	0,45	44,0
4.okutma	0,46	45,0
5.okutma	0,42	41,1
ORT	0,46	
SD	0,03	
CV	6,57	
LOD	0,09	
LOQ	0,30	

3.7.4. Lizo-Gb3 kuru kan metodu geri kazanım çalışması

Geri kazanım çalışmaları için iki seviye örnek hazırlanmıştır. Referans tam kan örneği iki seviye kalibrasyon standardı (0,5 ng/mL ve 10,0 ng/mL) ile spike edilerek hazırlanmış ve geri kazanım yüzdeleri hesaplanmıştır (Çizelge 3.29). Geri kazanım çalışmalarında % 95,0 güven aralığı değeri $100,8 \pm 3,52$ olarak bulunmuştur.

Çizelge 3.29. Kuru kan Lizo-Gb3 geri kazanım çalışması

Spike		Spike	
0,5 ng/mL	%Rec	10,0 ng/mL	%Geri kazanım
0,45	90	10,3	103
0,50	100	10,4	104
0,48	96	9,3	93
0,46	92	10,2	102
0,42	84	10,2	102

3.7.5. Lizo-Gb3 kuru kan metodu stabilite çalışması

Kısa süreli stabiliteyi değerlendirmek için kontrol örnekleri (düşük ve yüksek) oda sıcaklığında 2 saat bekletilmiştir, ardından ekstraksiyon işlemi uygulanmıştır ve analiz

edilmiştir. Autosampler stabilite çalışması için örnekler cihaz içerisinde 24 saat 4 derecede bekletilmiştir ve analiz edilmiştir (Çizelge 3.30). Uzun dönem stabilite çalışması için örnekler -25 °C’de 30 ve 90 gün bekleme süreleri sonrası hazırlanmış ve analiz edilmiştir.

Çizelge 3.30. Kuru kan Lizo-Gb3 stabilite çalışması

Lizo-Gb3 (ng/mL)	Stabilite testi	Lizo-Gb3 (µg/L)	%değişim
1,25	2 saat (kısa süre stabilite)	1,24	-0,8
	24 saat (autosampler stabilite)	1,23	-1,6
	30 gün (-25 C uzun stabilite)	1,30	4,0
	90 gün (-25 C uzun stabilite)	1,24	-0,8
30,0	2 saat (kısa süre stabilite)	31,3	4,33
	24 saat (autosampler stabilite)	31,3	4,33
	30 gün (-25 C uzun stabilite)	31,1	3,67
	90 gün (-25 C uzun stabilite)	30,8	2,67

3.8. Alfa-galaktozidaz A enzim aktivitesi ölçümü:

3.8.1. Standart /reaktif /çözeltilerin hazırlanması

- Sodyum Asetat Trihidrat Stok Çözeltisi (0.1 M): 1.36 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Supelco 1.06267) 100 mL H_2O da çözülmüştür.
- Asetik asit Stok Çözeltisi (0.1 M): 0.57 mL glasiyel asetik asit (Supelco 1.00063) son hacim 100 mL olacak şekilde H_2O ile dilüe edilmiştir.
- Reaksiyon Tamponu (0.1 M Asetat Tamponu), (pH: 4.5): 43 mL 0.1 M Sodyum asetat trihidrat stok çözeltisi ile, 57 mL 0.1 M asetik asit stok çözeltisi karıştırılarak hazırlanmıştır.
- Substrat/Tampon: 8,5 mg 4-Metilumbeliferil α -D-galaktopiranozid (TRC, M334475, MW: 338,31 g/mol) 5 mL reaksiyon tamponu ile çözülmüştür (substrat çözeltisi son konsantrasyonu 5mM).
- N-Asetil-D-galaktozamin (1.0 M): 2.21 g N-Asetil-D-galaktozamin (Sigma, A2795) 10 mL H_2O ’da çözülmüştür.
- Durdurma tamponu : (0.2 M Na_2CO_3 / glisin), (pH: 10.5): 21.2 g Na_2CO_3 (Supelco 1.06392) 400 mL saf su ile çözülür. 3.75 g Glisin (Sigma G7403) 100 mL saf su ile çözülmüştür. Na_2CO_3 ve glisin çözeltileri karıştırılmıştır ve saf su ile hacmi 1000 mL’ye tamamlanmıştır.
- 4-Metilumbeliferon (10 mmol/L) 17 mg 4-MU (Sigma, M-1381) konsantrasyonunda 10 mL hacminde stop tamponu içerisinde hazırlanmıştır.

3.8.2. Alfa-galaktozidaz A enzim analizi test çalışma talimatı

Kuru kan örnekleri

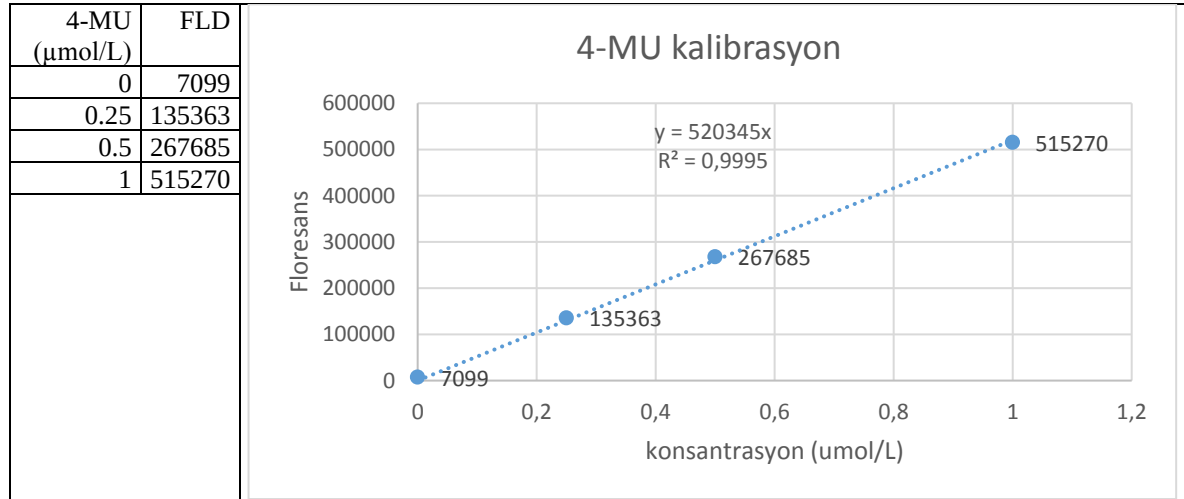
Deney tüplerine kontrol, blank ve hasta örneklerinden birer adet 3,0 mm punch (Perkin Elmer Delfia puncher) (GEHC Whatman CF12 Filtre Kağıdına emdirilmiş kan örneklerinden) alınmıştır. Bütün deney tüplerine sırasıyla; 35 µL H₂O, 15 µL 0,1 M N-Asetilgalaktozamin, 100 µL substrat/tampon eklenmiştir, 1 dakika karıştırılmıştır ve 17 saat 37°C’de inkübe edilmiştir. Ardından bütün tüplere 1350 µL stop buffer eklenmiştir ve reaksiyon durdurulmuştur. Vorteksle 30 saniye karıştırılmıştır, 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sırasıyla 96’lık beyaz flourometrik mikro plate içerisine alınmıştır. Florimetrede (BioTek Synergy H1) Ex: 366 nm Em: 442 nm’de floresanlar kaydedilmiştir.

Kalibrasyon ana stok ve çalışma standartlarının hazırlanışı

- 4-Metilumbeliferon (Sigma, M-1381) 10 mmol/L konsantrasyonunda 10 mL hacminde stop tamponu içerisinde hazırlanmıştır (17,6 mg/10 mL). Ara stoklar stop tamponu içerisinde hazırlanmıştır.
- 4-Metilumbeliferon Çalışma Standartları: 0,25 - 0,5 – 0,1 µmol/L konsantrasyon aralığında stop tamponu içerisinde hazırlanmıştır (Çizelge 3.29.).
10 mmol/L ana standart çözeltisinden 100 µL alınıp 1 mL stop tamponu içerisinde dilüe edilerek konsantrasyonu 1000 µmol/L olan bir çözelti hazırlanmıştır. 1000 µmol/L hazırlanan standart çözeltisi seyreltilerek sırasıyla 100 µmol/L ve 10 µmol/L’lik çözeltiler hazırlanmıştır.

Çizelge 3.29. Alfa-galaktozidaz A kuru kan kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

STD-0	Stop tamponu	V ₀ = 1500 µL
STD2-0,25 µmol/L	25 µL, 10 µM 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tamon ile 1500 µL’ye tamamlanmıştır.	V ₁ = 25 µL
STD2-0,5 µmol/L	50 µL, 10 µM 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tampon ile 1500 µL’ye tamamlanmıştır.	V ₁ = 50 µL
STD3-1,0 µmol/L	100 µL, 10 µM 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tampon ile 1500 µL’ye tamamlanmıştır.	V ₂ = 100 µL



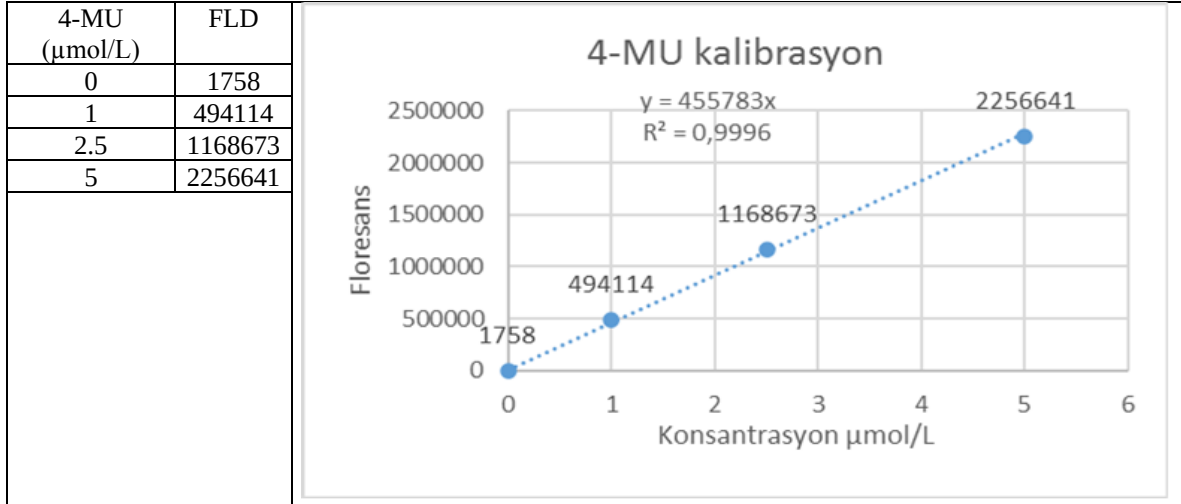
Şekil 3.5. Alfa-galaktozidaz A kuru kan analizi 4-MU kalibrasyon grafiği

Lökosit örnekleri

Deney tüplerine kontrol, blank (H_2O) ve hasta örneklerinden $35 \mu\text{L}$ pipetlenir. Bütün deney tüplerine sırasıyla; $15 \mu\text{L}$ $0,1 \text{ M}$ N-Asetilgalaktozamin, $100 \mu\text{L}$ substrat/tampon eklenmiş, 1 dakika karıştırılmış ve 30 dakika 37°C 'de inkübe edilmiştir. Ardından bütün tüplere $1350 \mu\text{L}$ stop tamponu eklenmiş ve reaksiyon durdurulmuştur. Vorteksle 30 saniye karıştırılmış ve 5 dakika santrifüj edilmiştir. Sırasıyla 96'lık beyaz flourometrik mikro plate içerisine alınmıştır. Florimetrede (BioTek Synergy H1) Ex: 366 nm Em: 442 nm 'de floresanlar kaydedilmiştir.

Çizelge 3.30. Alfa-galaktozidaz A lökosit kalibrasyon standartlarının hazırlanışı

STD-0	Stop tamponu	$V_0 = 1500 \mu\text{L}$
STD1-1,0 $\mu\text{mol/L}$	$100 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{M}$ 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tampon ile $1500 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.	$V_1 = 100 \mu\text{L}$
STD2-2,5 $\mu\text{mol/L}$	$250 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{M}$ 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tampon ile $1500 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.	$V_2 = 250 \mu\text{L}$
ST3-5,0 $\mu\text{mol/L}$	$500 \mu\text{L}$, $10 \mu\text{M}$ 4-MU alınmıştır ve hacmi stop tampon ile $1500 \mu\text{L}$ 'ye tamamlanmıştır.	$V_2 = 500 \mu\text{L}$



Şekil 3.6. Alfa-galaktozidaz A lökosit analizi 4-MU kalibrasyon grafiği

3.9. GLA dizi analizi

Fabry hastalığı genetik çalışmasında yeni nesil sekanslama (NGS) metodu ile dizileme yapılmaktadır. Bu işlemde izole edilen DNA'dan PCR ile çoğaltılan PCR ürünleri dizilenmektedir ve referans dizi ile karşılaştırılmaktadır (NCBI Genomik Referans Dizi: NG_007119.1, NM_000169.2). Burada saptanan mutasyonlardan, kodlayan dizide olanları raporlanmaktadır. Raporlanan mutasyonların Fabry hastalığı ile ilişkisi "HGMD" veri tabanından alınarak eklenmektedir. Veri tabanında olmayan mutasyonlar için SIFT, Mutation t@ster, PolyPhen-2 gibi model analiz programlarının öngörülleri eklenmektedir.

3.10. İstatistiksel Analiz

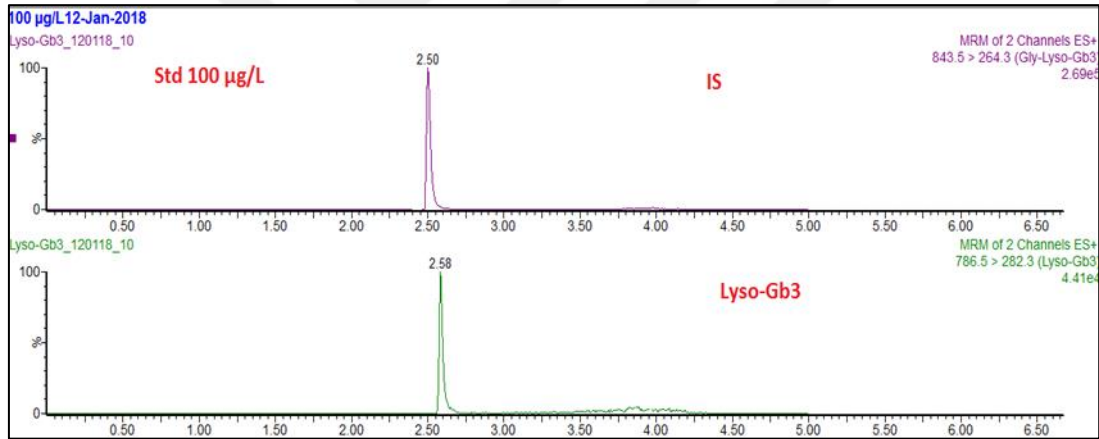
Çalışmada elde edilen verilerin analizinde SPSS versiyon 26 istatistik paket programı kullanılmıştır. Enzim aktivite değeri ve biyobelirteç parametrelerinin birbirleri ile olan ilişkilerinin incelenmesinde kontrol ve hasta gruplarında ayrı olacak şekilde pearson korelasyon katsayısı esas alınmıştır, anlamlı ilişkinin görüldüğü parametreler arasında saçılım grafiği ile gösterim sağlanmıştır. Fabry hastalarını sağlıklı deneklerden ve fonksiyonel varyantlardan ayırt etmek için optimal kesme değeri (cut-off), alıcı çalışma karakteristiği (ROC) eğrisi analizi ile belirlenmiştir.



4. BULGULAR

4.1. Metot Geliştirme

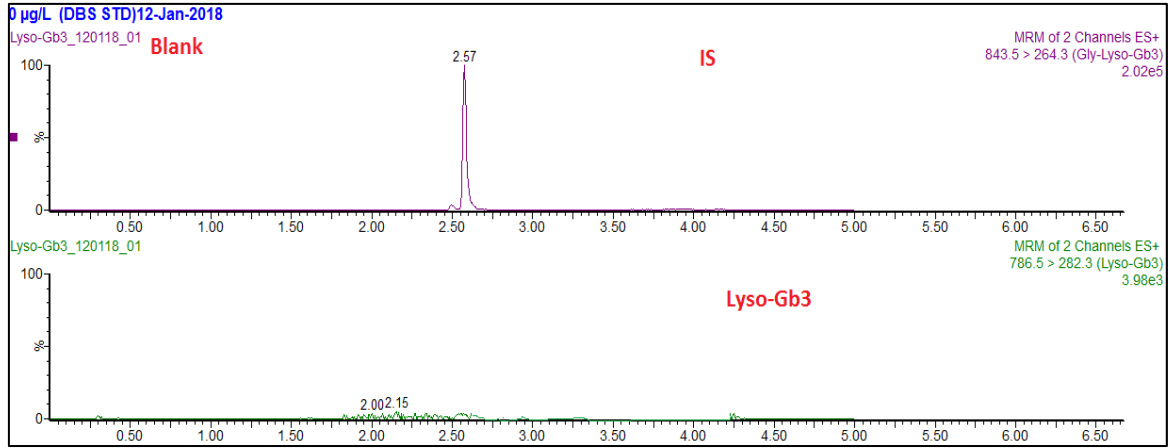
Lizo-Gb3 ve IS (Gly-Lizo-Gb3) için optimum elüsyon mobil faz A (5mM amonyum format ACN + %0,2 formik asit) ve mobil faz B (5mM amonyum format H₂O + %0,2 formik asit) gradient akış programı ile elde edilmiştir. Akış hızı 0,5 mL/dk olarak belirlenmiştir. Başlangıçta mobil faz A %100, 1.dakikada oran % 65 düşmektedir, 3. dakikada B mobil fazı oranı %100'e ulaşmıştır, 3,5. dakikada ise %65 B ile devam edilmiştir, 5.dakikada başlangıç koşullarına (%100 A) dönmüştür. Alıkonma zamanları Lizo-Gb3 için 2,50 dk, Gly-Lizo-Gb3 için 2,58 dk olarak saptanmıştır. Lizo-Gb3 (100 nmol/L) ve Gly-Lizo-Gb3 (25 nmol/L) kromatogramları Şekil 4.1.'de verilmiştir.



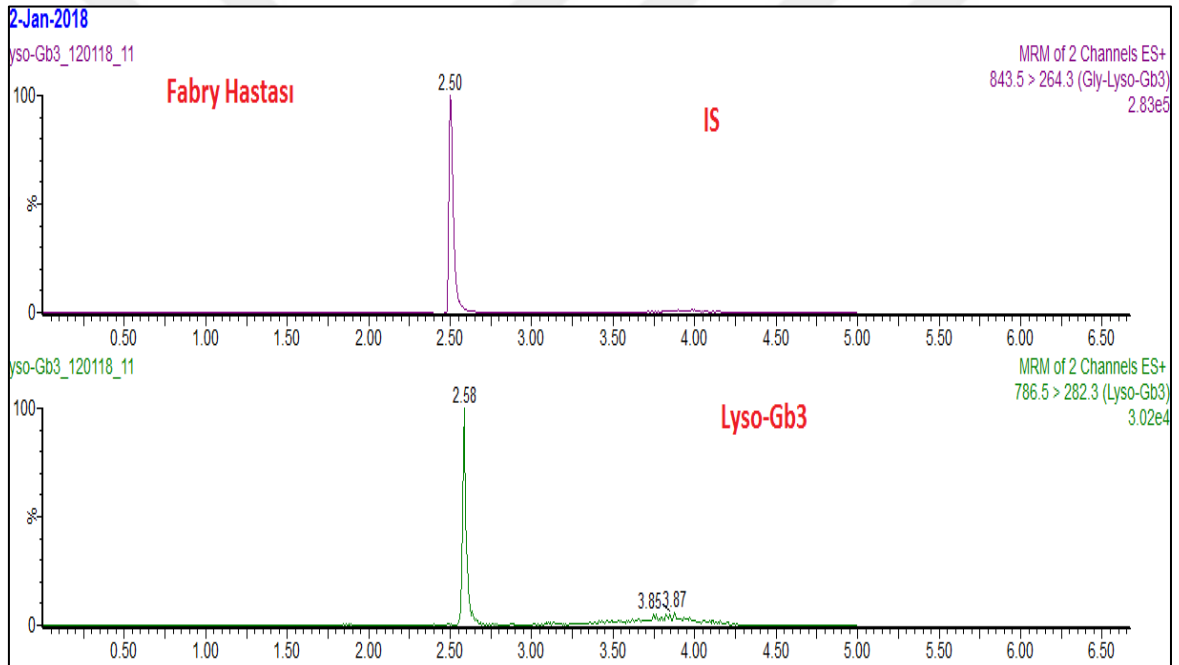
Şekil 4.1. Lizo-Gb3 (100 nmol/L) ve Gly-Lizo-Gb3 (25 nmol/L) kromatogramları

4.2. Seçicilik

Kör (blank) havuzların enjeksiyonundan sonra, ilgilenilen bileşiklerin (lizo-Gb3 ve IS) saptanmasına engel olabilecek endojen maddelerden kaynaklanan ek pikler gözlenmemiştir. Bu kör örnekler için 5 farklı enjeksiyon yapılmıştır. Kör enjeksiyonuna ait temsili kromatogram Şekil 4.2.'te verilmiştir. Fabry hastasının enjeksiyonundan elde edilen kromatogram Şekil 4.3.'te verilmiştir.



Şekil 4.2. Kör örnekte Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3



Şekil 4.3. Fabry hastasında Lizo-Gb3 ve Gly-Lizo-Gb3)

4.3. Doğrusallık

4.3.1. Plazma Lizo-Gb3 kalibrasyon standartları

Lizoo-Gb3 için kalibrasyon eğrisi 0 – 100 nmol/L aralığında 7 nokta olarak oluşturulmuştur.

Kalibrasyon verileri 5 gün boyunca yapılan çalışmalar sonucu değerlendirilmiştir. Beş günün ortalama Lizo-Gb3 pik alanlarına karşı konsantrasyon değerleri kullanılarak

kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Analit konsantrasyonları ile eşleşen analit – (IS) internal standart pik alan oranları arasında tekrarlanabilir doğrusal bir korelasyon göstermiştir. Ortalama R^2 0,996 olarak $y = 307,21x$ ($x = \text{Lizo-Gb3 konsantrasyonu}$) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. Lyso-Gb3 plazma kalibrasyon verileri

	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün
R^2	0.997	0.996	0.997	0.995	0.995
$y =$	261.75x	314,68x	381.69x	294.85x	313.37x

4.3.2. Kuru kan Lizo-Gb3 kalibrasyon standartları

Lizo-Gb3 kuru kan için kalibrasyon eğrisi 0,5 –100 ng/mL aralığında 8 nokta olarak oluşturulmuştur.

Kalibrasyon verileri 4 gün boyunca yapılan çalışmalar sonucu değerlendirilmiştir. Dört günün ortalama Lizo-Gb3 pik alanlarına karşı konsantrasyon değerleri kullanılarak kalibrasyon eğrisi oluşturulmuştur. Analit konsantrasyonları ile eşleşen analit – (IS) internal standart pik alan oranları arasında tekrarlanabilir doğrusal bir korelasyon göstermiştir. Ortalama $R^2 = 0,997$ olarak $y = 16,369x$ ($x = \text{Lizo-Gb3 konsantrasyonu}$) olarak saptanmıştır (Çizelge 4.2).

Çizelge 4.2. Lizo-Gb3 kuru kan kalibrasyon verileri

	1.gün	2. gün	3.gün	4.gün
R^2	0,998	0,996	0,996	0,996
$y =$	0,0524x	0,0612x	0,0716x	0,0616x

4.4. Tekrarlanabilirlik

4.4.1. Plazma Lizo-Gb3 tekrarlanabilirlik

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında üç farklı seviye kontrol plazma örneği (QC1, QC2 ve QC3) 5 gün 3 paralel olarak, EC1 ve EC2 ticari kontrol örnekleri tek gün 5 paralel olarak çalışılmıştır.

Günler arası çalışmalarda QC1, QC2 ve QC3 5 günlük verileri toplanmıştır.

Gün içi ve günler arası çalışmaların her ikisi içinde %CV değerleri tüm seviye kontroller için %20'nin altında saptanmıştır. QC1 ve QC2 için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik verileri Çizelge 4.3.'te özet olarak verilmiştir. Kontroller EC1 ve EC2 için gün içi tekrarlanabilirlik verileri Çizelge 4.4.'te verilmiştir.

Çizelge 4.3. Lizo-Gb3 plazma QC1, QC2 ve QC3 gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik

	Lizoo-Gb3	Gün içi			Günler arası		
	nmol/L	Ortalama	SD	%CV	Ortalama	SD	%CV
QC1	2,0	2,18	0,2	5,7	2,12	0,1	6,8
QC2	20,0	22,3	0,2	0,9	22,2	0,3	1,5
QC3	45,0	46,5	0,7	1,4	46,4	1,7	3,6

Çizelge 4.4. Lizo-Gb3 plazma EC1, EC2 gün içi tekrarlanabilirlik

	Lizo-Gb3	Gün içi		
	nmol/L	Ortalama	SD	%CV
EC1	5,1	4,5	0,1	2,3
EC2	71,3	64,2	3,3	5,2

4.4.2. Kuru kan Lizo-Gb3 tekrarlanabilirlik

Gün içi tekrarlanabilirlik çalışmaları kapsamında iki farklı seviye kontrol kuru kan örneği (QC-01 ve QC-02) 5 gün 3 paralel olarak çalışılmıştır.

Günler arası çalışmalarda QC-01 ve QC-02 için 5 günlük verileri toplanmıştır.

Gün içi ve günler arası çalışmaların her ikisi içinde %CV değerleri tüm seviye kontroller için %20'nin altında saptanmıştır. QC-01 ve QC-02 için gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik verileri Çizelge 4.5.'te özet olarak verilmiştir.

Çizelge 4.5. Lizo-Gb3 kuru kan QC-01, QC-02 gün içi, günler arası tekrarlanabilirlik

	Lizo-Gb3	Gün içi			Günler arası		
	ng/mL	Ortalama	SD	%CV	Ortalama	SD	%CV
QC-01	6,2	5,8	0,4	6,6	5,5	0,6	10,0
QC-02	74,7	75,4	3,9	5,2	73,0	3,2	4,4

4.5. Geri Kazanım

4.5.1. Plazma Lizo-Gb3 geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları kapsamında dört farklı (R1, R2, R3, R4) örnek hazırlanmıştır. Bu örnekler iki seviye standartın (10nmol/L ve 50 nmol/L), iki farklı hasta olamadığı bilinen plazma örneği ile karıştırılması ile elde edilmiştir. Hazırlanan örnekler 3 paralel olarak çalışılmıştır ve % geri kazanımlar hesaplanmıştır. Her iki seviye için geri kazanım değeri ortalama %95 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.6.).

Çizelge 4.6. Lizo-Gb3 plazma geri kazanım çalışmaları

Plazma	Lizo-Gb3		
	Ger. Değer(nmol/L)	Ort değer (nmol/L)	Ort % Geri Kazanım
R1	5,06	4,90	97,0
R2	25,06	22,20	90,0
R3	5,01	4,90	99,0
R4	25,01	22,20	92,0

4.5.2. Kuru kan Lizo-Gb3 geri kazanım

Geri kazanım çalışmaları kapsamında iki farklı (R1(DBS), R2(DBS)) örnek hazırlanmıştır. Bu örnekler iki seviye standartın (0,5 ng/mL ve 10 ng/mL), iki farklı hasta olmadığı bilinen tam kan örneği ile karıştırılması ile elde edilmiştir. Hazırlanan örnekler 5 paralel olarak çalışılmıştır ve % geri kazanımlar hesaplanmıştır. Her iki seviye için geri kazanım değeri ortalama %96,7 olarak saptanmıştır (Çizelge 4.7.).

Çizelge 4.7. Lizo-Gb3 kuru kan geri kazanım çalışmaları

Kuru kan	Lizo-Gb3		
	Ger. Değer(ng/mL)	Ort değer (ng/mL)	Ort % Geri Kazanım
R1(DBS)	0,5	0,46	92,4
R2(DBS)	10	10,1	101

4.6. Tespit limiti (LOD), Ölçüm limiti (LOQ)

Lizo-Gb3 plazma metodu tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) 1,0 nmol/L standartla spike edilen kör örnekle yapılmıştır. Bu örnek cihaza ardışık olarak 5 kez enjekte edilmiştir.

Kuru kan örnekleri için tespit/ölçüm limiti (LOD/LOQ) çalışması 0,5 ng/mL standart ile spike edilen örneklerle yapılmıştır. Bu örnek cihaza ardışık olarak 5 kez enjekte edilmiştir.

Bu çalışmalardan elde edilen konsantrasyon değerlerinin ortalaması ve standart sapma verileri elde edilmiştir. Standart sapma değerinden yararlanarak LOD ve LOQ değerleri hesaplanmıştır ve Çizelge 4.7’de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Lizo-Gb3 tespit/ölçüm limiti

Lizo-Gb3	Plazma		Kuru kan	
	nmol/L	ng/mL	nmol/L	ng/mL
LOD	0,12	0,09	0,10	0,09
LOQ	0,40	0,30	0,40	0,30

4.7. Stabilité Çalışması

Ekstre edilmiş plazma ve kuru kan örneğinde Lizo-Gb3’ün, 4°C’de, 24 saat autosampler içerisinde bekletildikten sonra stabilitesini koruduğu saptanmıştır. Her iki seviyedeki kontrol örneği oda sıcaklığında 2 saat boyunca stabilitesini korumuştur. Son olarak 30 ve 90 günlük bekleme süreleri sonunda yapılan çalışmada kontrol örneklerinin stabilitesini koruduğu görülmüştür. Her iki seviye örnekte gözlenen değişimlerin %10’un altında olduğu tespit edilmiştir.

$$\% \text{ Değişim} = 100 * (\text{ortalama konsantrasyon} - \text{gerçek konsantrasyon}) / \text{gerçek konsantrasyon}$$

4.8. İnterferans Çalışması

İnterferans çalışmasında normal, hemolizli, lipemik ve ikterik plazma örnekleri kullanılmıştır. Öncelikle bütün örnekler tek tek çalışılmıştır. Ardından normal örnekle, hemolizli, lipemik ve ikterik örnek farklı oranlarda karıştırılarak geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Tüm örnekler için % geri kazanım değerleri ≥ 90 olarak saptanmıştır. Geri kazanım oranları; hemolizin, lipeminin ve ikterinin plazma Lizo-Gb3 sonuçlarını dikkate değer bir oranda etkilemediğini göstermiştir.

4.9. Klinik uygulamalar

4.9.1. Arşiv örnekleri ile yapılan çalışma

Geçerli kılma çalışmaları tamamlanan metot ile 55 sağlıklı kontrolün plazma örneklerinde Lizo-Gb3 ölçümleri yapılmıştır. Sağlıklı 42 kontrol kuru kan örneğinde ise eş zamanlı α -galaktozidaz A enzim aktivitesi tayini ve Lizo-Gb3 ölçümü yapılmıştır. Ölçümler başarıyla tamamlanmış ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9. ve 4.10.'da verilmiştir.

Sağlıklı bireylerde plazma Lizo-Gb3 konsantrasyonu ortalama $0,12 \pm 0,12$ ng/mL, kuru kan Lizo-Gb3 konsantrasyonu $0,48 \pm 0,31$ ng/mL olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.9. Plazma Lizo-Gb3 sağlıklı birey çalışmaları

Sağlıklı birey	Lizo-Gb3		Sağlıklı birey	Lizo-Gb3	
	nmol/L	ng/mL		nmol/L	ng/mL
H-1	0,27	0,21	H-31	0,17	0,13
H-2	0,54	0,42	H-32	0,24	0,19
H-3	0,22	0,17	H-33	0,14	0,11
H-4	0,91	0,72	H-34	0,15	0,12
H-5	0,61	0,48	H-35	0,16	0,13
H-6	0,12	0,09	H-36	0,21	0,17
H-7	0,01	0,01	H-37	0,17	0,13
H-8	0,12	0,09	H-38	0,31	0,24
H-9	0,07	0,06	H-39	0,04	0,03
H-10	0,03	0,02	H-40	0,21	0,17
H-11	0,00	0,00	H-41	0,19	0,15
H-12	0,14	0,11	H-42	0,10	0,08
H-13	0,13	0,10	H-43	0,02	0,02
H-14	0,06	0,05	H-44	0,03	0,02
H-15	0,14	0,11	H-45	0,00	0,00
H-16	0,17	0,13	H-46	0,09	0,07
H-17	0,00	0,00	H-47	0,22	0,17
H-18	0,13	0,10	H-48	0,00	0,00
H-19	0,00	0,00	H-49	0,19	0,15
H-20	0,15	0,12	H-50	0,34	0,27
H-21	0,00	0,00	H-51	0,17	0,13
H-22	0,10	0,08	H-52	0,03	0,02
H-23	0,11	0,09	H-53	0,18	0,14
H-24	0,10	0,08	H-54	0,10	0,08
H-25	0,01	0,01	H-55	0,14	0,11
H-26	0,10	0,08	ORT	0,14	0,12
H-27	0,07	0,06	Medyan	0,14	0,11
H-28	0,20	0,16	SD	0,15	0,12
H-29	0,19	0,15			
H-30	0,22	0,17			

Çizelge 4.10. Sağlıklı bireylerin kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 ve α -Gal A çalışmaları

Sağlıklı birey	Lizo-Gb3 (ng/mL)	α -Gal A nmol/mL/s	Sağlıklı birey	Lizo-Gb3 (ng/mL)	α -Gal A nmol/mL/s
H1	0,44	3,4	H22	0,1	5,6
H2	0,81	6,8	H23	0,14	2,8
H3	0,86	15	H24	0,73	4,2
H4	0,72	3,6	H25	0,21	3,1
H5	0,31	4,8	H26	0,6	2,6
H6	0,18	4,9	H27	1,04	3,8
H7	0,47	3,3	H28	0,22	4,3
H8	0,45	12	H29	0,17	4,5
H9	0,16	5,7	H30	0,58	4,8
H10	0,12	8	H31	0,67	2,7
H11	0,89	3,2	H32	0,53	2,6
H12	0,06	5,5	H33	0,12	2,7
H13	0,57	3,2	H34	0,58	4,1
H14	0,58	4,5	H35	0,28	3,5
H15	0,56	13	H36	0,12	2,9
H16	1,23	4,7	H37	0,12	3,8
H17	0,8	4,9	H38	0,64	4,2
H18	0,93	2,8	H39	0,81	3,4
H19	0,65	2,7	H40	0,18	2,8
H20	0,14	6,8	H41	0,81	3,5
H21	0,3	5,6	H42	0,11	4,9
			ORT	0,48	4,79
			Medyan	0,48	4,15
			SD	0,31	2,73

4.9.2. Dış merkezle yapılan karşılaştırma çalışması (Doğruluk)

Dış merkeze Lizo-Gb3 miktar tayini için gönderilen 7 adet hastaya ait örneğin kuru kan örneği çalışılmıştır. Bu örneklerle ait dış merkez sonuçları ve iç çalışma sonuçları arasında korelasyon ($r=0.998$) gözlenmiştir.

Çizelge 4.11. Dış merkezle paralel kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 çalışmaları

Dış merkez karşılaştırma çalışması				
	Dış Merkez	İç çalışma		
	Lizo-Gb3 (μ g/L)	Lizo-Gb3 (μ g/L)	α -gal A nmol/mg/s	GLA gen analizi
K	1.6	1.8	-	c.685T>G(F229V) (Heterozigot)
E	68.7	62.2	3.5	-
E	68.5	57.7	2.9	-
K	4.7	3.7	63.4	-
K	3	3.1	-	c.1117G>C (p.G373R) (Heterozigot)
E	<0.6	0.5	-	-
K	3.8	3.1	-	-

4.9.3. Arşiv kuru kan örnekleri ile yapılan Lizo-Gb3, α -gal A analizleri

Metot geçerli kılma çalışmaları devamında Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda 2017-2019 yılları arasında Fabry hastalığı taraması için gelmiş ve α -gal A enzim aktivitesi çalışılmış, isimlendirilmiş arşiv kuru kan örneklerinde Lizo-Gb3 miktar tayini yapılmıştır.

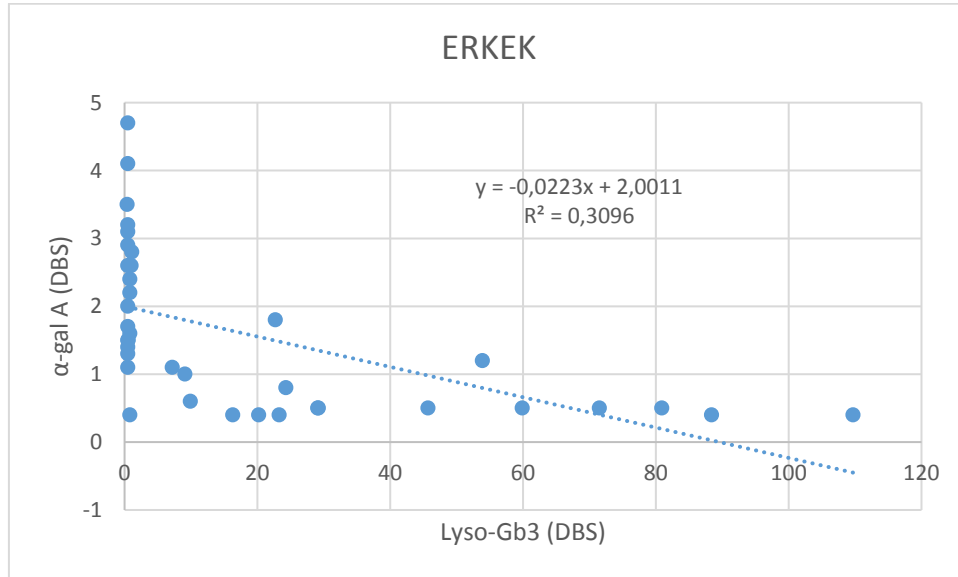
37 erkek ve 51 kadın hastadan oluşan toplam 88 adet kuru kan örneği kullanılmıştır.

İlk adımda α -gal A enzim aktivitesi ve Lizo-Gb3 sonuçları arasındaki korelasyon değerlendirilmiştir.

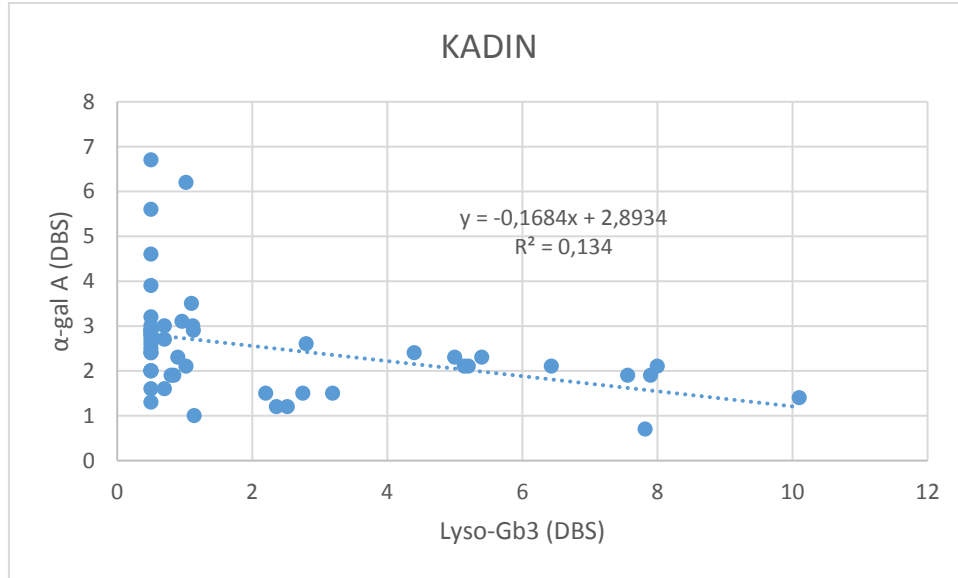
Erkek hastalar için $r = -0,556$ saptanmış, korelasyon grafiği Şekil 4.4.'te verilmiştir.

Kadın hastalar için $r = -0,366$ saptanmış, korelasyon grafiği Şekil 4.5.'te verilmiştir.

Enzim aktiviteleri ile Lizo-Gb3 arasında negatif korelasyon mevcuttur. Enzim aktivitesi azaldığında Lizo-Gb3 miktarının artması beklenmektedir.



Şekil 4.4. α -gal A – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Erkek)



Şekil 4.5. α -gal A – Lizo-Gb3 (DBS) korelasyon grafiği (Kadın)

4.10. İstatistik Çalışmaları

Bu kısımda Lizo-Gb3 kuru kan ve plazma metodunun rutin çalışmalarının başlatılması ardından Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda 2017-2022 yılları arasında yapılan Fabry hastalığı taramalarına ait veriler değerlendirilmiştir.

Çalışma grubundaki erkeklerin yaş ortalaması $47,78 \pm 18,63$ kadınların yaş ortalaması $47,54 \pm 20,80$ olarak saptanmıştır.

Erkeklerde kuru kan örneklerinde ortalama α -gal A enzim aktivitesi değeri $4,7 \pm 2,85$ nmol/mL/s, kadınlarda $4,6 \pm 2,48$ nmol/mL/s olarak saptanmıştır. Erkeklerde kuru kan örneklerinde ortalama Lizo-Gb3 değeri $7,78 \pm 16,01$ ng/mL kadınlarda $1,71 \pm 2,33$ ng/mL olarak saptanmıştır. Erkeklerde lökosit örneklerinde ortalama α -gal A enzim aktivitesi değeri $80,93 \pm 35,36$ nmol/mg/s, kadınlarda $78,65 \pm 55,37$ nmol/mg/s olarak saptanmıştır.

Erkeklerde plazma örneklerinde ortalama lizo-Gb3 değeri $11,97 \pm 23,52$ ng/mL kadınlarda $2,07 \pm 2,74$ ng/mL olarak saptanmıştır. Çalışma grubu ile ilgili açıklamalar Çizelge 4.12.'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Çalışma grubu detayları

										Percentiles						
		Mean	Median	SD	Minimum	Maximum	IQR	Skewness	Kurtosis	5	10	25	50	75	90	95
Yaş	E	47,78	50,00	18,63	0,00	100,00	24,00	-0,49	0,07	12,00	23,00	37,00	50,00	61,00	70,00	76,00
	K	47,54	49,00	20,80	0,00	104,00	28,00	-0,44	-0,32	6,00	18,00	35,00	49,00	63,00	73,00	78,00
α -gal A(DBS)	E	4,70	4,10	2,85	0,10	70,40	2,60	4,12	43,71	1,90	2,30	3,00	4,10	5,60	7,70	9,40
	K	4,60	4,00	2,48	1,00	26,00	2,80	2,56	14,23	2,00	2,30	2,90	4,00	5,70	7,70	9,26
Lizo-Gb3, Kart	E	7,78	0,50	16,01	0,41	105,10	6,73	3,11	11,37	0,50	0,50	0,50	0,50	7,23	23,98	45,26
	K	1,71	0,50	2,33	0,50	20,80	1,70	3,18	16,02	0,50	0,50	0,50	0,50	2,20	4,87	6,92
α -gal A (lök)	E	80,93	76,10	35,36	0,10	313,70	39,43	1,12	3,44	35,16	44,00	58,60	76,10	98,03	124,70	145,70
	K	78,65	65,16	55,37	4,10	351,60	51,80	2,03	6,29	14,89	26,58	42,30	65,16	94,10	146,34	178,48
Lizo-Gb3 Plazma	E	11,97	0,80	23,52	0,50	95,63	5,63	2,16	3,53	0,80	0,80	0,80	0,80	6,43	48,51	80,30
	K	2,07	0,80	2,74	0,80	13,75	0,44	2,43	5,70	0,80	0,80	0,80	0,80	1,24	6,81	7,85

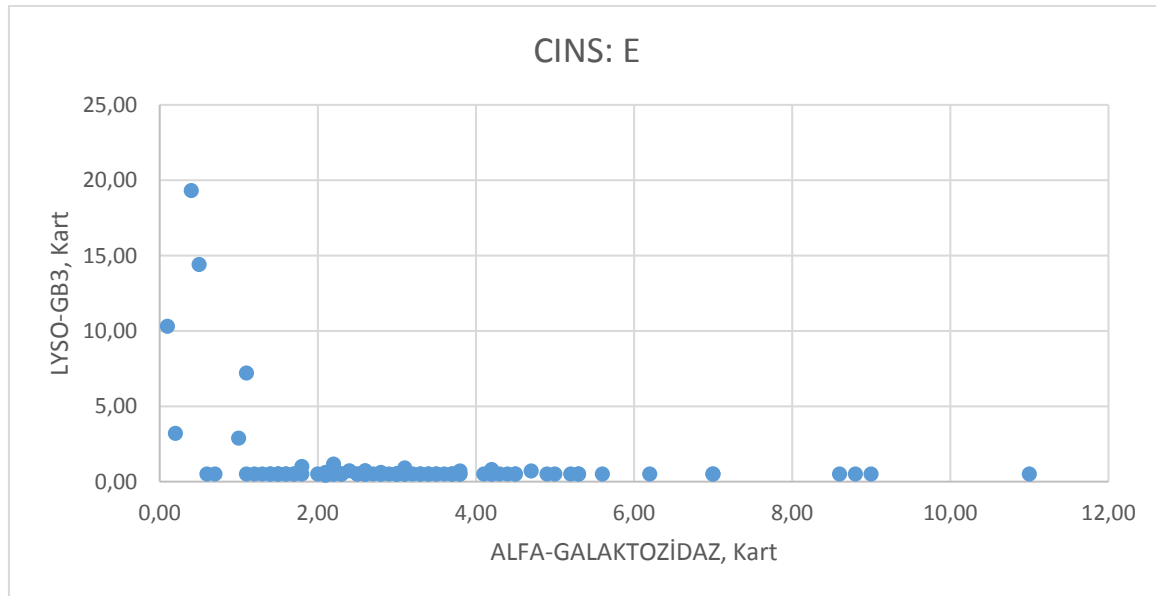
4.10.1 Lizo-Gb3 ve α -galaktozidaz A enzim aktivite testlerinin korelasyonu

Bu kısımda α -galaktozidaz A enzim aktivite değerleri ile Lizo-Gb3 miktarları arasındaki ilişkiler incelenmiştir. Kuru kan örneklerinde yapılan enzim ve Lizo-Gb3 analiz sonuçlarının değerlendirildiği korelasyon grafikleri Şekil 4.6 ve Şekil 4.7.'de verilmiştir. Lizo-

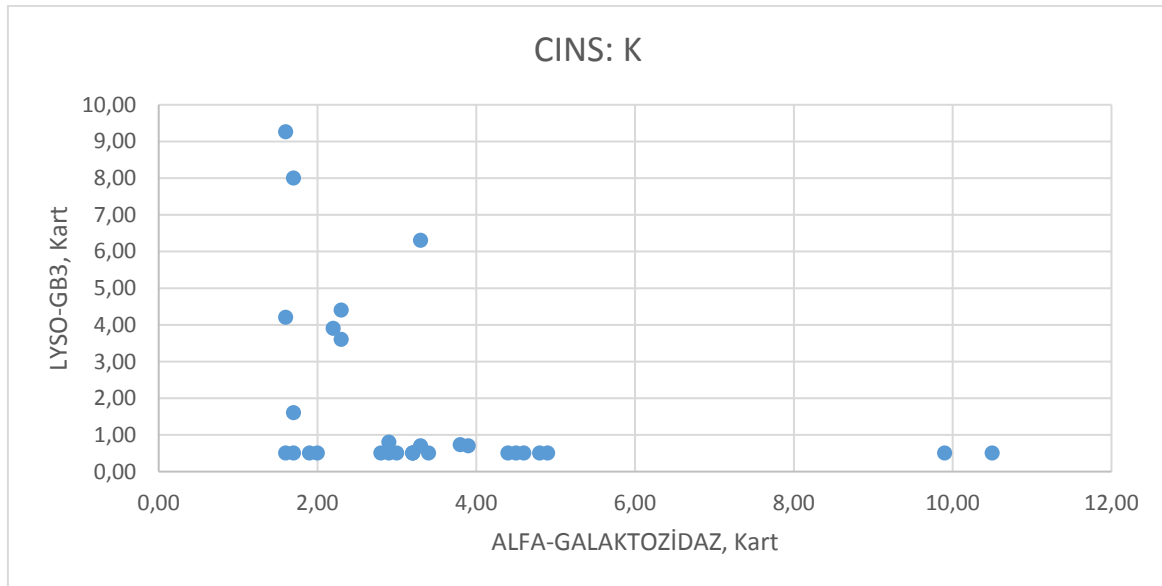
Kuru kan örneklerinde α -galaktozidaz A enzim analizi yapılan 23002 erkek hasta, lizo-Gb3 düzeyleri ölçülen 202 erkek hasta ve genetik olarak pozitif saptanan 98 hastanın verilerine ulaşılarak çalışmada kullanılmıştır. Erkek hastalarda kuru kan örnekleri ile yapılan analizlerde; α -galaktozidaz A (DBS) – Lizo-Gb3 (DBS) arasında negatif yönde anlamlı korelasyon ($r = -0,300$, $p < 0,01$) saptanmıştır.

Kuru kan örneklerinde α -galaktozidaz A enzim analizi yapılan 437 kadın hasta, lizo-Gb3 düzeyleri ölçülen 302 kadın hasta ve genetik olarak pozitif saptanan 31 hastanın verilerine ulaşılarak çalışmada kullanılmıştır. Lizo-Lizo-Kadın hastalarda kuru kan örnekleri ile yapılan analizlerde; α -galaktozidaz A (DBS) – Lizo-Gb3 (DBS) arasında negatif yönde anlamlı korelasyon ($r = -0,338$, $p < 0,1$) saptanmıştır.

Lizo-Lizo-



Şekil 4.6. Erkek Hasta Kuru Kan Örneklerinde α -gal A – Lizo-Gb3 korelasyon grafiği

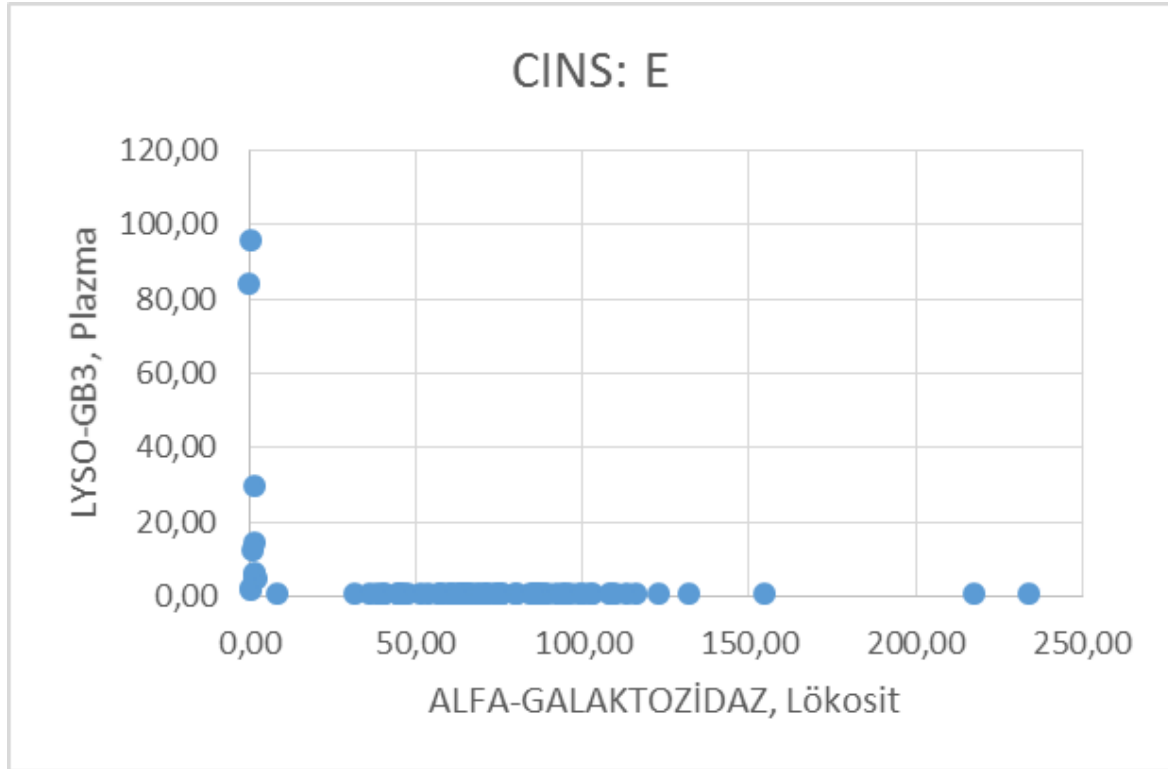


Şekil 4.7. Kadın Hasta Kuru Kan Örneklerinde α -gal A – Lizo-Gb3 korelasyon grafiği

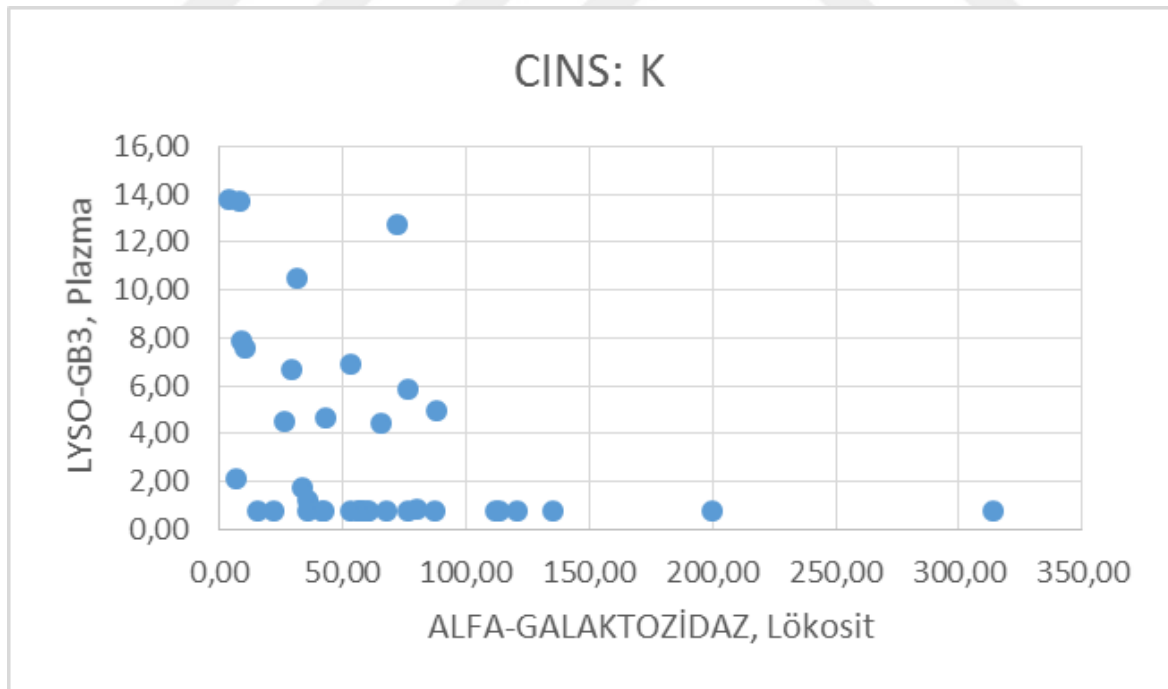
Lökosit α -galaktozidaz A enzim aktivite değerleri ile plazma Lizo-Gb3 miktarları arasındaki ilişkiler değerlendirilmiş ve Lizo-korelasyon grafikleri Şekil 4.8 ve Şekil 4.9.'da verilmiştir.

Lizo-Lökosit örneğinde enzim analizi yapılan 4215 erkek hasta, enzim analizi ve Lizo-Gb3 çalışılmış 152 ve genetik olarak pozitif saptanan 78 erkek hastanın verilerine ulaşılarak çalışmada kullanılmıştır. Erkek hastalarda lökosit ve plazma örnekleri ile yapılan analizlerde; α -galaktozidaz A – Lizo-Gb3 arasında negatif yönde anlamlı korelasyon ($r = -0,352$, $p < 0,01$) saptanmıştır.

Lökosit örneğinde enzim analizi yapılan 166 kadın hasta, enzim analizi ve Lizo-Gb3 çalışılmış 142 ve genetik olarak pozitif saptanan 38 kadın hastanın verilerine ulaşılarak çalışmada kullanılmıştır. kadın hastalarda lökosit ve plazma örnekleri ile yapılan analizlerde; α -galaktozidaz A – Lizo-Gb3 arasında negatif yönde anlamlı korelasyon ($r = -0,351$, $p < 0,05$) saptanmıştır. Lizo-Lizo-Lizo-Lizo-Lizo-



Şekil 4.8. Erkek Hastalarda α -gal A (lökosit) – Lizo-Gb3 (plazma) korelasyon grafiği



Şekil 4.9. Kadın Hastalarda α -gal A (lökosit) – Lizo-Gb3 (plazma) korelasyon grafiği

4.10.2. Lizo-Gb3 ve α -galaktozidaz A ROC eğrileri ve değerlendirmeleri

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 29595 erkek ve 14519 vakanın örnekleri çalışılmıştır.

Lizo-Gb3 (kuru kan)

Geliştirilen Lizo-Gb3 kuru kan analiz metodu ile çalışılan örneklerin sonuçlarının işlenmesi ile elde edilen veriler Çizelge 4.11, Çizelge 4.12. ve çizelge 4.13'te özetlenmiştir.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 29595 erkek vakanın örnekleri çalışılmıştır. Bunlardan 65 erkek hastada kuru kanda Lizo-Gb3 ve *GLA* gen analizi çalışılmış, 33 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 14519 kadın vakanın örnekleri çalışılmıştır. Bunlardan 192 kadın hastada kuru kanda lizo-Gb3 ve *GLA* gen analizi çalışılmış, 118 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Kuru kan Lizo-Gb3 erkek çalışmalarında AUC değeri 0,848 iken, kadınlar için 0,756 ($p<0,001$) saptanmıştır.

Kuru kan Lizo-Gb3 sınır değeri erkek vakalarda 0,66 ng/mL, kadın vakalarda Lizo-Gb3 sınır değeri 0,53 ng/L olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.11. Vaka işleme özeti Lizo-Gb3 (kuru kan)

Vaka işleme özeti		
Cins		N (Vaka sayısı)
E	Pozitif ^a	33
	Negatif	32
	Missing	29530
K	Pozitif ^a	118
	Negatif	74
	Missing	14327

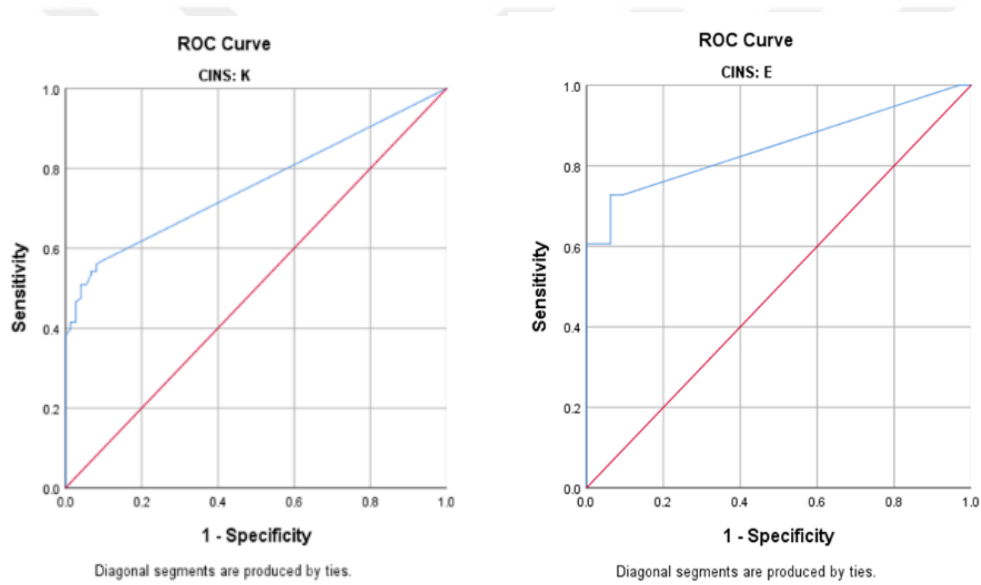
a.GLA mutant

Çizelge 4.12. Lizo-Gb3 kuru kan ROC eğrisi açıklamaları

Cins	Area	Std. Error ^b	Asymptotic Sig. ^c	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Alt sınır	Üst sınır
E	0.848	0.050	0.000	0.749	0.946
K	0.756	0.034	0.000	0.689	0.822
b. Parametrik olmayan varsayım altında c. Sıfır hipotezi: true area = 0.5					

Çizelge 4.13. ROC eğrisi koordinatları

	Positive if Less Than or Equal To ^b	Sensitivity	1 - Specificity	Specificity	Youden
E	0.655	0.727	0.063	0.938	1.665
K	0.530	0.559	0.081	0.919	1.478



Şekil 4.10. Lizo-Gb3 (kuru kan) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileri

Lizo-Gb3 (plazma)

Geliştirilen Lizo-Gb3 plazma analiz metodu ile çalışılan örneklerin, sonuçlarının işlenmesi ile elde edilen veriler Çizelge 4.14, Çizelge 4.15. ve çizelge 4.16'da özetlenmiştir.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 29595 erkek vakanın örnekleri çalışılmıştır. Bunlardan toplam 29 erkek hastada plazma Lizo-Gb3 ve *GLA* gen analizi çalışılmış, 17 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 14519 kadın vakanın örnekleri çalışılmıştır. Bunlardan 94 kadın hastada plazma Lizo-Gb3 ve *GLA* gen analizi çalışılmış, 44 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Plazma Lizo-Gb3 erkek çalışmalarında AUC değeri 0,853 iken kadınlar için 0,761 ($p<0,001$) saptanmıştır.

Plazma Lizo-Gb3 sınır değeri erkek vakalarda 1,28 nmol/mL, kadın vakalarda Lizo-Gb3 sınır değeri 0,84 nmol/L olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.14. Vaka işleme özeti Lizo-Gb3 (plazma)

Vaka işleme özeti		
Cins		N (Vaka sayısı)
E	Pozitif ^a	17
	Negatif	12
	Missing	29566
K	Pozitif ^a	44
	Negatif	50
	Missing	14425

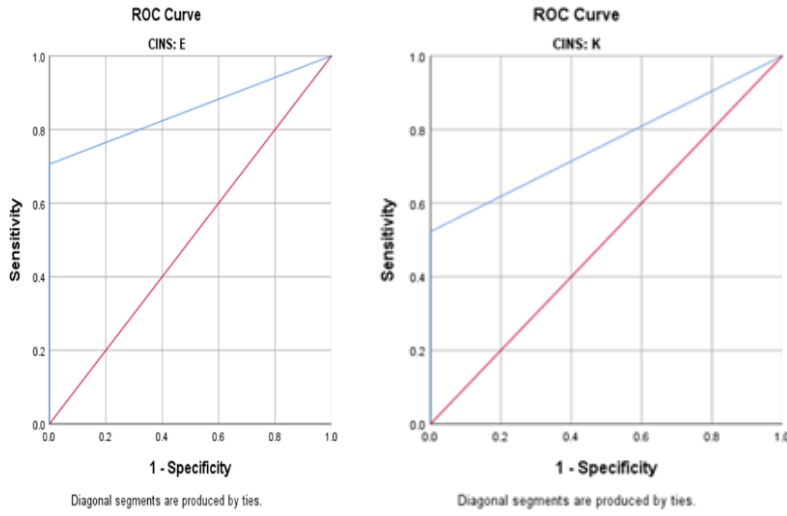
a.GLA mutant

Çizelge 4.15. Lizo- Gb3(plazma) ROC eğrisi açıklamalar

Cins	Area	Std. Error ^b	Asymptotic Sig. ^c	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Alt sınır	Üst sınır
E	0.853	0.073	0.001	0.710	0.996
K	0.761	0.052	0.000	0.659	0.864
	b. Parametrik olmayan varsayım altında c. Sıfır hipotezi: true area = 0.5				

Çizelge 4.16. ROC eğrisi koordinatları

	Positive if Less Than or Equal To ^b	Sensitivity	1 - Specificity	Specificity	Youden
E	1,275	0.706	0.000	1,00	1.706
K	0.835	0.523	0.000	1,00	1.523



Şekil 4.11. Lizo-Gb3 (plazma) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileri

Alfa-galaktozidaz A (kuru kan)

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 29595 erkek vakanın örnekleri çalışılmıştır. Toplam 2745 erkek hastanın kuru kan enzim değeri düşük bulunmuş ve genetik analize alınmıştır. Bunlardan 113 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 14519 kadın vakanın örnekleri çalışılmıştır. Toplam 127 kadın vakanın kuru kan enzim değeri düşük bulunmuş ve genetik analize alınmıştır. Bunlardan 27 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Alfa-galaktozidaz A erkek çalışmalarında AUC değeri 0,777 iken kadınlar için 0,721 ($p < 0,001$) saptanmıştır.

Kuru kan örneklerinde erkek vakalarda α -gal A enzim aktivitesi sınır değeri 1,45 nmol/mL/s, kadın vakalarda α -gal A enzim aktivitesi sınır değeri 2,35 nmol/mL/s olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.17. Vaka işleme özeti α -gal A (kuru kan)

Vaka işleme özeti		
Cins		N (Vaka sayısı)
E	Pozitif ^a	113
	Negatif	2632
	Missing	26850
K	Pozitif ^a	27
	Negatif	100
	Missing	14392

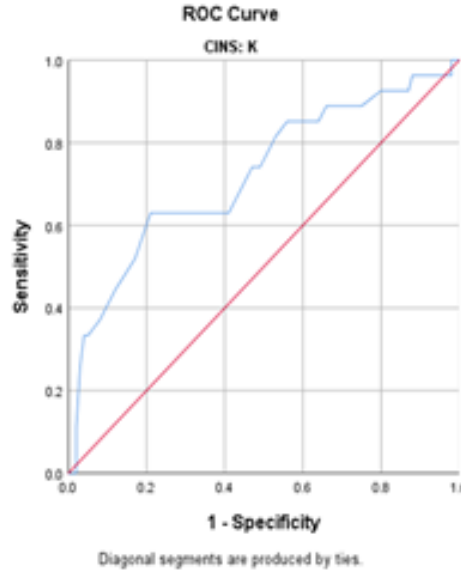
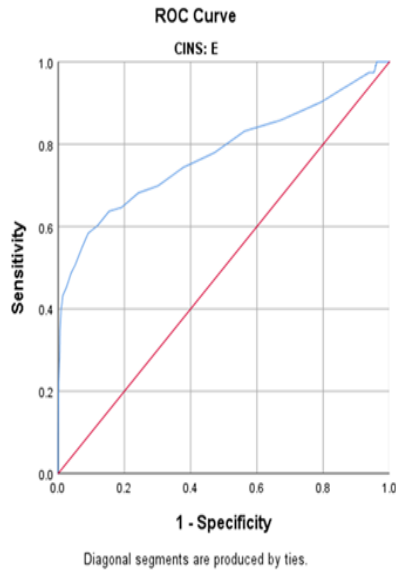
a.GLA mutant

Çizelge 4.18. α -gal A (kuru kan) ROC eğrisi açıklamaları

Cins	Area	Std. Error ^b	Asymptotic Sig. ^c	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Alt sınır	Üst sınır
E	0.777	0.029	0.000	0.72	0.83
K	0.721	0.060	0.000	0.60	0.84
b. Parametrik olmayan varsayım altında c. Sıfır hipotezi: true area = 0.5					

Çizelge 4.19. ROC eğrisi koordinatları

	Positive if Less Than or Equal To ^b	Sensitivity	1 - Specificity	Specificity	Youden
E	1,45	0.584	0.091	0,909	1,493
K	2,35	0.627	0.210	0,790	1,420

Şekil 4.12. α -galaktozidaz A (kuru kan) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğrileriAlfa-galaktozidaz A (lökosit)

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 29595 erkek vakanın örnekleri çalışılmıştır. Toplam 114 erkek hastanın lökosit enzim değeri düşük bulunmuş ve genetik analize alınmıştır. Bunlardan 40 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Fabry hastalığı tarama çalışmaları kapsamında toplam 14519 kadın vakanın örnekleri çalışılmıştır. Toplam 56 kadın hastanın lökosit enzim değeri düşük bulunmuş ve genetik analize alınmıştır. Bunlardan 26 hastada *GLA* geni mutasyonu saptanmıştır.

Alfa-galaktozidaz A erkek çalışmaları AUC değeri 0,84 iken kadınlar için 0,79 ($p < 0,001$) saptanmıştır.

Lökosit örneklerinde erkek vakalarda α -gal A enzim aktivitesi sınır değeri 8,75 nmol/mg/s, kadın vakalarda α -gal A enzim aktivitesi sınır değeri 54,9 nmol/mg/s olarak saptanmıştır.

Çizelge 4.20. Vaka işleme özeti α -gal A (lökosit)

Vaka işleme özeti		
Cins		N (Vaka sayısı)
E	Pozitif ^a	40
	Negatif	74
	Missing	29841
K	Pozitif ^a	26
	Negatif	30
	Missing	14463

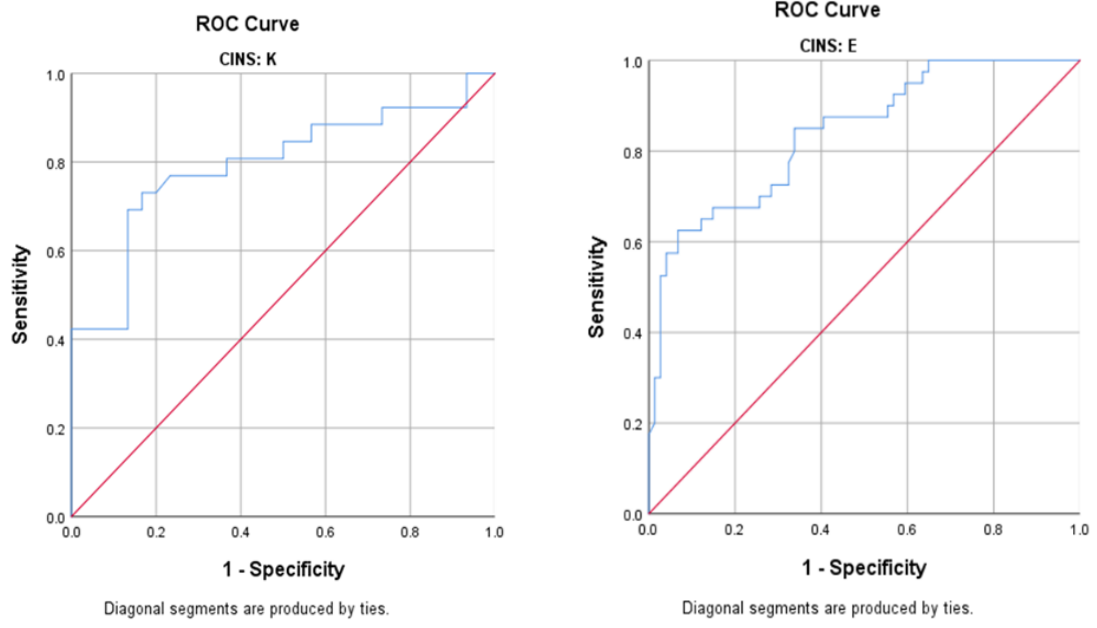
a. GLA mutant

Çizelge 4.21. α -gal A (lökosit) ROC eğrisi açıklamaları

Cins	Area	Std. Error ^b	Asymptotic Sig. ^c	Asymptotic 95% Confidence Interval	
				Alt sınır	Üst sınır
E	0.840	0.039	0.000	0.764	0.916
K	0.794	0.064	0.000	0.670	0.919
b. Parametrik olmayan varsayım altında c. Sıfır hipotezi: true area = 0.5					

Çizelge 4.22. ROC eğrisi koordinatları

	Positive if Less Than or Equal To	Sensitivity	1 - Specificity	Specificity	Youden
E	8,75	0.625	0.0676	0.932	1,557
K	54,85	0.731	0.1667	0,833	1,540



Şekil 4.13. α -Galaktozidaz A (lökosit) erkek (E) ve kadın (K) ROC eğri



5. TARTIŞMA

Fabry hastalığı (FH), α -galaktosidaz A (α -Gal A) eksikliği ile sonuçlanan *GLA* genindeki mutasyonların neden olduğu X'e bağlı kalıtsal bir hastalıktır. α -Gal A kusuru, FH'dan etkilenen hastaların lizozomlarında globotrioilseramid (Gb3) ve diğer ilgili glikosfingolipidlerin ilerleyici birikimine neden olur [123]. Klinik fenotipler, erken-başlangıçlı klasik ve hafif form geç-başlangıçlı varyantları içerir [5].

Klasik fenotipte, α -Gal A aktivitesi çok az olan veya hiç bulunmayan erkekler, akroparesteziler, anjiyokeratom, korneal opasiteler, hipohidro ve çocuklukta veya erken ergenlikte ortaya çıkan gastrointestinal semptomlar gibi hastalık belirtileri ve semptomları ile belirgin hücre içi Gb3 birikimi geliştirirler. İlerleyen yaşla birlikte, özellikle vasküler endotel lizozomlarında, kardiyomiyositlerde ve böbrek podositlerinde glikosfingolipidlerin ilerleyici birikimi, sol ventrikül hipertrofisi, hipertrofik kardiyomiyopati, aritmiler, böbrek yetmezliği ve serebrovasküler hastalık ile ilişkilidir. Bu durum tipik olarak yaşamın dördüncü veya beşinci on yılında erken ölümle sonuçlanır [65].

Aksine geç başlangıçlı fenotipli erkeklerde rezidüel α -Gal A aktivitesi vardır, mikrovasküler endotelial glikosfingolipid birikimi yoktur ve klasik erkek Fabry hastalarında görülen erken belirtilerden yoksundur. Yetişkinlikte kardiyak veya daha az sıklıkla böbrek hastalığı ile ortaya çıkarlar. Özellikle, hafif fenotipin kardiyak alt tipinde biyopsi ile kanıtlanmış bir Fabry nefropatisi de rapor edilmiştir [124]. Dişi heterozigotlar, esas olarak çarpık X-kromozomal inaktivasyonla ilişkili, asemptomatikten şiddetliye değişen değişken FH ekspresyonuna sahiptir [125].

Genellikle laboratuvar tanısında ilk adım, α -Gal A enzim aktivitesinin belirlenmesidir [88]. Bununla birlikte, heterozigot dişilerde enzim aktivitesinin normal aralıkta olabileceği bilinmektedir [3]. Son zamanlarda, Gb3'ün deasile türevi, globotrioilsfingozin (Lizo-Gb3), FH'nın ayırt edici özelliği olarak tanımlanmıştır [12]. Lizo-Gb3, yenidoğan ve yüksek riskli grup taraması [126, 127], tanı için [7, 128], fenotip belirlemede biyobelirteç olarak [8], hastalık şiddetini yansıtan bir araç olarak [129] ve terapötik izleme için [13, 19, 130] yararlı bir araç olarak gösterilmiştir.

Fabry hastalığı için enzim replasman tedavisi mevcut olduğundan, erken teşhis çok önemlidir. Bu sebeplerle Lizo-Gb3'ün Fabry Hastalığı tanı ve tedavi takibindeki önemi birçok çalışmanın konusu olmuş ve araştırılmıştır. Bu tez kapsamında Lizo-Gb3 miktar tayini için LC-MS/MS analiz metodu kurulması hedeflenip, çalışmalar yapılmıştır.

Yayınlanan diğer yöntemlerle (Çizelge 5.1.) karşılaştırıldığında, sunulan yöntem, kloroform gibi güvenli olmayan çözücülerden ve katı faz ekstraksiyonu (SPE) gibi pahalı ve işlem adımları fazla metotlardan kaçınırken, hazırlama adımlarını azaltarak hızlı numune işlemeyi yüksek hassasiyetle birleştirmektedir.

Çizelge 5.1. Yayınlanmış plazma Lizo-Gb3 metotları

Örnek hazırlama	Hazırlık basamak sayısı	Kalibrasyon aralığı(ng/mL)	Tespit limiti	%Geri Kazanım	Metotlar
Sıvı-sıvı ekstraksiyon+derivatizasyon	11	0-800	8	%90	[12]
Sıvı-sıvı ekstraksiyon	11	2-160	0,04*	%98	[17]
Sıvı-sıvı ekstraksiyon	11	0-120	0,3	-	[129]
Protein çöktürme	5	0-400	2,3	%100	[114]
Protein çöktürme	3	2-200	2	%98	[21]
Katı faz ekstraksiyonu	9	0,8-320	2	%64	[18]
Katı faz ekstraksiyonu	11	0-200	0,025	%50	[20]
Katı faz ekstraksiyonu	11	0,6-200	-	-	[19]
Protein çöktürme+CHCL ₃	4	0-800	0,05	-	[22]
Protein çöktürme+CHCL ₃	5	3-1600	4,0*	-	[23]
Kartuş+protein çöktürme	2	0,25-100	0,25	%95	[131])

*(LOD) tespit limiti

Plazma örneklerine glikolipid ekstraksiyonu için eş zamanlı protein çöktürme yöntemi ve metanol/aseton (1/1) karışımı kullanılmıştır [132]. Sadece protein çöktürme yöntemini kullanmak, sıvı-sıvı (LLE) ve katı faz (SPE) ekstraksiyon yöntemleri ile kıyaslandığında hem çok hızlı hem de oldukça ucuzdur. İşlem sadece 5 basamakta uygulanmıştır.

Ekstraksiyon sonrası supernatant UPLC sistemine enjekte edilmiştir. Lizo-Gb3 için m/z 786,5 > 282,3 [M+H]⁺, Gly-Lizo-Gb3 (IS) için m/z 843,5 > 264,3 [M+H]⁺ olarak saptanmıştır. IS (Gly-Lizo-Gb3) ve Lizo-Gb3 için alıkonma süreleri sırasıyla 2,50 dk ve 2,58 dk'dır. Kalibrasyon eğrisi Lizo-Gb3 standardının seyreltilmesi ve havuz plazma içerisine spike edilmesi ile hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0-100 nmol /L arasında ortalama R²= 0,996 (y= 307,21x) ile düzgün linearite göstermiştir [133]. Bu metot örnek hazırlama ve

kromatografik analiz süresi dahil edildiğinde toplamda 15 dakika gibi bir sürede uygulanabilmektedir.

Metodumuz tespit limiti (LOD) 0,10 ng/mL, ölçüm limiti (LOQ) 0,30 ng/mL olarak saptanmıştır, bu LOD/LOQ değerlerinin benzer yöntemleri kullanan çalışmalarda raporlanan değerlerin oldukça altında olduğu görülmektedir [21, 114].

Geri kazanım çalışmaları farklı seviyede spike plazma ile yapılmış ortalama değer > %95 olarak saptanmıştır. Benzer çalışmalarda elde edilen geri kazanım değerleri ile uyumlu bulunmuştur ve tarama ve tanı testleri için uygundur.

Sağlıklı bireylerin plazma (kontrol) örneklerinde yapılan çalışmada ortalama Lizo-Gb3 düzeylerinin ortalaması $0,12 \pm 0,12$ ng/mL olarak bulunmuştur. Bu değer LOD/LOQ değerinin altındadır.

Fabry tarama grubunda (2017-2022) erkeklerde Lizo-Gb3 plazma için ortalama değer $11,97 \pm 23,52$ ng/mL kadınlarda $2,07 \pm 2,74$ ng/mL olarak saptanmıştır.

Ayrıca Lizo-Gb3 plazma erkek için AUC hassasiyet %71, özgüllüğü %100 olarak 1,27 ng/mL eşik değeri Fabry hastaları ile sağlıklı bireylerden ayırmayı başarmıştır. Kadınlar için plazma eşik değeri (cut-off) 0,84 ng/mL olarak saptanmıştır. Bu eşik değerin (cut-off) hassasiyeti %52 ve özgüllüğü %100 olarak bulunmuştur. Hasta bireyleri sağlıklılardan ayırabilmektedir. Literatürde raporlanan eşik değerleri 0,4-2,3 ng/mL arasında değişmektedir [129, 114, 23, 22].

Kuru kan kalibrasyon eğrisi Lizo-Gb3 standardının seyreltilmesi ve havuz tam kan içerisine spike edilmesi ile hazırlanmıştır. Kalibrasyon eğrisi 0,5 -100 ng/mL arasında ortalama $R^2 = 0,997$ ($y = 16,369x$) ile düzgün linearite göstermiştir. Bu metot örnek hazırlama ve kromatografik analiz süresi dahil edildiğinde toplamda 10 dakika gibi bir sürede uygulanabilmektedir.

Metodumuz tespit limiti (LOD) 0,10 ng/mL, ölçüm limiti (LOQ) 0,30 ng/mL olarak saptanmıştır, bu LOD/LOQ değerlerinin benzer yöntemleri kullanan çalışmalarda raporlanan değerlerin oldukça altında olduğu görülmektedir [14, 15] .

Geri kazanım çalışmaları farklı seviyede (R1, R2) spike kuru kan ile yapılmış ortalama değer $> \%96,6$ olarak saptanmıştır. Benzer çalışmalarda geri kazanım verileri raporlanmamıştır. Elde edilen geri kazanım tarama ve tanı testleri için uygun bulunmuştur.

Sağlıklı bireylerin kuru kan (kontrol) örneklerinde yapılan çalışmada ortalama Lizo-Gb3 düzeylerinin ortalaması $0,48 \pm 0,31$ ng/mL ($\pm 1SD$: 0,17-0,79 ng/mL) olarak bulunmuştur [15].

Düzen Laboratuvarı'na 2018 yılı içerisinde Fabry hastalığı taraması için gelen erkek hastalardan genetiği ispatlanmış hemizigot vakalarda ($n=5$) ortalama Lizo-Gb3 değeri $71,6 \pm 44,6$ ng/mL olarak saptanmıştır. Bu değer benzer yayınlarda raporlanan verilerle uyumludur [8]. 2018 yılı içerisinde Fabry hastalığı taraması için gelen kadın hastalardan genetiği ispatlanmış heterozigot vakalarda ($n=5$) ortalama Lizo-Gb3 değeri $6,1 \pm 2,7$ ng/mL olarak saptanmıştır. Bu değer benzer yayınlarda raporlanan verilerle uyumludur [8].

Fabry tarama grubunda (2017- 2022) erkeklerin yaş ortalaması 47,78, kadınların yaş ortalaması 47,54 olarak saptanmıştır. Erkeklerde kuru kan örneklerinde ortalama α -gal A enzim aktivitesi değeri 4,7 nmol/mL/s, kadınlarda 4,6 nmol/mL/s olarak saptanmıştır. Erkeklerde lökosit örneklerinde ortalama α -gal A enzim aktivitesi değeri 80,93 nmol/mg/s, kadınlarda 78,65 nmol/mg/s olarak saptanmıştır.

Fabry tarama grubunda (2017-2022) erkeklerde Lizo-Gb3 kuru kan için ortalama değer 7,78 $\pm 16,01$ ng/mL kadınlarda $1,71 \pm 2,33$ ng/mL olarak saptanmıştır.

Erkek hastalarda α -gal A aktivitesi ROC eğrisi 0,78'lik eğri altında alanı (AUC) %58,4 hassasiyet, %90,9 özgüllük ve 1,45 nmol/mL/s eşik değeri ile vermiştir. Lizo-Gb3 ROC eğrisi 0,85'lik eğri altında alanı (AUC) %72,7 hassasiyet, %93,8 özgüllük ve 0,66 ng/mL eşik değeri ile vermiştir. Eşik değer 1,3 ng/mL (Referans aralık $<1,3$ ng/mL) için erkeklerde %60,6 hassasiyet, %100 özgüllük vermektedir. Delarosa ve diğerlerinin bulguları ile örtüşmekte hatta daha iki kat daha iyi seçicilik ve benzer oranda özgüllük sunmaktadır [134].

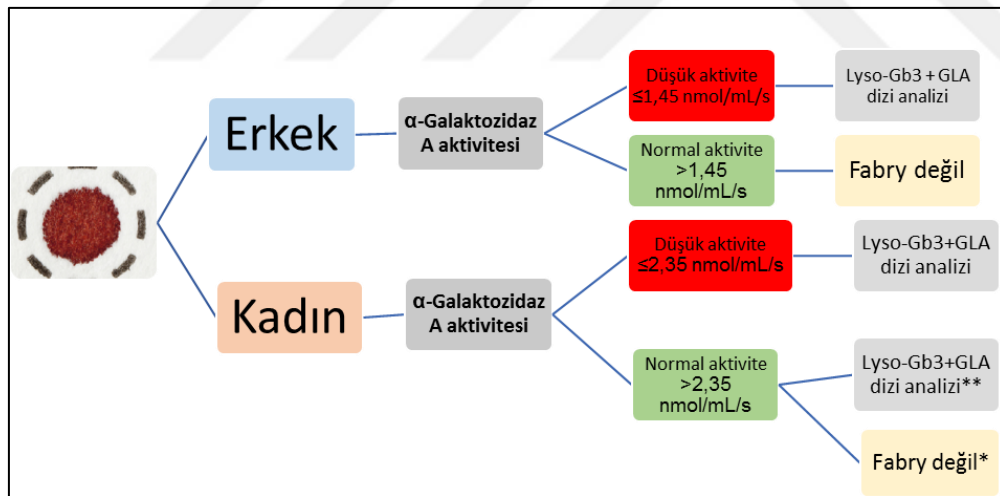
Kadın hastalarda α -gal A aktivitesi ROC eğrisi 0,72'lik eğri altında alanı (AUC) %62,9 hassasiyet, %79,0 özgüllük ve 2,35 nmol/mL/s eşik değeri ile vermiştir. Kadın hastalarda Lizo-Gb3 ROC eğrisi 0,76'lik eğri altında alanı (AUC) %55,9 hassasiyet, %91,9 özgüllük

ve 0,53 ng/mL eşik değeri ile vermiştir. Eşik değeri 1,3 ng/mL (Referans aralık < 1,3 ng/mL) için kadınlarda %34,7 hassasiyet, %100 özgüllük vermektedir. Delarosa ve diğerlerinin bulguları ile örtüşmekte hatta daha iyi seçicilik ve özgüllük sunmaktadır [134].

Kuru kan örnekleri ile yaptığımız enzim ve biyobelirteç sonuçlarının değerlendirilmesi neticesinde aşağıdaki tanı algoritması (Şekil 4.1.) oluşturulmuştur. Bu algoritma temel alınarak ek spot kuru kan örneği ile Fabry hastalığı taraması yapmak mümkün olabilir. ROC analizlerinden elde edilen α -Gal A ve lizo-Gb3 verileri kullanılarak oluşturulmuştur.

Kadın hastalar için enzim aktivitesi 2,35 nmol/mL/s üzerinde olduğu durumlarda;

- (**) Kuvvetli klinik şüphe varlığında veya ailede Fabry hastalığı öyküsü durumunda lizo-Gb3+GLA dizi analizi yapılmalıdır.
- (*) Klinik bulguları ve ailede Fabry hastalığı öyküsü olmadığında Fabry değil denebilir. Ancak yine de atlanan vakalar olabilir.



Şekil 5.1. Fabry hastalığı tanı algoritması



6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Fabry hastalığı en sık rastlanan lizozomal depo hastalıklarından biridir ve enzim replasman tedavisi (ERT) ile hastalığın önüne geçmek mümkündür. Lizo-Gb3 gibi bir hastalık belirtecinin miktarsal tayini, hastalığın teşhisi, hastalığın ilerleyişi ve terapötik etkinliğin takibi için büyük önem kazanmaktadır.

Kuşkusuz, pozitif biyokimyasal sonuçlar gösteren herhangi bir hastada FH'nı doğrulamak veya dışlamak için genetik analiz zorunludur. Biyokimyasal strateji, indeks hastası olan aileler için bağımsız bir test olarak kullanılamaz.

Öte yandan tarama maliyetlerinin de azaltılması çok önemli bir konu olmaktadır. Fabry hastalığı farklı birtakım hastalıklarla örtüşen belirtileri olan nadir bir hastalık olduğundan, tüm kadınları herhangi bir semptom veya belirti ile genetik teste tabi tutmak çok pahalı olmaktadır. Ancak α -gal A enzim aktivitesine dayalı primer tarama ve Lizo-Gb3 ölçümünün birlikte kullanımı, gen analizi yapılan hasta sayısını ve tarama maliyetini önemli ölçüde azaltır.

Ülkemizde Fabry hastalığının, tanısı, tedavisi ve takibi için her yıl çok yüksek rakamlar harcanmakta, tanıdaki zorluklar nedeniyle yurtdışına örnek gönderilmesi gerekebilmektedir.

Tez çalışmamızda Lizo-Gb3 miktar tayininde kullanılmak üzere, sağlam ve yüksek hassasiyette LC-MS/MS analiz metodu geliştirilmesi, geçerli kılınması ve biyolojik örneklerde uygulanabilirliğinin gösterilmesi hedeflenmiştir.

Yapılan analitik çalışmalarla Lizo-Gb3 miktar tayini için geliştirilen LC-MS/MS analiz metodunun farklı örnek türlerinde (plazma, kuru kan) uygulanabilir, yüksek numune sayıları için uygun ve yüksek hassiyette olduğu gösterilmiştir.

Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda 2017-2019 yılları arasında Fabry taramasına gelen, α -Gal A enzim aktivitesi çalışılmış örnekler metot geçerli kılma ve klinik uygulamalardaki performansının test edilmesi için kullanılmıştır. Elde edilen verilen metodun biyolojik örneklerde uygulanabilirliğini göstermiştir.

Yine Düzen Laboratuvarlar Grubu'nda 2017-2022 yılları arasında Fabry hastalığı taramaları kapsamında çalışılan örneklerin enzim, biyobelirteç verileri istatistiksel olarak işlenmiş ve yeni metot ile elde edilen verilerin güvenilirliği gösterilmiştir.

Geliştirilen metot ve tanı algoritmasının Fabry hastalığının teşhis ve tedavisine etkin bir katkı sunacağı, tanı konan her vaka için taşıyıcılık ve prenatal tanı konulabilmesi için imkan sağlayacağını düşünmekteyiz.

Tez çalışmamız vesilesiyle ülkemiz koşullarında yapılan biyokimyasal testler ve genetik analizlerle Fabry hastalığı tanısının etkin bir şekilde, hızlı konmasının, tüm maddi ve manevi kayıpları azaltmasının yanı sıra, tamamı yurtdışından alınan tıbbi malzemelerde tasarruf sağlayacağını düşünmekteyiz.

KAYNAKÇA

1. De Duve C, P. B. (1955). Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochemical Journal*, 60(4), 604.
2. Aerts JM, G. J.-K.-B. (2008). Elevated globotriaosylsphingosine is a hallmark of Fabry disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(8), 2812-2817.
3. Aerts JM, K. W.-B. (2011). Biomarkers in the diagnosis of lysosomal storage disorders: proteins, lipids, and inhibodies. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(3), 605-619.
4. Auray-Blais, C., Cyr, D., Ntwari, A., West, M. L., Cox-Brinkman, J., Bichet, D. G. and Drouin, R. (2008). Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(3), 331-340.
5. Ezgu, F, Alpsoy, E, Bahcebasi, B.Z, Kasapcopur, O., Palamar, M., Onay, H., Ozdemir B.H., Topcuoglu, M.A. and Tufekcioglu O. (2022) Expert opinion on the recognition, diagnosis and management of children and adults with Fabry disease: a multidisciplinary Turkey perspective. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 17(1), 90.
6. Amodio, F., Caiazza, M., Monda, E., Rubino, M., Capodicasa, L., Chiosi, F. and Limongelli, G. (2022). An Overview of Molecular Mechanisms in Fabry Disease. *Biomolecules*, 12(10), 1460.
7. Hollander, Z, Dai, DL, Putko, BN, Yogasundaram, H, Wilson-McManus, JE, Thompson, RB, Khan, A, West, ML, McManus, BM, Oudit, GY. (2015). Gender-specific plasma proteomic biomarkers in patients with Anderson-Fabry disease. *European Journal of Heart Failure*, 17(3), 291-300.
8. Lenders, M., Hennermann, J. B., Kurschat, C., Rolfs, A., Canaan-Kühl, S., Sommer, C., Üçeyler N, Kampmann C, Karabul N, Giese AK, Duning T, Stypmann J, Krämer J, Weidemann F, Brand SM, Wanner C, Brand E. (2016). Multicenter Female Fabry Study (MFFS) - clinical survey on current treatment of females with Fabry disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 11(1), 88.
9. Pinto, R., Caseiro, C., Lemos, M., Lopes, L., Fontes, A., Ribeiro, H., Pinto E, Silva E, Rocha S, Marcão A, Ribeiro I, Lacerda L, Ribeiro G, Amaral O, Sá Miranda MC. (2004). Prevalence of lysosomal storage diseases in Portugal. *European Journal of Human Genetics*, 12(2):87-92
10. Desnick, R. J., Allen, K. Y., Desnick, S. J., Raman, M. K., Bernlohr, R. W. and Krivit, W. (1973). Fabry's disease: enzymatic diagnosis of hemizygotes and heterozygotes: α -galactosidase activities in plasma, serum, urine, and leukocytes. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 81(2), 157-171.
11. Ananth, N. and Rao, J. K. (2009). Inborn Errors of Metabolism: review and data from a tertiary center . *Indian Journal of Clinical Biochemistry*, 24(3), 215-222.

12. Anderson, W. (1898). A case of angio-keratoma. *British Journal of Dermatology*, 10, 113–117.
13. Arends, M. W. (2016). Characterization of Classical and Nonclassical Fabry Disease: A Multicenter Study. *Journal of the American Society of Nephrology*, 28(5), 1631–1641.
14. Arends, M. W. (2017). Favourable effect of early versus late start of enzyme replacement therapy on plasma globotriaosylsphingosine levels in men with classical Fabry disease. *Mol Genet Metab*, 121(2), 157–161.
15. Atul Mehta, U. R. (2012). Fabry Disease. In *Lysosomal Storage Disorders: A Practical Guide* (s. 58–62). New York: John Wiley&Sons.
16. Auray-Blais C, N. A. (2010). How well does urinary lyso-Gb3 function as a biomarker in Fabry disease? *Clinica Chimica Acta*, 411(23–24), 1906–1914.
17. Auray-Blais, C. C.-B. (2008). Urinary globotriaosylceramide excretion correlates with the genotype in children and adults with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 93(3), 331–340.
18. Auray-Blais, C. L.-M.-W. (2020). High-Risk Screening for Fabry Disease in a Canadian Cohort of Chronic Kidney Disease Patients. *Clinica Chimica Acta*, 501, 234–240.
19. Auray-Blais, C. M. (2009). Proposed high-risk screening protocol for Fabry disease in patients with renal and vascular disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 32(2), 303–308.
20. Banerjee, S. &. (2012). Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *International Journal of Analytical Chemistry*, 3(2), 1–40.
21. Beirão, I. C. (2017). Biomarkers and Imaging Findings of Anderson–Fabry Disease—What We Know Now. *Diseases*, 5(2), 1–17.
22. Bligh, E. G. (1959). A Rapid Method Of Total Lipid Extraction And Purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911–917.
23. Boscaro, F. P. (2002). Rapid quantitation of globotriaosylceramide in human plasma and urine: a potential application for monitoring enzyme replacement therapy in Anderson-Fabry disease. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 16(16), 1507–1514.
24. Boutin, C. A.-B. (2012). Novel Gb3 Isoforms Detected in Urine of Fabry Disease Patients: A Metabolomic Study. *Current Medicinal Chemistry*, 19(19), 3241–3252.
25. Boutin, M. A.-B. (2014). Multiplex tandem mass spectrometry analysis of novel plasma lyso-Gb₃-related analogues in Fabry disease. *Analytical Chemistry*, 86(7), 3476–3483.

26. Boutin, M. G.-B. (2012). LC–MS/MS analysis of plasma lyso-Gb3 in Fabry disease. *Clinica Chimica Acta*, 414, 273-280.
27. Boyd RE, L. G. (2013). Pharmacological Chaperones as Therapeutics for Lysosomal Storage Diseases. *Journal of Medicinal Chemistry*, 56(7), 2705–2725.
28. Brady RO, T. J. (1973). Replacement therapy for inherited enzyme deficiency. *The New England Journal of Medicine*, 289(1), 9–14.
29. Brady, R. O. (2010). Fabry Disease – An Overview. In *Fabry Disease* (s. 19-37). London New York: Springer.
30. Byeon, S., Kim, J., Lee, J., & Moon, M. (2016). Variations in plasma and urinary lipids in response to enzyme replacement therapy for Fabry disease patients by nanoflow UPLC-ESI-MS/MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(9), 2265-2274.
31. Chace, D. T. (2003). Use of tandem mass spectrometry for multianalyte screening of dried blood specimens from newborns. *Clinical Chemistry*, 49(11), 179-1817.
32. Chamoles, N. .. (2001). Fabry disease: enzymatic diagnosis in dried blood spots on filter paper. *Clinica Chimica Acta*., 308(1-2), 195–196.
33. Chien, Y.-H. B.-C.-L. (2012). Lyso-globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3) levels in neonates and adults with the Fabry disease later-onset GLA IVS4+919G>A mutation. *Journal of Inherited Metabolic Dis*, 36(5), 881-885.
34. Chloe Miu Mak, H.-C. H.-W.-W. (2013). Inborn errors of metabolism and expanded newborn screening review and update. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Science*, 50(6), 142-162.
35. Clarke, J. T. (2007). Narrative Review: Fabry Disease. *Physiology In Medicine: A Series Of Articles Linking Medicine with Science*, 146(6), 425-433.
36. CLSI. (2014). *Liquid chromatography-mass spectrometry methods; Approved Guideline, CLSI document 62-A* (Cilt 34). Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standarts Institute.
37. Coant N, S. W. (2017). Ceramides, roles in sphingolipid metabolism and in health and disease. *Advances in Biological Regulation*, 63, 122-131.
38. Cooper, G. M. (2019). Lysosomes: Lysosomal acid hydrolases. *The Cell A Molecular Approach* (s. Protein Sorting and Transport: The Endoplasmic Reticulum, Golgi Apparatus and Lysosomes). içinde Sunderland, MA: Oxford University Press U.S.A.
39. Gault, L. O. (2010). An overview of sphingolipid metabolism: from synthesis to breakdown. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 688, 1-23.
40. Dajnoki A, F. G. (2010). Newborn screening for Fabry disease by measuring GLA activity using tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta*, 411(19), 1428-1431.

41. Delarosa-Rodríguez R, S. J.-M.-M.-A. (2021). Accuracy diagnosis improvement of Fabry disease from dried blood spots: Enzyme activity, lyso-Gb3 accumulation and GLA gene sequencing. . *Clinical Genetics*, 99(6), 761-771.
42. Desnick R, I. C. (2001). α -galactosidase A deficiency: Fabry disease. In: Scriver. B. A. Scriver CR (Dü.) içinde, *The metabolic and molecular bases of inherited disease* (s. 3733–74). New York: McGraw-Hill,.
43. Desnick RJ, S. R. (1972). Correction of enzymatic deficiencies by renal transplantation: Fabry's disease. *Surgery*, 72(2), 203-211.
44. Doheny, D. S. (2018). Fabry Disease: prevalence of affected males and heterozygotes with pathogenicGLA mutations identified by screening renal, cardiac and stroke clinics, 1995–2017. *Journal of Medical Genetics*, 55(4), 261-268.
45. Dominique P Germain, P. A. (2002). Patients affected with Fabry disease have an increased incidence of progressive hearing loss and sudden deafness: an investigation of twenty-two hemizygous male patients. *BMC Medical Genetics*, 3(1), 1-10.
46. Donald Waters, D. A. (2018). Global birth prevalence and mortality from inborn errors of metabolism: a systematic analysis of the evidence. *Journal of Global Health*, 8(2).
47. Dr. İrfan Şencan, D. B. (2017). *Kalitsal Metabolizma Hastalıkları Kontrol Programı 2018-2021*. Ankara: Sağlık Bakanlığı Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü.
48. Echevarria L, B. K. (2015). X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clinical Genetics*, 89 (1), 44-54.
49. Echevarria, L. B. (2016). X-chromosome inactivation in female patients with Fabry disease. *Clin Genet* , 89(1), 44–54.
50. El-Hattab, A. W. (2015). Inborn Errors of Metabolism. *Clinics in Perinatology*, 42(2), 413-439.
51. Eng CM, F. J. (2007). Fabry disease: baseline medical characteristics of a cohort of 1765 males and females in the Fabry Registry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 30(2), 184-192.
52. Eng CM, G. N. (2001). Safety and efficacy of recombinant human α -galactosidase A replacement therapy in Fabry's disease. *New England Journal of Medicine*, 345(1), 9-16.
53. Ezgü, F. (2016). Inborn Errors of Metabolism. *Advances in Clinical Chemistry* (Cilt Volume 73, s. 195-250). içinde Elsevier Inc.
54. Fabry, J. (1898). Ein Eintrag zur Kenntniss der Purpura haemorrhagica nodularis (Purpura papulosa haemorrhagica Hebrae). *Arch. Derm. Syphil. (Berlin)*, 43(1), 187-200.
55. Ferreira, C. R. (2019). A proposed nosology of inborn errors of metabolism. *Genetics in Medicine*, 21(1), 102-106.

56. Frances M. Platt, A. d. (2018). Lysosomal storage diseases. *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1-25.
57. Gal, A. D. (2011). Toward a consensus in the laboratory diagnostics of Fabry disease-recommendations of a European expert group. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 34(2), 509-514.
58. Gelb, M. H. (2006). Direct multiplex assay of enzymes in dried blood spots by tandem mass spectrometry for the newborn screening of lysosomal storage disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 29((2-3)), 397-404.
59. Germain, D. P. (2010). Fabry disease. *Germain Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(30), 2-49.
60. Glish, G. a. (2003). The basics of mass spectrometry in the twenty-first century. *Nature Reviews Drug Discovery*, 2(2), 140-150.
61. Gold, H. M. (2012). Quantification of Globotriaosylsphingosine in Plasma and Urine of Fabry Patients by Stable Isotope Ultraperformance Liquid Chromatograph. *Clinical Chemistry* , 59(3), 547-556.
62. Hamers, M. e. (1977). Characterization of α -galactosidase isoenzymes in normal and Fabry human-Chinese hamster somatic cell hybrids. *Human Genetics*, 36(3), 289-297.
63. Heike Schulze, K. S. (2013). Sphingolipids and lysosomal pathologies. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1841(5), 799–810.
64. Hers, H. (1963). α -Glucosidase deficiency in generalized glycogen-storage disease (Pompe's disease). *Biochemical Journal*, 86(1), 11.
65. Hoffmann, B. S. (2007). Gastrointestinal symptoms in 342 patients with Fabry disease: prevalence and response to enzyme replacement therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol.*, 5(12), 1447–1453.
66. Hornbostel, H. a. (1953). Excision of skin in diagnosis of Fabry's angiokeratoma with cardio-vasorenal syndrome as phosphatide storage disease. *Klinische Wochenschrift*, 31((3-4)), 68-69.
67. Hwu WL, C. Y. (2009). Newborn screening for Fabry disease in Taiwan reveals a high incidence of the later-onset GLA mutation c.936+919G > A (IVS4+919G > A). *Hum Mutat* , 30, 1397-1405.
68. Irene Simonetta, A. T. (2020). Biomarkers in Anderson–Fabry Disease. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(8080), 1-18.
69. Irfan Vardarli, C. R. (2020). Diagnosis and Screening of Patients with Fabry Disease. *Therapeutics and Clinical Risk Management*, 16, 551–558.
70. Jean-Marie Saudubray, M. À.-C. (2018). Inborn Errors of Metabolism Overview Pathophysiology, Manifestations, Evaluation, and Management. *Pediatric Clinics of North America*, 65(2), 179-208.

71. Johannes Kramer, F. W. (2018). Biomarkers for Diagnosing and Staging of Fabry Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 25(13), 1530-1537.
72. Johannes Krämer, F. W. (2018). Biomarkers for Diagnosing and Staging of Fabry Disease. *Current Medicinal Chemistry*, 25, 1-8.
73. Johnson, B. M. (2013). Analysis of Lyso-Globotriaosylsphingosine in Dried Blood Spots. *Annals of Laboratory Medicine*, , 33(4), 274-278.
74. K D MacDermot, A. H. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *Journal of Medical Genetics*, 38(11), 769–807.
75. Kint, J. (1970). Fabry's disease: alpha-galactosidase deficiency . *Science*, 167(3922), 1268-1269.
76. Kolter, H. F. (2012). Lipidomics of Glycosphingolipids. *Metabolites* , 2, 134-164.
77. Kolter, T. (2011). A view on sphingolipids and disease. *Chemistry and Physics of Lipids* , 164, 590-606.
78. Krüger, R. T. (2012). Quantification of the Fabry marker lysoGb3 in human plasma by tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, , 883(884), 128–135.
79. Kumari, A. (2018). Lipid Storage Disorders/Sphingolipidoses. *Sweet Biochemistry: Remembering Structures, Cycles, and Pathways by Mnemonics* (s. 63-73). içinde Elsevier Inc.
80. Ledvinová, M. H. (2010). Biochemistry of Fabry Disease. *Fabry Disease* (s. 81-104). içinde Springer Science+Business Media B.V. .
81. Lee K, J. X.-M. (2003). A biochemical and pharmacological comparison of enzyme replacement therapies for the glycolipid storage disorder Fabry disease. *Glycobiology*, 13(4), 305-313.
82. Lenders M, B. E. (2018). Effects of enzyme replacement therapy and antidrug antibodies in patients with Fabry disease. *Journal of the American Society of Nephrology*. , 29(9), 2265–2278.
83. Li, Y. (2004). Direct multiplex assay of lysosomal enzymes in dried blood spots for newborn screening. *Clinical Chemistry*, 50(10), 1785-1796.
84. Linthorst GE, D. R. (2004). Misdiagnosis of Fabry disease: importance of biochemical confirmation of clinical or pathological suspicion. *British Journal of Dermatology*, 150(3), 575-577.
85. Linthorst, G. E. (2009). Screening for Fabry disease in high-risk populations: a systematic review . *Journal of Medical Genetics*, 47(4), 217–222.
86. MacDermot KD, H. A. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 60 obligate carrier females. *Journal of Medical Genetics*, 38, 769-775.

87. MacDermot KD, H. A. (2001). Anderson-Fabry disease: clinical manifestations and impact of disease in a cohort of 98 hemizygous males. *Journal of Medical Genetics*, 38, 750-760.
88. Malte Lenders, E. B. (2021). Fabry Disease: The Current Treatment Landscape. *Drugs*, 81(6), 635–645.
89. Maruyama, H. M. (2019). Effectiveness of plasma lyso-Gb3 as a biomarker for selecting high-risk patients with Fabry disease from multispecialty clinics for genetic analysis. *Genetical Medical*, 21(1), 44-52.
90. Mayes, J. S. (1981). Differential assay for lysosomal alpha-galactosidases in human tissues and its application to Fabry's disease. *Clinica Chimica Acta*, 112(2), 247-251.
91. McCafferty EH, S. L. (2019). Migalastat: A review in Fabry disease. *Drugs*, 79(5), 543–554.
92. Mehta A, B. M. (2010). Fabry disease: a review of current management strategies. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103(9), 641–659.
93. Mehta A, R. R.-P. (2004). Fabry disease defined: baseline clinical manifestations of 366 patients in the Fabry Outcome Survey. *European Journal of Clinical Investigation*, 34(3), 236-242.
94. Mehta, A. B. (2010). Fabry disease: a review of current management strategies. *QJM: An International Journal of Medicine*, 103(9), 641–659.
95. Meikle, P. e. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Jama*, 281(3), 249-254.
96. Michaud, M. C. (2020). When and How to Diagnose Fabry Disease in Clinical Praticce. *The American Journal of Medical Sciences*, 360(6), 641-649.
97. Morrone, M. F. (2011). Lysosomal storage disorders: Molecular basis and laboratory testing. *Human Genomics*, 5(3), 156-169.
98. Muna Abed Rabbo, Y. K. (2021). Sphingolipid lysosomal storage diseases: from bench to bedside. *Lipids in Health and Disease*, 20(44), 1-29.
99. Niemann M, R. A. (2014). Gene mutations versus clinically relevant phenotypes: lyso-Gb3 Fabry disease. *Circ Cardiovasc Genet*, 7(1), 8–16.
100. Nowak, A. M. (2017). Plasma LysoGb3: A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. A useful biomarker for the diagnosis and treatment of Fabry disease heterozygotes. *Molecular Genetics and Metabolism*, 120(1), 57-61.
101. Nowak, A. M. (2017). Correlation of Lyso-Gb3 levels in dried blood spots and sera from patients with classic and Later-Onset Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 121(4), 320-324.

102. Nowak, A. M. (2018). Genotype, phenotype and disease severity reflected by serum LysoGb3 levels in patients with Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 123(2), 148-153.
103. Oliveira JP, N. A.-e.-C.-T.-S. (2020). 2019Fabry disease caused by the GLA p.Phe113Leu (p.F113L) variant: Natural history in males. *European Journal of Medical Genetics*, 63(2), 103703.
104. Ortiz A, G. D. (2018). Fabry disease revisited: management and treatment recommendations for adult patients. *Molecular Genetics and Metabolism*. 2018;123:416–427., 123(4), 416-427.
105. Ozkara HA, T. M. (2004). Sphingolipidoses in Turkey. *Brain Dev* , 26, 363-366.
106. Perrone, A. M. (2021). A Rapid and Simple UHPLC-MS/MS Method for Quantification of Plasma Globotriaosylsphingosine (lyso-Gb3). *Molecules* , 26(7356), 1-10.
107. Polo, G. B.-V. (2017). Diagnosis of sphingolipidoses: a new simultaneous measurement of lysosphingolipids by LC-MS/MS. *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine*, 55(3), 1-12.
108. Pompen, A. M. (1947). Angiokeratoma corporis diffusum (universale) Fabry as a sign of an unknown internal disease; two autopsy reports. *Acta Medica Scandinavica*, 128(3), 234-255.
109. Pool, C. P. (1991). *Chromatography Today*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers B.V.
110. Poorthuis BJ, W. R. (1999). The frequency of lysosomal storage diseases in The Netherlands. *Human Genetic*, 105, 151-156.
111. Poupetová, H. L. (2010). The birth prevalence of lysosomal storage disorders in the Czech Republic comparison with data in different populations. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(4), 387–396.
112. R.O. Brady, A. G. (1967). Enzymatic defect in Fabry's disease. Ceramidetrihexosidase deficiency. *New England Journal of Medicine*, 276(21), 1163–1167.
113. Roddy, T. P. (2004). Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry Quantification of Globotriaosylceramide in Plasma for Long-Term Monitoring of Fabry Patients Treated with Enzyme Replacement Therapy. *Clinical Chemistry*, 51(1), 237-240.
114. Rombach, S. M. (2010). Plasma globotriaosylsphingosine: Diagnostic value and relation to clinical manifestations of Fabry disease. *Biochimica et Biophys*, 1802(9), 741–748.
115. Sakuraba, H. T. (2017). Plasma lyso-Gb3: a biomarker for monitoring fabry patients during enzyme replacement therapy. *Clinical and Experimental Nephrology*, 22(4), 843-849.

116. Schiffmann, R. e. (2001). Enzyme replacement therapy in Fabry disease: a randomized controlled trial. *Jama* , 285(21), 2743-2749.
117. Schiffmann, R. F. (2016). Is it Fabry disease? . *Genetics in Medicine*, 18(12), 1181–1185.
118. Sodi A, I. A. (2006). Ophthalmological manifestations of Fabry disease. *Fabry Disease: Perspectives from 5 Years of FOS*. (s. 1-24). içinde Oxford: Oxford PharmaGenesis.
119. Sophie Degroote, J. W. (2004). The cell biology of glycosphingolipids. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 15(4), 375–387.
120. Spada M, P. S. (2006). High incidence of later-onset fabry disease revealed by newborn screening. *American Journal of Human Genetics*, 79, 31-40.
121. Spada, M. e. (2006). High incidence of later-onset Fabry disease revealed by newborn screening. *The American Journal of Human Genetics*, 79(1), 31-40.
122. Sueoka, H. I. (2015). Nano-LC-MS/MS for Quantification of LysoGb3 and Its Analogues Reveals a Useful Biomarker for Fabry Disease. *PLOS ONE*, 10(5), 1-13.
123. Talbot, A. N. (2017). A simple method for quantification of plasma globotriaosylsphingosine: Utility for Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, , 122(1-2), 121–125.
124. Togawa T, K. T. (2010). Plasma globotriaosylsphingosine as a biomarker of Fabry disease. *Molecular Genetics and Metabolism*, 100(3), 257-261.
125. Togawa, T. K. (2010). Tissue and plasma globotriaosylsphingosine could be a biomarker for assessing enzyme replacement therapy for Fabry disease. *Biochemical and Biophysical*, 399(4), 716-720.
126. Tol L van der, v. d. (2014). A systematic review on screening for Fabry disease: prevalence of individuals with genetic variants of unknown significance. *Journal of Medical Genetics*, 51(1), 1-9.
127. Van Breemen, M., Rombach, S., & Dekker, N. (2011). Reduction of elevated plasma globotriaosylsphingosine in patients with Fabry disease following enzyme replacement therapy. *Biochim, Biophys Acta.*, 1812, 70-76.
128. Veen, S. J. (2020). Developments in the treatment of Fabry disease. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 1-14.
129. Wang, R. Y. (2007). Heterozygous Fabry women are not just carriers, but have a significant burden of disease and impaired quality of life. *Genetics in Medicine*, 9(1), 34-45.
130. Welford RWD, M. A. (2018). Glucosylceramide synthase inhibition with lucerastat lowers globotriaosylceramide and lysosome staining in cultured fibroblasts from Fabry patients with different mutation types. *Human Molecular Genetics*, 27(19), 3392-3403.

131. Wozniak MA, K. S. (2010). Frequency of Unrecognized Fabry Disease Among Young European-American and African-American Men With First Ischemic Stroke. *Stroke*. 2010;41:78., 41(1), 78-81.
132. Yoon, H.-R. (2015). A Fast Determination of Globotriaosylsphingosine in Plasma for Screening Fabry Disease Using UPLC-ESI-MS/MS. *Mass Spectrometry Letters*, 6(4), 116-119.
133. Young, E. M. (2007). Is globotriaosylceramide a useful biomarker in Fabry disease? *Acta Paediatrica*, 94(447), 51-54.
134. Yuri A Zarate, R. J. (2008). Fabry's disease. *The Lancet*, 372, 1427-1435.
135. Zhang, X. K.-L. (2008). Multiplex Enzyme Assay Screening of Dried Blood Spots for Lysosomal Storage Disorders by Using Tandem Mass Spectrometry. *Clinical Chemistry*, 54(10), 1725-1728.



EKLER

EK-1. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu Raporu



T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
Tıp Fakültesi Dekanlığı



Sayı : 24074710-604.01.01- 18
Konu : Toplantı Kararları

16.12.2019

Sayın *Prof. Dr. Yeşim Özkan*
Proje Yürütücüsü

Fakültemiz Klinik Araştırmalar Etik Kurulu'nun 09 Aralık 2019 tarihinde yapmış olduğu toplantı kararları ekte sunulmuştur.
Bilgilerinizi rica ederim.

Prof. Dr. İnaner AKAR
Dekan a.
Dekan Yardımcısı



Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurul Birimi 06500 Beşevler/ANKARA
Tel:0 312 202 69 58 Faks:0 312 202 46 73
e-Posta :tip@gazi.edu.tr İnternet Adresi :www.med.gazi.edu.tr

Bilgi için :Şerife Çiçek
Bilgisayar İşletmeni

**GAZİ ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR KARAR FORMU**

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUNUN ADI	Gazi Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRES	Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlık Binası 06500 Beşevler/Ankara
	TELEFON	0312 202 69 58
	FAKS	0312 202 46 73
	E-POSTA	tipetikkurul@gazi.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Alfa-Galaktozidaz Eksikliği Tanı ve Takibinde Kullanılmak Üzere Lizoglobotriasiloseramid (lyso-Gb3) Düzeyi Ölçümü için Likit Kromatografisi-Ardışık Kütle Spktrometrisi (LC-MS/MS) Metodu Geliştirilmesi ve Validasyonu			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI /UZMANLIK ALANI/ BULUNDUĞU MERKEZ	Eczacılık Fakültesi / G.Ü.			
	ARAŞTIRMANIN TÜRÜ	Kan, idrar, doku, radyolojik görüntü gibi biyokimya, mikrobiyoloji, patoloji ve radyoloji koleksiyon materyalleriyle veya rutin muayene tetkik tahlil ve tedavi işlemleri sırasında (önceden) elde edilmiş materyallerle yapılacak araştırmalar-Doktora tezi			
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐	ÇOK MERKEZLİ ☒	ULUSAL ☒	ULUSLARARASI ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Ver.No	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	28.11.2019	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	AYDINLATILMIŞ ONAM FORMU	28.11.2019	1	Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	Belge Adı			Açıklama
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ		☒	
	BIYOLOJİK MATERYAL TRANSFER FORMU		☐	
	DİĞER		☐	

KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 256	Toplantı tarihi: 09.12.2019
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler araştırmanın gerekçe amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup, araştırma dosyasında belirtilen merkez/merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına, G.Ü. Klinik Araştırmalar Etik Kurulu üyelerinin oybirliği ile karar verilmiştir.	

KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılım *		İmza
Prof. Dr. D. Berrin GÜNAYDIN BAŞKAN	Anest. ve Rea. AD. Farmako. Bİ.Dr.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Prof. Dr. Gülten TAÇOY BAŞKAN YARD.	Kardiyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	
Doç. Dr. İlyas OKUR BİLDİRİMDEN SORUMLU ÜYE	Çocuk Sağ. ve Hast AD Ç.Met. Bes BD	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐	

Prof. Dr. Nevzat YÜKSEL ÜYE	Psikiyatri AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Nesrin ÇOBANOĞLU ÜYE	Tıp Tarihi ve Etik AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Mehmet Ali ERGÜN ÜYE	Tıbbi Genetik AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☒
Prof. Dr. Nuriye ÖZDEMİR ÜYE	İç Hast. AD. Tıbbi Onkoloji BD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Prof. Dr. Aylin SEPİCİ DİNÇEL ÜYE	Tıbbi Biyokimya A.D	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Hasan BOSTANCI ÜYE	Genel Cerrahi AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Murat UÇAR ÜYE	Radyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Doç. Dr. Gökçe S. ÖZTÜRK FİNCAN ÜYE	Tıbbi Farmakoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Dr.Öğr.Üyesi A.Meltem SEVGİLİ ÜYE	Tıbbi Fizyoloji AD.	G.Ü.T.F	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Uzm Dr. Emine AVCI ÜYE	Halk Sağlığı	Halk Sağlığı Genel Müd.	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
Araş.Gör.Dr. Fahri Erdem KAŞAK ÜYE	Hukukçu	Hacı Bayram Veli Üniv.	E ☒	K ☐	E ☐	H ☒	E ☒	H ☐
İ. Nakhet EKŞİ ÜYE	Sivil Temsilci	-	E ☐	K ☒	E ☐	H ☒	E ☐	H ☐

* :Araştırma ile İlişki

** :Toplantıda Bulunma

ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Soyadı, adı : Elif ERKAN KURDOĞLU
Uyruğu : TC

Eğitim

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Doktora	Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü	2011-Devam ediyor
Yüksek Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü	2003
Lisans	Hacettepe Üniversitesi, Kimya Fakültesi	2000
Lise	Rize Anadolu Lisesi	1995

İş Deneyimi

Yıl	Yer	Görev
2000-devam ediyor	Düzen Laboratuvarlar Grubu	Birim Teknik Sorumlusu

Yabancı Dil

İngilizce, Almanca

Yayınlar

Bilimsel Katkıları

Coşgun, E., Öktem, M., Kurdoğlu, E.E. and Laleli, Y. (2015, 11-15 May). *Determination of the reference intervals for the plasma and urine amino acids*. The 8th Conference of Eastern Mediterranean Region International Biometric Society. Nevşehir.

Ekremoğlu, M., Kurdoğlu, E.E., Öktem, R.M. (2013). *Development and validation of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry assay for plasma Busulfan levels*. 38.Federation of European Biochemical Societies Congress St. Petersburg.

Oktem, M., Kurdoglu, E.E., Laleli, Y.R. (2014). *Is vitamin D toxicity really “Rare”?* .22nd International Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine (IFCC Worldlab) İstanbul.





GAZİLİ OLMAK AYRICALIKTIR..