

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLE PLAZMA
OKSİSTEROLLERİNİN ÖLÇÜMÜ VE ANALİTİK
VALİDASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra Zülfa HARMANCIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

2017-ANTALYA

T.C.

AKDENİZ ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

**KÜTLE SPEKTROMETRİK YÖNTEMLE PLAZMA
OKSİSTEROLLERİNİN ÖLÇÜMÜ VE ANALİTİK
VALİDASYONUNUN DEĞERLENDİRİLMESİ**

Büşra Zülfa HARMANCIK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

DANIŞMAN

Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ

Bu tez Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından TYL-2016-1490 proje numarası ile desteklenmiştir.

“Kaynakça gösterilerek tezinden yararlanılabilir”

2017-ANTALYA

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne;

Bu çalışma jürimiz tarafından Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Tıbbi Biyokimya Programında Yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir. 11/10/2017

Tez Danışmanı : Prof.Dr. S. Halide AKBAŞ
Akdeniz Üniversitesi

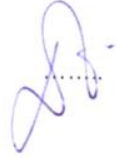
Üye : Prof.Dr. Gültekin YÜCEL
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Prof.Dr. Mutay ASLAN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Erdoğan SOYUÇEN
Akdeniz Üniversitesi

Üye : Doç.Dr. Ayşenur YEĞİN
Antalya Eğitim ve Araştırma Hastanesi

İmza

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunca belirlenen yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu'nun/...../..... tarih ve/..... sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Narin DERİN

Enstitü Müdürü

ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı beyan ederim.

Öğrencinin

Adı SOYADI

Büşra Zülfa HARMANCIK

İmza

Tez Danışmanı

Ad SOYAD

Prof. Dr. S. Halide AKBAŞ

İmza

TEŐEKKÜR

Tez çalışmam boyunca bilgilerini, desteğini ve yardımını esirgemeyen başta değerli danışman hocam Prof.Dr. S. Halide AKBAŞ'a,

Akademik hayatımın ilk basamaklarını atarken tecrübelerinden faydalanma imkanı sağlayan çok kıymetli Prof.Dr. Cevat YAZICI hocama,

Tez çalışmam boyunca bana yardımcı olan ekip arkadaşından daha çok bir dost olan Bilge Karatoy ERDEM'e,

Çalışmam sürecimde yanımda olan ve örnek toplamamda gönüllü olarak yardımcı olan tüm çalışma arkadaşlarıma ve hastane çalışanlarına,

Eğitim hayatım boyunca beni destekleyen, bana inanan ve güvenen, çok kıymetli babam İsmail Harmancık, annem Nilgün Harmancık, ablam Tuba Açıkça ve aramıza yeni katılan yeğenime,

En içten dileklerle teŐekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: Oksisteroller, kolesterolün çok sayıda kimyasal tepkime yoluyla oksidasyona uğramasıyla oluşan ve birçok fizyolojik süreçte ve çeşitli dejeneratif ve metabolik hastalıklarda, lipid metabolizması bozukluklarında önemli rol oynayan türevlerdir. Bu çalışmada, önemli oksisteroller arasında yer alan kolestan-3 β -5 α -6 β (C-triol) ve 7-ketokolesterol (7-KC)'ün ölçümünde çeşitli ekstraksiyon ve türevlendirme basamakları denenerek, sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometrik (LC-MS/MS) yöntemin analitik validasyonunun yapılması amaçlanmıştır.

Yöntem: Optimizasyon çalışmaları, MRM (multiple-reaction monitoring) modunda, pozitif elektrosprey iyonizasyon (ESI) ile LC-MS/MS (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu 8040 Corporation, Japan) cihazında yapılmıştır. 25 sağlıklı bireyden elde edilen plazmalarda dimetilglisin (DMG) türevlendirmesiyle C-Triol ve 7-KC multipleks (çoklu) ölçümünün analitik validasyonu değerlendirilmiştir. Bu amaçla; linearite, doğruluk analizi, tekrarlanabilirlik, saptama ve ölçüm limitleri (LLOD ve LLOQ), geri kazanım, carry-over analizi gibi parametreler çalışılarak sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirilmiştir.

Bulgular: Analiz süresi her iki parametre için 10 dakika (dk) olarak belirlendi (C-Triol: 3.1 dk, 7-KC: 7.26 dk). C-triol ve 7-KC için oluşturulan lineer regresyon eğrisinde; C-triol r^2 : 0.999, 7-KC için r^2 : 0.994 olarak bulundu. Doğruluk analizinde en az iki düzeyde hazırlanmış olan kalite kontrol örneklerinde C-triol ve 7-KC konsantrasyonları \pm %20'lik aralıkta bulundu. 25 kişiden oluşan kontrol grubunda C-triol analizi güvenilir bir şekilde gerçekleştirilerek plazmadaki konsantrasyonları hesaplandı. (min: 15.7, max: 38.61; ortalama \pm SD: 25.61 \pm 9.2 ng/mL). 7-KC ölçümlerinde standart sapmalar çok yüksek bulunduğu için plazma matriksinin interferans oluşturduğu veya plazmada 7-KC stabilitesinin bozulduğu düşünüldü.

Sonuç: Bu çalışma ile oksisterol ölçümü, duyarlı ve spesifik bir yöntem ile laboratuvarımızda denenmiş ve kullanıma hazır hale gelmiştir. 7-KC ise plazmadaki analit stabilitesini yansıtmada yararlı olabilecek bir parametredir.

Anahtar Kelimeler: Oksisteroller, Kolestan-3 β -5 α -6 β , 7-Ketokolesterol, LC-MS/MS

ABSTRACT

Objective: Oxysterols are derivatives of cholesterol which are formed by oxidation through numerous chemical reactions and play an important role in many physiological processes and in various degenerative and metabolic diseases, lipid metabolism disorders. In this study, analytical validation of liquid chromatography-tandem mass spectrometric (LC-MS / MS) method was evaluated by using various extraction and derivation steps in the measurement of cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol (C-Triol) and 7-ketocholesterol (7-KC) which are important oxysterols.

Method: Optimization studies were performed in LC-MS/MS (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu 8040 Corporation, Japan) with positive electrospray ionization (ESI) in multiple-reaction monitoring (MRM) mode. The analytical validation of C-Triol and 7-KC multiplex measurements with dimethylglycine (DMG) derivatization was evaluated in plasma from 25 healthy individuals. For this purpose; linearity, accuracy, repeatability, detection and quantitation limits (LLOD and LLOQ), recovery and carry-over analysis were studied and the results were evaluated statistically.

Results: The time of the analysis was 10 minutes (min) for both parameters (C-Triol: 3.2 min, 7-KC: 7.4 min). The values of r-squared (r^2) were found for C-triol as 0,999, for 7-KC as 0,994 in generated calibration curves. Concentrations of C-triol and 7-KC were within $\pm 20\%$ in quality control samples prepared at least two levels for accuracy analysis. Plasma C-triol levels were determined in a control group of 25 individuals (min: 15.7, max: 38.61; mean \pm SD: 25.61 \pm 9.2 ng/mL). The standard deviations were found high for 7-KC measurements, it was considered that the plasma matrix interfered or the 7-KC stability in the plasma deteriorated.

Conclusion: In this study, oxysterol measurement has been developed and ready for use in our laboratory with a sensitive and specific method. 7-KC was considered to be a useful parameter to reflect the stability of the analyte in the plasma.

Key words: Oxysterols, Cholestan-3 β ,5 α ,6 β -triol, 7-ketocholesterol, LC-MS/MS

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	ii
İÇİNDEKİLER	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	v
TABLolar DİZİNİ	vi
SİMGELER ve KISALTMALAR	vii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Kolesterol	3
2.2. Kolesterol Oksidasyon Ürünü Olan Oksisteroller	4
2.2.1. Oksisterollerin Oluşumu	4
2.2.2. Oksisterollerin Oluşum Mekanizması	4
2.2.3. Oksisterollerin Metabolizması Ve Eliminasyonu	6
2.2.4. Oksisterollerin Bulunduğu Yerler Ve Konsantrasyonları	7
2.2.5. Oksisterollerin Biyolojik Rolü	7
2.2.6. Oksisterollerin Hücre Membranı Üzerine Etkileri	8
2.3. Hastalıklarda Oksisterollerin Yeri	9
2.3.1. Ateroskleroz Ve İnflamasyon	9
2.3.2. Nörodejeneratif Hastalıklar	10
2.3.3. Kanser	12
2.3.4. Diğer Hastalıklarda Oksisteroller	13
2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları	13
2.4.1. Niemann Pick-Tip C Hastalığı	13
2.4.2. Klinik İnceleme	14
2.4.3. Niemann Pick-Tip C Tanısında Kullanılan Yöntemler	15
2.5. Kolesterol-3 β -5 α -6 β (C-triol) ve 7-Ketokolesterol(7-KC) Analizi	19
2.6. Kütle Spektrometresi	21
2.6.1. Sıvı kromatografi-Ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS)	22
2.7. Analitik Validasyon	24
2.7.1. Doğrusallık (Linearite)	24

2.7.2. Doğruluk	25
2.7.3. Tekrarlanabilirlik	25
2.7.4. Saptama (Limit of Detection-LOD) ve Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation-LOQ)	25
2.7.5. Geri Kazanım	27
2.7.6. İnterferans	27
2.7.7. Cary-over Etkisi	27
3. GEREÇ VE YÖNTEM	29
3.1. Laboratuvar Çalışmaları	29
3.1.1. Sağlıklı Kontroller	29
3.1.2. Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeleri	29
3.2. Ayrıntılı Yöntem	31
3.2.1. Kolest-3 β -5 α -6 β ve 7-Ketokolesterolün Analizi	31
3.3. Analitik Validasyon Çalışmaları	40
3.4. İstatistiksel Analiz	40
4. BULGULAR	41
4.1. Analitik Validasyon Parametreleri	41
4.1.1. Doğrusallık (Linearite)	41
4.1.2. Doğruluk Analizi	44
4.1.3. Tekrarlanabilirlik	45
4.1.4. Saptama ve Ölçüm Limitlerinin Belirlenmesi	47
4.1.5. Geri Kazanım	48
4.2. Türevlendirme Solüsyonu-2 İle Yapılan Analizler	48
4.3. Sağlıklı Kontrollerde Plazma Kolest-3 β -5 α -6 β Düzeyleri	49
4.4. Sağlıklı Kontrollerde Plazma 7-Ketokolesterol Düzeyleri	50
5.TARTIŞMA	51
6.SONUÇ VE ÖNERİ	56
KAYNAKLAR	58
ÖZGEÇMİŞ	73

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. Kolesterol molekülü (Kırmızı bölgelerden okside olarak oksisteroller oluşmaktadır.)	3
Şekil 2.2. Yaşa bağlı meydana gelen hastalıklarda oksisterollerin hedef organları	9
Şekil 2.3. NPC1/NPC2 genlerinin yapısı ve lizozom içindeki aktiviteleri	14
Şekil 2.4. Kolestan-3 β -5 α -6 β (C-triol)'ün molekül yapısı	18
Şekil 2.5. 7-Ketokolesterol'ün molekül yapısı	18
Şekil 2.6. Dimetilglisin ester molekül yapısı	20
Şekil 3.1. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol Kalibrasyon eğrisi	33
Şekil 3.2. 200 ng/mL Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol standart piki	33
Şekil 3.3. 7-Ketokolesterol kalibrasyon eğrisi	34
Şekil 3.4. 200 ng/mL 7-Ketokolesterol standart piki	34
Şekil 3.5. LC zamana göre pompa akış diagramı	40
Şekil 4.1. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol lineer regresyon eğrisi	42
Şekil 4.2. 7-Ketokolesterol için lineer regresyon eğrisi	42
Şekil 4.3. Sağlıklı kontrollerde plazma kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol düzeylerinin cinsiyete göre dağılımı	50

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 2.1. NP-C teşhis yöntemlerinden Filipin ve kolesterol esterifikasyon testlerin karşılaştırılması	16
Tablo 3.1. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterolün öncü ve ürün iyonlarının kütle geçişi	39
Tablo 4.1. Sağlıklı kontrollerin cinsiyet (n, %) ve yaşları (ortalama \pm SD)	41
Tablo 4.2. Standartların nominal ve ölçülen konsantrasyonları	43
Tablo 4.3. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için ardışık standart ölçümler	43
Tablo 4.4. 7-KC için için için ardışık standart ölçümler	44
Tablo 4.5. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için doğruluk değerlendirmesi	44
Tablo 4.6. 7-Ketokolesterol için doğruluk değerlendirmesi	45
Tablo 4.7. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için retansiyon zamanları ve konsantrasyonlara ait tekrarlanabilirlik sonuçları	46
Tablo 4.8. 7-Ketokolesterol için retansiyon zamanları ve konsantrasyonlara ait tekrarlanabilirlik sonuçları	46
Tablo 4.9. C-triol ve 7-KC için hesaplan LOD ve LOQ değerleri	48
Tablo 4.10. Türevlendirme solüsyonu-2 ile C-Triol ölçümü	49
Tablo 4.11. Türevlendirme solüsyonu-2 ile 7-KC ölçümü	49

SİMGELER ve KISALTMALAR

22-OHC	:	22-Hidroksikolesterol
24S-OHC	:	24S-Hidroksikolesterol
25-OHC	:	25-Hidroksikolesterol
27-OHC	:	27-Hidroksikolesterol
7-KC	:	7-Ketokolesterol
7-OHC	:	7-Hidroksikolesterol
7α-OHC	:	7 α -Hidroksikolesterol
7β-OHC	:	7 β -Hidroksikolesterol
ABC	:	ATP Bağlayıcı Kasetler
ACAT	:	Açıl Transferazlar
AH	:	Alzheimer Hastalığı
Apo-E	:	Apolipoprotein-E
CH25H	:	25-Hidroksilaz
C-Triol	:	Kolestan-3 β -5 α -6 β
CYP46A1	:	24S-Hidroksilaz
DMAP	:	Dimetilaminopridin
DMG	:	Dimetilglisin ester
EDC	:	Etilendiklorid
EDTA	:	Etilen Diamid Tetra Asetikasit
ER	:	Endoplazmik retikulum

ESI	: Elektro Sprey İyonizasyon
GC/MS	: Gaz kromatografisi-kütle spektrometresi
HDL	: Yüksek yoğunluklu lipoprotein
HMG CoA	: Hidroksimetilglutaril CoA
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
KBB	: Kan Beyin Bariyeri
LC-APCI-MS/MS	: Atmosferik basınçlı-Sıvı kromatografisi-Ardışık kütle spektrometresi
LCAT	: Açıl Transferazlar
LC-MS/MS	: Sıvı kromatografisi-Ardışık kütle spektrometresi
LC-MS	: Kütle Spektrometresi
LDH	: Lizozomal Depo Hastalıkları
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein
LOD	: Limit of Detection-Sapma Tayin Limit
LOQ	: Limit of Quantitation-Ölçüm Limiti
LXR	: Karaciğer X Reseptörü
m/z	: kütle/yük
MALDI	: Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu
MRM	: Multiple Reaction Monitoring
MSS	: Merkezi Sinir Sistemi
NP-A	: Niemann Pick Tip-A Hastalığı

NP-B	:	Niemann Pick Tip-B Hastalığı
NP-C	:	Niemann Pick Tip-C Hastalığı
NPC1	:	Niemann Pick C1 proteini
NPC2	:	Niemann Pick C2 proteini
PH	:	Parkinson Hastalığı
ROS	:	Reaktif oksijen türleri
S/N	:	Sinyal/gürültü
SD	:	Standart Sapma
Tau	:	Tabulin associated unit protein
TNF-α	:	Tümör Nekroz Faktörü

1.GİRİŞ

Hücre membranında bulunan kolesterol molekülleri büyük oranda oksidasyona duyarlıdır. Kolesterol oksidasyon ürünü olan oksisteroller, yapısındaki bir veya daha fazla oksijen içeren grupların varlığı ile kolesterolden farklıdır (Guardiola ve ark., 2002). Kolesterolün kimyasal yapısındaki bu farklılık, oksisterollerin biyofiziksel özelliklerinde önemli değişiklikler oluşturur ve bu değişiklikler lipid çift tabakalarının özelliklerini ve dinamiklerini önemli ölçüde düzenlemektedir (Kulig ve ark., 2015; Massey, 2006; Massey ve Pownall, 2006; Olkkonen ve Hynynen, 2009). Kolesterol-lipid homeostazi, çoğunlukla enzimatik olarak oluşan oksisteroller ile modüle edilir.

Oksisterollerin ana biyolojik kaynağı, çok sayıda kimyasal tepkime yoluyla oksidasyona uğrayarak türevlerine dönüştürülen kolesterol molekülüdür. Bu reaksiyonlar enzimatik veya non-enzimatik olarak gerçekleşmektedir. Non-enzimatik kolesterol oksidasyonu çoğunlukla steran halka sisteminin oksitlendiği ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır.

Oksisteroller, kolesterol kaynaklı olduğundan bu moleküllerin üretimi bir dereceye kadar kolesterol varlığına bağlıdır. Fizyolojik koşullar altında, oksisterollerin konsantrasyonunun kolesterol konsantrasyonundan yaklaşık 3 kat daha düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir (Brown ve Jessup, 2009). Normal koşullarda düşük düzeyde bulunan oksisterol konsantrasyonu, bazı patofizyolojik durumlarda çok yüksek düzeylerde (toplam sterol konsantrasyonu > %20) görülebilmektedir. Bu durumlarda oksisterollerin membran özellikleri üzerindeki etkisi önemli olmaktadır (Brown ve Jessup, 1999; Javitt, 2008; Olkkonen ve Lehto, 2004).

Oksisteroller, sadece kolesterol-lipid metabolizmasının ve membran yapısının modülasyonu gibi fizyolojik süreçlerde değil, çeşitli kronik ve dejeneratif hastalıklarda, metabolik hastalıklarda, hücresel fonksiyon bozukluklarında, lipid metabolizması bozukluklarında da önemli rol oynamaktadır. Zor tanı konulan bir lizozomal depo hastalığı olan Niemann Pick-Tip C'de de, Kolestan-3 β -5 α -6 β (C-triol) ve 7-Ketokolesterol (7-KC) gibi oksisterollerin artış gösterdiği bildirilmektedir.

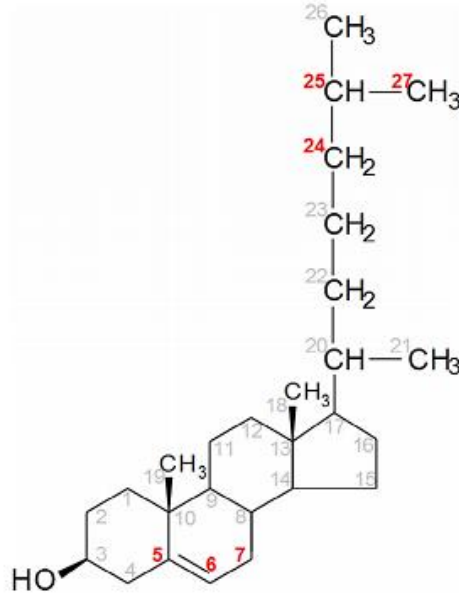
Plazma oksisterollerinin (C-triol ve 7-KC) analizi için, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS), sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ile yapılan kütle spektrometresi gibi yöntemler önerilmektedir (Jiang ve ark., 2011). Oksisterol analizinde en önemli basamak türevlendirme işlemi olduğundan Girard hidrazon, pikolinil ester ve dimetilglisin ester (DMG) ile farklı türevlendirme aşamaları denenmiştir. Oksisterol analizleri ile ilgili güvenilir, kolay ve etkin bir yöntem arayışı halen devam etmekte olup elektrosprey iyonizasyonlu (ESI) kütle spektrometrik ölçümler denenmektedir (Boenzi ve ark., 2014; Klinke ve ark., 2015; Pajares ve ark., 2015; Romanello ve ark., 2016 ; Kannenberg ve rak., 2016). Literatürde mevcut yöntemlerle ilgili analitik validasyon çalışmaları sınırlıdır. Yöntemlerin performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için yöntemle ilgili çeşitli parametrelerin belirlenip incelenmesi ve yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması gerekmektedir.

Bu çalışmada, lizozomal depo hastalıklarından Niemann Pick Tip-C'nin tanısında çok önemli bir rol üstlenen C-triol ve 7-KC oksisterollerinin ölçümünde çeşitli ekstraksiyon ve türevlendirme basamakları denenerek, elektrosprey iyonizasyonlu (ESI) LC-MS/MS yönteminin analitik validasyonunun yapılması ve rutin metabolizma laboratuvarına uyarlanması amaçlanmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1. Kolesterol

İnsan ve hayvan dokularında bulunan temel sterol kolesteroldür. Kolesterol, amfipatik bir yapıya sahiptir ve polar bir baş ile apolar bir hidrokarbon gövdeden oluşmaktadır (Şekil 2.1). Kolesterolün 3.karbonundaki –OH grubu ve 5-6. karbonları arasındaki çift bağ kolesterolün reaktif kısımlarını oluşturmaktadır. Ayrıca 10. ve 13. karbonlarında –CH₃ gurubu, 17. karbonunda ise 8 karbonlu yan zincir bulunur. Kolesterolün 3. karbonundaki –OH grubu esansiyel yağ asitleri ile esterleşebilmektedir.



Şekil 2.1. Kolesterol molekülü (Kırmızı bölgelerden okside olarak oksisteroller oluşmaktadır.)

Membranların başlıca bileşeni olan kolesterol organizmada; karaciğer, safra, bağırsak mukozası, beyin, sinir dokusu, deri, testis, over ve plazmada bulunmaktadır. Kolesterolün suda çok az çözünürlüğe sahiptir. Plazmada total kolesterolün ¾'ü ester, ¼'ü serbest şekilde bulunmaktadır. Membranlarda bu yapıların çoğu serbest kolesterol halinde bulunmaktadır. Plazmadaki kolesterolün büyük kısmı lipoproteinler aracılığı ile taşınmaktadır (Gürdöl, 2014).

İnsan vücudundaki kolesterol temel olarak asetat molekülünden oluşur. İki mol asetil CoA birleşerek asetoasetil CoA 'yı, ardından da 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA'yı

meydana getirir. Oluşan 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA'dan hidrosimetilglutaril CoA (HMG CoA) redüktaz enzimi aracılığı ile kolesterolün öncül maddesi olan mevalonat meydana gelir. Burada 3-hidroksi-3-metilglutaril CoA'dan mevalonat oluşumu hız kısıtlayıcı basamak ve bu reaksiyonu katalizleyen enzim HMG CoA redüktaz da hız kısıtlayıcı enzim olarak görev yapmaktadır (Andrew ve ark., 1997, Ray ve Cannon, 2005).

2.2.Kolesterol Oksidasyon Ürünü Olan Oksisteroller

Oksisteroller; kolesterolün, halka sisteminde veya yan zincirinde bir veya birden fazla konumda ilave oksijen işlevselliğine sahip olduğu geniş bir molekül ailesidir (Björkhem ve ark., 1999).

Oksisteroller, kolesterolden farklı olarak ilave oksijen varlığından dolayı lipofilik zarlara kolayca geçerler. Oksisteroller, safra asidinin ve steroid hormon biyosentez basamaklarının kilit unsurlarıdır (Smondryrev ve Berwitz, 2001).

Kolesterol-lipid homeostazı, çoğunlukla enzimatik olarak oluşan oksisteroller ile modüle edilir. Oksisteroller; sadece kolesterol-lipid metabolizmasının modülasyonu gibi fizyolojik süreçlerde değil, aynı zamanda patolojik süreçlerde de önemli rol oynamaktadır (Fakheri ve Javitt, 2012).

2.2.1.Oksisterollerin Oluşumu

Oksisterollerin ana biyolojik kaynağı, çok sayıda kimyasal tepkime yoluyla oksidasyona uğrayarak türevlerine dönüştürülen kolesterol molekülüdür. Bu reaksiyonlar enzimatik veya non-enzimatik olarak gerçekleşmektedir.

Non-enzimatik kolesterol oksidasyonu çoğunlukla steran halka sisteminin oksitlendiği ürünlerin oluşmasına neden olmaktadır (bazı istisnalar olabilir).

Genel olarak oksisteroller, kolesterolden ek polar grupların varlığı ile (bir veya birkaç tane olabilir) farklıdır. Bu ek gruplar; hidroksil grubu, keto grubu, hidroperoksi grubu, epoksi veya karboksil gruplarıdır (Fakheri ve Javitt, 2012).

2.2.2.Oksisterollerin Oluşum Mekanizması

Non-enzimatik kolesterol oksidasyonu, vücutta fizyolojik olarak bulunan reaktif oksijen türleri (ROS) ile reaksiyona girerek gerçekleşmektedir (Brown ve Jessup, 2009). Kolesterolün ROS ile etkileşimi, 7.karbondaki hidrojenin ayrılmasına ve

radikal karbon oluşmasına yol açar (Fruhirth ve ark., 2007; Jurkiewicz ve ark., 2012). Kolesterol bu oksijen radikali ile reaksiyona girerek bir kolesterol peroksil radikali (COO·) oluşturur (Brown ve Jessup, 2009). Bu radikal, diğer lipid moleküllerinden hidrojeni daha da ayırarak, 7.karbondaki –OOH kısmı ile nispeten kararlı bir kolesterol hidroperoksit (7α -OOH-kolesterol, 7β -OOH-kolesterol ve 7-ketokolesterol) oluşuma neden olabilir. 7-OOH-kolesterol türleri, non-enzimatik olarak üretilen majör kolesterol oksidasyon ürünleridir (Brown ve Jessup, 1999, 2009; Brown ve ark., 1997).

Kolesterolün enzimatik oksidasyon ürünleri, çoğunlukla sitokrom P450 ailesiyle ilişkili farklı enzimlerin etkisiyle oluşmaktadır (Olkkonen ve ark., 2012; Russell, 2000). Örneğin; bu enzimlerden biri olan CYP46A1 enzimi, 24-hidroksikolesterol (24S-OH) oluşumunu katalize etmektedir. Bu enzim çoğunlukla sinir hücrelerinin ve retinanın endoplazmik retikulumunda (ER) bulunmaktadır (Björkhem, 2007). CYP7A1 ve CYP27A1 olmak üzere iki enzim ağırlıklı olarak karaciğerde oluşan 7α -hidroksikolesterol ve 27-hidroksikolesterol sentezinde rol almaktadır (Bjorkhem ve Eggertsen, 2001). Endoplazmik retikulumda ve çoğu dokunun golgi cisimciğinde bulunan demir içermeyen bir enzim olan 25-hidroksilaz (CH25H), 25-hidroksikolesterol oluşumunu katalize etmektedir (Russell, 2000).

Fizyolojik olarak bulunan oksisteroller arasında kolesterol biyosentezinin bir yan ürünü olan 24S-25-epoksi-kolesterol, enzimatik olarak üretildiği için ayırt edici özelliğe sahiptir (Nelson ve ark., 1981).

Diyet ile alınımında ekzojen bir oksisterol kaynağı olduğu bilinmektedir (Otegui-Arrazola ve ark., 2010). Okside steroller; gıda üretimi, depolanması ve hazırlanması ile oksidatif koşullara bağlı olarak kolesterol bakımından zengin olan gıdalarda yüksek düzeylerde görülmektedir (Brown ve Jessup, 2009). Gıdalardan emilen oksisterollerin, kan dolaşımına girebileceği yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Ancak endojen ve ekzojen oksisterol düzeylerinin tam bir kantitasyonu yoktur (Brown ve Jessup, 1999; Carpenter, 2002).

Oksisteroller, kolesterol kaynaklı olduğundan bu moleküllerin üretimi bir dereceye kadar kolesterol varlığına bağlıdır. Fizyolojik koşullar altında, oksisterollerin

konsantrasyonunun kolesterol konsantrasyonundan yaklaşık 3 kat daha düşük düzeyde olduğu düşünülmektedir (Brown ve Jessup, 2009).

2.2.3.Oksisterollerin Metabolizması ve Eliminasyonu

Oksisterol metabolizmasında dört ana yol vardır; (Gill ve ark., 2008)

- İlk olarak, oksisteroller kolesterol açıl transferazlar (ACAT ve LCAT) ile esterleşebilirler.
- İkinci yol, oksisterol oluşumunda CYP27A1 enzimi, aynı zamanda halka yapısı oksitlenmiş sterollerin daha ileri oksidasyonunu katalizleyebilir ve suda iyi çözünen türlere dönüştürebilir. Örneğin; CYP27A1 enzimi ile 7-ketokolesterol (7-KC), 27-hidroksikolesterol (27-OHC), 27-OHC de 3 β -OH-5-COOH-kolik asite dönüşmektedir (Brown ve ark., 2000).
- Üçüncü yol, 11 β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi, oksitlenmiş sterollerini azaltabilir. Örneğin; 11 β -hidroksisteroid dehidrojenaz enzimi ile 7-KC ve 7 β -hidroksikolesterol (7 β -OHC) düzeyleri azalmaktadır (Jessup ve Brown, 2005).
- Dördüncü yol, kolesterol sülfotransferaz enzimi hem halka hem de yan zincir oksisterollerini sülfatlandırabilir. Örneğin; 7-KC ve 7 β -kolesterol-3-sülfat molekülünde görülmektedir. (Chen ve ark., 2007; Fuda ve ark., 2007)

Oksisterollerin eliminasyonu ise membranlarda görülmektedir. Oksisterollerin hidrofobik yapıda olması nedeniyle, taşınmaları için özel lipofilik taşıyıcılar gereklidir. Literatür de bu tür birçok taşıyıcı tespit edilmiştir (Brown ve Jessup, 2009). Örneğin; Sterollerin yüksek yoğunluklu lipoproteinlere (HDL) dönüşmesiyle ABCA1, apolipoprotein A1'e aktarır.

Enzimatik ve non-enzimatik olarak üretilen oksisterollerin bir kısmının varlığı antioksidanlarla azaltılabilir. Örneğin; diyabetik hastalara vitamin E takviyesinin, 7-KC ve 7 β -OHC düzeylerini düşürdüğü belirtilmiştir. Aynı zamanda antioksidan desteklerinin, kolesterol epoksit düzeylerini de azalttığı düşünülmektedir. Ancak bu konu hakkında kesin bilgi yoktur (Brown ve Jessup, 1999).

2.2.4.Oksisterollerin Bulunduğu Yerler ve Konsantrasyonları

İnsan vücudaki oksisterollerin yeri ve konsantrasyonları, potansiyel fizyolojik rolleri göz önüne alındığında önemli bir yer tutmaktadır. Kolesterol gibi oksisteroller de oldukça hidrofobiktir. Aynı zamanda, kolesterolden farklı olarak oksisterollerin molekül yapısındaki küçük kimyasal farklılıklar, diğer membran bileşenleri ile etkileşim şekillerini önemli ölçüde etkilemektedir. Bundan dolayı oksisteroller membran yapısı üzerinde önemli bir etkiye sahiptir (Kulig ve ark., 2015; Massey ve Pownall, 2005; Wang ve ark., 2004). Normal koşullarda oksisterol konsantrasyonu, yüksek kolesterol varlığında düşük düzeylerde gözlenmektedir. Bununla beraber, bazı patofizyolojik durumlarda oksisterol konsantrasyonu çok yüksek düzeylerde (toplam sterol konsantrasyonu > %20) görülebilmektedir. Bu durumlarda oksisterollerin membran özellikleri üzerindeki etkisi önemli olmaktadır (Brown ve Jessup, 1999; Javitt, 2008; Olkkonen ve Lehto, 2004).

Hücrel oksisterol içeriği ve subselüler oksisterollerin konumu üzerine yapılan çalışmalarla, bu oksisterollerin tanımlanmasının karmaşık olduğu bildirilmiştir. Bu durum, özellikle kolesterol konsantrasyonuna göre daha düşük düzeylerde bulunan oksisteroller için önemli olmaktadır. Özellikle enzimatik olarak üretilen oksisteroller için, az miktarda kolesterol oksidasyonu bile analiz sonuçlarını büyük oranda etkileyebilmektedir. Bu yüzden oksisterol analizi yapılırken metotta peroksit içermeyen çözücüler kullanarak kolesterol oksidasyonunun kontrol edilmesi son derece önemlidir (Brown and Jessup, 1999; Olkkonen, 2012; van Reyk and Jessup, 1999).

Günümüzde, in vivo oksisterol konsantrasyonlarının analizi hakkında birkaç çalışma vardır. Bu nedenle, çeşitli patolojik durumlarda oksisterol düzeylerini değerlendirmek için verilerin doğru analizi oldukça önemlidir (Hulten ve ark., 1996; van Reyk ve ark., 2006).

2.2.5.Oksisterollerin Biyolojik Rolü

İnsan vücudunda nispeten düşük düzeylerde bulunmasına rağmen, oksisterollerin önemli biyolojik etkilerinin olduğu bilinmektedir.

Bu etkilerden bazıları;

- Metabolik ara maddeler
- Kolesterol homeostaz düzenleyicileri
- Aterojenik ajanlar
- Hücre geçirgenliği modülatörleri
- Gen ekspresyon düzenleyicileri
- Hücresel sinyal reseptörleri

olarak bildirilmiştir (Kulig ve ark., 2015b; Meaney ve ark., 2002; Olsen ve ark., 2009; Smondyrev ve Berkowitz, 2001).

2.2.6.Oksisterollerin Hücre Membranı Üzerine Etkileri

Biyolojik zarların fiziksel özellikleri çok sayıda hücresel mekanizma üzerinden sıkı bir şekilde kontrol edilmektedir. Kolesterol neredeyse tüm hücre membranlarının yapısında bulunduğundan, kolesterol homeostazı çok önemlidir. Literatürdeki bilgiler incelendiğinde, yapılan çalışmalarda lipid çift tabakasının fizikokimyasal ve biyolojik özelliklerine oksisterollerin de etkilerinin olduğu gösterilmiştir (Massey, 2006; Olkkonen and Hynynen, 2009). Ek olarak oksisterollerin; lipoproteinler, membran proteinleri ve sterol taşıyıcı proteinler ile etkileşimleri incelenmiş olup kolesterolün etkilerinden farklı olduğu gösterilmiştir (Charbonneau ve ark., 2001).

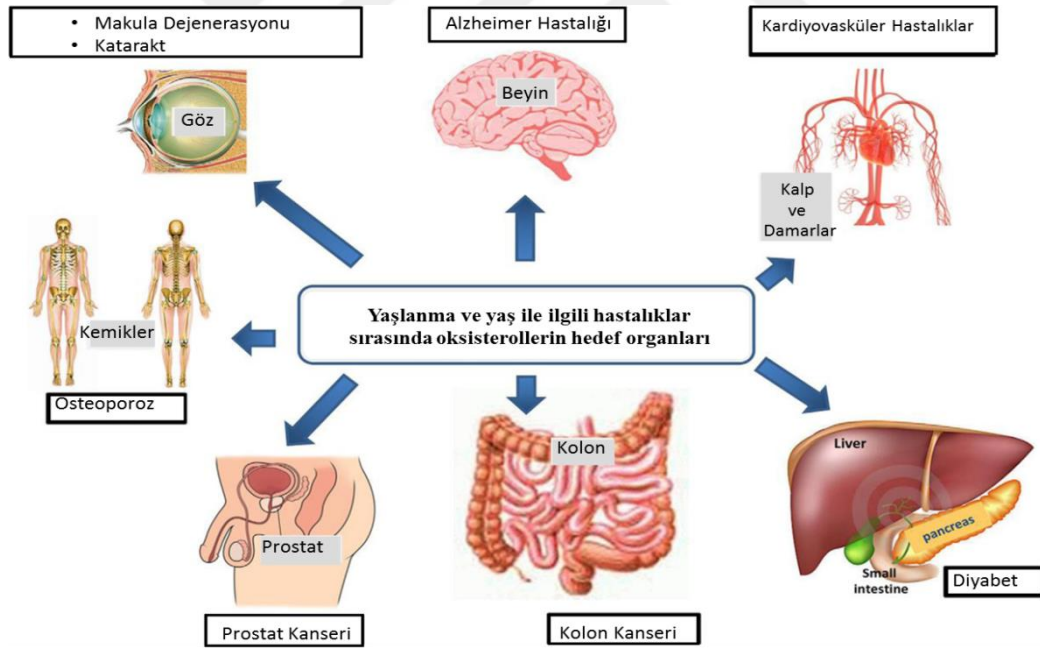
Özetle, oksisteroller kolesterolden ayıran yapısal özellikler vardır ve biyolojik makromoleküllerin modifikasyonu ile doğrudan ilgilidir. Örneğin; 7-KC'ün sentetik ve biyolojik membranlarda kolesterolden farklı olarak kristalize olduğu yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Phillips ve ark., 2001).

Biyofiziksel açıdan bakıldığında, lipid çift tabakasında kolesterolün etkileri; düzenleyici ve yoğunlaştırıcı etkilerdir. Düzenleyici etkisi, kolesterolün hidrokarbon zincirinin uzaması anlamına gelirken, yoğunlaştırıcı etkisi ise kolesterol molekülünün çevresinde lipid başına düşen yüzey alanının azalması anlamına gelmektedir. Genel olarak oksisteroller, lipid çift tabakalarını kolesterol ile benzer şekilde etkiler ancak tipik olarak oksisterolün düzenleyici ve yoğunlaştırıcı

etkilerinin kuvveti kolesterolün etkilerinden daha zayıftır (Ahyayauch ve ark., 2006; Gelissen ve ark., 1999; Keller ve ark., 2004; Kulig ve ark., 2015b; Pulfer ve Murphy, 2004). Örneğin; 7-KC ve 5-hidroksikolesterol (5-OHC)'ün lipid çift tabakası üzerinde daha az düzenleyici etkisi olduğu bulunmuştur (Wang ve ark., 2004).

2.3. Hastalıklarda Oksisterollerin Yeri

Oksisteroller, sadece kolesterol-lipid metabolizmasının ve membran yapısının modülasyonu gibi fizyolojik süreçlerde değil, aynı zamanda patolojik koşullarda da önemli rol oynamaktadır. Kolesterol-lipid homeostazı çoğunlukla enzimatik olarak oluşan oksisteroller (7-OHC, 22-OHC, 24-OHC, 25-OHC, 27-OHC) tarafından modüle edilmektedir. Aynı zamanda en güçlü sitotoksikite, otooksidasyon orjinli oksisteroller (7-KC ve 7-OHC) için kabul edilmiştir. Hücre ölümü ve inflamasyona bağlı birçok hastalıkta, oksisterollerin fizyolojik seviyeleri aştığı bulunmuştur. Şekilde oksisterollerin hastalıklarla ilişkilerine genel bir bakış gösterilmektedir. (Şekil 2.2)



Şekil 2.2. Yaşa bağlı meydana gelen hastalıklarda oksisterollerin hedef organları

W. Kulig et al. / Chemistry and Physics of Lipids 199 (2016) 144–160

2.3.1. Ateroskleroz ve İnflamasyon

Ateroskleroz, oksisterollerle ilgili olduğu bilinen kardiyovasküler bir hastalıktır. Bu patolojik durum, büyük ve orta arterlerin duvarlarındaki kolesterol birikimi ile karakterizedir. Aterosklerotik plak oluşumu giderek damar lümenini daraltır,

tromboza yol açar ve hedef organlara giden oksijen miktarının azalmasına sebep olarak kalp krizi ve inmeye sebep olan mortalite oranı yüksek bir durumdur (Chisolm ve Steinberg, 2000). Aterosklerotik lezyonlarda bulunan kolesterol genellikle düşük yoğunluklu lipoproteinlerden (LDL) kaynaklanmaktadır (Goldstein ve ark., 1979). Bu patolojik durumda oksisterollerden; 7-KC, 27-OHC ve 7 α / β -OHC düzeyleri plazmada belirgin şekilde artmaktadır. Aynı zamanda, aterosklerotik plağın içeriği %75-80 oksisterollerden oluşmaktadır. Plak gelişiminde bu oksisterollerin aktif rol aldığı belirlenmiştir (Brown ve Jessup, 1999).

Aynı zamanda immünolojik yanıt ve özellikle makrofaj biyolojisinin, oksisteroller tarafından düzenlendiği ortaya koyulmuştur. Örneğin; karaciğer X reseptörünün (LXR) aktive olmasıyla, sterollerin akışı artar ve aterosklerotik lezyonların oluşumunu engelleyecek inflamatuvar yanıtı inhibe eder (Graham ve Allen, 2015). 27-OHC'nin ise, pro-inflamatuvar genleri regüle ettiği, vasküler hücrelerdeki inflamatuvar süreçleri başlatarak plazma tümör nekroz faktörü (TNF- α) yükselttiği bilinmektedir.

2.3.2. Nörodejeneratif Hastalıklar

Alzheimer, Parkinson, Huntington ve Multiple skleroz gibi nörodejeneratif hastalıklar, genellikle oksisterollerle ilgili farklı koşullar oluşturmaktadır. Vücuttaki toplam kolesterolün yaklaşık %20'si beyinde bulunmaktadır. Beyin insan vücudundaki kolesterolün en yüksek bulunduğu organdır. Beyinde bulunan kolesterolün; %10'u nöronların, %20'si nöronları besleyen glial hücrelerin, %70'i nöronları saran miyelin kılıfın yapısına katılmaktadır (Maxfield ve Tabas, 2005).

Beyinde kolesterol, kan-beyin bariyeri (KBB) nedeniyle in situ olarak sentezlenmektedir. Beyinde sentezlenen fazla kolesterol, 24-hidroksilaz (CYP46A1) enzimi ile KBB'ni geçebilen bir oksisterol olan 24-OHC'ye çevrilerek karaciğer tarafından metabolize edilmektedir (Bjorkhem, 2006). Ayrıca dolaşımda en fazla bulunan oksisterol olan 27-OHC ve 7 α -hidroksi-3okzo-4-kolesteronik asitin KBB'ni geçebildiği gösterilmiştir. Lipofilik bir zar olan KBB'ni geçebilen oksisterollerin, beyin-kolesterol homeostazını düzenlemesine ilişkin patolojik koşullarda aktif bir rol oynadığı bildirilmiştir (Bjorkhem ve ark., 2009).

Alzheimer Hastalığı (AH)

Alzheimer hastalığı (AH), milyonlarca insanı etkileyen demansın en yaygın şeklidir. AH; insan beyninde protein agregatlarının oluşumu, amiloid betanın hücre dışında depolanması ve tubulin associatlet unit (tau) proteinlerinin hücre içi birikmesiyle karakterizedir (Blennow ve ark., 2006). AH patogenezinde oksisterollerin rolü çok önemlidir (Gamba ve ark., 2015). Örneğin; 24-OHC, kolesterol sentezini kontrol eden transkripsiyon faktörleri olan SREBP-1C, SREBP-2 ve LDL reseptörlerini down-regüle eder, apolipoprotein-E'yi LXR aracılığıyla uyararak up-regüle eder ve ATP bağlayıcı kasetlerden ABCA1 ve ABCG1'in up-regülasyonunu sağlar (Abildayeva ve ark., 2006). 24-hidroksilaz enziminin, AH dahil olmak üzere bazı bellek bozukluklarına sebep olduğu öne sürülmüştür (Burlot ve ark., 2015). Beyindeki CYP46A1 seviyesinin yaşla beraber arttığı ve bununla yaşlılık döneminde bilişsel bozulmaya neden olabileceği öne sürülmektedir. Yaş dışında, apo-E'nin e4 allelini bulundurması, Alzheimer hastalarında olduğu gibi ateroskleroz için de ana risk faktörüdür (Zarrouk ve ark., 2014).

Parkinson Hastalığı (PH)

Parkinson hastalığı en yaygın görülen hareket bozukluğudur. Lewy inklüzyon cisimcikleri α -synuclein proteinin birikmesi ve hücre ölümü ile karakterizedir. PH'nda, beyinde dopamin üreten nöronların kaybı izlenmektedir. Dopamin salgılayan hücreler özellikle beyin sapında substantia nigra isimli bölgede bulunmaktadır (Rantham Prabhakara ve ark., 2008). Oksisteroller (24S-OHC, 27-OHC ve secosterol) özellikle α -synuclein agregasyonuna ve dopamin içeren nöronların ölümüne neden olmaktadır (Bosco ve ark., 2006). Ayrıca, oksidatif kolesterol metabolitlerinin düzeyleri PH hastalarının serebral korteksinde daha yüksektir. Serebrospinal sıvıda 24S-OHC düzeyi hastalığın süresi ile ilişkilidir. Bu bilgilere rağmen, birkaç klinik çalışmada PH ile oksisterol düzeyleri arasında bir korelasyon bulunamamıştır (Bjorkhem ve ark., 2013). Genel olarak, oksisterollerin PH'daki önemi tartışmalı olmakla beraber göz ardı edilmemelidir.

Huntington Hastalığı (HH)

Huntington hastalığı, beyindeki sinir hücrelerinin progresif hasarıyla kas koordinasyonunu etkilenmesiyle karakterize olan zihinsel bozukluğun görüldüğü genetik bir bozukluktur. HH ve oksisterollerin ilişkisi hakkında veriler çok fazla değildir. HH hastalarında 24S-OHC ve 27-OHC düzeylerinin plazmada değiştiği

gözlenmiştir (Leoni ve Caccia, 2015). Bir çalışmada ise, beyin ölümü gerçekleşen HH hastalarına ait dokularda, putamende 24S-OHC düzeyinde %60 azalma, kolesterol düzeyinde %30 artış, 7-KC ve 7 β -OHC düzeyinde %50-70 oranında artış olduğu gözlenmiştir (Kreilaus ve ark., 2015).

Multiple Skleroz (MS)

Multiple skleroz hastalığı, immun kaynaklı demiyelinizasyon ve merkezi sinir sisteminde (MSS) akson kaybı ile karakterizedir. Demiyelinizasyona katılan çok miktarda ROS, miyelin içeriğinin %10'undan fazlasını oluşturan kolesterolü oksitlemektedir (Vejuş ve Lizard, 2009). Aslında, MS hastalarının beyin-omurilik sıvısı nöronal hasar oluşturduğu bilinen 7-KC içermektedir. Aynı zamanda, MS hastalarının plazmalarında 24S-OHC gözlenmiştir (Teunissen ve ark., 2007). Bu bilgiler doğrultusunda Multiple skleroz (MS) oluşturulan fare modelinde plazma 24S-OHC ve 27-OHC düzeylerinin arttığı belirtilmiştir (Teunissen ve ark., 2007).

2.3.3. Kanser

Karsinogenezin enflamasyonla güçlü bir şekilde bağlantılı olduğu bilinmektedir (Griven- nikov ve ark., 2010). Oksisteroller; kolon, akciğer, cilt, göğüs, prostat ve safra kanalı kanseri ile ilişkilidir (Jusakul ve ark., 2011). Karsinogenezde oksisterollerin etkisi üç şekilde olmaktadır;

- DNA hasarının indüklenmesi,
- Siklooksijenaz-2 ekspresyonunun indüksiyonu
- Tümör hücresi migrasyonunun uyarılması şeklindedir (Zarrouk ve ark., 2014).

Kolorektal kanserler, LXR aktivasyonuna duyarlıdır. LXR aktivitesi, prostat kanserinin ilerlemesini azaltıcı etki oluşturabilmektedir. İn-vitro oksisterollerin yaşlanan hücrelere müdahale ettiği ve etkisi az olsa da birçok kanser hücre tipinin ölümüne neden olduğu yakın zamanda yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Zarrouk ve ark., 2014).

2.3.4. Diğer Hastalıklarda Oksisteroller

Oksisterollerin rolü; Tip-2 diyabet, kronik böbrek yetmezliği, anoreksiya, katarakt gibi hastalıklarda da gösterilmiştir (Sottero ve ark., 2015; Mal-grange ve ark., 2015; Sottero ve ark., 2009).

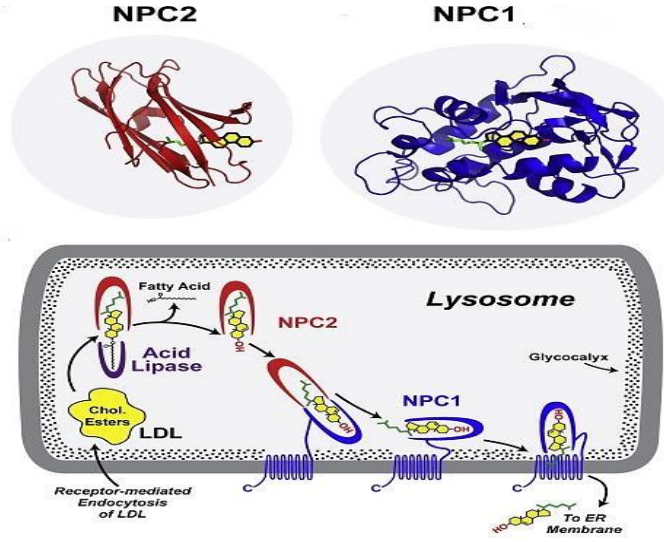
Östrojen sinyali, uygun kemik yoğunluğunu korumak için kritik önem taşır. Plazmada artan 27-OHC düzeylerinin kemik-mineral yoğunluğunu azalttığı gösterilmiştir. Bu veriler östrojen sinyali, kolesterol ve metabolik hastalıklar ile osteoporoz arasındaki ilişkinin kanıtı olmaktadır (Dusell ve ark., 2010).

2.4. Lizozomal Depo Hastalıkları

Lizozomal depo hastalıkları (LDH), lizozomal enzim ve transport proteinlerinin fonksiyon eksikliğinden kaynaklı olarak oluşan ve 60'dan fazla tipi olan kalıtsal geçişli hastalıklardır. LDH'de defektif enzim nedeniyle sfingolipid, glikozaminoglikan, glikoprotein ve glikojen gibi birçok substratın parçalanma ve uzaklaştırılma mekanizması sorunludur. Bu substratlar endozom/lizozom içerisinde depolanmaktadır. Substratların birikimi doku hasarı ve hücre ölümüne yol açmaktadır. Lizozomal hastalıkların diğer birçok genetik hastalık gibi bebeklik ya da erişkin yaşta başlangıç gösteren türleri bulunmaktadır (Sharafi ve Emre, 2010).

2.4.1. Niemann Pick-Tip C Hastalığı

Niemann Pick tip-C hastalığı (NP-C), nadir görülen otozomal resesif, nörovisseral lipid depolama bozukluğudur. Bu hastalığa, NPC1 ve NPC2 genlerinde meydana gelen mutasyon sebep olmaktadır (Şekil 2.3) (Pentchev ve ark., 1985). Lizozomlarda ve geç endozomlarda, esterleşmemiş kolesterol ve çeşitli sfingolipidler dahil olmak üzere geniş bir lipid birikimi ile karakterizedir (Vance ve Karten, 2014). NP-C'de lipidlerin birikimi hastalık patogenezinde önemli rol oynamaktadır. NP-C'nin başlangıç yaşı değişkenlik göstermektedir ve hastalığın farklı evrelerinde ortaya çıkabilen ve farklı oranda ilerleme gösteren, spesifik olmayan, visseral, nörolojik ve psikiyatrik klinik semptomları bulunmaktadır (Vaniel, 2010; Jahnova ve ark., 2014). NP-C çeşitli verilere göre 89.000 canlı doğumda bir görülmektedir. Ancak tanısı zor koyulan bu hastalığın tanınmayan ve geç başlangıçlı formları daha yüksek bir insidans oluşturmaktadır (Patterson ve ark., 2012).



Şekil 2.3. NPC1/NPC2 genlerinin yapısı ve lizozom içindeki aktiviteleri

Brown and Goldstein Niemann-Pick Type C Disease, 2013

NP-C de tanıyı geciktiren bazı faktörler vardır. İlk klinik tablo spesifik olmadığı için NP-C'nin sınırlı farkındalığı ile birlikte kesin tanı koymak zorlaşmaktadır. NP-C için bazı ülkelerde ulusal tanı merkezleri mevcut olsa dahi, tanısal testlerin yaygınlığı, test yapılabilirliği ve maliyeti açısından sınırlıdır. Bu durum, genellikle semptomların başlangıcından, teşhis ve tedaviye kadar olan sürede büyük bir gecikmeye sebep olmaktadır (Wraith ve ark., 2009; Jahnova ve ark., 2014).

2.4.2. Klinik İnceleme

Ayrıntılı bir klinik muayene, bazı durumlarda NP-C'yi diğer nöro-metabolik bozukluklardan ayırt etmeye yardımcı olabilmektedir (Wraith ve ark., 2009). Aynı zamanda, NP-C'nin klinik bulguları hastalığın evresine bağlı olarak değişebilmektedir ve benzer genotipleri olan bireyler arasında bile farklılık gözlenebilmektedir. Bu durumlarda klinik tanı koymak oldukça güçleşmektedir. Bu nedenle diğer kalıtsal metabolizma bozukluklarına benzer şekilde, doğrulayıcı laboratuvar testleri her zaman gereklidir.

NP-C'nin belirtileri ve semptomları genel olarak; visseral, nörolojik ve psikiyatrik olmak üzere üç kategoriye ayrılır (Mengel ve ark., 2013; Wijburg ve ark., 2012; Wraith ve ark., 2014). NP-C hastalarında, hastalığın belirlenmesine yardımcı olan bazı semptomlar vardır. Bunlar arasında; neonatal kolestatik sarılık, splenomegali, progresif supronükleer palsi, ataksi, disfaji, distoni, bilişsel bozukluk ve psikoz yer almaktadır. Fakat semptomlar bunlarla sınırlı değildir. Spesifik NPC1 veya NPC2

mutasyonlarının, NP-C'nin nörolojik semptomlarının başlangıç yaşı ile bağlantılı olduğu bilinmektedir (Vainer, 2010).

NP-C'nin heterojenliği ve diğer hastalıklarla örtüşen semptomlarının varlığı, teşhis sürecini zorlaştırmakta ve geciktirmektedir. Visseral ve nörolojik/psikiyatrik semptomları bulunan yetişkin bir hasta ile sadece visseral bulguya sahip NP-C tanısı almış hastalar bulunabilmektedir (Wraith ve ark., 2014).

2.4.3. Niemann Pick-Tip C Tanısında Kullanılan Yöntemler

Laboratuvar temelli testler NP-C tanısının temelini oluşturmaktadır. Uzmanlar tarafından NP-C için tanı testlerinin geliştirilmesi konusunda ortak bir görüş bulunmaktadır. Çünkü mevcut NP-C tanısı için yaklaşımlar bazı sınırlamalara sahiptir (Wraith ve ark., 2016).

Filipin ile Boyama ve Kolesterol Esterifikasyon Testi

NP-C, LDL kaynaklı kolesterolün hücre içi taşınmasında meydana gelen bir bozulma ile karakterizedir (Vainer ve ark., 2015; Vance ve Karten, 2015). NPC1 ve NPC2 proteinleri, geç endozom-lizozomlardan kolesterol çıkışı için gereklidir. NPC1 ve NPC2 proteinleri herhangi bir mutasyona uğrayarak işlevini kaybettiğinde LDL hücreleri geç endozom-lizozom bölgesinde kolesterol birikmesine neden olmaktadır (Kruth ve ark., 1986). Bu mekanizma, NP-C tanısı için mevcut yöntem olan Filipin testinin prensibini oluşturmaktadır.

Bir başka tanı yöntemi olan kolesterol esterifikasyon yönteminde; açıl-KoA, kolesterol açiltransferaz (ACAT) ile kolesterol ester oluşumunu geciktirmektedir (Pentchev ve ark., 1987). Bu iki yöntemin avantaj ve dezavantajları tabloda gösterilmektedir (Tablo 2.1).

Tablo 2.1. Filipin ile boyama ve kolesterol esterifikasyon testlerin karşılaştırılması

Yöntem	Avantajlar	Sınırlamalar
Deri fibroblastlarının Filipin ile boyanması (Floresans mikroskopu ile değerlendirme)	<ul style="list-style-type: none">• NP-C vakalarının %80'den fazlasının tipik yöntemi• NPC1 ve NPC2 de benzer sonuçlar• Boyama sonucu net bir şekilde anlaşılakta ve klinik bulgular tanıyı destekler.	<ul style="list-style-type: none">• İnvaziv deri biyopsisi ve hücre kültürü• 2-5 hafta arasında sonuç çıkması• Yüksek maliyet• Teknik şartlar ve gereksinimler (her analiz için yeterli mikroskop koşulları, spesifik biyolojik reaktifler)• Tüm bu nedenlerden dolayı sonuçları yorumlamada uzman tecrübesi (daha az sayıda pozitif hücre olduğunda ve NP-A/B de hafif pozitif sonuçları yorumlamak zorlaşır.)
Kolesterol esterifikasyon testi (LDL kaynaklı kolesterol ester oluşumu)	<ul style="list-style-type: none">• NPC1 ve NPC2 genlerinde meydana gelen mutasyonların tanımlanmasında çok avantajlıdır.• NP-C vakalarında net ve kesin sonuç verir.• NP-C'yi NP-A/B ve diğer hastalıklardan ayırmaktadır.	<ul style="list-style-type: none">• Deri biyopsisi ve hücre kültürü• Çok uğraş gerektirir ve yüksek maliyete sahiptir.• Spesifik biyolojik reaktiflerin gereksinimi• Filipin boyama testinden daha az spesifiktir.

Biyokimyasal Belirteçler

NP-C için daha geniş bir tarama yapabilmek için düşük maliyetli, kan bazlı, spesifik ve hızlı analize olanak sağlayan biyobelirteçlere ihtiyaç vardır. Kitotriozidaz aktivitesi ölçümü, uzun zamandır NP-C tanısı için tek yaklaşımdı. Son yıllarda, birkaç yeni, daha duyarlı ve spesifik metabolitlerin testleri geliştirilmiştir. Bunlar NP-C için birincil tarama testi olarak sıklıkla kullanılabilme özelliğine sahiptir (Vanier ve ark., 2016).

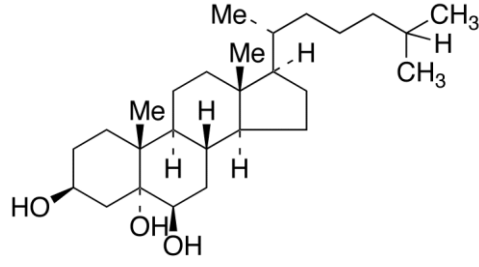
Kitotriozidaz Aktivitesi

Kitotriozidaz aktivitesinin ölçümünün, Gaucher hastalığı tanı ve izleniminde yararlı bir biyobelirteç olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda kitotriozidaz aktivitesinin hafif /orta düzeyde artış göstermesi, NP-A, NP-B ve NP-C de dahil olmak üzere diğer lizozomal depo hastalıkları için genel bir gösterge olmuştur ve yaygın olarak kullanılmaktadır (Ries ve ark., 2006). Ancak NP-C hastalarında kitotriozidaz aktivitesindeki artış, hastalığın geç başlangıçlı formlarında ortaya çıkmaktadır. Ayrıca, inme ve tip-2 diyabet gibi sık görülen hastalıklarda da yükselmiş kitotriozidaz aktivitesi kaydedilmiştir (Elmonem ve ark., 2016; Bustamante ve ark., 2014). Bu nedenle, kitotriozidaz aktivitesi NP-C için özgüllük ve duyarlılıktan yoksundur (Boot ve ark., 1998).

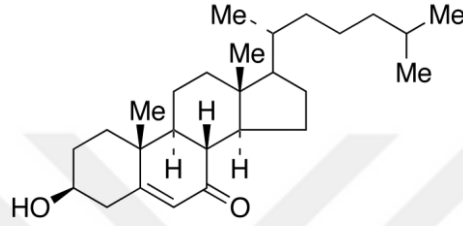
Oksisterol Analizleri

Esterleşmemiş kolesterolün lizozomlarda birikmesinin yanı sıra, NPC1 hücre dizilerinde ve NPC1 fare modelinde ROS üretimini artırarak oksidatif stres yarattığı gösterilmiştir (Reddy ve ark., 2006; Zampieri ve ark., 2009; Zhang ve ark., 2008).

Oksidatif strese, non-enzimatik olarak kolesterolün oksidasyon ürünlerinin oluştuğu bilinmektedir. NPC1 fare dokularında iki oksisterolün (kolestan-3 β -5 α -6 β ve 7-ketokolesterol) bu şekilde yükseldiği kaydedilmiştir (Şekil 2.4 ve Şekil 2.5) Aynı zamanda bu metabolitler plazmada da artmış olarak bulunmuştur. NP-C'li fare ve hastalarda artmış bulunan bu oksisteroller, NPC1 heterozigotlarda kısmen artmıştır (Porter ve ark., 2010; Zhang ve ark., 2008).



Şekil 2.4. Kolesterol-3 β -5 α -6 β (C-triol)'ün molekül yapısı



Şekil 2.5. 7-Ketokolesterol (7-KC)'ün molekül yapısı

NP-C'nin hızlı tanısında kullanılmak üzere plazma oksisterollerinin analizi için, gaz kromatografisi-kütle spektrometresi (GC/MS), sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresi (LC-MS/MS) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon kaynağı kullanılan kütle spektrometrik (LC-APCI-MS/MS) yöntemler önerilmiştir (Jiang ve ark., 2011). Elektrosprey iyonizasyon(LC-ESI-MS/MS) gibi farklı iyonizasyon kaynaklı kütle spektrometrik yöntemler de gelişmeye devam etmektedir (Boenzi ve ark., 2014; Klinke ve ark., 2015; Pajares ve ark., 2015; Romanello ve ark., 2016; Kannenberg ve rak., 2016).

NPC1 veya NPC2 genleri mutasyona uğramış tüm hastalarda plazma oksisterol düzeyleri yükselmiştir (Stamfer ve ark., 2013, Jiang ve ark., 2011; Reunert ve ark., 2014; Amroui ve ark., 2014). Oksisterol düzeyleri NP-C hastalarının Filipin boyama testi sonuçları her zaman ilişkili bulunmamıştır. Fakat özenli çalışılmış ve pozitif sonuçlanmış Filipin testli NP-C hastalarında, oksisterol düzeyleri yüksek bulunmuştur (Stamfer ve ark., 2013).

Literatürde denenen metotlara ait analizlerin sonuçları incelendiğinde, C-triol analizinin NP-C hastaları için 7-KC analizinden daha fazla ayırt edici güce sahip olduğu görülmektedir. (Porter ve ark., 2010; Boenzi ve ark. 2014).

NP-C tanısı koyulan hasta sınırlı olduğundan, C-triol ve 7-KC analizlerinin özgün değeri yeni anlaşılmaya başlanmıştır. C-triol ve 7-KC düzeylerinin, NP-A ve NP-B, lizozomal asit lipaz eksikliği ve serebrotendinöz ksantomatoz gibi hastalıklarda da kısmen arttığı gözlenmiştir. Smith-Lemli-Opitz sendromu ve peroksizomal bozuklukları olan bazı hastalarda da 7-KC düzeyinde kısmen artış gözlenmiştir (Pajares ve ark., 2015; Kannanberg ve ark., 2016). Çeşitli karaciğer hastalıklarında, genetik hiperkolesterolemi olan hastalarda ve nörolojik tutulum görülen bazı hastalıklarda, Gaucher'nin de dahil olduğu birçok LDH'da normal sonuçlar gözlenmiştir (Pajares ve ark., 2015). Ancak oksisterol sonuçlarının yüksekliği, özellikle kolestatik sarılığı olan yenidoğanlarda dikkatli bir şekilde yorumlanmalıdır (Polo ve ark., 2016).

Bu geliştirilen biyobelirteçlerin, NP-C tarama testi olarak kullanımında birçok avantaj bulunmaktadır. C-triol ve 7-KC analizleri dondurulmuş plazmalarda hızlı bir şekilde yapılabilir. Deri fibroblastlarında Filipin boyama testi gibi invaziv yöntemlerden daha duyarlıdır. C-triol daha spesifik olduğundan tanıda daha tercih edilebilir görülmektedir. Oksisterol analizinin maliyeti diğer yöntemlere göre çok daha düşüktür. Ancak analizle ilgili birtakım sınırlamalar vardır. Oksisterol analizleri; non-invaziv olması, düşük maliyeti, kısa sürede analiz edilebilmesi ve hassas olması nedeniyle diğer önemli hususlar dikkate alınır NP-C şüphesi olan kişiler için son derece yararlı görünmektedir (Polo ve ark., 2016).

2.5. Kolestan-3 β -5 α -6 β (C-triol) ve 7-Ketokolesterol (7-KC) Analizi

Oksisterol analizi, biyolojik sıvılarda çok düşük konsantrasyonda (ng/mL) bulunduğu için kolay değildir. Geliştirilen yöntemlerde, analiz öncesi işlemler (özellikle türevlendirme aşaması) çok titizlikle yapılmalıdır. Kan örneklerinin; hemoliz olmadan ve kısa bir süre içinde dondurucuya kaldırılması gereklidir. Bu sınırlamalar, özellikle hızlı otooksidasyon özelliğine sahip 7-KC için yanlış yüksek sonuçlar oluşturabilmektedir. Bu zorlayıcı analizler için birkaç kromatografik yöntem geliştirilmiştir (Wraith ve ark., 2009).

Bugüne kadar, biyolojik örneklerde oksisterollerin kantifikasyonu esas olarak GC/MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir. Bu yöntem, karmaşık yapıdaki oksisterollerin duyarlı olarak saptanmasına rağmen GC/MS temelli yöntemler yoğun emek, uzun örnek hazırlama prosedürleri ve nispeten daha fazla plazma hacimlerine

gereksinim olduğundan kullanımı sınırlanmıştır (Bjorkem ve ark., 1988; Menendez-Carreno ve ark., 2008).

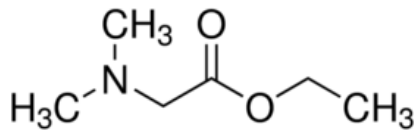
Türevlendirme

LC-MS/MS yöntemine dayanan analizlerde, ekstraksiyonlar ve çeşitli basamaklar birleştirilerek yeni prosedürler oluşturulmuştur. Oksisterol analizinde en önemli basamak türevlendirme işlemi olduğundan Girard hidrazon, pikolinil ester ve dimetilglisin ester (DMG) ile farklı türevlendirme aşamaları denenmiştir (Şekil 2.6).

Girard türevlendirme işlemi, enzimatik basamakların varlığı ve bir gece süren inkübasyon nedeniyle oldukça zahmetli ve zaman alıcı bir yöntem olduğundan günümüzde tercih edilmemektedir.

Pikolinil ester ile yapılan türevlendirme işleminde, sabunlaştırma basamağı ve yüksek sıcaklıkta (80°C) inkübasyon gerektiğinden, kolesterolün otooksidasyonuna bağlı kantitasyon sorunları yaşanmıştır.

Dimetilglisin (DMG) ile türevlendirme işlemi ise; yöntemin verimliliği, serbest esterlenmemiş oksisterollerin tespitine imkan sağlaması, daha düşük sıcaklıkta derivatizasyon (otooksidasyon ürünlerinin oluşumunu sınırlar) gerektirmesi gibi uygun özellikleri nedeniyle C-triol ve 7-KC analizi için tercih edilmektedir (Jiang ve ark., 2011; Polo ve ark., 2016).



Şekil 2.6. Dimetilglisin ester molekül yapısı

Örnek Stabilitesi

Kütle spektrometrik yöntem ile yapılan C-triol ve 7-KC analiz çalışmaları incelendiğinde örnek stabilitesinin sonuçları etkilediği görülmüştür. Polo ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada -20°C ve -80°C de saklanan iki ayrı grup örnekler analiz edilmiştir. Sonuçlar değerlendirildiğinde, -20°C'de saklanan kalite kontrol örnekleri -80°'de saklanan örneklerin sonuçlarıyla karşılaştırıldığında, C-

triol stabilitesini korurken, 7-KC'nin hızlı okside olma özelliğinden dolayı plazmada arttığı gözlenmiştir.

Bu sonuçlara göre literatürde bu iki parametre için yapılan yorumlar aşağıda verilmiştir (Polo ve ark., 2011; Jiang ve ark., 2011);

- C-Triol, oda sıcaklığında 2-3 gün boyunca stabildir. Ancak ölçüm bir hafta içinde yapılmalıdır.
- Kısa sürede (bir hafta) analiz edilecek örnekler -20°C'de saklanabilir. Ancak uzun süre (ay/yıl) saklanması gereken örnekler için -80°C tercih edilmelidir.
- C-Triol, NP-C tanısı için yararlanılabilecek olan öncelikli biyobelirteçtir.
- 7-KC ise örneklerin doğru saklanma kontrolü ve örnek stabilitesini değerlendirmek için kullanılabilir.

2.6. Kütle Spektrometresi

Kütle spektrometreleri, manyetik veya elektriksel bir alanda hareket eden yüklü partikülleri kütle/yük (m/z) oranlarına göre diğer yüklü partiküllerden ayırarak analiz eden cihazlardır. Kütle spektrometrelerinin tıp alanında kullanımı son yıllarda önemli oranda artmıştır. Özellikle metabolik hastalıkların tanısında, genişletilmiş yenidoğan taramalarında, steroid hormon ve vitamin analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır.

Moleküller normalde yüklü partiküller değildir ve kütle spektrometrelerinde iyonizasyon işlemi ile uyarılarak iyonize hale dönüşürler. Yüklü moleküller stabil olmadıklarından başka moleküllerle veya bir yüzey ile çarpıştıklarında küçük parçacıklara parçalanırlar. Oluşan her bir iyon kendine özgü bir kütle/yük oranına sahiptir ve bu oranların yoğunluğuna karşı oluşan bir spektrumla gösterilmektedir. Her bir iyonun yoğunluğu detektöre ulaşan miktarı ile orantılıdır ve her bileşiğin spektrumu kendine özeldir. Bilinmeyen bir örneğin analizi sonucu elde edilen pik, referans materyale ait pik ile karşılaştırılarak bileşiğin kütlesi tanımlanmaktadır (Mosharrafa ve ark., 1971; Cooks ve ark., 1983).

İyonlaştırma işlemi çeşitli kaynaklarla sağlanabilmektedir. İyon kaynaklarını başlıca gaz faz iyon kaynakları ve desorpsiyon iyon kaynakları olmak üzere iki grupta

incelemek mümkündür. Gaz faz iyon kaynaklarında örnek önce buharlaştırılır ve daha sonra iyonize edilir. Desorpsiyon kaynaklarında ise örnek sıvı veya katı halden direkt gaz iyonlara dönüştürülür. Isıya dayanıksız ve uçucu olmayan bileşiklere kolaylıkla uygulanabilir olması desorpsiyon kaynaklarının avantajları arasındadır. Gaz faz kaynaklar ise genellikle kaynama noktası 500°C nin altındaki ısıya dayanıklı örneklerle uygulanmaktadır (Banks ve ark., 1994).

Gaz faz iyon kaynaklarından elektron iyonizasyon (ESI) ve kimyasal iyonizasyon (CI) teknikleri en sık kullanılanlardır. Desorpsiyon tipi iyon kaynaklarından; hızlı atom bombardımanı (FAB) polar ve çok yüksek moleküler ağırlıklı moleküllerin analizinde kullanılmaktadır. Elektrosprey iyonizasyon (ESI) ise polipeptitlerin, proteinlerin ve oligonükleotidlerin analizinde sıklıkla kullanılmaktadır. Matriks destekli lazer desorpsiyon iyonizasyonu (MALDI) ise özellikle peptitlerin analizinde kullanılmaktadır (Banks ve ark., 1994). Termosprey iyonlaştırma kaynağı ise yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sisteminden MS sistemine gelen kapiller tüpüne yüksek voltaj uygulanarak ısıtılarak örnek iyon kaynağına püskürtülerek gönderilir. Bu iş için kullanılan “Termosprey” ile sıvı halden gaz hale dönüştürülen iyon buharlaştırılmaktadır. Damlacıklar (+) ve (-) yüklü iyonlar ile çözücü içermektedirler. Ancak iyonlardan birinin polaritesi daha baskındır.

Kütle spektrometreleri iyon kaynağına giren bütün bileşikleri ayrıştırır ve iyonlaştırır. Organik bileşiklerin içerisinde çok fazla sayıda molekül mevcuttur ve hepsinin kütle fragmenti izlenir. Bu nedenle iyi bir spektrum elde etmek amacıyla belirli bir sürede sadece saf bir bileşiğin kütle spektrumunu almak gereklidir. Dolayısı ile kütle spektrometreleri gaz veya sıvı kromatografi gibi bir ayrıştırma işlemi ile birlikte kullanılması gerekir (Kiser ve Sulliman, 1968). Sıvı Kromatografi-Kütle Spektrometresi (LC-MS) uçucu olmayan ve ısıya karşı dayanıksız olan bileşiklerin ayrıştırılması için kullanılır. Sıvı faz kullanıldığı için yüksek ısı gerekmemektedir (Lacey ve ark., 200; Banks ve ark., 1994).

2.6.1. Sıvı kromatografi-Ardışık Kütle Spektrometresi (LC-MS/MS)

Seçiciliği yükseltmek ve dedeksiyon limitlerini artırmak için MS'den önce örneğin ekstraksiyon ve kromatografik ayrıştırmalar gibi bazı ön işlemlerden geçirilmesi gereklidir. Bunun için en uygun yöntemlerden birisi, iki veya daha fazla analitik tekniğin ardışık olarak bağlanmasıdır. Kullanılan kolonlar normal faz ve ters faz

olarak ayrılır. Ters faz kolonda sabit faz, sabit silika partiküllerine kovalent bağ ile bağlı nonpolar organik gruplardan oluşur. Mobil faz ise polar sıvıdır. Nonpolar analitler kolonu daha erken terk ederler. Normal faz kromatografide ise sabit faz polar moleküllerden mobil faz ise apolar çözücünden oluşur. Normal faz kromatografilerde mobil fazdaki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin değişikliklere neden olmaktadır.

Kolondan çıkan moleküller iyonlaştırma kaynağına gelir. İyonlaştırma kaynağı tarafından moleküller uyarılarak yüklü iyonize hale getirilirler. Çalışmamızda iyonlaştırma kaynağı olarak ESI kullanılmıştır. ESI özellikle büyük ve ısıya dayanıksız protein, polipeptid analizinde tercih edilir. İyonlaştırma kaynağında oluşan farklı m/z oranına sahip iyonlar kütle analizörü tarafından ayırt edilerek dedektöre gönderilir. Çalışmamızda kütle analizörü olarak üçlü kuadrupol sistemi kullanılmıştır. İyon demeti yoluna paralel yerleştirilmiş ve 0.1-0.3 m uzunluğunda dört silindirik çubuktan ibaret bir kuadrupol sistemi kullanılır.

Bu dört silindirik çubuğa hem doğru akım hem de radyo frekansı gerilimi uygulanır. Ayırma borusuna küçük bir yarıktan giren iyonlar arasında ancak belli bir m/z değerinde olanlar, sabit bir doğru akımda veya radyo frekansı geriliminde çubuklar arasından geçerek dedektöre ulaşırlar. Spektrum doğru akım gerilimini veya radyo frekansı gerilimini değiştirerek kaydedilir.

Ardışık MS/MS'de karışım birinci MS'nin iyon kaynağına verilir. Burada karışımın iyonizasyonu bileşiğin kendine ait iyonlarının oluşmasını sağlar. Bunlara ana iyonlar denir. Bilinmeyen örneğin karakteristik ana iyonu böylelikle seçilir ve tanımlanır. Bu incelenecek olan bileşiği karışımın içindeki diğer bileşenlerinden ayırır. Birinci MS'de ayrılmış olan ana iyon iki MS arasındaki çarpışma odasında bir kez daha parçalanıp ikincil iyon fragmentlerine ayrılır. Bunlara ikincil iyon denir. İkincil iyon ikinci MS analizöründe ayırt edilerek dedektöre gönderilir. Bu şekilde ana iyon ile ikincil iyonun birlikte taranması bileşiğin yüksek seçicilikte tanımlanmasını ve karışımdaki diğer bileşenlerden tamamen ayrılmasını sağlar (Lacey ve ark., 2000).

LC-MS/MS ile parçalanmış ana iyonun istenen parçası izlenebildiğinden girişim yapan etkenler elimine edilerek analizin seçiciliği de artırılmıştır. Aynı m/z oranına sahip pek çok molekülün mevcut olmasına karşın aynı parçalanma iyonlarına sahip

molekül sayısı doğada 1/10.000'dür. Bu nedenle LC-MS/MS tekniği özgün bir test olmasının yanı sıra çok düşük konsantrasyonlarda maddenin miktar tayininin yapılabilmesini mümkün kılmaktadır. Ayrıca sonuçların doğrulanmasına da gerek duyulmamaktadır.

GC/MS ile saatte 4-6 örnek analiz edilebilirken, tandem MS/MS ile saatte 60 örneğe kadar çıkılabilir. Böylece analiz hızı artırılmış ve örnek başına birim maliyet düşürülmüş olmaktadır. (Persichilli ve ark., 2010; Tuschl ve ark., 2005).

2.7. Analitik Validasyon

Analitik validasyon; yöntemin ilgili performans kriterlerine uygunluğunun saptanması için yöntem parametrelerinin belirlenip incelendiği bir geçerlilik çalışmasıdır. Yeterli kalitede ölçüm yapmak klinik açıdan büyük bir önem taşımaktadır. Bu ölçümler büyük bir etkiye sahiptir. Yöntem validasyonu; yeni bir yöntem kullanılacağı zaman, mevcut yöntemlerin kullanım amacı genişlediğinde veya kalıcı bir problem meydana geldiğinde yapılmalıdır.

Geçerli bir validasyon analizi için aşağıdaki parametreler araştırılmalıdır.

2.7.1. Doğrusallık (Linearite)

Doğrusallık değerlendirmesi yapılırken; standart eğri (kalibrasyon eğrisi), yönteme ve analite bağlı belirli sayıda ölçüm noktası ile belirlenir. Eğrinin oluşturulması, içinde miktarı bilinen referans örnek veya kör örnek içine eklenmiş analitin bilinen konsantrasyonu ile yapılır. Her bir ölçüm noktasında en az üç ölçüm yapılır ve sonuçların ortalaması alınarak eğri çizilir.

Her bir nokta ana solüsyondan dilüsyonlar yapılması yerine bağımsız olarak hazırlanmalıdır. Kalibrasyon eğrisi analiz edilen örnek yapısının farklılığına göre değişebilmektedir. Elde edilen sonuçlar ile çizilen eğride üst ve alt sınırlar belirlenmelidir.

Sonuçlar grafiksel olarak verilir ve "lineer regresyon formülü" ile "korelasyon katsayısı" belirtilir. Bu şekilde çalışma aralığının doğrusallığı tespit edilir. Korelasyon katsayısı (r^2) $>0,99$ 'a yakın olmalıdır. Kalibrasyon eğrisinin uzun süre kullanılması gerektiğinde geçerliliğinin kontrol edilmesi gerekmektedir. (Tiryaki ve Aysal, 2003).

2.7.2. Doğruluk Analizi

Yöntemin doğruluğu, örnek için ölçülen değer ile gerçek değer birbirine yakınlığıdır. Doğruluk; bir örneğin bilinen konsantrasyonunun analiz edilmesi ve gerçek değer ile ölçülen değer karşılaştırılması ile belirlenir. %20 sapma oranını geçip geçmediği kontrol edilir.

2.7.3. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik, ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığının, kesinliğin bir ölçüsüdür. Aynı zamanda, bir maddenin aynı ölçüm koşullarında (aynı kişi, aynı cihaz ve ekipmanlar, aynı laboratuvar şartları), kısa zaman aralığında yapılan ölçüm sonuçlarının birbirine yakınlığını değerlendirmek amacıyla standart sapmasının hesaplanmasıdır. Tekrarlanabilirlik çalışmaları gün içi ve günler arasında, farklı konsantrasyonlarda, ortalama 20 ölçüm olacak şekilde yapılmalıdır.

2.7.4. Saptama (Limit of Detection-LOD) ve Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation-LOQ)

Çok düşük konsantrasyonlarda çalışılması gerektiği durumlarda örneğin vermiş olduğu sinyalin, kör örnekten ayrımının yapılması ve uygun bir kesinlikle kantitatif sonuçların elde edilmesi gerekir (Akdağ, 2003; 2006).

Analiz sonucunda elde edilen değer sıfırın üstünde olduğunda iki olasılık vardır;

1. Örnek aranan analiti içermiyor ve elde edilen sonuçlar körün dağılım aralığındadır.
2. Örnek aranan analiti içeriyor ve analiz tekrarları ortalamanın elde edilmesini sağlar.

Bu durumda 2 farklı limit oluşur ve aşağıdaki gibi ifade edilir;

- Saptama Limiti (Limit of Detection – LOD) X_{LOD}
- Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation – LOQ) X_{LOQ}

Saptama limiti (X_{LOD}); kör ve sıfır dışında tespit edilebilen en küçük miktar ya da konsantrasyon olarak tanımlanmaktadır.

Saptama limitinin belirlenebilmesi için yaklaşımların birçoğu benzer kör matrikslerin veya düşük düzeydeki analit sonuçlarının standart sapmaları veya metodun standart sapmasının faktörle çarpımı ile hesaplanması yönündedir. Bu şekilde saptama limiti 3 şekilde hesaplanabilmektedir (Tiryaki ve Aysal, 2003).

- Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden
- Metodun standart sapması üzerinden
- Sinyal/Gürültü üzerinden

Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları üzerinden aşağıdaki formülle hesaplanır;

$$X_{LOD} = X_{KÖR} + 3 \times S_0$$

S_0 = kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları

$X_{KÖR}$ = kör örneklerin ortalaması

Yukarıdaki eşitlik eğer analiz sonuçlarından körün çıkarılması temeline dayanıyorsa $X_{KÖR}$ eşitliğe konulmamalıdır. S_0 , matrikse uygun kör veya düşük düzeyde analit içeren materyal kullanılarak en az 6 tercihen 10 bağımsız çalışma ile elde edilmelidir. Çalışmamızda X_{LOD} değeri bu formül kullanılarak yapılmıştır.

Ölçüm limiti (X_{LOQ}), analitin kabul edilebilir düzeyde doğru ve kesin olarak metot koşullarında belirlenebildiği en düşük düzeydir.

Ölçüm limiti (LOQ) iki farklı şekilde hesaplanabilir.

1. 6 ile 10 arasında kör örnek okumalarının sinyal/gürültü (S/N) oranının 10 katı alınarak hesaplanır.
2. LOD'nin 3 katı alınarak bulunur.

Kör örnekler üzerinden hesaplama formülü;

$$X_{LOQ} = X_{KÖR} + 10 \times S_0$$

LOD üzerinden hesaplama formülü;

$$X_{LOQ} = X_{LOD} \times 3$$

2.7.5. Geri Kazanım

Kimyasal ölçümde gerçek değerın ölçülmesi uygulanan yöntemle bağılı olarak değışebilir. Deneysel işlemler esnasında çeşitli nedenlerle bir kayıp oluşabilir. Bu kayıp miktarının oranını ve belirsizliğini hesaplamak gerekir. Kayıp miktarı metodun geri kazanım oranı olarak ifade edilir.

Geri kazanım çalışmasının en büyük avantajı orijinal matrikste çalışma yapılabilmesidir. Çalışma için orijinal matriks yani validasyon çalışmasının yapıldığı matriks, aranan analit ile zenginleştirilir. Bunun yanında dezavantajı, orijinal örneklerde aranan analitlerin örnekle olan fiziksel ve kimyasal bağlarının çok güçlü olmasına rağmen, zenginleştirilen örneklerde dışardan katıldığı için bu şekilde bir bağ oluşmamasıdır. Bunun sonucunda geri kazanım çalışmasında her zaman daha başarılı sonuçlar elde edilebilir.

Geri kazanım sonuçlarının genellikle %80 ile %120 arasında değışmesi başarılı olarak kabul edilir. Analiz edilecek maddeyi içermeyen matriks madde (Referans madde-Rm) üzerine belli oranda standart eklenerek analiz yapılır. Referans madde analiz edilir ve bulunan değerin referans madde değerine oranı geri kazanım oranıdır.

$$\text{Geri kazanım} = \frac{\text{Bulunan konsantrasyon}}{\text{Referans konsantrasyon}}$$

2.7.6. İnterferans

Yöntemin herhangi bir basamağında olumsuz yönde etki gösteren maddelerin oluşturduğu etkiye interferans (bozucu etki) denir. İnterferans çoğunlukla lipemi ve hemoliz varlığı, ilaç kullanımı gibi durumlarda ortaya çıkar. Bu durumun varlığını tespit etmek için örneklerde analiz yapıldıktan sonra, bozucu etkisi incelenecek maddeler örneklere ilave edilir. Ölçüm tekrarlanır. Durumun değerlendirilmesi “geri kazanım” çalışmasında olduğu gibi yapılır.

2.7.7. Carry-over Etkisi

Carry-over etkisi; kromatografik sistemden kaynaklanan, önceki örnekten gelen herhangi bir kalıntıdan kaynaklanan kontaminasyondur. Carry-over aynı zamanda birkaç örnekten sonra kromatogramları rastgele etkileyebilecek bir

kontaminasyondan da kaynaklanabilmektedir. Carry-over, yüksek konsantrasyonlu bir örnek veya standarttan sonra bir veya birkaç boş enjeksiyon yapılarak değerlendirilir.



3.GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Kütle Spektrometresi Laboratuvarında bulunan LC-MS/MS cihazı kullanılarak yapılmıştır. Araştırma, Akdeniz Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (BAP) tarafından 2016-1490 numara ile desteklenmiş ve Akdeniz Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulu tarafından 332 numaralı karar ile onaylanmıştır.

3.1.Laboratuvar Çalışmaları

3.1.1. Sağlıkli Kontroller

Çalışma kapsamında 25 sağlıklı kişiden (15 erkek-10 kadın) kan örnekleri 5 mL'lik K2 EDTA (EtilenDiaminTetraAsetikasit)'lı tüplere alındı. Alınan kan örnekleri 4000 rpm'de 5 dk santrifüj edilip, elde edilen plazmalar, alikuatlandıktan sonra analiz zamanına kadar 30 gün -80°C'de saklandı. Bu örnekler, kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterolün analitik validasyon çalışmalarında kullanıldı.

3.1.2. Kullanılan Cihaz, Kimyasal ve Sarf Malzemeleri

1. LC-MS/MS cihazı (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu 8040 Corporation, Japan)
2. Santrifüj (Hettich Rotina 35)
3. Vorteks (Rx3 Velp-Scientifica)
4. Soğutmalı santrifüj (Eppendorf Centrifuge 5403)
5. Azot uçurma ünitesi
6. Labor-İldam Sanyo (-80°C) derin dondurucu
7. Heidolph-Rotamax 120 (Rotator shaker) karıştırıcı
8. pH metre (Hanna Instruments pH-211)
9. Hassas terazi (Shimadzu- AYY-220)
10. Etüv (Heraeus-T-12)
11. N,N-Dimetilglisin hidroklorit (DMG) (2491-06-7 Sigma, Almanya)

12. N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarboimid hidroklorit (EDC) (E1769 Sigma, Almanya)
13. 4-(Dimetilamino) piridin (DMAP) (1122-58-3 Sigma, Almanya)
14. Delipidized serum (991-24-HDS LeeBiosolution, USA)
15. İnsan plazma havuzu (K2 EDTA) (Hmpledta2-strpd-4x SeraLab, ABD)
16. $3\beta,5\alpha,6\beta$ -Trihydroxycholestane (T795100 TRC, Kanada)
17. $3\beta,5\alpha,6\beta$ -Trihydroxycholestane-d7 (T795102 TRC, Kanada)
18. 7-ketokolesterol (K185050 TRC, Kanada)
19. 7-ketokolesterol-d7 (K185052 TRC, Kanada)
20. Distile Su
21. Hekzan (650552 Sigma, Almanya)
22. Amonyum format (540-69-2 Sigma, Almanya)
23. Kloroform (650471 Sigma, Almanya)
24. Formik asit (64-18-6, Merck, Almanya)
25. Asetonitril (75-05-8, Merck, Almanya)
26. Raptor™ AR C-18 Kolon (100x2.1 mm; 2.7 μ m particle size)
27. K2 EDTA'lı tüp (5 mL)
28. Pastör Pipeti
29. Mavi pipet ucu
30. Sarı pipet ucu
31. Mikro pipet ucu

32. Falkon tüp (15mL)
33. Otomatik pipet (10 µL, 200 µL, 1000 µL)
34. Propilen ependorf (2 mL)
35. LC-MS/MS vial, mikro vial

3.2. Ayrıntılı Yöntem

3.2.1. Kolestan-3β,5α,6β-Triol ve 7-Ketokolesterol Analizi

Kolestan-3β,5α,6β-triol ve 7-ketokolesterol analizi elektrospray iyonizasyon (ESI) kaynaklı ultra hızlı sıvı kromatografisi (LC-20 AD UFLC XR, Shimadzu Corporation, Japan) ile kombine LCMS-8040 triple kuadrupol tandem kütle spektrometresinde (Shimadzu Corporation, Japan) optimize edilmiş çoklu reaksiyon izleme (MRM) yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Cihaz, ESI (+) pozitif modda kullanılmıştır.

Mobil Fazların Hazırlanması:

Mobil faz A, 1 mM amonyum format ve 1 L distile su ile hazırlandı. pH değeri kontrol edilerek formik asit ile 3'e ayarlandı. Mobil faz B, 1 mM amonyum format 950 mL asetonitril, 50 mL distile su ile hazırlandı. pH değeri kontrol edilerek formik asit ile 3'e ayarlandı.

Optimizasyon Çalışmaları

Optimizasyon için; kolestan-3β,5α,6β-triol ve izotop işaretli kolestan-3β,5α,6β-triol ile 7-ketokolesterol ve izotop işaretli 7-ketokolesterol standartları, metanol ile 1 mg/mL olacak şekilde çözülerek stok standartlar hazırlandı. 1 mg/mL'lik stoklardan 10'ar µL'si ependorf tüplere koyularak azot gazı altında yaklaşık 30 dakika boyunca uçuruldu. Daha sonra türevlendirme solüsyonu aşağıdaki şekilde hazırlandı. (Ayrıntılı yöntem reaktif hazırlanması başlığı altında verilmiştir.)

Optimizasyon için Türevlendirme Solüsyonunun Hazırlanması:

0.5M DMG (N,N-Dimetilglisin hidroklorit) Hazırlama: Molekül ağırlığı 139.58 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlandı.

2M DMAP (4-(Dimetilamino) pridin) Hazırlama: Molekül ağırlığı 122.17 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlandı.

Eşit hacimlerde tartılan DMG ve DMAP ajanları aynı ependorfa aktarılarak, 0.5 mL kloroform ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

1M EDC (N-(3-Dimetilaminopropil)-N'-etilkarboimid hidroklorit) Hazırlama: Molekül ağırlığı 191.70 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlamak için tartıldı. Tartılan EDC, ependorfa aktarılarak 0.5 mL kloroform ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

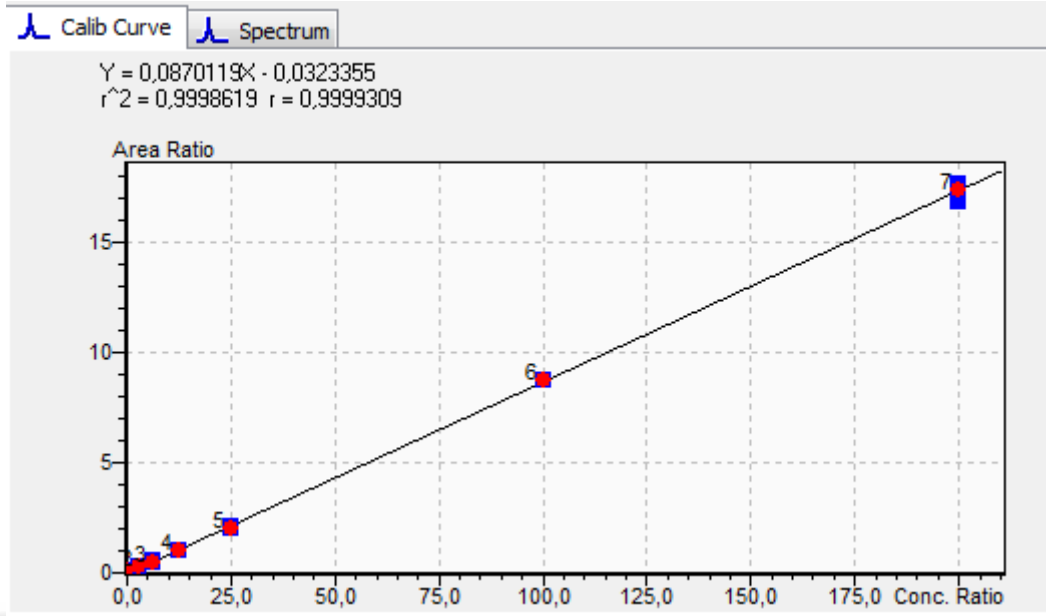
Hazırlanan DMG ve DMAP ile EDC solüsyonları eşit hacimlerde alınmak üzere yeni ependorfa aktarılarak vortekslendi ve türevlendirme solüsyonu hazırlandı. Türevlendirme solüsyonun her analiz için taze hazırlanmasına dikkat edildi.

Uçurma işlemi tamamlanan ependorf tüplere taze hazırlanmış olan türev solüsyonundan 40 µL eklendi. Vortekslenerek azot gazı ünitesinde tekrar uçurma işlemi yapıldı. Uçurma işlemi tamamlandıktan sonra asetonitril-su (70:30) solüsyonu ile örnekler çözüldü ve 200 µL cam vialer aktarılarak enjeksiyona hazırlandı.

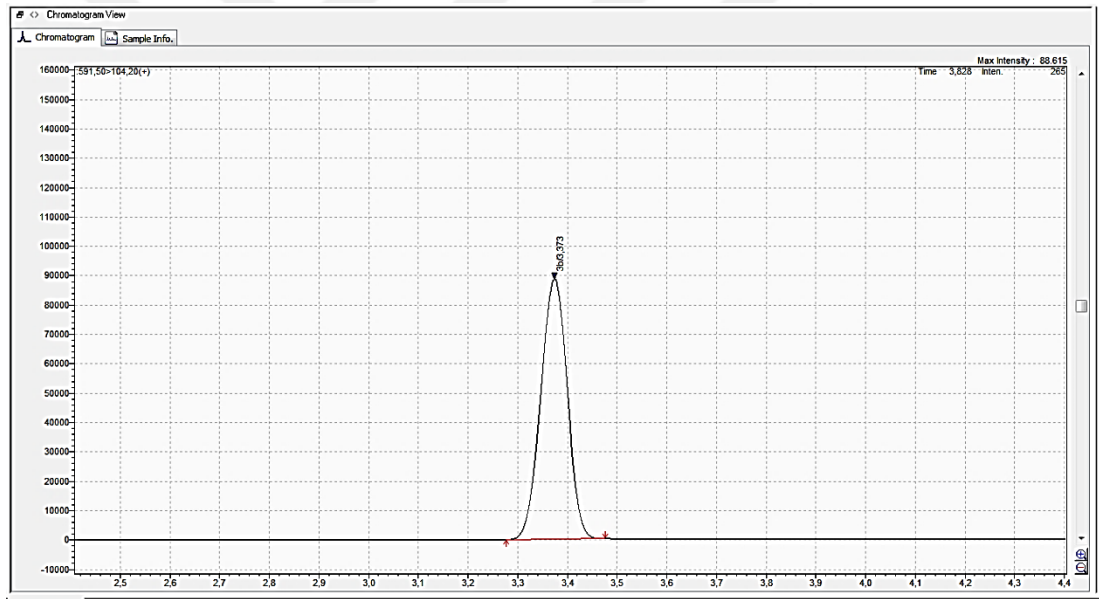
Mobil faz A'nın akış hızı 0.5 mL/dk olarak ayarlandı. Prekürsör ve yavru iyonların m/z değerleri; kolestan-3β,5α,6β-Triol standart için sırasıyla 591.50, 104.20 Da, d7(döteryum) işaretli internal standart için sırasıyla 597.50, 104.10 Da ve 7-ketokolesterol standart için 485.50, 104.10 Da, d7 işaretli internal standart için 492.50, 104.00 Da olarak belirlendi. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak belirlendi. Analiz süresi toplam 10 dakika sürdü.

Kalibrasyon Çalışması

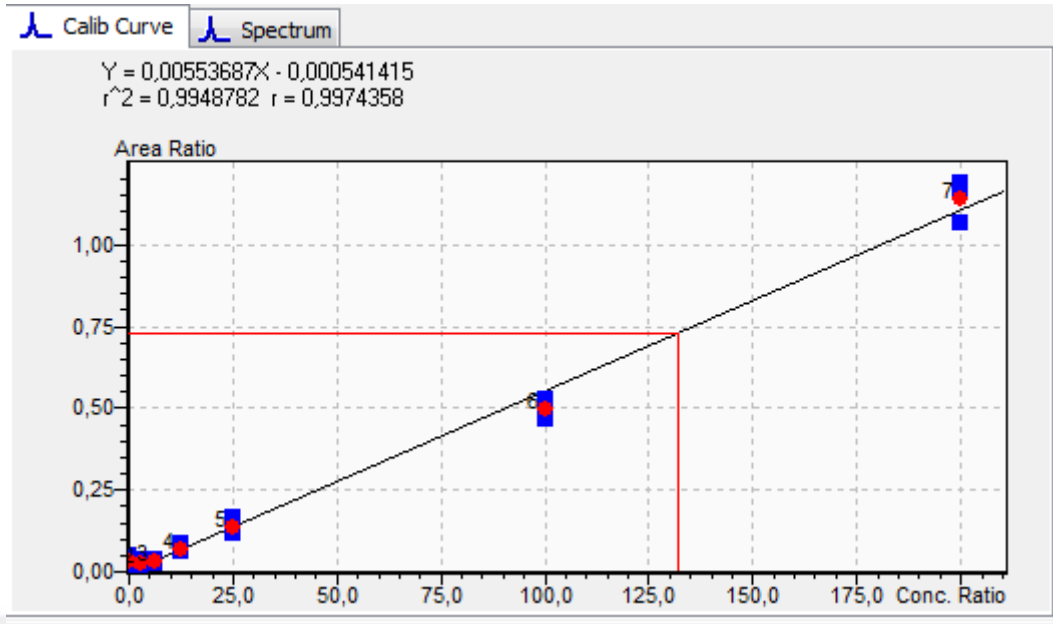
Kalibrasyon eğrisi için 1 mg/mL'lik Kolestan-3β,5α,6β-triol ve 7-ketokolesterol stok standartlardan metanol ile dilüsyon yapılarak 3.125 ng/mL, 6.25 ng/ml, 12.5 ng/mL, 25 ng/mL, 100 ng/mL, 200 ng/mL konsantrasyonlarda seriler hazırlandı. 20 µL enjeksiyon yapılarak bilinen konsantrasyonlara karşılık elde edilen alanlar için lineer regresyon eğrisi çizildi. Her iki analitin kalibrasyon eğrileri Şekil 3.1 ve Şekil 3.3 de gösterilmektedir. Kalibrasyon eğrisi oluşturulurken kullanılan 200 ng/mL'lik standartlara ait pikler de aşağıda örnek olarak verilmiştir (Şekil 3.2, Şekil 3.4).



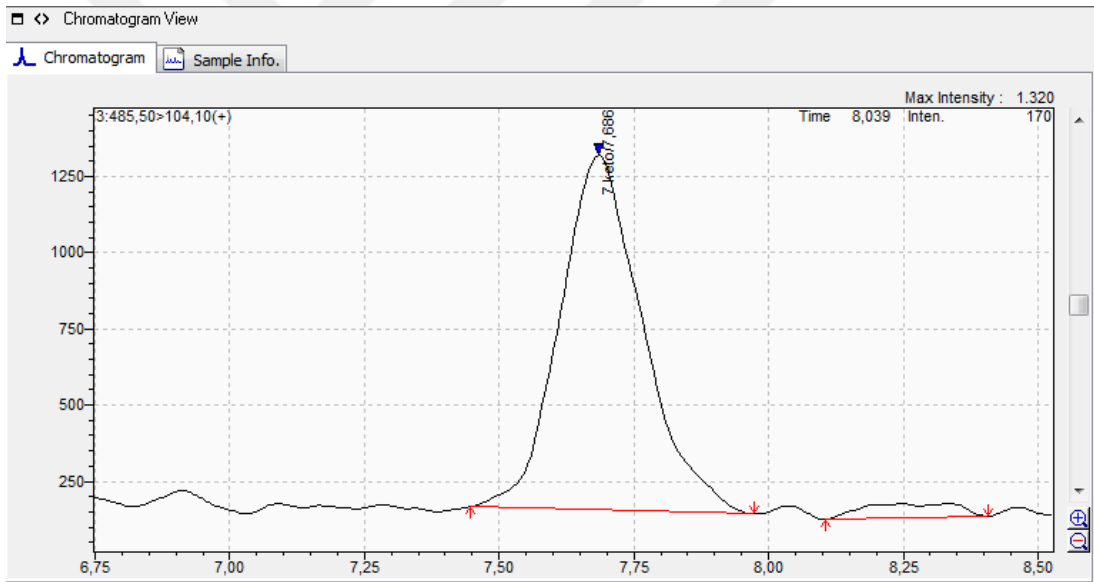
Şekil 3.1. Kolestan-3β,5α,6β-Triol Kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.2. 200 ng/mL Kolestan-3β,5α,6β-Triol standart piki (İntensity:90000)



Şekil 3.3. 7-Ketokolesterol kalibrasyon eğrisi



Şekil 3.4. 200 ng/mL 7-Ketokolesterol standart piki (İntensity:3250)

Kalite Kontrol (QC) Örneklerinin Hazırlanması

Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterol için oluşturulan yöntemin güvenilirliğini saptayabilmek için endojen insan plazma havuzuna (Human plazma K2 EDTA) bilinen konsantrasyonlarda standartlar eklendi. Bu konsantrasyonlar 0 ng/mL, 100 ng/mL ve 200 ng/mL'idi.

Reaktiflerin Hazırlanması

İnternal Standartların Hazırlanması: 1 mg d7 işaretli Kolesterol-3 β ,5 α ,6 β -Triol ve 7-Ketokolesterol internal standartları 1 mL metanol ile çözülerek 1mg/mL konsantrasyonda stok solüsyon olarak hazırlandı. Bu stoklardan 1000 ng/mL konsantrasyonda ara stok mikst internal standartlar hazırlandı. 1000 ng/mL ara stok; 1 μ L Kolesterol-3 β ,5 α ,6 β -Triol-d7, 1 μ L 7-Ketokolesterol-d7 ependorfa aktarılarak 998 μ L metanol ile seyreltilerek hazırlandı. Stok solüsyonları -20°C’de saklandı. Örnekler için 100 ng/mL konsantrasyonda mikst internal standart kullanıldı.

Standartların Hazırlanması: 10 mg Kolesterol-3 β ,5 α ,6 β -Triol ve 7-Ketokolesterol, 10 mL metanol ile çözülerek 1 mg/mL stok solüsyonu hazırlandı. Bu stok solüsyonundan 1000 ng/mL konsantrasyonunda mikst ara stok solüsyonu hazırlandı. 1000 ng/mL ara stok; 1 μ L kolesterol-3 β ,5 α ,6 β -triol, 1 μ L 7-ketokolesterol ependorfa aktarılarak 998 μ L metanol ile seyreltilerek hazırlandı. Stok solüsyonlar, -20°C’de saklandı.

Türevlendirme Solüsyonlarının Hazırlanması

Çalışmamızda farklı türevlendirme işlemlerinin ve ekstraksiyonların yöntem üzerindeki etkilerini gözlemek için aşağıda yer alan farklı reaktifler denenmiştir.

Türevlendirme Solüsyonu-1:

Hacimler 20 örnek analizine göre hesaplanmıştır.

1M DMG Hazırlama: Molekül ağırlığı 139.58 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlamak için tartıldı.

2M DMAP Hazırlama: Molekül ağırlığı 122.17 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlamak için tartıldı.

Eşit hacimlerde tartılan DMG ve DMAP ajanları aynı ependorfa aktarılarak, 0.5mL kloroform ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

1M EDC Hazırlama: Molekül ağırlığı 191.70 g/mol olan türevlendirme ajanından 0.5 mL hazırlamak için tartıldı. Tartılan EDC, ependorfa aktarılarak 0.5 mL klorofom ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

Hazırlanan DMG ve DMAP ile EDC solüsyonları eşit hacimlerde alınmak üzere yeni ependorfa aktarıldı, vortekslendi ve türevlendirme solüsyonu hazırlandı. Türevlendirme solüsyonunun, türevlenmeyi etkilediğinden dolayı her analiz için taze hazırlanması ve solüsyonun sarı renk almadan kullanılmasına dikkat edildi.

Örnek Hazırlığı-1

Örnekler, kalibratörler ve kalite kontrol örnekleri cihaza verilmeden önce aşağıdaki ekstraksiyon işlemlerinden geçirilmiştir.

1. Analiz öncesinde tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirilmiştir.
2. Hazırlanan kalibratörler, kalite kontroller ve örnekler 30 saniye vortekslendi.
3. Örneklerden 50 µL propilen ependorfa koyuldu.
4. 100 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan mix internal standarttan 300 µL örneklerin üzerine koyuldu.
5. Ependorfların kapakları kapatılarak 30 saniye vortekslendi.
6. Vortekslenen örnekler 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Süpernatan yeni bir ependorf tüpe alındı. Bu aşamada internal standartlar metanolla hazırlandığından plazma proteinler çöktürülerek uzaklaştırıldı.
8. Süpernatanlar azot ile uçurma işlemine tabii tutuldu. Bu aşamada örneklerin tamamen kurumasına dikkat edildi.
9. Kuruyan örneklerin üzerine 40 µL türevlendirme solüsyonu-1 eklendi.
10. Örnekler 30 saniye vortekslendi.
11. Ependorf tüpler 45°C 1 saat inkübe edildi. Bu aşama sonrasında başarılı bir türevlenme için yoğun sarı renk görmek önemlidir.
12. Ependorf tüplere 20 µL metanol eklenerek reaksiyon durduruldu.
13. Örnekler azot gazı altında uçuruldu.

14. Kuruyan örnekler 200 µL 70:30 oranında asetonitril-su solüsyonu eklendi.
15. Her bir ependorf tüp dikkatli bir şekilde vorteksenerek örneklerin çözülmesi sağlandı.
16. İnsertlere 200 µL koyularak cam vialler hazırlandı ve LC-MS/MS'e yüklendi.
17. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı.

Türevlendirme Solüsyonu-2:

Hacimler 20 örnek analizine göre hesaplanmıştır.

0,5 M DMG Hazırlama: Molekül ağırlığı 139.58 g/mol olan türevlendirme ajanından 2.5 mL hazırlamak için tartıldı.

2M DMAP Hazırlama: Molekül ağırlığı 122.17 g/mol olan türevlendirme ajanından 2.5 mL hazırlamak için tartıldı.

Eşit hacimlerde tartılan DMG ve DMAP ajanları aynı ependorfa aktarılarak, 2.5 mL kloroform ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

1M EDC Hazırlama: Molekül ağırlığı 191.70 g/mol olan türevlendirme ajanından 2.5 mL hazırlamak için tartıldı. Tartılan EDC, ependorfa aktarılarak 2.5 mL kloroform ile çözüldü ve 30 saniye vortekslendi.

Hazırlanan DMG ve DMAP ile EDC solüsyonları eşit hacimlerde alınmak üzere yeni ependorfa aktarıldı, vortekslendi ve türevlendirme solüsyonu hazırlandı. Türevlendirme solüsyonunun, türevlenmeyi etkilediğinden dolayı her analiz için taze hazırlanması ve solüsyonun sarı renk almadan kullanılmasına dikkat edildi.

Örnek Hazırlığı-2

Örnekler, kalibratörler ve kalite kontrol örnekleri cihaza verilmeden önce aşağıdaki ekstraksiyon işlemlerinden geçirilmiştir.

1. Analiz öncesinde tüm örnekler ve solüsyonlar oda ısısına getirilmiştir.

2. Hazırlanan kalibratörler, kalite kontroller ve örnekler 30 saniye vortekslendi.
3. Örneklerden 50 µL propilen ependorfa koyuldu.
4. 100 ng/mL konsantrasyonda hazırlanan mix internal standarttan 300 µL örneklerin üzerine koyuldu.
5. Ependorfların kapakları kapatılarak 30 saniye vortekslendi.
6. Vortekslenen örnekler 10 dakika 3000 rpm'de santrifüj edildi.
7. Süpernatant yeni bir ependorf tüpe alındı. Bu aşamada internal standartlar metanolle hazırlandığından plazma proteinlerin çökerek uzaklaştırıldı.
8. Süpernatantlar azot gazı altında uçuruldu. Bu aşamada örneklerin tamamen kurummasına dikkat edildi.
9. Kuruyan örneklerin üzerine 200 µL türevlendirme solüsyonu-2 eklendi.
10. Örnekler 30 saniye vortekslendi.
11. Ependorf tüpler 45°C 1 saat inkübe edildi. Bu aşama sonrasında başarılı bir türevlenme için yoğun sarı renk görmek önemlidir.
12. Ependorf tüplere 100 µL metanol eklenerek reaksiyon durduruldu.
13. Örnekler azot gazı ile uçurma işlemine tabii tutuldu.
14. Kuruyan örnekler 200 µL 70:30 oranında asetonitril-su solüsyonu eklendi.
15. Her bir ependorf tüp dikkatli bir şekilde vortekslenerek örneklerin çözülmesi sağlandı.
16. İnsertlere 200 µL koyularak cam vialler hazırlandı ve LC-MS/MS'e yüklendi.
17. Enjeksiyon hacmi 20 µL olarak ayarlandı.

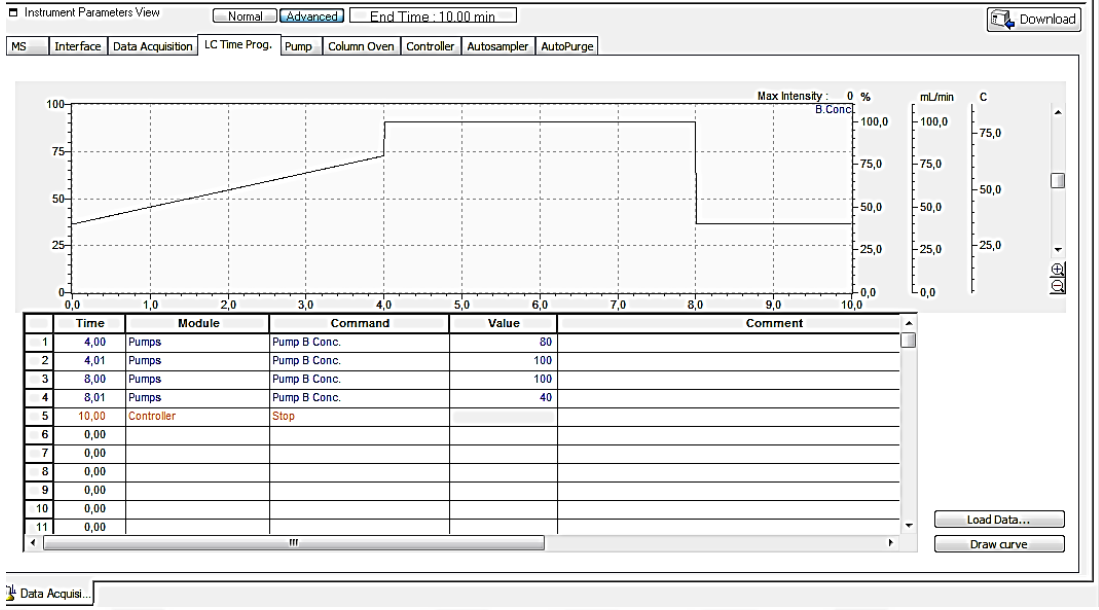
Örneklerin LC-MS/MS ile Analizi

Her analit için MRM (multiple-reaction monitoring, çoklu reaksiyon izlemi) geçişi ve internal standart verileri elde edilmiştir. Ölçümler mütipleks (çoklu) yapıldı. İyonizasyon yöntemi olarak pozitif elektrosprey iyonizasyon kullanıldı. Öncül ve ürün iyonların m/z değerleri; kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol standart için sırasıyla 591.50, 104.20 Da, d7 işaretli internal standart için sırasıyla 597.50, 104.10 Da ve 7-Ketokolesterol standart için 485.50, 104.10 Da, d7 işaretli internal standart için 492.50, 104.00 Da olarak belirlendi (Tablo 3.1).

Tablo 3.1. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterolün öncül ve ürün iyonları

Kütle Geçişi	
Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol	591.5 \rightarrow 104.2
	591.5 \rightarrow 488.5
7-Ketokolesterol	485.5 \rightarrow 104.1
	486 \rightarrow 383
D7-Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol	597.5 \rightarrow 104.1
D7-7-Ketokolesterol	492.5 \rightarrow 104

Kromatografik ayırma işlemi için Raptor™ ARC-18 (100x2.1 mm; 2.7 μ m particle size) kolonu kullanılmıştır. Cihazın akış hızı 0.5 mL/dk, kolon sıcaklığı 45°C ve enjeksiyon hacmi 20 μ L, gradient programı solvent B, % 80 (0.01-4.0 dk.), % 100 (4.01-8.0 dk.), % 40 (8.01-10.0 dk.) olarak ayarlanmıştır (Şekil 3.5). Her bir örnek için analiz ve kolonun temizlenme süresi 10 dk. olarak belirlenmiştir.



Şekil 3.5. LC zamana göre pompa akış diagramı

3.3. Analitik Validasyon Çalışmaları

Bu çalışmada analitik validasyon çalışmalarını yaparken; doğrusallık (linearite), doğruluk analizi, tekrarlanabilirlik, saptama ve ölçüm limitleri (LOD-LOQ), geri kazanım ve carry-over parametreleri değerlendirilmiştir.

Doğrusallık analizi; metanol ile 7 farklı konsantrasyonda hazırlanan standartlar ile lineer regresyon eğrisi oluşturularak yapılmıştır. Doğruluk analizi; insan plazma havuzunda 0 ng/mL, 100 ng/mL ve 200 ng/mL olmak üzere üç seviyede hazırlanan kalite kontrol örnekleri değerlendirilerek yapılmıştır. Tekrarlanabilirlik analizi; kalite kontrol örneklerin aynı ölçüm koşullarında arkaya arkaya 5 kez ölçülmesi ile yapılmıştır. Saptama ve ölçüm limitleri, yöntemin standart sapması üzerinden hesaplama yapılarak değerlendirilmiştir. Geri kazanım analizi ise; insan plazmasından 100 ng/mL olacak şekilde hazırlanan örneklerde yapılmıştır.

3.4. İstatistiksel Analiz

İstatistiksel analizler Statistical Package for Social Sciences (SPSS) for Windows 20.0 programı ile yapılmıştır. Sonuçlar Ortalama±Standart Deviasyon olarak ifade edilmiştir. p değeri <0.05 istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

4.BULGULAR

Bu çalışmada, plazmada kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterol'ün kütle spektrometrik ölçümünün analitik validasyonunu değerlendirmek için 25 sağlıklı kişinin plazma örnekleri kullanılmıştır. Bu amaçla, 15 sağlıklı erkek (% 60) ve 10 sağlıklı kadından (% 40) kan örnekleri elde edilmiş ve çalışmalar gerçekleştirilmiştir (Tablo 4.1).

Tablo 4.1. Sağlıklı kontrollerin cinsiyet (n,%) ve yaşları (ortalama \pm SD)

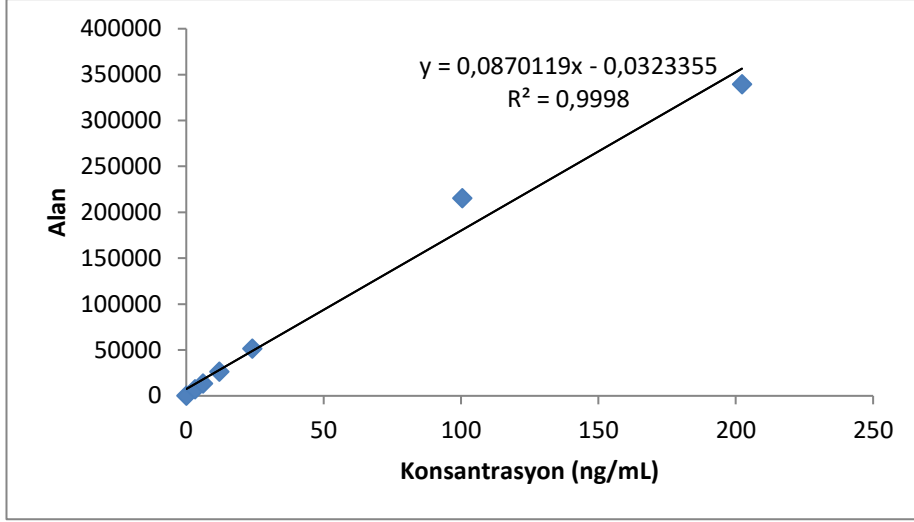
	Cinsiyet	Yaş
	n (%)	(ortalama\pmSD)
Erkek	15 (60)	28.6 \pm 10.7
Kadın	10(40)	29.7 \pm 11.7
Toplam	25(100)	29.15 \pm 12

Bu çalışmada, analitik yöntem validasyonu yapılırken test edilen parametreler, yöntemin uygulama amacına ve kapsamına bağlı olarak belirlenmiştir. Bu amaçla; linearite, doğruluk analizi, tekrarlanabilirlik, ölçüm ve saptama limitleri (LLOD ve LLOQ), geri kazanım, carry-over analizi gibi parametreler değerlendirilmiştir.

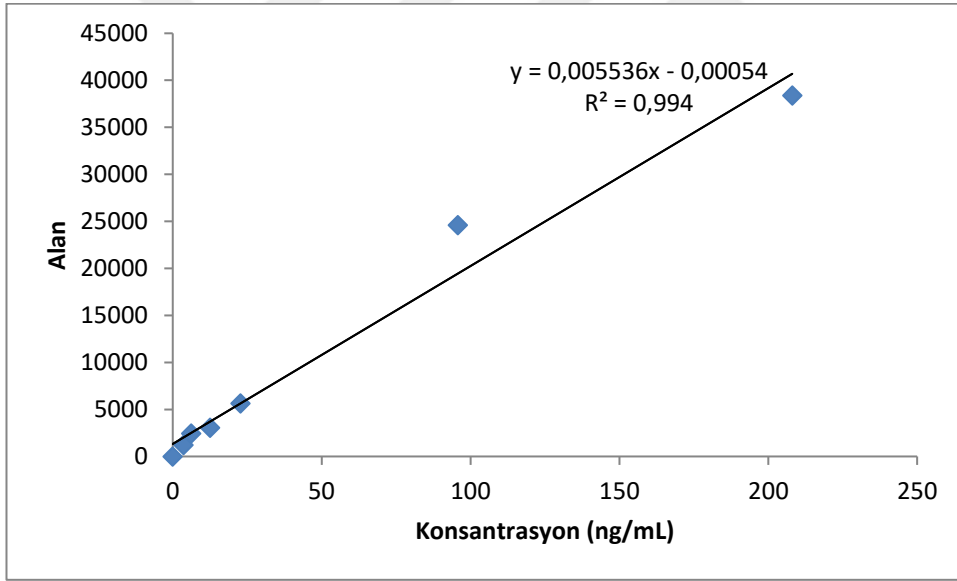
4.1. Analitik Validasyon Parametreleri

4.1.1. Doğrusallık (Linearite)

Doğrusallık analizini yaparken kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterol standartlarından 7 farklı konsantrasyonda (0, 3.125, 6.25, 12.5, 25, 50, 200 ng/mL) kalibratörler hazırlandı. Hazırlanan kalibratör standartlar kütle spektrometresinde (LC-MS/MS) 3 kez enjeksiyon yapılarak analiz edildi. Elde edilen iyon yoğunluk değerleri (intensity) ve alan/konsantrasyon verilerinin ortalama değerleri ile kalibrasyon eğrisi çizilmiştir. Bu eğrilerin korelasyon katsayıları (Correlation Coefficient) hesaplanmış ve elde edilen her bir kalibrasyon eğrisi için r^2 değeri 0.99'un (kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için 0.9998, 7-ketokolesterol için 0.994) üzerinde bulunmuştur (Şekil 4.1 ve Şekil 4.2).



Şekil 4.1. Kolestan-3β,5α,6β-triol lineer regresyon eğrisi



Şekil 4.2. 7-Ketokolesterol için lineer regresyon eğrisi

Kolestan-3β,5α,6β-triol ve 7-ketokolesterol için belirlenen konsantrasyonlarda hazırlanan standartlar LC-MS/MS cihazı ile başarılı bir şekilde ölçülebilmektedir (Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4).

Tablo 4.2. Standartların nominal ve ölçülen konsantrasyonları

Nominal değer (ng/mL)	Ölçülen değerler (ng/mL)	
	Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol (ng/mL)	7-Ketokolesterol (ng/mL)
0	0.99	1.3
3.125	3.29	3.15
6.25	6.01	5.44
12.5	11.91	12.42
25	23.44	24.31
100	101.89	91.22
200	199.28	204.5

Tablo 4.3. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için ardışık standart ölçümleri

C-Triol (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	\pm %20
0	1.02	1.01	0.95	0.99	Geçerli
3.125	3.39	3.27	3.20	3.29	Geçerli
6.25	6.02	5.93	6.07	6.01	Geçerli
12.5	11.77	12.08	11.9	11.91	Geçerli
25	23.38	24.01	22.94	23.44	Geçerli
100	104.22	100.50	100.96	101.89	Geçerli
200	192.97	202.61	202.26	199.28	Geçerli

Tablo 4.4. 7-KC için ardışık standart ölçümleri

7-KC (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	±%20
0	1.72	1.01	1.18	1.3	Geçerli
3.125	3.41	2.48	3.57	3.15	Geçerli
6.25	4.43	5.75	6.15	5.44	Geçerli
125	11.12	15.08	11.07	12.42	Geçerli
25	22.7	21.08	29.23	24.31	Geçerli
100	95.71	83.25	94.71	91.22	Geçerli
200	213.61	191.84	208.05	204.5	Geçerli

4.1.2. Doğruluk

Doğruluk analizi yapılırken, her iki analit (kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol ve 7-ketokolesterol) için en uygun matriks olan K2 EDTA içeren insan plazma havuzu kullanıldı. Bu matriks kullanılarak farklı analit konsantrasyonlarında (0 ng/mL, 100ng/mL, 200 ng/mL) kontrol örnekleri hazırlandı. Her bir örnek için 3 ayrı enjeksiyon yapıldı. Ölçümler sonrası ortalama değerler hesaplandı ve hedef değer ile kıyaslandı. Bulunan bu değer, hedef değer \pm %20'sini geçip geçmediği kontrol edildi (Tablo 4.5, Tablo 4.6).

Tablo 4.5. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol doğruluk değerlendirmesi

C-Triol (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	±%20
0	1.01	0.98	1.18	1.03	Geçerli
100	94.22	89.45	119.50	101.05	Geçerli
200	209.68	182.58	180.67	190.98	Geçerli

Tablo 4.6. 7-Ketokolesterol için doğruluk değerlendirmesi

7-KC (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)	±%20
0	1.01	1.03	1.05	1.04	Geçerli
100	86.65	99.88	100.02	95.52	Geçerli

4.1.3. Tekrarlanabilirlik

Kolestan-3β,5α,6β-triol ve 7-ketokolesterol için tekrarlanabilirlik çalışmasında K2 EDTA insan plazma matrisinde hazırlanmış 100 ng/mL konsantrasyonda örnekler kullanıldı. Her iki parametre için tekrarlanabilirlik verileri aşağıdaki tabloda özetlenmektedir (Tablo 4.7 ve Tablo 4.8).

Tablodaki standart sapma ve %CV değeri şu formül ile hesaplanmıştır;

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

$$\%CV = \frac{SD}{\bar{x}} * 100$$

SD: Tekrarlanabilirliğin standart sapması

\bar{x} : Ölçülen değer

x: Ölçülen değerlerin ortalaması

n: Ölçüm sayısı

Tablo 4.7. Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol için retansiyon zamanları ve konsantrasyonlara ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	Retansiyon zamanı (dk)	Konsantrasyon (ng/mL)
1.enjeksiyon	3.13	94.22
2.enjeksiyon	3.09	89.43
3.enjeksiyon	3.08	85.59
4.enjeksiyon	3.11	119.50
5.enjeksiyon	3.08	104.0
Ortalama	3.1	98.55
Standart sapma	0.01	13.58
%CV	0.61	13.78

Tablo 4.8. 7-Ketokolesterol için retansiyon zamanları ve konsantrasyonlara ait tekrarlanabilirlik sonuçları

	Retansiyon zamanı (dk)	Konsantrasyon (ng/mL)
1.enjeksiyon	7.45	86.65
2.enjeksiyon	7.26	99.88
3.enjeksiyon	7.22	100.02
4.enjeksiyon	7.18	84.55
5.enjeksiyon	7.19	102.55
Ortalama	7.26	94.73
Standart sapma	0.11	8.43
%CV	1.52	8.9

4.1.4. Saptama ve Ölçüm Limitlerinin Belirlenmesi

Saptama Limiti (Limit of Detection-LOD)

Çalışmamızda LOD değeri, kör örneklerin standart sapmaları üzerinden hesaplanmıştır. Kör örnekler C-triol ve 7-KC analitleri için 6 enjeksiyon verilerek aşağıdaki formül kullanılarak hesaplanmıştır.

Veriler tablo da gösterilmektedir (Tablo 4.9).

$$X_{LOD} = X_{KÖR} + 3 \times S_D$$

S_D = Kör örneklerin sonuçlarının standart sapmaları

$X_{KÖR}$ = Kör örneklerin ortalaması

Standart sapma formülü;

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

\bar{x} : Ölçülen değer

x : Ölçülen değerlerin ortalaması

n : Ölçüm sayısı

Ölçüm Limiti (Limit of Quantitation-LOQ)

Ölçüm aralığının alt sınırı, LOQ olarak tespit edilmektedir. Kabul edilebilir ve gerçeklikle ölçülen en düşük analit konsantrasyonu olan LOQ genellikle LOD değerinin 3 katı olarak da hesaplanabilmektedir.

Biz çalışmamızda ölçüm limitini (LOQ), kör örnekleri üzerinden $X_{LOQ} = X_{LOD} \times 3$ formülü kullanılarak hesapladık. Veriler tabloda gösterilmektedir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. C-triol ve 7-KC için hesaplanan LOD ve LOQ değerleri

	C-Triol (ng/mL)	7-KC (ng/mL)
1.Enjeksiyon	1.02	1.72
2. Enjeksiyon	1.01	8.91
3. Enjeksiyon	1.10	1.88
4. Enjeksiyon	0.95	1.18
5. Enjeksiyon	1.10	1.01
6. Enjeksiyon	1.09	1.60
Ortalama	1.04	2.91
Standart sapma	0.06	3.36
LOD	1.22	12.99
LOQ	3.66	38.97

4.1.5. Geri Kazanım

C-Triol ve 7-KC için 100 ng/mL’lik standartlar hazırlandı, elde edilen ölçüm sonuçlarında aşağıda gösterilen formüle göre geri kazanım yüzdesi hesaplandı.

$$\% \text{ Geri kazanım} = \text{Bulunan konsantrasyon} / \text{Referans konsantrasyon} * 100$$

$$\text{C-Triol için Geri kazanım} = 94.22 / 100 = 0.94 * 100 = 94$$

$$\text{7-KC için Geri kazanım} = 99.88 / 100 = 0.99 * 100 = 99$$

4.2. Türevlendirme Solüsyonu-2 İle Yapılan Analizler

Türevlendirme solüsyonunun konsantrasyon ve hacmi değiştirilerek yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlar tablolarda verilmiştir (Tablo 4.10 ve Tablo 4.11). Elde edilen analiz sonuçları Türevlendirme solüsyonu-1 ile benzer bulunmuştur.

Tablo 4.10. Türevlendirme solüsyonu-2 ile C-Triol ölçümü

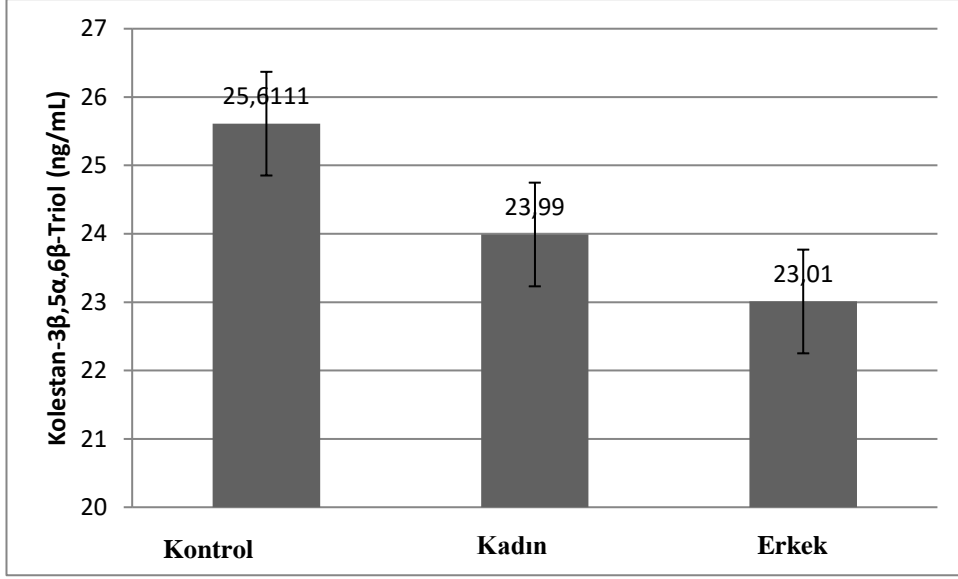
C-Triol (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	4.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)
0	0.08	0.02	0.04	0.02	0
100	94.22	89.43	85.59	119.50	97.19
200	178.43	180.67	209.68	182.58	187.84

Tablo 4.11. Türevlendirme solüsyonu-2 ile 7-KC ölçümü

7-KC (ng/mL)	1.Enjeksiyon (ng/mL)	2.Enjeksiyon (ng/mL)	3.Enjeksiyon (ng/mL)	4.Enjeksiyon (ng/mL)	Ortalama (ng/mL)
0	0.1	0.6	0	0	0
100	86.65	99.88	100.02	94.55	95.27
200	208.56	202.64	201.4	0	204.4

4.3. Sağlıklı Kontrollerde Plazma Kolestan-3 β ,5 α ,6 β -Triol Düzeyleri

Sağlıklı kontrollerde plazma kolestan-3 β ,5 α ,6 β -triol düzeyleri; minimum 15.7 ng/mL, maksimum 38.61 ng/mL aralığındaydı. Kadınlarda bu aralıklar 15.7- 38.61 ng/mL olarak bulunurken, erkeklerde 18.63-33.3 ng/mL olarak bulundu. Plazma C-Triol düzeyleri açısından kadın ve erkekler arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık gözlenmemiştir ($p>0.05$). Sonuçlar ortalama \pm SD olarak ifade edilmiştir (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Sağlıklı kontrollerde plazma kolestan-3β,5α,6β-triol düzeylerinin cinsiyete göre dağılımı

4.4. Sağlıklı Kontrollerde 7-Ketokolesterol Düzeyleri

7-ketokolesterol için kalibrasyon ve kalite kontrol örneklerinde geçerli sonuçlar alınmasına rağmen sağlıklı kontrollere ait plazma örneklerinde yapılan ölçümlerde tekrarlanabilir ve güvenilir sonuçlar elde edilemedi. Plazma örneklerinde 7-KC ile ilgili stabilite sorunu olduğu düşünüldü.

5. TARTIŞMA

Lizozomal depo hastalıkları (LDH); sfingolipid, glikozaminoglikan, glikoprotein ve glikojen gibi birçok substratın parçalanma ve uzaklaştırılma mekanizmasında hasar oluşmasıyla meydana gelen kalıtsal geçişli hastalıklardır. Bu substratlar, bir kompleks halinde lizozom içerisinde depolanmaktadır. Hücrelerde biriken bu bileşikler çeşitli fonksiyon bozukluklarına yol açmaktadır. Biriken bu bileşiklerin kimyasal özelliklerine göre 60'tan fazla lizozomal depo hastalığı bilinmektedir. Eritrosit hariç bütün hücrelerde lizozom bulunduğu için, bu hastalıklar tüm organları etkileyen, ilerleyici bozukluklardır ve yaşla birlikte patolojik semptomları artmaktadır. Hastalık lizozomlarda eksik olan enzime ait substratın sindirilememesi ve hücre içinde aşırı birikimiyle ortaya çıkar. Bu hastalıkların teşhisi, hastaların lökositlerinde veya fibroblast kültürlerinde enzim aktivitesinin tespitine dayanır. Lizozomal depo hastalıklarının diğer bir özelliği klinik ve genetik heterojenite göstermeleridir.

Niemann Pick tip-C hastalığı (NP-C), nadir görülen (1:89000) otozomal resesif, nörovisseral lipid depolanması ile karakterize bir lizozomal depo hastalığıdır. Bu hastalığa, NPC1 ve NPC2 genlerinde meydana gelen mutasyonlar sebep olmaktadır (Pentchev ve ark., 1985). Bu genlerdeki mutasyonlar; hücre içindeki lizozomlardaki kolesterol transportunun bozulmasına, MSS ve iç organlarda glikosfingolipidlerin ve kolesterolün birikmesine neden olur. NP-C'nin tipinin, şiddetinin ve ortaya çıkış yaşının aşırı değişkenliğinden dolayı klinik tanısını koymak oldukça güç olmaktadır (Vanier ve ark., 2010). Bazı vakalarda, belirsiz semptomların tespit edilmesindeki yavaşlıktan ve uzmana yönlendirildikten sonra çok uzun süre ve iş gerektiren tanı testlerinin uygulanmasından dolayı kesin tanıya ulaşmak uzun yıllar sürebilmektedir (Patterson ve ark., 2012). Önceki yıllarda, NP-C için hızlı ve spesifik biyokimyasal testlerin yokluğu, hastalığa sahip bireylerin tespit edilmesinde bir engel olarak görülmüştür. NP-C için Filipin boyama, altın standart olarak tanı testi olarak görülmektedir. Ancak Dünya çapında sadece bazı özelleşmiş laboratuvarlarda yapılan, sınırlı duyarlılığa sahip, çok zaman gerektiren bir metottur. NPC1 ve NPC2 gen mutasyon analizi, Filipin boyamasından sonra doğrulama testi olarak sıklıkla yapılmaktadır ancak bazı vakalarda kesin sonuç vermeyebilmektedir (McKay ve ark., 2014). Özellikle çocuklarda ve erişkinlerde nörolojik bulguların ilerlemesini

azalttığı veya durdurduğu gösterilmiş, onaylanmış ve hastalığa spesifik bir farmakolojik tedavi (misglustat) varken, NP-C'nin daha hızlı tanısına olanak kılan laboratuvar tanı metotlarına ihtiyaç vardır.

Bu nedenle, non-enzimatik olarak oluşan kolesterol oksidasyon ürünlerinin belirlenmesi, NP-C'nin daha hızlı tanısına olanak verebilecek ümit verici, duyarlı bir yöntem olarak önerilmektedir. Bu oksisterollerden özellikle C-triol ve 7-KC, yakın zamanda NP-C hastalığının tanısız biyobelirteçleri olarak gösterilmektedir (Poter ve ark., 2010). Yapılan çalışmalarda, NP-C hastaların plazma örneklerinde C-Triol ve 7-KC'nin anlamlı artışlar gösterdiği gözlenmiştir (Polo ve ark., 2016; Jiang ve ark., 2011). Literatürde oksisterol ölçümleri için genellikle uzun zaman alan ve zahmetli olarak nitelendirilen birçok farklı yöntem bulunmaktadır. Çalışmamızın amacı, insan plazmasındaki oksisterollerin tespiti için, literatür bilgileri ışığında, klinik laboratuvar ortamında kolay uygulanabilen, duyarlı, yüksek verimli bir yöntemi geliştirmektir. Geliştirilen yöntem; birçok nörolojik hastalığın araştırılmasında yararlı olmasının yanı sıra, özellikle çok zor tanı koyulan bir lizozomal depo hastalığı olan NP-C'nin erken tanısında da kullanılacaktır.

Kütle spektrometrik yöntemlerle yapılan C-triol ve 7-KC analizi; NP-C tanısında çok daha yüksek duyarlılık ve özgüllük sunmaktadır. Ancak bu yöntemlerde, çok hızlı bozulan oksisterollerin iyonizasyon etkinliğini artırmak için kimyasal türevlendirme gerekmektedir ve günümüze kadar birçok farklı türevlendirme ajanı denenmiştir (Griffiths ve ark., 2013). Bu yöntemlerden biri olan pikolinil ester ile türevlendirme, oksisterollerini saptamak için geliştirilen bir yöntemdir (Honda ve ark., 2009; Ikegami ve ark., 2009). Honda ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, oksisterollerin pikolinil estere dönüşmesi için uyguladıkları prosedürün 80°C de 1 saat inkübasyon içerdiği için kolesterol otooksidasyonuna sebep olabileceği ve yanlış pozitif sonuçlar oluşturabileceğini bildirmişlerdir (Honda ve ark., 2009). Griffiths ve ark., ise, LC-MS/MS yöntemi ile oksisterollerin Girard hidrazon türevlerinin analizini yapmışlar fakat nicel veriler sağlayamamışlardır (Griffiths ve ark., 2006). N,N-dimetilglisin (DMG) esterleri ile türevlendirmeyi içeren diğer kütle spektrometrik yöntemlerde ESI ve APCI iyonizasyon kaynakları denenmiş, her ikisinin de duyarlı ve güvenilir olduğu kabul edilmiştir (Jiang ve ark., 2007; Polo ve ark., 2016; Klinke ve ark., 2015; Jiang ve ark., 2011). Bu türevlendirme ajanlarından başka, trimetilglisin (TMG) ve mono-(dimetilaminoetil)-süksinil (MDMAES) esterleri gibi farklı

türevlendirmelerle yapılan ölçümler DMG ile karşılaştırıldığında; C-triol için ESI iyonizasyon ile duyarlı bulunmuş fakat konsantrasyon artışlarını yansıtmada DMG kadar başarılı olamamıştır (Johnson ve ark., 2001). Biz bu çalışmada; DMG, DMAP ve EDC türevlendirme ajanları ve ESI iyonizasyon kullanılarak C-triol'ün kütle spektrometrik yöntemle başarıyla ölçülebildiğini gözlemledik. Fakat aynı türevlendirme ajanları ile yapılan ölçümler, 7-KC için duyarlı ve tekrarlanabilir bulunamadı.

Oksisterol analizinde bir diğer önemli basamak ise örneklerin ekstraksiyon işlemidir. Örnek ekstraksiyonu yapılırken çok özenli ve dikkatli çalışılması gereklidir. Boenzi ve ark., yaptıkları çalışmada, türevlendirme için ayrılan zamanı kısaltmak için sıcaklığı 65°C'ye arttırmış, süreyi ise 15 dakikaya indirmişlerdir. Biz bu yöntemi denediğimizde C-Triol ve 7-KC'ün bu sıcaklıkta yalancı yüksek sonuçlar verdiğini gözlemledik. Özellikle 7-KC'nin moleküler yapısından kaynaklanan hızlı oksidasyon nedeniyle ölçümünün zorluğu literatürde de bildirilmektedir. Çalışmamızda yüksek sıcaklığın oksisteroller üzerindeki etkilerini azaltmak için türevlendirme işlemi, Polo'nun çalışmasında belirtildiği gibi 45°C'de, 1 saat süreyle yapılmıştır (Polo ve ark., 2016). Polo ve arkadaşları oksisterollerin ekstraksiyonu için hekzan ile iki basamaklı likit-likit ekstraksiyonu tercih etmişlerdir (Polo ve ark., 2016). Biz çalışmamızda hekzan ile iki basamaklı likit-likit ekstraksiyonunu kullandığımızda, analiz sonuçlarında tekrarlanabilirlik açısından problem oluştuğunu gözlemledik. Bunun nedeni enjeksiyon öncesinde temiz bir örnek sağlamak amacıyla yapılan likit-likit ekstraksiyon basamağının manipülasyon tekniğinden çok etkilenmesi ve çeşitli dış interferanslara duyarlı olmasıdır. Bu nedenle sonraki denemelerimizde likit-likit ekstraksiyon basamağını kaldırdık. Bu değişiklik ile C-triol analizinde tekrarlanabilirlik ve doğruluk ile ilgili ideal sonuçları elde ettik. 7-KC analizinde kalibrasyon ve kalite kontrol sonuçları; tekrarlanabilirlik, doğruluk, geri kazanım, vb. açılardan kabul edilebilir olmasına rağmen sağlıklı kontrollere ait plazma örneklerinde aynı sonuçlara ulaşamadı. Literatürde de likit-likit ekstraksiyon aşamasının daha basite indirilmesine rağmen başarılı sonuçlar elde edilen çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (Helmschrodt ve ark., 2014). Ayrıca oksisterol ölçümlerinde türevlendirici ajan tipinin yanı sıra konsantrasyonunun farklılığı ile ilgili çalışmalar da bulunmaktadır. Klinke ve arkadaşları DMG türev solüsyonunun hacmini beş kat arttırdıklarında sonuç kalitesinde ve geri kazanım değerlerinde

belirgin düzelme gözlemiştir (Klinke ve ark., 2015). Bizim çalışmamızda, literatürde yer aldığı şekilde DMG ile türevlendirme, türevlendirici ajan konsantrasyonunun artırılması, likit-likit ekstraksiyonunun yapılması veya kaldırılması gibi basamakların hepsi, her iki parametre için denenmiştir. Her iki parametre için elde ettiğimiz sonuçların büyük bir kısmı, literatürde bildirilen verilerle uyum göstermektedir. Örneğin; Klinke ve arkadaşları C-Triol ve 7-KC için gün içi kesinlik değerlerini sırasıyla % 4.8 ve % 4.1, geri kazanımı sırasıyla % 93 ve % 107 olarak bildirmişlerdir. Bizim gün içi kesinlik değerlerimiz Klinke'nin belirttiği değerlerden daha yüksek (C-Triol: % 13.78, 7-KC: % 8.9) olmasına rağmen kütle spektrometrik çalışmalarda kabul edilen % 20'lik RSD (Rölatif Standart Deviation) değerinin altında bulunmuştur. Aradaki farklılıkların ekipman kaynaklı olduğu düşünülmüştür. Jiang ve arkadaşları yaptıkları analitik yöntem çalışması sonucunda sağlıklı kontrollerde C-Triol düzeylerini 7.42-21.2 ng/mL aralığında belirlerken, biz de çalışmamızda sağlıklı kontrollerde C-Triol düzeylerini 15.7-38.61 ng/mL aralığında ölçerek literatür ile uyumlu sonuçlar elde ettik.

7-KC analizinde kalibrasyon ve kalite kontrol sonuçları; tekrarlanabilirlik, doğruluk, geri kazanım, vb. açılardan kabul edilebilir olmasına rağmen sağlıklı kontrollere ait plazma örneklerinde aynı sonuçlara ulaşamadı. Bu sonuçlar 7-KC'nin, NP-C hastalığı için bir biyobelirteç olamayacağını ancak örnek stabilitesini ve matriks etkisini tespit etmede yardımcı olabileceğini bize gösterdi. Literatürde de yapılan çalışmalarda NP-C tanısında C-Triol'ün güvenilir bir biyobelirteç olduğu, 7-KC'nin ise ancak örneklerin saklama koşullarını değerlendirmek için kullanılabileceği ifade edilmektedir. Özellikle örneklerin -80°C yerine -20°C'de saklanmasıyla, ilk 30 gün içinde bile 7-KC artışı gözlenmektedir (Polo ve ark., 2016).

Oksisterol analizi için özel kan tüpüne ihtiyaç yoktur. Rutin biyokimya laboratuvarında kullanılan çeşitli tüpler analiz için yeterlidir. Aynı zamanda az miktarda örnek hacmi (50 µL) gerektirmesi oksisterol analizlerini kolaylaştıran diğer bir unsurdur. EDTA'lı plazma tercih edilmesine rağmen, serum, lityum heparinli plazma, sitratlı plazma gibi örneklerde de analiz yapılabilir. Literatürde serum 7-KC konsantrasyonlarının plazmaya göre daha yüksek olduğu, bunun nedenin de oda ısısında 20-30 dakikalık pıhtılaşma süresinin 7-KC konsantrasyonlarını arttırması olduğu bildirilmektedir (Helmschrodt ve ark., 2014).

NP-C hastalığının prevalansı 1:89000 iken, sarılığı olan yenidoğanlarda, psikiyatrik hastalığı olan ve nörolojik semptomlar gösteren yetişkinlerde daha sık gözlenmektedir. Bu nedenle, oksisterol analizinin NP-C hastalığı açısından riskli popülasyonlarda daha yaygın kullanım sağlanması ve faydalı olması beklenmektedir (Yerushalmi ve ark., 2002; Bauer ve ark., 2008). NP-C hastalığının klinik bulguları, diğer birçok lizozomal depo hastalıklarına benzer olduğundan plazma oksisterollerinin ölçümü klinisyenlere, özellikle hepatosplenomegali görülen hastalarda NP-C şüphesini dışlamak için yararlı olacaktır (Porter ve ark., 2010). Yenidoğan tarama testlerine oksisterollerin integrasyonu ile NP-C hastalığının özellikle semptom vermeyen hastalarda erken tanı alması mümkün olacaktır (Yanjanin ve ark., 2010). Tarama testleri sayesinde, tanısı güç olduğu için belirlenemeyen ve insidansı düşük olarak bildirilen NP-C hastalığının da gerçek insidansı ortaya konulabilecektir. Plazma oksisterol konsantrasyonları, sadece NP-C hastalarında değil heterozigot bireylerde de artmaktadır. Porter ve ark.'nın yaptığı çalışmada, heterozigot bireylerde oksisterol düzeylerinin sağlıklı kontrollere göre yaklaşık 1.3-1.6 kat artış gösterdiği bildirilmektedir (Porter ve ark., 2010). Vücuttaki oksidatif stres artışı, kolesterol oksidasyonunu dolayısıyla C-triol ve 7-KC gibi oksisterollerini artırdığından, oksidatif stresle ilişkili ateroskleroz ve nörodejeneratif hastalıklarda da oksisterol ölçümleri riskli bireyleri tanımlamada faydalı olabilir.

Bu çalışmanın primer amacı NP-C hastalığının tanısında ve tedavi etkinliğinin izlenmesinde önemli biyobelirteçler olarak öne sürülen C-Triol ve 7-KC oksisterollerinin, LC-MS/MS ile ölçümünü kendi laboratuvarımız koşullarında yapabilmek, yöntemimizin analitik validasyonunu değerlendirmek ve sağlıklı kontrollere ait plazma konsantrasyonlarını belirlemektir. Çalışma süresinde NP-C hastalığı şüphesi olan hastalara ulaşamadığı için yöntemimizin tanısız performansını gözlemek mümkün olamamıştır. Bu çalışma sayesinde, duyarlı ve spesifik bir yöntemin laboratuvarımızda denenmiş ve kullanıma hazır olması, herhangi bir NP-C hastalığı şüphesi durumunda, fibroblast Filipin boyası gibi invaziv ve zaman alıcı bir tetkikle karşılaştırıldığında tıbbi tanı açısından çok faydalı olacaktır.

6.SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızın sonuçlarını şu şekilde özetleyebiliriz:

1. Plazma oksisterollerinden C-triol ve 7-KC'nin kütle spektrometrik yöntemle ölçümünün analitik validasyonu yapıldı. Analitik validasyon parametrelerinden; doğruluk, doğruluk analizi, tekrarlanabilirlik, saptama limiti (LOD), ölçüm limiti (LOQ) ve geri kazanım değerlendirildi.
2. C-triol ve 7-KC için oluşturulan lineer regresyon eğrisinde; C-triol $r^2:0.999$, 7-KC için $r^2:0.994$ olarak bulundu.
3. Doğruluk analizinde en az iki düzeyde hazırlanmış olan kalite kontrol örneklerinde C-triol ve 7-KC konsantrasyonları $\pm\% 20$ 'lik aralıkta bulundu.
4. Verilerimize göre LOD değeri, C-triol için 1.22 ng/mL, 7-KC için 12.99 ng/mL olarak hesaplanırken, LOQ değeri, C-triol için 3.66 ng/mL, 7-KC için 38.97 ng/mL olarak hesaplandı.
5. 25 kişiden oluşan kontrol grubunda C-triol analizi güvenilir bir şekilde gerçekleştirilerek plazmadaki konsantrasyonları hesaplandı. (min: 15.7, max: 38.61; ortalama \pm SD: 25.61 \pm 9.2 ng/mL)
6. Kontrol grubunda plazma 7-ketokolesterol konsantrasyonlarına ait standart sapmalar çok yüksek bulunduğu için plazma matriksinin ölçüm üzerinde interferans yaptığı veya plazmada 7-KC stabilitesinin bozulduğu düşünüldü.
7. C-triol ve 7-KC analizi iki farklı türevlendirme yöntemi denenerek karşılaştırıldı. Türevlendirme ajanının konsantrasyonunun artırılmasının analiz kalitesini çok değiştirmediği gözlemlendi.

Çalışma sonuçlarımıza göre önerilerimiz;

Örnek ekstraksiyonunda, türevlendirme basamağı oksisterol analizi için oldukça önemlidir. Türevlendirme solüsyonu eklendikten sonra inkübe edilen örneklerde sarı rengin oluşması başarılı bir türevlendirmenin olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda türevlendirme ajanının konsantrasyonunun artırılmasıyla benzer veriler elde edilmiştir. Duyarlı bir çalışma ve ön hazırlık gerektiren plazma oksisterol analizinde önerebileceğimiz bilgiler literatürde belirtildiği gibi yeni bir yöntem olduğundan sınırlıdır.



KAYNAKLAR

Abildayeva K., Jansen P.J., Hirsch-Reinshagen V., Bloks V.W., Bakker A.H.F., Ramaekers, F.C.S., de Vente J., Groen, A.K., Wellington, C.L., Kuipers F., Mulder M.. 24(S)-hydroxycholesterol participates in a liver X receptor-controlled pathway in astrocytes that regulates apolipoprotein E-mediated cholesterol efflux. *J. Biol. Chem.* 2006; 281, 12799–12808.

Ahyayauch H., Larijani B., Alonso A., Goni F.M. Detergent solubilization of phosphatidylcholine bilayers in the fluid state: influence of the acyl chain structure. *Biochim. Et Biophys. Acta-Biomembr.* 2006; 1758, 190–196.

Amraoui Y., E. Mengel, J.B. Hennermann. Oxysterols in NP type C: limitations of sensitivity and specificity. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014; 37 S150.

Andrew P. Lea, Dona McTavish. Atorvastatin: A review of its Pharmacology and therapeutic potential in the management of hyperlipidemias. *Drugs* 1997; 53: 828-847.

Bauer P. T. Boettcher, Meyer W., Martus P., Weiss S., Oheim R., Heinze K., Wittstock M. and Rolfs A. Niemann-Pick type C disease (NP-C) is a considerable diagnosis in juvenile and adultonset psychiatric disorders. *In: Annual Meeting of the American Society of Human Genetics (ASH-G), Philadelphia.*2008; 188-190.

Bjorkhem I., Breuer O., Angelin B., and Wikstrom S.A. Assay of unesterified cholesterol-5,6-epoxide in human serum by isotope dilution mass spectrometry. Levels in the healthy state and in hyperlipoproteinemia. *J. Lipid Res.* 1988; 29:1031 – 1038.

Bjorkhem I. Crossing the barrier: oxysterols as cholesterol transporters and metabolic modulators in the brain. *J. Intern. Med.* 2006; 260, 493–508.

Bjorkhem, I., Cedazo-Minguez A., Leoni V., Meaney S. Oxysterols and neurodegenerative diseases. *Mol. Aspects Med.* 30, 2009;171–179.

Bjorkhem I., Lovgren-Sandblom A., Leoni V., Meaney S., Brodin L., Salveson L., Winge K., Palhagen S., Svenningsson P. Oxysterols and Parkinson's disease:

evidence that levels of 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid correlates with the duration of the disease. *Neurosci. Lett.* 2013; 555, 102–105.

Bjorkhem I., Lutjohann D., Diczfalusy U., Stahle L., Ahlborg G., Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 1999; 39, 1594–1600.

Björkhem I. Rediscovery of cerebrosterol. *Lipids* 2007; 42, 5–14.

Blennow K., de Leon M.J., Zetterberg H. Alzheimer's disease. *Lancet* 2006; 368, 387–403.

Boenzi S., Deodato F., Taurisano R., Martinelli D., Verrigni D., Carrozzo R., Bertini E., Pastore A., Dionisi-Vici C., Johnson D.W. A new simple and rapid LC-ESI-MS/MS method for quantification of plasma oxysterols as dimethylaminobutyrate esters. Its successful use for the diagnosis of Niemann-Pick type C disease, *Clin. Chim. Acta* 437 2014; 93–100.

Boot R.G., Renkema G.H., Verhoek M., Strijland A., Blik J., T.M. de Meulemeester, Mannens M.M., Aerts J.M. The human chitotriosidase gene. Nature of inherited enzyme deficiency, *J. Biol. Chem.* 1988; 273-25680–25685.

Bosco D.A., Fowler D.M., Zhang Q., Nieva J., Powers E.T., Wentworth Jr P., Lerner R.A., Kelly J.W. Elevated levels of oxidized cholesterol metabolites in Lewy body disease brains accelerate alpha-synuclein fibrilization. *Nat. Chem. Biol.* 2006;2, 249–253.

Börkhem U. Diczfalusy, Lutjohann D. Removal of cholesterol from extrahepatic sources by oxidative mechanisms. *Current Opinion in Lipidology.* 1999;161–165.

Brown A.J., Jessup W. Oxysterols and atherosclerosis. *Atherosclerosis. . Mol. Aspects Med.* 1999;142, 1– 28.

Brown A.J., Jessup W. Oxysterols: sources, cellular storage and metabolism, and new insights into their roles in cholesterol homeostasis. *Mol. Aspects Med.* 2009;30, 111–122.

Brown A.J., Watts G.F., Burnett J.R., Dean R.T., Jessup W. Sterol 27- hydroxylase acts on 7-Ketocholesterol in human atherosclerotic lesions and macrophages in culture. *J. Biol. Chem.* 2000; 275, 27627–27633.

Brown D.A., London E. Structure of detergent-resistant membrane domains: does phase separation occur in biological membranes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2007; 240, 1–7.

Burlot M.A., Braudeau J., Michaelsen-Preusse K., Potier B., Ayciriex S., Varin J., Gautier B., Djelti F., Audrain M., Dauphinot L., Fernandez-Gomez F.J., Caillierez R., Laprevote O., Bieche I., Auzeil N., Potier M.C., Dutar P., Korte M., Buee L., Blum D., Cartier N. Cholesterol 24-hydroxylase defect is implicated in memory impairments associated with Alzheimer-like Tau pathology. *Hum. Mol. Genet.* 2015; 24, 5965–5976.

Bustamante A, Dominguez C., Rodriguez-Sureda V., Vilches A., Penalba A., Giralt D., Garcia-Berrocoso, V. Llombart, A. Flores, M. Rubiera, C.Molina, J. Alvarez-Sabin, J. Montaner, Prognostic value of plasma chitotriosidase activity in acute stroke patients, *Int. J. Stroke* 9. 2014; 910–916.

Carpenter K.L, Good H. COP, Bad COP: an unsolved murder. Are dietary cholesterol oxidation products guilty of atherogenicity. *Br. J. Nutr.* 2002; 88, 335–338.

Charbonneau C., Fournier I., Dufresne S., Barwicz J., Tancrede P. The interactions of amphotericin B with various sterols in relation to its possible use in anticancer therapy. *Biophys. Chem.* 2001; 91, 125–133.

Chen W., Chen G., Head D.L., Mangelsdorf D.J., Russell D.W. Enzymatic reduction of oxysterols impairs LXR signaling in cultured cells and the livers of mice. *Cell Metab.* 2007;5, 73–79.

Chiang J.Y.L. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J. Hepatol.* 2007; 40, 539–551.

Chisolm G.M., Steinberg D. The oxidative modification hypothesis of atherogenesis: an overview. *Free Radic. Biol. Med.* 2000; 28, 1815–1826.

Cooks R.G., Busch K.L., Glish G.L. Mass spectrometry: analytical capabilities and potentials. *Science*. 1983; 21: 222(4621): 273-91.

DuSell C.D., Nelson E.R., Wang X.J., Abdo J., Moedder U.I., Umetani M., Gesty-Palmer D., Javitt N.B., Khosla S., McDonnell D.P. The endogenous selective estrogen receptor modulator 27-Hydroxycholesterol is a negative regulator of bone homeostasis. *Endocrinology*. 2010;151, 3675–3685.

Elmonem M.A., Amin H.S., El-Essawy R.A., Mehaney D.A., Nabil M., Kamel L.N., Farid I.M. Association of chitotriosidase enzyme activity and genotype with the risk of nephropathy in type 2 diabetes, *Clin. Biochem*. 2016;49,444–448.

Epanand R.M., Bottega R. Modulation of the phase-transition behavior of phosphatidylethanolamine by cholesterol and oxysterols. *Biochemistry* 1987;26, 1820–1825.

Epanand R.M., Bottega R.. Modulation of the phase-transition behavior of phosphatidylethanolamine by cholesterol and oxysterols. *Biochemistry* 1987;26, 1820–1825.

Fakheri R.J., Javitt N.B. 27-Hydroxycholesterol, does it exist: On the nomenclature and stereochemistry of 26-hydroxylated sterols. *Steroids*. 2012; 77, 575–577.

Fruhwrth G.O., Loidl A., Hermetter A. Oxidized phospholipids: from molecular properties to disease. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Basis of Disease* 2007;1772, 718–736.

Fuda H., Javitt N.B., Mitamura K., Ikegawa S., Strott C.A. Oxysterols are substrates for cholesterol sulfotransferase. *J. Lipid Res*. 2007;48, 1343–1352.

Gamba P., Testa G., Gargiulo S., Staurenghi E., Poli G., Leonarduzzi G. Oxidized cholesterol as the driving force behind the development of Alzheimer's disease. *Front. Aging Neurosci*. 2015;7.

Gelissen I.C., Rye K.A., Brown A.J., Dean R.T., Jessup W. Oxysterol efflux from macrophage foam cells: the essential role of acceptor phospholipid. *J. Lipid Res*. 1999; 40, 1636–1646.

Gill S., Chow R., Brown A.J. Sterol regulators of cholesterol homeostasis and beyond: the oxysterol hypothesis revisited and revised. *Prog. Lipid Res.* 2008;47, 391–404.

Goldstein J.L., Ho Y.K., Basu S.K., Brown M.S. Binding site on macrophages that mediates uptake and degradation of acetylated low density lipoprotein, producing massive cholesterol deposition. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1979;76, 333–337.

Graham A., Allen A.-M. Mitochondrial function and regulation of macrophage sterol metabolism and inflammatory responses. *World Journal of Cardiology.* 2015;7, 277–286.

Green M. *A Practical Guide to Analytical Method Validation, Analytical Chemistry,* 1966; 68,305- 309.

Griffiths W.J., Crick P.J., Wang Y. Methods for oxysterol analysis: past, present and future. *Biochem Pharmacol* 2013;86:3–14.

Griffiths W.J., Wang Y., Alvelius G., Liu S., Bodin K., Sjövall J. Analysis of oxysterols by electrospray tandem mass spectrometry. *JAmSocMass Spectrom.* 2006;17(3):341–62.

Grivennikov S.I., Greten F.R., Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* 2010; 140, 883–899.

Guardiola F., Dutta P.C., Codony R., Savage G.P. *Cholesterol and Phytosterol Oxidation Products: Analysis, Occurrence, and Biological Effects.* AOCS Press, Champaign, Illinois (USA) 400 pages, 2002;ISBN 1-893997-34-0.

Helmschrodt C., Becker S., Schröter J., et al. Fast LC–MS/MS analysis of free oxysterols derived from reactive oxygen species in human plasma and carotid plaque. *Clin Chim Acta.* 2013;425:3–8.

Hempfen C., Wanschers H., van der Sluijs Veer G. A fast liquid chromatographic tandem mass spectrometric method for the simultaneous determination of total homocysteine and methylmalonic acid. *Anal Bioanal Chem.* 2008; 391: 263–70.

Honda A, Yamashita K, Hara T, et al. Highly sensitive quantification of key regulatory oxysterols in biological samples by LC–ESI-MS/MS. *J Lipid Res* 2009;50(2):350–7.

Ikegami T, Hyogo H, Honda A, et al. Increased serum liver X receptor ligand oxysterols in patients with non-alcoholic fatty liver disease. *J Gastroenterol* 2012;47(11):1257–66.

Ikonen E., Jansen M.. Cellular sterol trafficking and metabolism: spotlight on structure. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2008;20, 371–377.

Jahnova H., Dvorakova L., Vlaskova H., Hulkova H., Poupetova H., Hrebicek M., P.Jesina Observational, retrospective study of a large cohort of patients with Niemann-Pick disease type C in the Czech Republic: a surprisingly stable diagnostic rate spanning almost 40 years, *Orphanet J. Rare Dis.* 9. 2014; 140.

Javitt N.B. Oxysterols: novel biologic roles for the 21st century. *Steroids.* 2008;73, 149–157.

Jessup W., Brown A.J. Perspective—novel routes for metabolism of 7-ketocholesterol. *Rejuvenation Res.* 2005;8, 9–12.

Jiang X., Ory D.S., Han X. Characterization of oxysterols by electrospray ionization tandem mass spectrometry after one-step derivatization with dimethylglycine. *Rapid Commun Mass Spectrom.* 2007;21(2):141–52.

Jiang X., Sidhu R., Porter FD., et al. A sensitive and specific LC–MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann–Pick C1 disease from human plasma. *J Lipid Res.* 2011;52(7):1435–45.

Jiang X., R. Sidhu, F.D. Porter, N.M. Yanjanin, A.O. Speak, D.T. te Vruchte, F.M. Platt, H. Fujiwara, D.E. Scherrer, J. Zhang, D.J. Dietzen, J.E. Schaffer, D.S. Ory, A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma, *J. Lipid Res.* 2011; 1435–1445.

Johnson D.W., ten Brink H.J., Jakobs C. A rapid screening procedure for cholesterol and dehydrocholesterol by electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Lipid Res.* 2001;42(10):1699–705.

Jurkiewicz P., Olzyńska A., Cwiklik L., Conte E., Jungwirth P., Megli F.M., Hof M.. Biophysics of lipid bilayers containing oxidatively modified phospholipids: insights from fluorescence and EPR experiments and from MD simulations. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes.* 2012; 1818, 2388– 2402.

Jusakul A., Yongvanit P., Loilome W., Namwat N., Kuver R.. Mechanisms of oxysterol-induced carcinogenesis. *Lipids in Health and Disease.* 2011; 10, 44.

Kannenberg F., Nofer J.R., Schulte E., Reunert J., Marquardt T., Fobker M. Determination of serumcholestane-3beta,5alpha,6beta-triol by gas chromatography–mass spectrometry for identification of Niemann-Pick type C (NPC) disease, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2016

Keller R.K., Arnold T.P., Fliesler S.J. Formation of 7-dehydrocholesterol- containing membrane rafts in vitro and in vivo, with relevance to the Smith- Lemli-Opitz syndrome. *J. Lipid Res.* 2004;45, 347–355.

Kiser R.W., Sullivan R.E. Mass spectrometry. *Anal Chem* 1968; 40: 273-98.133

Banks J.F., Shen S., Whitehouse C.M., Fenn J.B. Ultrasonically assisted electrospray ionization for LC/MS determination of nucleosides from a transfer RNA digest. *Anal Chem.* 1994; 66: 406-14.

Klinke G., Rohrbach M., Giugliani R , Burda P., Baumgartner M.R., Tran C., Gautschi M., Mathis D., Hersberger M. LC-MS/MS based assay and reference intervals in children and adolescents for oxysterols elevated in Niemann-Pick diseases, *Clin. Biochem.* 2015;596–602.

Kreilau F., Spiro A.S., McLean C.A., Garner B., Jenner A.M.. Evidence for altered cholesterol metabolism in Huntington's disease post mortem brain tissue. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015;12286.

Kruth H.S., M.E. Comly, J.D. Butler, M.T. Vanier, J.K. Fink, D.A. Wenger, S. Patel, P.G. Pentchev, Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 1986;16769–16774.

Kucerka N., Pencer J., Nieh M.-P., Katsaras J. Influence of cholesterol on the bilayer properties of monounsaturated phosphatidylcholine unilamellar vesicles. *Eur. Phys. J. E* 2007; 23, 247–254.

Kuhn J., Götting C., Kleesiek K. Rapid micro-scale assay for homocysteine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clinical Biochemistry.* 2006; 39: 164-6.

Kulig W., Olzyska A., Jurkiewicz P., Kantola A.M., Komulainen S., Manna M., Pourmoussa M., Vazdar M., Cwiklik L., Rog T., Khelashvili G., Harries D., Telkki V.V., Hof M., Vattulainen I., Jungwirth P. Cholesterol under oxidative stress-how lipid membranes sense oxidation as cholesterol is being replaced by oxysterols. *Free Radic. Biol. Med.* 2015;84, 30–41.

Lacey J.M., Magera M.J., Matern D., Rinaldo P, O'Brien JF. A method for the rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography–mass spectrometry. *J Inher Metab Dis.* 2000; 23: 178.

Lehrer M. In Kaplan LA. *Mass spectrometry.* St.Louis: Mosby Company, 1996; 167-84.

Leoni V., Caccia C. The impairment of cholesterol metabolism in Huntington disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids* 2015;1851, 1095–1105.

Malgrange B., Varela-Nieto I., de Medina P., Paillasse M.R.. Targeting cholesterol homeostasis to fight hearing loss: a new perspective. *Front. Aging Neurosci.* 2015;7.

Martinez G.V., Dykstra E.M., Lope-Piedrafita S., Job C., Brown M.F. NMR elastometry of fluid membranes in the mesoscopic regime. *Phys. Rev. E.* 2002; 66, 050902.

Massey J.B. Membrane and protein interactions of oxysterols. *Curr. Opin. Lipidol.* 2006;17, 296–301.

Massey J.B., Pownall H.J. The polar nature of 7-Ketocholesterol determines its location within membrane domains and the kinetics of membrane microsolubilization by apolipoprotein A-I. *Biochemistry.* 2005; 44, 10423–10433.

Massey J.B., Pownall H.J. Role of oxysterol structure on the microdomain-induced microsolubilization of phospholipid membranes by apolipoprotein A-I. *Biochemistry.* 2005;44, 14376–14384.

Massey J.B., Pownall H.J. Structures of biologically active oxysterols determine their differential effects on phospholipid membranes. *Biochemistry.* 2006; 45, 10747–10758.

Maxfield F.R., Tabas I. Role of cholesterol and lipid organization in disease. *Nature.* 2005; 438, 612–621.

Meaney S., Bodin K., Diczfalusy U., Bjorkhem I. On the rate of translocation in vitro and kinetics in vivo of the major oxysterols in human circulation: critical importance of the position of the oxygen function. *J. Lipid Res.* 2002;43, 2130–2135.

Menendez-Carreno M.C., Garcia-Herreros, Astiasaran I., and Ansorena D. Validation of a gas chromatography-mass spectrometry method for the analysis of sterol oxidation products in serum. *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2008; 864 : 61 – 68.

Mengel E., Klünemann H.H., Lourenço C.M., Hendriksz C.J., Sedel F., Walterfang M., Kolb S.A. Niemann-Pick disease type C symptomatology: an expert-based clinical description. *Orphanet J. Rare Dis.* 8 2013; 166.

Mosharafa M., Stauffer W.M., Reed J.H. Recent developments in clinical mass spectrometry. *Biomed Sci Instrum* 1971; 8: 71.

Nelson J.A., Steckbeck S.R., Spencer T.A. Biosynthesis of 24,25- epoxycholesterol from squalene 2,3-22,23-dioxide. *J. Biol. Chem.* 1981;256, 1067– 1068.

Niemela P.S., Castillo S., Sysi-Aho M., Oresic M. Bioinformatics and computational methods for lipidomics. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*. 2009; 877, 2855–2862.

Olkkonen V.M. Macrophage oxysterols and their binding proteins: roles in atherosclerosis. *Curr. Opin. Lipidol.* 2012;23, 462–470.

Olkkonen V.M., Hynynen R. Interactions of oxysterols with membranes and proteins. *Mol. Aspects Med.* 2009;30, 123–133.

Olsen B.N., Schlesinger P.H., Baker N.A. Perturbations of membrane structure by cholesterol and cholesterol derivatives are determined by sterol orientation. *J. Amer. Chem. Soc.* 2009;131, 4854–4865.

Pajares S., Arias A., Garcia-Villoria J., Macias-Vidal J., Ros E., J. de las Heras, Giros M., Coll M.J., Ribes A., Cholestane-3 β ,5 α ,6 β -triol: high levels in Niemann-Pick type C, cerebrotendinous xanthomatosis, and lysosomal acid lipase deficiency. *J. Lipid Res.* 56 2015; 1926–1935.

Pandit S.A., Scott H.L. Multiscale simulations of heterogeneous model membranes. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*. 2009; 1788, 136–148.

Park W.D., O'Brien J.F., Lundquist P.A., Kraft D.L., Vockley C.W., Karnes P.S., Patterson M.C., and Snow K. Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1. *Hum. Mutat.* 2003;22:313 – 325.

Patterson M.C., Vecchio D., Prady H., Abel L., and Wraith J.E. Miglustat for treatment of Niemann-Pick C disease: a randomised controlled study. *Lancet Neurol.* 2007; 6: 765 – 772.

Patterson M.C., Hendriksz C.J., Walterfang M., Sedel F., Vanier M.T., Wijburg F. Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: an update, *Mol. Genet. Metab.* 2012;106, 330–344.

Pentchev P.G., Comly M.E., Kruth H.S., Tokoro T., Butler J., Sokol J., Filling-Katz M., Quirk J.M., Marshall D.C., Patel S., Vanier M.T., Brady R.O. Group C

Niemann-Pick disease: faulty regulation of low-density lipoprotein uptake and cholesterol storage in cultured fibroblasts, *FASEB J.* 1987; 40–45.

Pentchev P.G., Comly M.E., Kruth H.S., Vanier M.T., Wenger D.A., Patel S., Brady R.O. A defect in cholesterol esterification in Niemann-Pick disease (type C) patients, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1985;8247–8251.

Persichilli S., Gervasoni J., Zuppi C., Zappacosta B. A simplified method for the determination of total homocysteine in plasma by electrospray tandem mass spectrometry. *J Sep Sci.* 2010; 33: 3119-24.

Phillips J.E., Geng Y.J., Mason R.P. 7-Ketocholesterol forms crystalline domains in model membranes and murine aortic smooth muscle cells. *Atherosclerosis.* 2001;159, 125–135.

Polo G., Burlina A., Furlan F., Kolamunnage T., Cananzi M., Giordano L., Zaninotto M., Plebani M. High level of oxysterols in neonatal cholestasis: a pitfall in analysis of biochemical markers for Niemann-Pick type C disease. *Clin. Chem.Lab. Med.* 2016;1221–1229.

Porter F.D., Scherrer D.E., Lanier M.H., Langmade S.J., Molugu V., Gale S.E., Olzeski D., Sidhu R., Dietzen D.J., Fu R., Wassif C.A., Yanjanin N.M., Marso S.P., House J., Vite C., Schaffer J.E., and Ory D.S. Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease. *Sci. Transl. Med.* 2010;2:56ra81.

Pulfer M.K., Murphy R.C. Formation of biologically active oxysterols during ozonolysis of cholesterol present in lung surfactant. *J. Biol. Chem.* 2004;279, 26331–26338.

Rantham Prabhakara J.P., Feist G., Thomasson S., Thompson A., Schommer E., Ghribi O. Differential effects of 24-hydroxycholesterol and 27- hydroxycholesterol on tyrosine hydroxylase and alpha-synuclein in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Neurochem.* 2008;107, 1722–1729.

Ray KK, Cannon CP. The potential relevance of the multiple lipid-independent (pleiotropic) effects of statins in the management of acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol.* 2005; 46: 1425-33.

Reddy J.V., Ganley I.G., Pfeffer S.R. Clues to neuro-degeneration in Niemann-Pick type C disease from global gene expression profiling, *PLoS One* 1. 2006;e19.

Reunert J., Fobker M., Kannenberg F., Du Chesne I., Plate M., Wellhausen J., Rust S., Marquardt T. Rapid diagnosis of 83 patients with Niemann Pick type C disease and related cholesterol transport disorders by cholestantriol screening, *EBioMedicine.* 2016; 170–175.

Ries M., Schaefer E., Luhrs T., Mani L., Kuhn J., Vanier M.T., Krummenauer F., Gal A., Beck M., Mengel E. Critical assessment of chitotriosidase analysis in the rational laboratory diagnosis of children with Gaucher disease and Niemann-Pick disease type A/B and C, *J. Inherit. Metab. Dis.* 2006; 647–652.

Rog T., Pasenkiewicz-Gierula M., Vattulainen I., Karttunen M. Ordering effects of cholesterol and its analogues. *Biochimica Et Biophysica Acta- Biomembranes.* 2009;1788, 97–121.

Romanello M., Zampieri S., Bortolotti N., Deroma L., Sechi A., Fiumara A., Parini R., Borroni B., Brancati F., Bruni A., Russo C.V., Bordugo A., Bembi B., Dardis A. Comprehensive evaluation of plasma 7-ketocholesterol and cholestan-3beta,5alpha,6beta-triol in an Italian cohort of patients affected by Niemann-Pick disease due to NPC1 and SMPD1 mutations. *Clin. Chim. Acta.* 2016;455, 39–45.

Russell D.W. Oxysterol biosynthetic enzymes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular and Cell Biology of Lipids.* 200;1529, 126–135.

Sharafi P., Emre S. Biyobelirteçler ve lizozomal depo hastalıkları. *Hacettepe Tıp Dergisi.* 2010; 41,142-146

Simons K., Sampaio J.L. Membrane organization and lipid rafts. *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.* 2011;3.

Smondirev A.M., Berkowitz M.L. Effects of oxygen at edsterolonphospholipid bilayer properties: amolecular dynamicssimulation, *Chemistryand Physics of Lipids*. 2001; 112,31–39.

Sottero B., Gamba P., Gargiulo S., Leonarduzzi G., Poli G. Cholesterol oxidation products and disease: an emerging topic of interest in medicinal chemistry. *Curr. Med. Chem.* 2009;16, 685–705.

Sottero B., Gargiulo S., Russo I., Barale C., Poli G., Cavalot F. Postprandial dysmetabolism and oxidative stress in type 2 diabetes: pathogenetic mechanisms and therapeutic strategies. *Med. Res. Rev.* 2015;35, 968–1031.

Stampfer M.S. Theiss, Amraoui Y., Jiang X., Keller S., Ory D.S., Mengel E., Fischer C., Runz H. Niemann-Pick disease type C clinical database: cognitive and coordination deficits are early disease indicators. *Orphanet J. Rare Dis.* 2013;8- 35.

Teunissen C.E., Floris S., Sonke M., Dijkstra C.D., De Vries H.E., Lutjohann D. 24S-hydroxycholesterol in relation to disease manifestations of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neurosci. Res.* 2007;85, 1499–1505.

Tuschl K., Bodamer O.A., Erwa W., Mühl A. Rapid of total plasma homocysteine by tandem mass spectrometry. *Clinica Chimica Acta.* 2005; 351: 139-41.

Van Meer G., Voelker D.R., Feigenson G.W. Membrane lipids: where they are and how they behave. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2008;9, 112–124.

Van Reyk D.M., Brown A.J., Hult'en L.M., Dean R.T., Jessup W. Oxysterols in biological systems: sources, metabolism and pathophysiological relevance. *Redox Rep.* 2006; 11, 255–262.

Vance J.E., Karten B. Niemann-Pick C disease and mobilization of lysosomal cholesterol by cyclodextrin. *J. Lipid Res.* 2014;55,1609–1621.

Vanier M.T., Complex lipid trafficking in Niemann-Pick disease type C, *J. Inherit. Metab. Dis.* 2015;35, 187–199.

Vanier M.T., Niemann-Pick disease type C, *Orphanet J. Rare Dis.* 2010;5-16.

Vejuh A., Lizard G. Cytotoxic effects of oxysterols associated with human diseases: induction of cell death (apoptosis and/or oncosis), oxidative and inflammatory activities, and phospholipidosis. *Mol. Aspects Med.* 2009;30, 153–170.

Wang J.W., Megha London E. Relationship between sterol/steroid structure and participation in ordered lipid domains (lipid rafts): Implications for lipid raft structure and function. *Biochemistry.* 2004;43, 1010–1018.

Wijburg F.A., Sedel F., Pineda M., Hendriksz C.J., Fahey M., Walterfang M., Patterson M.C., Wraith J.E., Kolb S.A. Development of a suspicion index to aid diagnosis of Niemann-Pick disease type C, *Neurology.* 2012; 78, 1560–1567.

Wraith J.E., Baumgartner M.R., Bembi B., Covanis A., Levade T., Mengel E., Pineda E., Sedel F., Topcu M., Vanier M.T. Recommendations on the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C. *Mol. Genet. Metab.* 2009;98 : 152 – 165 .

Wraith J.E., Sedel F., Pineda M., Wijburg F.A., Hendriksz C.J., Fahey M., Walterfang M., Patterson M.C., Chadha-Boreham H., KolbS.A. Niemann-Pick type C suspicion index tool: analyses by age and association of manifestations, *J. Inherit. Metab. Dis.* 2014;37, 93–101.

Yanjanin N.M, Velez J.I, Gropman A., King K., Bianconi S.E., Conley S.K., Brewer C.C., Solomon B., Pavan W.J., ArcosBurgos M. Linear clinical progression, independent of age of onset, in Niemann-Pick disease, type C. *Am. J. Med. Genet. B.Neuropsychiatr. Genet.* 2010;153, 132-140.

Yerushalmi B., Sokol R.J., Narkewicz M.R., Smith D., Ashmead J.W., Wenger D.A. Niemann-pick disease type C in neonatal cholestasis at a North American Center. *J. Pediatr.Gastroenterol* 2010;.35, 44 – 50.

Zampieri S., Mellon S.H., Butters T.D., Nevyjel M., Covey D.F., Bembi B., Dardis A. Oxidative stress in NPC1 deficient cells: protective effect of allopregnanolone, *J.Cell. Mol. Med.* 2009;3786–3796.

Zarrouk A., Vejux A., Mackrill J., O'Callaghan Y., Hammami M., O'Brien N., Lizard G. Involvement of oxysterols in age-related diseases and ageing processes. *Ageing Res. Rev.* 2014;18, 148–162.

Zhang J.R., Coleman T., LangmadeS.J., Scherrer D.E., Lane L., Lanier M.H., Feng C., Sands M.S., Schaffer J.E., Semenkovich C.F., Ory D.S. Niemann-Pick C1 protects against atherosclerosis in mice via regulation of macrophage intracellular cholesterol trafficking, *J. Clin. Invest.*(2008;118, 2281–2290.



ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler

Adı	Büşra Zülfa	Uyruğu	T.C.
Soyadı	HARMANCIK	Tel no	05423240891
Doğum tarihi	01.10.1991	e-posta	busrazulfa@gmail.com

Eğitim Bilgileri

	Mezun olduğu kurum	Mezuniyet yılı
Lise	Özel Sevgi Anadolu Lisesi	2009
Lisans	Erciyes Üniversitesi-Biyoloji Bölümü	2014
Yüksek Lisans	Akdeniz Üniversitesi-Tıbbi Biyokimya ABD	2017
Doktora		

İş Deneyimi

Görevi	Kurum	Süre (yıl-yıl)
Biyoloji Öğretmeni	Uğur Dershanesi	2013-2014

Proje Deneyimi

Proje Adı	Destekleyen kurum	Süre (Yıl-Yıl)
Renal Transplantasyon Hastalarında 1,25-Dihidroksivitamin D3 Düzeylerinin İnorganik Pirofosfat, Fetuin A, Osteoprotegerin, Kemik Morfogenik Protein-2 ve Alkalen Fosfataz ile İlişkisi	Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK)	2016

Burslar-Ödüller:

- XXVII. Ulusal Biyokimya Kongresi'nde "Renal Transplant Hastalarında Demir Eksikliğinin Solubl Transferrin Reseptörü (sTfr) İle İlişkisi" adlı Poster Ödülü
- "Renal Transplantasyon Hastalarında 1,25-Dihidroksivitamin D3 Düzeylerinin İnorganik Pirofosfat, Fetuin A, Osteoprotegerin, Kemik Morfogenik Protein-2 ve Alkalen Fosfataz ile İlişkisi" adlı projede bursiyer