

**T.C.
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KOLESTAZ HASTALARINDA SAFRA ASİTLERİNİN
LC-MS/MS İLE ARAŞTIRILMASI VE OLASI
BİYOBELİRTEÇLERİN BELİRLENMESİ**

Öğr.Gör. Ufuk BOZKURT OBUZ

Biyokimya Programı

DOKTORA TEZİ

ANKARA

2020

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam boyunca emeğini, bilgisini, değerli vaktini hiç esirgemeyen, yoğun çalışma dönemlerimde bana ışık tutan, gülen güzel yüzüyle moral kaynağım olan, hiçbir şeyini esirgemeyen, beni benden fazla düşündüğünü bildiğim, çok değerli hocam sayın Prof.Dr. İncilay LAY'a en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

Bu çalışmada bize güvenen ve desteğini esirgemeyen Beslenme ve Metabolizma Bilim Dalı Öğretim üyesi sayın Prof.Dr. Turgay COŞKUN'a teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Ayrıca örneklerin temininde desteklerini esirgemeyen ve yardımlarıyla çalışmaya büyük katkı sağlayan Gastroenteroloji-Hepatoloji ve Beslenme Bilim Dalı Öğretim üyeleri sayın Prof.Dr. Aysel Yüce'ye, sayın Prof.Dr. Hasan Özen'e, sayın Prof.Dr. Hülya Demir'e teşekkür eder, saygılarımı sunarım.

Tüm bu süreçte yoğunluğuna rağmen ilgisini, emeğini, sevgisini hiç esirgemeyen, çok şey öğrendiğim, hayatımda olmasından büyük onur ve gurur duyduğum kahramanıma, değerli hocam sayın Prof.Dr. Ebru BODUR'a en içten sevgi ve saygılarımla teşekkür ederim.

16921 Numaralı Hızlı Destek Projesi ile tezimi destekleyen Hacettepe Üniversitesi, Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

ÖZET

Bozkurt Obuz, U. Kolestaz Hastalarında Safra Asitlerinin LC-MS/MS ile Araştırılması ve Olası Biyobelirteçlerin Belirlenmesi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Biyokimya Programı Doktora Tezi, Ankara, 2020.

Kalıtsal safra asidi sentez bozuklukları (IEBAS) safra asitlerinin sentez yollarında görev alan enzimlerde yapısal veya işlevsel bozukluklar sonucu alışılmadık ara metabolitlerin birikmesine neden olan otozomal ressesif geçişli hastalıklar grubudur. Tedavi edilmediğinde nörolojik semptomlarla ilerleyen ve ölümcül karaciğer hastalığı ile sonuçlanan bu durumda erken tanı oldukça önemlidir. Bu çalışmada nadir görülen, tanısı güç olan ancak tedavi edilebilir bu hastalıkların erken tanısında kullanılabilecek yöntem ve bunlara yönelik olası biyobelirteçlerin belirlenebilmesi amaçlandı. Kuru kağıda emdirilmiş idrar örneklerinde LC-MS/MS yöntemi ile altmış sekiz safra asidi ara metabolitleri hedefli metabolomik analiz ile değerlendirildi. Plazma örneklerinde 5 α -kolestanol ve 7-dehidrokolesterol ara metaboliti ve kolesterol ölçümü GC-MS yöntemiyle değerlendirildi. Hastalar ile sağlıklı bireylerin total safra asit değerleri arasında (p=0,001), klasik safra asit değerleri arasında (p=0,001), hidroksile safra asit değerleri arasında (p=0,001), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asit değerleri arasında (p=0,002) ve 3-okzo- Δ ⁴-safra asit değerleri arasında (p=0,001) anlamlı bir fark olduğu bulundu. Bir hastada 3 β -hidroksi- Δ 5-steroid dehidrogenaz eksikliği, bir hastada oksisterol-7 α -hidroksilaz eksikliği, 3 hasta serebrotendinöz ksantomatozis tanıları ile uyumlu idrarla atılan safra asidi ara metabolitleri tespit edildi. Kolesterol ve kolestanol değerleri arasında (p=0,570 ve p=0,099) anlamlı bir fark olmadığı bulundu. 7-dehidrokolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulundu (p=0,008). Bu bulgular safra asit sentez yollarında görev alan enzim eksikliklerinin bir sonucu olarak açığa çıkan ara metabolitlerin idrarda ve plazmada tespit edilebilmesinde ve bu bozuklukları öngörmeye hedefli kütle spektrometri yönteminin etkili olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kolestaz, safra asitleri, safra asit sentez bozukluğu, LC-MS/MS, GC-MS.

Bu tez, HUBAP (Proje No:16921) tarafından desteklenmiştir.

ABSTRACT

Bozkurt Obuz, U. Investigation of Bile Acids by LC-MS/MS in Cholestasis Patients and Determination of Possible Biomarkers, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences Ph. D. Thesis in Biochemistry, Ankara, 2020. Inborn errors of bile acid synthesis (IEBAS) are autosomal recessively inherited disorders that are resulted from the deficiencies in the structure or function of the enzymes involved in the synthesis of bile acids, causing the accumulation of unusual intermediate metabolites of bile acid synthesis. If untreated, progressive neurological symptoms and fatal liver disease is prominent, thus early diagnosis is important. In this study, it was aimed to determine the method that can be used in the early diagnosis of these rare, difficult to diagnose but treatable diseases and possible biomarkers for them. Sixty-eight bile acid intermediate metabolites were evaluated by targeted metabolomic analysis in urine samples impregnated on dry paper by LC-MS/MS method. In plasma samples, 5 α -cholestanol and 7-dehydrocholesterol intermediate metabolite and cholesterol measurement were evaluated by GC-MS method. A significant difference was observed between total bile acid values (p=0.001), classical bile acid values (p=0.001), hydroxylated bile acid values (p=0.001), 3 β -hydroxy- Δ 5-bile acid values (p=0.002) and 3-oxo- Δ ⁴-bile acid values (p=0.001) of patients and healthy individuals. Urinary bile acid metabolites compatible with 3 β -hydroxy- Δ 5-steroid dehydrogenase deficiency in one patient, oxysterol-7 α -hydroxylase deficiency in one patient, and cerebrotendinous xanthomatosis in 3 patients were detected. There was no significant difference between cholesterol and cholestanol values (p=0.570 and p=0.099). A significant difference was found between 7-dehydrocholesterol values (p=0.008). Our findings show that the targeted mass spectrometry technology is effective in detecting the intermediate bile acid metabolites in urine and plasma and predicting enzyme deficiencies involved in bile acid synthesis pathways.

Key words: Cholestasis, bile acids, bile acid synthesis disorder, LC-MS/MS, GC-MS.

This thesis was supported by HUBAP (Project Number:16921).

İÇİNDEKİLER

ONAY SAYFASI	iii
YAYIMLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI	iv
ETİK BEYAN	v
TEŞEKKÜR	vi
ÖZET	vii
ABSTRACT	viii
İÇİNDEKİLER	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER	xiv
TABLolar	xvii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	2
2.1. Safra Asitlerinin Kimyasal Yapısı	2
2.2. Safra Asitlerinin Enterohepatik Dolaşımı	4
2.3. Safra Asit Sentezi ve Sentez Yolları	6
2.3.1. Klasik/ Nötr Yol	8
2.3.2. Alternatif/ Asidik Yol	10
2.3.3. Yamasaki Yolu	11
2.3.4. 25-Hidroksilasyon Yolu	11
2.4. Safra Asitlerinin Sentez Bozuklukları	11
2.4.1. Sterol 27-Hidroksilaz Eksikliği	15
2.4.2. 3 β -Hidroksi- Δ 5-Steroid Oksidoredüktaz (Dehidrogenaz) Eksikliği	17
2.4.3. Δ 4-3-Oksosteroid 5 β -Redüktaz Eksikliği	19
2.4.4. Oksisterol 7 α -Hidroksilaz (CYP7B1) Eksikliği	20
2.4.5. Safra Asit KoA Amino asit N-açiltransferaz Eksikliği	21
2.4.6. α -Metilaçil-KoA Rasemaz Eksikliği	22
2.4.7. Kolesterol 7 α -Hidroksilaz (CYP7A1) Eksikliği	24
2.4.8. Safra asit-KoA Ligaz Eksikliği	24
2.4.9. Peroksizomal Sentez Bozuklukları	25
2.5. Kalıtsal Metabolizma Hastalıklarında Tarama Yöntemleri	25
2.6. Kromatografi	26
2.7.Kütle Spektrometrisi	27

2.7.1. Numune Giriş	29
2.7.2. İyonizasyon Kaynağı	30
2.7.3. Kütle Analizörü	33
2.7.4. Detektör	33
2.8. Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)	33
2.9. Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (GC/MS)	35
3.GEREÇ VE YÖNTEM	37
3.1. Kimyasallar ve Cihazlar	37
3.1.1. Kimyasallar	37
3.1.2. Cihazlar	40
3.1.3. Cam ve Sarf Malzemeler	41
3.2. Çalışma Grupları	41
3.3. Örneklerin Toplanması	41
3.4. Verilerin Toplanması	42
3.5. Yöntemler	42
3.5.1. LC-MS/MS Yöntemi	42
3.5.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	42
3.5.1.2. Örneklerin Hazırlanması	44
3.5.1.3. LC-MS/MS Çalışma Koşulları	45
3.5.2. GC-MS Yöntemi	50
3.5.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması	50
3.5.2.2. Örneklerin Hazırlanması	51
3.5.2.3. GC-MS Çalışma Koşulları	52
3.6. Etik Kurul İzni	54
3.7. İstatistiksel Yöntemler	54
4.BULGULAR	55
4.1. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Kromatogramları	55
4.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Standart Doğruları	63
4.3. Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri ve Biyokimyasal Verileri	76
4.4. LC-MS/MS Yöntemi ile Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun İdrar Safra Asitleri Analiz Verileri	79

4.5. GC-MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Standart Doğruları	95
4.6. GC-MS Yöntemi ile Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun Kolesterol, Kolestanol ve 7-Dehidrokolesterol Analiz Verileri	97
5.TARTIŞMA	101
5.1. 3 β -hidroksi- Δ 5-Steroid Dehidrogenaz Eksikliği	102
5.2. Sterol 27-Hidroksilaz Eksikliği	107
6.SONUÇ VE ÖNERİLER	118
7.KAYNAKLAR	120
8.EKLER	137
EK-1: Tez Çalışması ile İlgili Etik Kurul İzni	
EK-2: Tez Çalışması Orjinallik Raporu	
EK-3: Takip Formu	
EK-4: Hasta/Kontrol ve Ebeveyn/Çocuk Onam Formları	
EK-5: Safra Asitlerinin Açık Adları	
9.ÖZGEÇMİŞ	

SİMGELER VE KISALTMALAR

µg	Mikrogram
µL	Mikrolitre
µmol	Mikromol
3β-HSD	3β-Hidroksi-Δ ⁵ -C ₂₇ -Steroid Dehidrogenaz
ACN	Asetonitril
ACOX2	Açıl-Koa Oksidaz 2
AKR1C4	Aldo-Keto-Redüktaz Ailesi 1 Üye C4
AKR1D1	Aldo-Ketoreduktaz Ailesi 1 Üye D1
ALT	Alanin Aminotransferaz
AMACR	Alfa-Metilaçıl-Koa Rasemaz
APCI	Atmosferik Basıncılı Kimyasal İyonizasyon
AST	Aspartat Aminotransferaz
BAAT	Safra Asit-Koa:N-Açıl Amino Asit Transferaz
BACL	Safra Asidi Koa Ligaz
BSTFA	Bis-trimetilsililtrifluorasetamid
CA	Kolik Asit
CBAS1	Kongenital Safra Asidi Sentez Bozukluğu Tip 1
CBAS2	Kongenital Safra Asidi Sentezi Bozukluğu Tip 2
CDCA	Kenodeoksikolik Asit
CE	Parçalanma Enerjisi
CH25H	Sterol 25-Hidroksilaz
CI	Kimyasal İyonizasyon
Cr	Kreatinin
CTX	Serebrotendinözis Ksantomatozis
CYP27A1	Sterol 27-Hidroksilaz
CYP7A1	Kolesterol 7α-Hidroksilaz
CYP7B1	Oksisterol 7α-Hidroksilaz
CYP8B1	Sterol 12α-Hidroksilaz
DCA	Deoksikolik Asit
DHCA	3α,7α-Dihidroksi-5β Kolestanoik Asit
EI	Elektron İyonizasyonu
ESI	Elektrosprey İyonizasyon

EtOH	Etanol
FAB-MS	Hızlı Atom Bombardımanı-Kütle Spektrometrisi
GC-MS	Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrofotometrisi
GGT	Gama-Glutamil-Transpeptidaz
HPLC	Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi
HSD3B7	3 β -Hidroksi- Δ 5-C27-Steroid Oksidoredüktaz
IEBAS	Kalıtsal Safra Asidi Sentez Bozuklukları
IEM	Kalıtsal Metabolizma Bozuklukları
IS	İç Standart
KOH	Potasyum Hidroksit
LCA	Litokolik Asit
LC-MS/MS	Sıvı Kromatografisi-Üçlü Kuadropol Kütle Spektrometrisi
m/z	Kütle/Yük
MALDI	Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon-İyonizasyon
mg	Miligram
mL	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
mmol	Milimol
MRM	Çoklu Reaksiyon Tarama
MS	Kütle Spektrofotometrisi
MW	Moleküler Ağırlık
pmol	Pikomol
RT	Alıkonma Süresi
SIC	Tek İyon Kromatogramı
SLC27A5	Safra Asit KoA ligaz
THCA	3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β kolestanoik asit
TIC	Toplam İyon Kromatogramı
U	Ünite
w/v	Kütle/Hacim

ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa
2.1. Kolesterol (5 β -Kolanolik asit) iskelet yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılması	3
2.2. Safra asitlerinin hidroksil grubunun sayısı ve konumu, konjuge ve konjuge olmayan formları	4
2.3. Safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı	5
2.4. Safra asit sentez yolları	7
2.5. Yan zincirde ve steroid halka yapısında görülen modifikasyonlar ve tanımlanan safra asit sentez bozuklukları	13
2.6. Serebrotendinöz ksantomatoza neden olan sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi metabolik yolu	15
2.7. 3 β -hidroksi Δ^5 -C27-steroid dehidrogenaz eksikliği metabolik yolu	18
2.8. Oksisterol 7 α -hidroksilaz (CYP7B1) enzim aktivitesi eksikliği safra asidi sentezi metabolik yolu	21
2.9. α -metilaçil-Koa rasemaz enzim aktivitesindeki bozukluk ve birincil safra asidi sentezi ve dallı zincirli yağ asidi sentezi metabolik yolları	23
2.10. Işığın dağılması ve kütle analizi işlemi karşılaştırılması	28
2.11. Kütle spektrometrisi bileşenleri	29
2.12. LC-MS/MS sisteminin kısımları	34
2.13. Gaz kromatografisi dört kutuplu kütle spektrometrisinin (GC/MS) şematik diyagramı	36
3.1. İdrar örneklerinin hazırlanması	45
3.2. Plazma örneklerinin hazırlanması	52
4.1. Klasik safra asitleri grubunda yer alan CA, GCA, TCA, CDCA, GCDCA, TCDCA, UDCA ve LCA standartlarına ait kromatogramlar	56
4.2. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GUDCA, TUDCA, TLCA, DCA, GHCA, GLCA ve TDCA standartlarına ait kromatogramlar	57
4.3. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S, G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2, G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S, Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S, G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2, Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3 ve Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S standartlarına ait kromatogramlar	58
4.4. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri ve 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan Δ^5 -3 β ,12 α -(OH)2, Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2, CA- Δ^4 ,6-3-one, GCA- Δ^4 -3-one, TCA- Δ^4 -3-one, CDCA- Δ^4 ,6-3-one, TCDCA- Δ^4 -3-one, GCDCA- Δ^4 -3-one, CDCA- Δ^4 -3-one ve CA- Δ^4 -3-one standartlarına ait kromatogramlar	59

- 4.5. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri, kısa zincirli safra asitleri ve uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan T- Δ^5 -3 β -OH, C27-THCA, C27-DHCA, Δ^5 -3 β -OH, G- Δ^5 -3 β -OH-3S, G- Δ^5 -3 β -OH, T- Δ^5 -3 β -OH-3S, Δ^5 -3 β -OH-3S, nor-CA ve CA-1 β -ol standartlarına ait kromatogramlar 60
- 4.6. Hidroksile safra asitleri ve klasik safra asitleri grubunda yer alan GCA-1 β -ol, TCA-1 β -ol, CA-6 α -ol, CDCA-1 β -ol, GCA-6 α -ol, TLCA-3S, DCA-3S, GCDCA-3S, GCA-3S ve TUDCA-3S standartlarına ait kromatogramlar 61
- 4.7. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GUDCA-3S, TCDCA-3S, TDCA-3S, CDCA-3S, UDCA-3S, CA-3S, TCA-3S, GLCA-3S, LCA-3S ve GDCA-3S standartlarına ait kromatogramlar 62
- 4.8. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GCA, TCA, CA ve TCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 63
- 4.9. klasik safra asitleri grubunda yer alan CA-3S, GCDCA, TCDCA, CDCA, GCDCA-3S ve TCDCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 64
- 4.10. Klasik safra asitleri grubunda yer alan CDCA-3S, GUDCA, TUDCA, UDCA, GUDCA-3S ve UDCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 65
- 4.11. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GDCA, TDCA, DCA, GDCA-3S, TDCA-3S ve DCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 66
- 4.12. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GLCA, TLCA, LCA, GLCA-3S, TLCA-3S ve LCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 67
- 4.13. Klasik safra asitleri grubunda yer alan GHCA safra asit standardının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 68
- 4.14. Hidroksile safra asitleri grubunda yer alan GCA-1 β -ol, TCA-1 β -ol, CA-1 β -ol, GCA-6 α -ol, CA-6 α -ol ve CDCA-1 β -ol safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 69
- 4.15. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S, Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S ve G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2 safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 70
- 4.16. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH), Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2, G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S, Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S, G- Δ^5 -3 β -OH ve T- Δ^5 -3 β -OH safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri 71
- 4.17. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan Δ^5 -3 β -OH, G- Δ^5 -3 β -OH-3S, T- Δ^5 -3 β -OH-3S, Δ^5 -3 β -OH-3S ve Δ^5 -3 β ,12 α -(OH)2 safra asit

standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri	72
4.18. 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan GCA- Δ^4 -3-one, TCA- Δ^4 -3-one, CA- Δ^4 -3-one, GCDCA- Δ^4 -3-one, TCDCA- Δ^4 -3-one ve CDCA- Δ^4 -3-one safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri	73
4.19. 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan CA- Δ^4 ,6-3-one ve CDCA- Δ^4 ,6-3-one safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri	74
4.20. Kısa zincirli safra asidi olan nor-CA safra asit standardının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri	74
4.21. Uzun zincirli safra asitleri olan C27-DHCA ve C27-THCA safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri	75
4.22. Kolesterol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri	95
4.23. Kolestanol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri	96
4.24. 7-Dehidrokolesterol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri	96
4.25. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması	98
4.26. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolestanol düzeylerinin karşılaştırılması	98
4.27. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma 7-dehidrokolesterol düzeylerinin karşılaştırılması	99

TABLOLAR

Tablo	Sayfa
2.1. Safra asidi sentez bozukluklarının gen sembolleri, kısaltmaları, alternatif adları, etkilenen proteinler ve idrar safra asit metabolitleri	14
3.1. Standart doğru için standart çözeltiler ve derişimleri	43
3.2. LC-MS/MS çalışma koşulları ve cihaz parametreleri	46
3.3. LC-MS/MS yöntemi ile incelenen safra asit standartlarının MRM geçişleri ve alıkonma süreleri (RT)	47
3.4. GC-MS standart doğru için standart çözeltiler ve derişimleri	51
3.5. GC-MS çalışma koşulları ve cihaz parametreleri	53
3.6. GC-MS yöntemi ile incelenen kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol standartlarının kütle spektrumunda seçilen iyon değerleri, referans iyon değerleri ve alıkonma süreleri (RT)	54
4.1. Kontrol grubunun demografik özellikleri ve biyokimyasal verileri	76
4.2. Hastaların demografik özellikleri ve biyokimyasal verileri	77
4.3. Kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin demografik özellikleri ve biyokimyasal verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri	79
4.4. Kontrol grubunun LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri	80
4.5. Hastaların LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri	81
4.6. Kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri	83
4.7. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması	84
4.8. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri	85
4.9. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen hidroksile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması	87
4.10. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen hidroksile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri	88
4.11. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması	89

- 4.12.** LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri 90
- 4.13.** LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması 91
- 4.14.** LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri 92
- 4.15.** LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri 93
- 4.16.** LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri 94
- 4.17.** Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen demografik özellikleri ve plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerleri 99
- 4.18.** Hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerleri 100

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Otozomal resesif geçişli nadir kalıtsal hastalıklar, ülkemizde akraba evlilikleri oranının yüksek olması nedeniyle sık görülmektedir. Safra asitlerinin metabolizmasında görev alan enzimlerde görülen kalıtsal bozukluklar safra asitlerinin biyosentezinde anormalliklere neden olur. Şimdiye kadar 9 farklı safra asidi bozukluğu tanımlanmıştır. Nadir görülen, tanısı güç olan ancak tedavi edilebilir bu hastalıkların erken tanısında kullanılacak yöntem ve bunlara yönelik olası biyobelirteçlerin belirlenebilmesi amaçlanmıştır.

Bu çalışmada etiyojisi bilinmeyen kronik karaciğer hastalığı ve kolestaz tanılı hastalarda kuru kağıda emdirilmiş idrar örneklerinde yüksek duyarlılık ve özgüllüğe sahip LC-MS/MS yöntemi ile klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3 β -hidroksi Δ 5- safra asitleri ve 3-okzo- Δ 4- safra asitleri grubuna ait safra asitlerinin analizi yapılmıştır. 5 α -kolestanol, 7-dehidrokolesterol ve kolesterol ölçümü GC-MS yöntemiyle yapılmıştır. Çalışma sonucunda, nedeni açıklanamayan kronik karaciğer hastalığı ve kolestazlı hastalarda safra asidi sentez yollarında (klasik/nötral yol, alternatif/asidik yol, Yamasaki yolu ve 25-hidroksilasyon yolu) safra asidi ara metabolitlerinin değerlendirilmesi ve bu sentez yollarındaki enzim bozukluklarının belirlenmesi amaçlanmıştır.

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı'na başvuran nedeni açıklanamayan kolestazlı hastalarda safra asitlerinin sentez yolları ve bu sentez yollarında klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3 β -hidroksi- Δ 5- safra asitleri ve 3-okzo- Δ 4- safra asitleri grubuna ait 68 farklı safra asidi metabolitlerinin atılım profilleri hedefli metabolomik analiz ile incelenmiştir.

Safra asitlerinin sentez yollarında açığa çıkan bu ara metabolitlerin yüksek duyarlı ve özgül LC-MS/MS yöntemi ile kapsamlı analizi dünyada sadece Japonya Tokyo'da gerçekleştirilmektedir. Bu çalışma ile Japonya yöntemi referans alınarak 68 safra asidi metabolitinin hedefli metabolomik analiz ile laboratuvarımıza kurulumu gerçekleştirilerek, laboratuvarımızın dünyada ikinci merkez olması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

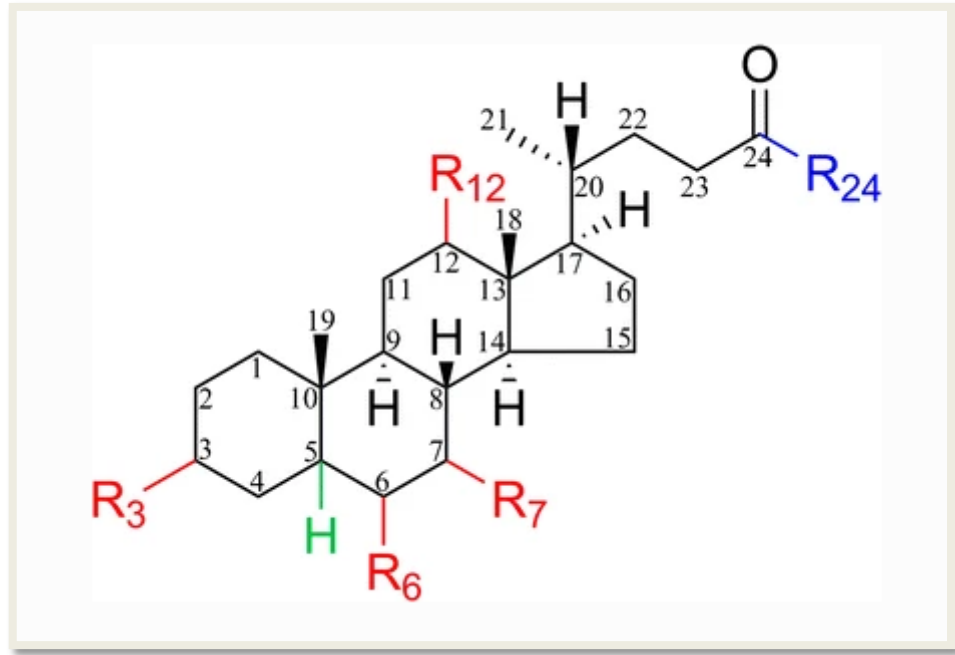
Safra içeriğinde ~% 95 oranında su ve safra asitleri, fosfolipitler, kolesterol, proteinler ve peptitler, amino asitler, steroidler, enzimler, elektrolitler gibi endojen bileşiklerin karışımı bulunmaktadır (1,2). Safranın en önemli bileşenleri olan safra asitleri ince bağırsakta emilim, emülsifikasyon ve lipitlerin sindiriminden sorumlu, zayıf metabolize olan kararlı moleküllerdir (3).

Safra kesesinde içerisinde bulunan safra asitleri fosfolipitler ve kolesterol ile karışık miseller oluşturur. Misel oluşumu kolesterolün çözünürlüğünü artırmak ve safra asidi toksisitesini azaltmak için oldukça önemlidir. Sindirim ve emilim görevlerine ek olarak safra asitleri, hücre içi ligandla aktive olan nükleer reseptörleri ve hücre yüzeyi G proteinine bağlı reseptörleri aktive eden, lipit ve glukoz metabolizmasını, ilaç metabolizmasından immüniteye kadar çeşitli hücresel işlemleri düzenleyen sinyal molekülleri olarak görev alırlar (4).

2.1. Safra Asitlerinin Kimyasal Yapısı

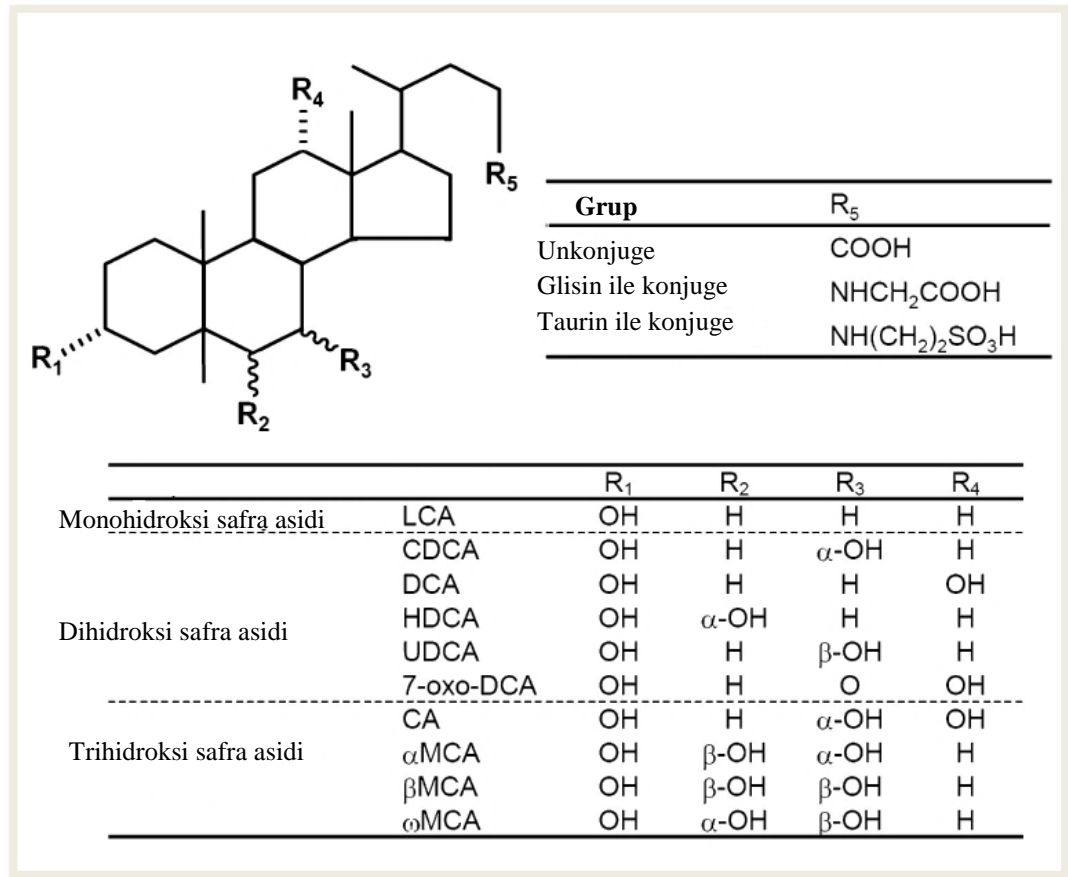
Kolesterolden türeyen safra asitleri hidrofilik ve hidrofobik yüze sahip amfipatik özellik gösteren moleküllerdir. Hidroksil gruplarının molekülün sadece bir yüzünde bulunması hidrofilik karakterin oluşmasına neden olur. Molekülün diğer yüzü hidroksil grupları içermediğinden hidrofobik özellik gösterir (5,6).

Memelilerde bulunan tüm safra asitleri C₂₄-5 β (kolanoik asit) yapısal karakterindedir. Steroid çekirdeğinde üç adet 6 C'lu halka ve bir adet 5 C'lu halkanın birleşmesiye oluşan dört karbon halkası vardır (6). 24 C'lu steroid çekirdeğe ek olarak yan zincirinde bir karboksil grubu taşır (7). Şekil 2.1.'de kolestan (5 β -kolanoik asit) iskelet yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılması gösterilmiştir.



Şekil 2.1. Kolestan (5β -kolanoik asit) iskelet yapısı ve karbon atomlarının numaralandırılması (8).

Hepatositlerde *de novo* sentezlenen safra asitleri pirimer safra asitleri olarak adlandırılır. İnsanlarda sentezlenen pirimer safra asitleri iki tanedir. C-3,C-7 ve C-12'de üç hidroksil grubu bulunduran bir trihidroksi-safra asidi olan kolik asit (CA) ve C-3 ve C-7'de iki hidroksil grubu bulunduran bir dihidroksi-safra asidi olan kenodeoksikolik asit (CDCA). Sentez sonrası serbest asit formunda yani dekonjuge formda olan CA ve CDCA bağırsakta bakteriyel enzimler aracılığıyla glisin veya taurin ile konjugasyona uğrar. Konjugasyon ile C-7'de bulunan hidroksil grubu çıkarılır ve 7-deoksi safra asitleri oluşur. Konjugasyon sonunda kolik asitten (CA) deoksikolik kolik asit (DCA); kenodeoksikolik asitten (CDCA) litokolik asit (LCA) meydana gelir. Bağırsakta bakteriyel enzim katalizi ile pirimer safra asitlerinden sentezlenen DCA ve LCA sekonder safra asitleri olarak adlandırılır (5,9,10). Şekil 2.2.'de safra asitlerinin hidroksil grubunun sayısı ve konumu, konjuge ve konjuge olmayan formları gösterilmektedir.



Şekil 2.2. Safra asitlerinin hidroksil grubunun sayısı ve konumu; konjuge ve konjuge olmayan formları (11).

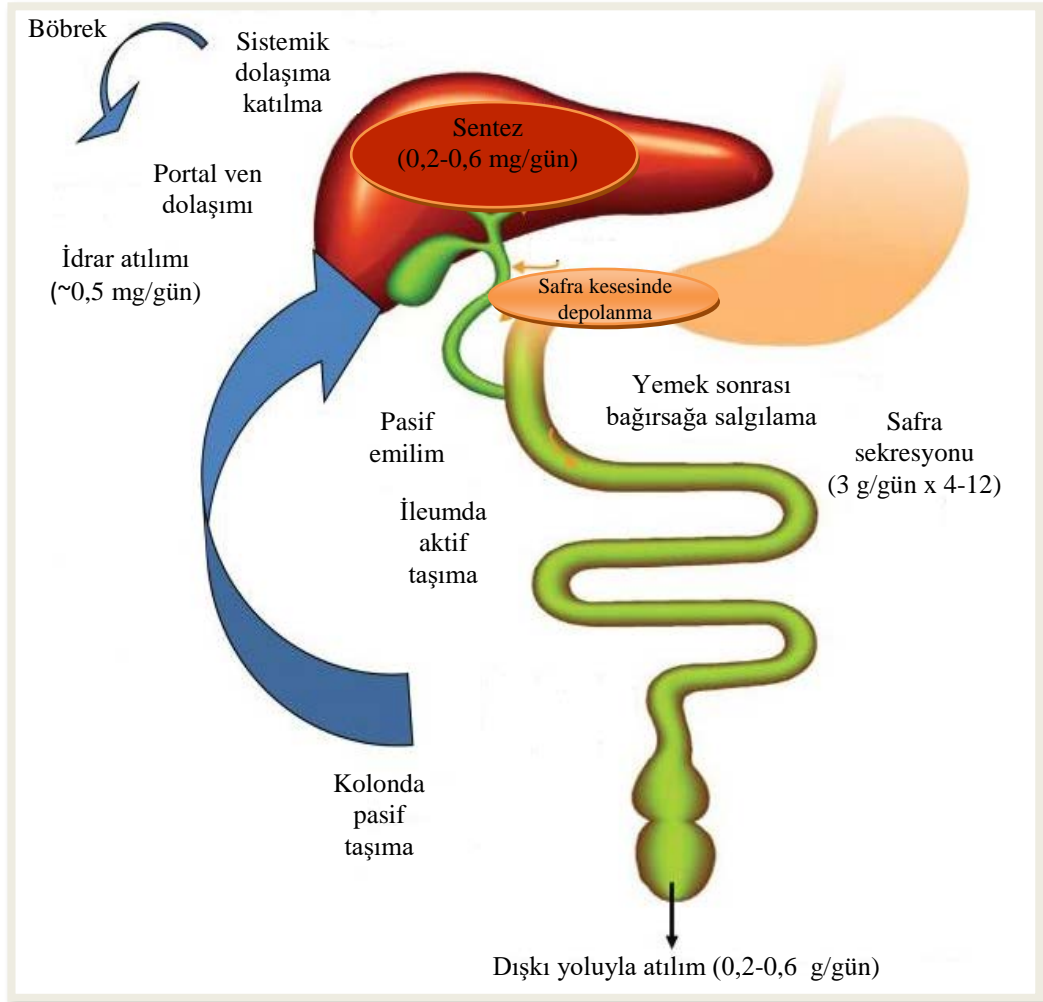
Hücre içi veya hücre dışı kompartmanlarda safra asitlerinin konsantrasyonları yükseldiğinde sitotoksik etki gösterir. Hidroksil gruplarının sayısı sitotoksik etkinin şiddetini belirler. CA yapısında bulunan üç hidroksil grubu bu safra asidini en hidrofilik ve en az sitotoksik yapar. DCA ve CDCA yapısında iki hidroksil grubuna bulduklarından CA ile kıyaslandığında daha zararlıdır. LCA ise sadece bir hidroksil grubu bulduğundan en sitotoksik safra asididir (12,13).

2.2. Safra Asitlerinin Enterohepatik Dolaşımı

Safra asitlerinin karaciğer ve bağırsak arasında taşınması enterohepatik dolaşım olarak tanımlanmaktadır (14,15). Enterohepatik dolaşım ilk olarak 1681'de Borelli tarafından açıklanmıştır (16).

Enterohepatik dolaşım havuzdaki safra asitlerinin yaklaşık % 95'inin geri kazanıldığı, insanlarda safra asidi homeostazını korumak için bir geri bildirim

mekanizması olarak görev yapan oldukça etkili bir fizyolojik yoldur (17). Safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı Şekil 2.3.'de gösterilmektedir.



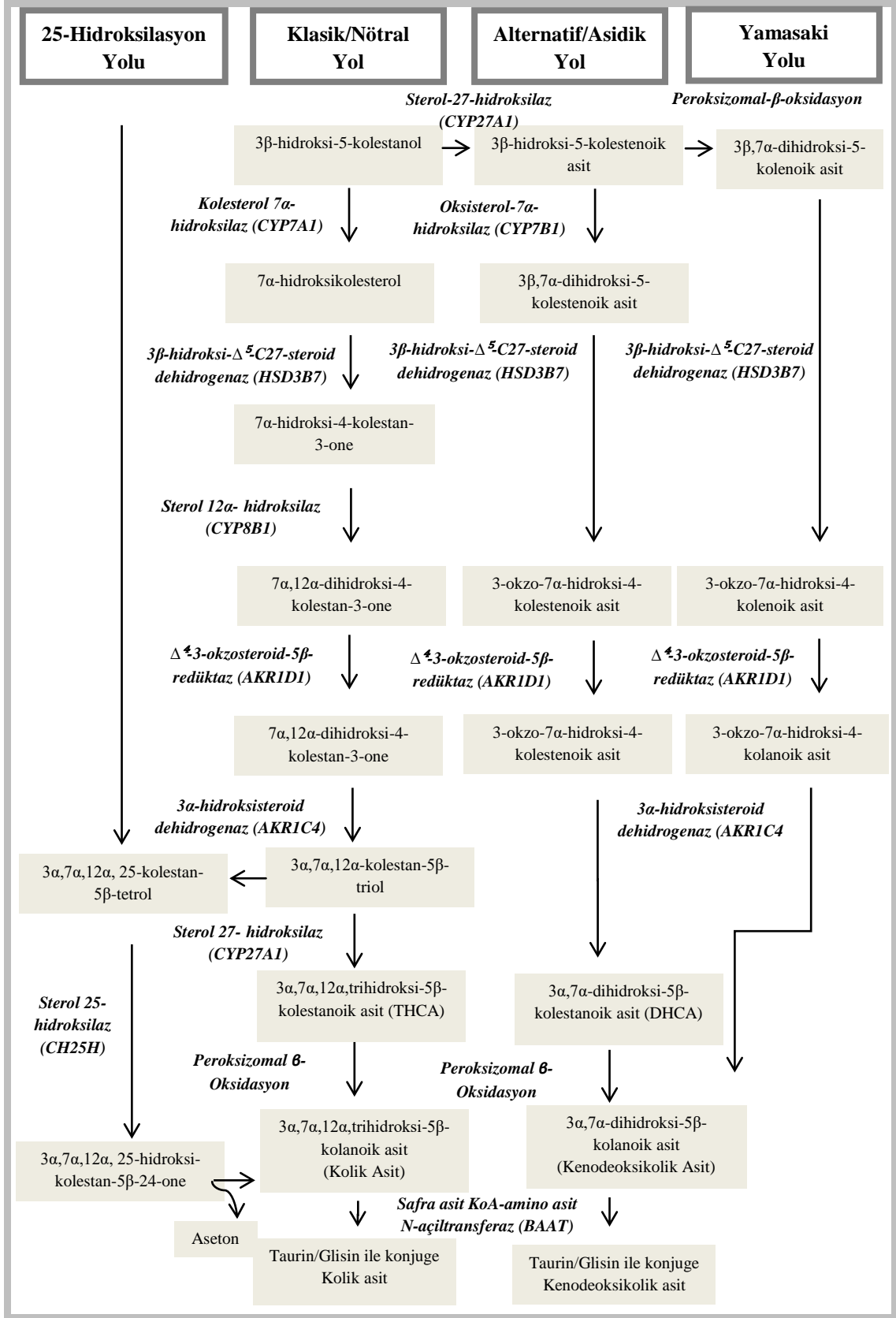
Şekil 2.3. Safra asitlerinin enterohepatik dolaşımı (6).

Karaciğerde kolesterolden sentezlenen ve dolaşıma salgılanan safra asit miktarı günde yaklaşık olarak 0,5 g'dır. Dolaşımdaki bu miktar toplam safra asidi havuzunun % 5'ini oluşturmaktadır. Havuzda kalan safra asitlerinin % 95'i günde 4-12 kez karaciğer ile bağırsak arasında dolaşır. Safra asitlerinin çoğu ileumda aktif taşıma yoluyla yeniden emilirken, karaciğer dolaşımı için duodenumda az miktarda pasif difüzyon gerçekleşir. Sistemik dolaşıma dökülen az miktarda safra asidi böbrekte geri kazanılır. Bununla birlikte, günde yaklaşık 0,2-0,6 g safra asidi dışkıyla kaybedilir. Bu miktar kolesterolden *de novo* olarak sentezlenmesi gereken miktarı belirler (6,18).

2.3. Safra Asit Sentezi ve Sentez Yolları

Kolesterolden primer safra asitlerine giden biyosentetik yolda 17 farklı enzim görev alır ve enzimler endoplazmik retikulum, mitokondri, sitoplazma ve peroksizom olmak üzere farklı hücre kısımlarında bulunmaktadır (19). Sentez klasik veya nötral yol, alternatif veya asidik yol, Yamasaki yolu ve 25-hidroksilasyon yolu olarak tanımlanan dört farklı yolla gerçekleşmektedir. Birçok ara maddenin birden fazla reaksiyon için substrat olması nedeniyle sentez yollarında reaksiyonların sırası tam olarak belirlenememiştir (5,20).

Son yıllarda kabul edilen safra asit sentez yolları ve ara metabolitleri Şekil.2.4.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. Safra asit sentez yolları.

2.3.1. Klasik/ Nötral Yol

Klasik safra asit sentez yolunda vücuttaki toplam safra asitlerinin büyük bir kısmı üretilir. Ara metabolitlerin nötral yapıda olması nedeniyle nötral yol olarak da adlandırılan bu yolun sonunda primer yapıda iki safra asidi sentezlenir. C-3, C-7 ve C-12'de hidroksil grupları olan bir trihidroksi-safra asidi olan $3\alpha,7\alpha,12\alpha$,trihidroksi- 5β -kolanoik asit (CA:kolik asit); ve C-3 ve C-7'de hidroksil grupları olan bir dihidroksi-safra asidi olan $3\alpha,7\alpha$,dihidroksi- 5β -kolanoik asit (CDCA: kenodeoksikolik asit) (21,22).

Klasik veya nötral safra asidi sentez yolunda önce steroid halka yapısında değişikliğe neden olacak reaksiyonlar gerçekleşir. Steroid halka modifikasyonlarından sonra alifatik yan zincirde oksidatif bölünme gerçekleşir (23,24).

Kolesterolün karaciğer tarafından safra asitlerine dönüşümü, kolesterolün vücuttan atılması için en temel yoldur. Bu yolun ilk reaksiyonu karaciğerde lokalize olan mikrozomal sitokrom P450 enzimi kolesterol 7α -hidroksilazın (CYP7A1) katalizörlüğünde gerçekleşir (25,26). Kolesterol 7α -hidroksilaz (CYP7A1) kolesterol (3β -hidroksi-5-kolestanol) molekülünün hidroksilasyonunu katalize eder ve 7α -hidroksikolesterol oluşur (5,27). Kolesterolün 7α -hidroksilaz (CYP7A1) ile hidroksilasyonu bu yolda hız sınırlayıcı adımdır ve enzim aktivitesi transkripsiyon seviyesinde sıkı bir şekilde düzenlenir (28-32).

Bu basamaktan sonra klasik/nötral yol ile alternatif/asidik yol 3β -hidroksi- Δ^5 -C27-steroid oksidoredüktaz (HSD3B7) enziminin katalizlediği izomerizasyon basamağında kesişir (33). Bu adımda 3β -hidroksil grubu oksitlenerek 7α -hidroksi-4-kolesten-3-one (C4 olarak da adlandırılır) oluşur. Bu ara metabolit hem CA hem de CDCA için ortak öncüdür ve serum C4 seviyeleri insanlarda safra asit sentez oranını yansıtan biyobelirteç olarak görev yapmaktadır (34-36).

Klasik/nötral yolun bir sonraki adımında 7α -hidroksi-4-kolesten-3-one 12α -pozisyonunda hidroksilasyona uğrar ve $7\alpha,12\alpha$ -dihidroksi-4-kolesten-3-one oluşur. Reaksiyon bir dallanma noktası enzimi olan sterol 12α -hidroksilaz (CYP8B1) aracılığıyla gerçekleşir (37). CDCA yapısından farklı olarak CA yapısında 12α -pozisyonunda bulunan bir hidroksil grubu bu basamakta sterol 12α -hidroksilaz

(CYP8B1) enziminin katalizörlüğünde eklenir (38). 12 α -hidroksilasyon reaksiyonu gerçekleşmediğinde 7 α -hidroksi-4-kolesten-3-one CDCA sentezi için 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β -kolestanoik asit'e dönüştürülerek yola devam eder (20,24,38). Ancak kolik asit sentezi için mikrozomal enzim sterol 12 α -hidroksilaz (CYP8B1) enzim basamağı gereklidir (15,39).

12 α -hidroksilasyon basamağının gerçekleşmesinden bağımsız olarak HSD3B7 basamağı ürünü sitozolik enzimler Δ 4-3-okzosteroid-5 β redüktaz (AKR1D1) ve 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaz (AKR1C4) katalizörlüğünde CA ve CDCA öncülleri olan 3 α ,7 α ,12 α -5 β - kolestan-triol'e dönüşür (40,41).

Δ 4-3-oksosteroid-5 β -redüktaz (AKR1D1; aldo-keto-redüktaz 1D1), 5 β -hidrojen konfigürasyonunun oluşumuna yol açan Δ 4 çift bağının indirgenmesinden sorumlu enzimdir. 3 α -hidroksisteroid dehidrogenaz (AKR1C4; aldo-keto-redüktaz 1C4) enzimi ise 3-okso grubunun 3 α -hidroksil grubuna indirgenmesinde sorumludur. Bu reaksiyonların sonunda steroid halka modifikasyonları tamamlanır (20,24,33).

Steroid halka yapısındaki değişikliklerden sonra yan zincir modifikasyonu gerçekleşir. Bunun için ilk adım mitokondriyal sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Enzim C-27 pozisyonuna hidroksil grubunun eklenmesinden sorumludur. Hidroksil grubunun eklenmesiyle yan zincir okside olur ve daha sonra bir aldehit ve karboksilik aside oksitlenir (40). 3 α ,7 α ,12 α -kolestan-5 β -triol ve 3 α ,7 α ,12 α ,27-kolestan-5 β -tetrol'ün yan zincir oksidasyonu sonucu sırasıyla 3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β kolestanoik asit (THCA) ve 3 α ,7 α -dihidroksi-5 β kolestanoik asit (DHCA) oluşur (37,42,43). Son olarak yan zincirin peroksomal β -oksidasyonu gerçekleşir ve C27-safra asidi ara maddelerinden C24-safra asitleri kolik asit ve kenodeoksikolik asit oluşur (5).

Klasik/nötral yolun safra asidi sentezini kontrol ederek kolesterol homeostazını korumaktan sorumlu olduğu ve alternatif/asidik yoldan daha önemli olduğu düşünülmektedir (44). Ancak bunun her durumda geçerli olmadığı, patofizyolojik koşullar söz konusu olduğunda safra asidi sentezinin alternatif yolunun daha aktif olduğu bildirilmiştir (45).

2.3.2. Alternatif/ Asidik Yol

Safra asit sentezinin alternatif/asidik yolunda asidik ara metabolitlerin oluşması bu yolun asidik yol olarak adlandırılmasına neden olur (4,25). Klasik/nötral yoldan farklı olarak bu yolda kolesterolün yan zincir oksidasyonu steroid halka yapısı modifikasyonlarından önce gelmektedir (46,47).

Klasik safra asidi sentez yolunda reaksiyonların ilk adımı sadece hepatositlerde eksprese edilen kolesterol 7α -hidroksilaz (CYP7A1) tarafından başlatılmaktadır. Asidik/alternatif yol ise birçok dokuda eksprese edilmektedir (48).

Reaksiyonların ilk basamağında iç mitokondriyal membranlarda bulunan sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi kolesterolün hidroksilasyonunu gerçekleştirir ve 3β -hidroksi-5-kolestenoik asit oluşur (4,25,49). Monohidroksi C-27 safra asidi daha sonra oksisterol 7α -hidroksilaz (CYP7B1) ile C-7 pozisyonunda hidroksilasyona uğrar ve $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi-5-kolestenoik asit oluşur (25,50). Böylece mitokondriyal sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) ve mikrozomal oksisterol 7α -hidroksilaz (CYP7B1) enzimleri aracılığıyla yan zincirin oksidasyonu gerçekleşir (51). Daha sonra, 3β -hidroksi- Δ^5 -C27-steroid dehidrogenaz (HSD3B7) steroid çekirdek yapısında modifikasyonları başlatır ve klasik yoldaki aynı enzimler halka yapı modifikasyonlarını tamamlar (52).

CYP27A1 alternatif/asidik yolun hız sınırlayıcı enzimi olduğu yönünde görüşler olsa da CYP27A1 alternatif/asidik yolun ilk enzimidir ancak hız sınırlayıcı enzim değildir. Bunun nedeni enzimin birçok dokuda yüksek oranda eksprese edilmesidir. İç mitokondriyal membranda kolesterol düşük seviyelerdedir ve kolesterolün mitokondri içine taşınmasının bu yolda hız sınırlayıcı adım olduğunu düşünülmektedir (53-57).

Normal fizyolojik koşullar altında alternatif/asidik yol aracılığı ile vücuttaki safra asit kaybının yaklaşık % 10'u karşılanmaktadır. Ancak yenidoğan döneminde sterol kolesterol 7α -hidroksilaz (CYP7A1) henüz eksprese edilemediğinden alternatif yol daha baskındır. Laktasyondan sonra ve yaşam boyu klasik yolun safra asidi sentezinde baskın olduğu düşünülmektedir (31,58,59).

2.3.3. Yamasaki Yolu

Yamasaki yolunda da alternatif/asidik yolda olduğu gibi önce yan zincir oksidasyonu ardından steroid halka yapısında modifikasyonlar gerçekleşir. Bu yolun ilk adımında sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi katalizörlüğünde 3 β -hidroksi-5-kolestenoik asit oluşur. İnsanlarda peroksisomal β -oksidasyondan önce veya sonra 7 α -hidroksilasyon ile yoldaki en önemli ara metabolit olan 3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenik asit oluşur (51,60).

İnsanlarda bu yolla sentezlenen CDCA'nın başlıca ürün olduğu düşünülmektedir (61,62).

Yamasaki yolunun insanlardaki safra asidi havuzuna katkısı tam olarak açıklanamamıştır. Fetal dönemde monohidroksi safra asitleri mekonyum ve amniyotik sıvılarda yüksek düzeyde tespit edilmiştir. Bu nedenle bu yolun gelişme döneminde önemli olabileceği düşünülmüştür (51,61,62).

2.3.4. 25-Hidroksilasyon Yolu

Halka yapısı modifikasyonundan sonra 27-hidroksilasyona ve ardından peroksisomal β -oksidasyonuna gerek duyulmadan C24-karboksilik asit elde etmek için bir başka yol da 25-hidroksilasyon yoludur. Mikrozoal enzim sterol 25-hidroksilaz (CH25H), 24 pozisyonunda bir 24S-pentole hidroksillenerek 3 α ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β kolestan-25-tetrol üretir. Daha sonra (muhtemelen) bir 24 okzo-tetrol (3 α ,7 α ,12 α -25-hidroksi-5 β kolestan-24-one) oluşur ve CA ve aseton verecek şekilde parçalanır (51,63,64).

2.4. Safra Asitlerinin Sentez Bozuklukları

Karaciğerde safra asitlerinin kolesterolden sentezlenmesi hepatositlerin farklı hücre bölümlerinde bulunan enzimler aracılığıyla gerçekleşir. Sentezde görev alan enzimlerden bir veya daha fazlasının kusurlu olması ilgili basamağı bloke eder ve safra asit havuzunda değişir. Hepatositler normal safra asidi havuzu oluşturmak için kolesterolü sürekli olarak metabolize eder ve atipik safra asidi ara maddelerinin oluşumuna neden olur. Yüksek konsantrasyonlarda biriken bu atipik safra asitleri ve safra asidi ara metabolitleri hücresel hasara neden olur (65-71).

Özellikle primer safra asitlerinin eksikliğine neden olan hepatotoksik ara metabolitler ekstrahepatik dokularda yaralanma, kolestaz, merkezi sinir sistemine bağlı bozukluklar ve yenidoğan döneminde karaciğer hasarına neden olabilir. Bu ara metabolitlerin neden olduğu karaciğer hasarı ilerleyicidir ve tedavi edilmediğinde siroz ve hatta karaciğer yetmezliğine bağlı ölümle sonuçlanabilir (66,72,73).

Safra asitlerinin sentezinde aksaklık olması kolestaz olarak ortaya çıkan bozulmuş safra akışının ana nedeni olarak kabul edilmektedir (74).

Safra kanallarında safra asitlerinden bağımsız olarak bir safra akışı söz konusudur. Ancak safra asitlerinin sentezlenip safra kanallarına pompalanmasıyla bu akış uyarılır. Safra asit sentezinde kusur olduğunda safra kanalındaki bu akış bozulur ve normalde safra ile atılan bileşiklerin tutulmasına neden olur. Safra asitleri ayrıca γ -glutamil-transpeptidaz (GGT)'ın kanaliküler membrandan salınımını uyarırlar ve safra asitlerinin eksikliği söz konusu olduğunda plazmada GGT düzeyleri artmaz (75-77).

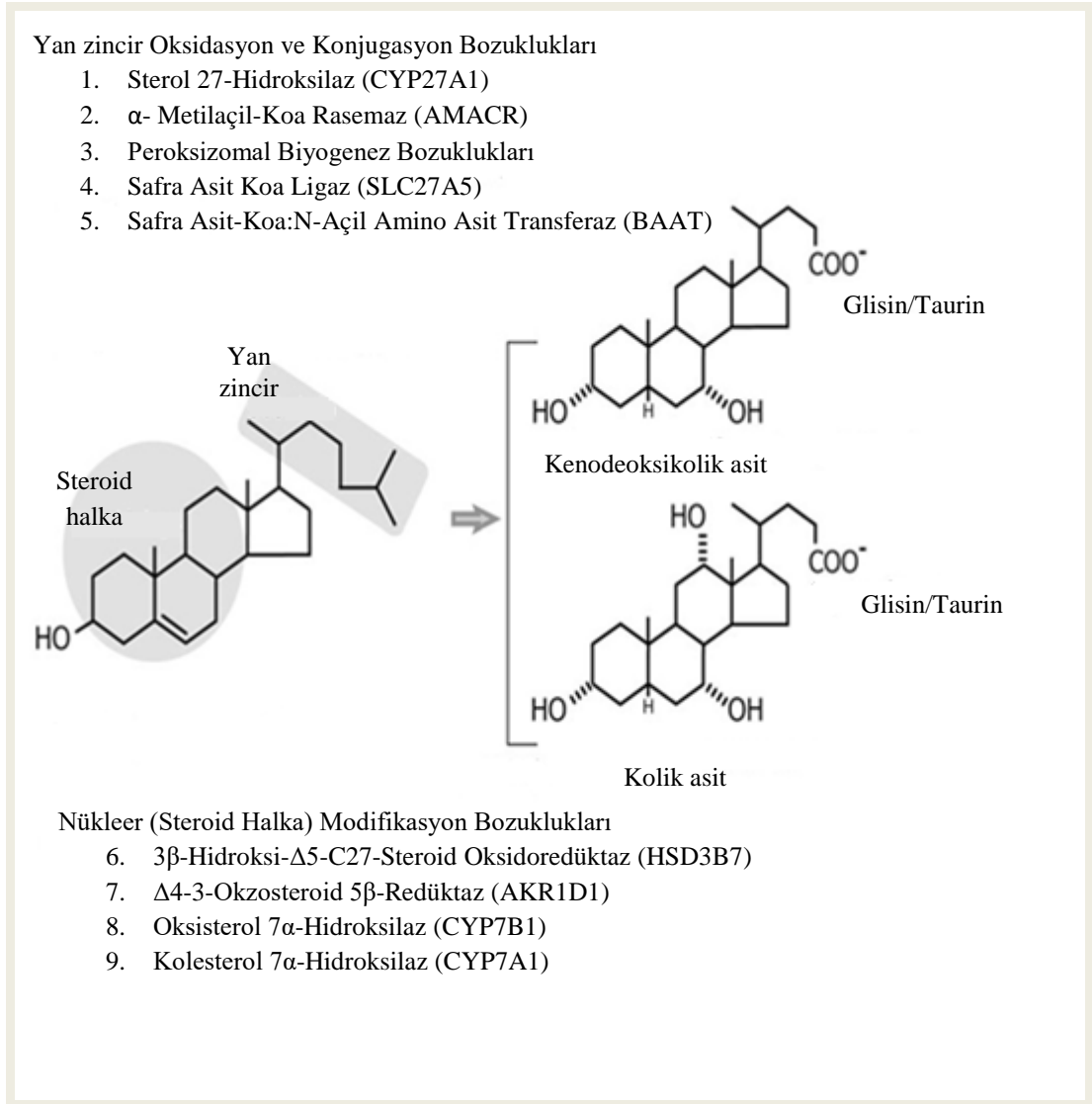
Sonuç olarak diğer kolestaz nedenlerinden farklı olarak safra asit sentez bozukluğu söz konusu olduğunda plazma GGT düzeyleri referans aralığında iken safra ile atılan bileşiklerin seviyelerinde artış görülmektedir.

Safra asidi sentezinde enzim kusurlarının neden olduğu kalıtsal safra asidi sentez bozuklukları (IEBAS) genellikle yenidoğan döneminde uzun süreli sarılık olarak ortaya çıkan genetik metabolik bozukluklar olarak tanımlanmaktadır (78).

Safra asidi sentez yollarında en az 17 enzim görev almaktadır ancak bugüne kadar sadece 9 tip IEBAS tanımlanabilmiştir (66,79). Bu kusurlar hem plazmada hem de idrarda olağandışı safra asidi ve safra asidi ara maddelerinin birikmesi ile karakterize edilir (80).

IEBAS varlığından şüphelenildiğinde plazma ve idrarda safra asit ara metabolitlerinin tespit edilmesi için en uygun tarama yöntemi atipik safra asidi ara metabolitlerinin tespit edilmesini mümkün kılan kütle spektrometrisi yöntemleridir (78,79). Tedavi edilmediğinde nörolojik semptomlarla ilerleyen ve ölümcül karaciğer hastalığı ile sonuçlanabilen bu durumda erken tanı oldukça önemlidir (6). Safra asidi replasman tedavisi ile hem eksik olan primer safra asitleri karşılanır hem de toksik ara metabolitlerin oluşumu önlenir. Böylece başarılı sonuçlar elde edilebilir (81).

Yan zincirde oksidasyon ve konjugasyon bozuklukları ve steroid halka modifikasyon bozuklukları olmak üzere bugüne kadar tanımlanan 9 IEBAS Şekil 2.5.'de gösterilmektedir (82).



Şekil 2.5. Yan zincirde ve steroid halka yapısında görülen modifikasyonlar ve tanımlanan safra asit sentez bozuklukları (82).

Safra asit sentez bozukluklarının gen sembolleri, kısaltmaları, alternatif adları ve etkilenen proteinler ayrıntılı olarak Tablo 2.1.'de yer almaktadır (83).

Tablo 2.1.Safra asidi sentez bozukluklarının gen sembolleri, kısaltmaları, alternatif adları, etkilenen proteinler ve idrar safra asit metabolitleri.

Safra Asit Sentez Bozuklukları	OMIM	Gen Sembolü	Etkilenen Protein	Biyokimyasal Parametreler	İdrar safra asit metabolitleri
3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz/izomeraz eksikliği	607764	HSD3B7	3 β -Hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz/izomeraz	AST/ALT: \uparrow Direkt bilirubin: \uparrow GGT: n	di- ve tri-hidroksi safra asitlerinin sülfat/glisin konjugatları
Δ 4-3-Okzosteroid-5 β -redüktaz eksikliği	604741	AKR1D1	Delta(4)-3-okzosteroid-5 β -redüktaz	AST/ALT: \uparrow Direktbilirubin: \uparrow GGT: n- \uparrow	7 α -Hidroksi-3-oxo ve 7 α , 12 α -dihidroksi-3-oxo-4-kolenoik asitler
Oksisterol 7 α - hidroksilaz eksikliği	603711	CYP7B1	Oksisterol 7 α -hidroksilaz	AST/ALT: \uparrow T-bil/D-bil: \uparrow GGT: n	3 β -Hidroksi-5-kolenoik asitler
Kolesterol 7 α - hidroksilaz eksikliği	118455	CYP7A1	Kolesterol 7 α -hidroksilaz	*	*
Sterol 27-hidroksilaz eksikliği	213700	CYP27A1	Sterol 27-hidroksilaz	Kolestanol (Plazma)	Kolestan pentol glukuronidleri
α -Metilaçil-KoA rasemaz eksikliği	604489	AMACR	α -Metilaçil-KoA rasemaz	AST: \uparrow ALT: \uparrow GGT: \uparrow	Taurotetra-[tri/penta]-hidroksikolestanoik asitler
Safraasit-KoA: amino asit N-açiltransferaz eksikliği	602938	BAAT	Safra asit-KoA: amino acid N açiltransferaz	Bilirubin: n- \uparrow AST: n- \uparrow ALT: n- \uparrow	Amidlenmemiş safra asitleri
Safra asit-KoA ligaz eksikliği	603314	SLC27A5	Safra asit-KoA ligaz	Direkt bilirubin: n- \uparrow GGT: n	Amidlenmemiş safra asitleri
ATP8B1 eksikliği	211600	ATP8B1	ATP8B1 (tip 4 P-tip ATPaz)	GGT: n	Klasik safra asitleri

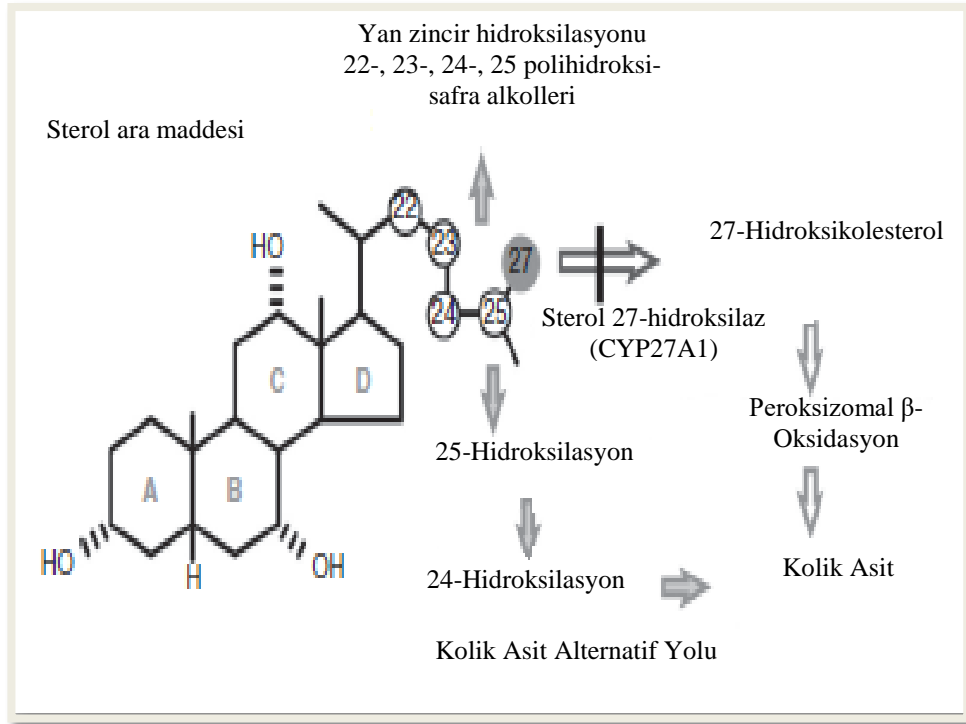
* Tek hasta tanımlanmıştır.

2.4.1. Sterol 27-Hidroksilaz Eksikliği

CYP27A1 geni dokuz ekzon ve sekiz intron içerir (56). CYP27A1 geni tarafından kodlanan sterol 27-hidroksilaz enzimi sterol ara maddelerinin C27-pozisyonunda hidroksillenmesinden sorumlu mitokondriyal enzimdir (84,85).

Serebrotendinöz ksantomatozis (CTX) safra asidi sentezinde ilk oksidasyonu adımının katalizinden sorumlu 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzim eksikliğinden kaynaklanan nadir görülen otozomal resesif lipid depo hastalığıdır (86-89). CTX ilerleyici motor ve bilişsel bozulmaya yol açan kronik bir hastalıktır (90-92).

CYP27A1 hem klasik hem de alternatif safra asidi sentez yollarında yan zincir modifikasyonlarında görev aldığı için insanlarda CYP27A1 mutasyonları C4 de dahil olmak üzere 7 α -hidroksile edilmiş kolesterol metabolitlerinin seviyelerinin artmasına neden olur (93). Sterol 27 hidroksilaz (CYP27A1) enzimi metabolik yolları Şekil 2.6.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.6. Serebrotendinöz ksantomatoza neden olan sterol 27-hidroksilaz (CYP27A1) enzimi metabolik yolu (83).

CYP27A1 enzimindeki bozukluk asidik/alternatif yolu tamamen bloke eder, çünkü bu yolda ilk reaksiyon CYP27A1 katalizi ile kolesterolden 3 β -hidroksi-5-kolestenoik aside dönüşümüdür. Klasik/nötral yolda ise reaksiyon 3 α ,7 α ,12 α -kolestan-5 β -triol seviyesinde durur ve primer safra asitlerinin eksikliğine yol açar. Safra asit sentezinin uyarılması da safra asidi ara metabolitlerinin artmasına yol açar. Primer safra asidi olan CA bir dereceye kadar 25-hidroksilasyon yolu ile sentezlenebilir. Ancak sadece bu yol eksikliğin giderilmesi için yeterli değildir. Klasik/nötral yolda oluşan 7 α -hidroksi-4-kolesten-3-one metaboliti ve kolesterol dokularda (ve ksantomalarda) biriken 5 α -kolestanole dönüştürülür (94-96).

Hastalık birçok organ sistemini etkiler ve birçok dokuda anormal kolesterol ve kolestanol birikimi ile karakterize edilir, bu da nörolojik fonksiyon bozukluğu (demans, omurilik parezi ve serebellar ataksi ile), peritendinöz ksantomalar, erken ateroskleroz ve kataraktlarla sonuçlanır (97,98). Dokularda ve özellikle beyinde biriken 5 α -kolestan-3 β -ol (kolestanol) (5 α -dihidro bir kolesterol türevi) ciddi nörolojik bozukluklara neden olur (99).

Hastalık kronik ishal ile bebeklik döneminde belirti gösterebilir. Öğrenme güçlüğü ve bilişsel bozukluk çoğu durumda çocukluk döneminde ortaya çıkabilir. Ancak sıklıkla çocukluk veya ergenlik döneminde bilateral kataraktlar görülür. CTX hastalarında nörolojik işlev bozukluğu ergenliğe kadar ortaya çıkmaz. Zihinsel işlevsellik yaşın artmasıyla ilerler ve tipik nörolojik semptomlar 20'li ve 30'lu yaşlarda belirgin bir şekilde görülür. Tedavi edilmediğinde hastalık ölüme kadar ilerleyebilir (100-105).

Klinik fenotip oldukça heterojen olduğundan hastalığın erken evrelerinde teşhis edilebilmesi zordur (106-108). CYP27A1 geninde aynı mutasyona sahip kardeşler arasında bile klinik belirtilerde farklılıklar görülebilir. Bu nedenle CTX hastalarında klinik semptomlar ile genotipik kusur her zaman ilişkili görülmektedir (89).

İlk CTX vakası 1937'de van Bogaert tarafından tanımlanmıştır (109). O zamandan beri, dünyada 300'den fazla vaka bildirilmiştir. Cinsiyet baskınlığı yoktur. CTX oldukça nadir görülen bir hastalıktır; Avrupa'da Kafkasyalılar

arasında görülme sıklığı 100.000 kişi başına 1,9 olarak tahmin edilmektedir (89). CTX'in tahmini insidansı Doğu Asya'da daha yüksektir, 100.000 kişi başına yaklaşık 15,5 (110). Japonya'da 2018'de, 3 yıldan uzun bir süredir CTX üzerine yapılan bir araştırma CTX'li 40 hastayı tanımlamıştır (111).

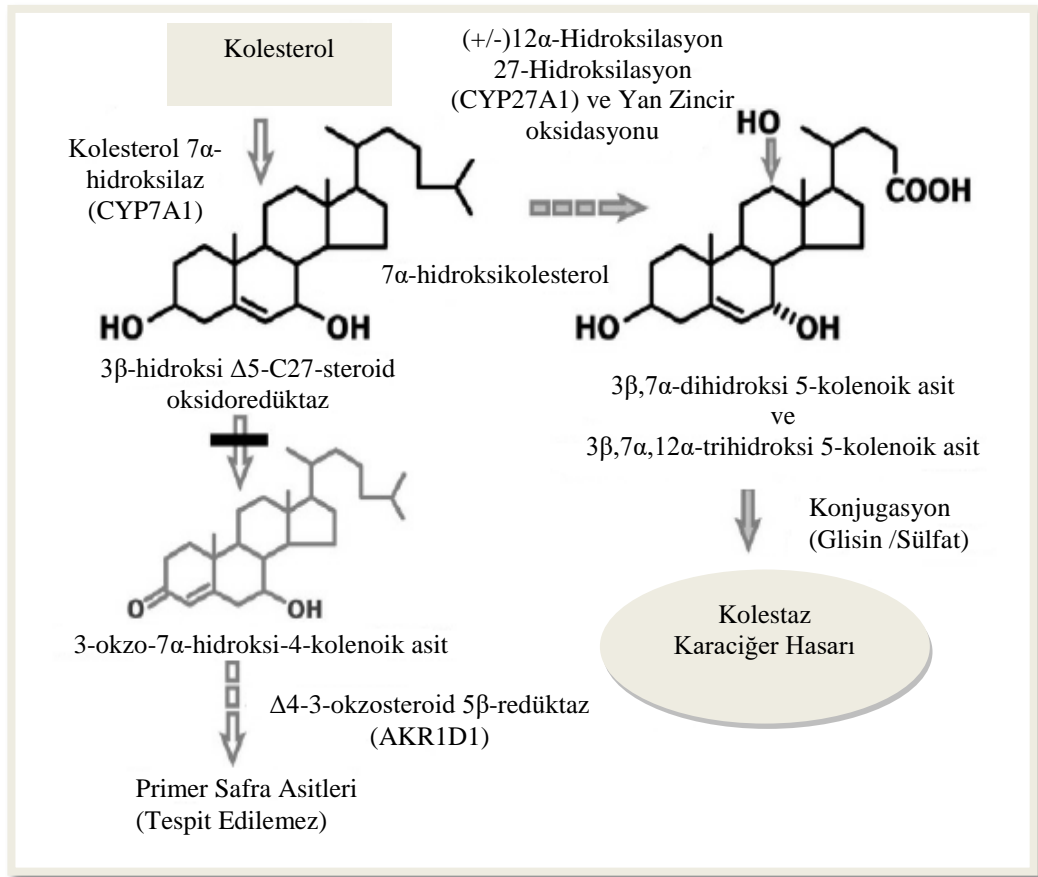
2.4.2. 3 β -Hidroksi- Δ 5-Steroid Oksidoredüktaz (Dehidrogenaz) Eksikliği

3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz (3 β -HSD) eksikliği keşfedilen ilk safra asidi sentezi bozukluğudur (112-115) ve safra asidi sentezindeki en yaygın bozukluktur (115-117). En çok yenidoğanda veya bebeklerde kolestaz olarak kendini gösterir ve tedavi edilmedikçe erken siroz ve karaciğer yetmezliğine kadar ilerleyebilir (113,118,119).

3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz (3 β -HSD) enzimi hem klasik/nötral yol hem de alternatif/asidik safra asit sentez yollarında görev alan endoplazmik retikulumda membran bağlı bir enzimdir. Enzim reaksiyonun ikinci basamağını katalizlemekten sorumludur (116,120).

HSD3B7 enzim eksikliğinde biriken 7 α -hidroksikolesterol C24-safra asitlerine dönüşür. 12 α -pozisyonda hidroksilasyonun gerçekleşip gerçekleşmemesine bağlı olarak 3 β ,7 α -dihidroksi 5-kolenoik asit ve 3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi 5-kolenoik asit metabolitleri oluşur. Sonuçta Δ 5-çift bağı indirgenemediğinden 3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolestenoik asit ve 3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolestenoik asit metabolitleri 3 α -konfigurasyonuna dönüştürülemez (24).

Bu doymamış C24-safra asitleri çoğunlukla 3 β -hidroksi konumda sülfatlanır (121) ve idrarla atılmadan önce yan zincir yalnızca glisin ile konjuge edilir (24,72,113). 3 β -hidroksi Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz eksikliği metabolik yolu Şekil 2.7.'de gösterilmektedir (83).



Şekil 2.7. 3 β -hidroksi Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz eksikliği metabolik yolu (83).

Sonuç olarak bu atipik ara metabolitler kanaliküler zar boyunca taşınamaz ve karaciğerde birikir (70). Bu metabolitler kolestatik ve hepatotoksiktir ve sentez yolundaki blokaj primer safra asitlerinin sentezinin azalmasına, dolayısıyla da bu metabolitlerin sürekli olarak sentezlenmelerine neden olur (71,122,123). Bu durumda primer safra asitlerinin kolinerjik etkisinin olmaması kolestazın başlıca nedeni olarak kabul edilmektedir. Karaciğerde biriken toksik metabolitlerin ise siroza neden olduğu düşünülmektedir (124).

3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz (3 β -HSD) enzimidaki mutasyon safra asit sentez hataları içerisinde en sık rastlanan sentez bozukluğudur. Otozomal resesif kalıtım gösteren bu bozukluk safra asidi sentez bozukluğu tip 1(CBAS1) olarak da adlandırılmaktadır (116,122,125). Hastalık ilk olarak 1987'de Clayton ve ark. tarafından tanımlanmıştır (113). HSD3B7, 2000 yılında Schwarz ve ark. (126) tarafından klonlanmış ve 3 β -HSD eksikliğine neden olan 21 farklı mutasyon tanımlanmıştır (127-129).

3 β -HSD eksikliğini erken başlangıçlı karaciğer hastalığının diğer nedenlerinden ayıran en belirgin klinik özellikler; kolestaz varlığına rağmen pruritus yokluğu, normal serum GGT seviyesi ve total serum primer safra asitlerinin normal veya düşük seviyelerde olmasıdır (124,130,131). Hastalardaki klinik belirtiler farklılık gösterebilir (132), ancak serum GGT ve toplam safra asidi konsantrasyonları önemli belirteç olarak kabul edilebilir (117). Hastalığın erken evrelerinde serum karaciğer enzimleri referans aralığı sınırlarındadır. Hastalığın ilerlemesi ile enzim düzeylerinde artışlar görülür (65).

Teşhis yaşı değişkenlik göstermektedir. Çoğu vaka bebeklik çağında veya erken çocuklukta tanımlansa da, genç veya hatta orta yaşlı yetişkinlerde de teşhis edilebilir. Klinik özellikler ve semptomlar da hastadan hastaya farklılık göstermektedir. Hatta HSD3B7 geninde heterozigot mutasyona sahip bazı hastaların asemptomatik olduğu bildirilmiştir (117,133).

2.4.3. Δ 4-3-oksosteroid 5 β -redüktaz Eksikliği

Safra asitlerinin A/B cis konfigürasyonu steroid-5 β -redüktaz veya aldo-keto redüktaz 1D1 (AKR1D1) tarafından verilir. AKR1D1 insanlarda bilinen tek steroid 5 β -redüktazdır ve ağırlıklı olarak karaciğerde eksprese edilir (134). Safra asidi biyosentezinin tüm yolları için gerekli olan Δ 4-oksosteroid 5 β -redüktaz enzimi aldo-ketoredüktaz ailesi 1 üye D1 (AKR1D1) geni tarafından kodlanır (135). Enzim halka yapısını oluşturmak için C-4 ile C-5 arasındaki çift bağın indirgenmesini katalize eder (136).

Enzim eksikliğinde çift bağ indirgenemez ve bunun sonucu olarak 3-okzo ara metabolitlerinin 3 α -hidroksil ürünlerine dönüşümü gerçekleşmez. Diğer enzim kusurlarında olduğu gibi AKR1D1 eksikliğinde de primer safra asitleri azalır. Enzim kusurunun olduğu basamakta ise Δ -4-3-okzo-steroid ara metabolitleri birikir (62). Biriken doymamış C27-3-okzo- Δ 4 steroidler daha sonra karşılık gelen C24-safra asitlerine dönüştürülür (24).

Primer Δ 4-3-oksosteroid 5 β -redüktaz eksikliği kongenital safra asidi sentezi bozukluğu tip 2, (CBAS2) olarak da adlandırılmaktadır. Nadir görülen ancak tedavi edilmediğinde yaşamı tehdit eden safra asidi sentez bozukluğudur.

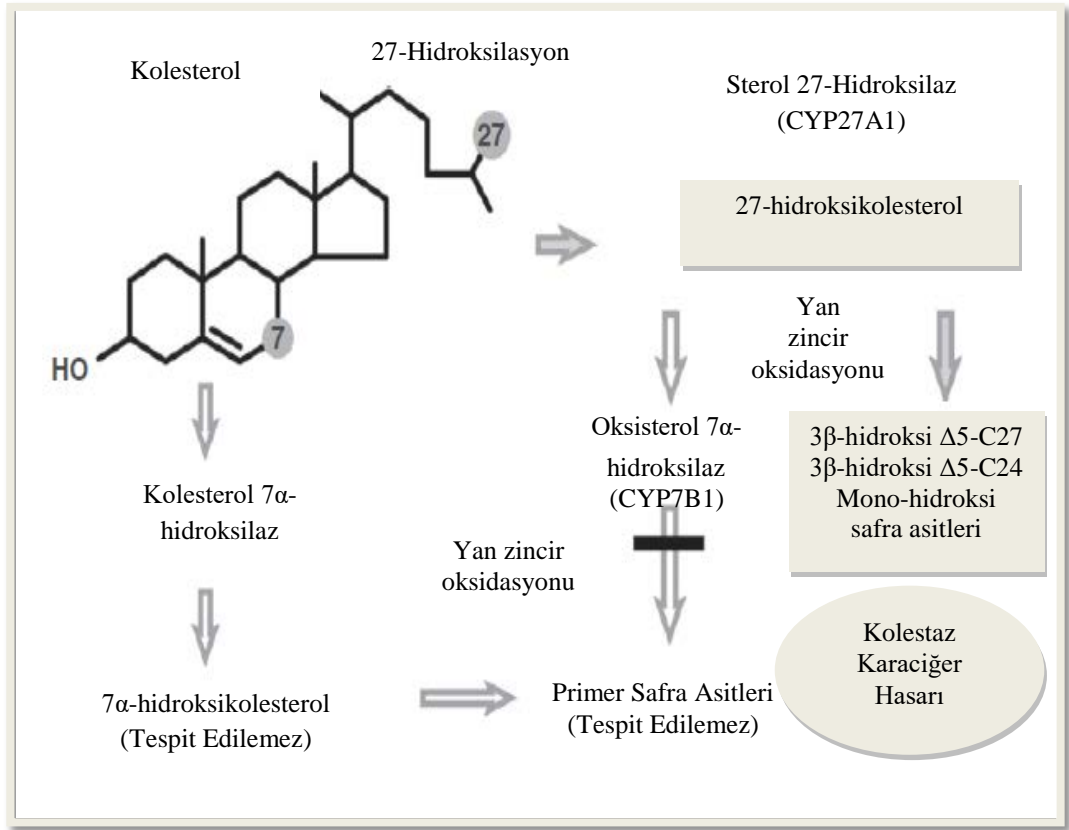
AKR1D1 enziminde mutasyon sonucu safra asit sentezi durur ve GGT'ın kanaliküler membrandan ayrılmasını kolaylaştıran primer safra asitlerinde eksikliğe neden olur. Bu nedenle diğer sentez bozukluklarından farklı olarak $\Delta 4$ -okzosteroid 5 β -redüktaz enzim eksiliğinde GGT hafif yüksek düzeydedir (78). Sekonder $\Delta 4$ -3-okzosteroid 5 β -redüktaz eksikliği ise AKR1D1 enzim aktivitesine bağlı olarak görülen sentez bozukluğudur (137).

5 β -redüktaz eksikliği iki tip içerir: SRD5B1 gen mutasyonu ile primer 5 β -redüktaz eksikliği ve SRD5B1 gen mutasyonlarının neden olmadığı sekonder 5 β -redüktaz eksikliği (138,139). 5 β -redüktazı kodlayan SRD5B1 geni 7q32-33 kromozomu üzerinde bulunur ve otozomal resesif kalıtım gösterir (136). AKR1D1 baskın olarak karaciğerde eksprese edilir (140,141). 2003 yılına kadar AKR1D1 (SRD5B1) genindeki mutasyonlara sahip hastalar tarif edilmemiştir (138,139).

2.4.4. Oksisterol 7 α -hidroksilaz (CYP7B1) Eksikliği

Oksisterol 7 α -hidroksilaz enzimi kromozom 8q21.3 üzerinde 6 ekzon içeren CYP7B1 geni tarafından kodlanır ve otozomal resesif kalıtım gösterir (142-144). CYP7B1 enzimi sadece alternatif/asidik yolda 3 β -hidroksi-5-kolestenoik asidin hidroksilasyonunu gerçekleştirir ve 3 β -dihidroksi-5-kolestenoik asit oluşur. Enzim eksikliğinde görülen kusurlar özellikle yaşamın erken dönemlerinde asidik yolun insanlarda ne kadar önemli olduğunu göstermektedir (79,145).

Oksisterol 7 α -hidroksilaz (CYP7B1) enzim aktivitesi eksikliğine bağlı safra asidi sentezi metabolik yolu Şekil 2.8.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.8. Oksisterol 7 α -hidroksilaz (CYP7B1) enzim aktivitesi eksikliği safra asidi sentezi metabolik yolu (83).

Oksisterol 7 α -hidroksilaz eksikliğinin, bilinen IEBAS vakaları arasında en düşük prevalansa sahip olduğu düşünülmektedir (125). Bugüne kadar sadece 4 vaka bildirildiğinden, klinik belirtiler veya prognozlar tam olarak açıklığa kavuşturulamamıştır (146).

1998'de ilk oksisterol 7 α -hidroksilaz eksikliği vakası tanımlanmıştır ve literatürde sadece 3 vaka bildirilmiştir. Oksisterol 7 α -hidroksilaz enzimi yaşamın erken döneminde safra asidi sentezi için kolesterol 7 α -hidroksilazdan daha önemli olabilir (142,143, 147,148).

2.4.5. Safra Asit KoA amino asit N-açiltransferaz Eksikliği

Safra asit sentez yollarının tümünde ortak olarak gerçekleşen son adım primer safra asitleri olan kolik asit ve kenodeoksikolik asidin (genellikle taurin veya glisin) C-24'e amid bağı ile konjugasyonudur. Konjugasyon ile safra

asitlerinin fiziksel ve kimyasal özellikleri değişir ve polariteleri artar (25,149,150).

Safra asit sentezinde bu son adım reaksiyonları BACL ve BAAT genleri tarafından kodlanan iki enzim aracılığıyla gerçekleşir: safra asidi KoA ligaz ve safra asidi KoA: amino asit N-açıltransferaz (151-156).

Kenodeoksikolik asit (CDCA) ve kolik asidi (CA) KoA esterlerine (kenodeoksikoloil-KoA ve koloil-KoA) dönüştüren BACL, SLC27A5 tarafından kodlanır. Kenodeoksikoloil-KoA ve Koloil-KoA'yı kenodeoksikolik asit ve kolik asidin glisin ve taurin konjugatlarına dönüştüren BAAT, BAAT geni tarafından kodlanır (157).

Bu safra asidi sentez bozukluğuna safra asitlerinin KoA esterlerini taurin veya glisin konjugatlarına dönüştüren, karaciğere özgü peroksizomal enzim safra asidi-KoA: amino asit N-açıltransferazı kodlayan BAAT genindeki mutasyonlar neden olur (78,158,159). Dolayısıyla bu enzim bozukluğunun görüldüğü hastalarda safradaki safra asitlerinin % 95'i konjuge edilmemiştir (159).

Sonuç olarak, hastalarda yağ emilim bozukluğuna ve yağda çözünen vitamin eksikliğine ve raşitizme yol açar (153,160). Bu semptomlar konjuge safra asitlerinin azalan sekresyonu sonucunda ortaya çıkar (160).

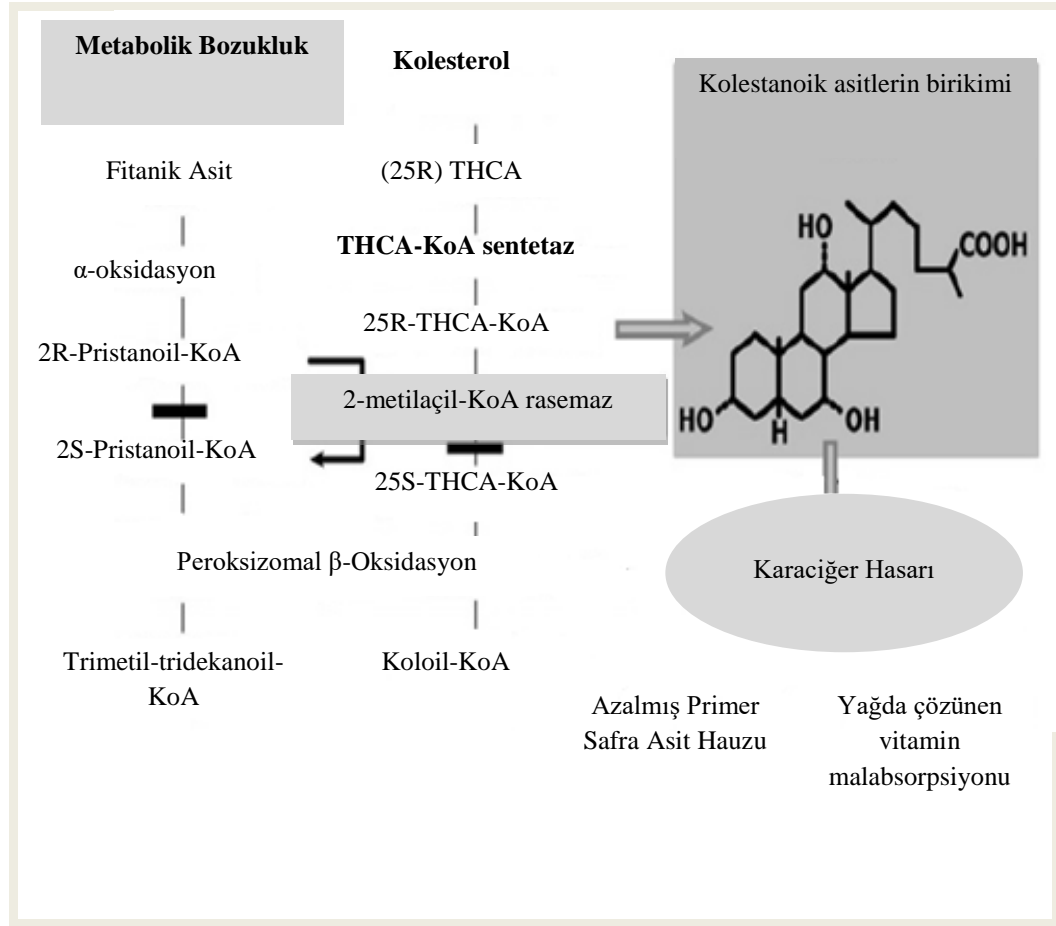
2.4.6. α -metilaçil-KoA rasemaz Eksikliği

α -metilaçil-KoA rasemaz (AMACR) hem peroksizomda hem de mitokondride β -oksidasyonda görev alan yardımcı enzimdir (161). Bu enzim eksikliğine AMACR genindeki otozomal resesif mutasyonlar neden olur (162).

AMACR, (25R)-pristanik asit, (25R)-THCA ve (25R)-DHCA dahil olmak üzere (R)-konfigurasyonunda bir metil grubu ile hem safra asidi sentezinde yer alan ara metabolitlerin hem de yağ asitlerinin izomerizasyonunu katalize eder (163). Bu enzimdeki bir eksiklik safra asidi yan zincir oksidasyonunu bozarak idrar, safra ve serumda (25R)-THCA'nın yüksek konsantrasyonlarına neden olur (164,165). Bu nedenle AMACR eksikliği, plazma, hücreler ve dokularda (25R)-pristanik asit, (25R)-THCA ve (25R)-DHCA'nın birikmesine neden olur. Bu

enzimdeki bozukluklar hem safra asidi hem de yağ asidi sentez yollarını etkiler (163,164).

α -metilaçil-KoA rasemaz (AMACR) enzimin metabolik yolları Şekil 2.9.'da gösterilmektedir.



Şekil 2.9. α -metilaçil-KoA rasemaz enzim aktivitesindeki bozukluk ve birincil safra asidi sentezi ve dallı zincirli yağ asidi sentezi metabolik yolları (83).

AMACR eksikliğinin klinik belirtileri arasında çocukluk döneminde hafif ila şiddetli karaciğer hastalığı, kolestaz ve yağda çözünen vitamin malabsorpsiyonu sayılabilir. Nörolojik semptomlar da gözlenebilir ancak bu ergenlik sonrası ortaya çıkabilir (165,166). Karaciğer hastalığının temel olarak safra asidi sentez bozukluğuna bağlı olduğunu, ilerleyici nörolojik semptomların ise temel olarak pristanik asit birikimine bağlı olduğu düşünülmektedir (24).

2.4.7. Kolesterol 7 α -Hidroksilaz (CYP7A1) Eksikliği

CYP7A1 safra asit sentez yolunda hız sınırlayıcı enzimdir ve sadece karaciğerde eksprese edilir (5).

Safra asidi sentezinin klasik/nötral yolunun ilk adımını kolesterolün (3 β -hidroksi-5-kolestanol) kolesterol 7 α -hidroksilaz (CYP7A1) enzim katalizi ile 7 α -hidroksikolesterole dönüşümüdür. CYP7A1 enzim eksikliğinde alternatif/asidik yol aktive edilir ve primer safra asitlerinin sentezi bu yolda oksisterol 7 α -hidroksilaz enzimi üzerinden devam eder. Bu nedenle CYP7A1 enzim eksikliği safra asidi eksikliğine yol açmaz. CYP7A1 eksikliği olan üç birey tanımlanmıştır. Tanımlanan üç hastanın hepsinde statine dirençli hiperkolesterolemi (yüksek LDL düzeylerine sahip) ve üç kişiden ikisinde hiper-trigliseridemi ve safra taşı hastalığı öyküsünün varlığı tespit edilmiştir. Belirtiler kolestatik karaciğer hastalığı gibi görünmese de CYP7A1 eksikliğinin hepatik kolesterol birikimine ve yetersiz safra asidi atılımına neden olduğu sonucuna varılmıştır (31).

2.4.8. Safra asit-KoA Ligaz Eksikliği

Primer safra asitlerinin sentezinin son basamağında kolik asit ve kenodeoksikolik asidin glisin veya taurin aminoasitleri ile konjugasyonu gerçekleşir (167). Reaksiyon iki enzim aracılığıyla gerçekleşir (125).

Safra asit-KoA ligaz (BACL) birincil safra asitlerinin amidasyonu için gerekli olan ilk enzimdir ve C24-safra asitlerini karşılık gelen safra asit-KoA'larına dönüştürür (33,43). BACL, endoplazmik retikulumda bulunan karaciğere özgü bir enzimdir. Ayrıca enterohepatik dolaşımda bağırsak bakterileri tarafından dekonjugasyona uğrayan safra asitlerinin yeniden konjugasyonunda gereklidir (43,168).

SLC27A5 geni tarafından kodlanan BACL enzimidaki homozigot bir mutasyon varlığı sadece iki kardeşte tanımlanmıştır (157). Bu hastaların plazma ve idrarında tespit edilen safra asitleri >% 85 unkonjuge idi (24).

2.4.9. Peroksizomal Sentez Bozuklukları

β -oksidasyon yoluyla kısaltılması gereken DHCA ve THCA'nın yan zinciri, 25 konumunda bir metil grubuna sahiptir. Sterol 27-hidroksilaz, yalnızca 25R-stereoizomerleri ve β -oksidasyon sisteminin ilk enzimi olan açıl-KoA oksidaz 2'yi (ACOX2) ürettiğinden, sadece 25S-stereoizomerlerini kabul etmesi için AMACR'nin 25R-izomerlerini 25S-izomerlerine dönüştürmesi gerekir (169). Bu stereoizomerlere dönüşüm, C-27 safra asidi yan zincirinin sonraki peroksizomal β -oksidasyonu aşaması için gereklidir (67,170). Sadece (S) konfigürasyonundaki metil grubundaki yağ asitleri, peroksizomal beta oksidasyon için substrat olarak kabul edilir (163).

AMACR eksikliğinde en çarpıcı safra asidi anormalliği, C27-safra asidi ara bileşiklerinin sadece (25R)- izomerinin varlığıdır (164,165). Buna karşılık, safra asidi biyosentezinin peroksizomal bozukluklarında, hem (25R)- hem de (25S)- izomerleri birikir (165).

2.5. Kalıtsal Metabolizma Hastalıklarında Tarama Yöntemleri

Kalıtsal metabolizma bozuklukları (IEM) terimi ilk olarak 1908'de genetik olarak belirlenmiş dört hastalığı (alkaptonüri, albinizm, sistinüri ve pentosüri) olan hastaları gözlemleyen İngiliz doktor Sir Archibald E. Garrod tarafından tanımlanmıştır (171).

Kalıtsal metabolizma bozuklukları (IEM) farklı insidanslara sahip kalıtsal hastalıklardır. Çoğu IEM bozukluğunun arkasındaki patofizyoloji, substratların doğrudan ürünlerine yetersiz dönüşümüyle sonuçlanan spesifik bir enzim kusurudur. Bu kusur, reaksiyon ürünü temel ürünlerde azalmaya ek olarak toksik etkileri olan sıra dışı metabolitlerin birikmesine yol açar. IEM'ler birden çok benzer semptom ve metabolitle ortaya çıkabilir ancak erken ve doğru teşhis oldukça önemlidir (172, 173).

Tek bir enzimin, yapısal proteinin veya taşıyıcı molekülün eksikliğinden veya enzim aktivitesindeki değişiklikten kaynaklanan bu kusurlar bugün teşhis edilmektedir, ancak bu tür hastalıklar hala nadirdir ve farklı ülke ve bölgelerde değişiklik göstermektedir (174). Bununla birlikte, genel insidanstaki

belirsizliklerin nedenleri ve dünya genelinde bireysel bozuklukların oranları ile ilgili veri eksikliği vardır. Bazı ülke veya bölgelerde akraba evliliğinin daha yüksek olması insidans oranlarını 50 kata kadar arttırabilir (175). Bu nedenle, tüm IEM'ler için evrensel bir klinik protokol kullanmak imkansızdır. Bu da sadece klinik bulgulara dayanarak ayırıcı tanıyı zorlaştırmaktadır. Klinik veriler kesin tanı için yeterli değildir. Bunun yerine, laboratuvar verileri tanı için birincil ipucu haline gelmiştir (176,177).

1980'lerde IEM'lerin taranmasında gaz kromatografisi/kütle spektrometrisi (GC/MS) kullanılmaktaydı. 1990'ların sonlarında, sıvı kromatografi/kütle spektrometrisinin (LC-MS) ortaya çıkışı ile 22 yeni IEM hastalığının hızlı teşhisi sağlandı (178). LC-MS/MS tabanlı yöntemler, bir dizi kritik metaboliti hedefler ve dünya çapında klinik rutinlerde uygulanan en yaygın kullanılan metabolomik analizleri temsil eder. Bu yöntemler daha önce kullanılan, zaman alan veya daha az hassas ölçümlere olan talebi azaltmıştır (179). Günümüzde, LC-MS ve direkt infüzyon tandem kütle spektrometrisi (MS/MS), metabolizmadaki doğuştan gelen hataların ölçümü için altın standart olarak kabul edilmektedir. IEM'lerin ardışık kütle spektrometrisi taraması, tek bir enjeksiyonla birkaç yaygın bozukluğu saptamak için ticari olarak temin edilebilen kitler kullanır (180, 181).

2.6. Kromatografi

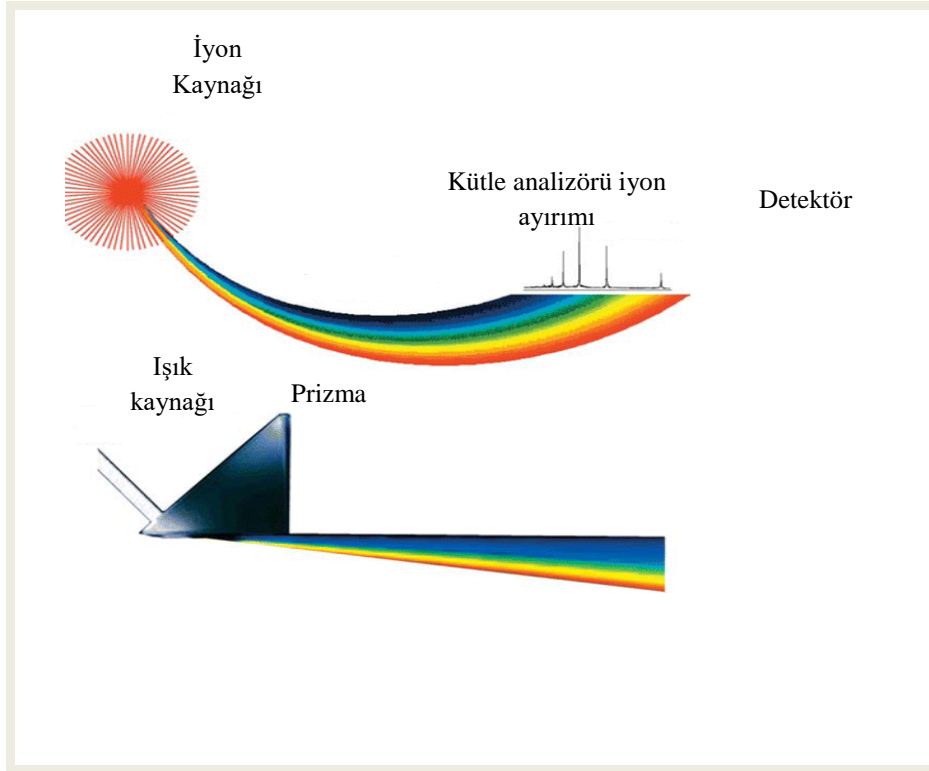
Kromatografi, bir karışımın bileşenlerinin diferansiyel etkileşimlerine göre ayrılmasını sağlayan tekniktir. Sistem mobil faz adı verilen bir hareketli faz (sıvı veya gaz) içerisinde çözüldüğü ve bu hareketli fazı geçirerek ayırmanın yapılmasını sağlayan bir sabit/durağan faz (katı veya sıvı)'dan oluşur. Mobil faz sistemden geçer ve numune uygulandıktan veya enjekte edildikten sonra numune bileşenlerini beraberinde taşır. Sabit faz sistem içinde bir destek ile tutulur ve hareket etmez. Bir numunenin bileşenleri bu sistemden geçerken, durağan faz ile en güçlü etkileşime sahip olan bileşenler bu faz tarafından daha fazla korunacaktır. Sabit faz ile daha zayıf etkileşime sahip olan ve mobil fazda daha fazla zaman harcayan bileşenlerden daha yavaş ilerler. Böylece bu bileşenlerin hareket hızında ve kromatografik sistemden geçerken ayrılmalarında bir fark oluşur (182).

2.7.Kütle Spektrometrisi

Kütle spektrometrisi (MS), analitlerden üretilen iyonların kütle-yük oranını ölçen, analitlerin kalitatif olarak tanımlanmasına ve kantitatif olarak belirlenmesine izin veren analitik bir tekniktir. Moleküllerin iyonize hale gelmeleri iyonizasyon işlemiyle gerçekleşir. Kütle/yük ayırımının sağlanabilmesi için elektrik ya da manyetik alanlar oluşturulur. Elektromanyetik alanlar ile iyonların uzaysal yörüngeleri, hızı ve/veya istikameti etkilenerek ayırma sağlanır. İyonların hareketi iyonun kütlesiyle ters orantılı ve iyonun yüküyle doğru orantılı şekilde etkilenir. m/z değerlerinin spektrumu ile moleküller tanımlanır (183).

İlk olarak fizikçi Joseph J Thomson (1856-1940) ve kimyager Francis W Aston (1877-1945) tarafından keşfedilen kütle spektrometrisinin biyokimya araştırmaları ve klinik uygulamalarda kullanımı daha geç olmuştur (184-187). MS 1970'lerin başında klinik laboratuvarlar tarafından ilk kez idrar (188-190) ve diğer vücut sıvılarında (191-193) sadece metabolik profil oluşturma için bir araştırma aracı olarak kullanılmaya başlanmıştır. MS'in ilk klinik laboratuvar uygulamaları toksikoloji analizleridir (194-199).

Bir kütle spektrometrisi, bir molekülün kütle-yük oranını (m/z) ölçerek kütlesini belirler. İyonlar, bir yükün kaybolması veya kazanılmasıyla üretilir. Bir kez oluştuktan sonra, iyonlar elektrostatik olarak bir kütle analizörüne yönlendirilir ve burada m/z 'ye göre ayrılır ve tespit edilir. Moleküler iyonizasyon, iyon ayrılması ve iyon saptamanın sonucu, moleküler kütle ve hatta yapısal bilgi sağlayabilen bir spektrumdur. Şekil 2.10.'da gösterildiği gibi bir kütle spektrometrisi ve bir prizma arasında benzetme yapılabilir. Prizmada ışık, dalga boylarına ayrılır ve daha sonra bir optik reseptör ile tespit edilir. Benzer şekilde, bir kütle spektrometrisinde, üretilen iyonlar kütle analiz cihazında ayrılır, sayısallaştırılır ve bir iyon detektörü (bir elektron çarpanı gibi) ile tespit edilir.



Şekil 2.10. Işığın dağılması ve kütle analizi işlemi karşılaştırılması (200).

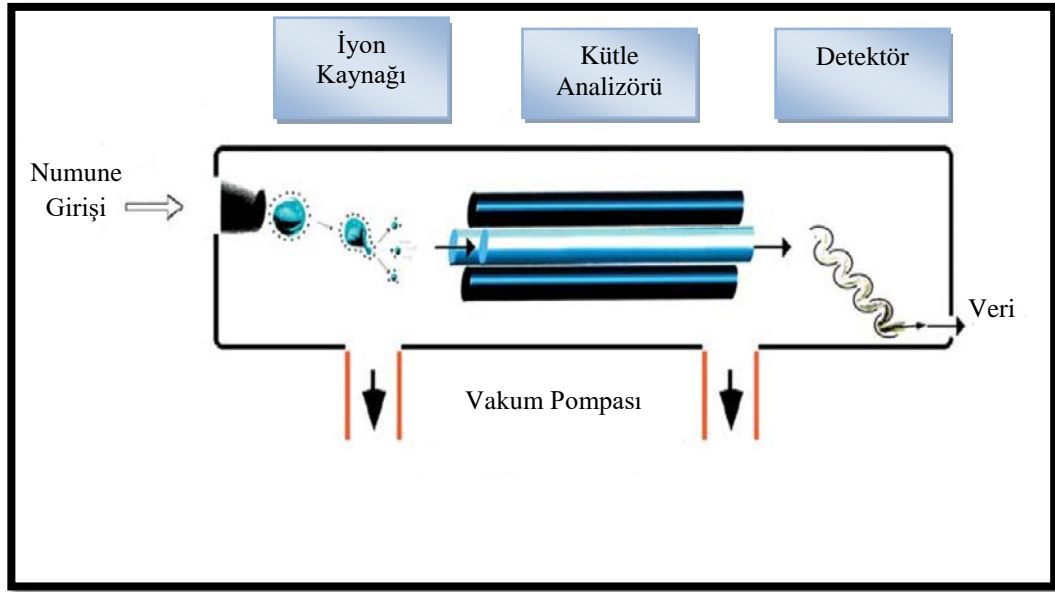
Kütle spektrometrisi, molekül ağırlığını belirlemek için atomları ve molekülleri ölçme tekniğidir. Bu tür kütle veya ağırlık bilgileri bir analitin kimliğini belirlemede her zaman yararlıdır. Böyle bir yöntemin olmazsa olmazları analit moleküllerinin iyonlara dönüştürülmesidir.

Dört temel bileşen çoğunlukla tüm kütle spektrometrilerinde standarttır:

1. Örnek girişi,
2. İyonizasyon kaynağı,
3. Kütle analizörü,
4. İyon detektörü.

Bazı bileşenler numune girişini ve iyonizasyon kaynağını birleştirirken, diğerleri kütle analiz cihazını ve detektörü birleştirir. Bununla birlikte tüm örnek moleküller, cihaz konfigürasyonuna bakılmaksızın aynı işlemlerden geçirilir.

Kütle spektrometrisinin bileşenleri Şekil 2.11.'de gösterilmektedir.



Şekil 2.11. Kütle spektrometrisi bileşenleri.

2.7.1. Numune Girişi:

Numune girişi başlangıçta kütle spektrometrisinde büyük bir sorundu. Bunun nedeni kütle analizi yapılacak maddenin atmosfer basıncında olması (760 Torr) ve numunenin cihazın iç basıncını ($\sim 10^{-6}$ Torr) değiştirmeyecek şekilde cihaza verilmesinin gerekliliği idi. Numune girişinin en yaygın yöntemleri bir prob veya plaka ile doğrudan yerleştirme (yaygın olarak MALDI-MS ile kullanılır), doğrudan infüzyon veya iyonizasyon kaynağına enjeksiyondur.

Doğrudan Yerleştirme: Bir yerleştirme probu/plakası kullanılarak bir numunenin cihaza verilmesinin çok basit bir yoludur. Numune, daha sonra kütle spektrometrisinin iyonizasyon bölgesine bir vakum aracılığıyla sokulan bir prob üzerine yerleştirilir. Numune ya termal desorpsiyonu kolaylaştırmak için ısıtılır ya da buharlaştırma ve iyonizasyonu kolaylaştırmak için lazer desorpsiyon gibi herhangi bir sayıda yüksek enerjili desorpsiyon işlemine tabi tutulur.

Doğrudan İnfüzyon: Bir örneği gaz veya çözelti halinde vermek için basit bir kılcal veya kılcal kolon kullanılır. Doğrudan infüzyon da yararlıdır çünkü vakumdan ödün vermeden az miktarda numuneyi kütle spektrometrisine etkili bir şekilde dahil edebilir. Kılcal kolonlar rutin olarak ayırma tekniklerini bir kütle spektrometrisinin iyonizasyon kaynağı ile arayüzü olarak kullanılır. Gaz

kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC) dahil olmak üzere bu teknikler ayrıca bir çözeltinin farklı bileşenlerini kütle analizinden önce ayırmaya yarar. Gaz kromatografisinde, farklı bileşenlerin ayrılması bir cam kılcal kolon içinde meydana gelir. Buharlaştırılmış numune gaz kromatografisinden çıkarken, doğrudan kütle spektrometrisine verilir.

2.7.2. İyonizasyon Kaynağı:

İyonizasyon yöntemi, iyonizasyon mekanizmasını ifade ederken, iyonizasyon kaynağı, iyonlaşmanın meydana gelmesini sağlayan mekanik cihazı tanımlamaktadır. Nötr bir molekülü elektron fırlatma yoluyla iyonize ederek işlemek, elektron yakalama, protonlama, katyonizasyon veya proton giderme yoluyla veya yüklü bir molekülü yoğunlaşmış bir fazdan gaz fazına aktararak iyonize ederek çalışır.

Protonlama, bir moleküle bir protonun ilave edildiği ve eklenen her proton için 1+ net pozitif yük üreten bir iyonizasyon yöntemidir. Pozitif yükler, kararlı katyonlar oluşturmak için aminler gibi molekülün daha temel kalıntıları üzerinde kalma eğilimindedir. Peptitler genellikle protonlama yoluyla iyonize edilir. Protonlama MALDI, elektrosprey iyonizasyonu (ESI) ve atmosferik basınçlı kimyasal iyonizasyon (APCI) ile elde edilebilir.

Deprotonasyon, bir protonun bir molekülden uzaklaştırılmasıyla net negatif yükün elde edildiği bir iyonizasyon yöntemidir. Genellikle MALDI, ESI ve APCI yoluyla elde edilen bu iyonizasyon mekanizması, fenoller, karboksilik asitler ve sülfonik asitler dahil olmak üzere asidik türler için çok yararlıdır.

Katyonizasyon, nötral bir moleküle kovalent olarak pozitif yüklü bir iyon eklenerek yüklü molekülün üretildiği bir iyonizasyon yöntemidir. Protonlama ile aynı gibi görünse de, katyonizasyon, bir proton (örn, Alkali, amonyum) dışında bir katyon ilave edilmesiyle farklılık gösterir. Ayrıca, protonlaşma kararsız moleküller için yararlı olduğu bilinmektedir. Ancak katyonların bir moleküle bağlanması doğal olarak daha az kovalenttir ve yük katyon üzerinde kalır. Bu, molekülün yükünün delokalizasyonunu ve parçalanmasını en aza indirir. Katyonizasyon yaygın olarak MALDI, ESI ve APCI yoluyla gerçekleştirilir.

Normalde çözelti içinde yüklü bileşiklerin transferi normal olarak yüklü türlerin yoğunlaştırılmış fazdan gaz fazına dezorpsiyonu veya atılması yoluyla gerçekleştirilir. Bu aktarım genellikle MALDI veya ESI yoluyla gerçekleştirilir (200).

Numunenin sisteme girişinden sonra ilk işlem iyonizasyondur. Yüklü moleküller veya molekül fragmanları oluşturmak için çalışmanın türüne göre değişikli gösteren iyon kaynağı seçilir. Seçilecek iyon kaynağının iyon verimliliğinin yüksek ve düşük enerji dağılımı sağlayacak özellikte olması tercih edilir. Gaz faz iyon kaynakları ve dezorpsiyon iyon kaynakları olarak iki gruba ayırmak mümkündür.

Gaz faz iyon kaynaklarında numune buharlaştırıldıktan sonra iyonize edilir. Dezorpsiyon iyonizasyon kaynağında ise numune direkt gaz hale geçerek iyonize olur (201). Gaz faz iyon kaynağının kullanıldığı iyonizasyon teknikleri arasında elektron iyonizasyon ve kimyasal iyonizasyon sayılabilir. Dezorpsiyon iyonizasyon teknikleri ise; Elektrosprey İyonizasyon (ESI), Atmosferik Basınçta Kimyasal İyonizasyon (APCI), Atmosferik Basınç Fotoiyonizasyon (APPI) ve Matriks Destekli Lazer Dezorpsiyon-İyonizasyon (MALDI)'dur.

Elektrosprey iyonizasyonu günümüzde kimyasal ve biyokimyasal analizlerde en yaygın kullanılan iyonizasyon tekniğidir. Elektrosprey ile çok çeşitli kimyasal maddeler iyonize edilebilir. Kütlede hiçbir sınırlama yoktur, bu da büyük kovalent olmayan protein komplekslerinin araştırılmasını bile mümkün kılar (202). MALDI ve ESI şimdi mükemmel kütle aralığı ve hassasiyet sunan biyomoleküler kütle spektrometrisi için en yaygın kullanılan iyonizasyon kaynaklarıdır (203,204)

Elektrosprey İyonizasyon (ESI)

1980'lerin sonlarında iki yumuşak iyonizasyon tekniği olan elektrosprey ve matriks destekli lazer dezorpsiyon/iyonizasyon (MALDI) keşfiyle kütle spektrometrelerinde molekül ağırlığındaki kısıtlamaları ortadan kaldırmıştır. MALDI ve ESI yöntemleri ile kütleleri 1000 Da'nın üzerinde olan moleküller gaz fazına aktarılabilir ve çok yüksek verimlilikle ve kütle bariz bir sınırlaması

olmaksızın iyonize edilebilir (205-207). Günümüzde ESI sıvı formdaki numunelerin analizi için en yaygın kullanılan tekniktir. Molekülleri doğrudan sıvı fazdan iyonize ettiği için, analitik kimyada yaygın olarak kullanılan geleneksel kromatografik ayırma teknikleriyle uyumludur. ESI, iyonların kütle spektrometrisi analizine tabi tutulmadan önce çözültiden gaz fazına geçişine yardımcı olmak için elektrik enerjisi kullanır. Çözültideki iyonik türler böylece büyük bir hassasiyetle ESI-MS ile analiz edilebilir (208).

ESI, peptitler, proteinler, karbonhidratlar, küçük oligonükleotitler, sentetik polimerler ve lipitler ile rutin olarak kullanılan bir yöntemdir. ESI, doğrudan sıvı bir çözültiden gaz halinde iyonize moleküller üretir. Bir elektrik alanı varlığında yüksek oranda yüklü damlacıkların ince bir spreyini oluşturarak çalışır.

Numune çözeltisi, 700 ila 5000 V arasında potansiyelde tutulan bir metal iğne ucundaki güçlü elektrik alanının bir bölgesinden püskürtülür. Potansiyelin uygulandığı iğne çözeltiyi, yüklü damlacıkların ince bir sprey halinde dağıtmaya yarar. Gaz, ısı veya her ikisi de damlacıklara atmosfer basıncında uygulanır, böylece çözücünün damlacıklardan buharlaşmasına neden olur. Yüklü damlacık boyutu azaldıkça, yüzeyindeki yük yoğunluğu artar. Bu yüzeydeki benzer yükler arasındaki karşılıklı *Coulombic* itme, yüzey gerilimi kuvvetlerini aşacak kadar büyük hale gelir ve iyonlar, "Taylor konisi" olarak bilinen yapıdan atılır. Başka bir olasılık, damlacıkların iyonları serbest bırakarak patlamasıdır. Her iki durumda da, ortaya çıkan iyonlar, kütle analizörünün vakumuna yol açan elektrostatik lensler vasıtasıyla bir deliğe yönlendirilir. ESI, çözeltinin sürekli olarak kullanılmasını içerdiğinden, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) veya kılcal elektroforez ile bir arayüz olarak kullanım için uygundur.

ESI içinde birçok çözücü kullanılabilir ve ilgili bileşiğin çözünürlüğüne, çözücünün uçuculuğuna ve çözücünün bir proton kaybetme yeteneğine göre seçilir. Tipik olarak metanol, 50/50 metanol/su veya 50/50 asetonitril/su gibi protik birincil çözücüler kullanılırken bazı bileşikler çözünürlüğünü arttırmak için % 10 DMSO ve izopropil alkol gibi aprotik yardımcı çözücüler kullanılır. ESI'de % 100 su kullanılmasına rağmen, suyun nispeten düşük buhar basıncı duyarlılık üzerinde zararlı bir etkiye sahiptir; uçucu bir organik çözücü eklendiğinde daha

iyi hassasiyet elde edilir. Bazı bileşikler, iyonlaşmayı kolaylaştırmak için % 0,1 formik asit içeren düz kloroform kullanılmasını gerektirir. Na⁺, K⁺ fosfat ve tuzlar gibi tamponlar, damlacıkların buhar basıncını düşürerek ESI için bir sorun oluşturur ve uçuculuğu azaltarak ESI'daki sinyali önemli ölçüde azaltır. Sonuç olarak, amonyum asetat gibi uçucu tamponlar daha etkili bir şekilde kullanılabilir (200).

2.7.3. Kütle Analizörü

Kütle analizörü kütle spektrometrisinin en temel bölümüdür. Kütle analizörü prizma ile karşılaştırılabilir. Bir ışığın bileşen dalga boyları bir prizma ile ayrılır ve daha sonra optik bir reseptör tarafından tespit edilir. Benzer şekilde kütle analiz cihazında, bir iyon ışınının farklı tipteki iyonları (m/z) ayrılır ve daha sonra detektöre ulaşır. Yüklü moleküller kararlı olmadıklarından diğer moleküllerle ya da bir yüzey ile temas ettiğinde parçalanarak yüklerini kaybederler. Kütle analizörünün doğru seçimi, bir uygulama için gereken çözünürlüğe, kütle aralığına, tarama hızına ve algılama sınırına bağlıdır.

2.7.4. Detektör

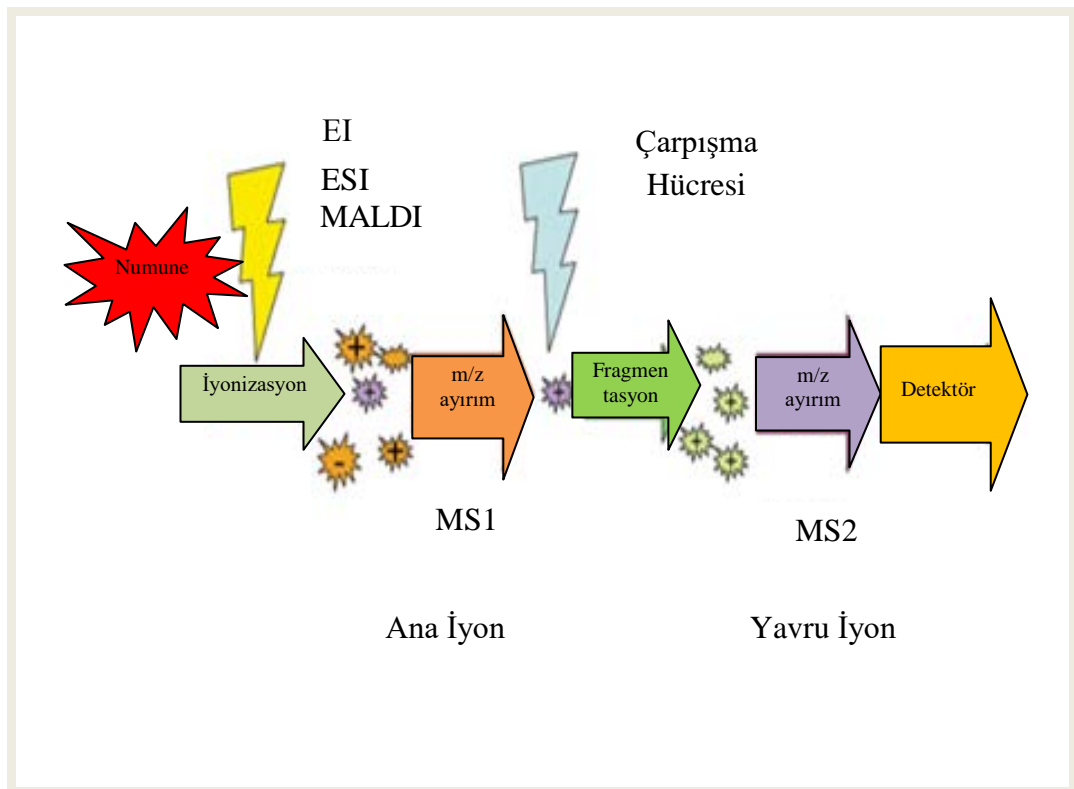
İyonlar kütle analizöründen geçtikten sonra elektron çoğaltıcı olarak kullanılan detektöre ulaşır. Yüklü partiküllerin detektör membranına çarpması sonucu elektron salınımı gerçekleşir. Her çarpışma sonrası oluşan akım dijital sinyal oluşturur ve detektörde oluşan sinyal yoğunluğunun zamana bağlı değişimi iyon kromatogramı olarak kaydedilir (209).

2.8. Sıvı Kromatografisi-Ardışık Kütle Spektrometrisi (LC-MS/MS)

Sıvı kromatografi-ardışık kütle spektrometrisi (LC-MS/MS), bir numunede farklı bileşiklerin ayrılması, tanımlanması ve kantitasyonu için kullanılan hassas bir analitik tekniktir. Bu teknik, güçlü bir ayırma yöntemi olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kütle spektrometrisi-kütle spektrometrisi (MS/MS) yönteminin birleşmesiyle oluşur. Bunun sonucu olarak da yüksek özgüllük ve hassasiyete sahip LC-MS/MS sistemleri protein, peptit ve

oligonükleotit analizi, ilaç keşfi ve klinik ilaç testi gibi farklı bileşikler için laboratuvarlarda tercih edilen oldukça hassas bir yöntem haline gelmiştir.

Sıvı kromatografisi sıvı karışımda bulunan bileşenlerin sabit ve hareketli faz aracılığıyla ayrıldığı fiziksel bir yöntemdir. Numuneler sıvı kromatografisi sistemi ile ayrıldıktan sonra kütle spektrometreleri analit moleküllerini bir iyon kaynağı ile iyonize duruma dönüştürür. İyonizasyon, sistem arayüzünde gerçekleşir ve yüklü partiküller oluşur. İyonlaşan bu yüklü damlacıklar MS/MS ünitesine gönderilir. Burada iyonlar ilk kuadrupolden kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrışır ve çarpışma hücresine geçer. Burada parçalananan moleküller ikinci kuadropole geçerek ikinci ayrışma sağlanır. İyonlar bir kütle analizöründe kütle / yük (m/z) oranlarına göre analiz edilir ve daha sonra detektör tarafından kantitasyonu sağlanır. LC-MS/MS sisteminin kısımları Şekil 2.12.'de gösterilmektedir (210,211).



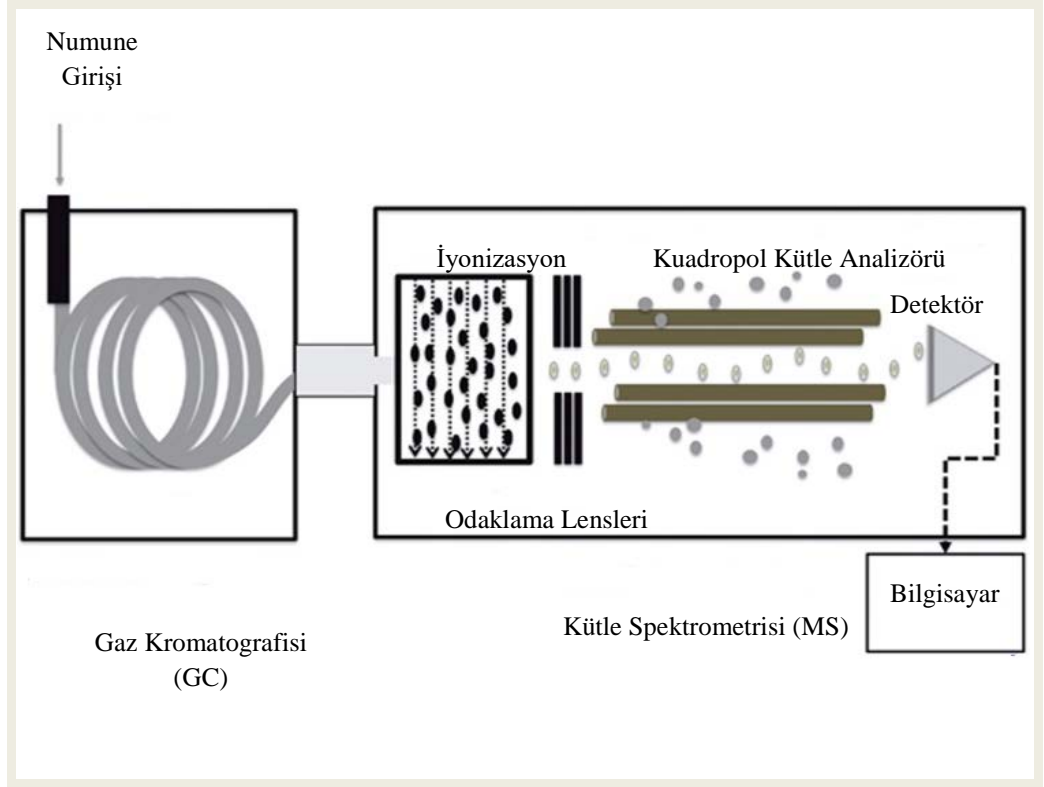
Şekil 2.12. LC-MS/MS sisteminin kısımları.

2.9. Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi (GC/MS)

Gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi iki temel bölümden oluşur: gaz kromatografisi (GC) ve kütle spektrometrisi (MS). Kimyasal karışımların ayrılabilirdiği, tanımlanabilirdiği ve nicelleştirilebilirdiği popüler, ucuz ve kullanımı kolay bir tekniktir. Bir bileşidin GC/MS tekniği ile analiz edilebilmesi için yeterince uçucu ve termal olarak kararlı yapıda olması gerekir. Bu kararlılık bileşiklerin türevlendirilmesiyle sağlanır. Ayrıca elde edilen verilerin kalitesini aksi yönde etkileyecek, istenmeyen adsorpsiyon etkilerini ortadan kaldırmak için analizden önce kimyasal modifikasyon gerekebilir.

Numune GC sistemine enjekte edildiğinde burada buharlaştırılır ve taşıyıcı gaz (genellikle helyum) tarafından bir kromatografik kolon üzerine püskürtülür. Numune kolondan geçerken ilgilenilen karışımı içeren bileşikler, kolonun iç yüzeyi (sabit faz) ve taşıyıcı gaz (mobil faz) ile kısmi etkileşimleri nedeniyle ayrılır. Kolonun ikinci kısmı ısıtılmış bir transfer hattından geçer ve iyon kaynağının girişinde sona erer. Burada kolondan çıkan bileşikler iyonlara dönüştürülür. İyonizasyon iki farklı şekilde gerçekleşebilir. En sık kullanılan yöntem elektron iyonizasyonu (EI) ve nadiren kullanılan alternatif kimyasal iyonizasyondur (CI). EI tekniğinde elektron demetleri molekülleri iyonize eder ve elektron kaybına neden olur. Bir elektronunu kaybeden molekül moleküler iyon olarak adlandırılır. Bu iyondan elde edilen pik bir kütle spektrumunda ulaştığında bileşidin molekül ağırlığı elde edilir.

Bir sonraki bileşen, pozitif yüklü iyonları, kullanılan analizöre bağlı olarak kütle ile ilgili çeşitli özelliklere göre ayıran bir kütle analizörüdür. En yaygın olanları kuadropoller ve iyon tuzaklarıdır. İyonlar ayrıldıktan sonra sinyalin çoğaltıldığı detektöre çarptırılır. Detektör oluşan sinyalleri zamana karşı toplam iyon kromatogramı (TIC: Toplam İyon Kromatogramı) veya zamana karşı tek iyon kromatogramı (SIC: Tek İyon Kromatogramı) şeklinde bilgisayara gönderir. Farklı GC-MS modelleri bulunsa da temel kısımlar hepsinde ortaktır. Gaz kromatografisi kütle spektrometrisinin temel kısımları Şekil 2.13.'de gösterilmektedir (212,213).



Şekil 2.13. Gaz kromatografisi dört kutuplu kütle spektrometrisinin (GC/MS) şematik diyagramı (211).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Kimyasallar ve Cihazlar

3.1.1. Kimyasallar

1. GCA (glikokolik asit sodyum hidrat tuzu) (LGC, Ürün Kodu, TRC-G641360)
2. TCA (taurokolik asit sodyum hidrat tuzu) (LGC, Ürün Kodu, TRC-T008851)
3. CA (Kolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-C432600)
4. GCA-3S (Glikokolik asit 3-sülfat) (*)
5. TCA-3S (Taurokolik asit 3-sülfat) (*)
6. CA-3S (Kolik asit 3-sülfat) (*)
7. GCDCA (Glikokenodeoksikolik asit sodyum tuzu, ultra-saf, <97%) (Sigma, Ürün Kodu, G-0759)
8. TCDCA (Taurokenodeoksikolik asit sodyum tuzu) (LGC, Ürün Kodu, TRC-T008130)
9. CDCA (Kenodeoksikolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-C291900)
10. GCDCA-3S (Glikokenodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
11. TCDCA-3S (Taurokenodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
12. CDCA-3S (Kenodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
13. GUDCA (Glikoursodeoksikolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-G679550)
14. TUDCA (Tauroursodeoksikolik asit sodyum tuzu, 90%) (LGC, Ürün Kodu, TRC-T009200)
15. UDCA (Ursodeoksikolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-U850000)
16. GUDCA-3S (Glikoursodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
17. TUDCA-3S (Tauroursodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
18. UDCA-3S (Ursodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
19. GDCA (Glikodeoksikolik asit sodyum tuzu) (LGC, Ürün Kodu, TRC-G641400)
20. TDCA (Taurodeoksikolik asit) (Sigma, Ürün Kodu, T0557)
21. DCA (Deoksikolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-D232645)
22. GDCA-3S (Glikodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
23. TDCA-3S (Taurodeoksikolik asit 3-sülfat) (*)
24. DCA-3S (Deoksikolik asit 3-sülfat) (*)

25. GLCA (Glikolitokolik asit) (CIL, Ürün Kodu, ULM-9555)
26. TLCA (Taurolitokolik asit sodyum tuzu) (LGC, Ürün Kodu, TRC-T009100)
27. LCA (Litokolik asit) (LGC, Ürün Kodu, TRC-L469180)
28. GLCA-3S (Glikolitokolik asit 3-sülfat) (*)
29. TLCA-3S (Taurolitokolik asit 3-sülfat) (*)
30. LCA-3S (Litokolik asit 3-sülfat) (*)
31. GHCA (Glikohiyokolik asit sodyum tuzu) (Steraloids, Ürün Kodu,C1860-000)
32. THCA (Taurohiyokolik asit sodyum tuzu) (Steraloids, Ürün Kodu,C1887-000)
33. HCA (Hiyokolik asit) (Steraloids, Ürün Kodu,C1850-000)
34. CA d4 (Kolik asit; 2,2,4,4-D4, 98%) (CIL, Ürün Kodu, DLM-2611)
35. GCA d4 (Glikokolik asit; 2,2,4,4-D4, 98%) (CIL, Ürün Kodu, DLM-2742)
36. TCA d4 (Taurokolik asit sodyum tuzu; 2,2,4,4-D4, 98%) (LGC, Ürün Kodu, DLM-9570)
37. GCDCA d4 (Glikokenodeoksikolik asit sodyum tuzu; 2,2,4,4,-D4,98%) (CIL, Ürün Kodu, DLM-7804)
38. TCDCA d4 (Taurokenodeoksikolik asit sodyum tuzu; 2,2,4,4-D4, 98%) (CIL, Ürün Kodu, DLM-9562)
39. GCA-1 β -ol (1 β -hidroksi-glikokolik asit) (*)
40. TCA-1 β -ol (1 β -hidroksi-taurokolik asit) (*)
41. CA-1 β -ol (1 β -hidroksi-kolik asit) (*)
42. GCA-6 α -ol (6 α -hidroksi-glikokolik asit) (*)
43. CA-6 α -ol (6 α -hidroksi-kolik asit) (*)
44. CDCA-1 β -ol (1 β -hidroksi-kenodeoksikolik asit) (*)
45. G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3 (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit N-(karboksimetil amid) (*)
46. T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3 (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil amid) (*)
47. Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3 (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit) (*)
48. T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil amid 3-sülfat) (*)
49. Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit 3-sülfat) (*)
50. G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2 (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit N-(karboksimetil amid) (*)

51. T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂ (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid) (*)
52. Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂ (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit) (*)
53. G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit N-(karboksimetil) amid 3-sülfat) (*)
54. T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid 3-sülfat) (*)
55. Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit 3-sülfat) (*)
56. G- Δ^5 -3 β -OH (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit N-(karboksimetil) amid) (*)
57. T- Δ^5 -3 β -OH (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid) (*)
58. Δ^5 -3 β -OH (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit) (*)
59. G- Δ^5 -3 β -OH-3S (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit N-(karboksimetil) amid 3-sülfat) (*)
60. T- Δ^5 -3 β -OH-3S (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid 3-sülfat) (*)
61. Δ^5 -3 β -OH-3S (3 β -hidroksi-5-kolenoik asit 3-sülfat) (*)
62. Δ^5 -3 β ,12 α -(OH)₂ (3 β ,12 α -dihidroksi-5-kolenoik asit) (*)
63. GCA- Δ 4-3-one (7 α ,12 α -dihidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit N-(karboksimetil) amid) (*)
64. TCA- Δ 4-3-one (7 α ,12 α -dihidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid) (*)
65. CA- Δ 4-3-one (7 α ,12 α -dihidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit) (*)
66. GCDCA- Δ 4-3-one (12 α -hidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit N-(karboksimetil) amid) (*)
67. TCDCA- Δ 4-3-one (12 α -hidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit N-(2-sülfoetil) amid) (*)
68. CDCA- Δ 4-3-one (12 α -hidroksi-3-okzo-4-kolenoik asit) (*)
69. CA- Δ 4,6-3-one (12 α -hidroksi-3-okzo-4,6-koladienoik asit) (*)
70. CDCA- Δ 4,6-3-one (3-okzo-4,6-koladienoik asit) (*)
71. nor-CA (nor-kolik asit) (*)
72. C27-DHCA (3 β ,7 α -dihidroksi-5 β -kolestanoik asit) (*)
73. C27-THCA (3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5 β -kolestanoik asit) (*)
74. 5 α -Kolestan-3 β -ol (Sigma-Aldrich, D6128)
75. 5 α -Kolestan (Sigma-Aldrich, C8003)
76. 7-Dehidrokolesterol \geq 95.0% (HPLC) (Sigma-Aldrich, 30800)

77. Kolesterol Sigma Grade, $\geq 99\%$ (Sigma-Aldrich, C8667)
78. N,O-bis trimetilklorosilan ile (trimetilsilil) trifloroasetamid (BSTFA+%10TMCS) (Supelco, T6381)
79. Hekzan (Merck, 104371.2500)
80. Amonyum Asetat (Merck, 101116)
81. Potasyum Hidroksit (Merck, 105012)
82. Aseton (Merck, 100012)
83. Asetonitril (Sigma-Aldrich, 00687)
84. Formik Asit (Sigma-Aldrich, 56302 Fluka)
85. Metanol (Sigma-Aldrich, 34885)
86. Etanol (Sigma-Aldrich, 108543)
87. Piridin (Silylation Grade) (Merck, 107462)

* Prof. Murai (Faculty of Pharmaceutical Sciences, Health Services University of Hokkaido, Hokkaido Japan) ve Prof. Iida (Nihon University College of Humanities and Sciences, Tokyo, Japan) 2 mg sentezletirildi.

3.1.2. Cihazlar

1. LC-MS/MS Sıvı Kromatografisi-Üçlü Kuadropol Kütle Spektrometrisi (Shimadzu 8040, Japonya)
2. GC-MS Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi (Shimadzu QP2010, Japonya)
3. Biyokimya Analizörü (Beckman Coulter AU680, ABD)
4. Su Banyosu (Nüve B5)
5. Evaporatör (Univapo 150H)
6. Santrifüj (NüveNF-1200R)
7. Etüv (Thermo Scientific Heraeus)
8. Azot uçurucu (VLM GmbH 33689 Bielefeld 1302001)
9. Kuru Blok Isıtıcı (Allsheng MK200-1)
10. Vorteks Karıştırıcı (Velp Scientifica 2X)(Heidolph Reax 2000 shaker)
11. Elektronik Hassas Terazî (Mettler ToledoAG204)
12. Sonikatör (Bandalin Sonorex)
13. -80 °C Derin Dondurucu (MDF-U6086S)
14. -20 °C Derin Dondurucu (DF-300)

15. Distile su cihazı (mpMinipure SUPER OTO-UP OTO)

3.1.3. Cam ve Sarf Malzemeler

1. Cam malzemeler (Interlab)
2. Otomatik Pipetler (Isolab; 10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL)
3. Pipet Uçları (Isolab; 10-100 µL, 100-1000 µL, 1-5 mL)
4. Vial (vida kapaklı) (Shimadzu)
5. İnsert (Shimadzu)
6. Ependorf tüp (Polipropilen, 1,5-2 mL)
7. LC-MS/MS Kolonu (İnertSustain C18 3 µm (150 x 2,1 mm))
8. GC-MS Kolonu (Rtx-1701 (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 mm))

3.2. Çalışma Grupları

Çalışma grubunu, Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Gastroenteroloji, Hepatoloji Bilim Dalı'na başvuran nedeni açıklanamayan kronik karaciğer hastalığı ve kolestaz tanısı almış 13 hasta oluşturmaktadır. Kontrol grubunu, kronik karaciğer hastalığı olmayan rutin kontroller için gelen ve rutin tetkikleri sağlıklı değerlerde çıkan 50 gönüllü sağlıklı birey oluşturmaktadır. Çalışma ve kontrol grubundaki bireylerin yaş ve cinsiyetlerinin benzer olmasına dikkat edilmiştir.

Çalışma ve kontrol grubundaki bireyler ve ebeveynleri araştırma amaçlı çalışma için düzenlenmiş aydınlatılmış onam formlarını ve rıza formlarını okuyarak çalışmaya katıldıklarını kabul etmişlerdir.

3.3. Örneklerin Toplanması

Çalışma grubundaki hastalar ve kontrol grubundaki gönüllülerden 1 kez idrar örneği alınmış ve çalışmaya kadar -80 °C'de saklanmıştır. Rutin testler için alınan kanlardan bir miktar ayrılmış ve çalışmada kullanılmak üzere -20 °C'de saklanmıştır. Alınan idrar ve ayrılan kan örnekleri Hacettepe Üniversitesi Hastaneleri Merkez Laboratuvarında analiz edilmiştir.

3.4.Verilerin Toplanması:

Bu tez kapsamında ölçülen 68 adet safra asidi çeşidi ve total safra asidi bu araştırma için özel olarak yapılmıştır. Hasta grubunun rutin istenen testlerinin ve incelemelerinin (Lipid Profili, ALT, AST, GGT, Total Bilirubin, Direkt Bilirubin, kayıtları hasta takip formu ile tutulmuştur (EK-3).

3.5. Yöntemler

3.5.1. LC-MS/MS Yöntemi

3.5.1.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Altmış sekiz safra asidinin standart ana stok çözeltileri 1000 µg/mL olacak şekilde saf etanolde hazırlanmıştır. Safra asit standartlarından 5 mg tartılarak üzerlerine 5 mL saf etanol ilave edilmiş ve çözümleri sağlanmıştır. Bu ana stok çözeltilerden 100 µL alınarak üzeri saf etanol ile 1000 µL'ye tamamlanmış ve derişimleri 100 µg/mL olan ara stok çözeltiler hazırlanmıştır. LC-MS/MS analizinde kullanılacak çalışma standartları bu ara stok çözeltiler kullanılarak hazırlanmıştır.

Altmış sekiz safra asidi türlerinin 10000 pmol/mL derişimindeki stok çalışma standartları %20 asetonitril ile çalışma öncesinde taze olarak hazırlanmıştır. Stok standart çözeltiler ve çalışma standartları -80 °C'de saklanmıştır.

Standart Doğru için Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

50-1000 pmol/mL arasında değişen 5 farklı seride standart doğru için kullanılacak standart çözeltiler %20 asetonitril içinde hazırlanmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

Standart doğru için standart çözeltilerinin derişimleri sırasıyla 1000 pmol/mL, 500 pmol/mL, 200 pmol/mL, 100 pmol/mL, 50 pmol/mL olarak belirlenmiştir.

Safra asit standartları ait oldukları gruplar ve moleküler iyonlarının m/z değerleri ve alıkonma süreleri dikkate alınarak gruplandırılmış ve 68 safra asidi

standartı için derişimi 1000 pmol/mL olan yedi farklı karışım hazırlanmıştır. 5 farklı seride standart çözeltilerin hazırlanmasında bu karışımlar kullanılmıştır. 1000 pmol/mL, 500 pmol/mL, 200 pmol/mL, 100 pmol/mL, 50 pmol/mL derişimdeki çözeltilerin hazırlanması Tablo 3.1.'de gösterilmektedir.

Tablo.3.1 Standart doğru için standart çözeltiler ve derişimleri.

	Karışım (1000 pmol/mL)	Kalibratör 4 (100 pmol/mL)	ACN:H ₂ O (%20)
Kalibratör 1 (1000 pmol/mL)	1000 µL	--	--
Kalibratör 2 (500 pmol/mL)	250 µL	--	250 µL
Kalibratör 3 (200 pmol/mL)	100 µL	--	400 µL
Kalibratör 4 (100 pmol/mL)	100 µL	--	900 µL
Kalibratör 5 (50 pmol/mL)	--	500 µL	500 µL

İnternal Standart (IS) Çözeltilerinin Hazırlanması:

İnternal standart olarak safra asidi türlerinin döteryum ile işaretlenmiş d₄-CA, d₄-GCA, d₄-TCA, d₄-GCDCA, d₄-TCDCA, d₅-CDCA-3S, d₅-GCDCA-3S, d₅-TCDCA-3S standartları kullanılmıştır. Her bir internal standarttan derişimi 1000 µg/mL olan ana stok internal standart çözeltiler %100 saf etanol kullanılarak hazırlanmıştır. Bu ana stok internal standart çözeltilerden 100 µL alınarak üzeri %100 saf etanol ile 1000 µL'ye tamamlanmış ve derişimleri 100 µg/mL olan ara stok internal standart çözeltiler hazırlanmıştır. Her bir internal standart %20 asetonitril kullanılarak 10000 pmol/mL derişimli çözeltiler elde edilmiştir. Sekiz internal standart çözeltisi eşit hacimde karıştırılarak (8x125 µL) 1000 pmol/mL derişimli internal standart çalışma çözeltisi elde edilmiştir. Bu internal standart

çalışma çözeltisi her çalışma öncesinde günlük olarak hazırlanmıştır. Stok standart çözeltiler $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

Mobil Fazların Hazırlanması:

Mobil Faz A: 500 mL 10 mM amonyum asetat çözeltisi ve 500 mL %0,01 (w/v) formik asit çözeltilerinin karışımından oluşmaktadır. Amonyum asetat ve formik asit çözeltilerinin hazırlanmasında LC-MS/MS analizine uygun saflıkta su kullanılmıştır.

Mobil Faz B: Yüksek saflıkta asetonitrilden oluşmaktadır.

Mobil fazlar çalışma öncesinde günlük olarak hazırlanmıştır. Kullanımdan önce 10 dk süreyle ultrasonik banyoda bekletilerek degaze edilmiştir.

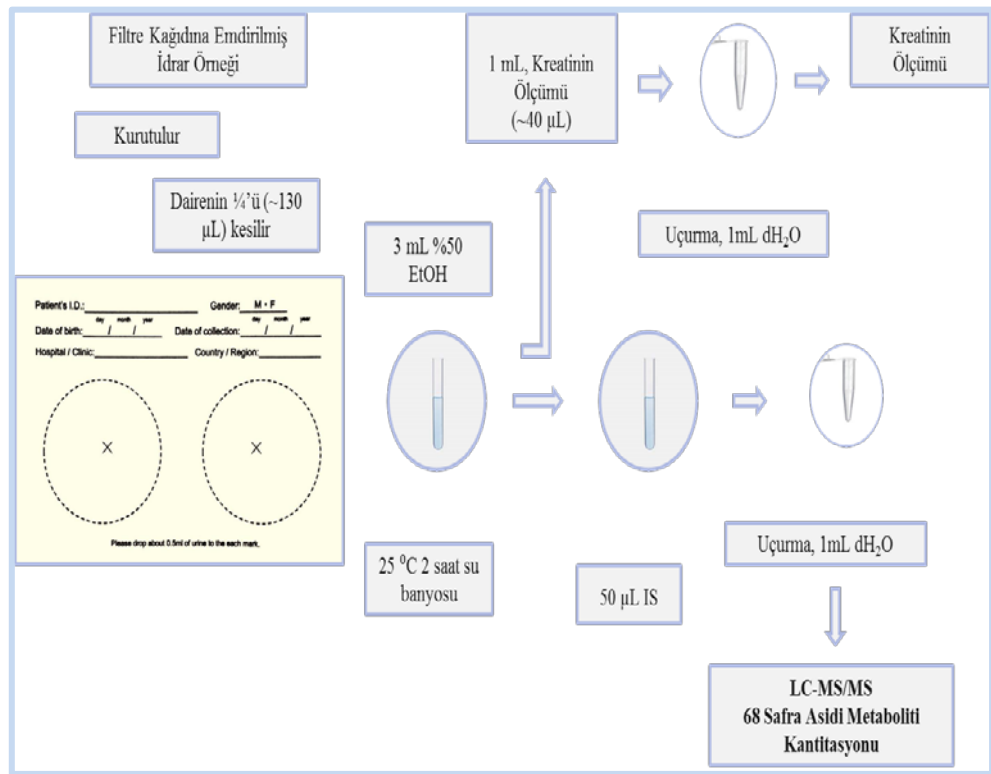
3.5.1.2. Örneklerin Hazırlanması

Her çalışma için çalışma ve kontrol gruplarından toplanan idrar örneklerinden 500 μL alınmıştır. Geri kalan idrar örnekleri $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmıştır.

LC-MS/MS yöntemi ile klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -safra asitleri ve 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitleri tayini için 500 μL idrar örneği kuru kâğıda (filtre kâğıdına) damlatılarak yaklaşık 4-5 saat oda sıcaklığında kuruması sağlanmıştır. Kuruyan filtre kağıdı dört eşit parçaya kesilmiş ve $\frac{1}{4}$ 'lük kısmı alınarak (yaklaşık 130 μL idrar) cam tüpe konulmuştur. Üzerine 3 mL %50 etanol eklenerek 2 saat süre ile 25°C 'de su banyosunda inkübe edilmiştir. İnkübasyondan sonra 1 mL ependorf tüpe alınmış ve kreatinin ölçümü için ayrılmıştır. Safra asidi ölçümleri için 1 mL alınarak üzerine 50 μL döteryumla işaretlenmiş internal standartlar (d_4 -CA, d_4 -GCA, d_4 -TCA, d_4 -GCDCA, d_4 -TCDCA, d_5 -CDCA-3S, d_5 -GCDCA-3S ve d_5 -TCDCA-3S) eklenmiş ve vortekslenmiştir. Çözücünün evaporatörde uzaklaştırılmasından sonra üzerine 1 mL LC-MS/MS analizine uygun saflıkta H_2O ilave edilerek ultrasonik su banyosunda çözündürülmüştür. Çözeltilerden 1 mL viallere alınarak LC-MS/MS cihazında analize hazır hale getirilmiştir.

Kreatinin ölçümü için inkübasyondan sonra ayrılan 1 mL örnek evaporatöre alınarak çözücü uçurulmuş ve üzerine 1 mL LC-MS/MS analizine uygun saflıkta H₂O ilave edilerek Biyokimya Analizörü (Beckman Coulter AU680) cihazında kreatinin ölçümü yapılmıştır.

LC-MS/MS yöntemi ile analiz edilecek idrar örneklerinin hazırlanmasında uygulanan iş akışı Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. İdrar Örneklerinin Hazırlanması.

3.5.1.3. LC-MS/MS Çalışma Koşulları

Çalışma ve kontrol gruplarından alınan idrar örneklerinde kantitatif olarak LC-MS/MS yöntemi ile klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3 β -hidroksi Δ 5-safra asitleri ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri derişimlerini belirlemek için Shimadzu marka LC/MS-8040 model Sıvı Kromatografisi-Kütle Spektrometresi kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için İnertSustain C18 3 μ m (150 x 2.1 mm) kolonu kullanılmıştır. Kütle spektrofotometrisinde elektrosprey iyonizasyon (ESI) kaynağı kullanılmış ve analiz negatif iyonizasyon modunda gerçekleştirilmiştir. Altmış sekiz safra asidinin ana iyon ve yavru iyon kütle/yük (m/z) değerleri dikkate alınarak

tarama tipi MRM (*Multiple Reaction Monitoring*) (çoklu reaksiyon tarama) olarak belirlenmiştir. Belirlenen optimum çalışma koşulları ve cihaz parametreleri Tablo 3.2.'de verilmiştir.

Tablo 3.2. LC-MS/MS Çalışma Koşulları ve Cihaz Parametreleri.

Çalışma Koşulu	Açıklama																		
Kolon	İnertSustain C18 3 µm (150 x 2.1 mm)																		
Mobil faz	Mobil Faz A: %0,01 Formik asit + 10 mM Amonyum asetat Mobil Faz B: Asetonitril																		
Elüsyon profili	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Zaman (dk)</th> <th>Oran (%)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>00.00 dk</td> <td>Başlama</td> </tr> <tr> <td>00.50 dk</td> <td>Mobil Faz B % 10</td> </tr> <tr> <td>05.00 dk</td> <td>Mobil Faz B % 22</td> </tr> <tr> <td>36.00 dk</td> <td>Mobil Faz B % 60</td> </tr> <tr> <td>46.00 dk</td> <td>Mobil Faz B % 98</td> </tr> <tr> <td>50.00 dk</td> <td>Mobil Faz B % 98</td> </tr> <tr> <td>50.01 dk</td> <td>Mobil Faz B % 10</td> </tr> <tr> <td>60.00 dk</td> <td>Bitiş</td> </tr> </tbody> </table>	Zaman (dk)	Oran (%)	00.00 dk	Başlama	00.50 dk	Mobil Faz B % 10	05.00 dk	Mobil Faz B % 22	36.00 dk	Mobil Faz B % 60	46.00 dk	Mobil Faz B % 98	50.00 dk	Mobil Faz B % 98	50.01 dk	Mobil Faz B % 10	60.00 dk	Bitiş
Zaman (dk)	Oran (%)																		
00.00 dk	Başlama																		
00.50 dk	Mobil Faz B % 10																		
05.00 dk	Mobil Faz B % 22																		
36.00 dk	Mobil Faz B % 60																		
46.00 dk	Mobil Faz B % 98																		
50.00 dk	Mobil Faz B % 98																		
50.01 dk	Mobil Faz B % 10																		
60.00 dk	Bitiş																		
Akış hızı	0,2 mL/dk																		
Kolon fırını sıcaklığı	40 °C																		
Tarama tipi	MRM																		
Analiz süresi	60 dk																		
İyonizasyon	Elektrosprey İyonizasyon (ESI), Negatif İyonizasyon																		

LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan toplam altmış sekiz safra asit standartlarının alıkonma süreleri (RT) ve MRM geçişleri Tablo 3.3.'de yer almaktadır.

Tablo 3.3. LC-MS/MS yöntemi ile incelenen safra asit standartlarının MRM geçişleri ve alıkonma süreleri (RT)

Safra Asitleri	RT (min)	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)
GCA	24.88	464.10	74.00
TCA	25.97	514.00	124.00
CA	25.59	407.00	343.40
GCA-3S	0.001	271.90	96.80
TCA-3S	20.367	296.70	96.90
CA-3S	21.10	487.10	96.90
GCDCA	28.87	448.30	74.00
TCDCA	29.30	498.00	124.10
CDCA	32.79	391.10	373.20
GCDCA-3S	22.90	263.80	96.90
TCDCA-3S	23.26	288.50	96.90
CDCA-3S	25.47	471.10	96.80
GUDCA	29.15	448.30	73.80
TUDCA	29.44	498.30	123.90
UDCA	26.52	391.10	373.50
GUDCA-3S	18.84	263.60	96.90
TUDCA-3S	23.33	288.50	96.90
UDCA-3S	21.24	471.10	97.00
GDCA	28.20	448.30	74.00
TDCA	29.52	498.00	124.10
DCA	32.74	391.10	345.40
GDCA-3S	22.90	263.60	97.00
TDCA-3S	23.84	288.50	97.00
DCA-3S	26.35	471.10	96.80

Tablo 3.3. (Devam) LC-MS/MS yöntemi ile incelenen safra asit standartlarının MRM geçişleri ve alıkonma süreleri (RT)

Safra Asitleri	RT (min)	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)
GLCA	35.32	432.10	73.90
TLCA	37.11	482.10	124.00
LCA	43.55	375.10	375.40
GLCA-3S	25.65	255.60	97.00
TLCA-3S	27.46	280.50	96.90
LCA-3S	31.31	455.10	96.90
GHCA	23.85	464.30	74.00
THCA	29.38	498.70	124.00
HCA	25.07	407.20	389.10
GCA-1 β -ol	16.35	480.20	74.00
TCA-1 β -ol	17.03	530.10	124.00
CA-1 β -ol	16.45	423.10	263.30
GCA-6 α -ol	18.90	480.20	74.00
CA-6 α -ol	19.27	423.10	313.30
CDCA-1 β -ol	20.07	407.20	389.30
G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	20.00	462.10	74.00
T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	20.80	512.10	124.00
Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	20.72	405.20	289.30
T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S	19.35	295.70	96.90
Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S	19.71	485.10	97.00
G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	23.72	446.20	74.00
T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	24.92	496.10	124.00
Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	26.07	389.10	357.30
G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	21.37	262.60	97.00
T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	0.001	287.50	97.00
Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	24.09	469.10	96.90
G- Δ^5 -3 β -OH	30.14	430.40	74.00
T- Δ^5 -3 β -OH	31.44	480.10	124.00

Tablo 3.3. (Devam) LC-MS/MS yöntemi ile incelenen safra asit standartlarının MRM geçişleri ve alıkonma süreleri (RT)

Safra Asitleri	RT (min)	Ana İyon (m/z)	Yavru İyon (m/z)
Δ^5 -3 β -OH	38.41	373.20	355.20
G- Δ^5 -3 β -OH-3S	23.47	254.90	96.90
T- Δ^5 -3 β -OH-3S	24.52	279.50	96.90
Δ^5 -3 β -OH-3S	28.75	453.10	96.90
Δ^5 -3 β ,12 α -(OH) ₂	25.98	389.10	287.30
GCA- Δ 4-3-one	20.58	460.10	74.00
TCA- Δ 4-3-one	21.45	510.10	124.00
CA- Δ 4-3-one	21.31	403.10	123.10
GCDCA- Δ 4-3-one	25.03	444.10	74.00
TCDCA- Δ 4-3-one	26.23	494.10	124.00
CDCA- Δ 4-3-one	27.60	387.10	369.30
CA- Δ 4,6-3-one	26.35	385.10	341.30
CDCA- Δ 4,6-3-one	37.16	369.10	325.30
nor-CA	21.60	393.20	329.30
C27-DHCA	44.05	433.20	415.40
C27-THCA	34.92	449.20	431.30

3.5.2. GC-MS Yöntemi

3.5.2.1. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

Stok Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Gaz kromatografisi kütle spektrometrisinde tayini yapılan kolesterol standardının ana stok standart çözeltisi 1163,69 $\mu\text{mol/L}$ olacak şekilde metanol içerisinde hazırlandı. 7-dehidrokolesterol ve kolestanol (5α -kolestan- 3β -ol veya dihidrokolesterol) standartlarının ana stok standart çözeltileri sırasıyla, 624 $\mu\text{mol/L}$ ve 643,2 $\mu\text{mol/L}$ olacak şekilde heptan içerisinde hazırlandı. Ana stok standart çözeltilerinden kolesterol metanol ile seyreltilerek, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol ise heptan ile seyreltilerek çalışma standartları hazırlandı. Hazırlanan çalışma standartları standart doğru için kullanıldı.

Kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol çalışma standartları her çalışma öncesinde taze olarak hazırlandı. Ana stok standart çözeltiler $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'de 6 ay süreyle muhafaza edildi.

Standart Doğru için Standart Çözeltilerin Hazırlanması:

Ana stok standart çözeltileri kullanılarak hazırlanan çalışma standartlarından yararlanılarak standart doğru oluşturulmuştur. Kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol için farklı konsantrasyonlarda 6 farklı seride standart çözeltiler taze olarak hazırlanmıştır.

Kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol'e ait standartlar ve derişimleri Tablo 3.4.'de gösterilmektedir.

Tablo 3.4. GC-MS Standart Doğru İçin Standart Çözeltiler ve Derişimleri.

	Kolesterol	7-Dehidrokolesterol	Kolestanol
Kalibratör 1	0,9 µg/mL	0,3 µg/mL	0,3 µg/mL
Kalibratör 2	1,8 µg/mL	0,6 µg/mL	0,6 µg/mL
Kalibratör 3	2,7 µg/mL	1,2 µg/mL	1,2 µg/mL
Kalibratör 4	4,5 µg/mL	2,4 µg/mL	2,4 µg/mL
Kalibratör 5	7,2 µg/mL	4,8 µg/mL	4,8 µg/mL
Kalibratör 6	10,8 µg/mL	9,6 µg/mL	9,6 µg/mL

İnternal Standart (IS) Çözeltilerinin Hazırlanması:

İnternal standart olarak koprostanol (5 β -cholestan-3 β -ol) kullanılmıştır. İnternal standardın ana stok çözeltisi 0,5 mg/mL olacak şekilde metanol içerisinde hazırlanmıştır. Bu ana stok internal standart çözeltisi metanol ile seyreltilerek çalışmada kullanılan derişik internal standart çözeltisi elde edilmiştir.

Hazırlanan internal standardın ana stok çözeltisi -80 °C’de saklanmıştır ve çalışmada kullanılan derişik internal standart çözeltileri taze olarak hazırlanmıştır.

3.5.2.2. Örneklerin Hazırlanması

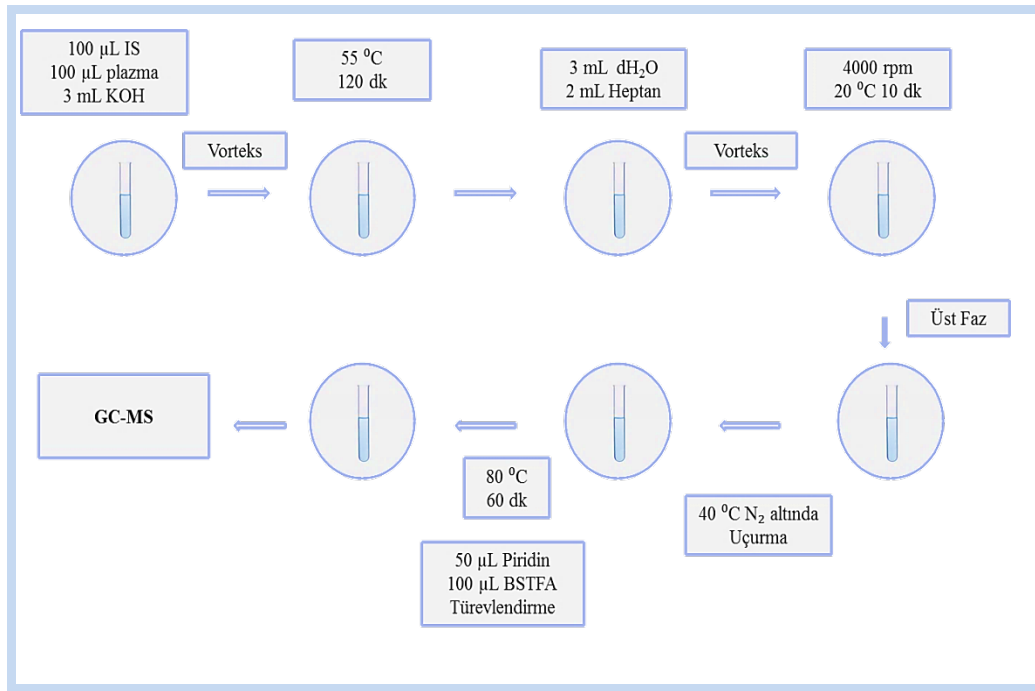
Çalışma ve kontrol gruplarından toplanan kan örneklerinin plazmaları ayrılmış ve çalışmaya kadar -80 °C’de saklanmıştır. Çalışma öncesinde plazma örnekleri oda ısısında bekletilmiş ve çözünmeleri sağlanmıştır.

Gaz kromatografisi kütle spektrometrisinde kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol analizi için ilk olarak 35 mL’lik cam vial içerisine 100 µL internal standart ve 100 µL çözülmüş plazma örneği eklenmiştir. Üzerine 3 mL KOH çözeltisi eklenerek vialerin kapağı kapatılmış ve hızlıca vortekslenmiştir. 55 °C’de 120 dk

bekletildikten sonra soğuk su altında reaksiyon durdurulmuş ve üzerlerine 3 mL ultra saf su ve 2 mL heptan eklenmiş ve viallerin kapağı kapatılarak hızlıca vortekslenmiştir. Daha sonra 4000 rpm'de 20 °C'de 10 dk santrifugasyon işleminin ardından organik faz (üst faz) alınarak 2 mL'lik cam viallere aktarılmıştır. 40 °C'de N₂ altında uçurma işleminin ardından türevlendirme basamağına geçilmiştir.

Türevlendirme için 50 µL piridin ve 100 µL Bis-trimetilsililtrifluorasetamid (BSTFA) (+ 10 % trimetilklorosilan) kullanılmıştır. Türevlendirme reaktifleri eklendikten sonra 80 °C'de 1 saat bekletilmiş ve daha sonra GC-MS viallerine alınarak analize hazır hale getirilmiştir.

GC-MS yöntemi ile analiz edilecek plazma örneklerinin hazırlanmasında uygulanan iş akışı Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. Plazma Örneklerinin Hazırlanması.

3.5.2.3. GC-MS Çalışma Koşulları

Çalışma ve kontrol gruplarından alınan plazma örneklerinde kantitatif olarak GC-MS yöntemi ile kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol (5 α -cholestan-3 β -ol veya dihidrokolesterol) derişimlerini belirlemek için Shimadzu marka GC-MS

Shimadzu QP2010 model Gaz Kromatografisi-Kütle Spektrometrisi kullanılmıştır. Kromatografik ayırım için Rtx-1701 (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 mm) GC-MS kolonu kullanılmıştır. Belirlenen optimum çalışma koşulları ve cihaz parametreleri Tablo 3.5’de verilmiştir.

Tablo 3.5 GC/MS Çalışma Koşulları ve Cihaz Parametreleri

Çalışma Koşulları		Açıklama		
GC Koşulları				
Enjeksiyon Miktarı	1 µL			
Kolon Sıcaklığı	90 °C			
Enjeksiyon Sıcaklığı	300 °C			
		Hız	Son Sıcaklık	Tutuş zamanı
		--	90.00	3.00
Kolon Programı		25.00	260.00	28.00
		1.00	275.00	13.00
Toplam Program Zamanı	65.80 dk			
Kolon	Rtx-1701 (30 m, 0,25 mm ID, 0,25 mm) Bellefonte, PA, USA			
Gaz Basıncı	199,8 kPa			
Toplam Akış	83,6 mL/dk			
Kolon Akışı	1,56 mL/dk			
Doğrusal Hız	32,7 cm/sn			
Arındırma Akışı	4,0 mL/dk			
MS Koşulları				
İyon kaynağı Sıcaklığı	200 °C			
Arayüz Sıcaklığı	230 °C			
Tarama Modu	Tarama			
İyonizasyon Modu	EI			

GC-MS yöntemi ile analizi yapılan kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol'e ait standartların kütle spektrumunda seçilen iyon değerleri, referans iyon değerleri ve kromatografik ayırmada bulunan alıkonma süreleri (RT) Tablo 3.6.'da yer almaktadır.

Tablo 3.6. GC-MS yöntemi ile incelenen kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol standartlarının kütle spektrumunda seçilen iyon değerleri, referans iyon değerleri ve alıkonma süreleri (RT)

	RT (min)	Seçilen İyon (m/z)	Referans İyon (m/z)
Kolesterol	29.90	458.00	386.00
Kolestanol	30.35	445.00	306.00
7-Dehidrokolesterol	32.50	343.00	351.00

3.6. Etik Kurul İzni

Hacettepe Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Etik Kurul'undan GO 18/255 kayıt numaralı ve "Kolestaz hastalarında safra asitlerinin LC-MS/MS ile araştırılması ve olası biyobelirteçlerin belirlenmesi" başlıklı proje için etik kurul izni 27/03/2018 tarihli etik kurul kararıyla alınmıştır ve bu tez kapsamında kullanılması uygun bulunmuştur (Ek.1).

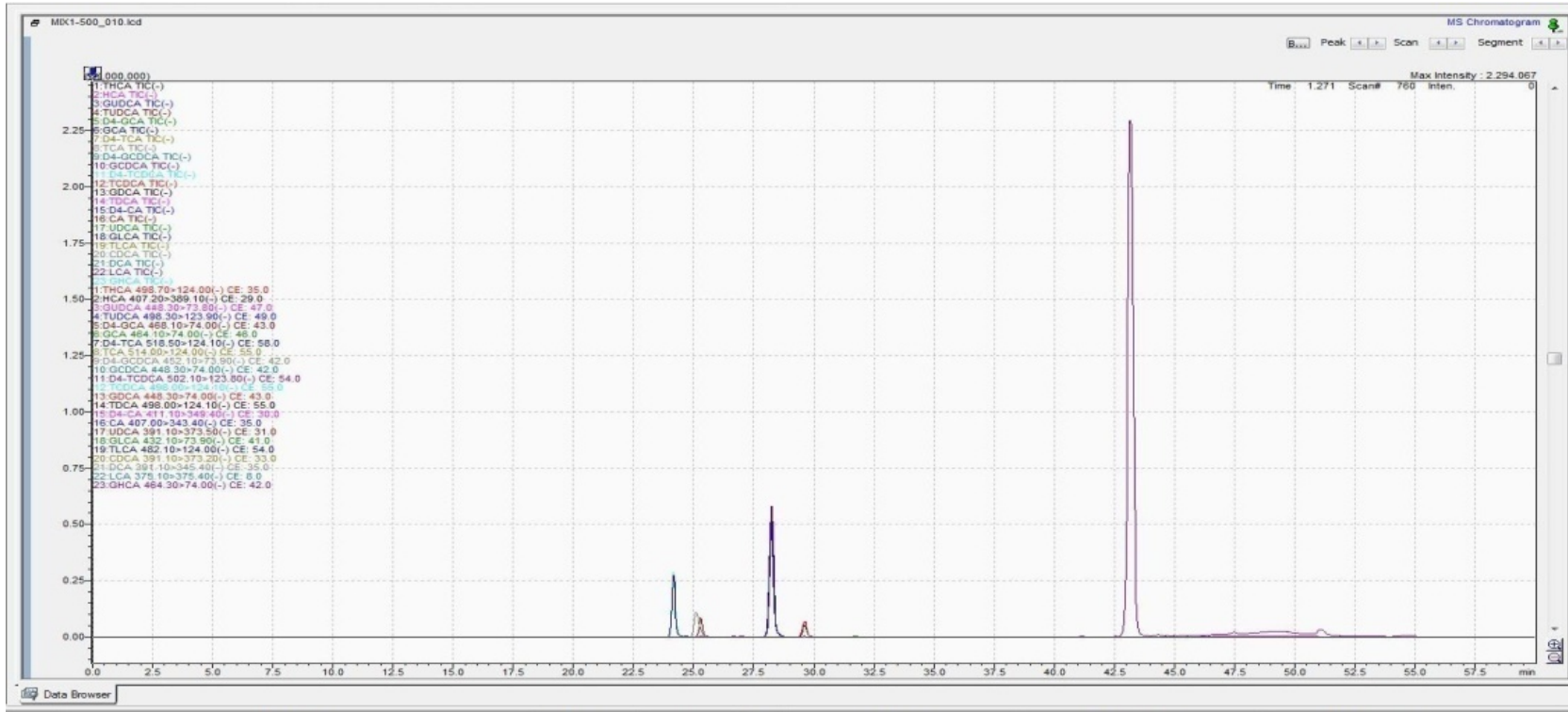
3.7. İstatistiksel Yöntemler

İstatistiksel analizler Windows IBM Sürüm 22.0 kullanılarak gerçekleştirildi. Parametrik dağılım gösteren veriler \pm standart sapma, parametrik dağılıma uymayan kategorik değişkenler ise medyan (minimum-maksimum) olarak ifade edildi. Değişkenlerin normal dağılıma uygunluğu görsel (histogram ve olasılık grafikleri) ve analitik yöntemlerle (Kolmogorov-Smirnov/Shapiro-Wilk testleri) değerlendirildi. Gruplar arasında varyansların homojenliği Levene testi ile test edildi. Normal dağılım gösterdiği belirlenen parametreler Bağımsız Gruplar T Testi ile Normal dağılım göstermeyen parametreler ise Mann-Whitney U Testi ile değerlendirildi. P değerinin 0.05'in altında olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildi.

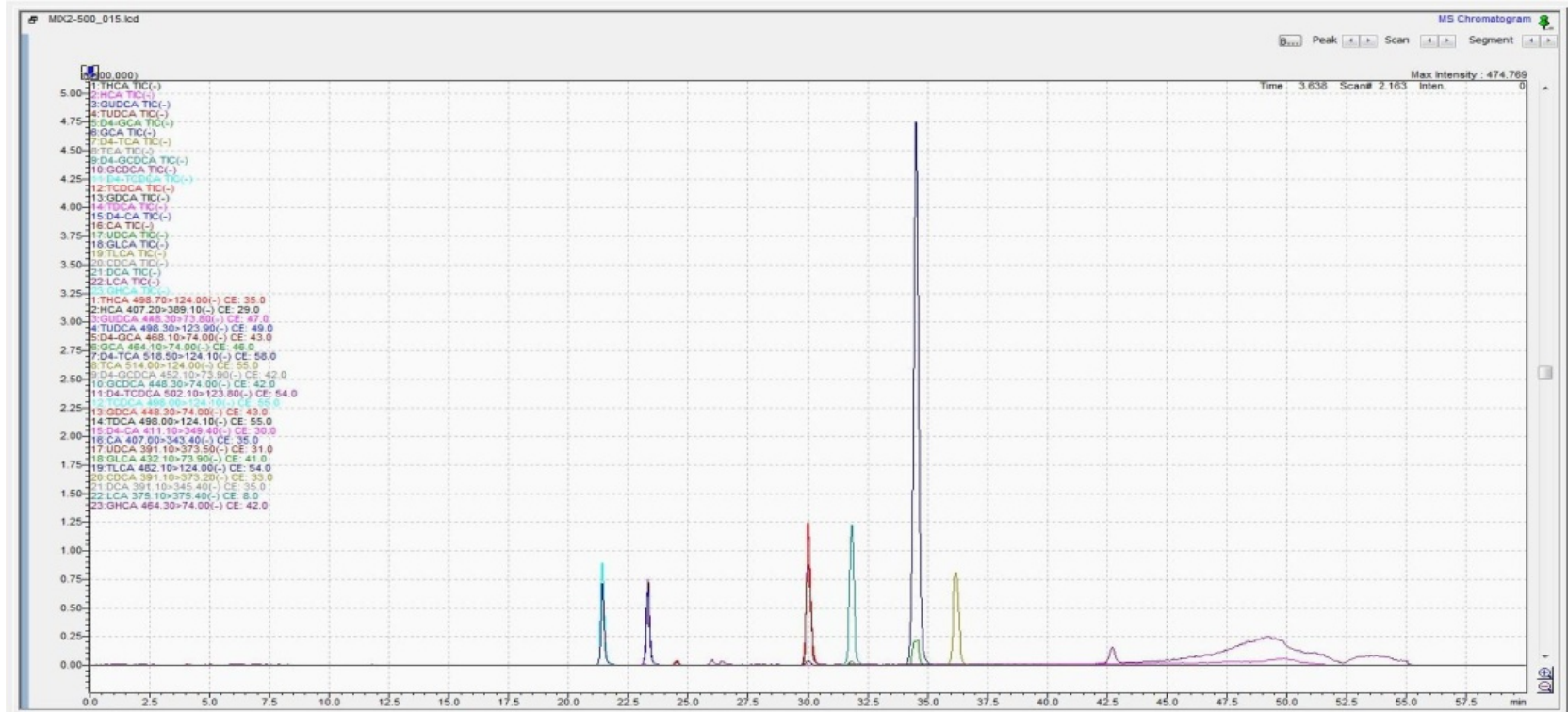
4. BULGULAR

4.1. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Kromatogramları

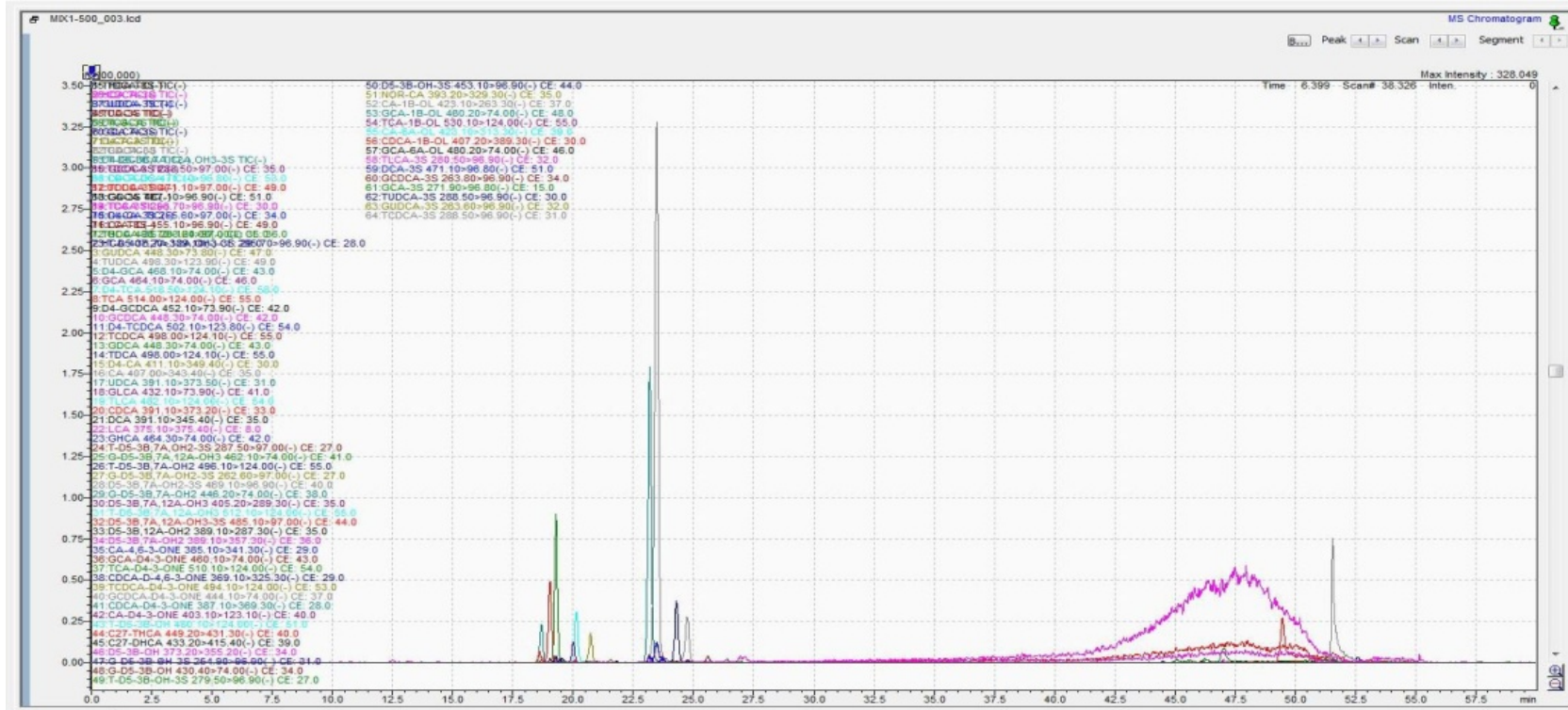
Safra asitleri standartlarına ait standart doğrularının hazırlanmasında safra asit standartlarının ait oldukları gruplar ve moleküler iyonlarının m/z değerleri ve alıkonma süreleri dikkate alınarak gruplandırılmış ve yedi farklı karışım hazırlanmıştır. Moleküler iyonlarının m/z değeri yakın olan safra asit standartlarının farklı karışımlarda yer almasına dikkat edilmiştir. Buna göre bu karışımlarda yer alan safra asit standartları ve bu standartların kromatogram görüntüleri Şekil 4.1., Şekil 4.2., Şekil 4.3., Şekil 4.4., Şekil 4.5., Şekil 4.6. ve Şekil 4.7.'de yer almaktadır.



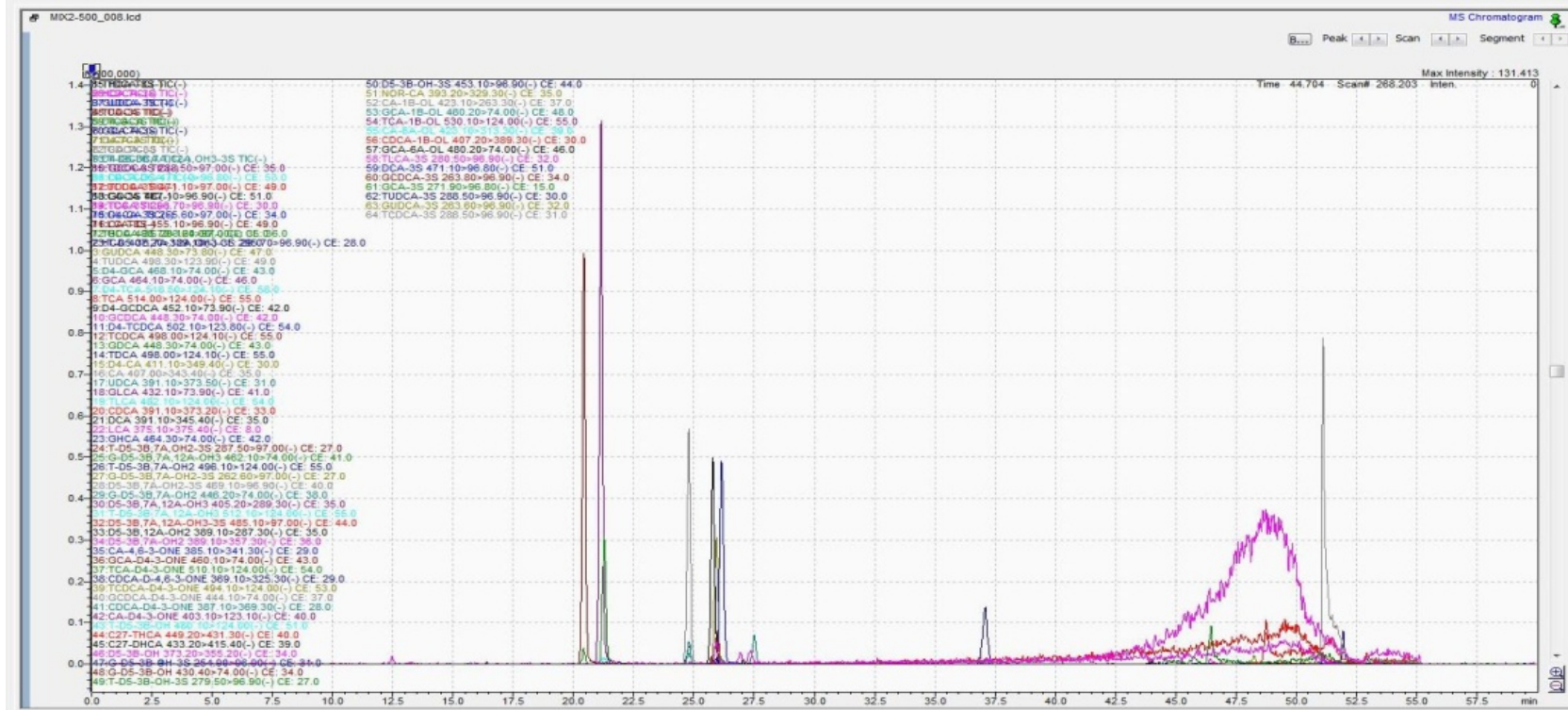
Şekil 4.1. Klasik safra asitleri grubunda yer alan **1) CA** (m/z 407.00, RT: 25.59), **2) GCA** (m/z 464.10, RT: 24.88), **3) TCA** (m/z 514.00, RT: 25.97), **4) CDCA** (m/z 391.10, RT: 32.79), **5) GCDCA** (m/z 448.30, RT: 28.87), **6) TCDCA** (m/z 498.00, RT: 29.30), **7) UDCA** (m/z 391.10, RT: 26.52) ve **8) LCA** (m/z 375.10, RT: 43.55) standartlarına ait kromatogramlar



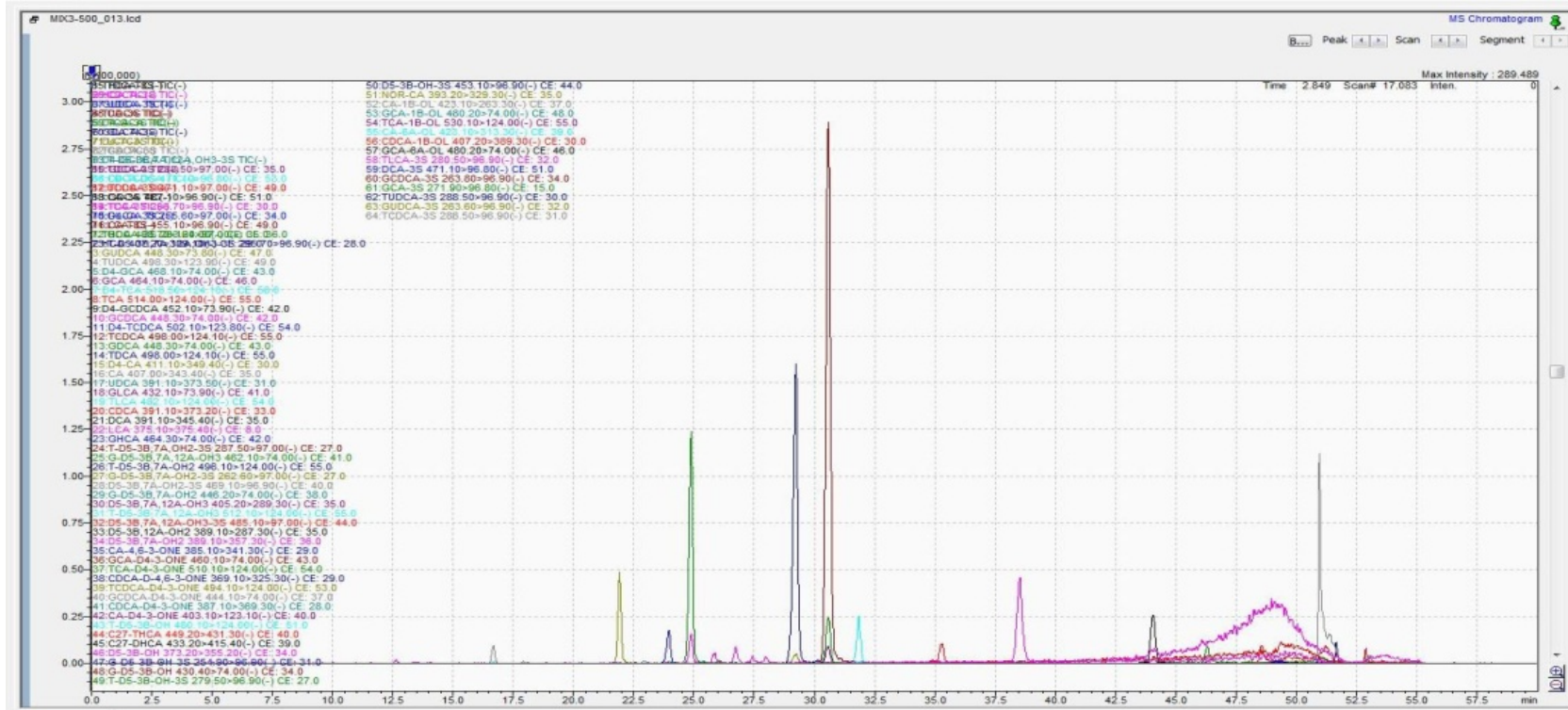
Şekil 4.2. Klasik safra asitleri grubunda yer alan **1)** GUDCA (m/z 448.30, RT: 29.15), **2)** TUDCA (m/z 498.30, RT: 29.44), **3)** TLCA (m/z 482.10, RT: 37.11), **4)** DCA (m/z 391.10, RT: 32.74), **5)** GHCA (464.30, RT: 23.85), **6)** HCA (m/z 407.20, RT: 25.07), **7)** GLCA (m/z 432.10, RT: 35.32), **8)** TDCA (m/z 498.00, RT: 29.52) standartlarına ait kromatogramlar



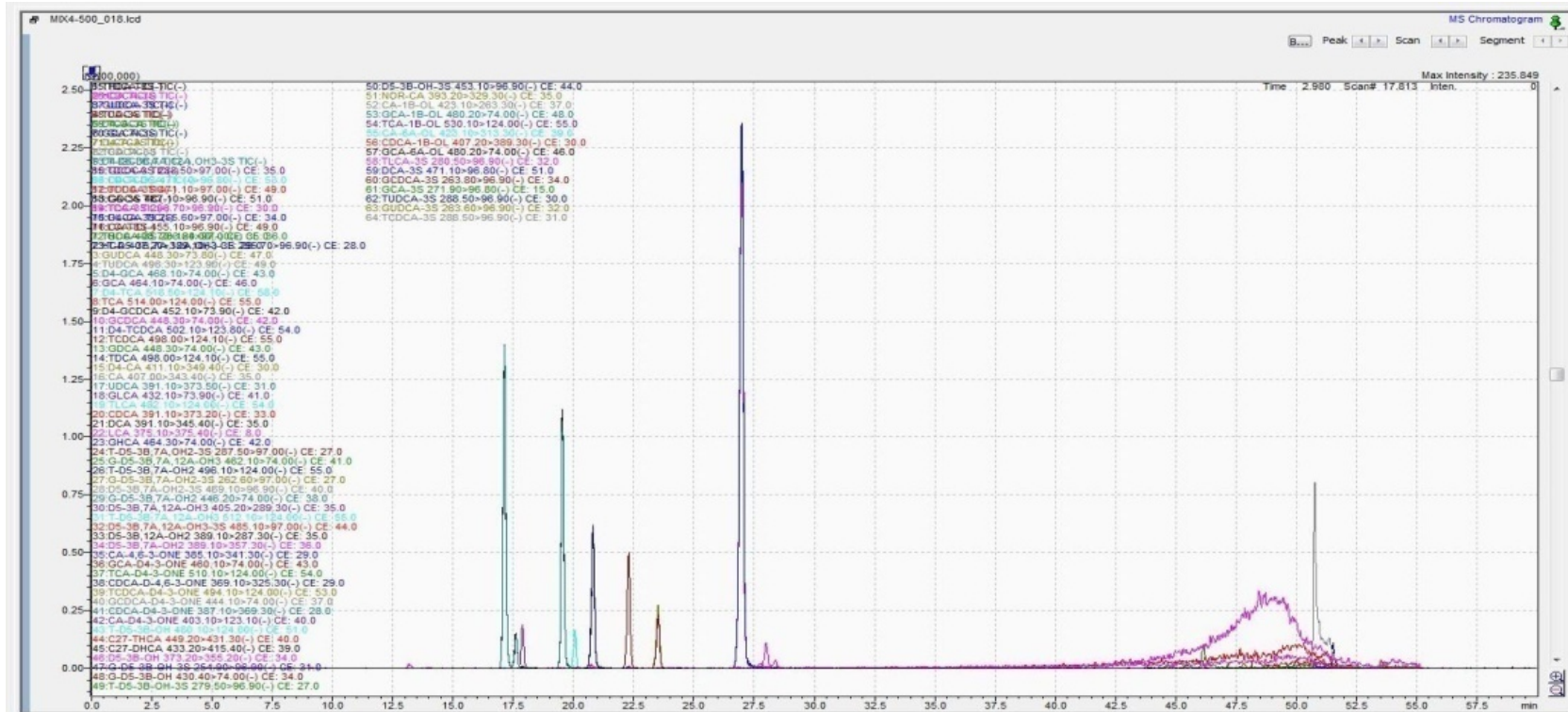
Şekil 4.3. 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan **1)** T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3-3S (m/z 295.70, RT: 19.35), **2)** G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3 (m/z 462.10, RT: 20.00), **3)** T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2 (m/z 496.10, RT: 24.92), **4)** G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2-3S (m/z 262.60, RT: 21.37), **5)** Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2-3S (m/z 469.10, RT: 24.09), **6)** G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2 (m/z 446.20, RT: 23.72), **7)** Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3 (m/z 405.20, RT: 20.72), **8)** T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3 (m/z 512.10, RT: 20.80), **9)** Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3-3S (m/z 485.10, RT: 19.71) standartlarına ait kromatogramlar



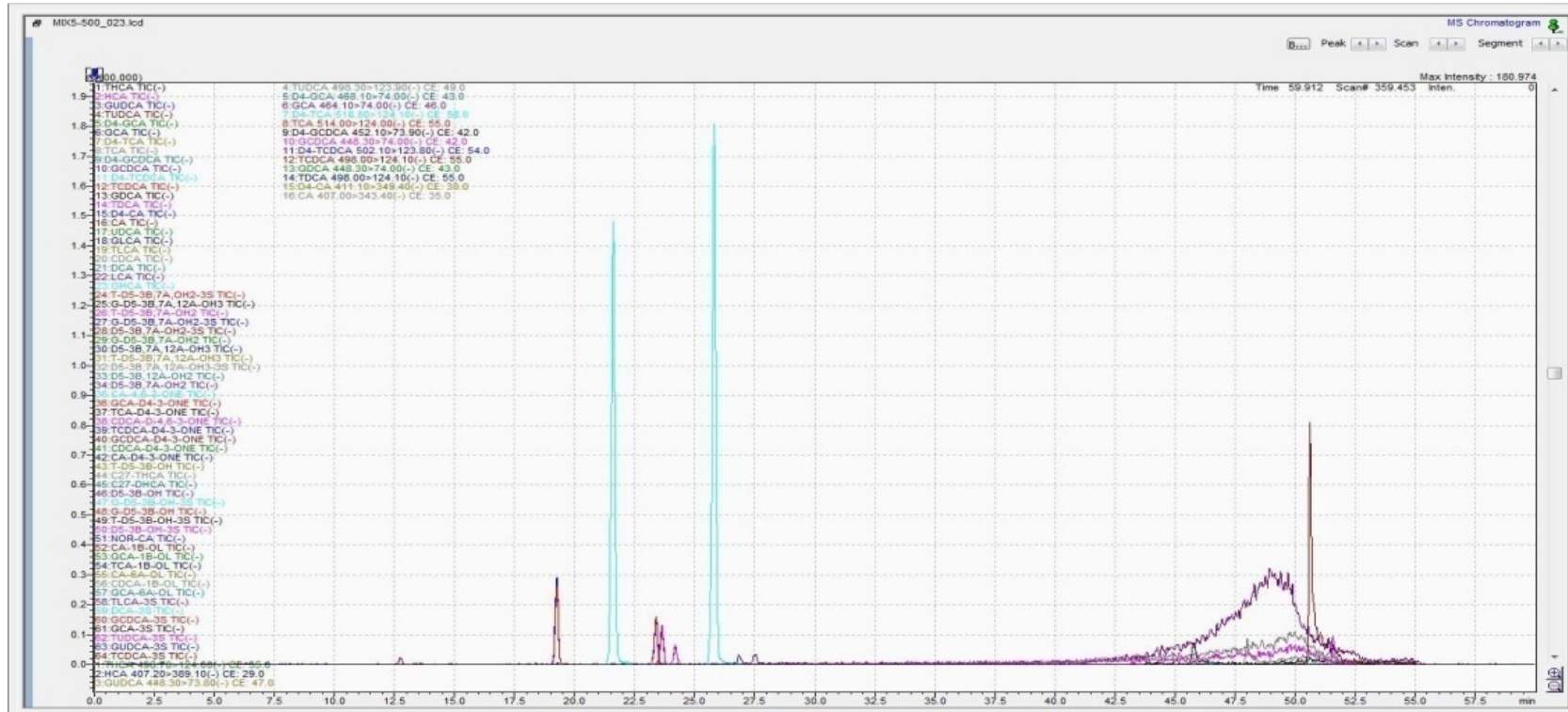
Şekil 4.4. 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri ve 3-okzo- Δ^4 -Safra Asitleri grubunda yer alan 1) Δ^5 - $3\beta,12\alpha$ -(OH) $_2$ (m/z 389.10, RT: 25.98) 2) Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH) $_2$ (m/z 389.10, RT: 26.07) 3) CA- $\Delta_4,6$ -3-one (m/z 385.10, RT: 26.35) 4) GCA- Δ_4 -3-one (m/z 460.10, RT: 20.58) 5) TCA- Δ_4 -3-one (m/z 510.10, RT: 21.45) 6) CDCA- $\Delta_4,6$ -3-one (m/z 369.10, RT: 37.16) 7) TCDCA- Δ_4 -3-one (m/z 494.10, RT: 26.23) 8) GCDCA- Δ_4 -3-one (m/z 444.10, RT: 25.03) 9) CDCA- Δ_4 -3-one (m/z 387.10, RT: 27.60) 10) CA- Δ_4 -3-one (m/z 403.10, RT: 21.31) standartlarına ait kromatogramlar



Şekil 4.5. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri, Kısa zincirli safra asitleri ve Uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan 1) T- Δ^5 -3 β -OH (m/z 480.10, RT: 31.44) 2) C27-THCA (m/z 449.20, RT: 34.92) 3) C27-DHCA (m/z 433.20, RT: 44.05) 4) Δ^5 -3 β -OH (m/z 373.20, RT: 38.41) 5) G- Δ^5 -3 β -OH-3S (m/z 254.90, RT: 23.47) 6) G- Δ^5 -3 β -OH (m/z 430.40, RT: 30.14) 7) T- Δ^5 -3 β -OH-3S (m/z 279.50, RT: 24.52) 8) Δ^5 -3 β -OH-3S (m/z 453.10, RT: 28.75) 9) nor-CA (m/z 393.20, RT: 21.60) 10) CA-1 β -ol (m/z 423.10, RT: 16.45) standartlarına ait kromatogramlar



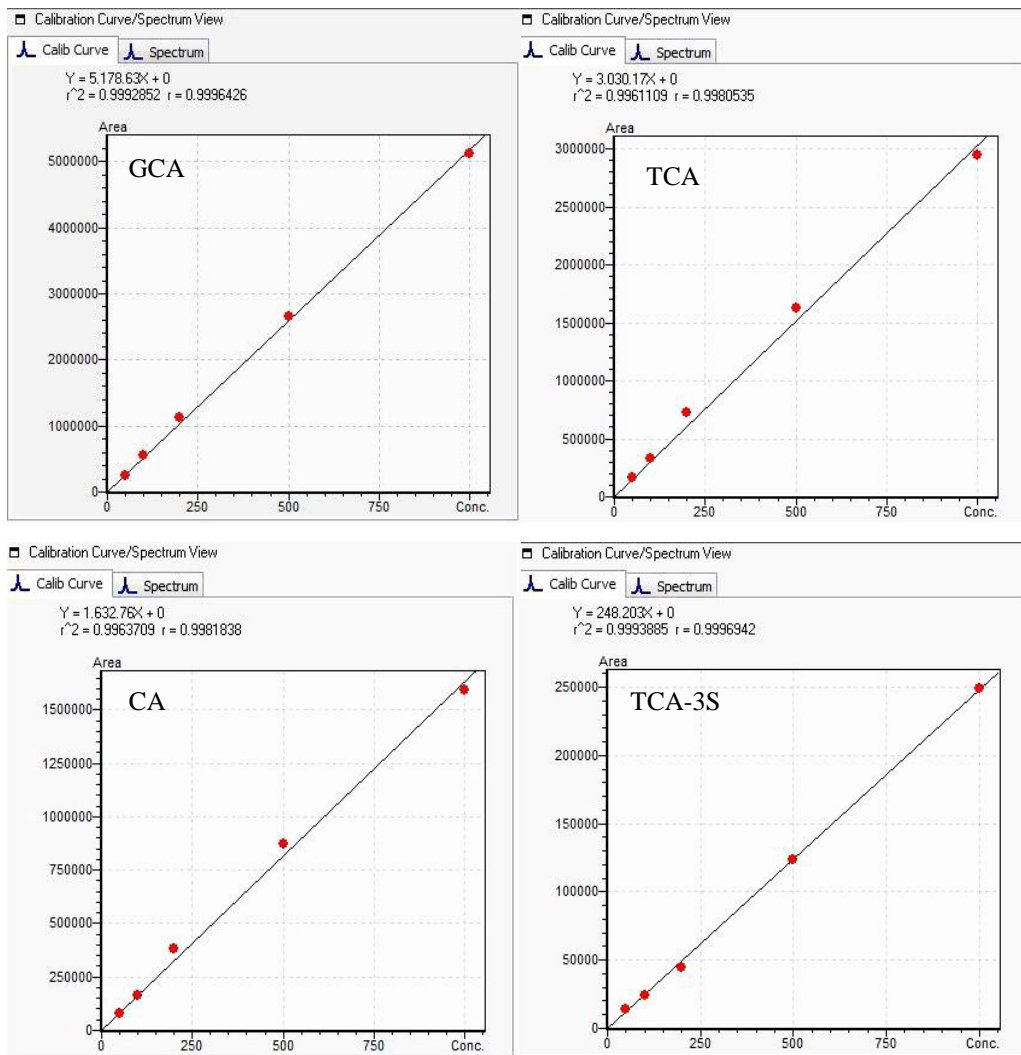
Şekil 4.6. Hidroksile safra asitleri ve Klasik safra asitleri grubunda yer alan **1)** GCA-1 β -ol (m/z 480.20, RT: 16.35) **2)** TCA-1 β -ol (m/z 530.10, RT: 17.03) **3)** CA-6 α -ol (m/z 423.10, RT: 19.27) **4)** CDCA-1 β -ol (m/z 407.20, RT: 20.07) **5)** GCA-6 α -ol (m/z 480.20, RT: 18.90) **6)** TLCA-3S (m/z 280.50, RT: 27.46) **7)** DCA-3S (m/z 471.10, RT: 26.35) **8)** GCDCA-3S (m/z 263.80, RT: 26.35) **9)** GCA-3S (m/z) **10)** TUDCA-3S (m/z 288.50, RT: 23.33) standartlarına ait kromatogramlar



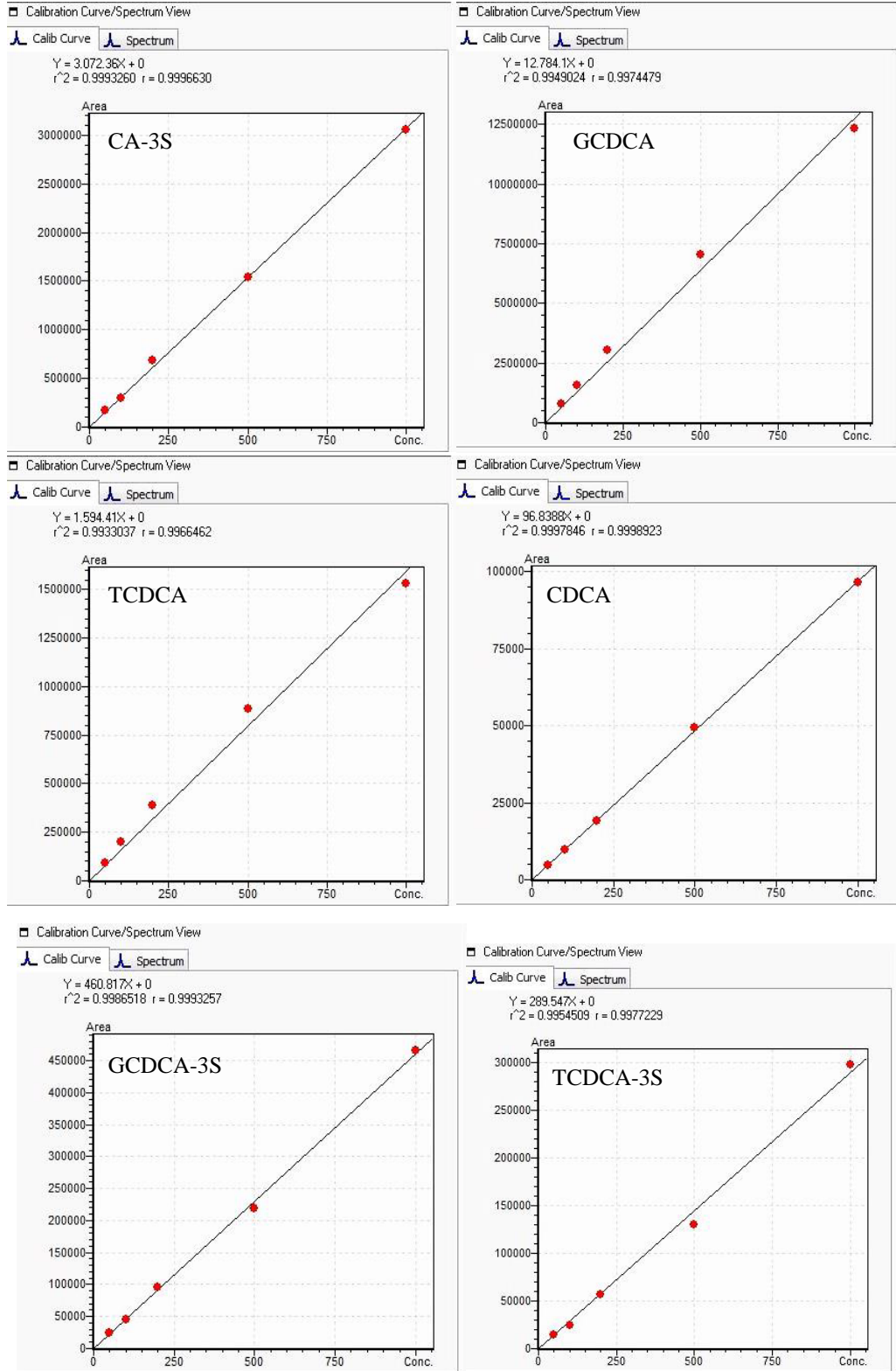
Şekil 4.7. Klasik safra asitleri grubunda yer alan **1)** GUDCA-3S (m/z 263.60, RT: 18.84) **2)** TCDCA-3S (m/z 288.50, RT: 23.26) **3)** TDCA-3S (m/z 288.50, RT: 23.84) **4)** CDCA-3S (m/z 471.10, RT: 25.47) **5)** UDCA-3S (m/z 471.10, RT: 21.24) **6)** CA-3S (m/z 487.10, RT: 21.10) **7)** TCA-3S (m/z 296.70, RT: 20.37) **8)** GLCA-3S (m/z 255.60, RT: 25.65) **9)** LCA-3S (m/z 455.10, RT: 31.31) **10)** GDCA-3S (m/z 263.60, RT: 22.90) standartlarına ait kromatogramlar

4.2. LC-MS/MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Standart Doğruları

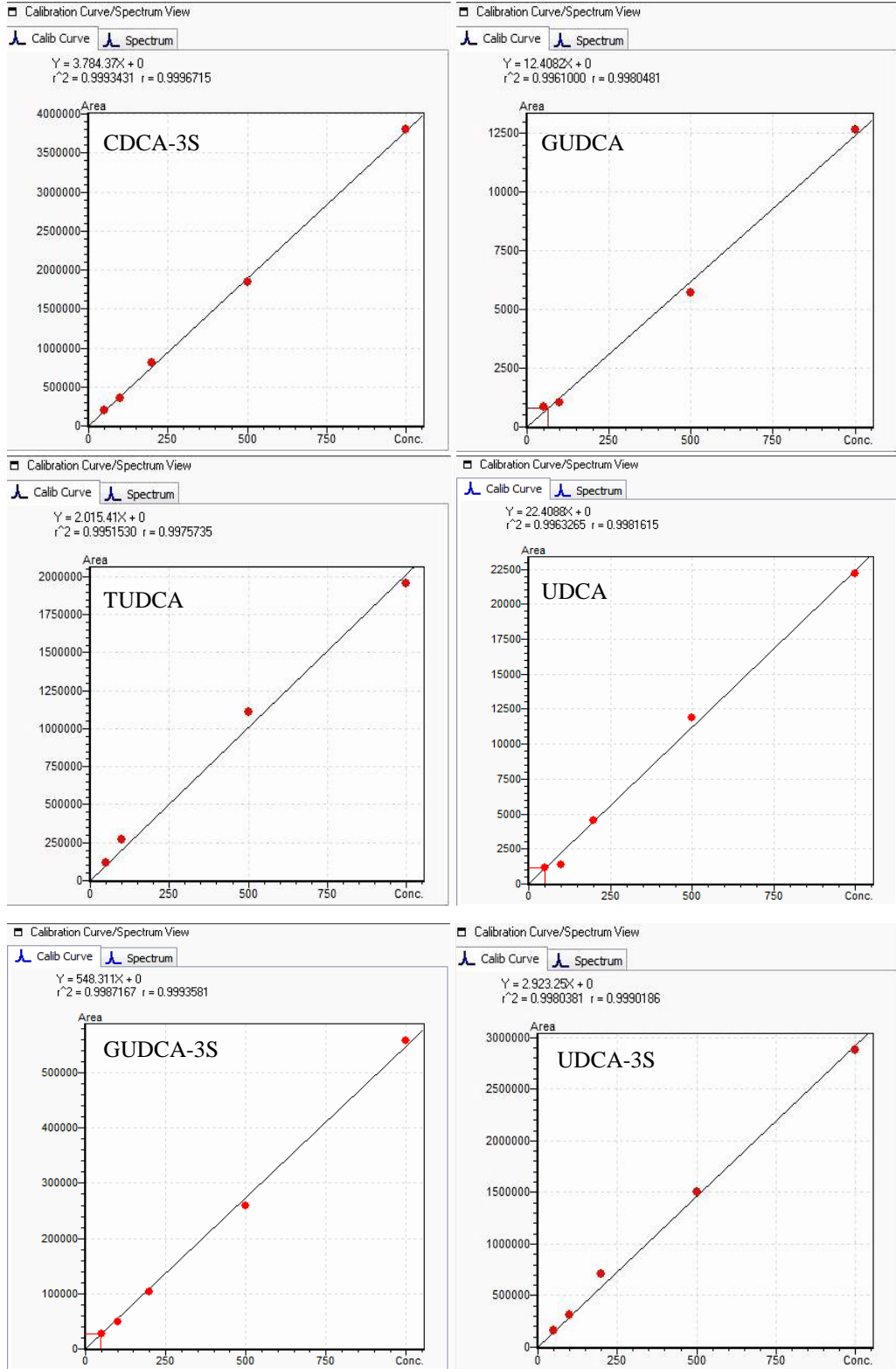
LC-MS/MS cihazı ile yapılan ölçümlerde safra asitlerinin standart doğruları 50- 1000 pmol/mL arasında değişen 5 farklı konsantrasyonda hazırlanmıştır. Standart doğrular safra asit türlerine göre gruplandırılmıştır. Bu safra asitleri gruplarına ait safra asidi türlerinin standart doğruları ve korelasyon katsayıları (r^2 değerleri) Şekil.4.8. ile Şekil.4.21. arasındaki şekillerde verilmiştir.



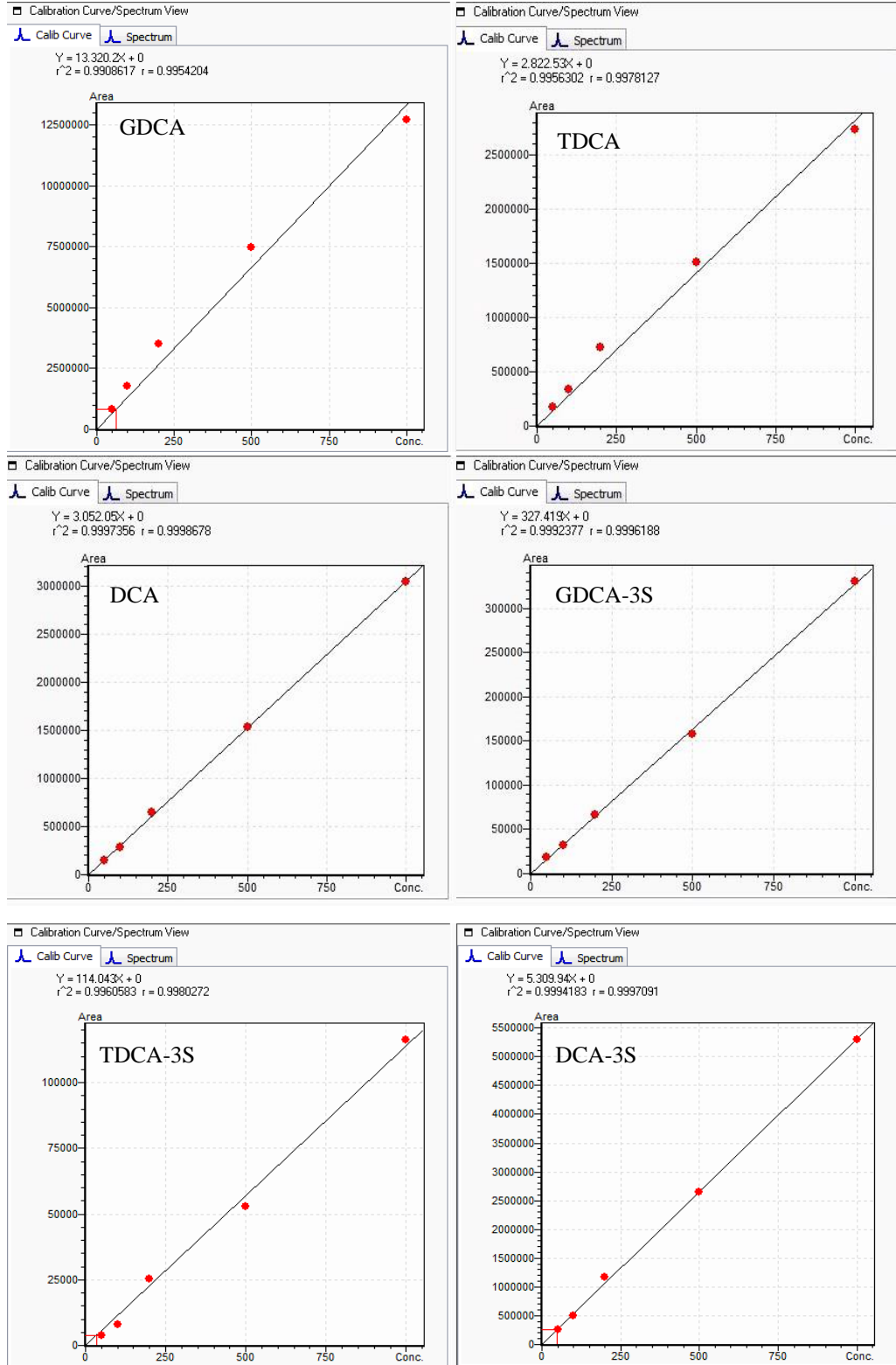
Şekil.4.8. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan GCA, TCA, CA ve TCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



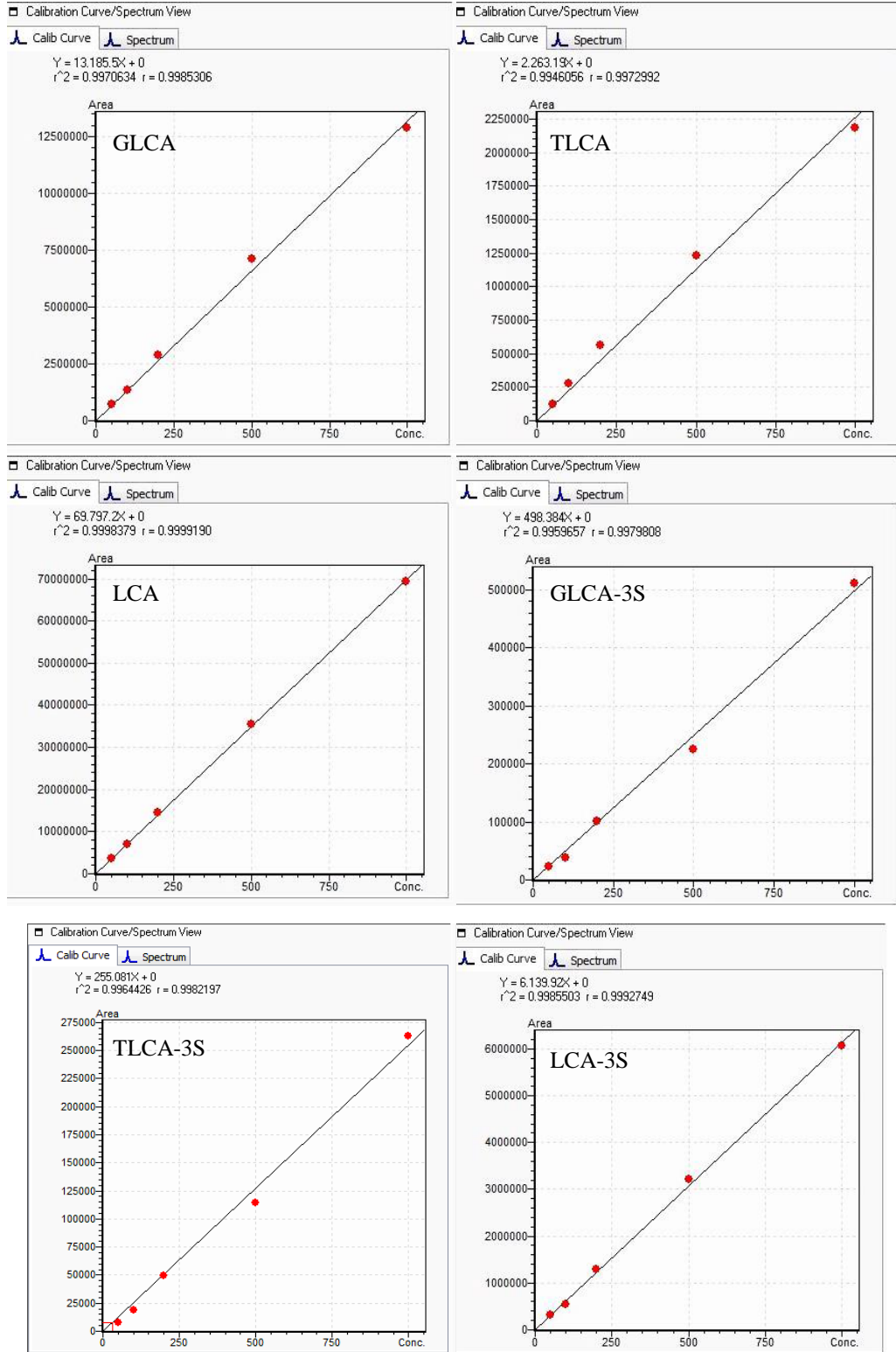
Şekil.4.9. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan CA-3S, GCDCA, TCDCA, CDCA, GCDCA-3S ve TCDCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



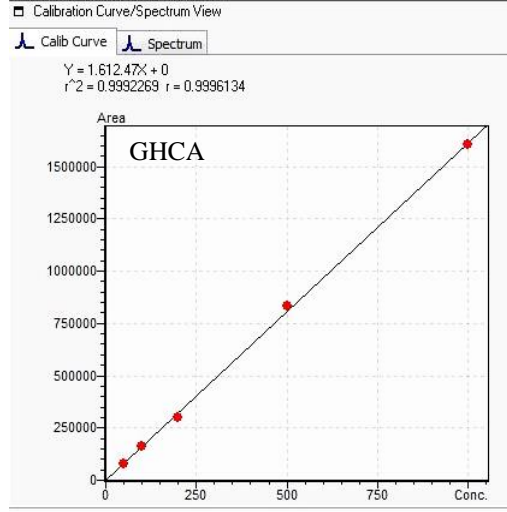
Şekil 4.10. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan CDCA-3S, GUDCA, TUDCA, UDCA, GUDCA-3S ve UDCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



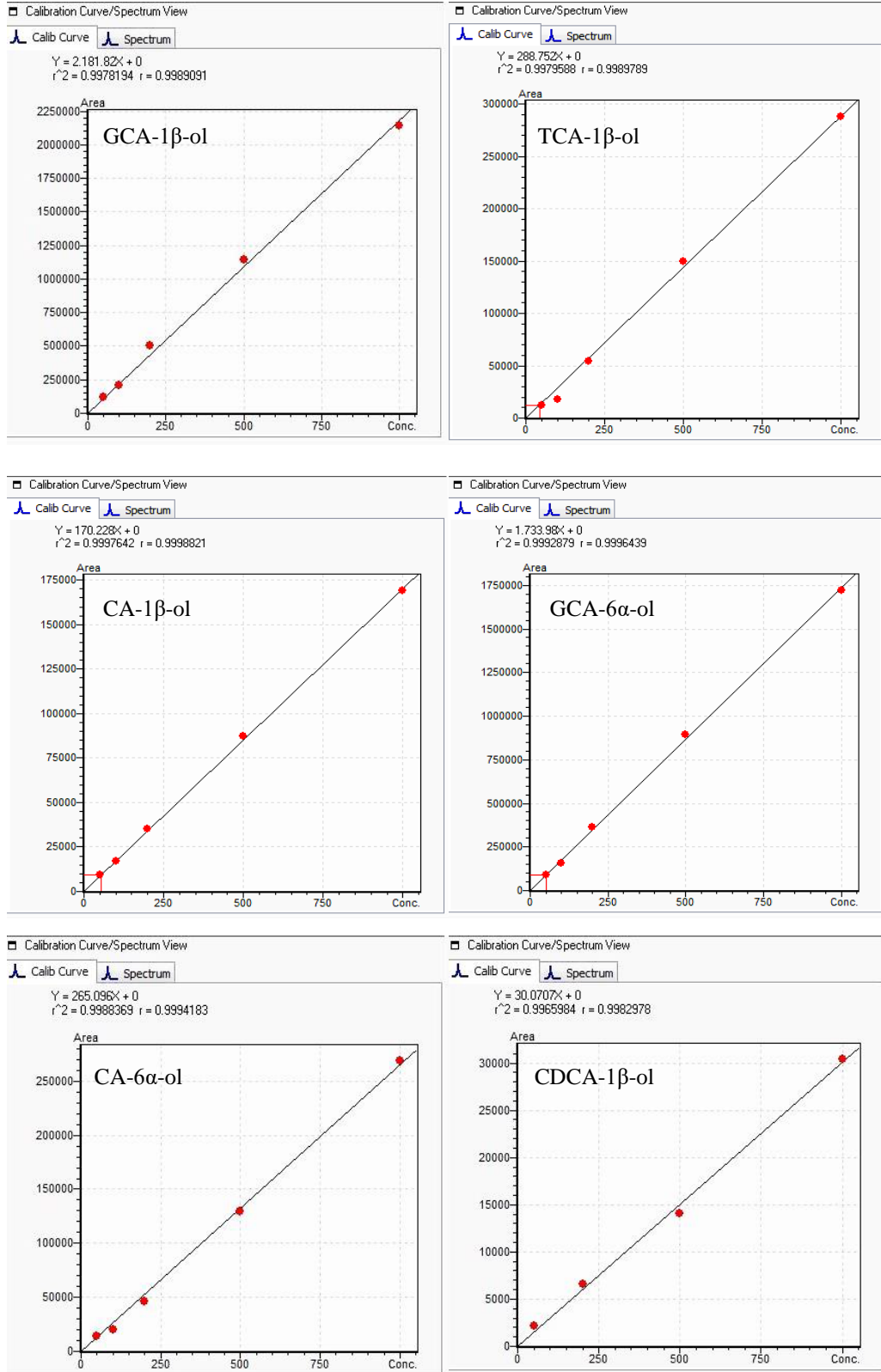
Şekil.4.11. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan GDCA, TDCA, DCA, GDCA-3S, TDCA-3S ve DCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



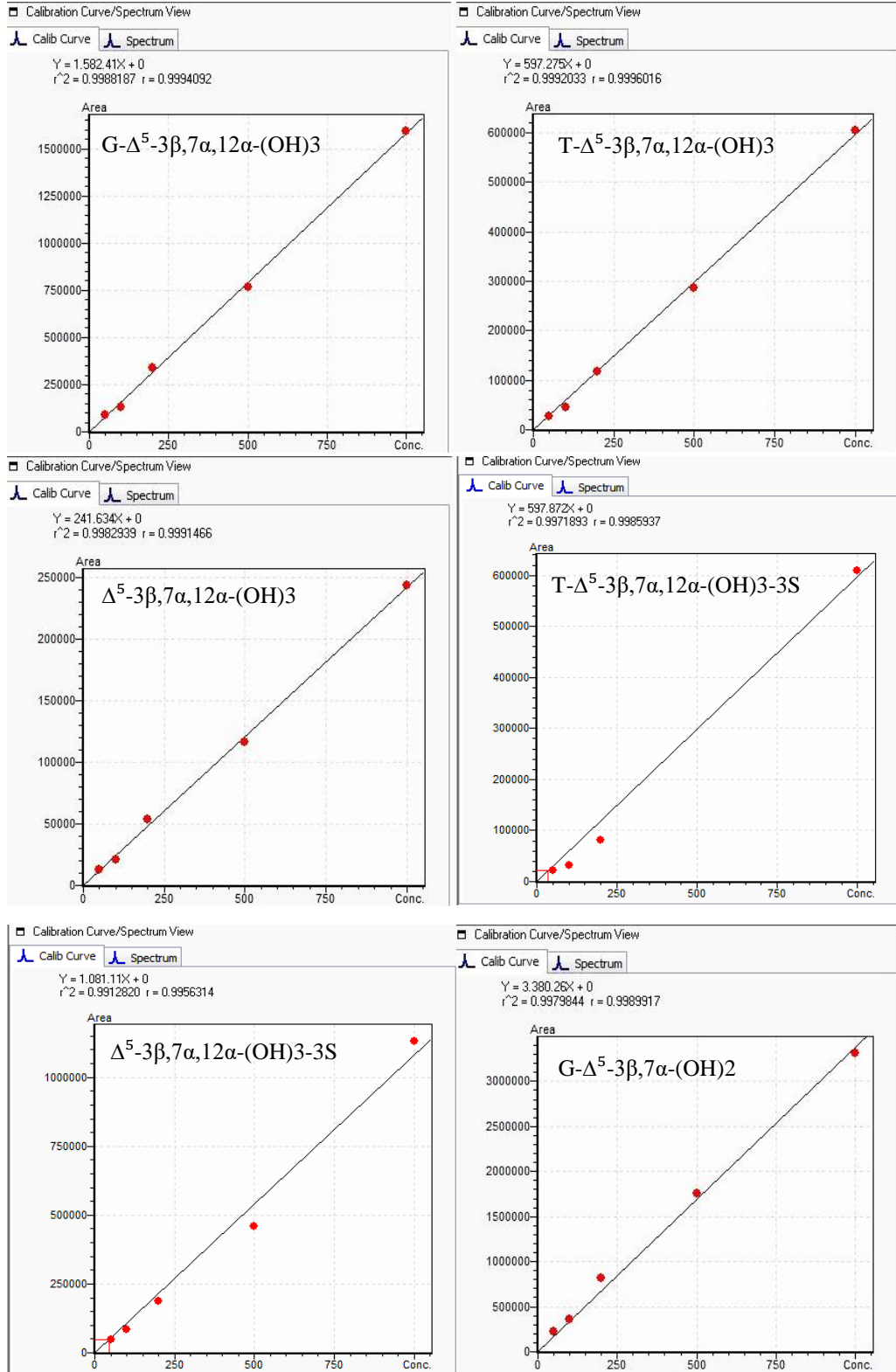
Şekil.4.12. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan GLCA, TLCA, LCA, GLCA-3S, TLCA-3S ve LCA-3S safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



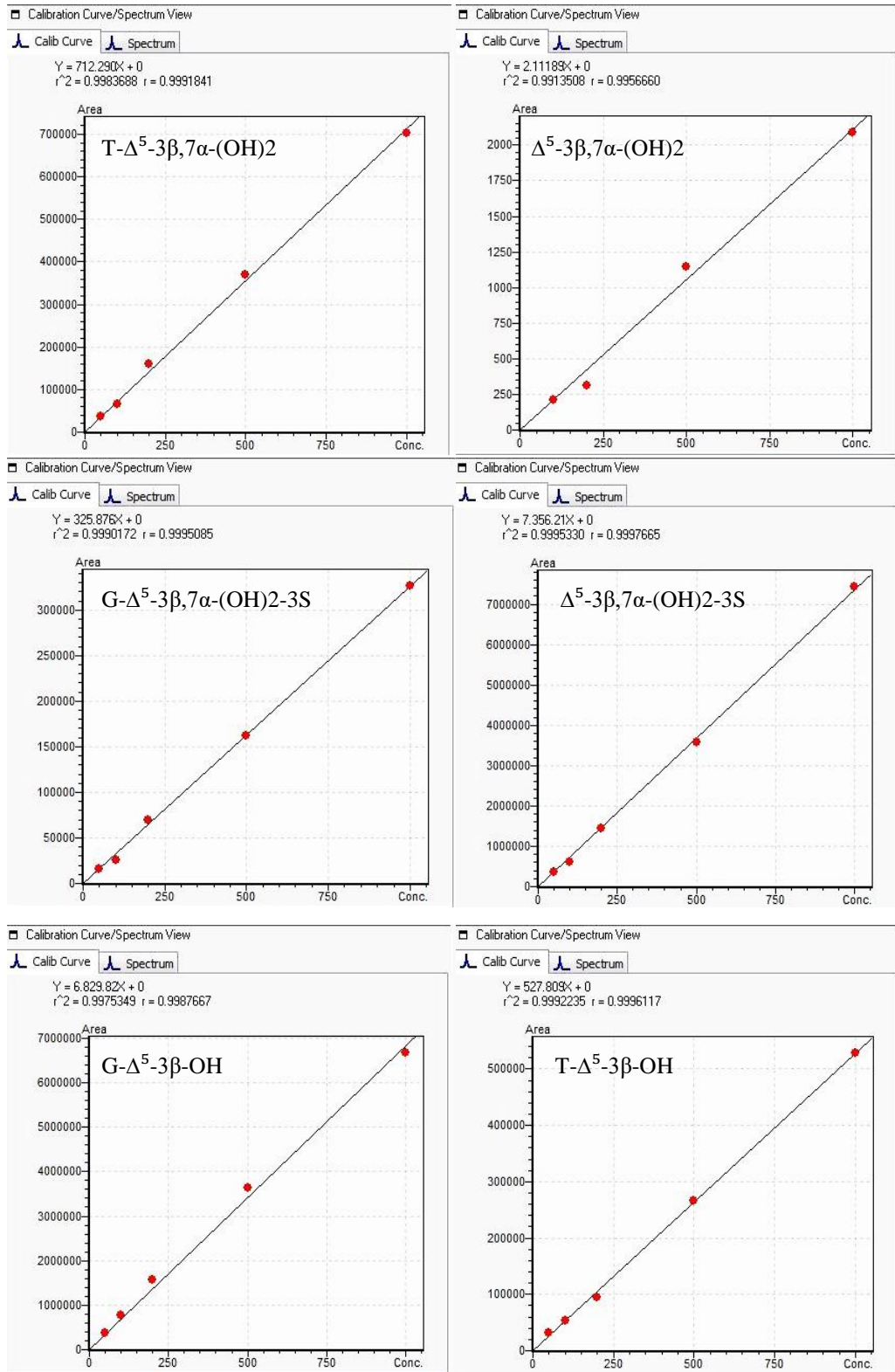
Şekil.4.13. Klasik Safra Asitleri grubunda yer alan GHCA safra asit standardının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri



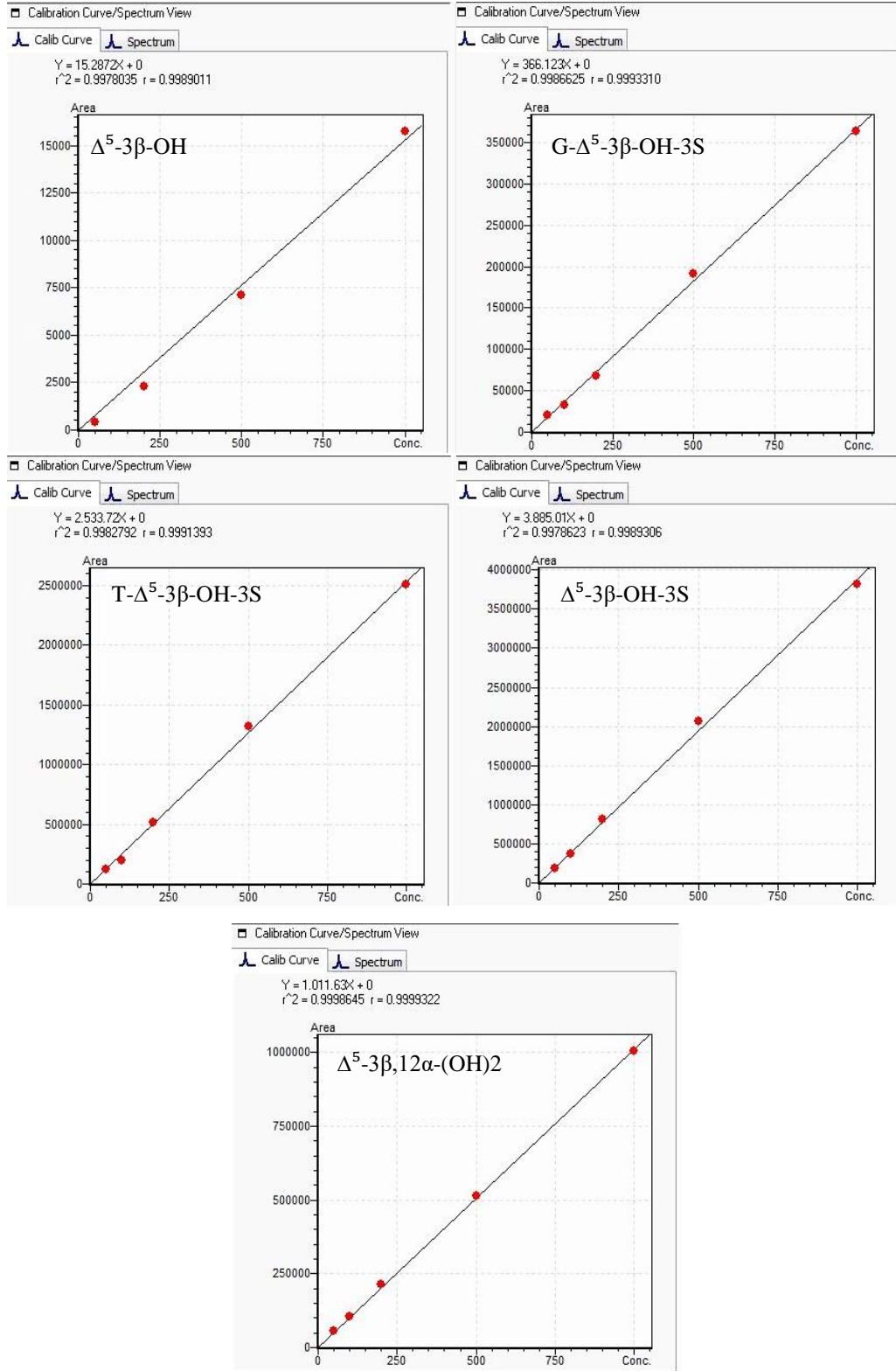
Şekil.4.14. Hidroksile Safra Asitleri grubunda yer alan GCA-1 β -ol, TCA-1 β -ol, CA-1 β -ol, GCA-6 α -ol, CA-6 α -ol ve CDCA-1 β -ol safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



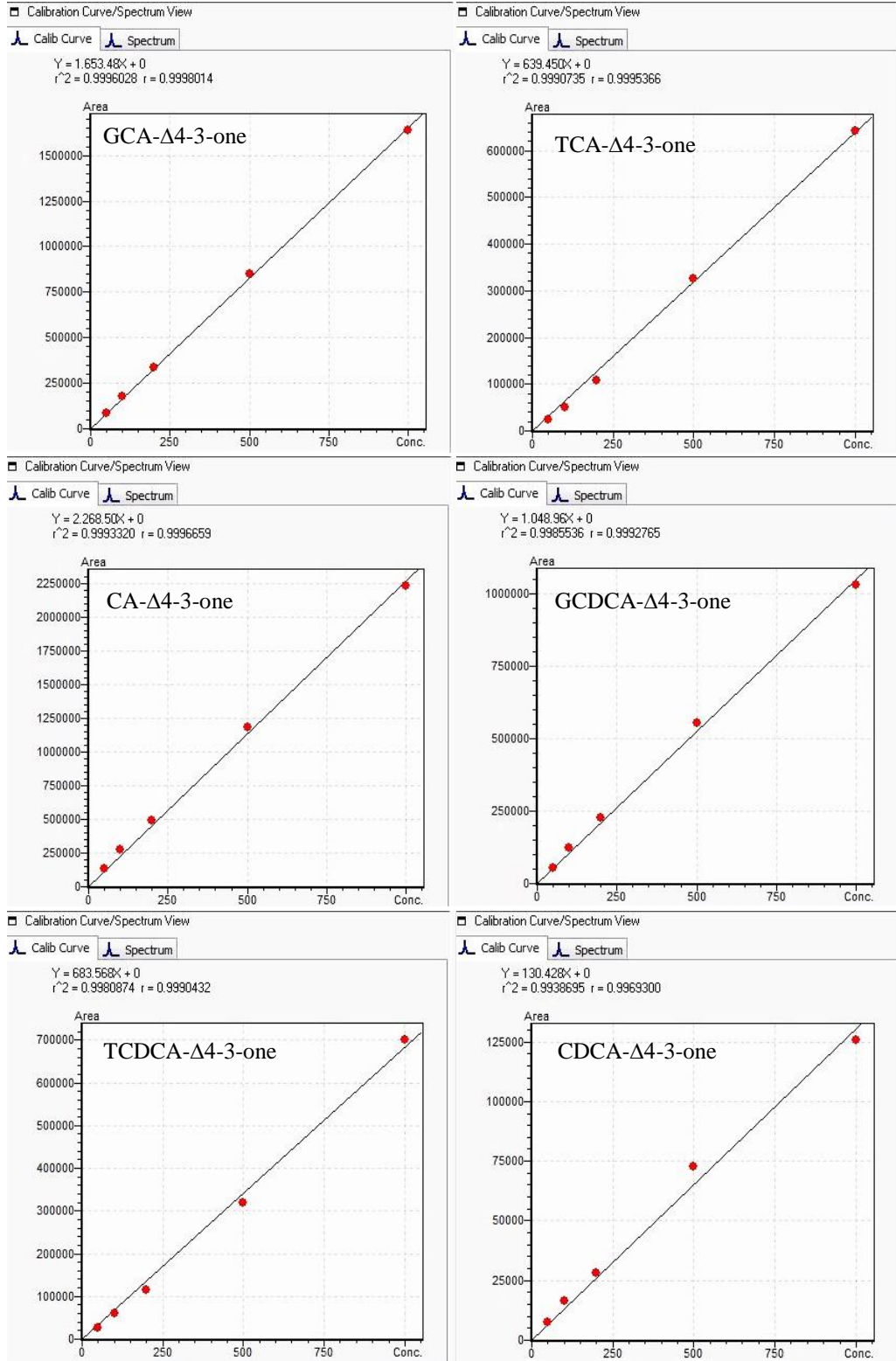
Şekil.4.15. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3, T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S, Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S ve G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2 safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r² değerleri



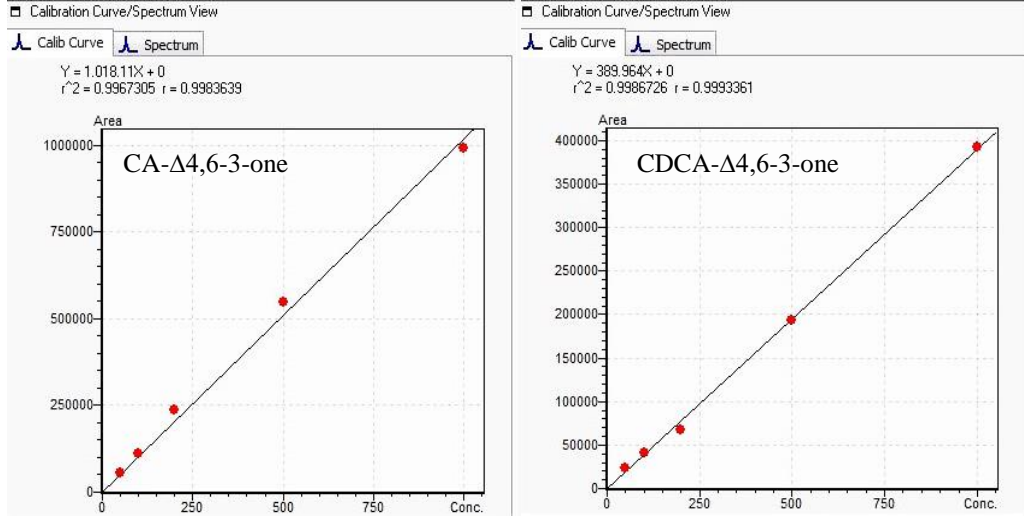
Şekil.4.16. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂, Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂, G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S, Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S, G- Δ^5 -3 β -OH ve T- Δ^5 -3 β -OH safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



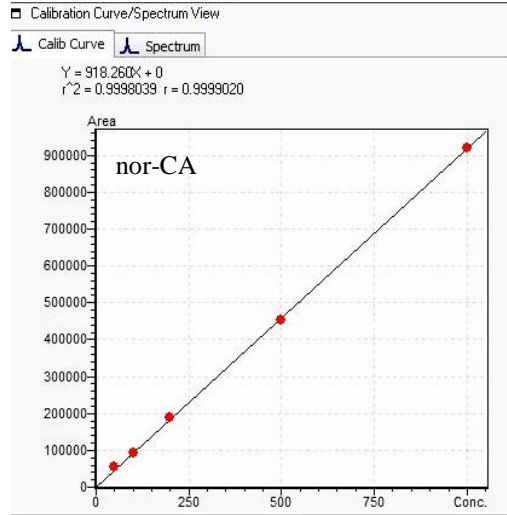
Şekil.4.17. 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan Δ^5 -3 β -OH, G- Δ^5 -3 β -OH-3S, T- Δ^5 -3 β -OH-3S, Δ^5 -3 β -OH-3S ve Δ^5 -3 β ,12 α -(OH)₂ safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



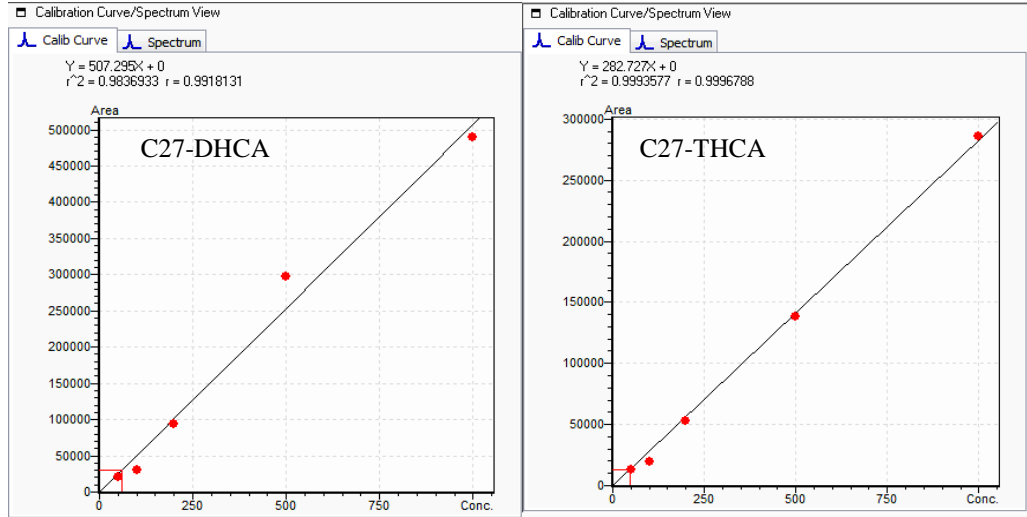
Şekil.4.18. 3-okso- Δ^4 -Safra asitleri grubunda yer alan GCA- Δ 4-3-one, TCA- Δ 4-3-one, CA- Δ 4-3-one, GCDCA- Δ 4-3-one, TCDCA- Δ 4-3-one ve CDCA- Δ 4-3-one safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



Şekil.4.19. 3-okzo- Δ^4 -Safra asitleri grubunda yer alan CA- $\Delta^4,6-3-one$ ve CDCA- $\Delta^4,6-3-one$ safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri



Şekil.4.20. Kısa zincirli safra asidi olan nor-CA safra asit standardının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri



Şekil.4.21. Uzun Zincirli Safra Asitleri olan C27-DHCA ve C27-THCA safra asit standartlarının LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen standart doğruları ve r^2 değerleri

4.3. Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun Demografik Özellikleri ve Biyokimyasal Verileri

Çalışmaya 13 hasta ve 50 sağlıklı birey dahil edildi. Kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin ve hastaların cinsiyetlerinin ve yaş ortalamalarının benzer olmasına dikkat edildi. Kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin demografik özellikleri ve biyokimyasal verilerinin (ALT, AST, Direkt Bilirubin, İndirekt Bilirubin, Total Bilirubin, İdrar Kreatinin) ortalama \pm standart sapma değerleri Tablo 4.1.'de verilmiştir. Hastaların demografik özellikleri ve biyokimyasal verileri (ALT, AST, GGT, Direkt Bilirubin, İndirekt Bilirubin, Total Bilirubin, İdrar Kreatinin) Tablo 4.2.'de verilmiştir.

Tablo 4.1. Kontrol grubunun demografik özellikleri ve biyokimyasal verileri.

Demografik Özellikleri ve Biyokimyasal Verileri	Sağlıklı Kontrol (Ort \pm Std Sapma)
Yaş	9,84 \pm 4,72 (n= 50)
Cinsiyet K:E	24:26 (n= 50)
ALT (U/L)	17,68 \pm 10,25 (n= 50)
AST (U/L)	25,24 \pm 8,95 (n= 50)
Direkt bilirubin (mg/dL)	0,11 \pm 0,05 (n= 31)
İndirekt bilirubin (mg/dL)	0,40 \pm 0,18 (n= 31)
Total bilirubin (mg/dL)	0,50 \pm 0,22 (n= 31)
Kreatinin (mmol/L)	0,20 \pm 0,14 (n= 50)

Tablo 4.2. Hastaların demografik özellikleri ve biyokimyasal verileri.

	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
Cinsiyet	E	E	K	K	E	E	E	E	E	K	K	K	K
Yaş	8 yıl	10 yıl	14 yıl	17 yıl	9 ay	5 ay	12 yıl	15 yıl	8 ay	1 yıl	8 yıl	1 yıl	4 ay
ALT (U/L)	33 (<39)	16 (<39)	13 (<39)	14 (<39)	120 (<60)	69 (<39)	127 (<39)	23 (<39)	86 (<39)	67 (<39)	16 (<39)	83 (<39)	250 (<39)
AST (U/L)	55 (<51)	24 (<51)	20 (<56)	26 (<56)	171 (<56)	59 (<56)	53 (<56)	23 (<56)	281 (<56)	164 (<56)	31 (<56)	190 (<56)	469 (<56)
GGT (U/L)	15 (3-22)	12 (3-22)	9 (3-22)	6 (3-22)	60 (12-122)	94 (12-122)	58 (3-22)	22 (2-42)	66 (1-39)	40 (4-22)	12 (4-22)	295 (4-22)	46 (4-22)
Direkt bilirubin (mg/dL)	0,11 (0-0,2)	0,15 (0-0,2)	0,10 (0-0,2)	0,09 (0-0,2)	3,60 (0-0,2)	0,20 (0-0,2)	0,18 (0-0,2)	0,17 (0-0,2)	17,98 (0-0,2)	3,11 (0-0,2)	0,20 (0-0,2)	0,28 (0-0,2)	4,0 (0-0,2)
İndirekt bilirubin (mg/dL)	0,35 (0-1,2)	0,54 (0-1,2)	0,41 (0-1,2)	0,31 (0-1,2)	3,49 (0-1,2)	0,41 (0-1,2)	0,57 (0-1,2)	0,53 (0-1,2)	7,09 (0-1,2)	2,31 (0-1,2)	1,12 (0-1,2)	0,54 (0-1,2)	4,6 (0-1,2)
Total bilirubin (mg/dL)	0,46 (0,3-1,2)	0,69 (0,3-1,2)	0,51 (0,3-1,2)	0,40 (0,3-1,2)	7,09 (0,3-1,2)	0,61 (0,3-1,2)	0,75 (0,3-1,2)	0,70 (0,3-1,2)	25,07 (0,3-1,2)	5,42 (0,3-1,2)	1,32 (0,3-1,2)	0,82 (0,3-1,2)	8,6 (0,3-1,2)
Kreatinin (İdrar) (mmol/L)	0,36	0,05	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,19	0,02	0,02	0,26	0,15	0,02

Referans aralığının üzerindeki değerler koyu yazılmıştır.

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireyler arasında yaş farklılığını belirlemek için Bağımsız Gruplar T testi kullanılmış ve yaşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,062$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin ALT değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve ALT değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin AST değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve AST değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin direkt bilirubin değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve direkt bilirubin değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin indirekt bilirubin değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve indirekt bilirubin değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin total bilirubin değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve total bilirubin değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin kreatinin değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve kreatinin değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,001$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin demografik özellikleri ve biyokimyasal verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri Tablo 4.3.'de verilmiştir.

Tablo 4.3. Kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin demografik özellikleri ve biyokimyasal verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri.

	Sağlıklı Kontrol (Ort ± Std Sapma) (n= 50)	Hasta (Ort ± Std Sapma) (n= 13)	p
Yaş	9,84 ± 4,72 (n= 50)	6,85 ± 6,19 (n= 13)	< 0,062
Cinsiyet K:E	24:26 (n= 50)	6:7 (n= 13)	0,906
ALT (U/L)	17,68 ± 10,25 (n= 50)	70,53 ± 67,315 (n= 13)	< 0,001
AST (U/L)	25,24 ± 8,95 (n= 50)	120,46 ± 133,84 (n= 13)	< 0,001
Direkt bilirubin (mg/dL)	0,11 ± 0,05 (n= 31)	2,32 ± 4,93 (n= 13)	< 0,001
İndirekt bilirubin (mg/dL)	0,40 ± 0,18 (n= 31)	1,71 ± 2,12 (n= 13)	< 0,001
Total bilirubin (mg/dL)	0,50 ± 0,22 (n= 31)	4,03 ± 6,92 (n= 13)	< 0,001
Kreatinin (mmol/L)	0,20 ± 0,14 (n= 50)	0,09 ± 0,11 (n= 13)	< 0,001

4.4. LC-MS/MS Yöntemi ile Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun İdrar Safra Asitleri Analiz Verileri

Kontrol grubundaki 50 sağlıklı bireyin ve 13 hastanın idrar örneklerinde LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan toplam 68 safra asit türüne ait değerler $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ olarak hesaplanmıştır. Safra asitleri beş farklı grupta değerlendirilmiş ve bu gruptaki safra asit türlerinin tespit edilen toplam değerleri medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir.

Kontrol grubunu oluşturan 50 sağlıklı bireyin idrar safra asit profillerinin değerleri Tablo 4.4.'de verilmiştir. Hasta bireylerin idrar safra asit profillerinin değerleri ve idrarda tespit edilen major safra asit grubu Tablo 4.5.'de verilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol grubunun LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri.

İdrar Safra Asit Profilleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$)	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)
Total safra asidi	0,45 (0,05- 2,10) (n= 50)
Klasik Safra Asitleri	0,45 (0,73- 2,04) (n= 50)
Hidroksile Safra Asitleri	0,01 (0,01- 0,12) (n= 17)
3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri	0,02 (0,01- 0,22) (n= 45)
3-okzo-Safra Asitleri	0,01 (0,01- 0,14) (n= 19)
Kısa-Uzun Zincirli Safra Asitleri	-- (n= 0)

Tablo 4.5. Hastaların LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri

İdrar Safra Asit Profilleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) (%)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
Total Safra Asitleri	32,86 (100)	0,68 (100)	0,99 (100)	1,14 (100)	9,85 (100)	47,87 (100)	3,52 (100)	0,72 (100)	60,99 (100)	113,37 (100)	0,27 (100)	30,69 (100)	3,28 (100)
Klasik Safra Asitleri	11,68 (35,5)	0,34 (50,7)	0,16 (16,5)	0,74 (64,8)	6,78 (68,9)	46,07 (96,3)	3,14 (89,2)	0,53 (73,4)	59,56 (97,7)	112,67 (99,4)	0,23 (83,8)	29,30 (95,5)	1,26 (38,4)
Hidroksile Safra Asitleri	0,03 (0,1)	0,13 (19,7)	0,17 (17,1)	--	0,39 (3,9)	0,16 (0,3)	0,01 (0,1)	0,01 (0,7)	0,59 (0,9)	0,23 (0,2)	0,01 (3)	0,76 (2,4)	1,56 (47,5)
3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri	21,01 (63,9)	0,03 (4,5)	0,30 (30,2)	0,16 (13,6)	1,79 (18,1)	0,36 (0,7)	0,16 (4,5)	0,16 (22,1)	0,17 (0,3)	0,15 (0,1)	0,01 (1,8)	0,53 (1,7)	0,02 (0,7)
3-okzo-Safra Asitleri	0,14 (0,4)	0,17 (25,1)	0,36 (36,2)	0,25 (21,6)	0,77 (7,7)	1,28 (2,7)	0,22 (6,2)	0,03 (3,8)	0,68 (1,1)	0,33 (0,3)	0,03 (11,4)	0,09 (0,3)	0,44 (13,4)
Kısa-Uzun Zincirli Safra Asitleri	0,01 (0,1)	--	--	--	0,15 (1,4)	--	0,01 (0,1)	--	--	--	--	0,01 (0,1)	--
Major İdrar Safra Asitleri	3 β -hidroksi- Δ 5-S.A.	Klasik S.A.	3-okzo- Δ 5-S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Klasik S.A.	Hidroksile S.A.
Teşhis	3 β -HSD Eksikliği	CTX	CTX	CTX	--	--	--	3 β -HSD Eksikliği	--	--	--	--	--

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin total safra asit değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve total safra asit değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,001).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin klasik safra asit değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve klasik safra asit değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,001).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin hidrokstile safra asit değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve hidrokstile safra asit değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,001).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asit değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asit değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,002).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin 3-okzo- Δ ⁴-safra asit değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve 3-okzo- Δ ⁴-safra asit değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur (p=0,001).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri Tablo 4.6.'da verilmiştir.

Tablo 4.6.Kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin LC-MS/MS Yöntemi ile elde edilen idrar safra asit profilleri verilerinin karşılaştırılması ve p değerleri.

İdrar Safra Asit Profilleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) (%)	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max) (n=)	Hasta Medyan (Min-Max) (n=)	p
Total Safra Asitleri	0,45 (0,05- 2,10) (n= 50)	3,52 (0,27- 113,37) (n= 13)	< 0,001
Klasik Safra Asitleri	0,45 (0,73- 2,04) (n= 50)	3,14 (0,16- 112,66) (n= 13)	< 0,001
Hidroksile Safra Asitleri	0,01 (0,01- 0,12) (n= 17)	0,17 (0,01- 1,56) (n= 12)	< 0,001
3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri	0,02 (0,01- 0,22) (n= 45)	0,16 (0,01- 21,01) (n= 13)	< 0,002
3-okzo- Δ ⁴ -Safra Asitleri	0,01 (0,01- 0,14) (n= 19)	0,25 (0,03- 1,28) (n= 13)	< 0,001
Kısa-Uzun Zincirli Safra Asitleri	-- (n= 0)	0,01 (0,01- 0,14) (n= 3)	---

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan ve klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.7.'de karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Tablo 4.8.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 4.7.LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması.

Klasik Safra Asitleri	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)	Hasta Medyan (Min-Max)
GCA	0,004 (0,001± 0,046) (n=50)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TCA	*	0,094 (0,019± 0,282) (n=6)
CA	0,002 (0,001 ±0,004) (n=5)	0,007 (0,002± 0,009) (n=3)
GCA-3S	*	*
TCA-3S	0,010 (n=1)	0,074 (0,069± 0,083) (n=3)
CA-3S	0,020 (0,001 ±0,016) (n=11)	0,010 (0,001± 0,033) (n=9)
GCDCA	0,001 (0,001 ±0,005) (n=50)	0,007 (0,001± 21,484) (n=11)
TCDC	*	0,743 (0,005± 0,999) (n=3)
CDCA	*	*
GCDCA-3S	*	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TCDC-3S	0,013 (0,005 ±0,022) (n=6)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
CDCA-3S	0,004 (0,001 ±0,019) (n=19)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
GUDCA	0,384 (0,050 ±2,011) (n=50)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TUDCA	*	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
UDCA	*	*
GUDCA-3S	*	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TUDCA-3S	*	*
UDCA-3S	0,001 (0,001 ±0,007) (n=14)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
GDCA	0,001 (0,001 ±0,002) (n=25)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TDCA	0,001 (n=1)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
DCA	*	*
GDCA-3S	0,008 (n=1)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TDCA-3S	0,022 (0,011 ±0,033) (n=7)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
DCA-3S	0,003 (0,001 ±0,018) (n=17)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
GLCA	*	*
TLCA	*	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
LCA	0,001 (0,001 ±0,012)(n=50)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
GLCA-3S	0,003 (n=1)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
TLCA-3S	0,005 (n=1)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
LCA-3S	0,001 (0,001 ±0,004) (n=24)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
GHCA	0,008 (0,001 ±0,105) (n=50)	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)
THCA	*	*
HCA	*	0,008 (0,003± 0,266) (n=9)

* Tespit Edilemedi

Tablo 4.8. (Devam) LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen klasik safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri.

Klasik Safra Asitleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
UDCA-3S	0,008	0,002	0,018	0,006	0,015	0	0	0,001	0	0	0,001	0,004	0,005
GDCA	0,001	0	0	0	0,002	0,038	0	0,001	6,219	8,132	0,001	0,019	0
TDCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0,536	0,44	0	0,002	0
DCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GDCA-3S	3,624	0	0	0	0	0	0	0	0,086	0	0	0,009	0
TDCA-3S	4,84	0	0,077	0	0,186	0,252	0,13	0,02	0,251	0	0	0	0
DCA-3S	0,002	0,002	0,007	0,004	0,018	0,003	0,003	0	0,006	0,004	0,001	0,008	0,006
GLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TLCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,008	0	0	0
LCA	0,002	0,007	0,013	0,022	0,174	0,026	0,014	0,004	0,02	0,044	0,003	0,005	0,06
GLCA-3S	0,003	0	0	0	0,558	0	0,085	0	0	0	0	0	0
TLCA-3S	0,005	0	0	0	1,094	0,33	0,086	0,009	0,11	0	0	0	0
LCA-3S	0,001	0	0,002	0,003	0,007	0,005	0,003	0,001	0,005	0,002	0,001	0,004	0,005
GHCA	0,009	0,005	0	0,011	0,038	0,068	0,005	0,044	0,612	0,394	0,016	0,186	0,018
THCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
HCA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6,899	0
TOPLAM	11,678	0,343	0,162	0,739	6,777	46,066	3,137	0,525	59,556	112,66	0,228	29,301	1,259

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan ve hidrokstile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.9.'da karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait hidrokstile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Tablo 4.10.'da ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 4.9.LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen hidrokstile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması.

Hidroksile Safra Asitleri	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)	Hasta Medyan (Min-Max)
GCA-1 β -ol	*	0,007 (0,005 \pm 0,009) (n=2)
TCA-1 β -ol	*	0,154 (0,006 \pm 1,450) (n=8)
CA-1 β -ol	*	*
GCA-6 α -ol	0,007 (0,001 \pm 0,115) (n=16)	0,018 (0,002 \pm 0,491) (n=12)
CA-6 α -ol	0,025 (0,014 \pm 0,044) (n=4)	0,013 (n=1)
CDCA-1 β -ol	0,040 (n=1)	0,297 (0,128 \pm 0,467) (n=2)

* Tespit Edilemedi

Tablo 4.10.LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen hidroksile safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri.

Hidroksile Safra Asitleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
GCA-1 β -ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0	0,009	0
TCA-1 β -ol	0,007	0	0,149	0	0,253	0	0	0	0,099	0,16	0,006	0,264	1,45
CA-1 β -ol	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
GCA-6 α -ol	0,012	0,005	0,02	0	0,133	0,163	0,005	0,005	0,017	0,064	0,002	0,491	0,107
CA-6 α -ol	0,013	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
CDCA-1 β -ol	0	0,128	0	0	0	0	0	0	0,467	0	0	0	0
TOPLAM	0,032	0,133	0,169	0	0,386	0,163	0,005	0,005	0,583	0,229	0,008	0,764	1,557

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan ve 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.11.'de karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Tablo 4.12.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 4.11. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması.

3β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)	Hasta Medyan (Min-Max)
G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3	0,002 (0,001±0,008) (n=9)	0,010 (0,002±0,090) (n=5)
T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3	0,004 (0,004±0,005) (n=2)	0,009 (0,005±0,014) (n=2)
Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3	0,010 (n=1)	0,950 (0,085±1,816) (n=2)
T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3-3S	*	0,063 (0,051±0,075) (n=2)
Δ^5 - $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -(OH)3-3S	0,003 (0,001±0,018) (n=16)	0,026 (0,002±0,130) (n=9)
G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2	0,001 (0,001±0,026) (n=6)	0,006 (0,003±4,394) (n=4)
T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2	0,001 (0,001±0,004) (n=4)	0,017 (0,002±0,024) (n=4)
Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2	*	0,057 (n=1)
G- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2-3S	*	0,018 (0,005±0,032) (n=2)
T- Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2-3S	0,002 (n=1)	*
Δ^5 - $3\beta,7\alpha$ -(OH)2-3S	0,001 (0,001±0,009) (n=20)	0,004 (0,001±14,549)(n=11)
G- Δ^5 - 3β -OH	0,001 (0,001±0,003) (n=19)	0,003 (0,001±0,006) (n=10)
T- Δ^5 - 3β -OH	*	0,044 (0,011±0,078) (n=2)
Δ^5 - 3β -OH	*	0,287 (0,001±1,346) (n=4)
G- Δ^5 - 3β -OH-3S	0,012 (0,002±0,122) (n=38)	0,450 (0,007±0,008) (n=7)
T- Δ^5 - 3β -OH-3S	0,001 (0,001±0,005) (n=7)	0,010 (0,001±0,193) (n=13)
Δ^5 - 3β -OH-3S	0,002 (0,001±0,010) (n=19)	0,005 (0,001±0,011) (n=12)
Δ^5 - $3\beta,12\alpha$ -(OH)2	*	*

* Tespit Edilemedi

Tablo 4.12. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri.

3 β -hidroksi- Δ^5 -safra asitleri (μ mol/mmolCr)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
G- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	0,09	0	0,022	0	0	0	0,01	0,003	0	0	0	0,002	0
T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	0	0	0	0,014	0	0	0	0	0	0	0	0,005	0
Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3	1,816	0	0	0	0,085	0	0	0	0	0	0	0	0
T- Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S	0,051	0	0	0	0	0,075	0	0	0	0	0	0	0
Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)3-3S	0,026	0	0,13	0,045	0,02	0,076	0,014	0	0	0,033	0,002	0,012	0
G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	4,394	0	0,005	0,008	0	0	0	0	0	0	0	0,003	0
T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	0,011	0	0,024	0,023	0	0	0	0	0	0	0	0,002	0
Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2	0,057	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	0	0	0	0	0,032	0	0	0	0	0	0	0,005	0
T- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)2-3S	14,549	0,002	0,031	0,002	0,007	0,01	0	0,001	0,004	0,005	0	0,002	0,004
G- Δ^5 -3 β -OH	0	0,002	0,003	0,003	0,004	0,005	0	0,001	0	0,006	0,001	0,001	0,005
T- Δ^5 -3 β -OH	0	0	0	0	0,078	0	0	0	0	0	0	0,011	0
Δ^5 -3 β -OH	0,001	0	0	0	1,346	0	0	0,141	0	0	0	0,434	0
G- Δ^5 -3 β -OH-3S	0,007	0,011	0,069	0,045	0,057	0	0	0	0	0,098	0	0,042	0
T- Δ^5 -3 β -OH-3S	0,005	0,007	0,007	0,013	0,141	0,193	0,127	0,01	0,161	0,011	0,001	0,006	0,006
Δ^5 -3 β -OH-3S	0,004	0,009	0,007	0,003	0,011	0,004	0,01	0,002	0,008	0	0,001	0,004	0,008
Δ^5 -3 β ,12 α -(OH)2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TOPLAM	21,011	0,031	0,298	0,156	1,781	0,363	0,161	0,158	0,173	0,153	0,005	0,529	0,023

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan ve 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.13.'de karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Tablo 4.14.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 4.13. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3-okzo- Δ^4 -safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması.

3-okzo- Δ^4 -Safra Asitleri	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)	Hasta Medyan (Min-Max)
GCA- Δ^4 -3-one	0,003 (n=1)	0,004 (0,001±0,034) (n=6)
TCA- Δ^4 -3-one	0,004 (0,001±0,040) (n=6)	0,028 (0,005±0,240) (n=4)
CA- Δ^4 -3-one	0,004 (0,002±0,007) (n=4)	0,007 (0,001±0,025) (n=7)
GCDCA- Δ^4 -3-one	0,002 (0,001±0,003) (n=2)	0,017 (0,002±0,107) (n=4)
TCDCA- Δ^4 -3-one	0,003 (0,002±0,004) (n=2)	0,031 (0,005±0,151) (n=4)
CDCA- Δ^4 -3-one	0,048 (0,003±0,136) (n=9)	0,237 (n=1)
CA- Δ^4 ,6-3-one	0,002 (n=1)	0,220 (0,022±0,904) (n=13)
CDCA- Δ^4 ,6-3-one	0,004 (0,003±0,004) (n=4)	0,022 (0,002±0,106) (n=3)

Tablo 4.14. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen 3-okzo- Δ^4 -Safra Asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri.

3-okzo- Δ^4 -Safra Asitleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
GCA- Δ^4 -3-one	0,002	0,003	0	0,005	0	0	0	0	0,034	0,006	0	0,001	0
TCA- Δ^4 -3-one	0	0	0	0	0,048	0,24	0	0	0	0	0,008	0,005	0
CA- Δ^4 -3-one	0,001	0,004	0	0,015	0	0,025	0	0	0,025	0	0,001	0,007	0
GCDCA- Δ^4 -3-one	0,006	0	0	0	0	0,107	0	0	0,028	0	0	0,002	0
TCDCa- Δ^4 -3-one	0	0	0,05	0,013	0,151	0	0	0	0	0	0	0,005	0
CDCA- Δ^4 -3-one	0	0	0	0	0,237	0	0	0	0	0	0	0	0
CA- Δ^4 ,6-3-one	0,124	0,163	0,307	0,214	0,223	0,904	0,22	0,027	0,589	0,322	0,022	0,045	0,437
CDCA- Δ^4 ,6-3-one	0,002	0	0	0	0,106	0	0	0	0	0	0	0,022	0
TOPLAM	0,135	0,17	0,357	0,247	0,765	1,276	0,22	0,027	0,676	0,328	0,031	0,087	0,437

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin LC-MS/MS yöntemi ile analizi yapılan ve kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Medyan (minimum-maksimum) olarak verilmiştir ve elde edilen veriler Tablo 4.15.'de karşılaştırılmıştır.

Hastalara ait kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerine ait veriler Tablo 4.16.'de ayrıntılı şekilde verilmiştir.

Tablo 4.15. LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının ve sağlıklı bireylerin idrar profilleri verilerinin karşılaştırılması.

Kısa-Uzun Zincirli Safra Asitleri	Sağlıklı Kontrol Medyan (Min-Max)	Hasta Medyan (Min-Max)
nor-CA	0,006 (n=1)	0,007 (0,002±0,012) (n=2)
C27-DHCA	0,009 (n=1)	0,032 (0,006±0,059) (n=2)
C27-THCA	*	0,039 (0,006±0,073) (n=2)

* Tespit Edilemedi

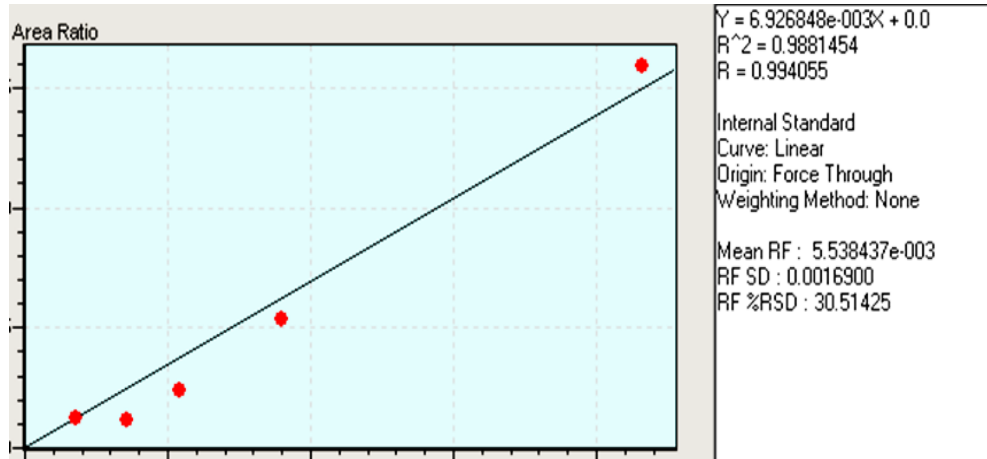
Tablo 4.16.LC-MS/MS yöntemi ile elde edilen kısa-uzun zincirli safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin kolestaz hastalarının idrar profilleri verileri.

Kısa-Uzun Zincirli Safra Asitleri ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$)	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
nor-CA	0	0	0	0	0,012	0	0	0	0	0	0	0,002	0
C27-DHCA	0	0	0	0	0,059	0	0	0	0	0	0	0,006	0
C27-THCA	0,006	0	0	0	0,073	0	0	0	0	0	0	0	0
TOPLAM	0,006	0	0	0	0,144	0	0	0	0	0	0	0,008	0

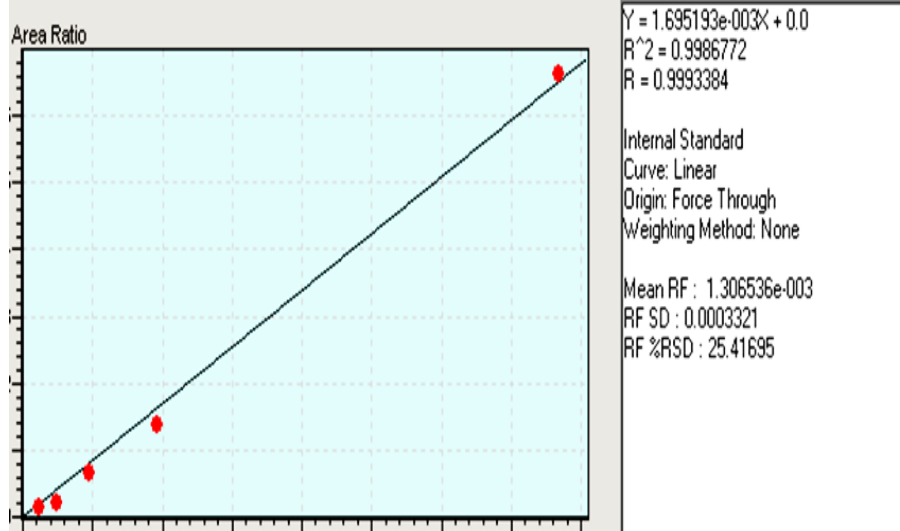
4.5. GC-MS Yöntemi ile Analizi Yapılan Safra Asitlerinin Standart

Doğruları

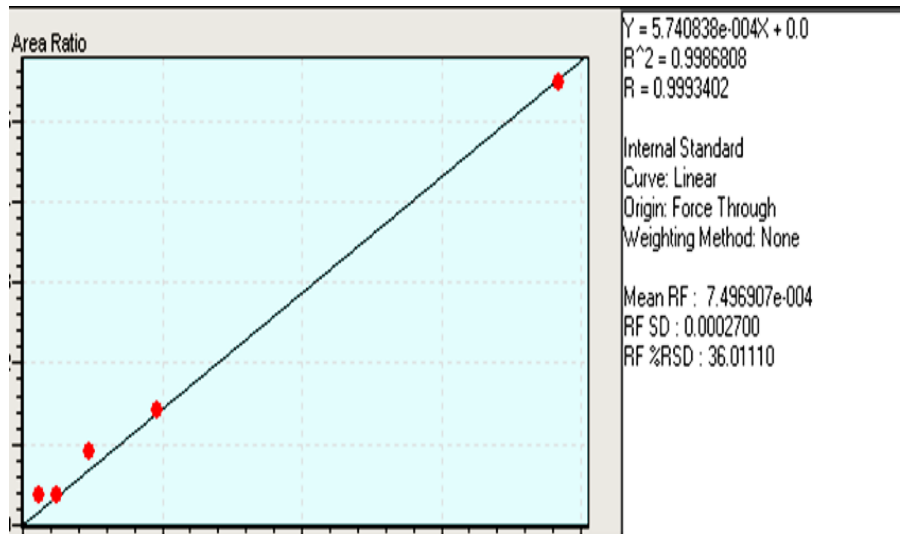
GC-MS cihazı ile yapılan ölçümlerde safra asit standartlarına ait standart doğruların belirlenmesinde kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol için farklı konsantrasyonlarda hazırlanan 0,3–10,8 µg/mL arasında değişen 5 standart kullanılmıştır. Kolesterol, 7-dehidrokolesterol ve kolestanol standartlarının standart doğruları ve korelasyon katsayıları (r^2 değerleri) Şekil.4.22., Şekil.4.23. ve Şekil.4.24.'de verilmiştir.



Şekil.4.22. Kolesterol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri.



Şekil.4.23. Kolesterol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri.



Şekil.4.24. 7-dehidrokolesterol standardının GC-MS yöntemi ile elde edilen standart doğrusu ve r^2 değeri.

4.6. GC-MS Yöntemi ile Kolestaz Hastalarının ve Kontrol Grubunun Kolesterol, Kolestanol ve 7-Dehidrokolesterol Analiz Verileri

Kontrol grubundaki 50 sağlıklı bireyin ve 9 hastanın plazma örneklerinde GC MS yöntemi ile analizi yapılan kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol'e ait değerler $\mu\text{g/mL}$ olarak hesaplanmıştır ve değerler ortalama \pm standart sapma olarak verilmiştir.

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireyler arasında yaş farklılığını belirlemek için Bağımsız Gruplar T testi kullanılmış ve yaşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,135$).

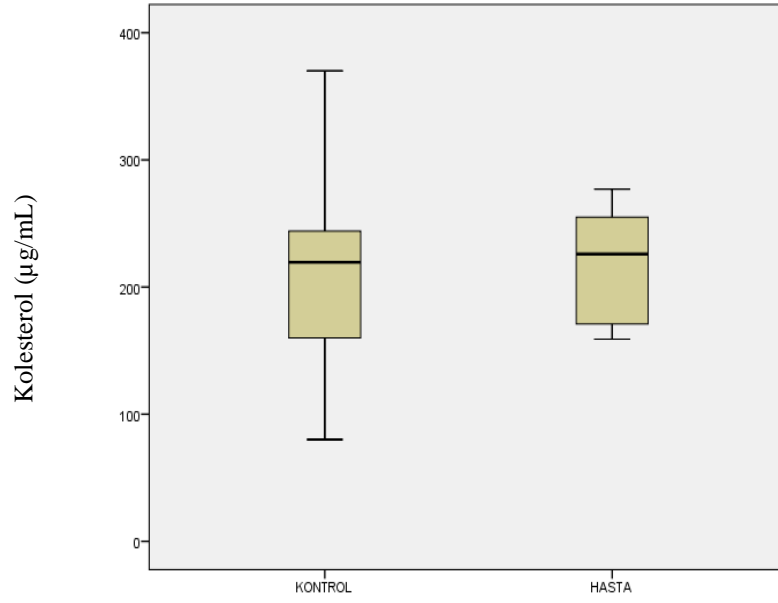
Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireyler arasında cinsiyet farklılığını belirlemek için Bağımsız Gruplar T testi kullanılmış ve yaşlar arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,594$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin kolesterol değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve kolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,570$).

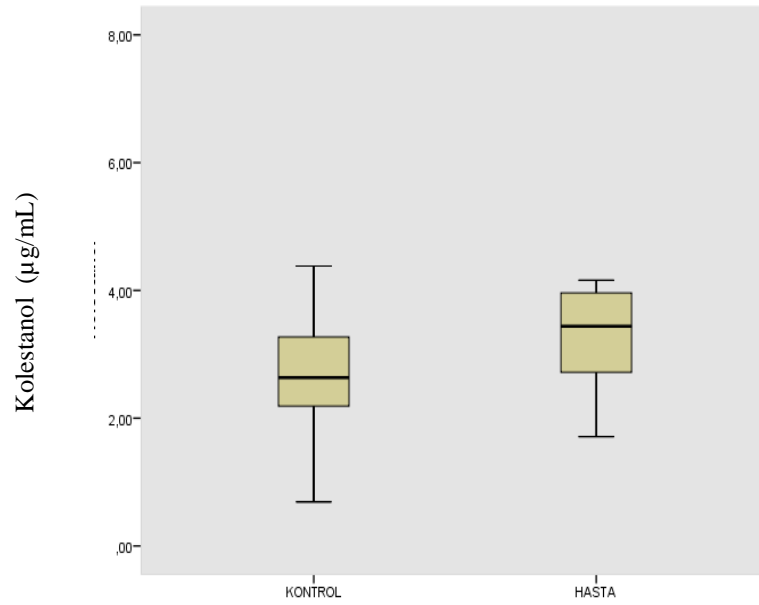
Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin kolestanol değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve kolestanol değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,099$).

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin 7-dehidrokolesterol değerleri arasında farklılığı belirlemek için Mann-Whitney U testi kullanılmış ve 7-dehidrokolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,008$).

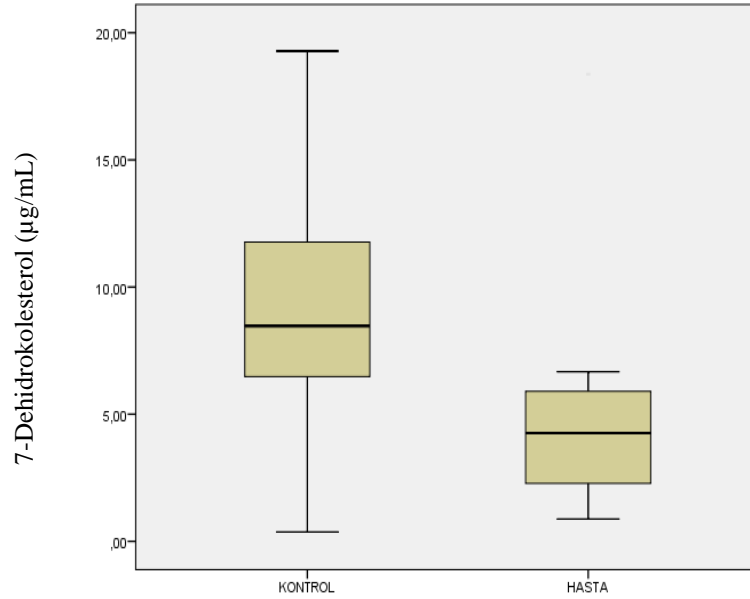
Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerlerinin karşılaştırılması Şekil.4.25., Şekil.4.26. ve Şekil.4.27.'de verilmiştir.



Şekil.4.25. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol düzeylerinin karşılaştırılması (p=0,570).



Şekil.4.26. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolestanol düzeylerinin karşılaştırılması (p=0,099).



Şekil.4.27. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma 7-dehidrokolesterol düzeylerinin karşılaştırılması (p=0,008).

Kontrol grubunun ve kolestaz hastalarının GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerlerinin karşılaştırılması Tabo 4.17.'de verilmiştir. Hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerleri Tablo 4.18.'de verilmiştir.

Tablo 4.17. Kontrol grubunun ve hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen demografik özellikleri ve plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerleri.

	Sağlıklı Kontrol (Ortalama ± Std.Sp) (n=46)	Hasta (Ortalama ± Std.Sp) (n=9)	P
Yaş	9,85 ± 4,65 (n=46)	7,11 ± 6,35 (n=9)	0,135
Cinsiyet K:E	21:25 (n=46)	5:4 (n=9)	0,594
Kolesterol (µg/mL)	210 ± 66,54 (n=46)	219 ± 46,64 (n=9)	0,570
Kolestanol (µg/mL)	2,68 ± 0,99 (n=46)	3,55 ± 1,85 (n=9)	0,099
7-Dehidrokolesterol (µg/mL)	9,25 ± 4,52 (n=46)	5,64 ± 5,16 (n=9)	0,008

Tablo 4.18. Hastaların GC-MS yöntemi ile elde edilen plazma kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol değerleri.

	Hasta 1	Hasta 2	Hasta 3	Hasta 4	Hasta 5	Hasta 6	Hasta 7	Hasta 8	Hasta 9	Hasta 10	Hasta 11	Hasta 12	Hasta 13
Kolesterol (µg/mL)	211,23	255,39	161,17	171,00	*	255,8	277,07	272,89	*	159,43	*	241,35	*
Kolestanol (µg/mL)	5,43	7,95	4,16	3,44	*	2,72	3,96	1,72	*	3,47	*	2,77	*
7-Dehidrokolesterol (µg/mL)	2,60	6,33	1,96	0,88	*	5,47	6,67	18,37	*	3,67	*	4,85	*
Teşhis	3β-HSD Eksikliği	CTX	CTX	CTX		--	--	3β-HSD Eksikliği	--	--	--	--	--

* Plazma örneği yok

5. TARTIŞMA

Nedeni bilinmeyen kolestaz tanısı almış bazı hastalarda safra asit sentez yollarında genetik mutasyonlar sonucu enzim fonksiyon bozuklukları tespit edilmiş ve bugüne kadar 9 farklı IEBAS tanımlanmıştır. IEBAS tanısı almış hastaların klinik özellikleri arasında kolestaz, hepatomegali ve akolik gayta; biyokimyasal özellikleri arasında serum direkt bilirubin düzeyi > 2 mg/dL ve normal seviyelerde toplam safra asit ve GGT değerleri yer almaktadır (66).

Hastalık erken yaşlarda karaciğer yetmezliğine ve ölüme doğru ilerleyebilir veya ileri yıllarda nörolojik semptomlarla ortaya çıkabilir. Son yıllarda safra asidi replasman tedavisi gündeme gelmiştir ve erken tedavi için erken tanı önemlidir. Normal GGT, düşük plazma kolesterolü ve normal seviyede veya artmış transaminazları olan nedeni açıklanamayan kolestatik bireylerde hastalıktan şüphelenilmelidir (74).

IEBAS'da tanımlanan bu biyokimyasal verilere ek olarak serum, safra ve idrarda kolik ve kenodeoksikolik asit seviyelerinde azalma ile birlikte söz konusu enzim eksikliğinin görüldüğü basamakta substratların karakteristik yapısını koruyan atipik safra asitlerinin yüksek konsantrasyonları tespit edilmektedir. Bu ara metabolitler rutin veya klasik yöntemlerle tespit edilememektedir. Kütle spektrofotometrileri günümüzde safra asidi sentezindeki atipik ara metabolitlerin ve dolayısıyla ilgili basamakta görevli enzim bozukluklarının tespit edilmesinde en uygun yöntem olarak kabul edilmektedir (125).

Safra asitlerinin analizinde iyon değiştirici kromatografi, gaz kromatografisi (GC) ve elektron iyonizasyon kütle spektrometresi (MS) yöntemleri kullanılmıştır. Bu yöntemlerin önemli bir dezavantajı, konjüge safra asitlerinin ayrılması ve gerekli uçuculuğun sağlanması için türevlendirmeye ihtiyaç duyulmasıdır. Daha sonra, hızlı atom bombardımanı (FAB)-MS ve ardından elektrosprey iyonizasyon (ESI) safra asitlerinin analizinde kullanılmaya başlanmıştır (214).

Dünyada sadece Japonya Tokyo'da bulunan 'Junshin Clinic Bile Acid' enstitüsünde Hiroshi Nittono (MD, PhD) direktörlüğünde kütle spektrofotometrileri

ile kapsamlı bir şekilde safra asitlerinin analizi yapılmaktadır. Bu yöntemde kuru kağıda emdirilmiş az miktarda idrar örneğinin yeterli olması özellikle bebeklerde ve küçük çocuklarda numune teminindeki zorlukları ortadan kaldırması bakımından oldukça önemlidir.

Bugüne kadar kurutulmuş idrar örneğinin nöroblastom, insan papilloma enfeksiyonu ve kongenital çeşitli metabolik bozuklukların teşhis edilmesinde kullanımının etkinliği bildirilmiştir ve bu nedenle IEBAS şüphesi varlığında kurutulmuş idrar örneğinin kullanılmasının güvenilir ve verimli bir sistem olduğu değerlendirilmiştir (215).

Çalışmamızda Japonya Tokyo'da bulunan 'Junshin Clinic Bile Acid' enstitüsünde Hiroshi Nittono (MD, PhD)'nun kullandığı yöntem esas alınarak nedeni açıklanamayan kolestaz hastalarının kuru kağıda emdirilmiş idrar örneklerinde klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3 β -hidroksi Δ 5-safra asitleri ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri grubunda yer alan toplam 68 farklı safra asidi ara metaboliti araştırılmıştır (215). IEBAS tanısı almış hastaların çalışmaya dahil edilmesine çalışılmıştır. Ayrıca bu çalışma ile dünyada sadece Japonya Tokyo'da geliştirilen yöntem referans alınarak 68 farklı safra asidi ara metaboliti LC-MS/MS yöntemi ile hedefli metabolomik bir analiz olarak kurulmuştur. Kurutulmuş idrar örneği kullanılarak LC-MS/MS ile safra asitlerinin taramasının fizibilitesinin değerlendirilmesi yapılmıştır.

Çalışmaya kolestaz tanısı olan 13 hasta dahil edildi. Hastalardan 2'si 3 β -hidroksi-HSD tanısı almış 8 ve 15 yaşlarında erkekti. Çalışmamızda CTX tanısı alan 3 hasta bulunmaktaydı. Bu hastalardan 1'i erkek ve 9 yaşındaydı. CTX tanısı almış diğer 2 hasta kız ve kardeşti. Kardeşlerden biri 14, diğeri 17 yaşındaydı.

Bu çalışmada bu iki hastalık grubunun klinik ve biyokimyasal özellikleri ile idrar safra asit profilleri ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır.

5.1. 3 β -hidroksi- Δ 5-steroid Dehidrogenaz Eksikliği

3 β -hidroksi- Δ 5-C27-steroid dehidrogenaz (3 β -HSD) bozukluğu ilk ve en sık bildirilen IEBAS'tır. Steroid çekirdeğinde modifikasyonun kusurlu olduğu otozomal

resesif bir durumdur. 3β -HSD enzimi, 7α -hidroksikolesterolün 3β -hidroksil kısmının oksido-redüksiyonu için gereklidir. 7α -hidroksikolesterol 7α -hidroksi-4-kolesten-3-on'a dönüşür. Enzimde bozukluk söz konusu olduğunda, 3β -hidroksil- $\Delta 5$ yapısı korunur, hem 7α -hidroksikolesterol hem de anormal C24 safra asitleri birikir (216). Sonuç olarak 3β -hidrojen 3α -konfigürasyonuna dönüştürülemediğinden, $3\beta,7\alpha$ -dihidroksi-5-kolenoik asit ve $3\beta,7\alpha,12\alpha$ -trihidroksi-5-kolenoik asit birikir. C24 safra asitlerinin C-3 pozisyonunda sülfat veya glisin ile konjugasyona uğrar (24). İdrar safra asitlerinin analizi sonucunda anormal bir tablo ortaya çıkar. Primer safra asitlerinin glisin ve taurin konjuge formları düşük seviyelerde ve dihidroksi ve trihidroksi kolenoik asitlerin sülfat ve glikosülfat ile konjuge formları yüksek seviyelerde tespit edilir (113,125).

Çalışmaya dahil edilen 13 hastadan 1'i 3β -hidroksi-HSD tanısı almış 8 yaşında erkekti. Klinik biyokimya değerleri ALT: 33 U/L (<39 U/L); AST: 55 U/L (<51 U/L); GGT: 15 U/L (3-22 U/L); Direkt bilirubin: 0,11 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,35 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 0,46 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak referans aralıklarında gözlendi. Hastamız kontrol için başvurmuş ve safra asidi replasman tedavisi ursodeoksikolik asit 2 hafta önce kesilmişti. 2016 yılında yurtdışına gönderilen örneklerden serum total safra asit düzeyleri normal, idrar safra asitleri yorumu primer safra asit düzeylerinde düşüklük, 3β -hidroksi-HSD eksikliği ile uyumlu olarak gelmiş ve bu doğrultuda 3β -hidroksi-HSD tanısı almıştır. Herhangi bir şikayeti, akolik gaita, sarılık, kaşıntı, hepatomegali yoktu.

8 yaşında erkek hastanın hikayesi incelendiğinde 40 günlükken başlayan sarılık, enjeksiyon sonrası kas içine kanama, hepatomegali hikayesi görülmektedir. Otoimmün hepatit belirteçleri negatif, seruloplazmin normal bulunmuştur. Siroz ve karaciğer yetmezliği olarak değerlendirilen hastanın karaciğer biyopsisinde parankimal dev hücre oluşumu, belirgin kolestaz, yağlanma, balonlaşma dejenerasyonu ve perisellüler fibrozisin saptandığı, morfolojik bulguların bilyer atreziyi dışladığı görülmüştür. Siroz ve portal hipertansiyon tanısı ile hastanemize başvuran hastanın ursodeoksikolik asit (ursofalk) tedavisi ile sarılığı düzelmiştir. Ursodeoksikolik asit bağırsaktan kolesterol emilimini engellemekte, karaciğerde

kolesterol sentezini azaltmakta ve safraya kolesterol atılımını azaltıcı etkiler göstermektedir (217).

2015'te hastanemizde değerlendirilen hastanın GGT değerinin normal olması, anne-baba akrabalığı (hala-dayı çocukları), kardeş karaciğer transplantasyon öyküsü olması ve ursodeoksikolik asitten yarar görmesi üzerine ilk planda safra asit sentez bozukluğu düşünülerek yurtdışına serum ve idrar safra analizleri için numune gönderilmiştir. Serum total safra asit düzeyleri normal, idrar safra asitleri yorumu primer safra asit düzeylerinde düşüklük, 3 β -hidroksi-HSD eksikliği ile uyumlu olarak gelmiştir. ABCB11 gen dizi analizinde mutasyon saptanmamıştır. ABCB11 geni safra tuzunu hücre dışına taşıyan bir pompadır (BSEP) (83). 2017 yılında safra asidi replasman tedavisi ursodeoksikolik asit başlanmıştır. Hastamızdan çalışma için örnekler alınmadan 2 hafta önce ursodeoksikolik asit tedavisi kesilmiştir.

IEBAS tanısı almış hastaların klinik özellikleri arasında nedeni açıklanamayan kolestaz, hepatomegali ve akolik gayta; biyokimyasal özellikleri arasında serum direkt bilirubin düzeyi > 2 mg/dL ve normal seviyelerde toplam safra asit ve GGT değerleri yer almaktadır (66). Hastamızda 2015'te hastanemizde değerlendirilme sırasında direkt bilirubin 0,48 mg/dL (0-0,2 mg/dL) yüksek ve diğer biyokimyasal verileri normal olarak bulunmuştur. Veriler 3 β -hidroksi-HSD eksikliğinde paylaşılan bulgularla benzerlik göstermektedir (218).

AI-Hussaini AA ve ark, 2017 yılında 3 β -hidroksi-HSD tanısı almış 11 hastayı dahil ettikleri çalışmada hastaların biyokimyasal parametrelerinin (ALT, GGT, Total bilirubin ve Direkt bilirubin) kolestaz tanısı için literatürlerde tanımlanan parametrelerle uyumlu olduğu görülmüştür (219).

Ursodeoksikolik asit tedavisi kesilmiş durumda alınan idrar örneklerinde yaptığımız safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 32,86 (%100) ve 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 21,01 (%63,9) olarak bulundu. 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitlerinden sonra baskın olan safra asit türü klasik safra asitleri (11,68(%35,5)) grubuydu. Murai T ve ark.'nın yaptığı çalışmada 3 β -hidroksi-HSD tanısı almış 2 hastanın idrar safra asit profilleri LC-MS/MS tekniği ile

analiz edilmiş ve bulgularımızla uyumlu olarak 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubunda yer alan safra asitlerinin yüksek değerleri tespit edilmiştir (220).

3 β -hidroksi-HSD tanısı almış hastamızda 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubunda yer alan Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S (14,549 μ mol/mmolCr), G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂ (4,394 μ mol/mmolCr) ve Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)₃ (1,816 μ mol/mmolCr) ara metabolitlerinin yüksek seviyeleri tespit edilmiştir. Verilerimizle uyumlu olarak 3 β -hidroksi-HSD tanısı almış 11 hastanın dahil edildiği çalışmada da idrarda bu eksiklik için karakteristik metabolitler olan 3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit ve 3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asitlerin varlığı tespit edilmiştir (219).

Bu enzim eksikliğinde hem 7 α -hidroksikolesterol hem de 3 β -hidroksi- Δ 5 yapısını koruyan C24 safra asitlerinin birikimi görülmektedir (216). Eksikliğinde biriken 7 α -hidroksikolesterol C24 safra asitlerine (3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolenoik asit ve 3 β ,7 α ,12 α -trihidroksi-5-kolenoik asit) dönüştürülür ancak Δ 5 pozisyonundaki çift bağ indirgenemez. Bu doymamış C24 safra asitleri çoğunlukla C3 konumunda sülfatlanır ve kısmen de glisin ile konjugasyona uğrar. Buna ek olarak Δ 5-3 β -C27 safra asitlerinin konjuge olmayan formları da tespit edilebilmektedir (24). Ayrıca 3 β -hidroksi- Δ^5 -C27-steroid dehidrogenaz (HSD3 β 7) eksikliği olan hastaların çoğunda idrarda tüm major safra asit bileşenleri sülfatlanmıştır (78). Bu bilgilerle uyumlu olarak LC-MS/MS yöntemi ile yaptığımız idrar analizi sonucunda 3 β -hidroksi dehidrogenaz eksikliği tanısı almış hastamızda, Δ 5-dihidroksi ve trihidroksi, 3. karbondan sülfatlanmış, konjuge ve konjuge olmayan C24 safra asitleri ve majör gliko ve tauro-kenodeoksikolik asitler ile gliko ve tauro-deoksikolik asitlerin 3. karbondan sülfatlanmış formları çok yüksek bulunmuştur. Ayrıca tüm safra asit kolanoitleri sülfatlanmış formda tespit edilmiştir. Bu bulgular literatürlerde yer alan sonuçlarla kıyaslandığında çalışmamızı desteklemektedir.

Çalışmaya dahil edilen 13 hastadan bir diğer hasta 3 β -hidroksi-HSD tanısı almış 15 yaşında erkekti. Klinik biyokimya değerleri ALT: 23 U/L (<39); AST: 23 U/L (<51); GGT: 22 U/L (3-22); Direkt bilirubin: 0,17 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,53 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 0,70 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak referans aralıklarında gözlendi. Hastamız kontrol için başvurmuş ve

safra asidi replasman tedavisi ursodeoksikolik asit almaktaydı. 2017 yılında yurtdışına gönderilen örneklerden 3 β -hidroksi-HSD eksikliği tanısı almıştır. Herhangi bir şikayeti, akolik gaita, sarılık, kaşıntı, hepatomegali yoktu.

15 yaşında erkek hastanın hikayesi incelendiğinde 2 aylıktan itibaren nedeni tespit edilemeyen neonatal kolestatik hepatit ön tanısı ile izlendiği ve ALT, AST, direkt bilirubin yüksek, GGT'nin normal saptandığı görülmüştür. Ursodeoksikolik asit tedavisi başlanmıştır. Bir yıl sonra sarılığı geçip, laboratuvar testleri normale dönmüş. 2 yaşında karaciğer biyopsisi yapılmış hafif şiddette kronik hepatit, evre 3 fibrozis tespit edilmiş. 2016'da yapılan karaciğer biyopsisi kronik hepatit ile uyumlu olarak değerlendirilmiştir. Anne-baba 2. dereceden akrabadır. 2017'de hastanemizde değerlendirilen hastanın GGT değerinin normal olması, anne-baba akrabalığı (2. derece) ve ursodeoksikolik asitten yarar görmesi üzerine ilk planda safra asit sentez bozukluğu düşünülerek yurtdışına serum ve idrar safra analizleri için numune gönderilmiştir. Sonuç 3 β -hidroksi-HSD eksikliği ile uyumlu olarak gelmiştir. 2017 yılında safra asidi replasman tedavisi ursodeoksikolik asit başlanmıştır.

Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 0,72 ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) (%100), klasik safra asitleri 0,53 ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) (%73,4), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,158 ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,027 ($\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) olarak bulundu.

Hastanın 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubunda yer alan monohidroksi safra asitlerinin di- ve trihidroksi safra asitlerine göre daha yüksek olduğu görülmektedir. Özellikle 3 β pozisyonundan hidrosillenmiş monohidroksi safra asidi yüksekti. Oksisterol-7 α -hidroksilaz (CYP7B1) alternatif/asidik yolda görevli enzimdir ve eksikliğinde idrarda 3 β pozisyonunda monohidroksi safra asidi metabolitleri artar. 3 β -hidroksi-5-kolestenoik asit, 7 α - konumunda hidrosilasyona uğrayamaz ve 3 β ,7 α -dihidroksi-5-kolestenoik asit oluşamaz. Artan monohidroksi safra asitleri klasik/nötral yolun ilk enzimi olan kolesterol 7 α -hidroksilaz enzimini baskılar ve primer safra asitlerinin klasik yolla sentezini durdurur. Bu nedenle bu hastalarda klasik safra asitleri düşüktür. Bu verilerle uyumlu olarak hastada 0,53 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ olarak tespit edilen değer, hastanın ursodeoksikolik asit alımına bağlı olarak artan

GUDCA (0,433 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$) değeridir (142, 221). Primer safra asitlerinin sentezlenememesi safra akışını engellemektedir. Bu bulgu ile birlikte 3β -hidroksi- $\Delta 5$ yapısındaki monohidroksi safra asitlerinin varlığı yüksek derecede hepatotoksiktir ve hastanın hikayesindeki neonatal kolestatik hepatiti ve o dönemdeki ALT, AST, direkt bilirubin yüksekliğini açıklamaktadır. Bulgularımız literatürde belirtildiği gibi asidik yolağın neonatal dönemde önemini de vurgulamaktadır. GC-MS analizinde hastanın plazma 7-dehidrokolesterolü yüksek bulunmuştur. Sterollerin 7α - konumunda hidroksilasyonu, oksisterol- 7α -hidroksilaz olmaması ve kolesterol 7α -hidroksilazın baskılanması nedeniyle gerçekleşemediğinden 7-dehidrokolesterol yüksek beklenir.

Oksisterol- 7α -hidroksilaz eksikliğinde tanımlanan klinik biyokimyasal verilerle uyumlu olarak hastada ALT, AST, direkt bilirubin yüksek, GGT normal değerdedir (31). Hastamızın biyokimya, idrar safra asitleri ve kan metabolitleri sonuçları 3β -hidroksi-HSD tanısı yerine oksisterol- 7α -hidroksilaz tanısını desteklemektedir. Ursodeoksikolik asit tedavisi kesildikten sonra alınan idrar örneğinde ölçüm değerli olacaktır. Hastanın ursodeoksikolik asit kesildikten sonra idrar safra asitleri ve kan metabolitleri analizi yapılması ve mutasyon analizinin oksisterol- 7α -hidroksilaz tanısı yönünde olması için klinisyenlerle görüşülmesi planlanmıştır.

Klinik durumun göstergesi olan biyokimyasal parametreler ile birlikte idrar safra asit metabolitleri ve kan metabolitleri hastalığın ilerlemesi veya tedaviye yanıt olarak zamanla değişmektedir. Bu nedenle, mevcut klinik durumun teşhisi, hastalığın başlangıcında en uygun terapötik stratejiyi seçmek için gereklidir. Bununla birlikte hastanın durumundaki değişikliklere bağlı olarak klinik durumun sık sık değerlendirilmesi de gerekmektedir (222).

5.2. Sterol 27-Hidroksilaz Eksikliği

Sterol 27-hidroksilaz enzimi hem klasik/nötral yol hem de asidik/alternatif yolda görev alan, CYP27A1 geni tarafından kodlanan ve sterollerin C27 pozisyonunda hidroksillenmesinden sorumlu mitokondriyal bir enzimdir (85). Eksikliği ilerleyici nörolojik fenotip ile karakterize edilen ve otozomal ressesif bir bozukluk olan CTX'e neden olur. Yaşamın ilk yıllarında (bebeklik ve çocukluk

döneminde) görülen semptomlar arasında yenidoğan kolestazı, diyare, bilateral katarakt ve gelişimsel gecikme sayılabilir. Ergenlik ve sonraki dönemlerde tendon ksantomları, piramidal ve serebellar bulgular, periferik nöropati ve demans dahil olmak üzere nöropsikiyatrik semptomlar gözlenir (223,224).

Sterol 27-hidroksilaz eksikliği sonunda asidik/alternatif yol tamamen bloke olurken klasik/nötral yol 5 β -kolestan-3 α ,7 α ,12 α -triol basamağında bloke olur. Bunun sonucunda da safra asitleri ara metabolitlerinde artış görülürken yolun sonunda sentezlenen primer safra asitlerinin sentezi azalır. 7 α -hidroksi-4-kolestan-3-one ve kolesterol dokularda ve ksantomlarda kolestanol haline dönüşür. CTX hastalarında görülen patolojik durumlara kolestanolün neden olduğu düşünülmektedir (225,226).

Sterol 27-hidroksilaz basamağındaki blokaj nedeniyle biriken 3 α ,7 α ,12 α -kolestan-5 β -triol metaboliti mikrozomal 23-, 24-, 25-hidroksilazlar aracılığıyla ayrıca hidroksilasyona uğrar. Oluşan safra alkollerinin son olarak glukuronidasyonu ile 5 β -kolestan-3 α ,7 α ,12 α , (23 veya 24), 25-pentol glukuronid CTX hastalarının idrarında tespit edilen metabolittir (98).

Kolestanol düzeylerinin tek başına CTX tanısında yeterli olamayacağı ve bazı karaciğer hastalıklarında da plazmada tespit edilebileceği yönünde görüşler de bulunmaktadır (227). Bu nedenle rutin olarak kullanılmamasına rağmen CTX tanısının konulmasında 7-dehidrokolesterol ve 8-dehidrokolesterol gibi kolesterol öncülerinin de plazma düzeyleri tespit edilmektedir (228).

Bu çalışmada da çalışmaya dahil edilen kontrol gruplarının ve hastaların plazma örneklerinde kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol düzeyler GC-MS yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Çalışmamızda CTX tanısı alan 3 hasta bulunmaktaydı. Bu hastalardan 1'i erkek ve 9 yaşındaydı. Klinik biyokimya değerleri ALT: 16 U/L (<39 U/L); AST: 24 U/L (<51 U/L); GGT: 12 U/L (3-22 U/L); Direkt bilirubin: 0,15 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,54 mg/dL (0-1,2 mg/dL); ve Total bilirubin: 0,69 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak referans aralıklarında gözlemlendi

9 yaşında erkek hastanın hikayesi incelendiğinde 3,5 yaşında nöbet geçirerek hastanemize başvurduğu ve takiben gelişme geriliği, kazanılmış becerilerin kaybı olduğu görülmüştür. Dış merkezde ölçülen kolestanol ve 7-dehidrokolesterol düzeyleri yüksek bulunmuştur. Klinik semptomları Serebellar Vakuolizasyonlu Serebrotendinöz Ksantomatozis ile uyumlu olarak not edilmiştir. Hastanın dış merkezde yapılan CYP27A1 geni kodlayan diziye ait ekzon 1-9 bölgelerinin dizi analizi sonucunda c.508_509ins16, p.E170Vfs*16 mutasyonu (Kodlayan dizinin 508 ve 509. pozisyonları arasında 16 nükleotidlik insersiyon gerçekleşmiştir. Proteinin 170. pozisyonunda 16 nükleotidlik insersiyon ile kalıp kaydıran mutasyon 16 kodon sonra dur kodonuna neden olmaktadır) ve delesyon mutasyonu heterozigot olarak saptanmıştır. Kenodeoksikolik asit başlanmıştır.

Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 0,68 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100) olarak tespit edildi. Klasik safra asitleri 0,34 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%50,7) ve bu grupta yer alan GUDCA değeri ise 0,321 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ olarak bulundu. GUDCA değeri hastanın kenodeoksikolik asit kullanımına bağlı olarak yüksekti.

Sterol 27-hidroksilaz enzim eksiliğinde asidik/alternatif yolun tamamen bloke olması nedeniyle safra asit sentezi klasik/nötral yol üzerinden devam eder. Bu yolda enzim $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -kolestan-5 β -triol ara metabolitini substrat olarak kullanır ve reaksiyonlar bu sentez basamağına kadar devam eder (225,226).

Bu hastada da 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,17 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$, hidroksile safra asitleri 0,133 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ ve 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,031 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ olarak bulundu. 3-okzo- Δ 4-safra asitlerinden CA- Δ 4,6-3-one 0,163 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ olarak yüksekti. Bu bulgu asidik/alternatif yolun sterol 27-hidroksilaz eksikliği nedeniyle bloke olduğunu ve üstünde bu 3-okzo- Δ 4-safra asitleri grubunun birikim yaptığını bize göstermektedir. Hidroksilasyon nedeniyle hidroksi (safra alkolleri) safra asitlerinde artış uyumludur.

CTX tanısı almış diğer 2 hasta kız ve kardeşti. Kardeşlerden biri 14 değeri 17 yaşındaydı. 14 yaşındaki kız kardeşin klinik biyokimya değerleri ALT: 13 U/L (<39

U/L); AST: 20 U/L (<51 U/L); GGT: 9 U/L (3-22 U/L); Direkt bilirubin: 0,10 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,41 mg/dL (0-1,2 mg/dL) Total bilirubin: 0,51 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak referans aralıklarında gözlemlendi.

14 yaşında kız hastanın hikayesi incelendiğinde 2. sınıftayken okuma yazmayı öğrenememesi nedeniyle doktora başvurduğunda bilateral katarakt tespit edilerek 8 yaşında katarakt ameliyatı olmuştur. Katarakt CTX hastalarında belirgin bir bulgudur. Dış merkezde ölçülen kolestanol değeri yüksek bulunmuştur.

17 yaşındaki kız kardeşin klinik biyokimya değerleri ALT: 14 U/L (<39 U/L); AST: 26 U/L (<51 U/L); GGT: 6 U/L (3-22 U/L); Direkt bilirubin: 0,09 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,31 mg/dL (0-1,2 mg/dL); Total bilirubin: 0,40 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak referans aralıklarında gözlemlendi.

17 yaşında kız kardeşin hikayesi incelendiğinde 3. sınıftayken okuma yazmayı öğrenememesi nedeniyle doktora başvurduğunda bilateral katarakt tespit edilerek 12 yaşında katarakt ameliyatı olmuştur. Dış merkezde ölçülen kolestanol değeri yüksek bulunmuştur.

Bu 2 CTX hastasının biyokimyasal parametreleri incelendiğinde ALT ve GGT düzeylerinin normal olduğu görülmektedir. Bu veriler Sasamura A ve ark.'nın CTX tanısı almış hasta ile yaptığı çalışma ile uyumluydu (229).

Her iki kardeşin anne-baba akrabalığı (hala-dayı çocukları) mevcuttu. 14 ve 17 yaşlarındaki kız kardeşlerin dış merkezde yapılan CYP27A1 geni kodlayan diziyeye ait ekzon 1-9 bölgelerinin dizi analizi sonucunda p.A216P (c.646 G>C) (rs201346271) mutasyonu homozigot olarak saptanmıştır. (Kodlayan dizinin 646. pozisyonunda Guanin nükleotiti Sitozine dönüşmüştür. Bu değişim proteinin 216. pozisyonunda Alanin aminoasiti yerine Prolin girmesine yol açmıştır. Bu mutasyon HGMD veri tabanında Serebrotendinöz ksantomatozis olarak bildirilmiştir. Her iki kardeş CTX tanısı alarak kenodeoksikolik asit başlanmıştır.

14 yaşında kız hastanın yapılan idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin 3-okzo-safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 0,99 µmol/mmolCr (%100) ve 3-okzo-safra asitleri

0,36 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%36,2) olarak bulundu. 3-okzo-safra asitlerinden sonra baskın olan safra asit türü 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -safra asitleri 0,30 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%30,2) grubuydu. Bu bulgu asidik/alternatif yolun sterol 27-hidroksilaz eksikliği nedeniyle bloke olduğunu ve üstünde bu 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitleri grubunun birikim yaptığını bize göstermektedir.

17 yaşındaki kız kardeşin yapılan idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 1,14 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100) ve klasik safra asitleri 0,74 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%64,8) olarak bulundu. Klasik safra asitlerinden sonra baskın olan safra asit türü 3-okzo-safra asitleri 0,25 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%21,6) grubuydu. Bu bulgu asidik/alternatif yolun sterol 27-hidroksilaz eksikliği nedeniyle bloke olduğunu ve üstünde bu 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitleri grubunun birikim yaptığını bize göstermektedir.

Diğer CTX hastası ile uyumlu olarak bu iki hastada da klasik/nötral yolda $3\alpha,7\alpha,12\alpha$ -kolestan- 5β -triol metabolitinin oluşumuna kadar reaksiyonlar gerçekleşir. Bu basamaklarda görev alan HSD3B7, CYP8B1 ve AKR1D1 enzimlerinin katalizi ile oluşan metabolitler idrarda tespit edilmiştir.

CTX hastalarının üçünde de toplam safra asitleri düşük bulunmuştur. Bunun nedeni sterol 27-hidroksilaz enzim eksikliğinde alternatif/asidik yolun tamamen bloke olması ve primer safra asit sentezinin sadece klasik yol üzerinden devam etmesidir (221).

Hidroksile safra asitleri, 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -safra asitleri ve 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitlerinin toplam safra asitlerine oranına bakıldığında 3 hastada da farklılık göstermektedir. İlk CTX hastamızda klasik safra asitlerinden sonra oransal olarak en fazla 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitleri yer almaktadır. Aynı gen bölgesinde homozigot mutasyona sahip olan CTX tanısı almış kardeşlerde ise 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -safra asitleri ve 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitlerinin toplam safra asitlerine oranı farklılık göstermektedir. Hidroksile safra asitleri ise 17 yaşındaki kardeşte tespit edilememiştir.

Hastalarda bu farklılığın nedeni sterol 27-hidroksilaz enzim basamağına kadar gerçekleşen reaksiyonlarda görev alan enzimlerin aktivitelerinin devam etmesi ve bireysel farklılıklar olabilir.

CTX tanısı almış hastaların plazma kolestanol düzeylerinin GC-MS yöntemi ile belirlendi. CTX tanısı almış 2 numaralı hastanın kolestanol düzeyi 7,95 µg/mL olarak tespit edildi. Bu değer sağlıklı kontrol verileri ile karşılaştırıldığında yüksekti. Bu hastanın dış merkezde yapılan kolestanol düzeyi ile karşılaştırıldığında bizim sonucumuz ile uyumlu olduğu görülmüştür.

CTX tanısı almış kardeşlerin plazma kolestanol düzeyleri ise sırasıyla 4,16 µg/mL ve 3,44 µg/mL olarak tespit edildi. Bu veriler de sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında yüksekti.

Sağlıklı bireylerde plazma kolestanol değerinin üst sınırının referans aralığının 7-11 µg/mL arasında değiştiği bildirilmiştir (230). Ancak kesin referans aralığı tanımlanmadığı için çalışmamızda sağlıklı kontrollerin plazma kolestanol düzeyleri dikkate alınmıştır.

Clayton ve ark. 2002 yılında 6 CTX tanısı almış hasta ile yaptıkları çalışmada plazma kolestanol değerleri yüksek bulunurken plazma kolesterol değerleri normal değerler arasında tespit edilmiştir. Bu çalışmada plazma kolestanol değerinin referans aralığı 3,3-12,5 µmol/L ve plazma kolesterol değerinin referans aralığı 2,6-5,2 mmol/L olarak belirlenmiştir (85). CTX hastalarında kolesterol plazmada normal veya düşük ve dokularda birikimi gözlenmektedir.

Çalışmaya dahil edilen 5 numaralı hasta 9 aylık bebektir. Hastanın hikayesi incelendiğinde doğduktan 2 gün sonra başlayan sarılık görülmektedir. Fototerapi verilmiş ancak fayda görülmemiş. 2019 yılında hastanemiz başvurusunda yapılan tetkiklerinde transaminazları yüksek saptanmış ancak karaciğer enzimlerinin yüksekliğine bağlı bir anormallik saptanmamıştır. Kısa süreli Ursofalk kullanılmış ancak faydası olmamış. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 120 U/L (<60); AST: 171 U/L (<56); GGT: 60 U/L (12-122); Direkt bilirubin: 3,60 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,53 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin: 3,49 mg/dL

(0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlemlendi. Hastanın ALT, AST, Direkt bilirubin ve Total bilirubin değerleri yüksekti. GGT referans değerler aralığındaydı. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 9,85 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 6,78 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%68,9), hidroksile safra asitleri 0,39 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%3,9), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 1,79 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%18,1) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,77 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%7,7) olarak bulundu. Oksisterol-7 α -hidroksilaz ile uyumlu olarak hastanın 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubunda monohidroksilli safra asidi yüksek gözlemlendi. Fakat primer ve sekonder safra asitlerinin varlığı nedeniyle safra asit metabolizma bozukluğu düşünülmemiştir.

Çalışmaya dahil edilen 6 numaralı hasta 5 aylık bebektir. Hasta beslenme sonrası kusma şikayetiyle hastanemize başvurmuş. Anne sütü ve mama ile besleniyormuş. Düzenli ursodeoksikolik asit (Ursoactive) tedavisi alan hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 69 U/L (<39); AST: 59 U/L (<56); GGT: 94 U/L (12-122); Direkt bilirubin: 0,20 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,41 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 0,61 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlemlendi. Hastanın klinik biyokimyasal verilerinde ALT ve AST değerleri dışında tüm değerleri referans aralığında olduğu tespit edildi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 47,87 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 46,07 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%96,3), hidroksile safra asitleri 0,16 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,3), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,36 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,7) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 1,28 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%2,7) olarak bulundu. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır. Ursodeoksikolik alımına bağlı olarak idrarda klasik safra asitleri çok yüksek düzeyde tespit edilmiştir.

Çalışmaya dahil edilen 7 numaralı hasta 12 yaşında erkektir. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 127 U/L (<39); AST: 53 U/L (<56); GGT: 58 U/L (3-22); Direkt bilirubin: 0,18 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,57 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 0,75 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlemlendi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin

klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 3,52 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 3,14 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%89,2), hidroksile safra asitleri 0,01 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,1), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,16 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%4,5) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,22 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%6,2) olarak bulundu. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 9 numaralı hasta 8 aylık bebektir. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 86 U/L (<39); AST: 281 U/L (<56); GGT: 66 U/L (1-39); Direkt bilirubin: 17,98 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 7,09 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 25,07 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlemlendi. Hastanın bütün biyokimyasal verilerinin yüksek olduğu tespit edildi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 60,99 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 59,56 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%97,7), hidroksile safra asitleri 0,59 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,9), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,17 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,3) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,68 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%1,1) olarak bulundu. Hastanın yüksek bulunan GUDCA değerinin ursodeoksikolik asit alımına bağlı olduğu düşünüldü. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 10 numaralı hasta 1 yaşında bebektir. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 67 U/L (<39); AST: 164 U/L (<56); GGT: 40 U/L (4-22); Direkt bilirubin: 3,11 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 2,31 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin 5,42 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlemlendi. Hastanın bütün biyokimyasal değerlerinin yüksek olduğu tespit edildi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 113,37 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 112,67 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%99,4), hidroksile safra asitleri 0,23 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,2) 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,15 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,1) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,33 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,3) olarak bulundu. Hastanın yüksek bulunan GUDCA değerinin ursodeoksikolik asit alımına bağlı olduğu düşünüldü. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 11 numaralı hasta 8 yaşındaydı. Hasta karın ağrısı şikayetiyle 2019 yılında hastanemize başvurmuş ve kabızlık tanısı konulmuş. Karın ağrısı, ishal, mide bulantısı, kusma şikayeti olmayan hasta Dulcosoft tedavisi başlanmış. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 16 U/L (<39); AST: 31 U/L (<56); GGT: 12 U/L (4-22); Direkt bilirubin: 0,20 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 1,12 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin: 1,32 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlendi. Hastanın biyokimyasal değerlerine bakıldığında bütün değerlerin referans aralığında olduğu tespit edildi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 0,27 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100) olarak çok düşük değerde tespit edildi. Klasik safra asitleri 0,23 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%83,8), hidroksile safra asitleri 0,01 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%3), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,01 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%1,8) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,03 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%11,4) olarak bulundu. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 12 numaralı hasta 1 yaşında bebektir. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 83 U/L (<39); AST: 190 U/L (<56); GGT: 295 U/L (4-22); Direkt bilirubin: 0,28 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 0,54 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin: 0,82 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlendi. Hastanın ALT, AST ve GGT değerlerinin yüksek olduğu tespit edildi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 30,69 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 29,30 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%95,5), hidroksile safra asitleri 0,76 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%2,4), 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,53 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%1,7) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,09 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,3) olarak bulundu. Hastanın yüksek bulunan GUDCA değerinin ursodeoksikolik asit alımına bağlı olduğu düşünüldü. Hastada safra asit sentez bozukluğuna ilişkin belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Çalışmaya dahil edilen 13 numaralı hasta 4 aylık bebektir. Hasta annenin 2. hamileliğinden ikiz eşi olarak 37 haftalık olarak doğmuş. Doğum sonrası bir sorunu olmamış. Sarılık ilk günlerde görülmüş. Annenin hamileliğinin son ayında kaşıntısı

şikayeti olmuş. Ailede karaciğer hastalığı öyküsü yok. Anne-baba akrabalığı yok. Ursodeoksikolik asit tedavisi başlanmış ve idrar safra asit analizi için kesilmiş. Hastanın klinik biyokimya değerleri ALT: 250 U/L; AST: 469 U/L; GGT: 46 U/L; Direkt bilirubin: 4,0 mg/dL (0-0,2 mg/dL); İndirekt bilirubin: 4,6 mg/dL (0-1,2 mg/dL) ve Total bilirubin: 8,6 mg/dL (0,3-1,2 mg/dL) olarak gözlendi. Yaptığımız idrar safra asitlerinin LC-MS/MS analizi sonucunda baskın olan safra asit profilinin klasik safra asitleri olduğu tespit edildi. Hastanın toplam safra asit değeri 3,28 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%100), klasik safra asitleri 1,26 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%38,4), hidroksile safra asitleri 1,56 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%47,5), 3β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri 0,02 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%0,7) ve 3-okzo- Δ 4-safra asitleri 0,44 $\mu\text{mol}/\text{mmolCr}$ (%13,4) olarak bulundu. Hastada hidroksile safra asitleri ve klasik safra asitleri yakın değerlerde tespit edilmiştir. Bu hastada da safra asit sentez bozukluğuna ilişkin belirgin bir bulguya rastlanmamıştır.

Hastaların idrar safra asit profilleri IEBAS tanısında önemli bir belirteçtir. Çünkü safra asit sentezinde bozukluk alışılmadık ara metabolitlerin idrarda birikmesine neden olur. Safra asit profilleri incelendiğinde baskın safra asidi türleri ve biyokimyasal sunum birlikte değerlendirilmelidir. Bu nedenle daha kapsamlı ve doğru tanı için çalışmamızda 68 farklı safra asidi standartları kullanılarak yeni olası biyobelirteçlerin belirlenmesine çalışılmıştır. IEBAS tanısına yaklaşımda safra asit gruplarının yüzde oranı ve yüksek yüzdeli grupların yükselen safra asit metabolitlerini değerlendirmek önemlidir.

Kontrol grubundaki sağlıklı bireyler ile hastaların ALT, AST, Direkt bilirubin, İndirekt bilirubin, Total bilirubin değerleri karşılaştırıldığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur. p değerleri hepsinde $<0,001$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar kolestaz hastalarının klinik sunumunda belirtilen sonuçlarla uyumluluk göstermektedir.

Kontrol grubundaki bireyler ile çalışmaya dahil edilen hastaların GGT düzeyleri istatistiksel olarak değerlendirmeye alınmamıştır. Çünkü nedeni bilinmeyen kolestaz tanısı almış hastaların biyokimyasal parametrelerine bakıldığında α -Metilaçil-KoA rasemaz eksikliği hariç, tanımlanan tüm bozuklukların klinik sunumunda GGT düzeylerinin referans aralığında olduğu belirtilmiştir (83).

Hastalar ile kontrol grubundaki sağlıklı bireylerin klasik safra asitleri, hidroksile safra asitleri, 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -safra asitleri ve 3-okzo- $\Delta 4$ -safra asitleri arasında anlamlı fark olduğu bulunmuştur. p değerleri sırasıyla $<0,001$; $<0,001$; $<0,002$; $<0,001$ olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar enzim eksikliğinin bir sonucu olarak idrarda bu ara metabolitlerin varlığının tespit edilmesiyle açıklanmaktadır. Sağlıklı bireylerin idrarında bulunmayan bu ara metabolitler tanı almış hastaların idrarında tespit edilmiştir ve bu beklenen bir sonuçtur.

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin kolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,570$). Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin 5α -kolestanol değerleri arasında anlamlı bir fark olmadığı bulunmuştur ($p=0,099$). CYP27A1 enzimindeki bozukluk asidik/alternatif yolu tamamen bloke ederken klasik/nötral yolda oluşan 7α -hidroksi-4-kolesten-3-one metaboliti 5α -kolestanole dönüştürülür ve kolesterol ile birlikte dokularda (ve ksantomalarda) birikir plazmada yüksek düzeyleri tespit edilir (99,95,96). Hastalarımızın tedavi sürecinde olmaları ve tedaviye verdikleri yanıtta bireysel farklılıkların olması sonuçlarımızı etkilemiştir. Ayrıca sadece CTX tanısı almış hastaların plazmalarında biriken bu metabolitlerin diğer hastalarda tespit edilememesi ve çalışmamızda CTX tanısı alan üç hastanın bulunması nedeniyle kontrol grubundaki bireyler ile hastalar arasında fark bulunamamıştır.

Kolestaz tanısı almış hastalar ile sağlıklı bireylerin 7-dehidrokolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur ($p=0,008$). 7-dehidrokolesterol sadece klasik/nötral yolda kolesterol 7α -hidroksilaz enzimi aracılığıyla sentezlenir ve 3β -hidroksi- $\Delta 5$ -C27-steroid dehidrogenaz (3β -HSD) enzimi ile 7α -hidroksi-4-kolesten-3-one oluşur. CTX hastalarından farklı olarak kolesterol 7α -hidroksilaz (CYP7A1) eksikliği dışında diğer hastaların kanında tespit edilebilir. Bu nedenle kontrol grubu ile hastaların 7-dehidrokolesterol değerleri arasında anlamlı bir fark olduğu bulunmuştur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Nedeni açıklanamayan kolestaz, karaciğer yetmezliği, nörolojik semptomları, normal GGT, normal veya artmış transaminaz ve direkt bilirubin düzeylerine sahip 13 hastanın safra asit sentez yollarında bozuklukları tanımlayabilmek ve olası biyobelirteçleri belirleyebilmek için idrar örneklerinde 68 farklı safra asit metaboliti ve kan örneklerinde kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol düzeyleri hedefli kütle spektrometri yöntemleri (LC-MS/MS ve GC-MS) kullanılarak araştırılmıştır.

3 β -hidroksi-HSD tanısı almış safra asidi replasman tedavisi kesilmiş hastada 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubu yüksek olarak gözlenmiştir. Bu grupta yer alan Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂-3S (14,549 μ mol/mmolCr), G- Δ^5 -3 β ,7 α -(OH)₂ (4,394 μ mol/mmolCr) ve Δ^5 -3 β ,7 α ,12 α -(OH)₃ (1,816 μ mol/mmolCr) ara metabolitlerinin yüksek seviyeleri tespit edilmiştir. Δ 5-dihidroksi- ve trihidroksi-, 3. karbondan sülfatlanmış, konjuge ve konjuge olmayan C₂₄ safra asitleri ve majör gliko ve tauro-kenodeoksikolik asitler ile gliko- ve tauro-deoksikolik asitlerin 3. karbondan sülfatlanmış formları çok yüksek bulunmuştur. 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubu başta olmak üzere tanımlanan metabolitler 3 β -hidroksi-HSD tanısında safra asidi replasman tedavisi başlanmadan önce biyobelirteçler olarak kullanılabilir.

Oksisterol-7 α -hidroksilaz eksikliği tanısı düşünülen hastanın 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri grubunda yer alan monohidroksi safra asitlerinin di- ve trihidroksi safra asitlerine göre daha yüksek olduğu ve yüksek kan 7-dehidrokolesterol görülmektedir. 3 β pozisyonundan hidroksillenmiş monohidroksi safra asidi metabolitleri ve kan 7-dehidrokolesterol safra asidi replasman tedavisi başlanmadan önce biyobelirteçler olarak kullanılabilir.

Sterol 27-hidroksilaz eksikliğinde hidroksile safra asitleri, 3-okzo- Δ 4-safra asitleri ve 3 β -hidroksi- Δ 5-safra asitleri safra asidi replasman tedavisi başlanmadan önce biyobelirteçler olarak kullanılabilir. Safra alkollerini yüksek gözlenmektedir. Kan kolestanol yüksekliği tanıda değerlidir.

İdrarda GUDCA düzeyi safra asidi replasman tedavisi (kenodeoksikolik asit) kullanımına bağlı olarak yüksek gözlenir. IEBAS tanısına yaklaşımda idrar safra asitleri analizi öncesi safra asidi replasman tedavisinin kesilmesi önemlidir.

Sterol 27-hidroksilaz eksikliğinde ayrıca sentez yolundaki ara metabolitlerden kolestanol ve 7-dehidrokolesterolün plazma seviyeleri tedavi öncesinde biyobelirteç olarak kullanılabilir.

IEBAS tanısına yaklaşımda idrar ile atılan safra asit gruplarının yüzde oranı ve yüksek yüzdeli grupların yükselen safra asit ara metabolitlerini değerlendirmek önemlidir.

Klinik durumun göstergesi olan biyokimyasal parametreler ile birlikte idrar safra asit metabolitleri ve kan metabolitleri hastalığın ilerlemesi veya tedaviye yanıt olarak zamanla değişmektedir. Bu nedenle, mevcut durumun teşhisi, hastalığın başlangıcında en uygun terapötik stratejiyi seçmek için gereklidir. Hastanın durumundaki değişikliklere bağlı olarak idrar safra asitleri ve kan kolestanol, 7-dehidrokolesterol düzeylerinin biyokimyasal parametreler ile birlikte aralıklarla değerlendirilmesi de gerekmektedir.

Safra asit sentez yollarının bozukluklarının ve özellikle ilgili basamakta görevli enzim bozukluklarını öngörmede idrarda safra asidi metabolitlerinin ve kan kolesterol, kolestanol ve 7-dehidrokolesterol düzeylerinin hedefli kütle spektrometri analizleri ile incelenmesi etkin bir yöntemdir.

7. KAYNAKLAR

1. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1035-78.
2. Mazuy C, Helleboid A, Staels B, Lefebvre P. Nuclear bile acid signaling through the farnesoid X receptor. *Cell Mol Life Sci*. 2015;72(9):1631-1650.
3. Eggert T, Bakonyi D, Hummel W. Enzymatic routes for the synthesis of ursodeoxycholic acid. *J Biotechnol*. 2014;191(10):11-21.
4. Li T, Chiang JY. Bile acid signaling in metabolic disease and drug therapy. *Pharmacol Rev*. 2014;66(4):948-983.
5. Russell DW. The enzymes, regulation, and genetics of bile acid synthesis. *Annu Rev Biochem*. 2003;72:137-174.
6. Chiang JY. Bile acid metabolism and signaling. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1191-212.
7. Thomas C, Pellicciari R, Pruzanski M, Auwerx J, Schoonjans K. Targeting bile-acid signalling for metabolic diseases. *Nat Rev Drug Discov*. 2008;7(8):678-693.
8. Yin S, Su M, Xie G, Li X, Wei R, Liu C, et al. Factors affecting separation and detection of bile acids by liquid chromatography coupled with mass spectrometry in negative mode. *Anal Bioanal Chem*. 2017;409(23):5533-5545.
9. Hofmann AF. The continuing importance of bile acids in liver and intestinal disease. *Arch Intern Med* 1999;159(22):2647-2658.
10. Arab JP, Cabrera D, Arrese M. Bile acids in cholestasis and its treatment. *Ann Hepatol*. 2017;16(1):53-57.
11. Taguchi K, Fukusaki E, Bamba T. Simultaneous and rapid analysis of bile acids including conjugates by supercritical fluid chromatography coupled to tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2013(1299):103-109.
12. Mil SWC, Houwen R and Klomp L. Genetics of familial intrahepatic cholestasis syndromes. *J Med Genet*. 2005;42(6):449-463.
13. Scholmerich J, Becher MS, Schmidt K, Schubert R, Kremer B, Feldhaus S, et al. Influence of hydroxylation and conjugation of bile salts on their membrane-damaging properties-studies on isolated hepatocytes and lipid membrane vesicles. *Hepatology* 1984;4(4):661-666.
14. Hofmann AF. The enterohepatic circulation of bile acids in mammals: form and functions. *Front Biosci*. 2009;14(1):2584-2598.
15. Li T, Chiang JYL. Nuclear receptors in bile acid metabolism. *Drug Metab Rev*. 2013;45(1):145-155.
16. Borelli G. 1681. *De Motu animalium, Pars altera*. Angeli Bernabo, Rome. English translation by P. Gosse, The Hague, Netherlands. 1743. Reprinted in 1989 by Springer, Berlin. 354-364.

17. Chiang JYL. Bile acid metabolism and signaling in liver disease and therapy. *Liver Res.* 2017;1(1):3-9.
18. Zhou H, Hylemon PB. Bile acids are nutrient signaling hormones. *Steroids.* 2014;86:62-68.
19. Chiang JYL. Regulation of bile acid synthesis. *Front Biosci.* 1998;3:176-193.
20. Li T, Francl JM, Boehme S, Chiang JY. Regulation of cholesterol and bile acid homeostasis by the cholesterol 7 α -hydroxylase/steroid response element-binding protein 2/microRNA-33a axis in mice. *Hepatology.* 2013;58(3):1111-1121.
21. Chiang JY. Regulation of bile acid synthesis: pathways, nuclear receptors, and mechanisms. *J Hepatol.* 2004;40(3):539-551.
22. Norlin, M, Wikvall K. Enzymes in the conversion of cholesterol into bile acids. *Curr Mol Med.* 2007;7(2):199-218.
23. Zhang M, Chiang JY. Transcriptional regulation of the human sterol 12 α -hydroxylase gene (CYP8B1): roles of hepatocyte nuclear factor 4 α in mediating bile acid repression. *J Biol Chem.* 2001;276(45):41690-41699.
24. Vaz FM, Ferdinandusse S. Bile acid analysis in human disorders of bile acid biosynthesis. *Mol Aspects Med.* 2017;56:10-24.
25. Russell DW, Setchell KD. Bile acid biosynthesis. *Biochemistry.* 1992;26;31(20):4737-4749.
26. Fuchs M. Bile acid regulation of hepatic physiology: III. Regulation of bile acid synthesis: past progress and future challenges. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2003;284(4):551-557.
27. Björkhem I, Leoni V, Meaney S. Genetic connections between neurological disorders and cholesterol metabolism. *J Lipid Res.* 2010;51(9):2489-2503.
28. Insull W Jr. Clinical utility of bile acid sequestrants in the treatment of dyslipidemia: a scientific review. *South Med J.* 2006;99(3):257-273.
29. Lefebvre P, Cariou B, Lien F, Kuipers F, Staels B. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation. *Physiol Rev.* 2009;89(1):147-191.
30. Claudel T, Staels B, Kuipers F: The farnesoid X receptor: a molecular link between bile acid and lipid and glucose metabolism. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(10):2020-2030.
31. Pullinger CR, Eng C, Salen G, Shefer S, Batta AK, Erickson SK, et al. Human cholesterol 7 α -hydroxylase (CYP7A1) deficiency has a hypercholesterolemic phenotype. *J Clin Invest.* 2002;110(1):109-117.
32. Ashby K, Navarro Almarino EE, Tong W, Borlak J, Mehta R, Chen M. Review article: therapeutic bile acids and the risks for hepatotoxicity. *Aliment Pharmacol Ther.* 2018;47(12):1623-1638.
33. Hubbard B, Doege H, Punreddy S, Wu H, Huang X, Kaushik VK, et al. Mice deleted for fatty acid transport protein 5 have defective bile acid conjugation and are protected from obesity. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1259-1269.

34. Axelson M, Aly A, Sjövall J. Levels of 7 alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in plasma reflect rates of bile acid synthesis in man. *FEBS Lett.* 1988;239(2):324-328.
35. Kannenberg F, Ellinghaus P, Assmann G, and Seedorf U. Aberrant oxidation of the cholesterol side chain in bile acid synthesis of sterol carrier protein-2/sterol carrier protein-x knockout mice. *J Biol Chem.* 1999;274(50):35455-35460.
36. Honda A, Yamashita K, Numazawa M, Ikegami T, Doy M, Matsuzaki Y, et al. Highly sensitive quantification of 7alpha-hydroxy-4-cholesten-3-one in human serum by LC-ESI-MS/MS. *J Lipid Res.* 2007;48(2):458-464.
37. Chiang JYL, Ferrell JM. Bile Acid Metabolism in Liver Pathobiology. *Gene Expr.* 2018;18(2):71-87.
38. Ellis EC. Suppression of bile acid synthesis by thyroid hormone in primary human hepatocytes. *World J Gastroenterol.* 2006;7;12(29):4640-4645.
39. Chiang JY. Bile acids: regulation of synthesis. *J Lipid Res.* 2009;50(10):1955-1966.
40. Solaas K, Ulvestad A, Söreide O, Kase BF. Subcellular organization of bile acid amidation in human liver: a key issue in regulating the biosynthesis of bile salts. *J Lipid Res.* 2000;41(7):1154-1162.
41. Chen M, Penning TM. 5 β -Reduced steroids and human $\delta(4)$ -3-ketosteroid 5 β -reductase (AKR1D1). *Steroids.* 2014;83:17-26.
42. Chiang JY. Negative feedback regulation of bile acid metabolism: impact on liver metabolism and diseases. *Hepatology.* 2015;62(4):1315-7.
43. Mihalik SJ, Steinberg SJ, Pei Z, Park J, Kim do G, Heinzer AK, et al. Participation of two members of the very long-chain acyl-CoA synthetase family in bile acid synthesis and recycling. *J Biol Chem.* 2002;277(27):24771-24779.
44. Schwarz M, Russell DW, Dietschy JM, Turley SD. Alternate pathways of bile acid synthesis in the cholesterol 7alpha-hydroxylase knockout mouse are not upregulated by either cholesterol or cholestyramine feeding. *J Lipid Res.* 2001;42(10):1594-1603.
45. Axelson M, Sjövall J. Potential bile acid precursors in plasma-possible indicators of biosynthetic pathways to cholic and chenodeoxycholic acids in man. *J Steroid Biochem.* 1990;36(6):631-640.
46. Anderson KE, Kok E, Javitt NB. Bile acid synthesis in man: metabolism of 7 α -hydroxycholesterol-14C and 26-hydroxycholesterol-3H. *J Clin Invest.* 1972;51(1):112-117.
47. Stravitz RT, Vlahcevic Z, Russell TL, Heizer ML, Avadhani NG, Hylemon PB. Regulation of sterol 27-hydroxylase and an alternative pathway of bile acid biosynthesis in primary cultures of rat hepatocytes. *J Steroid Biochem Mol. Biol.* 1996;57(5-6):337-347.

48. Hylemon PB, Zhou H, Pandak WM, Ren S, Gil G, Dent P. Bile acids as regulatory molecules. *J Lipid Res.* 2009;50(8):1509-1520.
49. Fabiani ED, Mitro N, Anzulovich AC, Pinelli A, Galli G, Crestani M. The negative effects of bile acids and tumor necrosis factor- α on the transcription of cholesterol 7 α -hydroxylase gene (CYP7A1) converge to hepatic nuclear factor-4. A novel mechanism of feedback regulation of bile acid synthesis mediated by nuclear receptors. *J Biol Chem.* 2001;276(33):30708-30716.
50. Björkhem I, Diczfalusy U. Oxysterols: friends, foes, or just fellow passengers? *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002;22(5):734-742.
51. Kevresan S, Kuhajda K, Kandrac J, Fawcett JP, Mikov M. Biosynthesis of bile acids in mammalian liver. *Eur J Drug Metab Pharmacokinet.* 2006;31(3):145-156.
52. Lawson AM, Setchell KDR. *Mass Spectrometry.* Setchell KDR, Kritchevsky D, Nair PP, editors. *The Bile Acids: Chemistry, Physiology, and Metabolism.* Berlin, Germany: Walter de Gruyter;1988.
53. Pandak WM, Ren S, Marques D, Hall E, Redford K, Mallonee D, et al. Transport of cholesterol into mitochondria is rate-limiting for bile acid synthesis via the alternative pathway in primary rat hepatocytes. *J. Biol. Chem.* 2002;277(50):48158-48164.
54. Li X, Hylemon P, Pandak WM, Ren S. Enzyme activity assay for cholesterol 27-hydroxylase in mitochondria. *J Lipid Res.* 2006;47(7):1507-1512.
55. Li X, Pandak WM, Erickson SK, Ma Y, Yin L, Hylemon P, et al. Biosynthesis of the regulatory oxysterol, 5-cholesten-3 β ,25-diol 3-sulfate, in hepatocytes. *J Lipid Res.* 2007;48(12):2587-2596.
56. Cali JJ, Russell DW. Characterization of human sterol 27-hydroxylase. A mitochondrial cytochrome P-450 that catalyzes multiple oxidation reaction in bile acid biosynthesis. *J Biol Chem.* 1991;266(12):7774-7778.
57. Chiang JY. Recent advances in understanding bile acid homeostasis. *F1000 Res.* 2017;6:2029.
58. Sarenac T, Mikov M. Biosynthesis and Biotransformation of Bile Acids. *Hosp Pharmacol Int Multydiscip.* 2017;4(1):469-485.
59. Lavoie JM. Dynamics of hepatic and intestinal cholesterol and bile acid pathways: the impact of the animal model of estrogen deficiency and exercise training. *World J Hepatol.* 2016;8(23):961-975.
60. Javitt NB, Kok E, Carubbi F, Blizzard T, Gut M, Byon CY. Bile acid synthesis. Metabolism of 3 beta-hydroxy-5-cholenoic acid to chenodeoxycholic acid. *J Biol Chem.* 1986;261(27):12486-12489.
61. Nakagawa M, Setchell KD. Bile acid metabolism in early life: studies of amniotic fluid. *J Lipid Res.* 1990;31(6):1089-1098.
62. Setchell KD, Dumaswala R, Colombo C, Ronchi M. Hepatic bile acid metabolism during early development revealed from the analysis of human fetal gallbladder bile. *J Biol Chem.* 1988;263(32):16637-16644.

63. Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Hauser S, Tint GS, Salen G, et al. 25 hydroxylation pathway of cholic acid biosynthesis in man and rat. *J Clin Invest.* 1976;57(4):897-903.
64. Salen G, Shefer S, Cheng FW, Dayal B, Batta AK, Tint GS. Cholic acid biosynthesis: the enzymatic defect in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest.* 1979;63(1):38-44.
65. Bove K, Daugherty CC, Tyson W, Heubi JE, Balistreri WF, Setchell KDR. Bile acid synthetic defects and liver disease. *Pediatr and Dev Pathol.* 2000;3:1-16.
66. Sundaram SS, Bove KE, Lovell MA, Sokol RJ. Mechanisms of disease: inborn errors of bile acid synthesis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol.* 2008;5(8):456-468.
67. Bove KE, Heubi JE, Balistreri WF, Setchell KD. Bile acid synthetic defects and liver disease: a comprehensive review. *Pediatr Dev Pathol.* 2004;7(4):315-334.
68. Hanson RF, Williams GC, Hachey D, Sharp HL. Hepatic lesions and hemolysis following administration of 3alpha, 7alpha, 12alpha-trihydroxy-5beta-cholestan-26-oyl taurine to rats. *J Lab Clin Med.* 1977;90(3):536-548.
69. Mathis RK, Watkins JB, Szczepanik-Van Leeuwen P, Lott IT. Liver in the cerebro-hepato-renal syndrome: defective bile acid synthesis and abnormal mitochondria. *Gastroenterology* 1980;79(6):1311-1317.
70. Stieger B, Zhang J, O'Neill B, Sjövall J, Meier PJ. Transport of taurine conjugates of 7alpha-hydroxy-3-oxo-4-cholenoic acid and 3beta,7alpha-dihydroxy-5-cholenoic acid in rat liver plasma membrane vesicles. *Cholestatic Liver Diseases.* 1994;82-87.
71. Stieger B, Zhang J, O'Neill B, Sjövall J, Meier PJ. Differential interaction of bile acids from patients with inborn errors of bile acid synthesis with hepatocellular bile acid transporters. *Eur J Biochem.* 1997;244(1):39-44.
72. Setchell KD, Heubi JE. Defects in bile acid biosynthesis-diagnosis and treatment. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2006;43(1):17-22.
73. Faust PL, Banka D, Siriratsivawong R, Ng VG, Wikander TM. Peroxisome biogenesis disorders: the role of peroxisomes and metabolic dysfunction in developing brain. *J Inherit Metab Dis.* 2005;28(3):369-383.
74. Jankowska I, Socha P. Progressive familial intrahepatic cholestasis and inborn errors of bile acid synthesis. *Clin Res Hepatol Gastroenterol.* 2012;36(3):271-274.
75. Taranto MD, Gelzo M, Giacobbe C, Gentile M, Marotta G, Savastano S, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis, a metabolic disease with different neurological signs: two case reports. *Metab Brain Dis.* 2016;31(5):1185-1188.
76. Mignarri A, Gallus GN, Dotti MT, Federico A. A suspicion index for early diagnosis and treatment of cerebrotendinous xanthomatosis. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(3):421-429.

77. Nie S, Chen G, Cao X, Zhang Y. Cerebrotendinous xanthomatosis: a comprehensive review of pathogenesis, clinical manifestations, diagnosis, and management. *Orphanet J Rare Dis.* 2014;9:179.
78. Clayton PT. Disorders of bile acid synthesis. *J Inherit Metab Dis.* 2011; 34(3):593-604.
79. Craigen WJ. Disorders of bile acid synthesis. In: Kline MW, editor. *Rudolph's Pediatrics.* 23rd ed. New York, NY: McGraw-Hill Education; 2018.
80. Donazzolo E, Gucciardi A, Mazzier D, Peggion C, Pirillo P, Naturale M, et al. Improved synthesis of glycine, taurine and sulfate conjugated bile acids as reference compounds and internal standards for ESI-MS/MS urinary profiling of inborn errors of bile acid synthesis. *Chem Phys Lipids.* 2017;204:43-56.
81. Zhang W, Jha P, Wolfe B, Gioiello A, Pellicciari R, Wang J, et al. Tandem mass spectrometric determination of atypical 3β -hydroxy- $\delta 5$ -bile acids in patients with 3β -hydroxy- $\delta 5$ -C27-steroid oxidoreductase deficiency: Application to diagnosis and monitoring of bile acid therapeutic response. *Clin Chem.* 2015;61(7):955-963.
82. Hussaini AA, Setchell KDR, AlSaleem B, Heubi JE, Lone K, Davit-Spraul A, et al. Bile Acid Synthesis Disorders in Arabs: A 10-year Screening Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017;65(6):613-620.
83. Lemonde HA, Gissen P, Clayton PT. Disorders of Bile Acid Synthesis and Biliary Transport. Blau N, Duran M, Gibson KM, Dionisi-Vici C, editors. *Physician's Guide to the Treatment and Follow-Up of Metabolic Diseases.* Springer-Verlag Berlin Heidelberg; 2014.
84. Rosen H, Reshef A, Maeda N, Lippoldt A, Shpizen S, Triger L, et al. Markedly reduced bile acid synthesis but maintained levels of cholesterol and vitamin D metabolites in mice with disrupted sterol 27- hydroxylase gene. *Journal of Biological Chemistry.* 1998;273(249):14805-14812.
85. Clayton PT, Verrips A, Sistermans E, Mann A, Mieli-Vergani G, Wevers R. Mutations in the sterol 27-hydroxylase gene (CYP27A) cause hepatitis of infancy as well as cerebrotendinous xanthomatosis. *J Inherit Metab Dis.* 2002;25(6):501-513.
86. Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GC, Theelen JP, Wevers RA, Gabreëls FJ, et al. Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain* 2000;123(5):908-919.
87. Lee M, Hazard S, Carpten JD, Yi S, Cohen J, Gerhardt GT, et al. Fine-mapping, mutation analyses, and structural mapping of cerebrotendinous xanthomatosis in U.S. pedigrees. *J Lipid Res.* 2001;42(2):159-169.
88. Salen G, Shefer S, Berginer VM. Familial diseases with storage of sterols other than cholesterol: cerebrotendinous xanthomatosis and sitosterolemia with xanthomatosis. In: Stanbury JB, Wyngaarden JB, Fredrickson DS, Goldstein JL, Brown MS, editors. *The metabolic basis of inherited disease.* 5th ed. New York, NY: McGraw-Hill. 1983:713-730.

89. Waldman AT, Percy AK. In: Cerebrotendinous xanthomatosis. Up To Date. Wolter Kluwer, Alphen aan den Rijn, Netherlands, 2016.
90. Van Heijst AF, Verrips A, Wevers RA, Cruysberg JR, Renier WO, Tolboom JJ. Treatment and follow-up of children with cerebrotendinous xanthomatosis. *Eur J Pediatr.* 1998;157(4):313-316.
91. Berginer VM, Gross B, Morad K, Kfir N, Morkos S, Aaref S, et al. Chronic diarrhea and juvenile cataracts: think cerebrotendinous xanthomatosis and treat. *Pediatrics.* 2009;123(1):143-147.
92. Yahalom G, Tsabari R, Molshatzki N, Ephraty L, Cohen H, Hassin-Baer S. Neurological outcome in cerebrotendinous xanthomatosis treated with chenodeoxycholic acid: early versus late diagnosis. *Clin Neuropharmacol.* 2013;36(3):78-83.
93. Leitersdorf E, Safadi R, Meiner V, Reshef A, Björkhem I, Friedlander Y, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis in the Israeli Druze: molecular genetics and phenotypic characteristics. *Am J Hum Genet.* 1994;55(5):907-15.
94. Inoue K, Kubota S, Seyama Y. Cholesterol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1999;256(1):198-203.
95. Seyama Y. Cholesterol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications. *J Med Food.* 2003;6(3):217-24.
96. Chen W, Suruga KN, Ishimura N, Gouda T, Lam VN, Yokogoshi H. Comparative regulation of major enzymes in the bile acid biosynthesis pathway by cholesterol, cholate and taurine in mice and rats. *Life Sciences.* 2005;77(7):746-757.
97. Shimazu K, Kuwabara M, Yoshii M, Kihira K, Takeuchi H, Nakano I, et al. Bile alcohol profiles in bile, urine, and feces of a patient with cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biochem.* 1986;99(2):477-483.
98. Batta AK, Salen G, Shefer S, Tint GS, Batta M. Increased plasma bile alcohol glucuronides in patients with cerebrotendinous xanthomatosis: effect of chenodeoxycholic acid. *J Lipid Res.* 1987;28(8):1006-1012.
99. Menkes JH, Schimschock JR, Swanson PD. Cerebrotendinous xanthomatosis. The storage of cholesterol within the nervous system. *Arch Neurol.* 1968;19(1):47-53.
100. Salen G, Steiner RD. Epidemiology, diagnosis, and treatment of cerebrotendinous xanthomatosis (CTX). *J Inherit Metab Dis.* 2017;40(6):771-781.
101. Salen G. Cholesterol deposition in cerebrotendinous xanthomatosis. A possible mechanism. *Ann Intern Med.* 1971;75(6):843-851.
102. Salen G, Grundy SM. The metabolism of cholesterol, cholesterol, and bile acids in cerebrotendinous xanthomatosis. *J Clin Invest.* 1973;52(11):2822-2835.

103. Salen G, Meriwether TW, Nicolau G. Chenodeoxycholic acid inhibits increased cholesterol and cholestanol synthesis in patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Biochem Med.* 1975;14(1):57-74.
104. Berginer VM, Salen G, Shefer S. Long-term treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with chenodeoxycholic acid. *N Engl J Med.* 1984;311(26):1649-1652.
105. Salen G, Berginer V, Shore V, Horak I, Horak E, Tint GS, et al. Increased concentrations of cholestanol and apolipoprotein B in the cerebrospinal fluid of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *N Engl J Med.* 1987;316(20):1233-1238.
106. Oftebro H, Björkhem I, Skrede S, Schreiner A, Pederson JI. Cerebrotendinous xanthomatosis: a defect in mitochondrial 26-hydroxylation required for normal biosynthesis of cholic acid. *J Clin Invest.* 1980;65(6):1418-1430.
107. Cali JJ, Hsieh CL, Francke U, Russell DW. Mutations in the bile acid biosynthetic enzyme sterol 27-hydroxylase underlie cerebrotendinous xanthomatosis. *J Biol Chem.* 1991;266(12):7779-7783.
108. Jiao H, Olin M, Hansson M, Eggertsen G, Eriksson M, Angelin B, et al. Unique case of cerebrotendinous xanthomatosis revisited: all the mutations responsible for this disease are present in the CYP27A1 gene. *J Intern Med.* 2018;283(6):604-606.
109. van Bogaert L, Scherer HJ, Epstein E. In: *Une forme cérébrale de la cholestérinose généralisée.* Masson et Cie, Paris, 1937.
110. Appadurai V, DeBarber A, Chiang PW, Patel SB, Steiner RD, Tyler C, et al. Apparent underdiagnosis of Cerebrotendinous Xanthomatosis revealed by analysis of ~60,000 human exomes. *Mol Genet Metab.* 2015;116(4):298-304.
111. Sekijima Y, Koyama S, Yoshinaga T, Koinuma M, Inaba Y. Nationwide survey on cerebrotendinous xanthomatosis in Japan. *J Hum Genet.* 2018;63(3):271-280.
112. Buchmann MS, Kvittingen EA, Nazer H, Gunasekaran T, Clayton PT, Sjövall J, et al. Lack of 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase in fibroblasts from a child with urinary excretion of 3 beta-hydroxy-delta 5-bile acids. A new inborn error of metabolism. *J Clin Invest.* 1990;86(6):2034-2037.
113. Clayton PT, Leonard JV, Lawson AM, Setchell KD, Andersson S, Egestad B, et al. Familial giant cell hepatitis associated with synthesis of 3 beta, 7 alpha-dihydroxy-and 3 beta,7 alpha, 12 alpha-trihydroxy-5-cholenoic acids. *J Clin Invest.* 1987;79(4):1031-8.
114. Ichimiya H, Egestad B, Nazer H, Baginski ES, Clayton PT, Sjoval J. Bile acids and bile alcohols in a child with hepatic 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency: effects of chenodeoxycholic acid treatment. *J Lipid Res.* 1991;32(5):829-841.
115. Jacquemin E, Setchell KD, O'Connell NC, Estrada A, Maggiore G, Schmitz J, et al. A new cause of progressive intrahepatic cholestasis: 3 beta-hydroxy-

- C27-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency. *J Pediatr*. 1994;125(3):379-384.
116. Cheng JB, Jacquemin E, Gerhardt M, Nazer H, Cresteil D, Heubi JE, et al. Molecular genetics of 3beta-hydroxy-Delta5-C27-steroid oxidoreductase deficiency in 16 patients with loss of bile acid synthesis and liver disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2003;88(4):1833-1841.
 117. Subramaniam P, Clayton PT, Portmann BC, Mieli-Vergani G, Hadzic N. Variable clinical spectrum of the most common inborn error of bile acid metabolism—3beta-hydroxy-Delta 5-C27-steroid dehydrogenase deficiency. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2010;50(1):61-66.
 118. Setchell KD, Suchy FJ, Welsh MB, Zimmer-Nechemias L, Heubi J, Balistreri WF. Delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase deficiency described in identical twins with neonatal hepatitis. A new inborn error in bile acid synthesis. *J Clin Invest*. 1988;82(6):2148-2157.
 119. Jahnel J, Zöhrer E, Fischler B, D'Antiga L, Debray D, Dezsofi A, et al. Attempt to determine the prevalence of two inborn errors of primary bile acid synthesis: results of a European Survey. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2017;64(6):864-868.
 120. Mizuochi T, Kimura A, Ueki I, Takahashi T, Hashimoto T, Takao A, et al. Molecular genetic and bile acid profiles in two Japanese patients with 3beta-hydroxy-delta5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency. *Pediatr Res*. 2010;68(3):258-263.
 121. Palmer RH. The formation of bile acid sulfates: a new pathway of bile acid metabolism in humans. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1967;58(3):1047-1050.
 122. Setchell KDR, Heubi JE, Bove K. Bile acid synthesis and metabolism. In: Kleinman RE, Sanderson IR, Goulet O, Sherman PM, Meili-Vergani G, Shneider BL, editors. *Walker's Pediatric Gastrointestinal Disease*". Hamilton, Ontario, Canada: BC Decker Inc. 2008.
 123. Huang HY, Zhou H, Wang H, Chen YX, Fang F. Novel Mutations in the 3β-hydroxy-Δ5-C27-steroid Dehydrogenase Gene (HSD3B7) in a Patient with Neonatal Cholestasis. *Chin Med J (Engl)*. 2016;129(1):98-100.
 124. Setchell KDR, O'Connell NC. Disorders of bile acid synthesis and metabolism: a metabolic basis for liver disease in children. In: Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF, editors. *Liver disease in children. Third Edition* ed Cambridge University Press; 2007.736-766.
 125. Heubi JE, Setchell KD, Bove KE. Inborn errors of bile acid metabolism. *Semin Liver Dis*. 2007;27(3):282-94.
 126. Schwarz M, Wright AC, Davis DL, Nazer H, Bjorkhem I, Russell DW. The bile acid synthetic gene 3beta-hydroxy-Delta(5)-C(27)-steroid oxidoreductase is mutated in progressive intrahepatic cholestasis. *J Clin Invest*. 2000;106(9):1175-1184.

127. Fischler B, Bodin K, Stjernman H, Olin M, Hansson M, Sjovall J, et al. Cholestatic liver disease in adults may be due to an inherited defect in bile acid biosynthesis. *J Intern Med.* 2007;262(2):254-262.
128. Gonzales E, Gerhardt MF, Fabre M, Setchell KDR, Davit-Spraul A, Vincent I, et al. Oral cholic acid for hereditary defects of primary bile acid synthesis: a safe and effective long-term therapy. *Gastroenterology.* 2009;137(4):1310-1320.
129. Nittono H, Takei H, Unno A, Shimizu T, Kobayashi M, Koike M, et al. 3beta-hydroxy-Delta-C-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency in a patient who underwent oral bile acid therapy for 10 years and delivered two healthy infants. *Pediatr Int.* 2010;52(4):192-195.
130. Seki Y, Mizuochi T, Kimura A, Takahashi T, Ohtake A, Hayashi S, et al. Two neonatal cholestasis patients with mutations in the SRD5B1 (AKR1D1) gene: diagnosis and bile acid profiles during chenodeoxycholic acid treatment. *J Inherit Metab Dis.* 2013;36(3):565-573.
131. Terazawa S, Kimura A, Inoue T, Murai T, Kurosawa T, Takao A. An infant with 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid dehydrogenase/isomerase deficiency presenting with typical neonatal hepatitis syndrome: the first Japanese case. *Acta Paediatr Jpn.* 1998;40(6):638-640.
132. Grijalva J, Vakili K. Neonatal liver physiology. *Semin Pediatr Surg.* 2013;22(4):185-189.
133. Molho-Pessach V, Rios JJ, Xing C, Setchell KD, Cohen JC, Hobbs HH. Homozygosity mapping identifies a bile acid biosynthetic defect in an adult with cirrhosis of unknown etiology. *Hepatology.* 2012;55(4):1139-1145.
134. Clayton PT, Patel E, Lawson AM, Carruthers RA, Tanner MS, Strandvik B, et al. 3-Oxo- Δ^4 bile acids in liver disease. *Lancet.* 1988;331:1283-1284.
135. Drury JE, Mindnich R, Penning TM. Characterization of disease-related 5beta-reductase (AKR1D1) mutations reveals their potential to cause bile acid deficiency. *J Biol Chem.* 2010;285(32):24529-24537.
136. Kondo KH, Kai MH, Setoguchi Y, Eggertsen G, Sjöblom P, Setoguchi T, et al. Cloning and expression of cDNA of human delta 4-3-oxosteroid 5 beta-reductase and substrate specificity of the expressed enzyme. *Eur J Biochem.* 1994;219(1-2):357-363.
137. Nittono H, Takei H, Unno A, Kimura A, Shimizu T, Kurosawa T, et al. Diagnostic determination system for high-risk screening for inborn errors of bile acid metabolism based on an analysis of urinary bile acids using gas chromatography-mass spectrometry: results for 10 years in Japan. *Pediatr Int.* 2009;51(4):535-43.
138. Lemonde HA, Custard EJ, Bouquet J, Duran M, Overmars H, Scambler PJ, et al. Mutations in SRD5B1 (AKR1D1), the gene encoding delta(4)-3-oxosteroid 5beta-reductase, in hepatitis and liver failure in infancy. *Gut.* 2003;52(10):1494-1499.

139. Gonzales E, Cresteil D, Baussan C, Dabadie A, Gerhardt MF, Jacquemin E. SRD5B1 (AKR1D1) gene analysis in delta(4)-3-oxosteroid 5beta-reductase deficiency: evidence for primary genetic defect. *J Hepatol.* 2004;40(4):716-718.
140. Su AI, Wiltshire T, Batalov S, Lapp H, Ching KA, Block D, et al. A gene atlas of the mouse and human protein-encoding transcriptomes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(16):6062-6067.
141. Wu C, Orozco C, Boyer J, Leglise M, Goodale J, Batalov S, et al. BioGPS: an extensible and customizable portal for querying and organizing gene annotation resources. *Genome Biol.* 2009;10(11):R130.
142. Setchell KD, Schwarz M, O'Connell NC, Lund EG, Davis DL, Lathe R, et al. Identification of a new inborn error in bile acid synthesis: mutation of the oxysterol 7 α -hydroxylase gene causes severe neonatal liver disease. *J Clin Invest.* 1998;102(9):1690-1703.
143. Ueki I, Kimura A, Nishiyori A, Chen HL, Takei H, Nittono H, et al. Neonatal cholestatic liver disease in an Asian patient with a homozygous mutation in the oxysterol 7 α -hydroxylase gene. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2008;46(4):465-469.
144. Wu Z, Martin KO, Javitt NB, Chiang JY. Structure and functions of human oxysterol 7 α -hydroxylase cDNAs and gene CYP7B1. *J Lipid Res.* 1999; 40(12):2195-2203.
145. Marin JJ, Macias RI, Briz O, Banales JM, Monte MJ. Bile Acids in Physiology, Pathology and Pharmacology. *Curr Drug Metab.* 2015;17(1):4-29.
146. Hong J, Oh SH, Yoo HW, Nittono H, Kimura A, Kim KM. Complete Recovery of Oxysterol 7 α -Hydroxylase Deficiency by Living Donor Transplantation in a 4-Month-Old Infant: the First Korean Case Report and Literature Review. *J Korean Med Sci.* 2018;33(51):e324.
147. Mizuochi T, Kimura A, Suzuki M, Ueki I, Takei H, Nittono H, et al. Successful heterozygous living donor liver transplantation for an oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency in a Japanese patient. *Liver Transpl.* 2011;17(9):1059-1065.
148. Dai D, Mills PB, Footitt E, Gissen P, McClean P, Stahlschmidt J, et al. Liver disease in infancy caused by oxysterol 7 α -hydroxylase deficiency: successful treatment with chenodeoxycholic acid. *J Inherit Metab Dis.* 2014;37(5):851-861.
149. Vlahcevic ZR, Pandak WM, Stravitz RT. Regulation of bile acid biosynthesis. *Gastroenterol Clin North Am.* 1999;28(1):1-25.
150. Suchy FJ, Sokol RJ, Balistreri WF. *Liver Disease in Children.* 3rd ed. Cambridge University Press, Cambridge. 2007.736-766.
151. Johnson MR, Barnes S, Kwakye JB, Diasio RB. Purification and characterization of bile acid-CoA: amino acid N-acyltransferase from human liver. *J Biol Chem.* 1991;5;266(16):10227-10233.

152. Wheeler JB, Shaw DR, Barnes S. Purification and characterization of a rat liver bile acid coenzyme A ligase from rat liver microsomes. *Arch Biochem Biophys.* 1997;1;348(1):15-24.
153. Carlton VE, Harris BZ, Puffenberger EG, Batta AK, Knisely AS, Robinson DL, et al. Complex inheritance of familial hypercholanemia with associated mutations in TJP2 and BAAT. *Nat Genet.* 2003;34(1):91-96.
154. Falany CN, Johnson MR, Barnes S, Diasio RB. Glycine and taurine conjugation of bile acids by a single enzyme. Molecular cloning and expression of human liver bile acid CoA: amino acid N-acyltransferase. *J Biol Chem.* 1994;29;269(30):19375-19379.
155. Falany CN, Xie X, Wheeler JB, Wang J, Smith M, He D, et al. Molecular cloning and expression of rat liver bile acid CoA ligase. *J Lipid Res.* 2002; 43(12):2062-2071.
156. Doege H, Baillie RA, Ortegon AM, Tsang B, Wu Q, Punreddy S, et al. Targeted deletion of FATP5 reveals multiple functions in liver metabolism: alterations in hepatic lipid homeostasis. *Gastroenterology.* 2006;130(4):1245-1258.
157. Chong CP, Mills PB, McClean P, Gissen P, Bruce C, Stahlschmidt J, et al. Bile acid-CoA ligase deficiency—a new inborn error of bile acid metabolism. *J Inherit Metab Dis.* 2012;35(3):521-530.
158. Hadzic N, Bull LN, Clayton PT, Knisely AS. Diagnosis in bile acid–CoA: amino acid N-acyltransferase deficiency. *World J Gastroenterol.* 2012;18(25):3322-3326.
159. Setchell KD, Heubi JE, Shah S, Lavine JE, Suskind D, Al-Edreesi M, et al. Genetic defects in bile acid conjugation cause fat-soluble vitamin deficiency. *Gastroenterology.* 2013;144:945-955.
160. Heubi, JE, Setchell KD, Jha P, Buckley D, Zhang W, Rosenthal P, et al. Treatment of bile acid amidation defects with glycocholic acid. *Hepatology.* 2015;61(1):268-274.
161. Ferdinandusse S, Denis S, Clayton PT, Graham A, Rees JE, Allen JT, et al. Mutations in the gene encoding peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase cause adult-onset sensory motor neuropathy. *Nat Genet.* 2000;24(2):188-191.
162. Ferdinandusse S, Denis S, IJlst L, Dacremont G, Waterham HR, Wanders RJ. Subcellular localization and physiological role of alpha-methylacyl-CoA racemase. *J Lipid Res.* 2000;41(11):1890-1896.
163. Schmitz W, Albers C, Fingerhut R, Conzelmann E. Purification and characterization of an alpha-methylacyl-CoA racemase from human liver. *Eur J Biochem.* 1995;231(3):815-822.
164. Ferdinandusse S, Overmars H, Denis S, Waterham HR, Wanders RJ, Vreken P. Plasma analysis of di- and trihydroxycholestanoic acid diastereoisomers in peroxisomal alpha-methylacyl-CoA racemase deficiency. *J Lipid Res.* 2001;42(1):137-141.

165. Setchell KD, Heubi JE, Bove KE, O'Connell NC, Brewsaugh T, Steinberg SJ, et al. Liver disease caused by failure to racemize trihydroxycholestanic acid: gene mutation and effect of bile acid therapy. *Gastroenterology*. 2003;124(1):217-232.
166. Smith EH, GavrillovDK, Oglesbee D, Freeman WD, Vavra MW, Matern D, et al. An adult onset case of alpha-methyl-acyl-CoA racemase deficiency. *J Inherit Metab Dis*. 2010;33(3):349-353.
167. Sjoval J. Dietary glycine and taurine conjugation in man. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1959;100(4):676-678.
168. Steinberg SJ, Mihalik SJ, Kim DG, Cuebas DA, Watkins PA. The human liver-specific homolog of very long-chain acyl-CoA synthetase is cholate: CoA ligase. *J Biol Chem*. 2000;275(21):15605-15608.
169. Veldhoven PP, Croes K, Asselberghs S, Herdewijn P, Mannaerts GP. Peroxisomal beta-oxidation of 2-methyl-branched acyl-CoA esters: stereospecific recognition of the 2S-methyl compounds by trihydroxycoprostanoyl-CoA oxidase and pristanoyl-CoA oxidase. *FEBS Lett*. 1996;388(1):80-84.
170. Cuebas DA, Phillips C, Schmitz W, Conzelmann E, Novikov DK. The role of alpha-methylacyl-CoA racemase in bile acid synthesis. *Biochem J*. 2002;363(3):801-807.
171. Garrod AE. Inborn errors of metabolism. In: June 1908: The Croonian Lectures Delivered Before the Royal College of Physicians of London. London (UK): Oxford University Press, 1909.
172. Vernon HJ. Inborn Errors of Metabolism: Advances in Diagnosis and Therapy. *JAMA Pediatr*. 2015;169(8):778-782.
173. Ismail IT, Showalter MR, Fiehn O. Inborn Errors of Metabolism in the Era of Untargeted Metabolomics and Lipidomics. *Metabolites*. 2019;9(10):242.
174. Guo K, Zhou X, Chen X, Wu Y, Liu C, Kong Q. Expanded Newborn Screening for Inborn Errors of Metabolism and Genetic Characteristics in a Chinese Population. *Front Genet*. 2018;9:122.
175. Afzal RM, Lund AM, Skovby F. The impact of consanguinity on the frequency of inborn errors of metabolism. *Mol Genet Metab Rep*. 2018;15:6-10.
176. Mak CM, Law EC, Lee HH, Siu WK, Chow KM, Au Yeung SK, et al. The first pilot study of expanded newborn screening for inborn errors of metabolism and survey of related knowledge and opinions of health care professionals in Hong Kong. *Hong Kong Med J*. 2018;24(3):226-237.
177. Romao A, Simon PEA, Góes JEC, Pinto LLC, Giugliani R, Luca GR, et al. Initial Clinical Presentation in Cases of Inborn Errors of Metabolism in a Reference Children's Hospital: Still a Diagnostic Challenge. *Rev Paul Pediatric*. 2017;35(3):258-264.
178. Matsumoto I, Kuhara T. A new chemical diagnostic method for inborn errors of metabolism by mass spectrometry-rapid, practical, and simultaneous urinary metabolites analysis. *Mass Spectrom Rev*. 1996;15(1):43-57.

179. Kuhara T. Gas chromatographic-mass spectrometric urinary metabolome analysis to study mutations of inborn errors of metabolism. *Mass Spectrom Rev.* 2005;24(6):814-827.
180. Jiang M, Liu L, Mei H, Li X, Cheng J, Cai Y. Detection of inborn errors of metabolism using GC-MS: Over 3 years of experience in southern China. *J Pediatric Endocrinol Metab.* 2015;28(3-4):375-380.
181. Lehotay DC, Hall P, Lepage J, Eichhorst JC, Etter ML, Greenberg CR. LC-MS/MS progress in newborn screening. *Clin Biochem.* 2011;44(1):21-31.
182. Hage DS. *Chromatography Principles and Applications of Clinical Mass Spectrometry Small Molecules, Peptides, and Pathogens.* Rifai N, Horvath AR, Wittwer C, Editors. 2018.
183. Watson JT, Sparkman OD. *Introduction to mass spectrometry: instrumentation, applications, and strategies for data interpretation.* Fourth Edition. John Wiley & Sons; 2007.
184. Aston FW. Bakerian lecture. A new mass-spectrograph and the whole number rule. *Proc R Soc.* 1927;115:487-514.
185. Lindemann FA., Aston FW. XLVIII. The possibility of separating isotopes. *Lond Edinb Dublin Philos Mag J Sci.* 1919;37:523-534.
186. Thomson JJ. XL. Cathode rays. *Lond Edinb Dublin Philos Mag J Sci.* 1897;44:293-316.
187. Zlatkis A, Liebich HM. Profile of volatile metabolites in human urine. *Clin Chem.* 1971;17(7):592-594.
188. Horning EC, Horning MG. Metabolic profiles: gas-phase methods for analysis of metabolites. *Clin Chem.* 1971;17(8):802-809.
189. Mamer OA, Crawhall JC, Tjoa SS. The identification of urinary acids by coupled gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 1971;32(2):171-184.
190. Crawhall JC, Mamer O, Tjoa S, Claveau JC. Urinary phenolic acids in tyrosinemia. Identification and quantitation by gas chromatography-mass spectrometry. *Clin Chim Acta.* 1971;34(1):47-54.
191. Hutterer F, Roboz J, Sarkozi L, Ruhig A, Bacchin P. Gas chromatograph-mass spectrometer-computer system for detection and identification of abnormal metabolic products in physiological fluids. *Clin Chem.* 1971;17(8):789-794.
192. Waterbury LD, Pearce LA. Separation and identification of neutral and acidic metabolites in cerebrospinal fluid. *Clin Chem.* 1972;18(3):258-262.
193. Atkinson AJ, Parker M, Strong J. Rapid gas chromatographic measurement of plasma procainamide concentration. *Clin Chem.* 1972;18(7):643-646.
194. Horning MG, Nowlin J, Lertratanangkoon K, Stillwell RN, Stillwell WG, Hill RM. Use of stable isotopes in measuring low concentrations of drugs and drug metabolites by GC-MS-COM procedures. *Clin Chem.* 1973;19(8):845-852.

195. Costello CE, Hertz HS, Sakai T, Biemann K. Routine use of a flexible gas chromatograph-mass spectrometer-computer system to identify drugs and their metabolites in body fluids of overdose victims. *Clin Chem.* 1974;20(2):255-265.
196. Horning MG, Gregory P, Nowlin J, Stafford M, Lertratanangkoon K, Butler C, et al. Isolation of drugs and drug metabolites from biological fluids by use of salt-solvent pairs. *Clin Chem.* 1974;20(2):282-287.
197. Vasiliades J. Identification of misused drugs in the clinical laboratory. I Tricyclics. *Clin Biochem.* 1980;13(1):24-29.
198. Gupta RN. Identification of misused drugs in the clinical laboratory. *Clin Biochem.* 1980;13(4):184.
199. Law NC, Aandahl V, Fales HM, Milne GW. Identification of dangerous drugs by mass spectrometry. *Clin Chim Acta Int J Clin Chem.* 1971;32(2):221-228.
200. Siuzdak G. *An Introduction to Mass Spectrometry Ionization: An Excerpt from The Expanding Role of Mass Spectrometry in Biotechnology*, 2nd ed.; MCC Press: San Diego, 2005.
201. Lifshitz C, Mark TD. *Mass Spectrometry, Ionization Theory. Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry (Third Edition)*. 2017. Pages 748-757.
202. Wilm M. Principles of Electrospray Ionization. *Mol Cell Proteomics.* 2011;10(7):1-8.
203. Yamashita M, Fenn JB. Electrospray ion source. Another variation on the free-jet theme. *J Phys Chem.* 1984;88(20):4451-4459.
204. Kebarle P, Verkerk UH. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom Rev.* 2009;28(6):898-917.
205. Karas M, Hillenkamp F. Laser desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10,000 daltons. *Anal Chem.* 1988;60(20):2299-2301.
206. Meng CK, Mann M, Fenn J. Of protons or proteins. *Zeitschrift für Physik D Atoms, Molecules and Clusters.* 1988;10:361-368.
207. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization for mass spectrometry of large biomolecules. *Science.* 1989;246(4926):64-71.
208. Ho CS, Lam CWK, Chan MHM, Cheung RCK, Law LK, Lit LCW, et al. Electrospray Ionisation Mass Spectrometry: Principles and Clinical Applications. *Clin Biochem Rev.* 2003; 24(1):3-12.
209. Banerjee S, Mazumdar S. Electrospray Ionization Mass Spectrometry: A Technique to Access the Information beyond the Molecular Weight of the Analyte. *Int J Anal Chem.* 2012;282574.
210. Woldegebriel M, Vivó-Truyols G. Probabilistic Model for Untargeted Peak Detection in LC-MS Using Bayesian Statistics. *Analytical chemistry.* 2015;87(14):7345-7355.

211. Xiao JF, Zhou B, Ressom HW. Metabolite identification and quantitation in LC-MS/MS-based metabolomics. *Trends Analyt Chem.* 2012;32:1-14.
212. Kim Y, Suh SH, Lee IK, Wolfe RR. Applications of stable, nonradioactive isotope tracers in in vivo human metabolic research. *Exp Mol Med.* 2016; 48(1):203-213.
213. Liyanage T, Brantley MR, Calixte EI, Solouki T, Shuford KL, Gallagher ES. Characterization of Electrospray Ionization (ESI) parameters on In-ESI Hydrogen/Deuterium Exchange of Carbohydrate-Metal Ion Adducts. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2019;30(2):235-247.
214. Griffiths WJ, Sjövall J. Bile acids: analysis in biological fluids and tissues. *J Lipid Res.* 2010;51(1):23-41.
215. Naritaka N, Suzuki M, Takei H, Chen HL, Oh SH, Kaewplang P, et al. Use of dried urine spots for screening of inborn errors of bile acid synthesis. *Pediatr Int.* 2019;61(5):489-494.
216. Wikvall K. Purification and properties of a 3 beta-hydroxy-delta 5-C27-steroid oxidoreductase from rabbit liver microsomes. *J Biol Chem* 1981; 256(7):3376-3380.
217. Beuers U, Trauner M, Jansen P, Poupon R. New paradigms in the treatment of hepatic cholestasis: from UDCA to FXR, PXR and beyond. *J Hepatol.* 2015;62(1):25-37.
218. Corso G, Dello Russo A, Gelzo M. Liver and the defects of cholesterol and bile acids biosynthesis: Rare disorders many diagnostic pitfalls. *World J Gastroenterol.* 2017;7;23(29):5257-5265.
219. Al-Hussaini AA, Setchell KDR, AlSaleem B, Heubi JE, Lone K, Davit-Spraul A, et al. Bile Acid Synthesis Disorders in Arabs: A 10-year Screening Study. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2017; 65(6):613-620.
220. Murai T, Oda K, Toyo T, Nittono H, Takei H, Muto A, et al. Determination of 3 β -hydroxy- Δ 5-bile acids and related compounds in biological fluids of patients with cholestasis by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* 2013;923-924:120-127.
221. Setchell KDR. Disorders of bile acid synthesis and metabolism. Frederick JS, Ronald JS and William FB editors. *Liver Disease in Children, Fourth Edition.* Published by Cambridge University Press: Cambridge University Press; 2014.
222. Mallory MA, Lee SW, Kowdley KV. Abnormal liver test results on routine screening. How to evaluate, when to refer for a biopsy. *Postgrad Med.* 2004;115(3):53-6, 59-62, 66.
223. Pierre G, Setchell K, Blyth J, Preece MA, Chakrapani A, McKiernan P. Prospective treatment of cerebrotendinous xanthomatosis with cholic acid therapy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 2008;31(2):241-245.

224. Verrips A, Hoefsloot LH, Steenbergen GC, Theelen JP, Wevers RA, Gabreëls FJ, et al. Clinical and molecular genetic characteristics of patients with cerebrotendinous xanthomatosis. *Brain*. 2000;123(5):908-919.
225. Inoue K, Kubota S, Seyama Y. Cholesterol induces apoptosis of cerebellar neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;256(1):198-203.
226. Seyama Y. Cholesterol metabolism, molecular pathology, and nutritional implications. *J Med Food*. 2003;6(3):217-24.
227. Koopman BJ, van der Molen JC, Wolthers BG, de Jager AE, Waterreus RJ, Gips CH. Capillary gas chromatographic determination of cholesterol/cholesterol ratio in biological fluids. Its potential usefulness for the follow-up of some liver diseases and its lack of specificity in diagnosing CTX (cerebrotendinous xanthomatosis). *Clin Chim Acta*. 1984;137(3):305-315.
228. Velden MG, Verrips A, Prinsen BH, de Barse M, Berger R, Visser G. Elevated cholesterol precursors other than cholesterol can also be a hallmark for CTX. *J Inher Metab Dis*. 2008;31(2):387-93.
229. Sasamura A, Akazawa S, Haraguchi A, Horie I, Ando T, Abiru N, et al. Late-onset Cerebrotendinous Xanthomatosis with a Novel Mutation in the CYP27A1 Gene. *Intern Med*. 2018;57(11):1611-1616.
230. Leitersdorf E, Safadi R, Meiner V, Reshef A, Bjorkhem I, Friedlander Y, et al. Cerebrotendinous xanthomatosis in the Israeli Druze: molecular genetics and phenotypic characteristics. *Am J Hum Genet*. 1994;55(5):907-915.