



BİRÜNİ
LABORATUVARI
25.yıl



TANDEM KÜTLE SPEKTROMETRİSİ (TANDEM - MS)

Dünyada yenidönan tarama programları Robert Guthrie'nin 1962 yılında fenilalanin için bakteriyel inhibisyon metodunu geliştirmesiyle birlikte fenilketonüri hastalarının taramasıyla başlamıştır. Son otuz yıl boyunca yenidönan taramaları konjenital hipotiroidi ve konjenital adrenal hiperplazi gibi diğer metabolik bozuklukları da içine alacak biçimde geliştirilmiştir.

Yıllar içerisinde ayrı ayrı hastalıkları tek tek taramak yerine bir testle birden fazla hastanın tarama fikri ortaya atılmıştır. Buradan yola çıkarak geliştirilen Tandem Kütle Spektrometrisi (Tandem-MS) hızlı, kesin ve az miktarda kan örneği ile çalışabilen bir yöntemdir. En önemli avantajı oldukça az miktarda fizyolojik sıvı veya kuru kan örneğinde birbiriyle bağlantısız çok sayıda farklı metabolit ve bileşimi aynı anda ölçebilmesidir.

Tandem-MS çok özgül ve duyarlı bir teknoloji olup, geniş bir hastalık grubunun değerlendirilmesini mümkün kılar. Tandem-MS ile taranabilen hastalıklar özet olarak Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tandem-MS kullanılarak tek bir kan örneği ile 25'den fazla yenidönan metabolik hastalarının taraması mümkündür. Böylece tek test-tek hastalık kavramından tek test-birden çok hastalık kavramına geçilmiştir. Tarama için Guthrie kartları üzerine alınmış ve kurutulmuş kan örneklerinden alınacak küçük diskler yeterlidir. Taranan hastalık sayısı yüksek olmasına rağmen yalancı pozitiflik oranı düşüktür (%0.26). Oysa klasik bakteriyel inhibisyon yöntemlerinde bu oran %1.5'dir. Yenidönanlarda ilk 24 saat içinde alınan kan örneklerinde de Tandem-MS yöntemi kullanılmaktadır.

Guthrie kartları üzerine alınmış ve kurutulmuş kan örneklerinden metanol ile elde edilen kısım, "soft iyonizasyon" veya "elektrospray" yöntemi ile cihaza yüklenir. İlk filtreleme kısmında iyonize olan ve iyonize olmayan moleküller ayrılır. İyonize ana moleküller daha sonra cihazın "çarpılma ünitesi" denilen bölümüne gelirler. Burada inert gazların (argon gazı vb) etkisi ile ana moleküller elektron yüklü daha küçük parçalara parçalanırlar.

(fragmentasyon). Ana molekülden ayrılan daha küçük iyonlar ikinci bir filtrede kütlelerine göre ayrılır. Cihazda bulunan iki MS (kütle spektrometrisi) aracılığıyla belli bir ana molekülün öncüsü olan küçük iyonize moleküller ile ana moleküller taranır ve gruplandırılır. Ana molekülden ayrılan küçük

moleküllerin oluşturdusu spektrum, bu ana molekül için karakteristiktir (fişkil 1). Cihazda iki adet kütle spektrometrisi bulunduğundan MS-MM, MS/MS veya MS² olarak gösterilir. Döteryum ifaretli internal bir standart ile karşılaştırılarak miktar tayini yapılır.

Tablo 1. Tandem MS ile taranabilen metabolik hastalıklar

Amino asit metabolizması
bozuklukları

- , Fenilketonüri
- , Diğer hiperfenilalaninemiler
- , Tirozinemi tip 1, 2, 3
- , Homosistinüri
- , Maple Syrup Urine hastalığı
- , Hiperprolinemi tip 2
- , Nonketotik hiperglisinemi

Yaş asidi oksidasyonu
bozuklukları

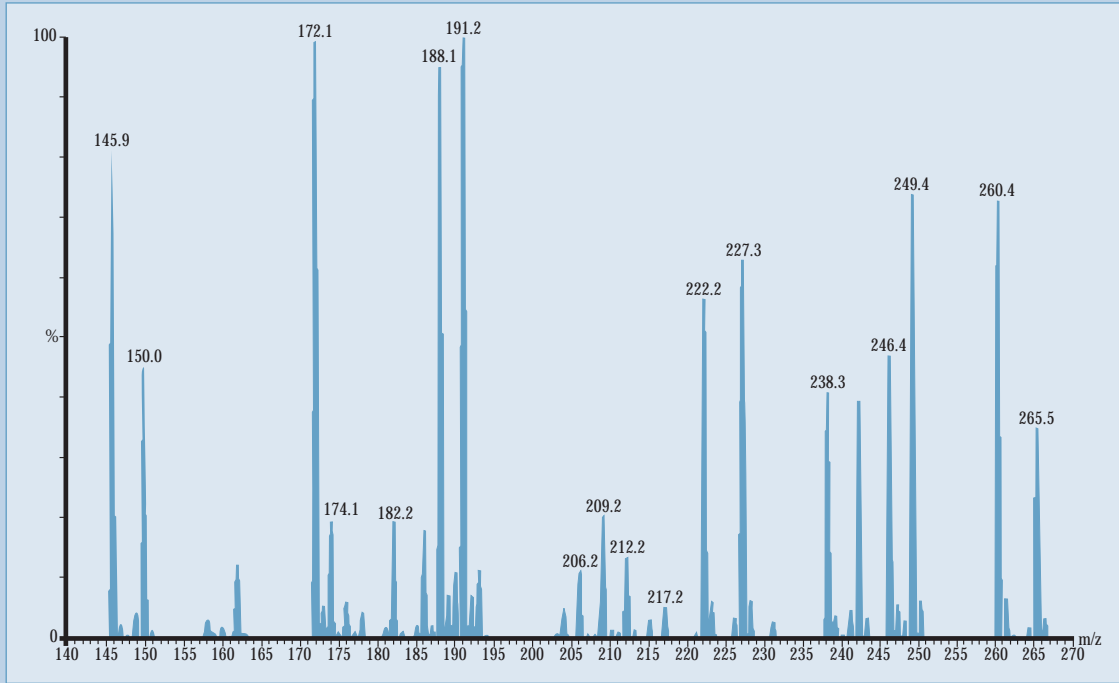
- , Kısa zincirli açil-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , Orta zincirli açil-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , Çok uzun zincirli açil-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , Kısa zincirli 3-hidroksi açil-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , Uzun zincirli 3-hidroksi açil-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , Uzun zincirli 2,4-dienoil-KoA redüktaz eksikliği
- , Trifonksiyonel protein (TFP) eksikliği
- , Primer karnitin eksikliği
- , Karnitin palmitoiltransferaz I eksikliği
- , Karnitin palmitoiltransferaz II eksikliği
- , Karnitin açilkarnitin translokaz eksikliği
- , Çoklu açil KoA dehidrogenaz eksikliği

Organik asit metabolizması
bozuklukları

- , Metilmalonik asidemi
- , Propiyonik asidemi
- , İzovalerik asidemi
- , Glutarik asidemi tip I
- , Glutarik asidemi tip II
- , Malonik asidüri
- , Mevalonik asidüri
- , HMG-KoA liyaz eksikliği
- , 2-Metilbütiril-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , İzobütiril-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , 2-metil-3-hidroksi-bütiril-KoA dehidrogenaz eksikliği
- , 3-metilglutakonil-KoA hidrataz eksikliği
- , 3-metilkrotonil-KoA karboksilaz eksikliği
- , 3-ketotiyolaz eksikliği

Üre siklusu enzim
bozuklukları

- , Sitrülinemi tip 1 ve 2
- , Argininosüksinik asidüri ve argininemi
- , Ornitin transkarbamilaz eksikliği



Şekil 1. Kurutulmuş kan örneğinden elde edilmiş amino asit ve açikarnitinlerin spektrumu. Her bir analiz için kontrol düzeyi I ile birlikte izotop ile işaretlenmiş internal standart yer almaktadır. Tüm analizlerin konsantrasyonları cut-off sınırındadır.

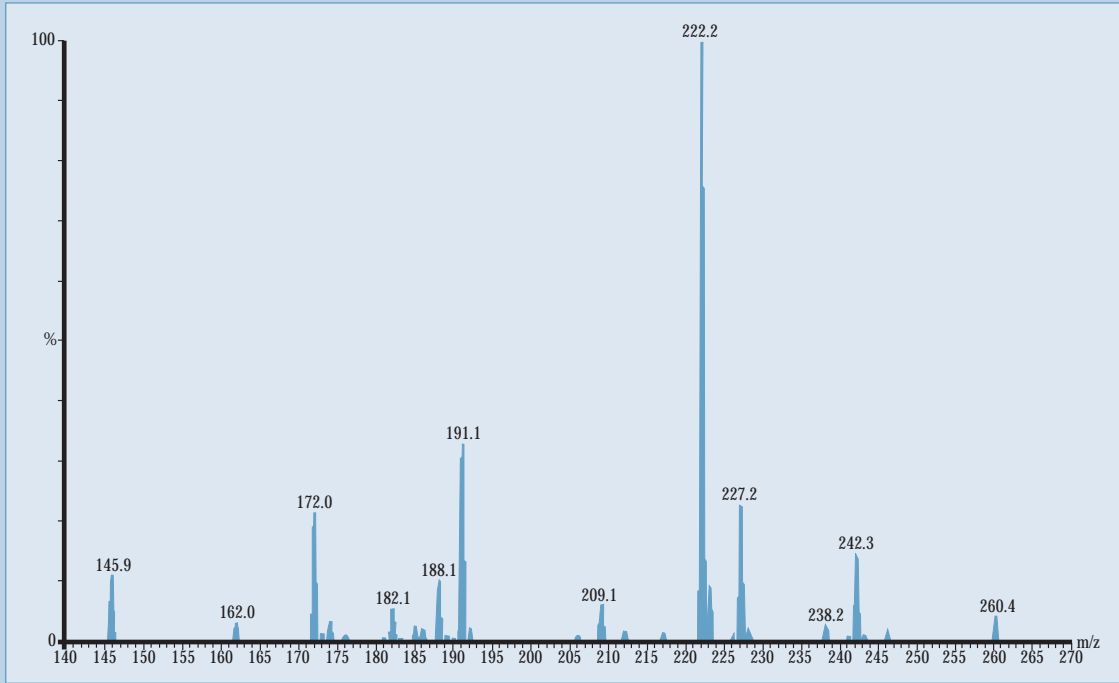
Kalıtsal Metabolik Hastalıkların Tanısında Tandem Kütle Spektrometrisi

Kalıtsal Metabolik Hastalıklar (KMH), metabolik yollardaki kilit enzimlerin sentezi ya da membrandan taşımada görevli proteinlerin sentezini düzenleyen genlerdeki mutasyonlara bağlı olarak gelişen hastalıklardır. Bu hastalıkların büyük çoğunluğu amino asit, organik asitler ve yağ asidi metabolizmasının kalıtsal kusurları olup, akut ve şiddetli metabolik krizler ile seyretmekte, uygun tedavi görmeyen olgularda sıklıkla erken yaşta ölümle sonuçlanmaktadır (Şekil 2). Bu hastalıkların tanısında temel amaç, klinik önemi olan hastalıkların erken evrede tanı konularak tedavi edilmesiyle zihinsel ve bedensel sekellerin önlenmesi ve ölüm oranının en alt düzeye indirilmesidir. Erken ve doğru tanı, zeka geriliğinin, şiddetli nörolojik bulguların,

fiziksel kusurların önlenmesinde büyük önem taşımakta, hem yaşam kalitesi hem de yaşam süresinin artırılmasına katkıda bulunmaktadır.

Tandem-MS, 1982 yılında metabolik tarama amacıyla kullanılmaya başlanmış, daha sonra açikarnitinlerin yanı sıra amino asit metabolizma kusurları da taramalara dahil edilmiştir.

Tandem-MS, KMH'nin tanısında birinci basamağı oluşturur ve kesin tanı için diğer biyokimyasal ve genetik testler de yapılmalıdır. Glutarik asidemi tip I ve karnitin palmitoiltransferaz I eksikliği gibi metabolik bozukluklarda, örneğin alındığında anormal metabolitler henüz oluşmadığından dolayı tanı atlanabilir ve normal sonuç bulunabilir. Bu nedenle daha ileri zamanlarda yeni örnek alınıp, analiz tekrar edilmelidir. Ayrıca amino asit, organik asit ve yağ asidi metabolizması ile ilgili bazı kalıtsal hastalıklar amino



Şekil 2. Fenilketonürlü bir olguda fenilalanin artışı.

asitlerin ve açilkarnitinlerin MS/MS analizi ile saptanamadığından, klinik bulguları olan bir olguda Tandem-MS ile yeniden taramasında herhangi bir patoloji saptanmamış olması, kalıtsal bir hastalığı ekarte etmek için yeterli değildir.

Örneklerin Toplama Kofulları ve Test Sonuçlarının Etkileyen Durumlar

Akut semptomlar, özellikle de karaciğer fonksiyonlarının etkileyen durumlar, ilaçlar ve diyet uygulamaları yanlış olabilecek metabolitlerin oluşmasına yol açabilir. Açilkarnitinler oda sıcaklığında en az 24 saat stabildir. Serbest ve total karnitin ile ilgili doğru sonuçların elde edilebilmesi için plazma/serum örneklerinin ayrıldıktan sonra dondurulmaları, kuru buz üzerinde laboratuvara ulaştırılmaları ve analiz aflamasına kadar -20°C'de saklanmaları gerekmektedir. Kurutma kadında emdirilen örnekler ise oda sıcaklığında 4 saat kadar kurutulduktan sonra kadı bir zarfa konularak gönderilmelidir.

Örneklerin alındığı kadının laboratuvarda kullanılan kadı ile aynı olması sonuçların doğruluğu açısından büyük önem taşımaktadır. Doğru bir sonucun elde edilebilmesi için kan örneğinin filtre kadına homojen olarak emdirilmesi, aynı bölgeye defalarca kanın emdirilmemesi çok önemlidir. Örnek olarak 3mm çapında bir kan damlası kullanılmakta ve bu miktar 3.1 µL olarak kabul edilmektedir. Tüm hesaplamalar bu değere göre yapıldığından hatalı emdirilen örnekler yanlış düşük ya da yüksek değerlere yol açabilir.

Yeniden taramalarında kabul edilecek kesin sınırlar değerler henüz belirlenmemiş olduğundan her laboratuvar kendi referans aralığını oluşturmalıdır. MS/MS bir tarama testi olduğundan herhangi bir patoloji saptanmaması, ilgili olgunun taraması yapılan hastalıklardan hiçbirine sahip olmadığı anlamına gelmemektedir. Bir tarama testi olan MS/MS, tanı koydurucu metabolitlerin normal değerlerin üzerine çıkmadığı durumlarda yanlış negatif sonuçlar verebilir. İlaçlara bağlı olarak

geliştiği bilinen doğrudan etkileşimler ise çok az sayıdadır. <drar yolu enfeksiyonlar>nda kullanılan, pivaloil grubu içeren antibiyotikler bebeğe uterus içinde veya anne sütü yoluyla geçerek, C5 açilkarnitin değerlerinin yükselmesine yol açabilir. Valproat gibi epilepsi tedavisinde kullanılan ilaçlar ve çeşitli analjezikler ise yağ asidi beta oksidasyon yolağ gibi mitokondriyal enzim sistemleri ile etkileşime girerek, ara ürünlerin anormal derecede yükselmesine neden olabilirler. Çeşitli bebek mamalar>nda yer alan orta zincirli trigliseritler C8, C10 gibi orta zincirli karnitinleri artırabilirler. Karnitin desteği alan olgularda sıklıkla C3 ile birlikte C2 artıfl da bulunur. Özellikle infüzyon yolu ile yüksek dozlarda karnitin desteği alan olgularda karnitin ve açil karnitin düzeylerinde çok yüksek artıflar görülebilir. Uzunlaçlık dönemi C2, C4-OH, C12:1, C14:1 gibi yağ asitlerinin düzeylerinde artıfla neden olabilir. Laktik asidoz da C3 düzeylerinde artıfla yol açabilir. Özellikle uzun zincirli yağ asitlerinin tüketilmesi (ayçiçek yağ, zeytinyağ) C14:2'de artıfla neden olabilir. Ketojenik diyet alan olgularda C2 ve C4-OH düzeyleri yüksek olarak saptanabilir. Üre döngüsü kusurlar>nda, tedavi amacı ile uygulanan benzoat ve/veya fenilasetat Tandem-MS'de benzoilkarnitin ile fenilasetilglutamata benzer pikler gösterebilir.

Tandem-MS ile çok kısa bir sürede, kurutulmuş kan damlas>ndan amino asitler ve açil karnitinler dahil 40 kadar metabolitin analiz edilmesi mümkündür. Fenilketonüri tanın>nın daha duyarlı bir şekilde konulmasının yanı sıra, ender görülen bazı kalıtsal hastalıklar>n doğumdan sonraki ilk haftada, henüz klinik bulgular gelişmeden, Tandem-MS ile teşhis edilmesi mümkün olabilmektedir. Sistemin otomatize edilmesi ile günde 500'ün üzerinde örnek analiz edilerek, yirminin üzerinde hastalığın taraması yapılabilmektedir.

Tandem-MS Yönteminin Uygulama Alanları

Gelişmiş ülkelerde Tandem-MS'in yenidoğan tarama testleri dışında uygulama alanları terapötik ilaç dozlarının izlenmesi (özellikle immünosüpresifler ve yeni nesil antikonvülzanlar ile antipsikotikler) ile farmakoloji, endokrinoloji ve toksikoloji alanlarındadır. Birçok laboratuvar da immünosüpresiflerin yanı sıra, yeni antiepileptik ve antiviral ilaçların takibi de Tandem Kütle Spektrometrisi ile yapılmaktadır. Tandem-MS'in bu uygulamadaki avantajları maliyetler ve immünoassay duyarlılığı açısından in vitro tanıdan başımsız olarak yüksek özgüllük ve duyarlılığa sahip olmasıdır. Ancak bu yöntemde bir testin yapılma süresi otomatize immünoassay sistemlerden daha uzun olup, özel teknik bilgiye gereksinim göstermektedir.

Son yıllarda çeşitli hormonlara ilişkin analizler de immünoassay yerine Tandem-MS kullanılarak yapılmaktadır. Tandem Kütle Spektrometrisi biyolojik deşifliklikleri ve çok düşük düzeylerde bulunmaları nedeniyle peptid hormonların ölçümü için tercih edilmemektedir; ancak bu tür hormonların tayini için gelecekte kullanılabilecek potansiyel yöntemler arasında yer alabilir. Tiroid hormonlarının yanı sıra kortizol, progesteron ve estradiol gibi küçük moleküllü hormonların tayininde immünoassay yöntemlerinin performansları daha iyi olmakla birlikte, heterofilik antikörlerden kaynaklanan etkileşimleri önlemek amacıyla Tandem-MS bu analizlerde de kullanılabilir.

Kaynaklar

1. Chace DH. Mass spectrometry in newborn and metabolic screening: historical perspective and future directions. Journal of mass spectrometry 2009; 44(2):163-170.
2. Burghardt S. Tandem mass spectrometry for neonatal screening. Clinical Laboratory International 2007; 31(6):14-16.
3. Schulze A, Lindner M, Kohlmüller D et al. Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications. Pediatrics 2003; 111(6):1399-1406.
4. Zytkovicsz TH et al. Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two year summary from the New England newborn screening program. Clinical Chemistry 2001; 47(11): 1945-1955.
5. Millinton DS et al. Tandem mass spectrometry: a new method for acylcarnitine profiling with potential for neonatal screening for inborn errors of metabolism. Journal of Inherited Metabolic disease 1990; 13(3):321-324.
6. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. Pediatrics 1963; 32:338-343.

MECİDİYEKÖY

Büyükdere Cad.
Gökfiliz Afl Merkezi No: 11 Kat: 3
34387 Mecidiyeköy - İstanbul
Tel. : (212) 217 41 41
Faks : (212) 217 41 10

KADIKÖY

Cemil Topuzlu Cad. Fazilet Sitesi
No: 44 Kat: 2
34726 Çiftelavuzlar - Kadıköy - İstanbul
Tel. : (216) 369 17 67
Faks : (216) 369 01 61

BAKIRKÖY

İncirli Cad. Santral Çıkmaz
Toprak Bloklar A-Blok 1-2
34147 Bakırköy - İstanbul
Tel. : (212) 570 88 60
Faks : (212) 570 93 00

ETİLER

Tepecik Yolu
No: 28/A
34337 Etiler - İstanbul
Tel. : (212) 358 51 00
Faks : (212) 358 50 56

NİFİANTAfi

Valikonaı Cad. Çam Apt.
No: 161 Kat: 1
34363 Nifiantaı - İstanbul
Tel. : (212) 233 22 95
Faks : (212) 233 38 42

ULUS

Etiler Adnan Saygun Cad. Uydu Sok.
Gündell Apt. No: 2/B Kat: 1
34340 Ulus - İstanbul
Tel. : (212) 287 43 00
Faks : (212) 287 33 83

ERENKÖY

İsmetsettin Günaltay Cad.
No: 184/B
34738 Erenköy - İstanbul
Tel. : (216) 411 31 66
Faks : (216) 411 20 61

FINDIKZADE

Millet Cad. Emir Han
No: 55 Kat: 2
34096 Fındıkzade - İstanbul
Tel. : (212) 633 41 42
Faks : (212) 633 49 05

ACIBADEM

Acıbadem Cad. Aydın Apt.
No: 109 Kat: 2
34718 Acıbadem - İstanbul
Tel. : (216) 545 72 72
Faks : (216) 545 74 77

YEfiİLKÖY

İstasyon Cad.
No: 21 Kat: 1
34149 Yeşilköy - İstanbul
Tel. : (212) 662 99 77
Faks : (212) 662 68 00

ÇEKMEKÖY

Aydın Menderes Cad.
Carpe-Diem Afl Merkezi Kat: 1
34782 Çekmeköy - İstanbul
Tel. : (216) 642 43 00
Faks : (216) 642 54 84

KEMERBURGAZ

İstanbul Cad.
Artell Forum Çarşı No: 38/14
34075 Göktürk - Kemerburgaz - İstanbul
Tel. : (212) 322 68 22
Faks : (212) 322 68 28