

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROJENAZ TANI KİTİ
KONTROL MATERYALİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE STABİLİZASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe YILDIZ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER

TEMMUZ 2024

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROJENAZ TANI KİTİ
KONTROL MATERYALİNİN
GELİŞTİRİLMESİ VE STABİLİZASYONU

UZMANLIK TEZİ

Dr. Tuğçe YILDIZ

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık Programı

Tez Danışmanı: Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER

Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20230612 kodlu proje ile desteklenmiştir.

TEMMUZ 2024

Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Tuğçe YILDIZ, ilgili yönetmeliklerin belirlediği gerekli tüm şartları yerine getirdikten sonra hazırladığı “GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROJENAZ TANI KİTİ KONTROL MATERYALİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE STABİLİZASYONU” başlıklı tezini aşağıda imzaları olan jüri önünde başarı ile sunmuştur.

Tez Danışmanı : **Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Jüri Üyeleri : **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Prof. Dr. Şahabettin SELEK
Bezmialem Vakıf Üniversitesi

Teslim Tarihi : **12/07/2024**
Savunma Tarihi : **01/07/2024**



*Canım aileme ve
Dr. Zeynep SEZAL ŞEREFÖĞLU'na,*

ÖNSÖZ

Tez çalışmam boyunca heyecanla bilgisi ve yardımlarıyla destek olan, akademik hayata adım atmam konusunda beni cesaretlendiren, her konuda sabır ve hoşgörüsüyle yaklaşan danışman hocam **Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER**'e, kapısını her çaldığımızda bize şefkatle yaklaşan, hayata ve biyokimyaya dair bütüncül yaklaşımıyla heybemizi değerli bilgilerle dolduran, çalışkanlığıyla bizlere her daim örnek olan Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı hocamız **Prof. Dr. Abdürrahim KOÇYİĞİT**'e, her zaman her konuda kapısını çalabildiğimiz, yeni fikirlere, çalışmaya, üretmeye olan heyecanımla bizlere örnek olan, sabırla ve sevgiyle her konuda beni dinleyen, destek olan değerli hocam **Prof. Dr. Şahabettin SELEK**'e;

Asistanlık sürecimde yaptığımız her çalışmada, tezimin istatistiksel analiz sürecinde desteğini esirgemeyen, öğrenme heyecanı, çalışma azmiyle bizleri de heyecanlandıran canım hocam **Doç Dr. Özge PASİN**'e;

Asistanlığımın son yıllarında birlikte çalıştığımız, günün her saati sabırla sorunlara farklı bir bakış açısı katarak çözüm üreten, moral vererek desteğini esirgemeyen, çömezim olarak başlayıp benden önce uzmanlık bayrağını eline alan **Dr. Caner YILDIZ**'a;

Bezmialem'de yolumuzun kesiştiği, bilimsel bakış açısına güvendiğim, azmini ve cesaretini her zaman takdir ettiğim, en güzel ve en zor günlerimde yanımda olan sadık dostum **Dr. Hifa Gülru ÇAĞLAR**'a;

Bezmialem Tıbbi Biyokimya'yı bizler için aile yapan değerli çalışma arkadaşlarım **Dr. Öğr. Üyesi Vildan Betül YENİGÜN, Dr. Fatmanur KÖKTAŞOĞLU, Dr. Metin DEMİREL, Ebru KANIMDAN, Zeynep ÖZMAN, Ezgi BALKAN, Ufuk SARIKAYA, Mehtap ALİM, Fatmanur BALİBEY**'e ve araştırma laboratuvarımızın vazgeçilmezi **Mustafa KARABONCUK**'a;

Asistanlık eğitimim ve tezim süresince desteklerini esirgemeyen Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nın neşeli, vefakar, sabırlı, öğretmeyi seven, hiçbir ricamızı geri çevirmeyen, başta **Sametay KAYA, Tağı POLAT, Sevgi KIRMIZI, Emre ÇETİNKAYA, Onur ÖZMEN** ve **Ayşe KARADAĞ** olmak üzere, tüm çalışanlarına; Aldığım her kararda arkamda olan, düştüğümde sevgileriyle sarıp sarmalayarak tekrar ayağa kalkmamı sağlayan, mutlu günümde içtenlikle gözleri ışıldayan, bugünümün mimarları canım annem **Nazife YILDIZ**'a, canım babam **Rüstem YILDIZ**'a ve canım kardeşim **Bayram Ali YILDIZ**'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

BEYAN

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

Tuğçe YILDIZ

İmza

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ.....	ii
BEYAN.....	iii
İÇİNDEKİLER	iv
KISALTMALAR	vii
SEMBOLLER	ix
TABLO LİSTESİ	x
ŞEKİL LİSTESİ.....	xii
ÖZET.....	xiii
SUMMARY	xv
1. GİRİŞ ve AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Eritrositler	3
2.2. Eritrosit Metabolizması.....	3
2.2.1. Glikoliz.....	4
2.2.2. Pentoz fosfat yolu.....	5
2.2.3. Eritrosit ve oksidatif stres.....	6
2.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Enzimi	7
2.3.1. Enzimin fonksiyonu	7
2.3.2. Enzimin yapısı.....	8
2.3.3. Enzimin genetiği	9
2.3.4. Enzimin varyantları	9
2.4. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Enzim Eksikliği.....	10
2.4.1. Tarihçesi.....	10
2.4.2. Sıtma ve G6PD eksikliği.....	11
2.4.3. Epidemiyoloji.....	12
2.4.4. Klinik belirtileri.....	12
2.4.4.1. İlaça bağlı akut hemolitik anemi	13
2.4.4.2. Enfeksiyona bağlı akut hemolitik anemi.....	13
2.4.4.3. Favizm.....	14
2.4.4.4. Yenidoğan sarılığı	16
2.4.4.5. Konjenital nonsferositik hemolitik anemi	16
2.4.5. Tanısı.....	17
2.4.6. Tanı sonrası sürecin yönetilmesi	18
2.5. Laboratuvar Kalite Kontrol	19
2.5.1. Kalite kontrol materyalleri	20
2.5.2. Kontrol materyali tipleri.....	20
2.5.2.1. Dondurulmuş kontrol materyali	20
2.5.2.2. Likit kontrol materyali	21
2.5.2.3. Liyofilize kontrol materyali	21
2.6. Liyofilizasyon	21

2.6.1. Genel bilgiler.....	21
2.6.2. Tarihçesi.....	22
2.6.3. Liyofilizasyon süreci.....	23
2.6.3.1. Dondurma.....	24
2.6.3.2. Primer kurutma.....	25
2.6.3.3. Sekonder kurutma	26
2.7. Liyoprotektan ve Kriyoprotektan Maddeler.....	26
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	31
3.1. Gereçler.....	31
3.1.1. Kimyasallar	31
3.1.2. Cihazlar	32
3.1.3. Sarf Malzemeler	32
3.2. Yöntem.....	33
3.2.1. Likit tam kan kontrol materyali hazırlanması	33
3.2.1.1. Numunelerin toplanması	33
3.2.1.2. Numune hazırlığı ve takibi.....	33
3.2.2. Likit enzim kontrol materyali hazırlanması	34
3.2.2.1. Hazırlanan tamponlar ve kokteyller	34
3.2.2.2. pH çalışması	35
3.2.2.3. Deney süreci.....	36
3.2.2.4. Laboratuvarlar arası çalışma	37
3.2.3. Liyofilize kontrol materyali hazırlanması.....	38
3.2.3.1. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler	38
3.2.3.2. Tam kan havuzu hazırlanması.....	39
3.2.3.3. Hemolizat oluşturulması	39
3.2.3.4. Liyofilizasyon aşaması.....	40
3.2.3.5. Liyofilizasyon sonrası takip aşaması	42
3.2.4. G6PD aktivite ölçüm metodu.....	42
3.2.5. İstatistiksel analiz	42
4. BULGULAR	44
4.1. TLC Değerinin Hesaplanması.....	44
4.2. Likit Tam Kan Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi	44
4.3. Likit Enzim Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi.....	46
4.3.1. Tampon deney verilerinin değerlendirilmesi	46
4.3.2. NADP deney verilerinin değerlendirilmesi.....	47
4.3.3. Albumin ve Albumin+NADP deney verilerinin değerlendirilmesi	49
4.3.4. DTT ve Glutasyon deney verilerinin değerlendirilmesi	52
4.3.5. Kokteyl deney verilerinin değerlendirilmesi.....	55
4.3.6. β -merkaptotanol ve EDTA deney verilerinin değerlendirilmesi.....	60
4.3.7. Sigma marka enzimle yapılan deney verilerinin değerlendirilmesi	61
4.3.8. Laboratuvarlar arası çalışma verilerinin değerlendirilmesi.....	62
4.3.9. Stabil olan ve olmayan kontrol materyallerinden bazılarının grafiksel olarak gösterilmesi	64
4.4. Liyofilize Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi	69
4.4.1. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Biyokimya ARGE Laboratuvarı'nda yapılan liyofilizasyon deney verilerinin sonuçlarının değerlendirilmesi.....	69
4.4.2. TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde yapılan liyofilizasyon deney verilerinin sonuçlarının değerlendirilmesi	70
5. TARTIŞMA	74
5.1. Likit Tam Kan Kontrol Materyali	74

5.2. Likit Enzim Kontrol Materyali	75
5.3. Liyofilize Kontrol Materyali	80
6. SONUÇ ve ÖNERİLER.....	84
KAYNAKLAR	86
EKLER.....	94
EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ	95
EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	98
ÖZGEÇMİŞ.....	101



KISALTMALAR

G6PD	: Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (indirgenmiş)
WHO	: Dünya Sağlık Örgütü
ATP	: Adenozin Trifosfat
NADH	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit (indirgenmiş)
PFY	: Pentoz Fosfat Yolu
NAD+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit (yükseltgenmiş)
FAD	: Flavin Adenin Dinükleotit (yükseltgenmiş)
DNA	: Deoksiriboz Nükleik Asit
RNA	: Ribonükleik Asit
NADP+	: Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (yükseltgenmiş)
GSH	: Glutatyon (γ-Glutamil Sisteinil Glisin)
GPx	: Glutatyon Peroksidaz
GSSG	: Okside Glutatyon
GR	: Glutatyon Redüktaz
G6P	: Glukoz 6 Fosfat
UGT1A1	: Üridin-difosfat-glukuronosil transferaz 1 gen promotörü
WST-8	: Formazan substratı
UV	: Ultraviyole
ISO	: Uluslararası Standardizasyon Organizasyonu (International Organization for Standardization)
ACD	: Asit-Sitrat-Dekstroz
CPDA	: Sitrat-Fosfat-Dekstroz-Adenin
EDTA	: Etilendiamintetraasetik asit
DTT	: Ditiyotreitol
NAC	: N- Asetilsistein
PBS	: Fosfat Salin Tamponu
%PD	: Yüzde Değişim
TLC	: Toplam Değişim Limiti
CVa	: Analitik değişkenlik
CVb	: Birey içi biyolojik değişkenlik
EFLM	: Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu
SL	: Stabilite Limiti
SPSS	: Statistical Package for the Social Science
NaOH	: Sodyum Hidroksit
HCl	: Hidroklorik asit
H₂O	: Su
CO₂	: Karbondioksit
H⁺	: Hidrojen iyonu
UME	: Ulusal Metroloji Enstitüsü
BSA	: Bovin Serum Albumin
Cys	: Sistein

AP : Alkalen Fosfataz
 β -ME : β -merkaptolanol
SH : Tiyol grubu
r-G6PD : Rekombinant G6PD
SD : Standart sapma



SEMBOLLER

μm	: mikrometre
nm	: nanometre
kDa	: kilodalton
bp	: baz çifti
IU/gHb	: gram hemoglobin başına International Unite
IU/RBC	: eritrosit başına International Unite
$\mu\text{mol/L}$: mikromol/litre
$^{\circ}\text{C}$: santigrat derece
mBar	: milibar
%	: yüzde
g/mol	: gram/mol
%w/w	: % ağırlık/ağırlık
mM	: milimolar
Tg	: cam geçiş sıcaklığı
$\mu\text{l/ml}$: mikrolitre/mililitre
ml	: mililitre
M	: molar
gr	: gram
RCF	: göreceli santrifüj kuvveti
IU	: International Unite
β	: Kararsızlık denklemi eğimi
.	

TABLO LİSTESİ

Sayfa

Tablo 2.1: WHO G6PD Eksikliği Sınıflandırması	10
Tablo 2.2: G6PD eksikliği olan hastalarda hemolizle ilişkili ilaçlar.....	14
Tablo 2.3: Liyoprotektan olarak kullanılan bazı maddeler [95].....	29
Tablo 3.1: Kullanılan kimyasallar ve markaları.....	31
Tablo 3.2: Kullanılan cihazlar ve markaları.....	32
Tablo 3.3: Kullanılan sarf malzemeler ve markaları.....	33
Tablo 3.4: Dahil olma ve dışlama kriterleri	34
Tablo 3.5: Çeşitli tamponlar ve distile su ile hazırlanmış olan kokteyllerin pH ölçüm sonuçları	35
Tablo 3.6: Deney aşamalarında çalışılan kombinasyonlar	38
Tablo 3.7: Bezmialem ve TÜBİTAK'ta liyofilizasyon aşamasında çalışılmak üzere hazırlanan hemolizat içerik listesi.....	40
Tablo 3.8: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ar-Ge laboratuvarında uygulanan liyofilizasyon prosedürü	41
Tablo 3.9: TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde uygulanan liyofilizasyon prosedürü.....	41
Tablo 3.10: TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde uygulanan primer kurutma aşaması	41
Tablo 4.1: Likit tam kan kontrol materyali deneyinin 45 °C stabilite çalışma verileri	45
Tablo 4.2: Likit tam kan kontrol materyali deneyinin 4 °C stabilite çalışma verileri	45
Tablo 4.3: Tampon 45°C stabilite çalışma verileri	47
Tablo 4.4: Tampon 4°C stabilite çalışma verileri.....	47
Tablo 4.5: NADP 45°C stabilite çalışma verileri.....	48
Tablo 4.6: NADP 4°C stabilite çalışma verileri.....	48
Tablo 4.7: Albumin 45°C stabilite çalışma verileri	49
Tablo 4.8: Albumin+NADP 45°C stabilite çalışma verileri	50
Tablo 4.9: Albumin+NADP 4°C stabilite çalışma verileri	51
Tablo 4.10: DTT+ Glutasyon 45°C stabilite çalışma verileri.....	52
Tablo 4.11: DTT+ Glutasyon 4°C stabilite çalışma verileri.....	53
Tablo 4.12: Kokteyl 45°C stabilite çalışma verileri.....	56
Tablo 4.13: Kokteyl 4°C stabilite çalışma verileri.....	57
Tablo 4.14: β -merkaptotanol- EDTA 45°C stabilite çalışma verileri	60
Tablo 4.15: Sigma marka enzimle yapılan 45°C stabilite çalışma verileri	61
Tablo 4.16: Sigma marka enzimle yapılan 4°C stabilite çalışma verileri	62
Tablo 4.17: Laboratuvarlar arası çalışmanın 2 aylık stabilite sonuçlarının karşılaştırılması	63
Tablo 4.18: Bezmialem'de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri	69

Tablo 4.19: Bezmialem’de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri	70
Tablo 4.20: TÜBİTAK UME’de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri	70
Tablo 4.21: TÜBİTAK UME’de hazırlanan ve +4 °C koşullarında 2 ay boyunca saklanan liyofilize kontrol materyallerinin stabilite çalışma verileri.....	72
Tablo 4.22: TÜBİTAK UME’de hazırlanan ve -20 °C koşullarında 2 ay boyunca saklanan liyofilize kontrol materyallerinin stabilite çalışma verileri.....	73



ŞEKİL LİSTESİ

Sayfa

Şekil 2.1: Eritrosit Metabolizması [16]	6
Şekil 2.2: Eritrosit ve Oksidatif Stres	7
Şekil 2.3: G6PD reaksiyon grafiği	8
Şekil 2.4: Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli [3]	8
Şekil 2.5: G6PD eksikliğinin görülme sıklığının dünya üzerinde dağılımı [3, 29] ...	12
Şekil 2.6: Favizmde Oksidatif Hasara Karşı Korumada G6PD'nin Rolü [55]	15
Şekil 2.7: Liyofilizasyon basamakları [83, 84].....	23
Şekil 2.8: Liyofilizasyon işlemi sırasında liyofilizasyon basamakları ile ürün arasındaki sıcaklık ve basınç ilişkisi [83, 84]	27
Şekil 2.9: Nanopartiküllerin stabilizasyonu için liyoprotektan kullanımı [95]	28
Şekil 2.10: Kriyoprotektanların sınıflandırılması	30
Şekil 3.1: Fiziksel etki ön deney sonuç grafiği (solda), sıcaklık ön deney sonuç grafiği (sağda)	36
Şekil 3.2: Liyofilize kontrol materyali geliştirilmesinde gerçekleştirilen deney basamaklarının şematik gösterimi.....	42
Şekil 4.1: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinTris-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil).....	65
Şekil 4.2: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinTris-Stok50-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil).....	65
Şekil 4.3: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinNaOH-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan).....	66
Şekil 4.4: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinNaOH-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan).....	66
Şekil 4.5: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Glisin-Stok200-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil).....	67
Şekil 4.6: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Glisin-Stok50-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil).....	67
Şekil 4.7: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Tris-Stok200-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan).....	68
Şekil 4.8: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Tris-Stok50-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan).....	68

GLUKOZ 6 FOSFAT DEHİDROJENAZ TANI KİTİ KONTROL MATERYALİNİN GELİŞTİRİLMESİ VE STABİLİZASYONU

ÖZET

Glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (G6PD), eritrositlerin bütünlüğünü korumak ve oksidatif stresi önlemek için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üreten pentoz fosfat yolundaki hız kısıtlayıcı enzimdir. G6PD eksikliği, dünyanın birçok bölgesinde olmak üzere 400 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Ülkemiz genelinde %0,5, Çukurova bölgesinde %8.2 oranında görülmektedir. Hastalara sadece eksikliğin olduğunu söylemek yeterli değildir, çünkü semptomların şiddeti enzim aktivitesinin miktarına bağlıdır. Bu sebeple kantitatif metotlar klinik takip, tedavi ve alınacak önlemler açısından önem taşımaktadır.

Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz G6PD aktivite ölçüm kitinin validasyon aşamalarını tamamladıktan sonra rutin laboratuvarımızda kullanılmaya başlandı. Yaptığımız ön çalışmalarda kullanmış olduğumuz likit enzim kontrol materyallerinin merkezler arası transfer sırasında sıcaklık değişiminden etkilenerek aktivite kaybına uğradığı tespit edildi. Rutin laboratuvarlarda gün içinde doğru sonuç verilip verilmediğini kontrol etmek ve analitik hataları belirleyebilmek için kullanılan kontrol materyalleri önemli olduğundan bu soruna odaklanıldı. Çalışmamızda farklı yöntem ve kimyasallar kullanılarak stabilitesi uzun G6PD kontrol materyali geliştirmek hedeflendi. Likit tam kan, likit enzim ve liyofilize kontrol materyalleri üzerine çalışıldı.

Likit tam kan kontrol materyali için planladığımız 45°C ve +4°C koşullarında yaptığımız deneyler sonucunda kontrol materyali olarak likit tam kanın kullanılmasının uzun süre depolama ve uzak merkezler arası transport koşullarında bir avantaj sağlamayacağı sonucuna varıldı. Stabilite takiplerinde ACD ve CPDA tüplerinin +4°C saklama koşullarında 6-8 hafta arasında stabil kaldığı görüldü. G6PD enzim aktivitesi çalışmak isteyip hemen çalışmayan ve numunelerin dış merkeze transportunu gerektiren durumlarda ACD ve CPDA içeren tüpler kullanılabilir.

Likit enzim kontrol materyali için yaptığımız deneyler ve laboratuvarlar arası çalışmada Glisin ve GlisinTris tamponunda çözölen enzim kontrol materyalleri hedeflenen sürelerde stabil kaldı.

Liyofilize kontrol materyalleri, rutin kullanımda uzun süreli depolama ve uzak merkezlere transfer gibi uzun süreli stabilite gerektiren durumlarda avantajlıdır. Çalışmamızda hemolizat örneklerinin liyofilizasyonu üzerine çalışıldı. CPDA

solüsyonu ile farklı dilüsyon oranları oluşturularak liyofilize edilen ve CPDA ile oda sıcaklığında çözülen kontrol materyallerinde 1 haftalık stabilite elde edildi. G6PD enzim aktivitesi eksik ve normal olan bireylerden alınacak kan örnekleriyle ayrı ayrı stok hazırlamadan farklı dilüsyonlarla farklı seviyelerde kontrol materyali hazırlanabilir. Çalışmamızda hazırlanan liyofilize kontrol materyalleri deney setlerinden bazıları -20°C ve 4°C’de muhafaza edildi. 2 ay muhafaza edildikten sonra çözülen materyallerin stabilite çalışma verilerinde -20°C koşullarında saklama koşullarının faydalı olacağı görüldü. Aynı zamanda her iki sıcaklık koşullarında da albumin ve gliserol gibi liyoprotektanlar eklenerek stabilitenin arttığı gözlemlendi.

Çalışmamızda, G6PD enzimi aktivitesi ölçüm kiti için stabil bir kontrol materyali geliştirilmiştir. Ayrıca tezimiz eritrositlerde çalışılan ve benzeri enzim parametrelerinin kontrol materyallerinin geliştirilmesi konusunda literatüre katkı sağlamıştır. Üniversitemizde üretilen G6PD kiti ve kontrol materyali üretimi konusunda yaptığımız tez çalışmamız yerli ve milli üretimde, laboratuvarlarda dışa bağımlılığı azaltmada önemli bir adım olacak ve ülkemize büyük katkı sağlayacaktır.

Anahtar Kelimeler: G6PD, tanı kiti, kontrol materyali, otoanalizör

DEVELOPMENT AND STABILIZATION OF GLUCOSE 6 PHOSPHATE DEHYDROGENASE DIAGNOSTIC KIT CONTROL MATERIAL

SUMMARY

Glucose 6 phosphate dehydrogenase (G6PD) is the rate-limiting enzyme in the pentose phosphate pathway, which produces nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) to maintain the integrity of erythrocytes and prevent oxidative stress. G6PD deficiency affects more than 400 million people in many regions of the world. It is seen at a rate of 0.5% throughout our country and 8.2% in the Çukurova region. It is not enough to just tell patients that there is a deficiency, because the severity of the symptoms depends on the amount of enzyme activity. For this reason, quantitative methods are important for clinical follow-up, treatment and precautions to be taken.

After completing the validation stages of the G6PD activity measurement kit we produced within our university, it started to be used routinely in our laboratory. In our preliminary studies, it was determined that the liquid enzyme control materials we used suffered loss of activity as a result of temperature changes during transfer between centers. This problem was focused on because the control materials used in routine laboratories to check whether correct results are given during the day and to detect analytical errors are important. In our study, we aimed to develop G6PD control material with long stability by using different methods and chemicals. Liquid whole blood, liquid enzyme and lyophilized control materials were studied.

As a result of the experiments we conducted at 45°C and +4°C conditions that we planned for liquid whole blood control material, it was concluded that using liquid whole blood as control material would not provide an advantage in long-term storage and transportation conditions between remote centers. Stability follow-ups showed that ACD and CPDA tubes remained stable for 6-8 weeks under +4°C storage conditions. Tubes containing ACD and CPDA can be used in cases where G6PD enzyme activity cannot be studied immediately and samples need to be transported to an external center.

In our experiments and interlaboratory studies for liquid enzyme control material, enzyme control materials dissolved in Glycine and GlycineTris buffer remained stable for the targeted periods.

Lyophilized control materials are advantageous in routine use in situations requiring long-term stability, such as long-term storage and transfer to remote centers. In our study, lyophilization of hemolysate samples was studied. Stability for 1 week was achieved in control materials that were lyophilized by creating different dilution rates with CPDA solution and dissolved with CPDA at room temperature. With blood

samples taken from individuals with deficient and normal G6PD enzyme activity, different levels of control material can be prepared with different dilutions without preparing separate stocks. Some of the experimental sets of lyophilized control materials prepared in our study were stored at -20°C and 4°C. In the stability study data of the thawed materials after being stored for 2 months, it was seen that storage conditions at -20°C would be beneficial. At the same time, it was observed that stability increased by adding lyoprotectants such as albumin and glycerol in both temperature conditions.

In our study, a stable control material was developed for the G6PD enzyme activity measurement kit. In addition, our thesis contributed to the literature on the development of control materials for similar enzyme parameters studied in erythrocytes. Our thesis work on the production of G6PD kit and control material produced at our university will be an important step in reducing foreign dependency in domestic and national production and laboratories and will make a great contribution to our country.

Keywords: G6PD, diagnostic kit, control material, autoanalyzer

1. GİRİŞ ve AMAÇ

Glukoz 6 fosfat dehidrojenaz (G6PD), eritrositlerin bütünlüğünü korumak ve oksidatif stresi önlemek için nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) üreten pentoz fosfat yolundaki hız kısıtlayıcı enzimdir. NADPH'nin bir molekülü, reaktif oksijen türlerinin veya diğer serbest radikallerin azaltılması ve proteinlerdeki redoks reaksiyonlarının dengesinin korunması için çok önemli olan indirgenmiş glutatyonu üretmek için gereklidir. Eritrositlerde pentoz fosfat yolundan başka NADPH üretim yolu bulunmamaktadır [1].

G6PD eksikliği, dünyanın birçok bölgesinde olmak üzere 400 milyondan fazla kişiyi etkilemektedir. Ülkemiz genelinde %0.5, Çukurova bölgesinde %8.2 oranında görülmektedir [2]. G6PD eksikliği hastalarının çoğu çeşitli uyaranlar tarafından tetiklenene kadar yaşamları boyunca asemptomatik olmaktadır. Bu uyaranlar; antimalariyal grubu gibi oksidatif ilaçlar, enfeksiyon, bakla, gıdalardaki bazı koruyuculara maruziyet, diyabet, miyokard enfarktüsü ve yorucu fiziksel egzersiz gibi oksidatif stresi artıran çeşitli klinik durumlar olarak sıralanabilir. Uyaranlara maruz kaldıktan sonra semptomlar, 24-48 saat içinde genellikle akut hemolitik anemi olarak ortaya çıkar. G6PD eksikliği olan hastaların klinik belirtileri karakteristik olmakla birlikte, semptomların şiddeti enzim aktivitesinin miktarına bağlıdır [3]. Hastaları değerlendirirken pratik bir sınıflama olması için Dünya Sağlık Örgütü (WHO), G6PD varyantlarını klinik özelliklerine ve enzim aktivite düzeyine göre beş gruba ayırmıştır. Bu sebeple kalitatif metotlardan ziyade aktivitenin ölçüldüğü kantitatif metotlar kullanılması klinik takip, tedavi ve alınabilecek önlemler açısından önem taşımaktadır.

Laboratuvarın yeri tanı koyma ve tedavi takibinde çok önemlidir. Bu yüzden hasta numunelerinden güvenilir ve kabul edilebilir sonuçlar vermek her laboratuvarın birincil hedefidir. Tıbbi laboratuvardaki hatalar preanalitik, analitik veya postanalitik evrede olabilmektedir. Rutin laboratuvarlarda gün içinde doğru sonuç verdiğimizizi kontrol etmek ve analitik aşamada olabilecek hataları belirlemek için kullandığımız

kontrol materyalleri büyük önem taşımaktadır. Teorik olarak dondurulmuş, likit ve liyofilize olmak üzere 3 tip kontrol materyali üretilmektedir.

Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz G6PD aktivite ölçüm kiti, validasyon çalışmaları bitirildikten sonra rutin laboratuvarımızda kullanılmaya başlanmıştır. Yaptığımız ön çalışmalarda kullanmakta olduğumuz likit enzim kontrol materyalinin merkezler arasında transferi sırasında sıcaklık değişiminden etkilenecek aktive kaybına uğradığı tespit edilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda tez çalışmamda farklı yöntem ve kimyasallar kullanarak likit enzim, likit tam kan ve liyofilize kontrol materyalleri üzerinde çalışılarak stabilitesi en uzun G6PD kontrol materyalini geliştirmek hedeflenmiştir.



2. GENEL BİLGİLER

2.1. Eritrositler

Kan, içerdiği özel hücrelerin yanında çeşitli biyomolekülleri bünyesinde bulunduran ve sudan oluşan sıvı bir doku olarak kabul edilmektedir. Kan, içerisinde bulunan bileşenler sayesinde insan vücudunda homeostazı sağlamada önemli rol oynar. Kanın başlıca fonksiyonları taşıma, düzenleme ve korumadır. Kanda en fazla bulunan hücre kırmızı kan hücreleri diye adlandırılan eritrositlerdir. Eritrositlerin başlıca görevi, organizmanın ihtiyacı olan oksijeni taşımak, karbondioksiti uzaklaştırmak ve protonların hemoglobine bağlanması yoluyla kanın tamponlanmasına katkı sağlamaktır. Eritrositlerin kemik iliğinde öncü hücrelerden gelişip olgunlaştıktan sonra dolaşımdaki ömrü yaklaşık 120 gündür. Farklılaşma sürecinde tüm iç organellerini kaybeden insan eritrositleri, çekirdeksiz ve bikonkav disk şeklindedir [4]. Normal bir eritrositin çapı 7–8.7 µm, kalınlığı 1.5–2.5 µm'dir [5-7]. Eritrositin membran kalınlığı 6 nm olup, yapısının %49'unu protein, %44'ünü lipid, %7'sini karbonhidrat oluşturmaktadır [8]. Hücre yapısının korunması ile hücre zarının esnekliği ve bütünlüğünün sağlanabilmesi için eritrositlerin fazla miktarda metabolik enerjiye ihtiyaçları vardır. Eritrositlerde hücrenin temel enerji kaynağı olan mitokondri bulunmaması metabolik kapasitelerini kısıtlamaktadır [9]. Eritrositler yaşlandıklarında retiküloendotelyal sistem hücreleri tarafından uzaklaştırılır ve hemoglobinleriyle birlikte yıkılırlar.

2.2. Eritrosit Metabolizması

Olgun eritrositlerin öncü hücreleri metabolik olarak aktif olmakla birlikte çeşitli biyomolekülleri sentezleyebilir ve oksidatif fosforilasyonla enerji üretebilirler. Ancak, olgun eritrositler gelişim sırasında organellerini kaybettiklerinden dolayı bu fonksiyonları yapmak için gerekli enzimleri yoktur. Her hücre gibi eritrositler de fonksiyonlarını yerine getirmek için enerjiye ihtiyaç duyarlar. Enerjiyi mitokondrileri olmadığından oksidatif fosforilasyon ve Krebs siklusu aracılığıyla üretemezler. Bu

sebeple eritrositlerde aktif olan glikoliz ve pentoz fosfat yolu, metabolizmaları için önemlidir. Bu iki yol gerekli olan enerjiyi ve indirgeyici güç kapasitesini karşılamaktadır [8].

2.2.1. Glikoliz

Glikoliz, ökaryot ve prokaryot olmak üzere tüm canlı hücrelerde organizmaya enerji sağlayan reaksiyonlar dizisidir. Literatürde Embden-Meyerhof yolu olarak da anılmaktadır. Glukoz, eritrositlerin temel enerji kaynağıdır. Normal fizyolojik koşullar altında, glükozun %90'ı glikolizle (Embden-Meyerhof yolu) anaerobik olarak pirüvat veya laktata katabolize edilir. 1 mol glükozun glikoliz yolağına girmesiyle fosfogliserat kinaz ve pirüvat kinaz basamaklarında toplam 4 mol ATP üretilmektedir. Hezokinaz ve fosfofruktokinaz enzimlerinin katalizlediğı fosforilasyon basamaklarında ise toplam 2 mol ATP kullanılmaktadır. Enerji bakımından net kazanç 1 mol glükoz başına 2 ATP olmaktadır. Glikoliz sırasında elde edilen enerji oldukça azdır. Bu yol mitokondri içermeyen eritrositler gibi hücrelerin enerji ihtiyacının karşılanmasında ve oksijen miktarının yetersiz kaldığı koşullarda çizgili kaslarda enerji elde etmek için gereklidir [8]. Ayrıca gliseraldehit-3-fosfat dehidrojenaz tarafından katalize edilen aşamada indirgeyici bir molekül olan NADH üretilir. Üretilen NADH, eritrositlerde sitokrom b5 redüktaz yoluyla methemoglobini hemoglobine indirgemek için kullanılabilir. Burada oksitlenmezse, glikolizin son basamağında oluşan pirüvatın laktat dehidrojenaz ile laktata indirgenmesinde kullanılır. Ayrıca glikoliz, organizmaya önemli metabolik ara ürünler de kazandırır. Glikolizin son ürünü ise pirüvattır. Glikoliz, inhibe edici ve uyarıcı faktörlerden oluşan karmaşık bir mekanizmaya sahiptir. Bu yolun genel hızı hezokinaz, fosfofruktokinaz ve pirüvat kinaz olmak üzere 3 hız sınırlayıcı enzim ve NADH ve ATP'nin varlığı tarafından düzenlenir. Bazı glikolitik enzimler, yolun ara ürünleri tarafından allosterik olarak uyarılır veya inhibe edilir [8-10].

Eritrositlerde glikolizin diğer bir amacı ise 2,3-bisfosfogliserat sentezidir. Eritrositlerde bisfosfogliserat mutaz adlı spesifik bir enzim bulunmaktadır. Bu enzim 1,3-bisfosfogliseratu molekül içi düzenlemeyle 2,3-bisfosfogliserata dönüştürür. Bu glikolitik ürün hemoglobinin allosterik düzenleyicisidir. Hemoglobinin oksijene ilgisini azaltarak dokulara oksijenin verilmesini kolaylaştırır. 2,3-bisfosfogliserat, fosfataz enzimi ile tekrar 3-fosfogliserata çevrilir. 2,3-bisfosfogliserat, mutaz enzimini

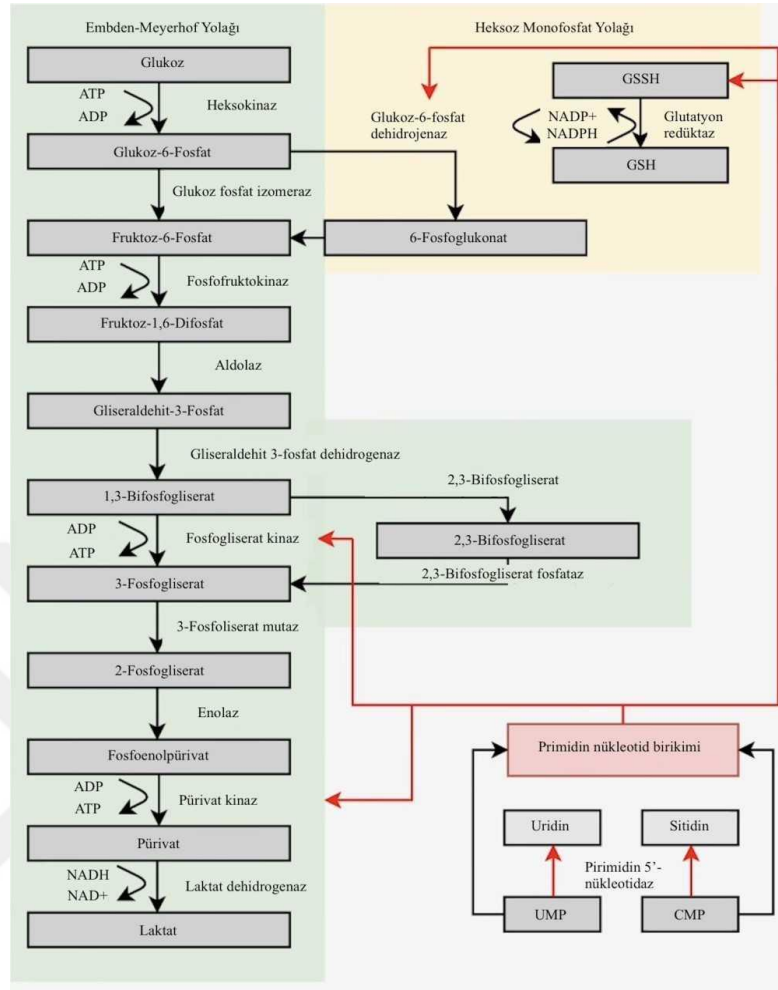
feedback inhibisyonla kontrol eder. Enerji ihtiyacı olduğunda hücrede fosfogliserat kinaz yolu işler (Şekil 2.1) [8].

2.2.2. Pentoz fosfat yolu

Pentoz fosfat yolu (PFY) keşfedilen ilk metabolik yollardan biridir. Literatürde pentoz fosfat yolundan, heksoz monofosfat yolu veya fosfoglukonat oksidatif yolu olarak da bahsedilmektedir. 1930'larda PFY üzerine yapılan çalışmalar Otto Walburg tarafından teşvik edilmiştir [11, 12]. Sonraki otuz yılda, büyük ölçüde Cornell Üniversitesi'nden Bernard Horecker tarafından yönlendirilen, ancak Arthur Kornberg, Terry Wood, Frank Dickens, Fritz Lipmann, Severo Ochoa, Hans Klenow gibi önde gelen biyokimyacıların önemli katkılarıyla yürütülen çalışmalar ile PFY'nin taslağı ortaya çıkmıştır [13, 14].

Eritrositlerde temel enerji kaynağı olan glukozun kullanımı için tek oksidatif yol PFY'dir [15]. Eritrositlerin varlığını sürdürebilmesi için PFY önemlidir. PFY, oksidatif ve nonoksidatif olmak üzere iki aşamada gerçekleşmektedir. PFY'nin oksidatif aşaması glukoz-6-fosfat dehidrojenaz enziminin katalizlediği tepkime ile başlayarak bir dizi geri dönüşümsüz tepkime dizisi ile devam etmektedir. Bu aşamada önemli bir indirgeyici molekül olan NADPH üretilmektedir (Şekil 2.1). PFY'nin nonoksidatif aşamasında ise geri dönüşümlü reaksiyonlar sonucunda bazı önemli bileşikler için ön madde olan riboz-5-fosfat üretilmektedir. Ayrıca bu tepkimeler aracılığıyla glikolitik ve glukoneojenik yollarla bağlantı sağlanmaktadır. PFY'de oluşan serbest enerji ATP'ye dönüştürülemez. Üretilen NADPH organizmada yağ asidi, steroid ve kolesterol sentezinde, ksenobiyotiklerin zararlı etkisini elimine etmeyi sağlayan oksidaz sisteminde, glutatyonun yenilenmesinde, deoksiriboz oluşumunda, bazı aminoasitlerin ve glukuronik asit metabolizmasında kullanılmaktadır. Üretilen pentozlar ise ATP, NAD⁺, FAD, DNA, RNA, gibi bileşiklerin yapısına katılmaktadır [8]. Bu yolun toplam reaksiyonu aşağıdaki gibidir:





Şekil 2.1: Eritrosit Metabolizması [16]

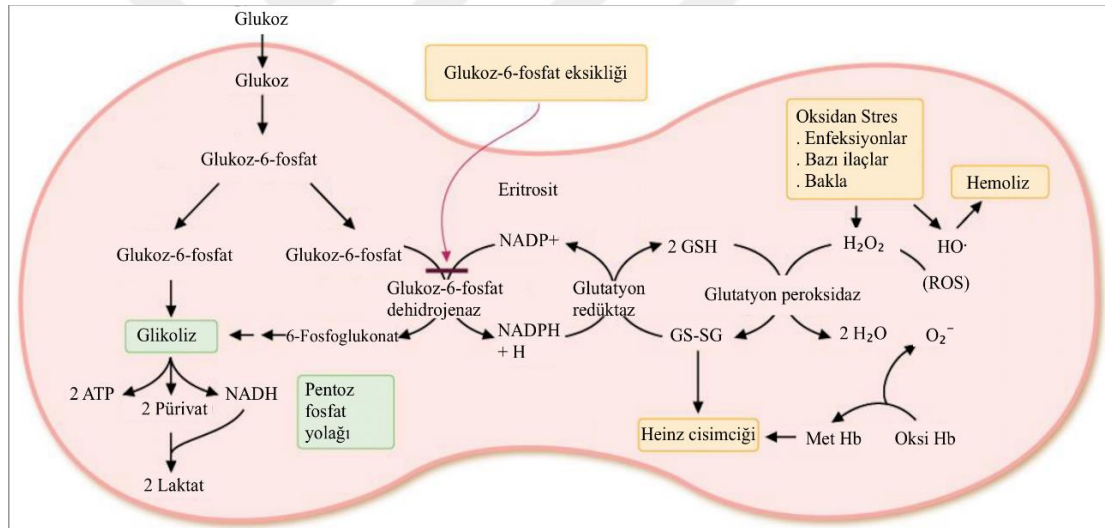
2.2.3. Eritrosit ve oksidatif stres

Reaktif oksijen türevleri, eritrositlerde hemoglobini methemoglobine dönüştürmekte ve membran lipidlerinde peroksitler oluşturmaktadır. PFY’de üretilen NADPH, oksitlenmiş glutatyonun rejenerasyonunda rol oynayarak eritrositlerin oksidatif strese karşı korunmasını sağlar [17, 18]. Glutatyon (γ -Glutamil Sisteinil Glisin, GSH) glutamat, sistein ve glisin aminoasitlerinden oluşan bir tripeptittir. GSH’deki serbest bulunan tiyol grubu oksidatif strese karşı koruyucu olmasını sağlamaktadır. GSH molekülüne serbest -SH grubunu sistein vermiştir.

Hücre zarında birçok protein ve enzim bulunmaktadır. Bunlar serbest oksijen radikalleriyle okside olurlarsa GSH, -SH grubunu okside olan proteine vererek -SH gruplarının redükte durumda tutulmasını sağlar. Methemoglobin ve peroksitlerin redüksiyonunu sağlamak için selenyum içeren glutatyon peroksidaz (GPx) ile GSH

oksitlenir ve iki glutasyon molekülü disülfid bağı ile birbirine bağlanır. Tekrar kullanılabilmesi için okside glutasyonun (GSSG) rejenere olması gerekmektedir. GSSG, glutasyon redüktaz (GR) aracılığıyla NADPH+H⁺'lar kullanılarak GSH'ye indirgenmektedir [8, 19].

Eritrositlerde GR'nin kullandığı NADPH, G6PD enziminin katalizlediği PFY'nin birinci ve hız kısıtlayıcı basamağında üretilmektedir. NADPH, GR'nin koenzimi olarak görev yapmaktadır. GR, gerekli hidrojeni NADPH molekülünden transfer ederek GSSG'nin GSH'ye dönüşümünü katalizler. Böylece glutasyon rejenerasyonu sağlanarak eritrosit hücresi oksidatif strese karşı korunmuş olur. G6PD eksikliğinde, eritrosit için önemli bir redüktif kaynak olan NADPH üretilemediğinden oksidatif stres gelişir. NADPH üretiminin sürekliliği, eritrositlerin yaşam döngüsünde kritik bir öneme sahiptir (Şekil 2.2) [8].



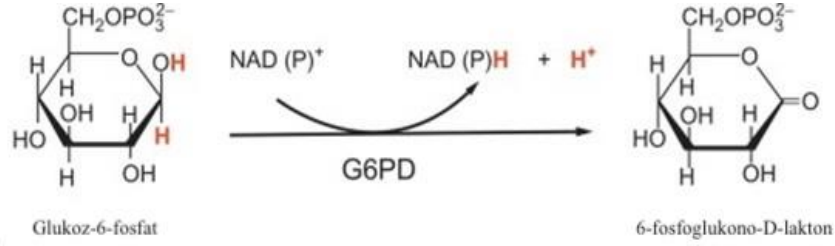
Şekil 2.2: Eritrosit ve Oksidatif Stres

2.3. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Enzimi

2.3.1. Enzimin fonksiyonu

G6PD enzimi, glukoz-6-fosfatı (G6P) 6-fosfoglukonalaktona dönüştürmesi sırasında G6P'nin 1. karbonundaki hidrojeni NADP'ye aktarır ve NADPH oluşur. Bu reaksiyon PFY'nin hız kısıtlayıcı basamağıdır (Şekil 2.3)[8]. Bu aşamada heksoz şekerinin pentoz şekerine dönüşümünün yanında birçok biyosentetik yolun elektron donörü olan

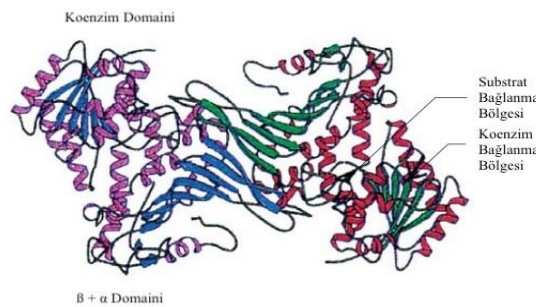
NADPH üretimi de gerçekleşmiş olur. Eritrositlerde üretilen NADPH, reaktif oksijen türevleri veya diğer serbest radikallerin azaltılması ve proteinlerdeki redoks reaksiyonlarının dengesinin korunması için önemli olan GSH'nin üretilmesi için önemli bir indirgeyici moleküldür [1, 20]. G6PD tüm hücrelerde mevcuttur; ancak konsantrasyonu farklı dokularda değişiklik göstermektedir [21]. Sağlıklı kırmızı kan hücrelerinde enzim maksimum potansiyelinin yalnızca %1-2'siyle çalışmaktadır.



Şekil 2.3: G6PD reaksiyon grafiği

2.3.2. Enzimin yapısı

G6PD geni, 13 ekzon ve 12 introndan oluşan X kromozomu üzerinde yer almaktadır [22]. Bu genin ürünü olan monomer, sitozolde yer alan, molekül ağırlığı 59 kDa olan, 515 amino asitten oluşan bir proteindir [23]. G6PD'nin üç boyutlu yapısının bir modeli 1996'da yayınlanmıştır [24] ve daha sonra insan G6PD enziminin kristal yapısı açıklanmıştır [25]. Aktif insan G6PD enzimi, pH dengesine bağlı olan dimer veya tetramer formunda bulunur. Alkali ortamda enzim dimer formunda bulunur iken, asidik durumda ise tetramer formundadır [26]. Her monomer 2 domainden oluşur: koenzim domaini ve $\beta + \alpha$ domaini. Bir α -heliks bağı 2 domaini birbirine bağlar. Her domain, bir öncü bağlanma bölgesi oluşturan sekiz peptid zincirinden oluşur. Her alt birim, NADP substratı ve G6P substratı için bağlanma bölgelerine ek olarak 1 molekül sıkı bağlı NADP'ye sahiptir. İnsan G6PD enzimi dimer-tetramer dengesindedir ve stabilitesi NADP konsantrasyonuna da bağlıdır (Şekil 2.4) [25].



Şekil 2.4: Aktif G6PD dimerinin üç boyutlu modeli [3]

2.3.3. Enzimin genetiği

İnsan G6PD enziminin geni Gd, X kromozomunun uzun kolunun (Xq28 bandı) telomerik bölgesine yakın bir yerde bulunur [27]. G6PD eksikliği, X'e bağlı bir genetik kusurdur. Bu nedenle erkeklerin bu durumdan kadınlara göre etkilenme olasılığı daha yüksektir. Aynı zamanda hemofili A gibi hastalıklara sebep olan genlere yakın konumda bulunmaktadır. İnsan G6PD geni, insan genomunun tam olarak dizilenen ilk bölgesidir. Gd geni 1986'da klonlanmıştır ve 12 intron ile 13 ekzondan oluşmaktadır. 59 kDa molekül ağırlığına ve toplam 20.114 bp uzunluğuna sahiptir ve bu genden 515 amino asit kodlanmaktadır [23]. X'e bağlı resesif kalıtımda, erkeklerde (XY) yalnızca bir gende kusur olması eksikliğe neden olması için yeterlidir. Bu sebeple erkeklerde eksikliğin görülme ihtimali yarı yarıyadır. Yani yalnızca eksik (Gd-) veya normal (Gd+) olmaktadırlar. Kadınlarda (XX) ise kusurlu genin bozukluğa neden olması için her iki X kromozomunda da bulunması gerekir. Yani normal (Gd+/Gd+), heterozigotlar (Gd+/Gd-) ve eksik (Gd-/ Gd-) olmak üzere 3 olasılığa sahiptirler. Yalnızca bir kusurlu gene sahip olan kadınların fenotipi sıklıkla “orta düzey (intermediate)” olarak adlandırılır, çünkü bu grubun G6PD aktivite düzeyleri genellikle normal ile eksik aralık arasında kalmaktadır [20].

2.3.4. Enzimin varyantları

G6PD geninin kodlama dizisini etkileyen değişiklikler farklı enzim aktivitesi oluşturan varyantları ortaya çıkartır. G6PD varyantlarının çoğunluğu çeşitli enzim aktivitesine yol açan amino asit değişikliğine yol açan tek baz değişimlerinden kaynaklanır. Sonuç olarak, polimorfizmlerin ortaya çıkması, bozukluğun ciddiyetinin enzimin aktivitesine bağlı olduğunu göstermektedir. 1967'de WHO komisyonu, G6PD varyantlarını ayırt etmek için enzimin aktivitesi, elektroforetik hareketliliği, ısı stabilitesi, G6P katabolizmasının etkinliği gibi özelliklerini kullanarak enzimin biyokimyasal karakterizasyonu üzerinde çalışma yapmıştır [28]. Bu süreç sonucunda 100 tanesi insan varyantı olmak üzere yaklaşık 430 varyant bulunmuştur. Bu çeşitliliğin pratik yaklaşımda kargaşa yaratmaması için WHO, enzim aktivitesine ve klinik semptomlara bağlı olarak G6PD varyantlarını 5 sınıfa ayırmıştır (Tablo 2.1) [29].

Tablo 2.1: WHO G6PD Eksikliği Sınıflandırması

Sınıf I	Enzim aktivitesi normalin %10'undan daha düşük, kronik hemolitik anemi
Sınıf II	Ciddi derecede eksiklik, genellikle aralıklı (ilaçlar, enfeksiyon, kimyasallara ve bakla tüketimine ikincil) hemolitik anemi
Sınıf III	Orta derecede enzim eksikliği (%10-60), aralıklı hemolitik anemi
Sınıf IV	Normal aktivite (%60-150), enzim eksikliği ve hemoliz yok
Sınıf V	Yüksek aktivite (>%150)

En sık görülen G6PD varyantları şu şekildedir [2]:

G6PD B: En sık görülen normal varyanttır. Beyaz ırk, Asya ve siyah ırkın büyük bir kısmında görülmektedir (Sınıf IV).

G6PD A: Siyah Afrikalıların %10-20'sinde görülmektedir (Sınıf IV).

G6PD A-: En sık görülen enzim eksikliği varyantıdır. Orta ve ağır derecede hemolize sebep olur (Sınıf III). Siyah Afrikalılarda ve Afrika kökenli Amerikalılarda görülür. Yenidoğan sarılığı ve oksidasyona yol açan ilaçlarla hemoliz görülür. Favizm daha nadirdir.

G6PD Akdeniz: Beyaz ırkta en sık görülen varyanttır. Ülkemizde görülen formdur ve ağır hemolize yol açar (Sınıf II). Yenidoğan sarılığı görülür ve ciddi boyutta olabilir. Favizm ve oksidasyona sebep olan ilaçlarla hemoliz de sıklıkla görülmektedir.

2.4. Glukoz-6-Fosfat Dehidrojenaz Enzim Eksikliği

2.4.1. Tarihçesi

G6PD, Otto Warburg ve Walter Christian tarafından 1932'de maya ve kırmızı kan hücrelerinde redoks fonksiyonlu bir enzim olarak karakterize edilmiştir [30, 31]. 19. yüzyılda Yunanistan, Portekiz ve İtalya'daki çocuk doktorları tarafından bakla yiyen çocuklarda anemi ve hemoglobinüri olduğu gözlemlenmiştir. Favizm olarak isimlendirilen bu durumun aynı kişilerde ve ailelerinde tekrarlandığı farkedilmiştir [32]. 1920'li yıllarda sıtmanın tedavi ve profilaksisinde kullanılan 8-aminokinolinlerin (primakin ve plazmokin) yan etkisi olarak hastalarda akut hemolitik anemi görülmüştür. Bu durumun aynı kişilerde tekrarlandığı tespit edildikten sonra görülen

yan etki primaquine duyarlılık sendromu olarak adlandırılmıştır [33]. Yapılan çalışmalarda favizm geçmişi olan çocuklar ve primaquine duyarlılık sendromu olan kişilerden alınan kırmızı kan hücrelerinde G6PD aktivitesinde eksiklik olduğu tespit edilmiştir [34, 35]. Daha sonraki yıllarda G6PD eksikliğinin genetik olarak X'e bağlı geçiş gösterdiği kanıtlanmıştır [36]. Ekzojen bir tetikleyici olmadığında G6PD eksikliği olan kişilerde hiçbir patolojinin olmadığı fakat primakin veya bakla gibi tetikleyiciler varlığında hemolitik anemi olduğu gözlenmiştir. Bu klinik durum bir gen ile çevresel bir faktör arasındaki spesifik bir etkileşimden kaynaklanan bir hastalığın prototipi haline gelmiştir.

2.4.2. Sıtma ve G6PD eksikliği

Sıtma, Plasmodium türlerinin neden olduğu, hayatı tehdit eden sivrisinek kaynaklı hastalıklardan biridir. Enfekte dişi Anofel sivrisineğinin ısırması yoluyla bulaşır. Memeliler, özellikle de insanlar, aralarında *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* ve *P. knowlesi*'nin de bulunduğu beş Plasmodium türünün taşıyıcısı olabilir. En öldürücü Plasmodium türü *P. falciparum*'dur. Diğer türler genellikle hafif sıtmaya neden olmaktadır. Ayrıca *P. falciparum* ve *P. vivax* en yaygın türler olup halk sağlığına en fazla etki edenlerdir. Sıtma, cibinlik, böcek ilacı kullanımı, ilaç tedavileri veya hem önleme hem de tedavi gibi kombinasyon kontrol uygulamalarıyla yönetilmektedir. Artemisinin türevlerinin 8-aminokinolin ile kombinasyonu olan sıtma ilacının yaygın kullanımı, sıtmadan ölümlerin sayısında önemli bir düşüşe yol açmıştır. Ancak bazı hastalarda G6PD eksikliği gibi klinik durumların olması kullanılan ilaçların yan etki yapmasına sebep olmaktadır. Bu sebeple kullanılırken bunlar göz önünde bulundurulmalıdır [37].

Literatürde G6PD eksikliğinin, Plasmodium spp.'nin neden olduğu ciddi sıtmaya karşı korunmada bir miktar etkiye sahip olduğu genel olarak kabul edilmektedir. G6PD eksikliği kırmızı kan hücrelerinde oksidatif stresin artmasına neden olur ve bu durum parazit üzerinde olumsuz etkiye sahiptir. Dolayısıyla bu mutasyona sahip bireylerin sıtmaya karşı bir miktar koruması olduğu düşünülmüştür [38].

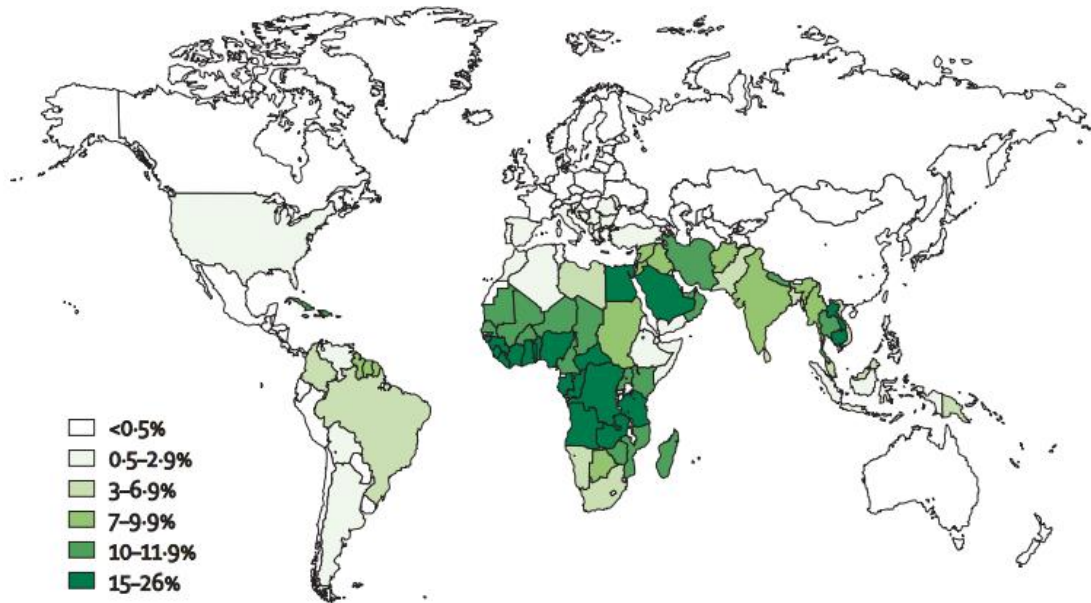
Özetle, sıtmanın endemik olduğu bölgelerde yaşayan ve her yıl sıtmayla enfekte olan G6PD eksikliği olan hastalarda literatür ışığında korunma olacağı ihtimali düşünülse de hastalık seyrinde akut hemolitik anemi görülebilmektedir. Yine sıtma tedavisinde kullanılan ilaçlar bu hastalarda yan etkiye sebep olabilmektedir [39]. Bu sebeple bir ön test yapılarak G6PD eksikliği taraması yapılması gerekmektedir. Bu tarama testi,

sıtmaya karşı ilacın sağlanması konusunda bilinçli karar verilmesinin yanı sıra eksiklikten kaynaklanacak olumsuz etkileri en aza indirmeyi sağlayacaktır.

2.4.3. Epidemiyoloji

Dünya çapında en az 400 milyon insanın G6PD eksikliğine neden olan gen mutasyonunu taşıdığı tahmin edilmektedir (Şekil 2.5). En yüksek prevalans Afrika, Güney Avrupa, Orta Doğu, Güneydoğu Asya ile Orta ve Güney Pasifik adalarında rapor edilmektedir. Ancak son yıllarda artan göç nedeniyle Kuzey ve Güney Amerika ile Kuzey Avrupa'nın bazı bölgelerinde de eksiklik alleli yaygın olarak görülmeye başlanmıştır [40]. Ülkemiz genelinde G6PD eksikliği %0.5, Çukurova bölgesinde ise % 8.2 oranında görülmektedir [2].

Herhangi bir popülasyon için, her bir allelin G6PD eksikliğinin genel prevalansına niceliksel katkısı belirlemek zordur. Bu nedenle enzim aktivitesi taramasına dayanan epidemiyolojik çalışmaların derinleştirilmesi faydalı olacaktır.



Şekil 2.5: G6PD eksikliğinin görülme sıklığının dünya üzerinde dağılımı [3, 29]

2.4.4. Klinik belirtileri

G6PD eksikliği hastalarının çoğu asemptomatik olarak hayatlarına devam etmektedir. Fakat bazı kronik hastalıklar, kullanılan ilaçlar, enfeksiyonlar ve gıdalar gibi oksidatif stresi artıracak uyarılara maruz kalındığında semptomlar açığa çıkabilmektedir [41]. Hastalarda semptomlar, uyarıyı aldıktan sonra 24-48 saat içinde genellikle akut hemolitik anemi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Akdeniz ve Asyalı bebeklerinde G6PD

eksikliğinin çoğunlukla yenidoğan sarılığı ile ilişkili olduğu bulunmuştur [42]. Ayrıca, G6PD eksikliği hastalarında diabetes mellitus, miyokard enfarktüsü ve ağır fiziksel egzersiz gibi çeşitli klinik durumlarda akut hemolitik anemi geliştiği rapor edilmiştir [43-45]. G6PD eksikliği hastalarında uzun süreli komplikasyon olarak yorgunluk, anemi, sırt ağrısı, sarılık ve konjuge olmayan bilirubin artışı gibi klinik belirtiler görölmektedir [46]

2.4.4.1. İlaça bağlı akut hemolitik anemi

Sıtmda standart tedavi olarak primakin ve artemisin türevleri kombinasyonlarının kullanılmasından sonra G6PD eksikliği olan hastalarda yan etkilerin geliştiğine dair gözlemler rapor edilmiştir. Daha sonra G6PD olan hastalarda birçoğ ilacın akut hemoliz yapabileceği bildirilmiştir (Tablo 2.2) [3]. Birçoğ bireyde güvenli olduğu belirtilen ilaç ve kimyasallar, G6PD eksikliğinin çok fazla varyantı olması sebebiyle bazı bireylerde güvenli olmayabileceğinden dikkatli olunmalıdır. Hemoliz riski ve ciddiyeti tedavi dozu ve süresine ek olarak bireyler arası farmakokinetik farklılıklar, enfeksiyon ve gıda gibi serbest radikalleri arttırabilecek durumlarla da ilişkili olabilmektedir. Hekimlerin yan etkisi belirlenmiş ilaçları kullanması gerekiyorsa kararı verirken klinik risk değerlendirmesi yapmaları gerekmektedir. Hemoliz olasılığını belirlemede kullanılabilir testler klinik uygulamada henüz mevcut değildir. Klinik olarak saptanabilen hemoliz ve sarılık tipik olarak ilacın alınmasından sonraki 24-72 saat içinde ortaya çıkmaktadır. Hemoglobinüriye bağlı koyu renkli idrar karakteristik bir işarettir [3]. Anemi 7-8. günlere kadar kötüleşmektedir. İlacın kesilmesinden sonra hemoglobin konsantrasyonları 8-10 gün sonra düzelmeye başlamaktadır. Periferik yaymada kırmızı kan hücrelerinde Heinz cisimcikleri (denatüre hemoglobin çökeltileri) görölmesi ise tipik bir bulgudur [3]. Bazı hastalarda ise hemoliz süreci kendi kendini sınırlayarak klinik olarak anlamlı anemi ve retikülositoz bulguları oluşturmaz.

2.4.4.2. Enfeksiyona bağlı akut hemolitik anemi

Enfeksiyon, G6PD eksikliği olan kişilerde hemolizin en tipik nedenidir. Sitomegalovirüs, Hepatit A ve B virüsleri, pnömoni ve tifo ateşi gibi enfeksiyonlar G6PD eksikliği olan kişilerde hemolizin en yaygın nedenleridir [47, 48]. Kullanılan ilaçlar, yaş, karaciğer fonksiyonu gibi birçoğ faktör hemolizin şiddetini etkilemektedir. Hem hepatit hem de hemolizde total bilirubin yükseldiğinden teşhiste hata kaynağı olabilecek bir bulgudur [49].

Şiddetli hemolizde yapılacak transfüzyonlar klinik gidişatı önemli ölçüde iyileştirebilir. Ayrıca akut böbrek yetmezliği ve hepatit, G6PD eksikliğinin önemli bir komplikasyonudur. Patofizyolojik temelinde böbrek iskemisine bağlı akut tübüler nekroz ve hemoglobin silindirlerinin neden olduğu tübüler tıkanma yer almaktadır. Bazı hastalarda hemodiyaliz ihtiyacı olabilmektedir [50, 51]. Akut böbrek yetmezliği komplikasyonu çocuklarda nadir olarak görülebilmektedir.

Tablo 2.2: G6PD eksikliği olan hastalarda hemolizle ilişkili ilaçlar

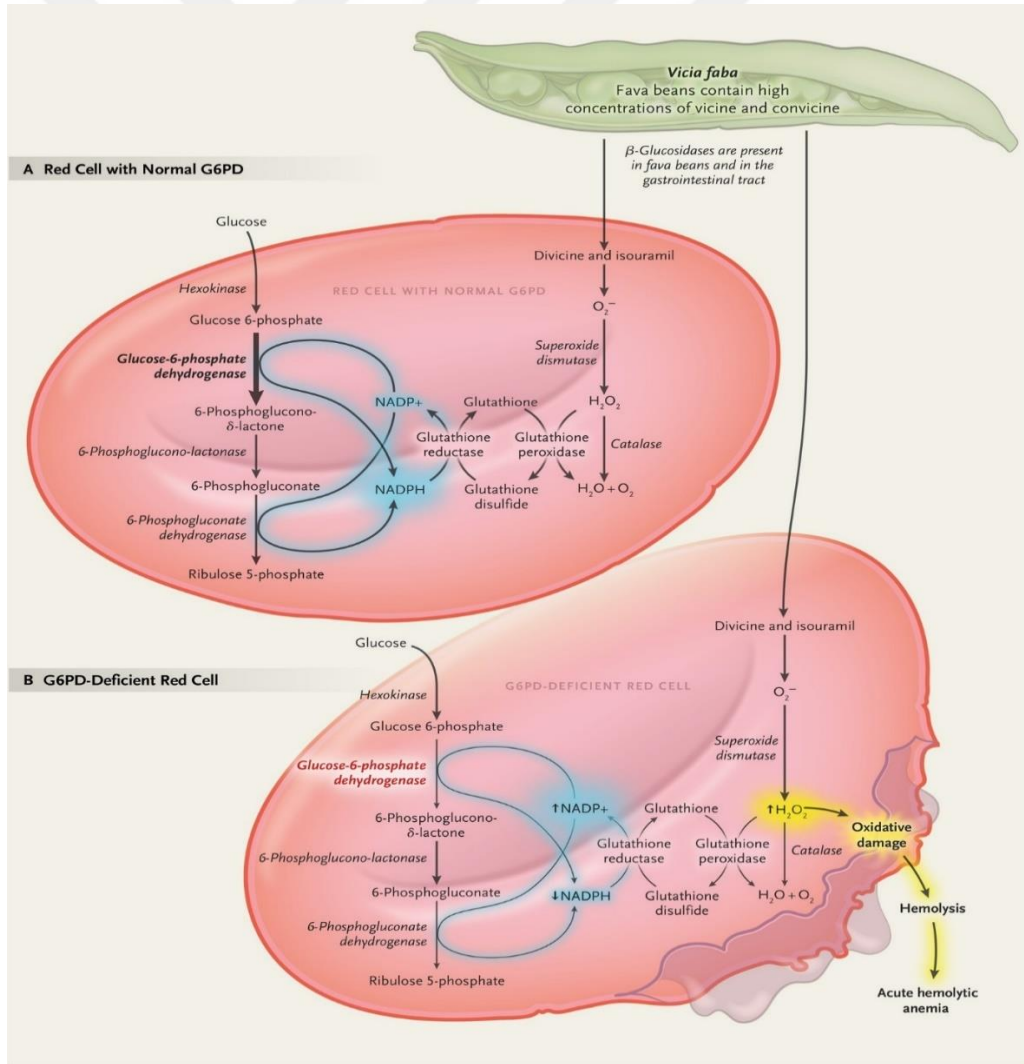
	Kesin İlişkisi Olanlar	Olası İlişkisi Olanlar	Şüpheli Olanlar
Antimalaryaller	Primakin Pamakin	Klorokin	Mepakrin Kinin
Sülfonamidler	Sülfanilamid Sülfasetamid Sülfapiridin Sülfametoksazol	Sülfadimidin Sülfasalazin Glibenklamid	Aldesülfon Sülfadiazin Sülfafurazol
Sülfonlar	Dapson		
Nitrofurantoin	Nitrofurantoin		
Antipiretik veya analjezik	Asetanilit	Aspirin	Parasetamol Fenasetin
Diğer ilaçlar	Nalidiksik asit Niridazol Metiltionyum Fenazopiridin Ko-trimoksazol	Siprofloksasin Kloramfenikol K vitamini analogları Askorbik asit Mesalazin	Aminosalisilik asit Doksorubisin Probenesid Dimerkaprol
Diğer kimyasallar	Naftalin 2,4,6-trinitrotoluen	Acalypha indica özütü	

2.4.4.3. Favizm

Favizm, bakla (*Vicia faba*) tüketimi sonucunda gelişen hemolitik anemi klinik belirtileridir. Bakla tüketiminin klinik sonuçları 20. yüzyılın başında rapor edilmiş olmakla birlikte bakla ile bu klinik bozukluk arasındaki ilişki yüzyıllar öncesinde tanımlanmıştır. Favizm yalnızca başlangıçta fark edildiği Akdeniz ülkelerinde değil, aynı zamanda bakla üretiminin ve tüketiminin yaygın olduğu Orta Doğu, Uzak Doğu ve Kuzey Afrika'da da yaygın olarak görülmektedir [52, 53]. Favizm'in en sık G6PD eksikliğinin Akdeniz varyantı ile ilişkili olduğunu düşünülmektedir. G6PD eksikliği olan bireylerin tümünde bakla yedikten sonra favizm tablosu görülmemektedir. Bu durum hastanın sağlığı, tüketilen bakla miktarı gibi favizm tablosuna sebep olabilecek çeşitli faktörlerin olabileceğini göstermektedir. Favizm, kurutulmuş veya dondurulmuş bakla tüketildikten sonra gelişebilmektedir. Ancak, bozukluk en çok

baklanın hasat edildiği dönemde görüldüğünden özellikle taze bakla yedikten sonra ortaya çıkması muhtemel gözükmektedir [54].

Favizmde hemoliz süreci karmaşık olmakla birlikte açığa kavuşturulmuş noktalar da bulunmaktadır. Baklada bulunan divicin, izouramil ve konvisin gibi toksin bileşenler, G6PD eksikliği olan hastalarda bağırsak epitelinden emilerek kana geçer. Bu maddeler, NADPH ve glutasyonu hızla oksitleyen hidrojen peroksite yanı sıra süperoksit anyonu gibi reaktif oksijen türlerini üretirler. Normal G6PD aktivitesine sahip eritrositlerde hidrojen peroksit katalaz ve glutasyon peroksidaz tarafından detoksifiye edilirler. Bu enzimatik reaksiyonların her ikisi de NADPH'ye bağlıdır. G6PD eksikliği olan eritrositlerde NADPH yetersiz olduğundan, glutasyon tükenmesini tersine çeviremezler ve bu nedenle ciddi oksidatif hasara maruz kalırlar (Şekil 2.6) [55].



Şekil 2.6: Favizmde Oksidatif Hasara Karşı Korumada G6PD'nin Rolü [55]

Favizm, genellikle bakla yenildikten yaklaşık 24 saat sonra akut hemolitik anemi olarak ortaya çıkar. G6PD eksikliği olan ve bakla tüketen kişilerde solukluk, sarılık ve hemoglobinüri sık görülen belirtilerendir. Anemi genellikle akut ve şiddetli olmaktadır. Aynı zamanda bazı hastalarda iskemiye veya hemoglobin silindirlerinin çökmesine bağlı olarak akut böbrek yetmezliği de görülebilmektedir. Hemoglobinüri, ilaçlar veya enfeksiyonun tetiklediği hemolitik krizlerin neden olduğu durumdan daha şiddetlidir. Favizm hastalarında meydana gelen oksidatif hasar, eritrositlerde bir dizi değişikliğe neden olup bu hücrelerin dolaşımından hızlı bir şekilde temizlenmesine yol açmaktadır. Bu nedenle favizm hastalarındaki hemolitik olaylar intravasküler veya ekstrasvasküler olmaktadır [56]. G6PD eksikliği prevalansının yüksek olduğu bölgelerde toplum sağlığını korumak için yapılan yenidoğan taramaları ve sağlık eğitimleri sayesinde vaka görülme sıklığı azalmaktadır [57].

2.4.4.4. Yenidoğan sarılığı

G6PD eksikliği olanlarda yenidoğan sarılığının sıklığı ve şiddeti, genetik, kültürel ve çevresel faktörlere bağlı olarak değişmektedir [3, 58, 59]. G6PD eksikliğinden kaynaklanan yenidoğan sarılığı, fizyolojik sarılık gibi genellikle doğumdan sonraki 1-4 gün civarında görülmektedir. Kernikterus, bu hastalarda nadir görülmekle birlikte tedavi edilmezse kalıcı nörolojik hasara neden olabilmektedir. Yenidoğan sarılığı G6PD eksikliği olan prematüre bebeklerde normal gebelik döneminde doğan bebeklere göre daha tipik ve daha şiddetli seyretmektedir. G6PD eksikliğinin yenidoğan sarılığına neden olmasının mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır. Gilbert hastalığına neden olan üridin-difosfat-glukuronosil transferaz 1 (UGT1A1) gen promotörünün bir mutasyonunu kalıtımla alan G6PD eksikliği olan bebekler özellikle yenidoğan sarılığı açısından risk altındadır [60]. Fototerapi alan ve aile öyküsü, etnik, coğrafi kökeni G6PD eksikliği olasılığını düşündüren sarılıklı bir bebekte veya fototerapiye yanıtı zayıf olan bir bebekte G6PD enzim düzeyinin ölçülerek eksiklik açısından değerlendirilmesi önerilmektedir [61].

2.4.4.5. Konjenital nonsferositik hemolitik anemi

Bazı hastalarda, G6PD eksikliğinin varyantları kronik hemolize sebep olan konjenital sferositik olmayan hemolitik anemiye yol açmaktadır. Bu varyantlar WHO sınıflandırmasında sınıf 1 olarak gruplandırılmaktadır [28]. Konjenital sferositik olmayan hemolitik anemiye neden olan G6PD varyantlarının çoğunlukla sporadik olmakla birlikte bazen bu duruma bağımsız mutasyonlar neden olabilmektedir [62].

Bu tablonun tanısı klinik bulgulardan yola çıkarak konabilmektedir. Bu bozukluktan genellikle bebeklik veya çocukluk döneminde şüphelenilmektedir. G6PD eksikliğinin neden olduğu konjenital sferositik olmayan hemolitik anemisi olan birçok hastanın öyküsünde ciddi neonatal sarılık, kan transfüzyonu gerektiren oksidatif stresle alevlenen kronik anemi, retikülositoz, safra taşları ve splenomegali bulunmaktadır. Bu tabloda yukarıda açıklanan akut hemolitik anemiden farklı olarak hemoliz esas olarak ekstrasvasküler olmaktadır [3]

2.4.5.Tanısı

Hızlı popülasyon taraması amacıyla, 1961'de Motulsky tarafından geliştirilen boyarenk giderme testi ve ultraviyole ışık altında floresan vermediğinde G6PD eksikliğini gösteren floresan spot testleri gibi çeşitli yarı kantitatif yöntemler uygulanmıştır [63, 64]. Formazan substratı (WST-8) kullanılan başka semikantitatif metotlar da geliştirilmiştir [65, 66]. Semikantitatif yöntemler kullanıldıktan sonra daha kesin yöntemler kullanarak tanının doğrulanması gerekmektedir.

Genç eritrositlerdeki aktivite seviyesi olgun eritrositlere göre daha yüksektir [67]. Bu durum akut hemoliz atağı sırasında enzim aktivitesi ölçülürken yanlış negatif sonuçlara veya yüksek retikülosit sayısı varlığında G6PD varyantları için teşhis sorunlarına sebep olabilmektedir. Ayrıca, genç eritrosit popülasyonuna sahip yenidoğanların değerlendirilmesinde de zorluklar yaşanabilmektedir. Heterozigot dişilerde, X kromozomu mozaikliği sebebiyle kısmi eksikliğe sebep olduğu için tarama testleri güvenilir bir şekilde teşhis edememektedir. Bu nedenle moleküler analizle kesin tanı konulabilmektedir.

G6PD eksikliği için spektrofotometrik yöntem, methemoglobin indirgeme testi, Heinz cisimcikleri tespiti, hızlı tanı testi veya floresan spot testi dahil olmak üzere kalitatif veya kantitatif birçok tanı testi mevcuttur. G6PD eksikliği olan hastalarının klinik belirtileri karakteristik olmakla birlikte, semptomların şiddeti enzim aktivitesinin miktarına bağlıdır. Bu nedenle, G6PD enzim aktivitesini tayin eden kantitatif spektrofotometrik laboratuvar testleri önem taşımaktadır. Kantitatif spektrofotometrik yöntem, ultraviyole (UV) dalga boyunda (340-365nm) NADPH oluşum seviyesini ölçerek enzim aktivitesini tespit edilebilen ve daha sonra gram hemoglobin (IU/gHb) veya kırmızı kan hücreleri (IU/RBC) başına International Unite olarak bildirilen UV-spektrofotometrik enzim aktivite tayin testidir. Bu yöntemle eksikliğin kesin tanısı konulabilmekle ve derecesi tespit edilebilmektedir. Özellikle;

- Afrika, Akdeniz, Asya kökenli çocuklarda veya erişkinlerde bilinen bir oksidatif ilaca maruz kalma, enfeksiyon veya bakla tüketimiyle tetiklenen akut hemolitik anemi meydana geldiğinde,
- Splenomegali veya kolelitiazisin tekrarladığı aile üyeleri (özellikle erkekler) varsa,
- Şiddetli yenidoğan sarılığı olan bebeklerde G6PD enzim aktivite tayin testi kullanarak G6PD enzim eksikliği araştırılmalıdır.

2.4.6. Tanı sonrası sürecin yönetilmesi

G6PD eksikliği için en etkili yönetim stratejisi, oksidatif stres faktörlerinden (ilaçlar, enfeksiyon, baklagiller gibi) kaçınarak hemolizi önlemektir. Ancak bu yaklaşım, hastanın geçmiş bir hemolitik atak veya bir tarama programı sonucu oluşan tanısının farkında olmasını gerektirir. G6PD eksikliği olan bireylerde akut hemoliz genellikle kısa ömürlüdür ve özel bir tedaviye ihtiyaç duymaz. Nadir durumlarda (genellikle çocuklarda), şiddetli anemiye yol açan akut hemoliz, eritrosit transfüzyonunu gerektirebilir.

G6PD eksikliğinden kaynaklanan yenidoğan sarılığı, diğer nedenlerden kaynaklanan yenidoğan sarılığıyla aynı şekilde tedavi edilir. Farklı konsantrasyonlardaki bilirubin yüksekliği tedavisi konusunda bazı tartışmalar mevcuttur [68]. Genellikle, konjuge olmayan bilirubin konsantrasyonu 150 µmol/L'ye yaklaştığında veya onu aştığında, nörolojik hasarı önlemek için hastalara fototerapi verilir; daha yüksek konsantrasyonlarda (>300 µmol/L) kan transfüzyonu gerekli olabilir.

Konjenital sferositik olmayan hemolitik anemisi olan hastalarda bazen kan transfüzyonu gerektirmeyen bir anemi vardır. Ancak bu kişilerin izlenmesi gerekir, çünkü herhangi bir şiddetlendirici faktör (enfeksiyon veya oksidan bir ilacın yutulması gibi) aneminin derecesini kötüleştirebilir. Çok nadiren konjenital sferositik olmayan hemolitik anemi transfüzyona bağımlıdır, bu nedenle demir şelasyon tedavisi uygulanmalıdır. E vitamini ve selenyum gibi antioksidanların kronik hemolizli hastalarda bir miktar etkisi var gibi görünmektedir ancak literatürde bunu destekleyecek tutarlı veriler bulunmamaktadır [69].

Konjenital sferositik olmayan hemolitik anemisi olan hastalarda bazen splenomegali gelişir, ancak genellikle splenektomiden fayda görmezler. Safra taşları, G6PD eksikliğine bağlı hemolizin bir komplikasyonudur. G6PD eksikliğinin anne karnında tespiti literatürde rapor edilmiştir [70], ancak bu yaklaşımın G6PD eksikliğinin düşük mortalite ve morbiditesini göz önüne aldığımızda gerekli olup olmadığı tartışmalıdır.

Diğer tedavilere dirençli olan ciddi eksiklik vakaları için gen terapisi uygulanması, üzerinde araştırma yapılmaya devam eden konulardan biridir.

2.5 Laboratuvarında Kalite Kontrol

Laboratuvarında çalışılan testler tarama, tanı, tedavi takibi ve prognoz belirleme açısından klinisyenlere yol göstermektedir. Bu yüzden hasta numunelerinden güvenilir ve kabul edilebilir sonuçlar vermek her laboratuvarın birincil hedefi olmalıdır. Ülke genelinde klinik laboratuvarlar günde milyonlarca test sonucu üretmektedir. Laboratuvarlarda her ne kadar iç kalite ve dış kalite kontrol prosedürleri sıkı bir şekilde uygulansa da aynı numunede iki farklı laboratuvarında farklı sonuçlar elde edilebilmektedir. Bu sebeple kalite yönetimi sürecinin daha standart hale getirilmesi için ileri çalışmalar yapılması önem taşımaktadır.

Kalite, müşterilerin belirtilen veya ifade edilmemiş ihtiyaçlarını karşılamak için bir ürün veya hizmetin özelliklerinin toplamı olarak tanımlanmaktadır [71]. Tıbbi laboratuvarların kalite gereksinimleri ISO15189 rehberi tarafından belirlenmiştir [72]. Tıbbi laboratuvardaki hatalar preanalitik, analitik veya postanalitik evrede olabilmektedir. Analitik sürecin hataları kalite kontrol materyalleri ile takip edilerek belirlenebilir (İç ve dış kalite kontrol materyalleri). İç ve dış kalite kontrol belirli ölçeklerde veya daha geniş ölçeklerde klinik laboratuvarlar analizlerinin kalite ve standardının korunmasını sağlamaktadır.

Kontrol materyalleri test edilecek analitin belirlenmiş bir miktarını içermektedir. Bu materyaller, hasta numuneleriyle aynı anda ve aynı sürece maruz bırakılarak analiz edilmelidir. Bu sayede test sisteminin güvenilirliği doğrulanabilir ve kullanıcıların performansı, çevresel koşullar değerlendirilebilir. İç kalite kontrol materyallerinin belirlenmiş aralıkları sisteme girildiğinde veya tekrarlı ölçümler yapılarak uygun aralıklar belirlendiğinde, günlük takibin daha kolay yapılabilmesi için sonuçların grafiksel olarak gösterilmesi oldukça faydalıdır. Bu amaçla rutin biyokimya laboratuvarlarında tercih edilen yöntem Levey-Jennings grafiklerinin kullanılmasıdır. Bu sayede laboratuvarın günlük performansı değerlendirilerek hata durumunda düzeltici faaliyetler başlatılır [73, 74].

Dış kalite kontrol süreci, bir dış tedarikçi veya ticari bir kurum üzerinden laboratuvar performansının objektif bir şekilde değerlendirildiği ve laboratuvar testlerinin, laboratuvar dışındaki bir kaynak ile karşılaştırılmasına olanak sağlayan bir sistemdir.

Programına dahil olunan kurum, laboratuvarlara miktarını bilmediği numuneleri gönderir. Laboratuvarlar bu numuneleri kendi çalışma koşullarında hasta numunesi gibi çalıştıktan sonra sonuçları ortak bir sisteme girerler. Süreç sonuçlandıktan sonra laboratuvarlar, eş grup veya referans laboratuvarları ile test sonuçları ve performans karşılaştırması yapabilirler. Bu süreçle birlikte kit veya çalışma prosedürüyle ilgili sistematik problemler ve iyileştirme ihtiyacı bulunan aşamalar belirlenerek düzeltici faaliyetlerde bulunulabilir [72, 74].

2.5.1. Kalite kontrol materyalleri

Tıbbi biyokimya laboratuvarları için hasta numunelerinden güvenilir ve kabul edilebilir sonuçlar verebilmek en önemli hedefdir. Bu nedenle kalite kontrol sürecindeki iç ve dış kalite kontrol değerlendirmesinde uygun kalite kontrol materyallerine ihtiyaç duyulmaktadır. Kalite kontrol materyallerinin uluslararası standartlara ve bilimsel tavsiyelere uygun özellikleri bildirilmiştir. Kalite kontrol materyalleri, test edilen analitin belirlenmiş bir miktarını içeren materyallerdir. Kalite kontrol materyalleri hedeflenen test için uygun ve ölçülebilir formda bulunmalıdır. Kalite kontrol materyali, gerçek numuneye benzer bir matrikse ve/veya analitik madde konsantrasyonuna sahip olmalıdır. Kontrol materyalinde bulunan analit konsantrasyonu, testin tıbbi karar noktalarına yakın olmalıdır yani hem düşük hem de yüksek konsantrasyon seviyelerini kontrol etmelidir. Ayrıca stabil, homojen olmalı ve patojen açısından risk taşımamalıdır. Kontrol materyalleri insan veya hayvan kaynaklı olarak üretilmektedir [74].

2.5.2. Kontrol materyali tipleri

Teorik olarak dondurulmuş, likit ve liyofilize olmak üzere 3 tip kontrol materyali üretilmektedir.

2.5.2.1. Dondurulmuş kontrol materyali

Dondurulmuş kontrol materyalleri sıklıkla hasta serumları kullanılarak üretilir. Modifiye edilmiş veya modifiye edilmemiş serumlarda elde edilen iki tip dondurulmuş kontrol materyali vardır. Modifiye edilmiş serumlar, kan bankasındaki hasta örneklerinin eski serum veya plazmaları kullanılarak üretilmektedir. Modifiye edilmemiş serumlar ise pıhtılaşmış tam kandan hemen ayrılarak havuzlanır, filtrelenir, karıştırılır ve polipropilen şişelere alikotlanır. Sonrasında kullanılana kadar -80°C'de muhafaza edilirler [75]. Dondurulmuş kontrol materyalinin diğer kontrol materyali

tiplerine göre avantajı minimum matriks etkisi ve sulandırma işlemi gerektirmemesidir. Ancak dondurma işlemi buz kristallerinin oluşmasına yol açarak hatalı sonuçlar verebileceğinden dikkatli olunmalıdır.

2.5.2.2. Likit kontrol materyali

Likit kontrol materyali, klinik biyokimyada sıklıkla kullanılmaktadır. Sterilizasyon veya kimyasallarla stabilize edilerek üretilir. Sterilizasyon yoluyla hazırlanan kontrol materyali, uygun filtreler kullanılarak yapılan filtreleme işlemiyle hazırlanır. Bu kontrol materyalinin raf ömrü hazırlandıktan sonra oda sıcaklığında (20-25°C) 7-14 gün kadardır. Kimyasal olarak stabilize edilmiş kontrol materyali ucuzdur [76]. Aynı zamanda hem iç hem de dış kalite kontrol değerlendirmesinde kullanıma uygundur. Bu kontrol materyalinin stabilitesi 2-8°C'de en az 24 gün ve -15°C ila -20°C 'de yaklaşık 1 yıldır. Bu kalite kontrol materyalinin stabilite, vialler arasında benzerlik, azaltılmış atık ve ortadan kaldırılmış sulandırma gibi avantajları vardır [77].

Eklenen stabilizatörler, viskoziteyi etkileyebileceğinden ölçüm yaparken bu durum dikkate alınmalıdır.

2.5.2.3. Liyofilize kontrol materyali

Rutin biyokimya laboratuvarlarında sıkça kullanılan liyofilize kontrol materyalleri dondurma-primer kurutma-sekonder kurutma aşamalarından oluşan liyofilizasyon işlemiyle hazırlanmaktadır. Aynı zamanda “in-house” kontrol materyallerinin hazırlanmasında da oldukça kullanışlı bir tekniktir. Bu kontrol materyalinin stabilitesi 2-8 °C'de saklandığında en az 1 yıl, -20°C veya altında saklandığında birkaç yıl daha uzun olmaktadır. Üreticiler tarafından matrisin değiştirilmesi konusunda literatürde tartışmalar da mevcuttur [78]. Merkezler arası aktarımda ve uzun süre stabilitenin gerekli olduğu durumlarda oldukça avantajlıdır. Kontrol materyalinin sulandırılması aşamasında kullanılan distile suyun veya solüsyonun miktarı, kalitesi ve pipetleme işleminin hassas bir şekilde yapılması oldukça önemlidir [74].

2.6. Liyofilizasyon

2.6.1.Genel bilgiler

Su, hücreler içerisinde canlılık için biyokimyasal aktiviteleri destekleyen önemli bir çözücüdür. Ayrıca su çürümeye sebep olan organizmaların çoğalması, otoliz süreci ve

depolanmış ürünlerin bozulmasında da önemli rol oynamaktadır. Bu sebeple bozulması muhtemel olan ürünlerin dayanıklılık süresini artırmak için suyun ürünlerden uzaklaştırılması gerekmektedir [79]. Organik maddelerden suyun uzaklaştırılması sürecini liyofilizasyon ve freeze drying terimleri tanımlamakla birlikte iki terim de aynı süreç, prensip ve mekanizmaları ifade etmektedir.

Dondurarak kurutma olarak da bilinen liyofilizasyon, kontrol materyalleri, ilaçlar, terapötik proteinler gibi ürünlerin uzun vadeli stabilitesini iyileştirmek için faydalanılan önemli bir işlemdir [80]. Aşağıda liyofilize edilerek kullanılan bazı ürünler belirtilmiştir:

1. Reaktif veya ısıya duyarlı kimyasalların kurutulması veya konsantre edilmesi için prosesin kullanıldığı biyolojik olmayan maddeler.
2. Cansız biyoürünler. Enzimleri, hormonları, antibiyotikleri, vitaminleri, kan ürünlerini, antibiyotikleri, inaktive edilmiş veya zayıflatılmış aşılı, polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) bileşenlerini, nanopartikülleri vb. içerir. Bu alt grup, teşhis veya tedavi amacıyla kullanılabilen farmasötikleri içerir.
3. Cerrahi veya tıbbi kullanıma yönelik kemik ve diğer vücut dokuları, organoleptik özelliklerin önemli olduğu gıdalar, endüstriyel biyoürünler.
4. Kurutma ve sulandırma sonrasında yeni nesiller üretmek için büyümesi ve çoğalması gereken, aşı veya tohum kültürü kullanımına yönelik canlı organizmalar.
5. Çeşitli, örneğin selden zarar görmüş kitaplar, müze eserleri vb.

Dondurarak kurutulmuş katı halde, kimyasal veya fiziksel bozunma reaksiyonları engellenir veya yavaşlatılır, bu da uzun vadeli stabilitenin artmasına neden olur. Uzun stabilite avantajının yanında, liyofilize formlar depolama ve merkezler arası transportta kolaylık sağlar [81].

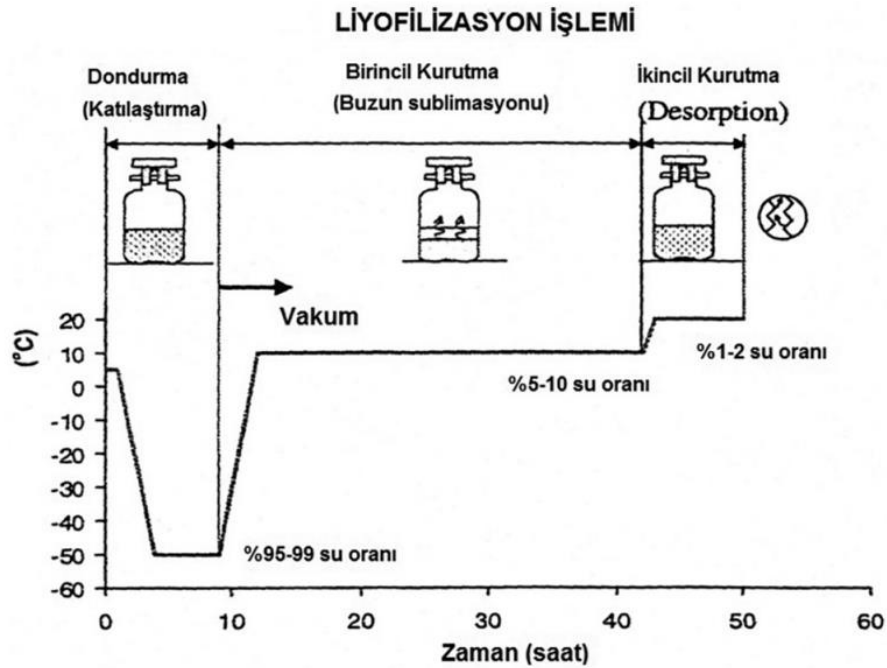
2.6.2. Tarihçesi

Yüzyıllar önce Astek ve Eskimoların gıda maddelerinin saklanması dondurarak kurutmayı kullandıkları bildirilmiştir. Aynı zamanda İnkalar tarafından Altiplano'da oksijeni az atmosfer ortamında ve güneşin radyan ısısı altında et kurutmak için bu yöntemin kullanıldığı bilinmektedir [82]. 1880'li yılların sonlarında laboratuvar şartlarında kullanılmaya başlanarak bu yöntemin temel prensipleri oluşturulmuştur [79]. Bordas ve d'Arsonval, 1906'da Paris'teki Acade'mie des Sciences'a sundukları makalelerinde, ilk kez hassas bir ürünü orta dereceli vakum altında donmuş halden kurutmanın mümkün olduğunu göstermişlerdir [82]. Böylece ürünler oda sıcaklığında

daha stabil durumda kalacaktı. Isıya dayanıklı antibiyotiklerin ve kan ürünlerinin işlenmesine ihtiyaç duyulan 1930'lara kadar bu yöntem bir laboratuvar tekniği olarak kalmıştır [79]. Earl Flosdorf, Ronald Greaves ve François Henaff, II. Dünya Savaşı sırasında yaygın olarak kullanılan dondurularak kurutulmuş insan plazmasının seri üretimine yönelik uygun büyük ölçekli ekipmanı tasarlamışlardır. Penisilin üzerine yaptığı çalışmalarla Nobel Ödülü sahibi olan Sir Ernst Boris Chain, antibiyotiklerin ve hassas biyokimyasalların hazırlanması için dondurarak kurutmayı tanıtmıştır. Isidore Gersh ve daha sonra Tokio Nei ve Fritjof Sjostrand, elektron mikroskobu için dondurularak kurutulmuş biyolojik yapıların dikkat çekici görüntülerini fotoğraflamışlardır. Charles Me'rieux ise serum ve aşılarda endüstriyel üretimi için geniş yeni alanlar açmıştır [82]. Bu tarihsel süreçte soğutma ve vakum teknolojileri, üretime yönelik liyofilizatörlerin geliştirilmesini sağlayacak kadar ilerlemiş olup artık sağlık, gıda gibi endüstrilerde kullanılmaktadır.

2.6.3. Liyofilizasyon süreci

Liyofilizasyon genel olarak dondurma, primer kurutma ve sekonder kurutma olmak üzere üç basamaktan oluşmaktadır (Şekil 2.7).



Şekil 2.7: Liyofilizasyon basamakları [83, 84]

2.6.3.1. Dondurma

Dondurma aşaması, liyofilizasyondaki en önemli basamaktır. Prosesin ilk adımı olarak kabul edilen ilk aşamada, ürünün süblimasyonu için önce dondurulması gerekir. Dondurma işlemi, ürünün termal denatürasyonunu azaltır, çözelti bileşenlerini hareketsiz hale getirir, vakum uygulandığında köpürmeyi önler ve maddenin görünüşü, çözünürlüğünü muhafaza eder. Dondurma aynı zamanda numune içinde arzu edilen buz kristali yapısını da indükler ve bu da kurumayı kolaylaştırır [79].

Dondurma adımı sırasında sıvı formülasyon, buz çekirdeklenmeye başlayana kadar soğutulur ve bunu buz büyümesi takip eder. Bu, suyun çoğunun camsı ve/veya kristalli çözünen maddelerden oluşan bir matristen buz kristallerine ayrılmasıyla sonuçlanır [85].

İdeal olarak dondurma, çözünen madde konsantrasyon etkilerini en aza indirmelidir. Ancak çözeltiler veya süspansiyonlar dondurulduğunda bu ideale ulaşmak mümkün olmayabilir. Sulu çözeltilerin veya süspansiyonların dondurulması ele alınırken, formülasyonda hem çözücünün (sulu çözeltiler durumunda su) hem de çözünenlerin özelliklerinin dikkate alınmasına ihtiyaç vardır [79].

Sıklıkla soğutma ve dondurma terimleri hatalı bir şekilde birbirinin yerine kullanıldığında sürecin anlaşılmasını karmaşık hale getirmektedir. Soğutma, dondurarak kurutucu raflarının, raflar arasında dolaşan sıvının, şişe ve tepsi kütlelerinin, dondurarak kurutucunun iç kısmının ve dağıtılan çözelti veya süspansiyonun sıcaklığının azaltılması anlamına gelmektedir. Soğutma, sıvıdan katıya bir hal değişimini ifade etmemektedir. Donma ise suyun buz haline ani faz değişimini ifade eder [79].

Çözeltiler veya süspansiyonlar dondurulduğunda, buz oluşumundan önce ölçülen donma noktalarının önemli ölçüde altına soğuyabilirler; bu, aşırı soğutma olarak tanımlanan bir olgudur. Aşırı soğutmanın kapsamı soğutma hızına, numune bileşimine ve temizliğine, dağıtılan dolum hacmine, kap tipine, numune soğutma yöntemine vb. bağlıdır. Aşırı soğutulmuş durumda, çözeltinin bileşimi değişmeden kalırken, soğutulmuş sıvı termodinamik olarak kararsızdır ve buz oluşumuna karşı hassastır. Çözelti daha düşük sıcaklıklara soğutuldukça buzun kristalleşme olasılığı da buna bağlı olarak artacaktır. Optimize edilmiş dondurarak kurutma için amaç, numune içeriği boyunca eşit soğutma ve donmayı teşvik etmek için süspansiyonda aşırı soğutmayı teşvik etmek olmalıdır [79]. Hızlı soğuma küçük buz kristallerinin

oluşmasıyla sonuçlanır ve bu kristaller mikroskobik olarak ne kadar yoğun ise, yapıyı korumada o kadar faydalıdır.

Dondurma aşamasının ideal olabilmesi için, hem çözücü suyun hem çözünen maddenin tamamen kristalleşmesi gerekmektedir. Kristalizasyon, kurutulan ürünün mikro yapısını oluşturmaktadır. Bunun için ürünün donma derecesine ulaşılması gerekmektedir ve bu da kimyasal yapısına bağlı olmaktadır. Dondurma işlemi ne kadar başarılı gerçekleşirse o kadar iyi kurutulmuş ürün elde edilmektedir. Bu sebeple bu aşamada dikkatli olunmalıdır [84].

2.6.3.2. Primer kurutma

Suyun üç hali (buz, sıvı ve buhar) üçlü noktada bir arada bulunur ve atmosfer altı basınçlarda buzun süblimleşmeyle doğrudan buhara dönüşebileceğini gösterir. Dondurulmuş bir numuneden buz süblimasyonu, çözünen maddelerin orijinal çözelti veya süspansiyonda olduğu gibi mekansal olarak düzenlendiği açık, gözenekli, kuru bir yapıyla sonuçlanır. Kurutma ilerledikçe bileşenlerin yoğunlaştığı buharlaşmanın aksine, vakum altında süblimleştirme, konsantrasyon etkilerini en aza indirerek aktif ve kolayca çözünebilir kuru bir ürün sağlar [79].

Çözeltiyi dondurduktan sonraki adım süblimleştirme yoluyla numuneyi kurutmaktır. Liyofilizasyon koşullarını korumak için kısmi basıncın düşürülmesi önemlidir. Buzun doğrudan su buharına dönüşmesini sağlamak ve numunenin erimesini önlemek için suyun üçlü noktanın altında süblimleştirilmesi gereklidir (0 °C'de yaklaşık 800 mBar). Vakum ürünün üzerindeki hava konsantrasyonunu azaltarak süblimleşmenin teşvik edilmesini ve sisteme sızan havanın uzaklaştırılmasını sağlar [79].

Primer kurutma, kurutma döngüsünün ilk adımını oluşturur. Bu adımın amacı, liyofilize edilecek ürüne zarar vermeden bağıl nemi uzaklaştırmaktır. Primer kurutmada, dondurma basamağında oluşan kristal buz, süblimleşme yoluyla uzaklaştırılır. Bu nedenle, bölme basıncı buzun buhar basıncının çok altına düşürülür ve raf sıcaklığı, buz süblimasyonu ile uzaklaştırılan ısıyı sağlamak için yükseltilir. Primer kurutma sırasında numune sıcaklığı, kurutma sırasında numune hasarını en aza indirmek için uygun şekilde ötektik, cam geçiş, çökme veya erime sıcaklığının altında tutulmalıdır. Bu aşamada numunenin nemininin yaklaşık %70 ila 95'ini oluşturan buz su buharına dönüşür. Süblimleştirme verimli bir işlemdir, ancak primer kurutmanın uzunluğu numune formülasyonuna, kek derinliği gibi parametrelere bağlı olarak değişecektir. Primer kurutma sırasında numune, kurutma ilerledikçe numunenin

yüzeyinden tabana doğru uzaklaşan ayrı bir sınırdaki (süblimasyon arayüzü) kurur [79]. Primer kurutma sonucunda ürün kek görünümünü alır [86].

2.6.3.3. Sekonder kurutma

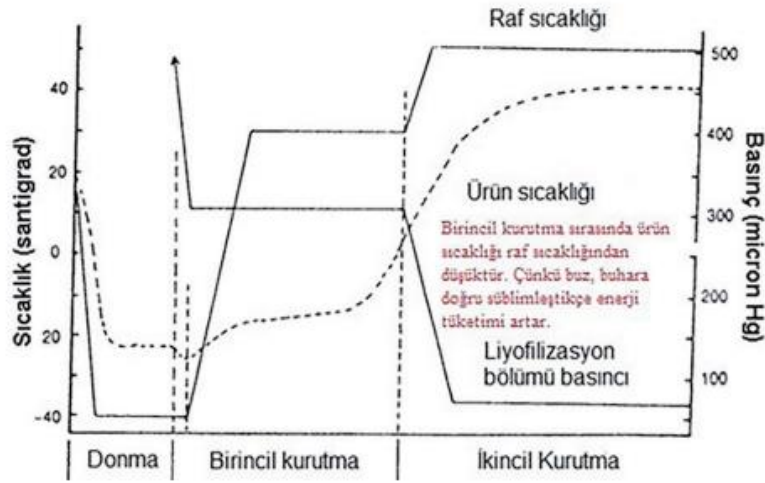
Sekonder kurutma, görünürde kuru yapıya adsorbe edilen yerleşik nemin desorpsiyon yoluyla uzaklaştırıldığı ikinci bir kurutma aşamasıdır. Sekonder kurutmanın amacı, primer kurutma sonrası ürünün dayanıklılığını ve ömrünü artırmak amacıyla üründeki bağıl nemi en aza indirmektir [87]. Primer kurutmanın tamamlanmasından sonra, ürün hala yaklaşık %15-20 oranında donmamış su içerebilir; bu sekonder kurutma aşamasında, genellikle yüksek sıcaklıkta ve düşük basınçta desorbe edilir ve sonuçta istenen düşük nem içeriğinin elde edilmesine olanak sağlanır [88]. Desorpsiyon, hazinede yüksek vakum koşulları kullanılarak raf sıcaklığının artırılması ve böylece sistem buhar basıncının veya bağıl nemin azaltılmasıyla kolaylaştırılır. Tersine, raf sıcaklığı düştüğünde ve yoğunlaştırıcının ısıtılmasıyla sistemdeki buhar basıncı arttığında, kurutulan numuneler nemi yeniden emecek ve nem içeriğinde bir artış sergileyecektir. Yüksek buhar akış hızlarıyla ilişkili dinamik bir süreç olan primer kurutmanın aksine, sekonder kurutma çok daha az verimlidir. Sekonder kurutma süresi toplam işlem süresinin yaklaşık %20-40'ını oluşturur ve yalnızca numunenin toplam neminin %5-10'unu ortadan kaldırır [79].

Genel olarak liyofilizasyon, çok zaman ve enerji isteyen bir işlemdir. Donma genellikle saatler içinde tamamlanırken, kurutma genellikle günler alır. Ancak kurutma aşamasında sekonder kurutma, primer kurutmaya kıyasla daha kısadır. Bu nedenle, liyofilizasyon döngüsü gelişimi tipik olarak primer kurutma adımını optimize etmeye, yani ürün kalitesini etkilemeden raf sıcaklığını ve/veya bölme basıncını ayarlayarak primer kurutma süresini kısaltmaya odaklanmıştır (Şekil 2.8) [89].

2.7. Liyoprotektan ve Kriyoprotektan Maddeler

Liyofilizasyon, sulu bir nanopartikül süspansiyonunu dondurarak, primer ve sekonder kurutma yoluyla amorf kristalli bir katıya dönüştüren bir işlemdir. Bu işlemler nanopartiküller üzerinde mekanik stres oluşturup agregasyona neden olarak nanopartikül stabilitesini azaltır [90]. Liyoprotektanlar, Şekil 2.9'da gösterildiği gibi nanopartiküllere fiziksel ve kimyasal stabilite sağlamak için liyofilizasyondan önce yalnızca sulu süspansiyona eklenen inert ekşiyanlardır [91]. Donma ve kurutma

adımları sırasında mekanik stresi azaltarak nanopartiküllerin stabilitesini artırır [92].

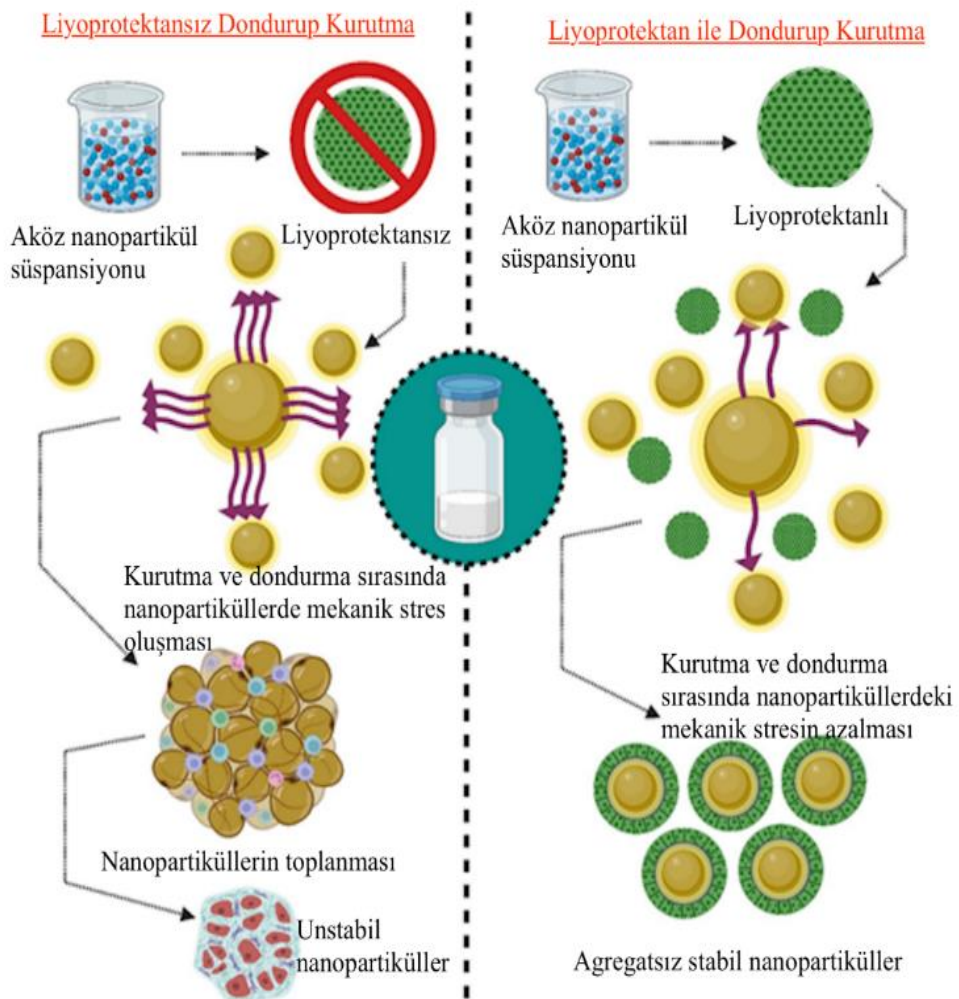


Şekil 2.8: Liyofilizasyon işlemi sırasında liyofilizasyon basamakları ile ürün arasındaki sıcaklık ve basınç ilişkisi [83, 84]

Hacim artırıcı maddeler (mannitol, glisin, sükroz), tamponlar (Tris HCl, histidin ve fosfat), yapı değiştiriciler, tonisite ayarlayıcılar (tuzlar), stabilizatörler (glikoz, dekstran, sükroz, trehaloz, laktoz, mannitol ve alanin) ve çöküş inhibitörleri (glikoz, dekstran, maltoz, maltotrioz, maltopentoz ve maltoheptoz), dondurarak kurutma işleminde liyoprotektan ve kriyoprotektan olarak en yaygın kullanılan inert ekşiyanlardır. Liyoprotektanlar aynı zamanda kriyoprotektan olarak da görev yapar veya bunun tersi de geçerlidir. Liyoprotektanlar olarak yaygın olarak kullanılan yardımcı maddelerin ayrıntıları Tablo 2.3 'te gösterilmiştir.

Kriyoprotektanlar, biyolojik dokuları ve hücreleri donma hasarından koruyan maddelerdir. Kriyoprotektan maddeler olmadan hücrelerin 0°C'nin altındaki sıcaklıklara maruz bırakılması onlar için ölümcüldür. Su, doku kütlelerinin yaklaşık % 80'ini oluşturduğundan, hem hücre içi hem de hücre dışı olarak suyun donması, hücrede zararlı biyokimyasal etkiler ve yapısal değişikliklere sebep olmaktadır [93]. Şekil 2.10'da belirtildiği üzere kriyoprotektanlar hücre içi ve hücre dışı olmak üzere iki gruba ayrılmaktadır. Hücre içi kriyoprotektanlar, hücre içi proteinleri stabilize ederler ve donma sıcaklığını düşürerek buz oluşumunu azaltır veya tamamen ortadan kaldırırlar. Aynı zamanda konsantre hale gelen hücre içi ve hücre dışı elektrolitlerin etkisine bağlı olarak osmotik hasarı azaltırlar. Bu kriyoprotektanlar, biyolojik

membranları kolayca geçebilmeli ve ideal olarak minimal toksik olmalıdırlar [93]. Hücre dışı kriyoprotektanlar ise hücre içine nüfuz etmezler ve bu nedenle koruyucu etkilerini hücre dışında gerçekleştirirler. Daha büyüktürler ve polimerler, dimerler veya trimerler olarak kovalent olarak bağlanırlar. Hücre dışındaki donmamış suyun oranını azaltırlar ve faz geçişlerini ve hidrasyon durumunu değiştirmek amacıyla membran lipitleri ve proteinleriyle etkileşime girerler. Ayrıca kriyoprotektan eklenmesi veya uzaklaştırılması sırasında hücrenin şişmesini engellemek amacıyla osmotik tampon olarak görev yaparlar [94].

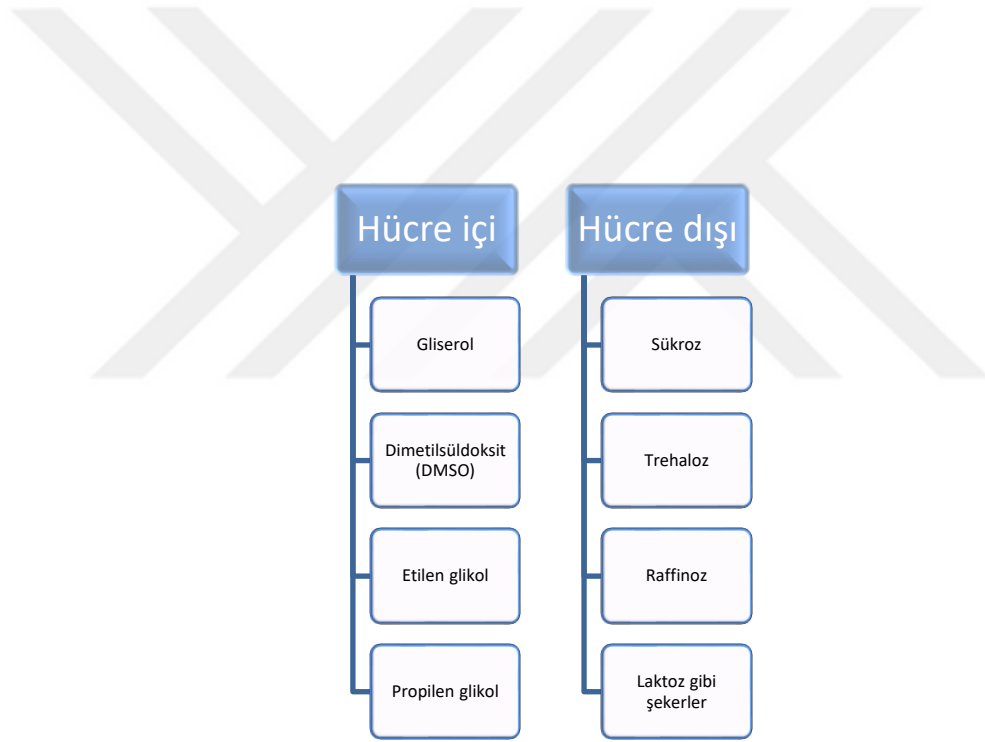


Şekil 2.9: Nanopartiküllerin stabilizasyonu için liyoprotektan kullanımı [95]

Tablo 2.3: Liyoprotektan olarak kullanılan bazı maddeler [95]

<i>Liyoprotektanlar</i>	Molekül ağırlığı (g/mol veya kDa)	Optimum liyoprotektan konsantrasyonu (% w/w veya mM)	Cam geçiş sıcaklığı (T _g , °C)	Fonksiyonları
<i>Dolum maddeleri</i>				
Glisin	75.07	10	-70 ila -90	Özellikle
Hidroksietil nişasta	670	12.5	44	dondurularak
Laktoz	342.3	1-2	101	kurutulacak
Mannitol	182.18	6	13	ürün
Sükroz	342.3	2.5	-46	konsantrasyonu
Trehaloz	378.33	20	106	çok düşük görünüyorsa, formülasyona hacim kazandırırılar.
<i>Tamponlar</i>				
Sitrat	192.12	NA	105	Dondurma
Histidin	155.15	3.5	-32	sırasında pH
Fosfat	94.97	20	NA	değişikliklerini
Tris HCl	121.14	NA	-81	ayarlar ve korurlar.
<i>Stabilizatörler</i>				
Alanin	89.09	1-5	-10 ila 35	Dondurarak
Dekstran	40-70	2	68.2	kurutma işlemi
Gliserol	92.09	NA	NA	sırasında
Polietilen glikol 400	380-420	25-35	-63	donma ve
Polivinil pirolidon	NA	7.5	NA	kuruma
Sodyum klorit	58.44	5 M	NA	streslerine karşı koruma sağlar.
<i>Tonisite ayarlayıcılar</i>				
Glisin				
Gliserol	75.07	10	-70 ila -90	Ozmotik
Mannitol	92.09	NA	NA	basıncı kontrol
Sükroz	182.18	6	13	ederken

Sodyum klorit	342.3 58.44	2.5 5 M	-46 NA	izotonik bir solüsyon üretirler.
Hidroksipropil-β- siklodekstrin	1387	5-10	418	Optimum kurutma sıcaklıklarına ulaşmak için ürünün çökme sıcaklığını yükseltir.



Şekil 2.10: Kriyoprotektanların sınıflandırılması

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneyle, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Ar-Ge Laboratuvarı ve Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi Rutin Biyokimya Laboratuvarı'nda Haziran 2023- Haziran 2024 tarihleri arasında yürütülmüştür. Çalışma, 12.05.2023 tarihli E.107226 sayılı Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu izni ile gerçekleştirilmiştir. Bu tez, Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 20230612 nolu proje ile desteklenmiştir.

3.1. Gereçler

3.1.1. Kimyasallar

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.1'de listelenmiştir.

Tablo 3.1: Kullanılan kimyasallar ve markaları

Tris baz (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃)	Sigma-Aldrich, Almanya
Tris HCl (NH ₂ C(CH ₂ OH) ₃ · HCl)	Sigma-Aldrich, Almanya
Nikotinamid Adenin Dinükleotit Fosfat (NADP)	Sigma-Aldrich, Almanya
Magnezyum Sülfat	Sigma-Aldrich, Almanya
Bovin serum albümini	Sigma-Aldrich, Almanya
Triton-X 100	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Azid	Sigma-Aldrich, Almanya
Glukoz 6 Fosfat (G6P)	Sigma-Aldrich, Almanya
Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Enzimi (G6PD)	Sigma-Aldrich, Almanya
Leuconostoc mesenteroides	
Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Enzimi (G6PD)	Sorachim, İsviçre
Glisin	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Hidroksid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Almanya
Hidroklorik Asit (HCl)	Sigma-Aldrich, Almanya
β-merkaptotanol	Sigma-Aldrich, Almanya
EDTA (Etilendiamintetraasetik asit)	Sigma-Aldrich, Almanya
Ditiyotreitil (DTT)	Sigma-Aldrich, Almanya
Glutasyon (reduced)	Sigma-Aldrich, Almanya
Glutasyon (oxidized)	Sigma-Aldrich, Almanya
N-Asetil Sistein (NAC)	Sigma-Aldrich, Almanya

L-Sistein HCl	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Klorür (NaCl)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sükroz	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Klorür (KCl)	Sigma-Aldrich, Almanya
Sodyum Fosfat Dibazik (Na ₂ HPO ₄)	Sigma-Aldrich, Almanya
Potasyum Fosfat Monobazik (KH ₂ PO ₄)	Sigma-Aldrich, Almanya
CPDA (Sitrat Fosfat Dekstroz Adenin) Solution	Sigma-Aldrich, Almanya
Gliserol	Sigma-Aldrich, Almanya
Penisilin streptomisin	Capricorn, Almanya

3.1.2. Cihazlar

Çalışmada kullanılan cihazlar Tablo 3.2’de listelenmiştir.

Tablo 3.2: Kullanılan cihazlar ve markaları

Otomatik pipetler	CAPP, Almanya; Eppendorf, Almanya
Distile su cihazı	Millipore Co., ABD
Ultra saf su cihazı	Sartorius Stedim Biotech, Almanya
Hassas terazi	Daihan, Kore
Santrifüj	Beckman Coulter, ABD
Vorteks	Stuart, İngiltere
Buzdolabı (+4°C)	Beko, Türkiye
Derin dondurucu (-20°C, -80°C)	Uğur, Türkiye; Haier, Çin
pH metre	Milwaukee, Mi 151, ABD
Manyetik ısıtıcılı karıştırıcı	Stuart, İngiltere
Otomatize klinik kimya analizörü	Siemens Atellica® CH 930 analyzer, Almanya
Tam Kan Sayım Cihazı	Sysmex XN1000, Almanya
İnkübatör	Nüve, Türkiye
Liyofilizatör	Freezone 2,5 Plus 1007871, Labconco, ABD

3.1.3. Sarf Malzemeler

Çalışmada kullanılan kimyasallar Tablo 3.3’te listelenmiştir.

Tablo 3.3: Kullanılan sarf malzemeler ve markaları

Ependorf tüp 2 ml	İsolab, Almanya
Falkon tüp 15 ml	İsolab, Almanya
Falkon tüp 50 ml	İsolab, Almanya
Pipet ucu 5ml	İsolab, Almanya
Pipet ucu 1000 µl	İsolab, Almanya
Pipet ucu 200 µl	İsolab, Almanya
Pipet ucu 10 µl	İsolab, Almanya
ACD (Acid Citrate Dextrose)	BD Vacutainer®, ABD
CPDA (Citrate Phosphate Dextrose Adenin)	Greiner Bio-One VACUETTE®,Avusturya
EDTA	Vacusera, Türkiye
Heparin	Vacusera, Türkiye
Sitrat	Vacusera, Türkiye

3.2. Yöntem

3.2.1. Likit tam kan kontrol materyali hazırlanması

3.2.1.1. Numunelerin toplanması

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde çeşitli polikliniklere başvuran hastalardan alınan anamnez ve fizik muayene doğrultusunda doktorları tarafından istenen parametreler Tıbbi Biyokimya laboratuvarında çalışılmaktadır. Hastanemizin kan alma biriminde çalışmamız için gönüllü olan, dahil olma ve dışlama kriterlerini karşılayan hastalardan kan alınarak uygun olan numuneler çalışmamıza dahil edildi. Çalışmamızın dahil olma ve dışlama kriterleri Tablo 3.4'te belirtildi. Çalışmaya dahil edilen her hastadan ACD, CPDA, EDTA, Heparin ve Sitrat'lı tüplere alınan kanlar santrifüj edilmedi ve tam kan şeklinde çalışıldı.

3.2.1.2. Numune hazırlığı ve takibi

Aynı hastadan alınan 5 farklı tüp bir deney seti olarak kabul edildi. Antibiyotiksiz ve sırayla 5 µl/ml, 10 µl/ml, 25 µl/ml konsantrasyonlarında içinde penisilin ve streptomisin bulunan antibiyotik solüsyonundan ilave edilerek 4 deney seti oluşturuldu. Bu şekilde hazırlanmış 4 deney seti 45 °C'ye ayarlanmış inkübatörde 24

saat inkübe edilerek 0, 3, 6, 9 ve 24. saatlerde aktivite ölçümleri yapıldı. Hazırlanan başka 4 deney seti ise 4°C koşullarında saklandı. İlk ay her hafta, ikinci ay iki haftada bir, sonra ayda bir olmak üzere 6 aylık takipleri tamamlandı.

Tablo 3.4: Dahil olma ve dışlama kriterleri

Dahil Olma Kriterleri	Dışlama Kriterleri
-Çalışmaya gönüllü olan hastalar	-Çalışmaya gönüllü olmayan hastalar
-18-65 yaş arası, kadın veya erkek hasta numuneleri	-Gebe ve emziren hastalar
	-HBs antijeni, anti-HCV antikor ve anti-HIV antikor dahil enfeksiyöz belirteçleri <u>POZİTİF</u> olan numuneler
	-Numunede bakteri, mantar üremesi olması
	-Hemolizli, lipemik ve ikterik numuneler
	-Pıhtılı numuneler
	-Tüplere uygun seviyede alınmamış numuneler (Yetersiz numune)

3.2.2. Likit enzim kontrol materyali hazırlanması

3.2.2.1. Hazırlanan tamponlar ve kokteyller

Deney basamaklarında kullanılan tampon ve kokteyllerin hazırlanış şekilleri aşağıdaki gibidir:

Glisin Tamponu: 80 ml distile su 100 ml balon jøjeye konuldu. İçine 5mM Glisin tartılarak eklendi. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (pH:8.24).

Glisin-Tris Tamponu: 80 ml distile su 100 ml balon jøjeye konuldu. İçine 25 mM Tris-baz ve 192 mM Glisin tartılarak eklendi. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (pH:8.70).

Glisin-NaOH Tamponu: 80 ml distile su 100 ml balon jøjeye konuldu. İçine 0.08 M Glisin ve 0.05125 M NaOH tartılarak eklendi. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (pH: 10.34).

Tris Tamponu: 80 ml distile su 100 ml balon jöjeye konuldu. İçine 50 mM Tris-baz ve 50 mM Tris-HCl tartılarak eklendi. Hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı (pH: 8.4)

Kokteyl 1: 5 mM N- Asetil sistein, 5 mM L-Sistein HCl, 5 mM β merkaptöetanol hazırlanan tamponlar ve distile su içinde çözülerek toplam hacim 4 ml'ye tamamlandı.

Kokteyl 2: %1 Albumin, 3 mM NADP, 5 mM β merkaptöetanol hazırlanan tamponlar ve distile su içinde çözülerek toplam hacim 4 ml'ye tamamlandı.

Kokteyl 3: 1 mM EDTA, 5 mM β merkaptöetanol, 5 mM DTT hazırlanan tamponlar ve distile su içinde çözülerek toplam hacim 4 ml'ye tamamlandı.

Kokteyl 4: 1 mM EDTA, 5 mM β merkaptöetanol, 5 mM DTT, 5 mM Glutasyon (reduced) hazırlanan tamponlar ve distile su içinde çözülerek toplam hacim 4 ml'ye tamamlandı.

Kokteyl 5: 1 mM EDTA, 5 mM β merkaptöetanol, 5 mM DTT, 5 mM Glutasyon (oxidized) hazırlanan tamponlar ve distile su içinde çözülerek toplam hacim 4 ml'ye tamamlandı.

3.2.2.2. pH çalışması

Deney basamaklarında hazırlanan çeşitli tamponlar ve distile su ile hazırlanan kokteyllerin ölçülen pH değerleri aşağıdaki gibidir:

Tablo 3.5: Çeşitli tamponlar ve distile su ile hazırlanmış olan kokteyllerin pH ölçüm sonuçları

(Glisin Tamponu)	(Glisin-Tris Tamponu)	(Glisin-NaOH Tamponu)
Kokteyl 1- 2.58	Kokteyl 1- 7.94	Kokteyl 1- 9.46
Kokteyl 2- 5.82	Kokteyl 2- 8.19	Kokteyl 2- 9.76
Kokteyl 3- 5.82	Kokteyl 3- 8.42	Kokteyl 3- 9.79
Kokteyl 4- 3.29	Kokteyl 4- 8.33	Kokteyl 4- 9.48
Kokteyl 5- 3.13	Kokteyl 5- 7.92	Kokteyl 5- 9.26

(TrisTamponu)**(Distile su)**

Kokteyl 1- 8.01

Kokteyl 1- 2.48

Kokteyl 2- 8.06

Kokteyl 2- 4.93

Kokteyl 3- 8.12

Kokteyl 3- 5.23

Kokteyl 4- 8.04

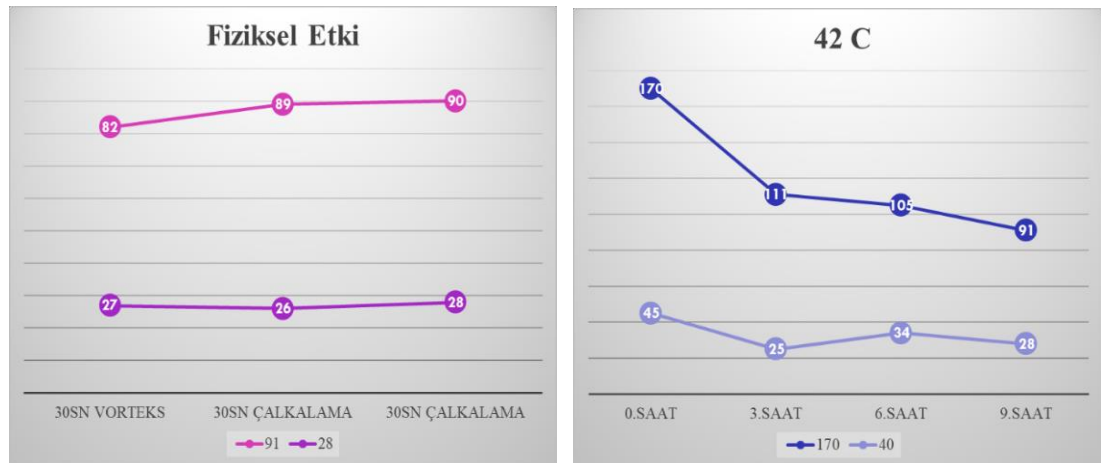
Kokteyl 4- 3.32

Kokteyl 5- 7.85

Kokteyl 5- 3.15

3.2.2.3. Deney süreci

Yapılan ön çalışmalarda kullanmakta olduğumuz likit enzim kontrol materyalinin farklı merkezlere transferi sırasında aktivite kaybına uğradığı tespit edildi. Bunun sebebini belirlemek için fiziksel etki ve sıcaklık ihtimalleri üzerinden ön deneyler yapıldı. Fiziksel etki, vorteksleme ve çalkalama ile test edildi. Sıcaklık için ise likit enzim kontrol materyali farklı derecelerde 9 saat inkübasyona tabi tutuldu. Yapılan deneylerde enzimin ön planda sıcaklık değişiminden etkilendiği belirlendi (Şekil 3.1). Bu sebeple deneylerde hazırlanan çeşitli likit enzim kontrol materyalleri belirlenen sıcaklıkta inkübasyona tabi tutuldu.



Şekil 3.1: Fiziksel etki ön deney sonuç grafiği (solda), sıcaklık ön deney sonuç grafiği (sağda)

Ticari olarak satın alınan farklı markalarda (Sigma ve Sorachim) liyofilize enzimler, süreç içinde tasarlanan farklı çözeltilerde çözülerek kullanıldı. Deney öncesinde

çözöldükten sonra dilüsyonla aktivitesi yaklaşık 200 U/dL'ye getirildi. Her deney setine distile suda çözülmüş enzim kontrol olarak dahil edildi. Tasarlanan her deney aşamasında deney setleri 45°C'de 24 saatlik inkübasyona tabi tutularak aktivite ölçümleri 0, 3, 6, 9 ve 24. saatlerde gerçekleştirildi. Hazırlanan aynı deney setlerinden 2 ml alikotlanarak +4 °C saklama koşulları altında takip edildi. İlk ay her hafta, ikinci ay iki haftada bir, sonra ayda bir olmak üzere 6 aylık aktivite ölçüm takipleri tamamlandı.

İlk deney aşamasında Glisin, Glisin-Tris, Glisin-NaOH ve Tris tamponlarında enzimler çözümlenerek deney aşamaları gerçekleştirildi. Daha sonra enzimin kofaktörü olan NADP, sürfaktan olarak albumin, sülfidril gruplarına karşı koruma sağlayan glutasyon, β-merkaptöetanol, ditiyothreitol, NAC, L-Sistein HCl, EDTA gibi kimyasal maddeler farklı konsantrasyonlarda eklenerek deney aşamaları gerçekleştirildi. Ön plana çıkan kimyasal maddelerle 5 adet kokteyl oluşturularak deney aşamaları tekrarlandı. Tablo 3.6'da deney aşamalarında çalışılan kimyasallar ve kombinasyonlar listelendi.

3.2.2.4. Laboratuvarlar arası çalışma

Laboratuvarlar arası stabilizasyon çalışması için Gaziantep ve Ankara'da bulunan iki laboratuvar belirlendi. Her deney setinden +4 °C'ye alikotlanarak 6 aylık takipleri tamamlanan materyallerden hangi kombinasyonların çalışmaya dahil edileceğine karar verildi. 12 farklı kombinasyondan G6PD aktivitesi 200 U/dL ve 50 U/dL olan iki seviye kontrol hazırlandı. Hazırlanan kontroller 1'den 24'e kadar kodlandı ve içeriklerine kodlama içerisinde yer verilmedi. Gönderilmeden önce 5 farklı sekonder tüpe 1ml olmak üzere alikotlandı. 1 sekonder tüp Bezmialem'de kalmak üzere her seviyeden 2'şer adet belirlenen merkezlere kargolandı. Merkezlere ulaşan sekonder tüplerden birer tanesi merkezimize geri yollandı. Sonrasında eş zamanlı olmak üzere G6PD aktivite takiplerine başlandı. İlk ay haftada bir, 2.ay 2 haftada bir olmak üzere ölçümler yapılarak takipler 2 aya tamamlandı.

Tablo 3.6: Deney aşamalarında çalışılan kombinasyonlar

Dsu (Sigma ve Sorachim) <ul style="list-style-type: none">•Albumin (%0.1, %1,%3)•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•NADP (1,3,5 mM)•1mM NADP+ %0.1 Albumin, 3mM NADP+%1 Albumin, 5mM NADP+ %3 Albumin•DTT (3,5,7 mM)•Glutatyon (3,5,7 mM)•Kokteyller
Glisin (Sigma ve Sorachim) <ul style="list-style-type: none">•Albumin (%0.1, %1,%3)•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•NADP (1,3,5 mM)•1mM NADP+ %0.1 Albumin, 3mM NADP+%1 Albumin, 5mM NADP+ %3 Albumin•DTT (3,5,7 mM)•Glutatyon (3,5,7 mM)•Kokteyller
Glisin-Tris (Sigma ve Sorachim) <ul style="list-style-type: none">•Albumin (%0.1, %1,%3)•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•NADP (1,3,5 mM)•1mM NADP+ %0.1 Albumin, 3mM NADP+%1 Albumin, 5mM NADP+ %3 Albumin•DTT (3,5,7 mM)•Glutatyon (3,5,7 mM)•Kokteyller
Glisin-NaOH (Sigma ve Sorachim) <ul style="list-style-type: none">•Albumin (%0.1, %1,%3)•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•NADP (1,3,5 mM)•1mM NADP+ %0.1 Albumin, 3mM NADP+%1 Albumin, 5mM NADP+ %3 Albumin•DTT (3,5,7 mM)•Glutatyon (3,5,7 mM)•Kokteyller
Tris (Sigma ve Sorachim) <ul style="list-style-type: none">•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•Albumin (%0.1, %1,%3) Albumin (%0.1, %1,%3)•1mM EDTA, 5mM β-merkaptöetanol, 1mM EDTA+ β-merkaptöetanol•NADP (1,3,5 mM)•1mM NADP+ %0.1 Albumin, 3mM NADP+%1 Albumin, 5mM NADP+ %3 Albumin•DTT (3,5,7 mM)•Glutatyon (3,5,7 mM)•Kokteyller

3.2.3. Liyofilize kontrol materyali hazırlanması

3.2.3.1. Hazırlanan tamponlar ve çözeltiler

Hemolizat hazırlama aşamasında kullanılan tampon ve çözeltilerin hazırlanma şekilleri aşağıdaki gibidir:

%0.9 NaCl: 9 gr NaCl tartılarak distile suyla total hacmi 1000 ml'ye tamamlandı.

%5 Sükroz: 5 gr sükroz tartılarak distile suyla total hacmi 100 ml'ye tamamlandı (pH:9.54).

PBS: 500 ml distile su içine 8 gr NaCl, 0.2 gr KCl, 1.44 gr Na₂HPO₄, 0.24 gr KH₂PO₄ tartılarak çözüldü ve total hacim 1000 ml'ye tamamlandı (pH:7.68).

Tris Tamponu: 50 mM Tris-HCl ve 50 mM Tris baz tartılarak 100 ml distile su içinde çözüldü ve total hacim 250 ml'ye tamamlandı (pH: 8.49).

Stabilize edici solüsyon: 2.7 mM EDTA hesaplanarak tartıldı ve 125 ml distile su ile karıştırıldı. EDTA çözülmeye kadar damla damla 25 mM NaOH eklenerek karıştırıldı. pH 7'ye ayarlandıktan sonra 0.7 mM β merkaptotanol ilave edildi ve total volüm 250 ml'ye tamamlandı.

3.2.3.2. Tam kan havuzu hazırlanması

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Sağlık Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne başvuran ve hekimlerin anamnez, fizik muayeneleri doğrultusunda istenen hemogram testleri için hastalardan EDTA'lı tüplere kan alınmaktadır. Çalışıldıktan 24 saat sonra ise tıbbi atık hükmünde olmaktadır. Bu kanlardan hemolizat oluşturmak için tam kan havuzu oluşturuldu ve G6PD enzim aktivitesine bakılarak deney basamaklarına devam edildi. Hastaların seroloji sonuçlarına ise hastane bilgi yönetim sisteminden bakılarak negatif olanlar çalışmaya dahil edildi. Hastanemizin Kan Merkezi'nde gelen hastalardan flebotomi yapılarak CPDA'lı torbalara alınan kanlar tıbbi atık hükmünde olmaktadır. Bu kanlardan da aynı şekilde tam kan havuzu oluşturularak aktivitesine bakıldıktan sonra deney basamaklarına devam edildi.

3.2.3.3. Hemolizat oluşturulması

Hazırlanan tam kan havuzları 1000 RCF'de, 4°C 'de 10 dakika santrifüj edilerek beyaz kan hücreleri ve plazmadan arındırıldı. Geride kalan eritrosit hücreleri 1000 RCF, 4°C'de 10 dakika santrifüjleme yoluyla üç kez soğuk %0.9 salin solüsyonu ile yıkandı. Distile su, PBS, sükröz, tris tamponu, stabilize edici solüsyon ve CPDA ile 1/2, 1/3, 1/5, 1/10, 1/20 dilüsyonlarında 10 dk elle çalkalama veya vorteksleme yoluyla eritrositler parçalanarak hemolizatlar oluşturuldu.

Bazı deney setlerine %1 gliserol, %3 gliserol, %1 albumin, 5 mM glisin ve kombinasyonları eklendi. Bezmialem ve TÜBİTAK'ta son deney aşamalarında çalışılan içerik listesi Tablo 3.7'de verildi. Örneğin; Sükröz 1/3-%1 Albumin+% 1 Gliserol, sükröz çözeltisinde 1/3 dilüsyonda hazırlanan hemolizata %1 Albumin ve %1 Gliserol eklendiğini ifade etmektedir. Sonrasında hazırlanan hemolizatlar liyofilizasyon şişelerine 2 ml olacak şekilde porsiyonlandı ve kapakları hafifçe açık kalacak şekilde yerleştirilerek liyofilizasyonun dondurma aşaması başlatıldı.

Tablo 3.7: Bezmialem ve TÜBİTAK'ta liyofilizasyon aşamasında çalışılmak üzere hazırlanan hemolizat içerik listesi

EDTA'lı tam kan havuzundan hazırlananlar (EDTA stok)	CPDA'lı tam kan havuzundan hazırlananlar (CPDA stok)
Sükroz 1/2	CPDA 1/3
Sükroz 1/5	CPDA 1/10
Sükroz 1/10	CPDA 1/20
Sükroz 1/20	CPDA 1/3- %1 Albumin+%1 Gliserol
Sükroz 1/3- %1 Albumin+%1 Gliserol	CPDA 1/10- %1 Albumin+%1 Gliserol
Sükroz 1/10- %1 Albumin+%1 Gliserol	CPDA 1/3- %1 Albumin+%3 Gliserol
Sükroz 1/3- %1 Albumin+%3 Gliserol	CPDA 1/10- %1 Albumin+%3 Gliserol
Sükroz 1/10- %1 Albumin+%3 Gliserol	CPDA 1/3-%1 Albumin+ 5mM Glisin
Sükroz 1/3- %1Albumin+ 5mM Glisin	CPDA 1/10-%1 Albumin+ 5mM Glisin
Sükroz 1/10- %1Albumin+ 5mM Glisin	CPDA 1/3- %1 Gliserol+5mM Glisin
PBS 1/2	CPDA 1/10- %1 Gliserol+5mM Glisin
PBS 1/5	
PBS 1/10	
PBS 1/20	
PBS 1/3- %1 Albumin+%1 Gliserol	
PBS 1/10- %1 Albumin+%1 Gliserol	
PBS 1/3- %1 Albumin+%3 Gliserol	
PBS 1/10- %1 Albumin+%3 Gliserol	
PBS 1/3- %1Albumin+5mM Glisin	
PBS 1/10- %1Albumin+5mM Glisin	

3.2.3.4. Liyofilizasyon aşaması

Donma döngüsü, primer kurutma ve sekonder kurutma basamaklarından oluşan liyofilizasyon işlemi, hem Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ar-Ge laboratuvarı hem de TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde gerçekleştirildi. Bezmialem'de kullandığımız liyofilizatörde kurutma aşamalarında sıcaklık değişikliği yapabildiğimiz ve süreci yakından takip edebildiğimiz bir sistem bulunmamaktaydı. Bu sebeple TÜBİTAK UME'den hizmet alımı yapıldı. Çalıştığımız tüm hemolizat içeriklerini bulunduran deney setleri hazırlandı. Dondurma, primer ve sekonder kurutma aşamaları için revize edilen protokol cihazda programlanarak hemolizatlar TÜBİTAK UME'de liyofilize edildi. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya

Ar-Ge laboratuvarı'nda uygulanan liyofilizasyon prosedürü aşağıda Tablo 3.8'de gösterildi. TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde uygulanan liyofilizasyon prosedürü ise aşağıda Tablo 3.9 ve Tablo 3.10'da gösterildi. Liyofilizasyon işlemi sonrası, şişelerin kapakları kapatılarak materyaller çözülene kadar -20 °C ve +4 °C 'ye kaldırıldı.

Tablo 3.8: Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ar-Ge laboratuvarında uygulanan liyofilizasyon prosedürü

Liyofilizasyon Aşamaları	Dondurma	Primer Kurutma	Sekonder Kurutma		
Sıcaklık (°C)	-80	-83	-83	-83	-83
Basınç (mBar)		0.140	0.280	0.340	0.420
Süre (saat)	17	24	2	2	2

Tablo 3.9: TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde uygulanan liyofilizasyon prosedürü

Liyofilizasyon Aşamaları	Dondurma	Primer Kurutma	Sekonder Kurutma
Sıcaklık (°C)	-30	*	28
Basınç (mBar)		*	0.400
Süre (saat)	3	*	1

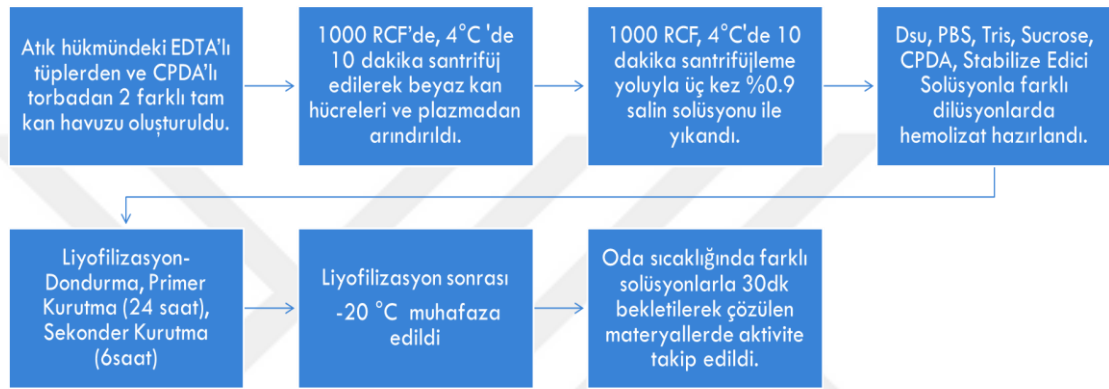
“*” ile gösterilen primer kurutma aşamalarının ayrıntıları Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10: TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü'nde uygulanan primer kurutma aşaması

Sıcaklık (°C)	-30	-25	-15	-5	0	10	20	25
Basınç (mBar)	0.267	0.133	0.133	0.133	0.133	0.200	0.267	0.333
Süre (dakika)	180	180	180	180	180	200	150	150

3.2.3.5. Liyofilizasyon sonrası takip aşaması

Liyofilize kontrol materyalleri kullanılmadan önce distile su, CPDA, sükröz, PBS, tris tamponu ve stabilize edici solüsyonla çözüldü. Bu solüsyonlarla sulandırıldıktan sonra yarım saat oda sıcaklığında çözülmesi beklendi. Aktivite ölçümü yapıldıktan sonra çözülmüş kontrol materyalleri 4 °C'de muhafaza edildi. Bu materyallerin 1, 3 ve 7.günlerde aktivite ölçümü yapılarak bir haftalık stabilite değerlendirilmesi yapıldı.



Şekil 3.2: Liyofilize kontrol materyali geliştirilmesinde gerçekleştirilen deney basamaklarının şematik gösterimi

3.2.4. G6PD aktivite ölçüm metodu

Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz Glukoz-6-fosfat dehidrojenaz aktivite ölçüm kiti, numune ön hazırlık işlemi olmaksızın tam kan örneklerinde çalışılabilmektedir. Enzimin aktivitesi 340 nm'de NADPH'nin absorbans değişikliğinin ölçülmesi ile hesaplanmaktadır (UV-spektrofotometrik enzim aktivite tayin testi). Bir internasyonal ünite (IU), normal şartlar altında 1 mikromol substratı 1 dakikada katalizleyen enzim miktarı olarak tanımlanmaktadır. Hasta enzim aktivitesi Hb değerine bölünerek IU/g Hb şeklinde sonuç verilmektedir.

3.2.5. İstatistiksel analiz

Her deney numunesi için, bazal ölçüm değerleri (zaman 0) ile seçilen farklı zaman noktalarındaki değerler arasındaki farklılıklar yüzde değişim (%PD) olarak, aşağıdaki formüle göre hesaplandı:

$$\%PD = [(tx - t0) / t0] \times 100$$

tx: bir analitin belirli bir x zaman noktasındaki konsantrasyonu

t0: bir analitin 0 zamanındaki konsantrasyonu

Daha sonra, her zaman noktası için %PD'nin ortalaması hesaplandı. Her zaman noktası ile 0 zamanı arasında izin verilen maksimum farklar, aşağıdaki denkleme göre *Toplam Değişim Limiti* (TLC) temel alınarak tanımlandı:

$$TLC = \pm \sqrt{(1,65*CVa)^2 + (0,5*CVb)^2}$$

Bu formüldeki CVa, ölçüm prosedürünün son 6 aydaki *analitik değişkenliği*dir. CVb ise Avrupa Klinik Kimya ve Laboratuvar Tıbbı Federasyonu (EFLM) biyolojik varyasyon veri tabanından elde edilen *birey içi biyolojik değişkenlik*dir.

Stabilite limiti (SL), %PD'nin TLC'ye eşit olduğu depolama süresi olarak belirlendi. Son zaman noktasında TLC'nin altında ortalama %PD değeri sergileyen numuneler için incelenen son zaman noktası SL olarak belirlendi. Ortalama %PD'nin TLC'nin üstünde çıkan durumlarda SL, EFLM Preanalitik Çalışma Grubu tavsiyeleri doğrultusunda regresyon analizi yapılarak aşağıdaki şekilde belirlendi [96, 97]:

$$SL = TLC / \beta$$

Formüldeki β değeri her numune için yapılan regresyon analizi sonucu oluşturulan kararsızlık denkleminin eğimidir.

Materyallerin 45°C deneylerinin 24.saat %PD değerleri ile +4°C deneylerinin 24.hafta %PD değerleri arasındaki ilişki Pearson korelasyon katsayısı ile incelendi.

İstatistik analizler için Microsoft Excel Analysis Toolpak uzantısı ve SPSS 26 (IBM Corporation, ABD) kullanıldı.

4. BULGULAR

4.1. TLC Değerinin Hesaplanması

TLC değeri aşağıdaki formülle hesaplandı. Formülde yer alan CVa değeri, kitin performans kriterlerinin değerlendirildiği aşamada hesaplanan %2,97 değeri olarak kabul edildi. CVb değeri için Westgard biyolojik varyasyon veri tabanından alınan G6PD spot %7,3 ve G6PD eritrosit %32,8 değerleri kullanıldı.

Likit enzim kontrol materyali için TLC değerinin hesaplanması:

$$TLC = \pm \sqrt{(1,65*CVa)^2 + (0,5*CVb)^2}$$

$$TLC = \pm \sqrt{(1,65*2,97)^2 + (0,5*7,3)^2}$$

$$TLC = \pm 6,1$$

Likit tam kan ve liyofilize kontrol materyali için TLC değerinin hesaplanması:

$$TLC = \pm \sqrt{(1,65*CVa)^2 + (0,5*CVb)^2}$$

$$TLC = \pm \sqrt{(1,65*2,97)^2 + (0,5*32,8)^2}$$

$$TLC = \pm 17,1$$

4.2. Likit Tam Kan Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi

Likit enzim kontrol materyali için çalışılan deney setlerinin 45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.1'de ve 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.2'de gosterildi. Sonuçlar, hesaplanan TLC değeri $\pm 17,1$ üzerinden değerlendirildi. Deney setlerinin llen son zaman noktasındaki %PD değerleri TLC değerinin üzerindeydi. Bu sebeple her numune için regresyon analizi yapılarak β değeri bulundu ve her birinin SL değeri hesaplandı. 45°C stabilite çalışma verileri değerlendirildiğinde SL değerlerinin heparin ve sitratlı tüplerde daha uzun olduğu gorld. Antibiyotiğin ve farklı konsantrasyonlarının enzim aktivitesi ve stabilitesine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edildi. 45°C stabilite çalışmasının deney sürecinde 6. saatte tüplerde makroskopik olarak hemoliz gorlmeye başlandı. Aynı zamanda heparin, sitrat, EDTA tüplerinde numunelerin kıvamında yoğunlaşma gorld. 4 °C stabilite çalışma verileri değerlendirildiğinde ACD ve CPDA'lı tüplerin SL değerlerinin daha uzun olduğu ve yaklaşık 6-8 hafta arasında stabil kaldığı gorld. Antibiyotiğin ve farklı

konsantrasyonlarının enzim aktivitesi ve stabilitesine herhangi bir etkisinin olmadığı tespit edildi.

Tablo 4.1: Likit tam kan kontrol materyali deneyinin 45 °C stabilite çalışma verileri

İçerik	%PD değerleri				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
ACD1-Abysiz	-26,8	-45,2	-50,3	-73,9	-3,7	4,7
CPDA1-Abysiz	-20,6	-36,1	-40,6	-69,0	-3,3	5,2
EDTA1-Abysiz	-27,8	-35,0	-38,3	-63,3	-3,1	5,6
SITRAT1-Abysiz	-32,4	-36,6	-31,0	-51,0	-2,6	6,6
HEPARIN1-Abysiz	-31,1	-45,2	-42,9	-60,5	-3,1	5,5
ACD2-5µL/ml	-24,7	-43,2	-46,9	-74,1	-3,6	4,7
CPDA2-5µL/ml	-19,0	-35,4	-38,0	-72,8	-3,4	5,1
EDTA2-5µL/ml	-14,7	-23,2	-20,5	-44,7	-2,1	8,3
SITRAT2-5µL/ml	-12,8	-12,8	-6,7	-38,3	-1,6	11,0
HEPARIN2-5µL/ml	-16,5	-20,3	-25,8	-41,8	-2,0	8,5
ACD3-10µL/ml	-27,2	-39,5	-51,9	-79,6	-3,8	4,5
CPDA3-10µL/ml	-22,6	-34,0	-41,5	-74,2	-3,5	5,0
EDTA3-10µL/ml	-29,5	-31,1	-32,6	-59,5	-2,8	6,0
SITRAT3-10µL/ml	-24,2	-24,8	-23,6	-52,2	-2,4	7,1
HEPARIN3-10µL/ml	-23,5	-26,8	-34,6	-52,5	-2,6	6,7
ACD4-25µL/ml	-31,9	-41,7	-55,2	-77,9	-3,9	4,4
CPDA4-25µL/ml	-26,7	-37,3	-47,2	-76,4	-3,7	4,7
EDTA4-25µL/ml	-29,7	-31,9	-37,8	-61,1	-3,0	5,8
SITRAT4-25µL/ml	-24,5	-26,4	-28,2	-52,8	-2,5	6,9
HEPARIN4-25µL/ml	-28,0	-30,8	-35,2	-54,4	-2,7	6,4

*Abysiz- Antibiyotik eklenmemiş

Tablo 4.2: Likit tam kan kontrol materyali deneyinin 4 °C stabilite çalışma verileri

İçerik	%PD değerleri										β değeri	SL (hf)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
ACD1-Abysiz	-1,8	-4,2	-16,2	-9,0	-10,8	-13,8	-28,7	-61,1	-46,7	-53,3	-2,5	6,8
CPDA1-Abysiz	-1,8	-3,6	-19,0	-9,5	-10,1	-13,1	-25,0	-58,3	-36,3	-47,6	-2,2	7,6
EDTA1-Abysiz	-0,5	-15,7	-35,5	-40,6	-60,9	-66,0	-72,6	-92,9	-83,8	-94,9	-5,0	3,4
SITRAT1-Abysiz	-14,2	-33,8	-41,2	-44,6	-69,6	-70,9	-85,8	-93,9	-83,8	-92,6	-5,2	3,3
HEPARIN1-Abysiz	-17,5	-41,3	-54,5	-68,3	-84,1	-89,4	-92,1	-100	-99,5	-100	-5,9	2,9
ACD2-5µL/ml	-1,4	-6,8	-19,7	-10,9	-15,6	-16,3	-33,3	-63,9	-50,3	-59,9	-2,8	6,1
CPDA2-5µL/ml	-4,8	-13,8	-18,6	-11,7	-12,4	-11,0	-26,9	-50,3	-35,2	-89,7	-2,8	6,0
EDTA2-5µL/ml	-2,4	-6,5	-17,3	-25,0	-44,6	-58,9	-74,4	-94,0	-92,3	-96,4	-5,0	3,5
SITRAT2-5µL/ml	-13,7	-35,6	-45,2	-51,4	-58,2	-58,9	-78,8	-93,8	-75,3	-84,9	-4,8	3,6
HEPARIN2-5µL/ml	-8,6	-22,8	-34,6	-51,9	-79,6	-90,7	-95,7	-100	-97,5	-100	-5,8	3,0
ACD3-10µL/ml	0,6	-11,6	-20,9	-12,2	-13,4	-16,9	-27,9	-67,4	-55,2	-61,0	-2,9	5,9
CPDA3-10µL/ml	0,0	-7,1	-17,3	-9,5	-11,9	-9,5	-18,5	-60,7	-37,5	-51,2	-2,3	7,5

EDTA3- 10µL/ml	-2,5	-11,6	-25,8	-34,8	-61,1	-73,7	-85,4	-99,0	-90,4	-91,9	-5,2	3,3
SITRAT3- 10µL/ml	-20,7	-34,3	-50,3	-60,9	-73,4	-74,0	-75,7	-98,2	-86,4	-90,5	-5,2	3,3
HEPARIN3 -10µL/ml	-8,4	-19,4	-46,1	-69,1	-90,1	-94,2	-96,3	-100	-98,4	-100	-5,9	2,9
ACD4- 25µL/ml	0,0	-5,9	-19,1	-11,8	-11,2	-13,8	-24,3	-61,8	-50,0	-58,6	-2,6	6,5
CPDA4- 25µL/ml	-1,3	-8,4	-20,0	-11,0	-10,3	-11,0	-17,4	-60,0	-38,1	-51,0	-2,3	7,5
EDTA4- 25µL/ml	2,3	-5,2	-17,2	-24,7	-47,7	-60,9	-76,4	-95,4	-85,1	-87,9	-4,8	3,6
SITRAT4- 25µL/ml	-22,2	-34,2	-43,7	-51,9	-65,8	-69,6	-82,3	-100	-89,2	-93,0	-5,3	3,2
HEPARIN4 -25µL/ml	-2,9	-17,0	-40,9	-64,9	-82,5	-91,8	-96,5	-100	-98,8	-100	-5,8	2,9

*Abysiz- Antibiyotik eklenmemiş

4.3. Likit Enzim Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi

4.3.1. Tampon deney verilerinin değerlendirilmesi

Likit enzim kontrol materyali için ön çalışmalar sonucunda belirlenen tamponlarla deneyler gerçekleştirildi. Deney setlerine distile suda çözülmüş enzim çözeltileri kontrol olarak konuldu. Tamponlarda çözülen enzimler Sorachim marka kullanıldı. Distile suda iki farklı marka kullanıldı. O sebeple markayı da ifade edecek şekilde kodlandı. 45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.3'te ve 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.4'te gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris tamponunda hazırlanan likit enzim materyali 24 saat stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 saat ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris ve GlisinNaOH tamponlarında hazırlanan likit enzim materyalleri 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.3: Tampon 45°C stabilite çalışma verileri

Tampon İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
Glisin	-0,29	-0,29	-7,67	-10,76	-0,5	13,0
GlisinTris	-14,74	-11,58	-13,76	-4,06		24
GlisinNaOH	-16,64	-19,14	-30,60	-37,68	-1,9	3,2
DsuSorachim	-1,01	-6,18	-5,47	-7,27	-0,4	16,2

Tablo 4.4: Tampon 4°C stabilite çalışma verileri

Tampon İçerik	Ortalama %PD								β değeri	SL (hf)
	1hf	3hf	4hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
Glisin	-1,21	-0,20	-7,37	-0,30	-3,02	-12,62	-6,46	-8,08	-0,4	15,1
GlisinTris	1,47	1,13	-4,86	4,07	2,94	-8,71	0,11	-1,13		24
GlisinNaOH	2,17	3,07	-3,61	0,81	1,53	-8,31	-4,06	-3,43		24
DsuSorachim	2,19	-0,89	-7,97	0,00	-5,08	-15,95	-11,86	-13,35	-0,6	9,9
DsuSigma	9,72	7,21	-3,38	9,72	4,15	0,65	7,10	8,08	0,3	18,2

4.3.2. NADP deney verilerinin değerlendirilmesi

Belirlenen tampon içeriklerine 1, 3, 5 mM NADP konularak deney aşamaları gerçekleştirildi. 45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.5'te ve 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.6'da gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalan GlisinTris-1mM NADP, GlisinTris-3mM NADP ve GlisinTris-5mM NADP likit enzim materyalleri 24 saat stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 saat ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak Dsusorachim-Kontrol likit enzim materyali 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.5: NADP 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
Glisin-1mM NADP	-35,8	-39,9	-43,5	-52,0	-2,8	2,2
Glisin-3mM NADP	-60,4	-68,5	-71,4	-83,2	-4,6	1,3
Glisin-5mM NADP	-64,9	-69,2	-77,6	-87,4	-4,9	1,3
GlisinTris-1mM NADP	-14,6	-14,5	-16,5	-4,9		24
GlisinTris-3mM NADP	-15,4	-16,1	-14,6	-5,0		24
GlisinTris-5mM NADP	-8,8	-10,0	-10,5	0,1		24
GlisinNaOH-1mM NADP	-8,7	-15,2	-28,8	-70,2	-2,9	2,1
GlisinNaOH-3mM NADP	-10,0	-20,1	-35,9	-78,2	-3,3	1,8
GlisinNaOH-5mM NADP	-9,6	-20,9	-37,5	-79,6	-3,4	1,8
Dsusora-Kontrol	-2,9	-6,6	-4,2	-8,7	-0,4	14,5
Dsusora-1mM NADP	-55,8	-59,9	-68,6	-72,5	-4,1	1,5
Dsusora-3mM NADP	-64,0	-71,9	-76,8	-83,0	-4,7	1,3
Dsusora-5mM NADP	-63,5	-72,4	-78,5	-88,2	-4,9	1,2
Dsusigma-Kontrol	-67,2	-83,5	-91,4	-97,3	-6	1
Dsusigma-1mM NADP	-56,2	-67,5	-78,6	-89,4	-4,9	1,2
Dsusigma-3mM NADP	-66,9	-72,3	-81,9	-91,2	-5,1	1,2
Dsusigma-5mM NADP	-71,1	-73,3	-82,5	-93,8	-5,2	1,2

Tablo 4.6: NADP 4°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD										β değeri	SL (hafta)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
Glisin-1mM NADP	-36,0	-45,5	-49,9	-58,4	-52,3	-54,6	-61,2	-64,2	-61,6	-62,7	-3,8	1,6
Glisin-3mM NADP	-50,2	-64,4	-67,4	-78,1	-74,6	-76,5	-80,2	-87,2	-86,5	-88,2	-5,3	1,2
Glisin-5mM NADP	-55,0	-69,4	-75,4	-83,4	-78,9	-81,1	-85,8	-91,4	-90,4	-92,0	-5,6	1,1
GlisinTris-1mM NADP	-7,7	-7,7	-8,1	-17,0	-10,8	-11,1	-12,3	-23,4	-17,8	-19,9	-1,1	5,6
GlisinTris-3mM NADP	-6,9	-10,2	-10,9	-20,2	-12,5	-16,1	-20,6	-32,7	-27,3	-30,3	-1,6	3,8
GlisinTris-5mM NADP	-6,7	-8,7	-11,5	-21,5	-15,7	-17,1	-23,3	-34,7	-34,8	-34,5	-1,8	3,4
GlisinNaOH-1mM NADP	-2,8	-10,9	-21,9	-37,0	-48,1	-60,1	-77,1	-88,4	-89,4	-92,0	-4,9	1,3
GlisinNaOH-3mM NADP	-6,8	-16,5	-26,2	-44,0	-52,7	-65,3	-80,4	-90,0	-91,3	-93,0	-5,0	1,2
GlisinNaOH-5mM NADP	-6,8	-18,9	-27,1	-43,8	-53,6	-65,2	-80,3	-89,8	-90,8	-93,0	-5,0	1,2

Dsusora-Kontrol	-2,9	-13,7	-2,9	-7,9	5,1	4,3	3,4	-6,9	6,8	5,1		24
Dsusora-1mM NADP	-47,1	-58,2	-66,0	-70,6	-70,1	-70,6	-74,9	-81,7	-83,2	-87,7	-5,0	1,2
Dsusora-3mM NADP	-54,4	-69,3	-74,5	-81,3	-78,1	-81,3	-85,0	-89,2	-90,2	-91,7	-5,5	1,1
Dsusora-5mM NADP	-55,4	-69,2	-76,6	-81,3	-76,8	-78,8	-83,2	-97,2	-88,7	-90,8	-5,5	1,1
Dsüsiga-Kontrol	3,8	3,8	6,7	-4,6	2,9	-6,2	-39,5	-56,5	-60,1	-62,5	-2,7	2,2
Dsüsiga-1mM NADP	-44,2	-59,3	-62,6	-88,0	-64,1	-65,2	-71,9	-81,3	-71,1	-70,9	-4,6	1,3
Dsüsiga-3mM NADP	-56,8	-70,8	-80,3	-83,4	-79,2	-81,9	-86,8	-90,7	-91,2	-92,9	-5,6	1,1
Dsüsiga-5mM NADP	-60,7	-73,9	-79,5	-94,0	-83,0	-85,8	-88,6	-99,3	-93,2	-94,1	-5,8	1,0

4.3.3. Albumin ve Albumin+NADP deney verilerinin değerlendirilmesi

45°C Albumin stabilite çalışma verileri Tablo 4.7’de, 45°C Albumin+NADP stabilite çalışma verileri Tablo 4.8’de 4°C Albumin+NADP stabilite çalışma verileri Tablo 4.9’da gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalan GlisinTris-1mM NADP+%0.1 Albumin, GlisinTris-3mM NADP+%1 Albumin, GlisinTris -5 mM NADP +%3 Albumin likit enzim materyalleri 24 saat stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 saat ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalan GlisinTris-1mM NADP +%0.1 Albumin ve Dsusorachim-Kontrol likit enzim materyali 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.7: Albumin 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-%0.1 ALB	-6,8	-7,5	-9,8	-8,1	-0,5	12,3
GLISIN-%1 ALB	-8,3	-8,2	-10,7	-10,2	-0,6	10,3
GLISIN-%3 ALB	-10,5	-10,5	-9,9	-9,6	-0,6	10,3
GLISINTRIS-%0.1 ALB	-9,3	-9,8	-10,4	-9,5	-0,6	10,5
GLISINTRIS-%1 ALB	-11,3	-10,0	-11,0	-9,5	-0,6	10,2
GLISINTRIS-%3 ALB	-13,0	-13,2	-14,3	-10,6	-0,7	8,6

GLISINNaOH-%0.1 ALB	-16,8	-22,0	-24,3	-33,0	-1,7	3,6
GLISINNaOH-%1 ALB	-17,4	-20,4	-22,1	-30,0	-1,6	3,9
GLISINNaOH-%3 ALB	-16,2	-19,7	-23,1	-28,6	-1,5	4,0
DSUSORA-%0.1 ALB	-11,6	-11,6	-12,5	-11,2	-0,7	8,8
DSUSORA-% 1 ALB	-12,3	-12,7	-11,3	-10,6	-0,7	9,1
DSUSORA-% 3 ALB	-13,1	-14,0	-15,3	-12,6	-0,8	7,6
DSIGMA	-88,0	-98,2	-100	-100	-5,9	1,0
DSIGMA-%0.1 ALB	-65,0	-85,2	-94,6	-100	-5,6	1,1
DSIGMA-%1 ALB	-62,8	-82,7	-92,9	-100	-5,6	1,1
DSIGMA-%3 ALB	-63,0	-81,2	-92,6	-100	-5,6	1,1

Tablo 4.8: Albumin+NADP 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-1 mM NADP +%0.1 ALB	-2,4	-5,4	-3,4	-15,3	-0,6	9,8
GLISIN-3 mM NADP +%1 ALB	-7,3	-9,2	-11,7	-23,6	-1,1	5,7
GLISIN-5 mM NADP +%3 ALB	-7,6	-8,5	-12,0	-24,0	-1,1	5,6
GLISINTRIS-1 mM NADP +%0.1 ALB	2,2	1,2	2,8	1,1		24
GLISINTRIS-3 mM NADP +%1 ALB	1,4	2,6	4,2	0,7		24
GLISINTRIS-5 mM NADP +%3 ALB	0,5	1,9	0,0	-2,4		24
GLISINNaOH-1 mM NADP +%0.1 ALB	-6,1	-12,6	-18,2	-66,0	-2,6	2,3
GLISINNaOH-3 mM NADP +%1 ALB	-3,0	-12,6	-20,3	-67,5	-2,7	2,3
GLISINNaOH-5 mM NADP +%3 ALB	-5,9	-12,8	-18,2	-61,4	-2,5	2,5
DSUSORA-K	-4,5	-3,9	-2,7	-7,3	-0,3	18,2
DSUSORA-1 mM NADP +%0.1 ALB	-7,3	-9,2	-10,5	-29,2	-1,2	4,9
DSUSORA-3 mM NADP +%1 ALB	-1,2	-3,8	-5,0	-13,9	-0,6	10,6
DSUSORA-5 mM NADP +%3 ALB	-5,8	-8,2	-8,6	-19,2	-0,9	7,1
DSIGMA-K	-56,8	-79,6	-86,9	-97,8	-5,4	1,1
DSIGMA-1 mM NADP +%0.1 ALB	-28,6	-47,7	-55,7	-88,6	-4,3	1,4
DSIGMA-3 mM NADP +%1 ALB	-19,3	-34,3	-40,6	-76,3	-3,5	1,7

DSIGMA-5 mM NADP +%3 ALB	-15,7	-28,9	-34,6	-67,2	-3,1	2,0
TRİS-KONTROL	-5,2	-6,8	-6,8	-9,9	-0,5	12,1
TRİS-1 mM NADP +%0.1 ALB	-1,8	-3,8	-3,3	-9,0	-0,4	15,7
TRİS-3 mM NADP +%1 ALB	-2,5	-3,6	-2,5	-8,6	-0,4	16,5
TRİS-5 mM NADP +%3 ALB	-3,9	-5,8	-3,8	-8,4	-0,4	15,2

Tablo 4.9: Albumin+NADP 4°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD										β değeri	SL (hafta)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
GLISIN-1 mM NADP +%0.1 ALB	-7,9	-17,6	-12,2	-11,2	-13,8	-13,4	-17,1	-13,2	-14,2	-13,2	0,9	6,9
GLISIN-3 mM NADP +%1 ALB	-23,3	-41,3	-42,2	-45,5	-53,8	-59,7	-68,5	-73,2	-74,8	-74,3	-4,3	1,4
GLISIN-5 mM NADP +%3 ALB	-28,9	-46,1	-49,5	-51,4	-61,5	-67,0	-77,5	-81,0	-84,0	-86,0	-4,9	1,3
GLISINTRIS-1 mM NADP +%0.1 ALB	-0,3	-9,7	0,8	1,8	1,1	-1,3	-2,0	-4,1	-4,8	-5,8		24
GLISINTRIS-3 mM NADP +%1 ALB	0,9	-10,5	-1,8	-1,8	-1,9	-4,8	-7,1	-9,4	-11,5	-13,4	-0,6	10,6
GLISINTRIS-5 mM NADP +%3 ALB	1,5	-11,5	-1,8	-1,6	-1,8	-4,8	-14,8	-9,2	-11,4	-11,9	-0,6	10,0
GLISINNaOH -1 mM NADP +%0.1 ALB	-2,2	-13,8	-10,8	-14,9	-27,0	-42,7	-69,1	-77,2	-83,3	-85,9	-4,3	1,4
GLISINNaOH -3 mM NADP +%1 ALB	-4,6	-18,4	-20,8	-24,9	-35,4	-43,7	-58,3	-68,7	-74,5	-79,2	-4,0	1,5
GLISINNaOH -5 mM NADP +%3 ALB	-11,6	-31,1	-33,3	-36,0	-43,8	-48,6	-60,3	-60,8	-65,6	-69,3	-3,7	1,6
DSUSORA-K	-2,7	-3,2	-5,2	0,1	1,3	-1,5	-5,3	-4,0	-3,2	0,2		24
DSUSORA-1 mM NADP +%0.1 ALB	-16,3	-28,3	-24,1	-24,1	-27,5	-27,7	-31,3	-21,3	-19,3	-17,0	-1,4	4,3
DSUSORA-3 mM NADP +%1 ALB	-10,0	-21,1	-19,2	-19,1	-22,5	-24,7	-30,8	-23,0	-24,7	-21,3	-1,5	4,1
DSUSORA-5 mM NADP +%3 ALB	-19,5	-31,9	-27,6	-29,6	-36,6	-39,2	-42,9	-42,2	-42,1	-40,7	-2,5	2,4
DSIGMA-K	-35,9	-14,3	-8,8	-6,0	-3,5	-3,0	-33,2	-39,8	-44,7	-52,5	-2,2	2,7
DSIGMA-1 mM NADP +%0.1 ALB	-21,5	-30,9	-26,7	-27,2	-32,8	-34,7	-36,1	-36,1	-33,2	-34,7	-2,2	2,8
DSIGMA-3 mM NADP +%1 ALB	-23,3	-39,6	-34,8	-37,2	-38,2	-41,6	-45,9	-50,7	-57,0	-60,9	-3,2	1,9
DSIGMA-5 mM NADP +%3 ALB	-22,1	-32,4	-30,9	-32,4	-50,9	-50,0	-47,5	-44,6	-43,2	-35,9	-2,7	2,3
TRİS-1 mM NADP +%0.1 ALB	-2,7	-10,9	-3,6	-2,7	-1,5	-6,2	-6,7	-9,3	-11,4	-11,3	-0,6	11,0

TRİS-3 mM NADP +%1 ALB	-4,7	-16,4	-9,6	-10,1	-10,6	-15,9	-19,0	-18,8	-22,6	-22,3	-1,2	5,1
TRİS-5 mM NADP +%3 ALB	-6,9	-17,9	-11,9	-13,4	-10,8	-14,6	-22,6	-16,6	-19,0	-18,3	-1,1	5,5

4.3.4. DTT ve Glutasyon deney verilerinin değerlendirilmesi

45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.10'da ve 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.11'de gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris-3 mM Glutasyon (reduced) , GlisinTris -5 mM Glutasyon (reduced) , GlisinTris -7 mM Glutasyon (reduced), GlisinNaOH-3 mM Glutasyon (reduced), GlisinNaOH -5 mM Glutasyon (reduced), GlisinNaOH -7 mM Glutasyon (reduced), Tris-3 mM Glutasyon (reduced), Tris -5 mM Glutasyon (reduced), Tris -7 mM Glutasyon (reduced) likit enzim materyali 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.10: DTT+ Glutasyon 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-3 mM DTT	-98,8	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-5 mM DTT	-97,6	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-7 mM DTT	-17,5	-39,2	-71,3	-100	-4,7	1,3
GLISIN-3 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-5 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-7 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISINTRIS-3 mM DTT	-8,8	-8,8	-7,7	-10,3	-0,6	10,8
GLISINTRIS-5 mM DTT	-7,8	-8,9	-6,4	-7,8	-0,5	13,3
GLISINTRIS-7 mM DTT	-6,8	-6,8	-7,3	-7,4	-0,4	14,0
GLISINTRIS-3 mM Glutasyon (reduced)	-7,3	-8,3	-4,0	-8,4	-0,4	13,8
GLISINTRIS-5 mM Glutasyon (reduced)	-10,2	-9,2	-8,3	-8,7	-0,5	11,6
GLISINTRIS-7 mM Glutasyon (reduced)	-8,4	-8,9	-6,3	-9,0	-0,5	12,2

GLISINNaOH-3 mM DTT	-10,5	-12,5	-12,9	-28,3	-1,3	4,7
GLISINNaOH-5mM DTT	-6,8	-9,3	-10,0	-27,7	-1,2	5,2
GLISINNaOH-7mM DTT	-7,2	-9,3	-8,9	-21,8	-1,0	6,3
GLISINNaOH-3 mM Glutasyon (reduced)	-9,0	-11,8	-11,8	-19,9	-1,0	6,3
GLISINNaOH-5 mM Glutasyon (reduced)	-9,5	-12,0	-11,0	-18,6	-0,9	6,6
GLISINNaOH-7mM Glutasyon (reduced)	-7,3	-8,4	-8,2	-14,9	-0,7	8,5
DSUSORA-K	-65,2	-80,1	-83,0	-93,1	-5,2	1,2
DSUSORA-3 mM DTT	-32,2	-81,5	-100	-100	-5,5	1,1
DSUSORA-5 mM DTT	-14,9	-40,8	-70,1	-100	-4,7	1,3
DSUSORA-7 mM DTT	-15,3	-27,0	-53,4	-100	-4,4	1,4
DSUSORA-3 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSUSORA-5 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSUSORA-7 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-K	-47,9	-77,3	-92,1	-100	-5,5	1,1
DSIGMA-3 mM DTT	-17,9	-100	-100	-100	-5,6	1,1
DSIGMA-5 mM DTT	-12,4	-32,1	-90,6	-100	-4,9	1,2
DSIGMA-7mM DTT	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-3 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-5 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-7 mM Glutasyon (reduced)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
TRİS-3 mM DTT	-7,8	-8,9	-6,8	-14,5	-0,7	8,8
TRİS-5 mM DTT	-7,9	-7,6	-6,1	-15,3	-0,7	8,7
TRİS-7 mM DTT	-9,4	-13,4	-18,4	-40,8	-1,8	3,4
TRİS-3 mM Glutasyon (reduced)	-7,6	-7,6	-7,3	-11,8	-0,6	10,3
TRİS-5 mM Glutasyon (reduced)	-6,4	-8,2	-6,8	-9,1	-0,5	12,3
TRİS-7 mM Glutasyon (reduced)	-8,2	-10,5	-9,8	-12,7	-0,7	8,9

Tablo 4.11: DTT+ Glutasyon 4°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD										β değeri	SL (hafta)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
GLISIN-3 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
GLISIN-5 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
GLISIN-7 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-100	-100	-100	-100	-6,2	1,0
	25,0	45,6	82,0	94,4	99,5	99,4						

GLISIN-3 mM Glutatyon (reduced)	- 72,4	- 81,3	- 89,9	- 95,4	- 98,7	- 99,0	-100	-100	-100	-100	-6,3	1,0
GLISIN-5 mM Glutatyon (reduced)	- 82,3	- 89,6	- 95,3	- 98,1	- 98,6	- 100	-100	-100	-100	-99,8	-6,3	1,0
GLISIN-7 mM Glutatyon (reduced)	- 91,2	- 95,1	- 97,7	- 100	- 100	- 100	-100	-100	-99,6	-99,6	-6,3	1,0
GLISINTRIS- 3 mM DTT	-8,8	-7,7	-7,2	-8,7	-8,8	- 10,7	-18,5	-6,2	-5,7	-8,8	-0,6	10,6
GLISINTRIS- 5 mM DTT	-8,2	-5,1	-8,2	-8,1	-3,7	-4,0	-16,1	-5,1	-1,5	-6,2	-0,4	15,8
GLISINTRIS- 7 mM DTT	-6,9	-9,0	-8,0	-8,4	-6,7	-8,2	-15,2	-6,8	-8,4	-7,3	0,5	-11,2
GLISINTRIS- 3 mM Glutatyon (reduced)	-7,7	-5,7	-5,2	-3,6	-5,2	-4,6	-14,0	-2,1	-2,0	0,0		24
GLISINTRIS- 5 mM Glutatyon (reduced)	-6,1	-7,0	-7,6	-7,2	-6,5	-6,0	-13,3	-3,6	-1,5	-1,2		24
GLISINTRIS- 7 mM Glutatyon (reduced)	-5,6	-5,6	-5,1	-3,4	-5,0	-5,4	-13,2	-4,0	-3,1	-2,9		24
GLISINNaOH- 3 mM DTT	- 15,3	- 17,2	- 15,8	- 15,4	- 17,6	- 15,3	-25,4	-16,7	-19,6	-15,6	-1,1	5,3
GLISINNaOH- 5mM DTT	- 23,9	- 23,8	- 23,8	- 26,2	- 24,8	- 23,8	-35,4	-24,8	-24,3	-25,7	-1,7	3,7
GLISINNaOH- 7mM DTT	- 17,4	- 13,0	- 16,2	- 16,9	- 17,4	- 19,3	-27,5	-20,7	-19,4	-20,3	-1,3	4,7
GLISINNaOH- 3 mM Glutatyon (reduced)	-6,2	-3,8	-2,4	-0,9	-0,5	-1,9	-14,2	-0,5	-0,9	0,9		24
GLISINNaOH- 5 mM Glutatyon (reduced)	-3,8	-1,5	-1,9	0,5	-3,8	-1,4	-15,2	2,3	0,6	1,0		24
GLISINNaOH- 7mM Glutatyon (reduced)	0,5	2,6	-1,6	0,4	0,5	2,0	-10,8	2,0	4,5	2,4		24
DSUSORA-K	- 71,1	- 83,0	- 84,7	- 87,3	- 90,1	- 91,7	-93,9	-95,5	-96,8	-97,7	-6,0	1,0
DSUSORA-3 mM DTT	- 97,5	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
DSUSORA-5 mM DTT	- 96,4	- 99,5	- 100	- 100	- 100	- 100	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
DSUSORA-7 mM DTT	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100	-100	-99,9	-100	-100	-6,4	1,0
DSUSORA-3 mM Glutatyon (reduced)	- 70,6	- 78,0	- 87,2	- 90,8	- 95,0	- 97,2	-99,1	-99,2	-100	-100	-6,2	1,0
DSUSORA-5 mM Glutatyon (reduced)	- 79,4	- 81,0	- 85,7	- 88,1	- 91,3	- 93,0	-96,3	-96,8	-98,6	-99,0	-6,1	1,0
DSUSORA-7 mM Glutatyon (reduced)	- 83,0	- 85,0	- 90,0	- 93,0	- 95,0	- 96,0	-98,8	-98,8	-100	-100	-6,2	1,0
DSIGMA-K	-8,9	- 11,3	-3,5	- 12,3	- 16,8	- 15,3	-28,7	-22,6	-26,8	-30,2	-1,5	4,0
DSIGMA-3 mM DTT	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100	- 100	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0

DSIGMA-5 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
	100	100	100	100	100	99,5						
DSIGMA-7mM DTT	-	-	-	-	-	-	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
	100	100	100	100	100	99,4						
DSIGMA-3 mM Glutasyon (reduced)	-	-	-	-	-	-	-87,2	-88,1	-90,8	-93,6	-5,5	1,1
	50,3	55,1	66,1	69,7	77,1	79,8						
DSIGMA-5 mM Glutasyon (reduced)	-	-	-	-	-	-	-98,4	-98,9	-98,9	-100	-6,1	1,0
	63,4	67,9	78,6	84,8	92,3	94,6						
DSIGMA-7 mM Glutasyon (reduced)	-	-	-	-	-	-	-96,9	-96,9	-98,5	-98,6	-6,0	1,0
	69,9	71,1	77,1	82,6	89,6	92,8						
TRİS-3 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-33,3	-25,9	-31,5	-36,1	-1,8	3,4
	13,1	10,8	15,3	13,1	18,1	17,6						
TRİS-5 mM DTT	-6,0	-	-	-9,2	-	-	-23,5	-12,9	-12,0	-12,9	-0,9	7,0
		11,2	12,4		10,7	12,4						
TRİS-7 mM DTT	-	-	-	-	-	-	-45,3	-42,7	-51,0	-58,3	-2,9	2,1
	17,1	21,8	23,2	25,9	30,5	30,7						
TRİS-3 mM Glutasyon (reduced)	-5,5	-1,8	-6,0	-1,0	-5,0	-5,5	-17,0	-3,2	-5,1	-1,4		24
TRİS-5 mM Glutasyon (reduced)	-3,8	-2,8	-3,7	-3,7	-4,2	-3,2	-15,1	-4,1	-5,2	-3,7		24
TRİS-7 mM Glutasyon (reduced)	-6,5	-6,0	-4,1	-3,3	-6,7	-6,5	-16,8	-6,0	-8,2	-4,9		24

4.3.5. Kokteyl deney verilerinin değerlendirilmesi

45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.12’de, 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.13’te gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris-Kokteyl 1 ve Tris-Kokteyl 1 likit enzim materyalleri 24 saat stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 saat ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris-Kokteyl 4 ve GlisinTris -Kokteyl 5 likit enzim materyali 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.12: Kokteyl 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-K	0,8	-3,8	-5,5	-10,1	-0,4	13,7
GLISIN-3 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-5 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-7 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-Kokteyl 2	-3,2	-6,6	-9,7	-14,1	-0,7	9,0
GLISIN-Kokteyl 3	-4,1	-10,5	-7,0	-8,8	-0,5	12,2
GLISIN-Kokteyl 4	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-Kokteyl 5	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISINTRIS-K	-2,3	-4,8	-6,5	-11,7	-0,5	11,4
GLISINTRIS-3 mM Glutasyon (oxidized)	-2,1	-4,0	-5,1	-9,7	-0,4	13,9
GLISINTRIS-5 mM Glutasyon (oxidized)	-3,7	-5,4	-5,8	-9,7	-0,5	13,1
GLISINTRIS-7 mM Glutasyon (oxidized)	-5,4	-2,2	-4,4	-7,5	-0,4	17,2
GLISINTRIS- Kokteyl 1	-3,2	-1,5	-5,5	-5,9		24
GLISINTRIS- Kokteyl 2	-2,6	-6,2	-8,5	-6,8	-0,4	15,1
GLISINTRIS- Kokteyl 3	-3,6	-6,2	-7,4	-12,9	-0,6	10,1
GLISINTRIS- Kokteyl 4	-6,2	-6,1	-6,7	-11,4	-0,6	11,0
GLISINTRIS- Kokteyl 5	-2,3	-2,8	-6,3	-8,1	-0,4	15,6
GLISINNaOH-K	-12,0	-15,6	-23,4	-45,4	-2,0	3,0
GLISINNaOH-3 mM Glutasyon (oxidized)	-7,0	-10,7	-13,8	-26,4	-1,2	5,1
GLISINNaOH-5 mM Glutasyon (oxidized)	-5,5	-7,9	-10,3	-22,6	-1,0	6,1
GLISINNaOH-7 mM Glutasyon (oxidized)	-4,8	-8,4	-12,3	-19,0	-0,9	6,8
GLISINNaOH- Kokteyl 1	-6,3	-14,1	-10,6	-22,2	-1,0	5,8
GLISINNaOH- Kokteyl 2	-5,3	-19,1	-25,6	-68,7	-2,9	2,1
GLISINNaOH- Kokteyl 3	-7,4	-16,0	-16,4	-33,1	-1,5	4,0
GLISINNaOH- Kokteyl 4	-5,7	-11,8	-11,8	-27,0	-1,2	5,1
GLISINNaOH- Kokteyl 5	-6,5	-12,7	-15,1	-23,5	-1,1	5,4
DSUSORA-K	-1,6	-7,0	-2,0	-8,2	-0,4	16,4
DSUSORA-3 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSUSORA-5 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0

DSUSORA-7 mM Glutasyon (oxidized)	-50,0	-100	-100	-100	-5,8	1,1
DSUSORA- Kokteyl 2	-3,3	-7,5	-7,5	-15,0	-0,7	8,9
DSUSORA- Kokteyl 3	-39,7	-73,9	-86,4	-99,4	-5,3	1,1
DSUSORA- Kokteyl 4	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSUSORA- Kokteyl 5	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-K	-62,2	-86,7	-91,5	-98,0	-5,5	1,1
DSIGMA-3 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-7 mM Glutasyon (oxidized)	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-Kokteyl 2	-22,7	-46,8	-53,9	-82,1	-4,0	1,5
DSIGMA-Kokteyl 3	-89,3	-98,9	-98,9	-100	-5,9	1,0
DSIGMA-Kokteyl 4	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
TRİS-K	-3,5	-2,6	-3,5	-8,5	-0,4	16,4
TRİS-3 mM Glutasyon (oxidized)	-3,4	-2,1	-4,9	-6,5	-0,3	19,2
TRİS-5 mM Glutasyon (oxidized)	-1,2	-2,2	-4,4	-6,6	-0,3	19,9
TRİS-7 mM Glutasyon (oxidized)	-4,4	-1,6	-3,8	-7,0	-0,3	19,0
TRİS-Kokteyl 1	-2,8	-2,8	-2,9	-4,0		24
TRİS-Kokteyl 2	-2,1	-5,5	-5,9	-7,6	-0,4	15,6
TRİS-Kokteyl 3	-1,6	-4,2	-5,9	-7,5	-0,4	16,3
TRİS-Kokteyl 4	-0,5	-3,8	-5,8	-6,9	-0,3	17,6
TRİS-Kokteyl 5	-1,5	-3,9	-3,9	-7,0	-0,3	18,5

Tablo 4.13: Kokteyl 4°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD										β değeri	SL (hf)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
GLISIN-K	-3,8	-0,4	-2,4	-4,2	-3,8	-8,8	-14,3	-15,9	-20,6	-22,6	-1,0	6,1
GLISIN-3 mM Glutasyon (oxidized)	- 18,0	-26,9	-27,0	-29,9	-38,7	-49,0	-59,0	-66,6	-77,1	-75,3	-4,0	1,5
GLISIN-5 mM Glutasyon (oxidized)	- 36,5	-52,8	-57,2	-64,3	-74,3	-86,0	-91,8	-95,3	-98,1	-97,9	-5,7	1,1
GLISIN-7 mM Glutasyon (oxidized)	- 75,0	-91,3	-93,4	-93,5	-93,4	-100	-100	-100	-96,7	-100	-6,2	1,0
GLISIN- Kokteyl 2	-8,8	-13,2	-15,4	-21,1	-24,2	-30,4	-42,3	-50,7	-56,8	-63,3	-3,0	2,0
GLISIN- Kokteyl 3	-7,0	-5,6	-5,4	-7,5	-4,4	-13,3	-10,0	-9,3	-11,1	-12,8	-0,7	9,2

GLISIN-Kokteyl 4	-23,5	-28,9	-29,8	-42,3	-40,7	-53,5	-64,8	-68,5	-80,6	-84,8	-4,3	1,4
GLISIN-Kokteyl 5	-87,9	-94,4	-100	-97,2	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
GLISINTR IS-K	-3,5	-1,6	-3,1	-4,8	-2,2	-6,8	-6,8	-7,8	-7,4	-10,4	-0,5	13,0
GLISINTR IS-3 mM Glutatyon (oxidized)	-2,3	-2,6	-2,2	-1,8	-1,3	-10,6	-5,6	-7,0	-6,5	-8,5	-0,4	14,6
GLISINTR IS-5 mM Glutatyon (oxidized)	-4,4	-4,4	-4,8	-5,2	-4,4	-11,3	-6,1	-8,7	-7,9	-8,2	-0,5	12,6
GLISINTR IS-7 mM Glutatyon (oxidized)	-3,1	-0,8	-1,8	-3,6	-4,0	-3,8	-4,9	-5,9	-8,0	-8,1	-0,4	15,6
GLISINTR IS-Kokteyl 1	-4,0	-1,4	-1,8	-3,2	-2,8	-10,5	-5,4	-5,5	-9,5	-6,8	-0,4	14,6
GLISINTR IS-Kokteyl 2	-2,7	-1,3	-2,8	-5,4	-6,3	-21,2	-10,7	-12,6	-15,8	-19,4	-0,9	6,8
GLISINTR IS-Kokteyl 3	-0,9	-0,4	2,2	-2,7	0,5	-8,4	-10,6	-4,9	-3,6	-6,2	-0,3	18,5
GLISINTR IS-Kokteyl 4	-2,5	-1,8	-1,8	-3,4	-4,4	-4,6	-3,4	-6,1	-10,2	-6,1		24
GLISINTR IS-Kokteyl 5	-1,4	0,0	-2,8	-2,7	-0,9	-3,1	-3,7	-5,0	-3,6	-4,9		24
GLISINNa OH-K	-6,0	-5,9	-4,7	-7,3	-6,0	-5,9	-8,8	-10,6	-10,5	-14,1	-0,6	9,5
GLISINNa OH-3 mM Glutatyon (oxidized)	-5,1	-4,5	-5,6	-8,3	-6,9	-13,7	-9,3	-9,7	-13,4	-11,4	-0,7	9,0
GLISINNa OH-5 mM Glutatyon (oxidized)	-2,8	-2,0	-5,1	-4,2	-7,5	-8,4	-10,5	-10,9	-11,8	-11,8	-0,6	9,5
GLISINNa OH-7 mM Glutatyon (oxidized)	-4,3	-4,2	-3,4	-4,7	-3,3	-5,1	-10,0	-8,5	-13,4	-11,8	-0,6	10,1
GLISINNa OH-Kokteyl 1	-4,8	-2,4	-2,3	-5,4	-5,3	-10,1	-9,5	-11,0	-14,9	-17,3	-0,8	8,0
GLISINNa OH-Kokteyl 2	-4,7	8,2	-15,7	-24,2	-34,6	-50,1	-62,8	-74,4	-80,9	-84,1	-4,2	1,5
GLISINNa OH-Kokteyl 3	-1,9	-3,6	-2,9	-1,4	-2,8	-6,4	-6,5	-9,8	-9,3	-11,8	-0,5	11,6
GLISINNa OH-Kokteyl 4	-1,9	-0,8	-2,0	-3,8	-2,8	-10,4	-3,8	-8,4	-12,4	-9,0	-0,5	12,0
GLISINNa OH-Kokteyl 5	-2,4	-0,9	-1,5	-2,9	-2,9	-4,2	-8,4	-7,6	-9,9	-11,3	-0,5	12,0
DSUSORA-K	0,4	0,9	-0,1	-0,4	-6,2	-19,7	-30,7	-44,8	-54,9	-69,8	-2,7	2,3
DSUSORA-3 mM	-33,5	-45,6	-53,8	-62,3	-68,9	-78,2	-86,2	-91,5	-96,8	-96,8	-5,5	1,1

Glutatyon (oxidized)												
DSUSORA -5 mM Glutatyon (oxidized)	-63,0	-80,1	-87,7	-87,8	-86,2	-90,8	-90,6	-93,8	-100	-100	-6,0	1,0
DSUSORA -7 mM Glutatyon (oxidized)	-30,0	-40,0	-43,3	-50,0	-50,0	-100	-100	-100	-100	-100	-5,8	1,1
DSUSORA -Kokteyl 2	-8,7	-12,8	-13,8	-20,4	-27,5	-34,9	-48,4	-56,7	-58,9	-62,2	-3,2	1,9
DSUSORA -Kokteyl 3	-23,9	-28,3	-29,5	-32,8	-33,8	-43,3	-43,7	-45,4	-50,3	-53,0	-2,9	2,1
DSUSORA -Kokteyl 4	-31,7	-50,4	-53,1	-60,1	-71,1	-79,6	-88,2	-94,4	-97,5	-98,9	-5,6	1,1
DSUSORA -Kokteyl 5	-89,3	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-100	-6,4	1,0
DSIGMA-K	-11,6	-9,9	-10,4	-15,5	-16,3	-23,8	-36,3	-57,0	-76,6	-85,0	-3,5	1,7
DSIGMA-3 mM Glutatyon (oxidized)	-43,7	-56,3	-65,6	-68,8	-74,4	-85,6	-89,4	-94,4	-96,2	-97,5	-5,7	1,1
DSIGMA-7 mM Glutatyon (oxidized)	-20,0	-20,0	-10,0	-30,0	-40,0	-100	-100	-100	-100	-90,0	-5,5	1,1
DSIGMA-Kokteyl 2	-14,8	-23,8	-25,9	-32,1	-38,3	-44,8	-55,6	-64,0	-70,4	-76,4	-3,8	1,6
DSIGMA-Kokteyl 3	-12,0	-14,0	-9,7	-12,9	-12,5	-14,9	-13,7	-14,8	-16,6	-20,2	-1,0	6,0
DSIGMA-Kokteyl 4	-80,1	-90,6	-90,6	-100	-98,5	-100	-100	-100	-100	-100	-6,3	1,0
TRİS-K	-11,2	-7,9	-6,0	-10,2	-9,1	-15,9	-11,3	-12,8	-15,0	-13,3	-0,8	7,5
TRİS-3 mM Glutatyon (oxidized)	-9,2	-10,2	-7,2	-8,4	-7,1	-11,3	-10,4	-10,3	-12,0	-14,0	-0,7	8,5
TRİS-5 mM Glutatyon (oxidized)	-8,1	-9,1	-8,2	-7,6	-9,2	-10,2	-10,8	-13,5	-12,3	-15,2	-0,8	7,8
TRİS-7 mM Glutatyon (oxidized)	-9,3	-9,7	-8,3	-8,7	-8,7	-16,3	-12,7	-13,1	-14,8	-14,6	-0,9	7,2
TRİS-Kokteyl 1	-3,9	-3,8	-5,1	-5,0	-4,5	-8,8	-10,2	-8,9	-12,4	-9,5	-0,6	10,4
TRİS-Kokteyl 2	-4,9	-8,1	-9,5	-13,7	-15,4	-24,6	-22,6	-24,7	-30,0	-31,8	-1,6	3,8
TRİS-Kokteyl 3	-4,3	-5,4	-5,5	-5,9	-4,9	-7,5	-8,8	-8,1	-8,1	-8,0	-0,5	12,5
TRİS-Kokteyl 4	-5,9	-4,2	-5,5	-7,2	-6,5	-13,4	-8,8	-9,2	-8,1	-10,4	-0,6	10,6
TRİS-Kokteyl 5	-6,0	-2,6	-5,1	-7,4	-4,9	-12,0	-9,5	-7,1	-9,9	-9,9	-0,6	10,9

4.3.6. β -merkaptotanol ve EDTA deney verilerinin değerlendirilmesi

45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.14'te gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris-5mM β -merkaptotanol, GlisinTris -1mM EDTA ve GlisinTris -5mM β -merkaptotanol+1mM EDTA likit enzim materyalleri 24 saat stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 saat ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.14: β -merkaptotanol- EDTA 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-5mM β -merkaptotanol	-7,7	-9,9	-11,3	-18,1	-0,9	6,9
GLISIN-1mM EDTA	-65,4	-74,6	-83,7	-80,9	-4,8	1,3
GLISIN-5mM β -merkaptotanol + 1mM EDTA	-55,6	-63,4	-67,8	-53,2	-3,5	1,8
GLISINTRIS-5mM β -merkaptotanol	-9,2	-9,3	-9,8	-1,0		24
GLISINTRIS-1mM EDTA	-12,8	-11,8	-11,3	-1,5		24
GLISINTRIS-5mM β -merkaptotanol+1mM EDTA	-6,9	-5,8	-6,2	-1,4		24
GLISINNaOH-5mM β -merkaptotanol	-9,8	-12,6	-18,2	-30,8	-1,4	4,2
GLISINNaOH-1mM EDTA	-12,6	-15,9	-20,2	-31,3	-1,5	4,0
GLISINNaOH-5mM β -merkaptotanol+1mM EDTA	-11,2	-14,3	-18,5	-32,6	-1,5	4,0
DSUSORA	-35,1	-32,6	-38,3	-39,1	-2,3	2,7
DSUSORA-5mM β -merkaptotanol	-40,3	-47,2	-57,2	-69,6	-3,7	1,7
DSUSORA-1mM EDTA	-68,5	-82,4	-88,8	-94,9	-5,4	1,1
DSUSORA-5mM β -merkaptotanol+1mM EDTA	-100	-100	-98,6	-99,3	-5,9	1,0
DSIGMA	-100	-100	-99,3	-100	-6,0	1,0
DSIGMA-5mM β -merkaptotanol	-81,5	-94,3	-96,6	-99,2	-5,8	1,1
DSIGMA-1mM EDTA	-92,8	-98,9	-99,0	-100	-5,9	1,0
DSIGMA-5mM β -merkaptotanol+1mM EDTA	-76,1	-90,7	-95,2	-98,4	-5,7	1,1

4.3.7. Sigma marka enzimle yapılan deney verilerinin değerlendirilmesi

45°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.15'te, 4°C stabilite çalışma verileri Tablo 4.16'da gösterildi. Sonuçlar, likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. 45°C inkübasyon deneyi sonuçlarında 24.saat ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak 24 saat stabilite gösteren kombinasyon görülmedi. Materyallerin 24. saatteki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 4°C stabilite çalışmasında ise 24. hafta ölçümlerinde %PD değeri, TLC değerinin altında kalarak GlisinTris-Kokteyl 1, GlisinTris -Kokteyl 3, GlisinNaOH-Kontrol, Tris-Kokteyl 3, Tris -Kokteyl 4 ve Tris -Kokteyl 5 likit enzim materyali 24 hafta stabilite gösterdi. Diğer materyallerin 24. haftadaki %PD değerleri TLC değerinin üstünde kaldığından SL değerleri hesaplanarak tabloda belirtildi. 15 hafta ve üstü SL değeri bulunanlar tabloda gri ile işaretlendi.

Tablo 4.15: Sigma marka enzimle yapılan 45°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD				β değeri	SL (saat)
	3sa	6sa	9sa	24sa		
GLISIN-K	-87,0	-94,4	-95,6	-97,9	-5,8	1,1
GLISIN-Kokteyl 2	-29,0	-42,3	-54,0	-79,5	-3,9	1,6
GLISIN-Kokteyl 3	-75,3	-90,5	-95,1	-98,4	-5,7	1,1
GLISIN-Kokteyl 4	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISIN-Kokteyl 5	-100	-100	-100	-100	-6,0	1,0
GLISINTRIS-K	-98,0	-98,5	-99,1	-99,5	-5,9	1,0
GLISINTRIS-Kokteyl 1	-94,7	-96,9	-97,5	-99,0	-5,9	1,0
GLISINTRIS-Kokteyl 2	-93,8	-97,1	-97,6	-99,1	-5,9	1,0
GLISINTRIS-Kokteyl 3	-98,0	-98,9	-99,0	-99,5	-5,9	1,0
GLISINNaOH-K	-18,2	-23,2	-30,9	-50,5	-2,4	2,5
GLISINNaOH-Kokteyl 1	-10,4	-13,8	-13,0	-23,7	-1,1	5,3
GLISINNaOH-Kokteyl 2	-12,6	-17,7	-30,3	-69,5	-3,0	2,1
TRİS-K	-96,0	-98,2	-98,1	-99,4	-5,9	1,0
TRİS-Kokteyl 1	-95,4	-97,7	-98,5	-98,9	-5,9	1,0
TRİS-Kokteyl 2	-87,6	-93,9	-95,9	-98,1	-5,8	1,1
TRİS-Kokteyl 3	-96,7	-98,2	-99,0	-99,4	-5,9	1,0
TRİS-Kokteyl 4	-95,9	-97,8	-98,6	-99,4	-5,9	1,0
TRİS-Kokteyl 5	-95,2	-97,8	-98,2	-99,4	-5,9	1,0

Tablo 4.16: Sigma marka enzimle yapılan 4°C stabilite çalışma verileri

İçerik	Ortalama %PD										β	SL (hf)
	1hf	2hf	3hf	4hf	6hf	8hf	12hf	16hf	20hf	24hf		
GLISIN-K	-0,8	-2,3	-2,9	-1,2	-0,8	-11,6	-3,2	-2,0	-5,1	-6,5	-0,3	20,5
GLISIN-Kokteyl 2	-19,5	-28,1	-34,1	-35,7	-38,6	-52,6	-54,4	-63,3	-63,9	-64,1	-3,6	1,7
GLISIN-Kokteyl 3	-3,3	-4,0	-5,0	-3,3	-2,9	-15,4	-5,7	-4,5	-11,8	-10,9	-0,5	11,2
GLISIN-Kokteyl 4	-45,4	-55,9	-64,9	-69,2	-79,0	-87,7	-91,8	-96,1	-97,9	-99,1	-5,8	1,0
GLISIN-Kokteyl 5	-64,2	-70,0	-75,8	-78,6	-86,8	-91,4	-94,2	-96,9	-99,2	-99,4	-6,0	1,0
GLISINTRIS-K	-2,5	-2,0	-1,3	-2,9	1,3	-10,1	-2,0	-2,9	-3,8	-8,0	-0,3	21,2
GLISINTRIS-Kokteyl 1	0,4	1,0	-0,5	1,3	3,1	-9,7	1,7	2,7	-3,1	-4,8		24
GLISINTRIS-Kokteyl 2	-4,4	-6,0	-7,9	-8,2	-7,9	-20,5	-14,3	-15,0	-20,1	-25,2	-1,1	5,4
GLISINTRIS-Kokteyl 3	-1,7	-1,2	-1,8	0,4	2,0	-11,5	0,4	-2,2	-2,6	-5,1		24
GLISINNaOH-K	-4,2	-4,1	-5,6	-3,9	-2,4	-12,6	-5,0	-3,6	-7,9	-5,9		24
GLISINNaOH-Kokteyl 1	-2,5	-7,3	-14,4	-14,3	-22,4	-35,3	-33,0	-33,5	-37,3	-37,5	-2,1	3,0
GLISINNaOH-Kokteyl 2	-8,5	-13,8	-20,1	-26,1	-32,9	-53,1	-61,6	-71,8	-79,8	-83,3	-4,2	1,5
TRİS-K	-4,3	-3,4	-0,5	-0,8	-1,2	-12,4	-4,0	-1,6	-5,8	-9,3	-0,4	17,2
TRİS-Kokteyl 1	-1,2	-1,5	-1,3	0,0	2,8	-10,0	-4,5	-4,5	-9,7	-10,1	-0,4	14,5
TRİS-Kokteyl 2	-8,7	-13,4	-16,3	-17,8	-19,4	-31,1	-26,2	-30,4	-30,8	-37,5	-1,9	3,2
TRİS-Kokteyl 3	-3,2	-1,9	-3,2	0,0	-0,4	-11,9	-1,2	-1,6	-3,6	-5,9		24
TRİS-Kokteyl 4	-3,5	-2,5	-2,8	-1,6	0,4	-12,2	-2,4	0,0	-5,8	-5,2		24
TRİS-Kokteyl 5	-2,0	0,5	-1,3	-2,0	2,0	-10,7	-0,5	-0,4	-3,2	-5,6		24

4.3.8. Laboratuvarlar arası çalışma verilerinin değerlendirilmesi

Laboratuvarlar arası çalışmanın 2 aylık stabilite sonuçları Tablo 4.17’de verildi. Materyallerin kodlamaları X-Y-Z şeklinde yapıldı. X “hazırlanan tampon veya çözücü”, Y “hazırlanan enzim aktivitesi” ve Z “çözülen liyofilize enzim markası”nı ifade etmektedir. %PD değerleri likit enzim materyali için hesaplanan TLC değeri $\pm 6,1$ üzerinden değerlendirildi. %PD değeri TLC değerinin altında kalanlar “*” ile işaretlendi. Materyallerden %PD değeri TLC’nin altında olan 4 veya 5 laboratuvar deney seti varsa gri ile işaretlendi

Tablo 4.17: Laboratuvarlar arası çalışmanın 2 aylık stabilite sonuçlarının karşılaştırılması

İçerik	%PD değerleri				
	Bezmialem	Gaziantep	Ankara	Gaziantep (Geri yollanan)	Ankara (Geri yollanan)
GLISIN-STOK200-SORACHIM	-14,8	-5,6*	1,9*	3,7*	-0,5*
GLISIN-STOK50-SORACHIM	-22,4	-58,6	25,9	-31,0	
GLISINTRIS-STOK200-SORACHIM	-1,5*	7,4	-17,8	-2,5*	-7,4
GLISINTRIS-STOK50-SORACHIM	0,0*	0,0*	-2,0*	2,0*	-6,0*
GLISINNAOH-STOK50-SORACHIM	-2,1*	-19,1	-34,0	-31,9	-27,7
GLISINNAOH-STOK200-SORACHIM	-1,5*	-9,2	-28,2	-22,6	-15,9
TRIS-STOK200-SORACHIM	-1,5*	-35,5	-41,1	-65,5	-69,5
TRIS-STOK50-SORACHIM	-8,3	-66,7	-72,9	-93,8	-93,8
GLISIN-STOK200-SIGMA	-3,8*	28,3	2,8*	0,9*	-3,8*
GLISIN-STOK50-SIGMA	-3,7*	1,9*	1,9*	-5,6*	1,9*
GLISINTRIS-STOK200-SIGMA	-2,8*	8,0	-10,4	-0,9*	-6,6
GLISINTRIS-STOK50-SIGMA	-3,8*	-7,7	-15,4	-9,6	-7,7
GLISINNAOH-STOK200-SIGMA	-2,8*	-5,2*	-16,6	-12,3	
GLISINNAOH-STOK50-SIGMA	-5,8*	-28,8	17,3	-28,8	-46,2
TRIS-STOK200-SIGMA	-1,0*	-18,3	-30,8	-26,4	-31,3
TRIS-STOK50-SIGMA	-8,0	-40,0	-46,0	-66,0	-78,0
DSU-STOK200-SIGMA	-10,7	18,4	-8,7	-1,5*	8,7
DSU-STOK50-SIGMA	-71,7	-26,4	1,9*	-64,2	
DSU-STOK200-SORACHIM	-2,9*	-5,3*	1,9*	-3,4*	-9,2
DSU-STOK50-SORACHIM	-19,2	-101,9	15,4	-63,5	-38,5
TRIS+%0.1ALB-STOK200-SIGMA	0,5*	13,5	-1,9*	3,9*	11,1
TRIS+%0.1ALB-STOK50-SORACHIM	0,0*	0,0*	34,8	23,9	39,1

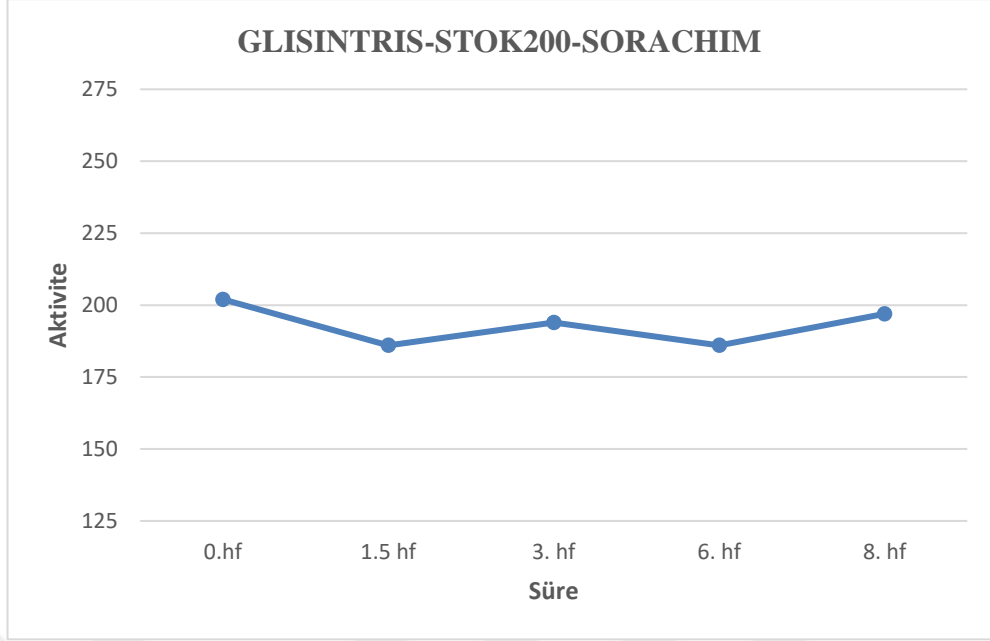
TRIS+%0.1ALB-STOK200-SORACHIM	-1,4*	6,3	-2,4*	5,3*	7,2
TRIS+%0.1ALB-STOK50-SIGMA	-2,1*	0,0*	40,4	10,6	2,1*

4.3.9. Stabil olan ve olmayan kontrol materyallerinden bazılarının grafiksel olarak gösterilmesi

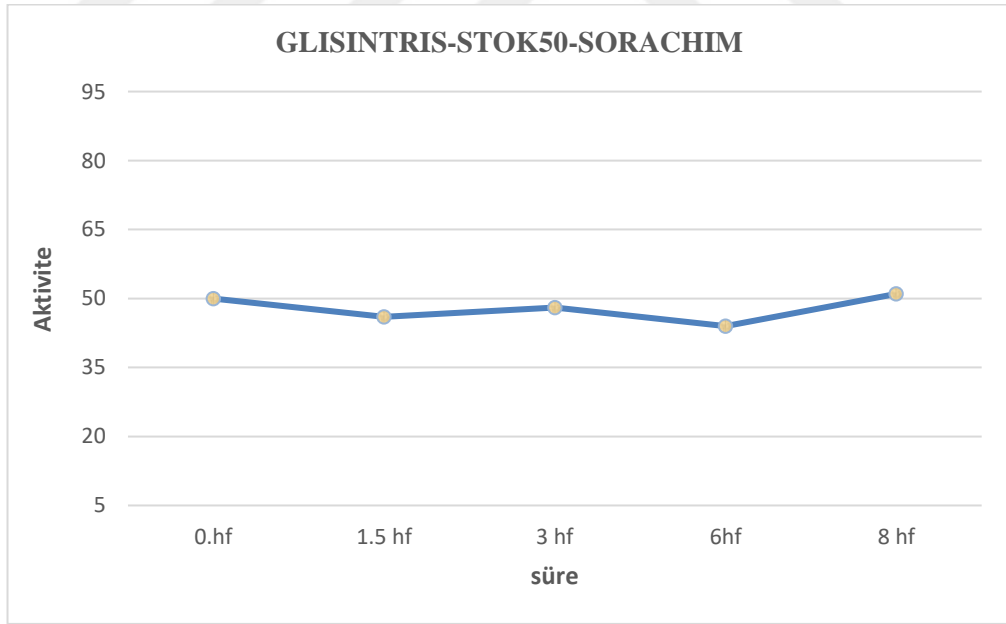
Gaziantep'teki merkeze gönderildikten sonra bize geri gönderilen GlisinTris tamponunda Sorachim marka enzimle hazırlanmış enzim aktiviteleri 200 ve 50 civarlarında olan kontrol materyallerinin 2 aylık takipleri Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de gösterildi (Stabil). Gaziantep'teki merkeze yollandıktan sonra bize geri gönderilen GlisinNaOH tamponunda Sorachim marka enzimle hazırlanmış aktiviteleri 200 ve 50 civarlarında olan kontrol materyallerinin 2 aylık takipleri Şekil 4.3 ve Şekil 4.4'te gösterildi (Stabil olmayan).

Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Glisin tamponunda Sigma marka enzimle hazırlanmış aktiviteleri 200 ve 50 civarlarında olan kontrol materyallerinin 2 aylık takipleri Şekil 4.5 ve Şekil 4.6'de gösterildi (Stabil). Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Tris tamponunda Sigma marka enzimle hazırlanmış aktiviteleri 200 ve 50 civarlarında olan kontrol materyallerinin 2 aylık takipleri Şekil 4.7 ve Şekil 4.8'de gösterildi (Stabil olmayan).

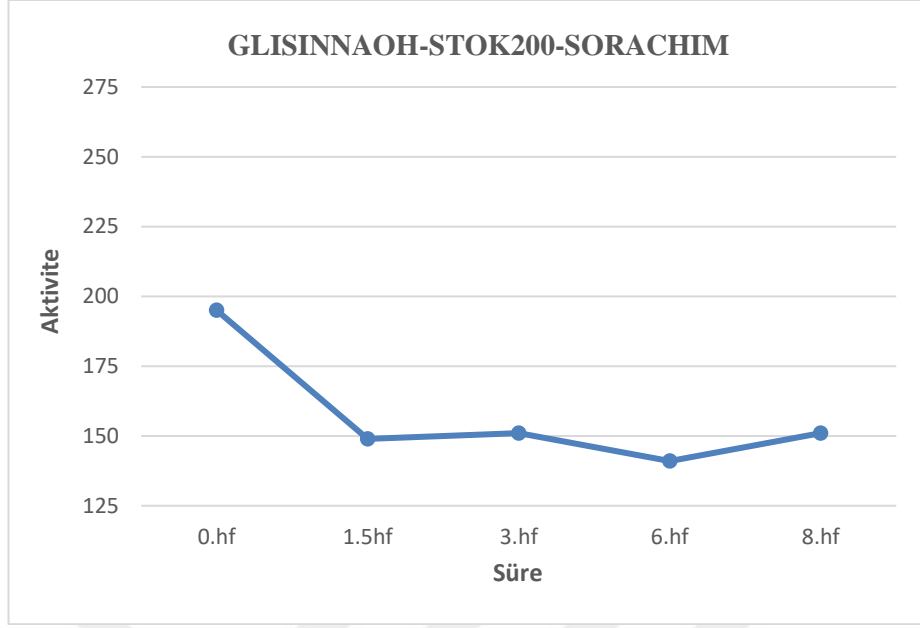
Çalışmamızda rutin laboratuvarımızda kullandığımız G6PD tanı kiti yüksek ve düşük seviye kontrol değer aralıkları kabul edilerek değerlendirme yapıldı. Yüksek seviye kontrol ortalama değeri 200, standart sapması 25; düşük seviye kontrol ortalama değeri 50, standart sapması 15 olarak kabul edildi. Şekillerde gösterilen stabil olan materyallerinin aktivite takiplerinde ± 1 SD içinde kaldığı görüldü.



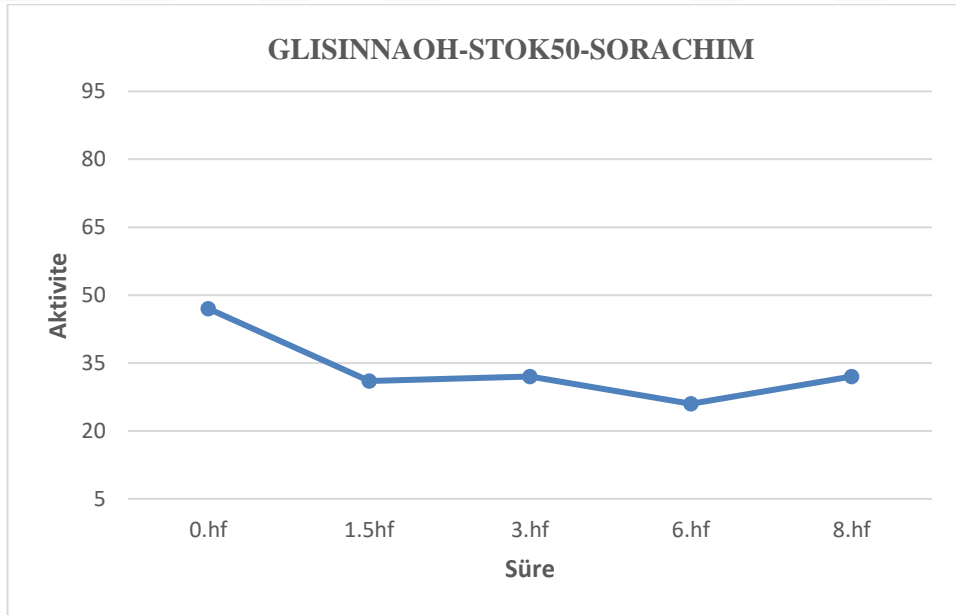
Şekil 4.1: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinTris-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil)



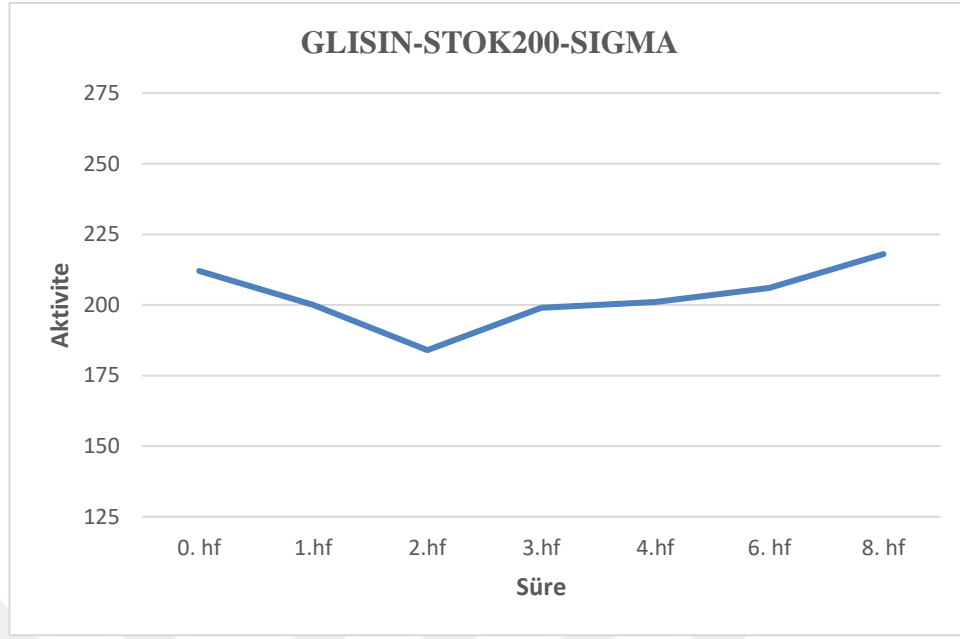
Şekil 4.2: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinTris-Stok50-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil)



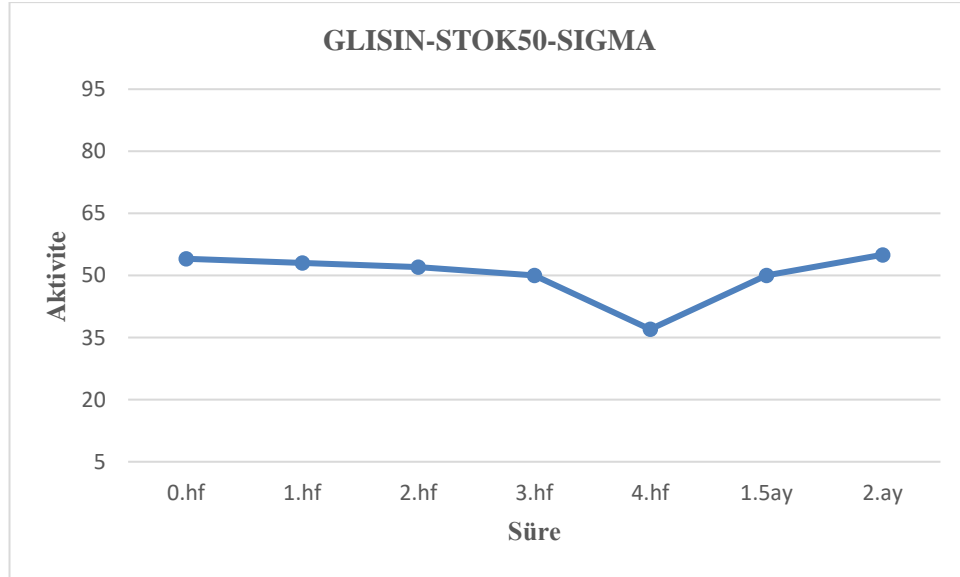
Şekil 4.3: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinNaOH-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan)



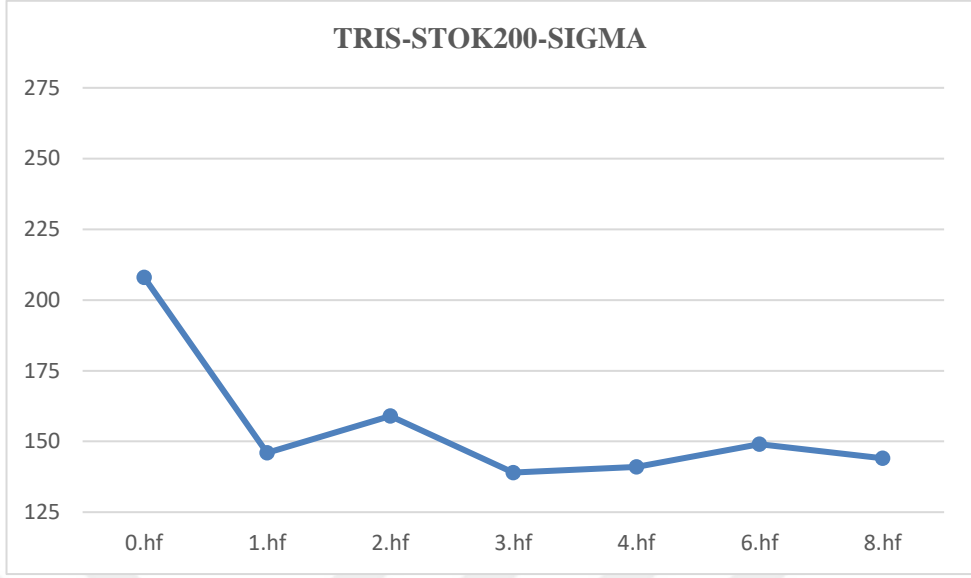
Şekil 4.4: Laboratuvarlar arası çalışmada Gaziantep'ten geri yollanan GlisinNaOH-Stok200-Sorachim kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan)



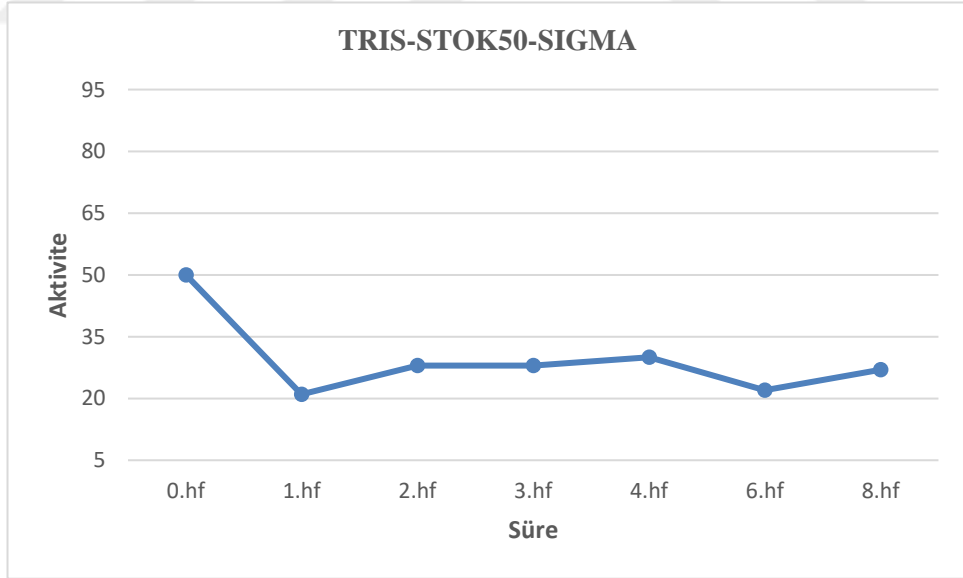
Şekil 4.5: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Glisin-Stok200-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil)



Şekil 4.6: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Glisin-Stok50-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil)



Şekil 4.7: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Tris-Stok200-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan)



Şekil 4.8: Laboratuvarlar arası çalışmada Ankara'daki merkezde takipleri yapılan Tris-Stok50-Sigma kontrol materyalinin 2 aylık aktivite takibinin grafiksel gösterimi (Stabil olmayan)

4.4. Liyofilize Kontrol Materyali Deney Verilerinin Değerlendirilmesi

4.4.1. Bezmialem Vakıf Üniversitesi Biyokimya ARGE Laboratuvarı'nda yapılan liyofilizasyon deney verilerinin sonuçlarının değerlendirilmesi

Sonuçlar, hesaplanan TLC değeri $\pm 17,1$ üzerinden değerlendirildi. 7 günlük takipte %PD değeri, TLC değerinin altında kalanlar gri ile işaretlendi. Hemolizatlardan 1/3 dilüsyonda hazırlananların sonuçları Tablo 4.18'de, 1/10 dilüsyonda hazırlananların sonuçları ise Tablo 4.19'da verildi. Çalışılan kombinasyonlardan 7. gün aktivite alınanlar sonuçlara dahil edildi. Bunların CPDA ile hemolizat oluşturulup, CPDA ile liyofilizasyon sonrası çözülenler olduğu görüldü. CPDA tam kan havuzundan hazırlanan hemolizatlar EDTA'lı havuzdan hazırlananlardan daha iyi sonuç verdi. CPDA ile oluşturulan hemolizatlardan liyofilize edilerek oluşturulan materyaller 7 günlük takiplerinde stabil olarak kalabildi. %PD değerleri değerlendirildiğinde gliserolün stabilizasyona olumlu etki ettiği gözlemlendi.

Tablo 4.18: Bezmialem'de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri

İçerik	1.gün (Aktivite)	7.gün (Aktivite)	%PD
CPDA1/3-EDTA stok	158	128	-19,0
CPDA1/3-%5 Gliserol-EDTA stok	139,8	128,3	-8,2
CPDA1/3-%1 Albumin- EDTA stok	165,8	138,3	-16,6
CPDA1/3-%3 Gliserol-EDTA stok	165,7	135,7	-18,1
CPDA1/3-CPDA stok	128,0	107,0	-16,4
CPDA1/3-%1 Albumin- CPDA stok	131,3	105,8	-19,4
CPDA1/3-%3 Gliserol- CPDA stok	124,5	108,3	-13,1
CPDA1/3-%1 Albumin- CPDA stok-2	100,3	83,8	-16,5
CPDA1/3-%3 Gliserol- CPDA stok-2	88,0	87,3	-0,9
CPDA1/3-%3 Gliserol+%1 Albumin-CPDA stok	92,3	93,0	0,8

Not: 1/3 dilüsyonda hazırlanan hemolizat içeriklerine tabloda yer verilmiştir

Tablo 4.19: Bezmialem’de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri

İçerik	1.gün (Aktivite)	7.gün (Aktivite)	%PD
CPDA1/10-EDTA stok	46,2	41,2	-10,8
CPDA1/10-%5 Gliserol- EDTA stok	27,3	30,8	12,8
CPDA1/10-%1 Albumin- EDTA stok	53,0	44,8	-15,6
CPDA1/10-%3 Gliserol- EDTA stok	39,8	35,3	-11,3
CPDA1/10-CPDA stok	41,0	35,3	-14,0
CPDA1/10-%1 Albumin- CPDA stok	46,8	33,8	-27,8
CPDA1/10-%3 Gliserol- CPDA stok	30,5	30,5	0
CPDA1/10-%1 Albumin- CPDA stok-2	30,8	30,5	-0,8
CPDA1/10-%3 Gliserol- CPDA stok-2	19,8	24,8	25,3
CPDA1/10-%3 Gliserol+%1 Albumin-CPDA stok	20,3	23,3	14,8

Not: 1/10 dilüsyonda hazırlanan hemolizat içeriklerine tabloda yer verilmiştir.

4.4.2. TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü’nde yapılan liyofilizasyon deney verilerinin sonuçlarının değerlendirilmesi

Sonuçlar, hesaplanan TLC değeri $\pm 17,1$ üzerinden değerlendirildi. 7 günlük takipte %PD değeri, TLC değerinin altında kalanlar gri ile işaretlendi. Çalışılan tüm kombinasyon içeriklerinin sonuçları Tablo 4.20’de verildi. CPDA ile oluşturulan hemolizatlardan liyofilize edilerek oluşturulan materyaller 7 günlük takiplerinde stabil olarak kalabildi. %PD değerleri değerlendirildiğinde gliserol ve albumin eklenmesinin stabilizasyona olumlu etki ettiği gözlemlendi. Tablo 4.21 ve Tablo 4.22’de TÜBİTAK UME’de hazırlanan ve sırasıyla +4 °C ve -20 °C koşullarında 2 ay boyunca saklanan liyofilize kontrol materyallerinin stabilite çalışma verileri gösterildi.

Tablo 4.20: TÜBİTAK UME’de Çalışılan Liyofilize Kontrol Materyali Stabilite Çalışma Verileri

İçerik	1.gün (Aktivite)	7.gün (Aktivite)	%PD
Sükroz 1/2-EDTA stok	247	119	-51,8
Sükroz 1/5-EDTA stok	100	42	-58
Sükroz 1/10-EDTA stok	47	21	-55,3
Sükroz 1/20-EDTA stok	22	16	-50

Sükroz 1/3- %1Albumin+%1Gliserol -EDTA stok	168	63	-62,5
Sükroz 1/10- %1Albumin+%1Gliserol -EDTA stok	56	26	-53,6
Sükroz 1/3- %1Albumin+%3Gliserol -EDTA stok	162	79	-51,2
Sükroz 1/10- %1Albumin+%3Gliserol -EDTA stok	53	31	-41,5
Sükroz 1/3- %1Albumin+5mMGlisin - EDTastok-3ml	242	151	-37,6
Sükroz 1/10- %1Albumin+5mMGlisin - EDTastok	54	21	-61,1
PBS 1/2-EDTA stok	200	17	-91,5
PBS 1/5-EDTA stok	107	34	-68,2
PBS 1/10-EDTA stok	55	25	-54,5
PBS 1/20-EDTA stok	27	13	-51,9
PBS 1/3-%1Albumin+%1Gliserol- EDTA stok	164	90	-45,1
PBS 1/10- %1Albumin+%1Gliserol-EDTA stok	49	21	-57,1
PBS 1/3-%1Albumin+%3Gliserol - EDTA stok	161	53	-67,1
PBS 1/10-%1Albumin+%3Gliserol -EDTA stok	42	16	-61,9
PBS 1/3-%1Albumin+5mMGlisin - EDTA stok	150	37	-75,3
PBS 1/10-%1Albumin+5mMGlisin -EDTA stok-3ml	80	34	-57,5
CPDA 1/3- CPDA stok	150	131	-12,7
CPDA 1/10- CPDA stok	43	38	-11,6
CPDA 1/20- CPDA stok	22	19	-13,6
CPDA 1/3- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	154	140	-9,09
CPDA 1/10- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	55	49	-10,9
CPDA 1/3- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	146	132	-9,6
CPDA 1/10- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	42	39	-7,1
CPDA 1/3- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	180	*	*

CPDA 1/10- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	47	42	-10,6
CPDA 1/3-%1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	155	136	-12,3
CPDA 1/10- %1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	44	40	-9,1

“*” ile gösterilen satırdaki numune yoğunluğundan dolayı cihaz tarafından çekilemedi

Tablo 4.21: TÜBİTAK UME’de hazırlanan ve +4 °C koşullarında 2 ay boyunca saklanan liyofilize kontrol materyallerinin stabilite çalışma verileri

İçerik	1.gün (Aktivite)	7.gün (Aktivite)	%PD
CPDA 1/3- CPDA stok	142	113	-20,4
CPDA 1/10- CPDA stok	34	27	-20,6
CPDA 1/20- CPDA stok	20	17	-15,0
CPDA 1/3- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	147	121	-17,7
CPDA 1/10- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	51	41	-19,6
CPDA 1/3- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	138	120	-13,0
CPDA 1/10- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	36	32	-11,1
CPDA 1/3- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	144	113	-21,5
CPDA 1/10- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	42	35	-16,7
CPDA 1/3-%1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	145	113	-22,1
CPDA 1/10- %1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	41	36	-12,2

Tablo 4.22: TÜBİTAK UME’de hazırlanan ve -20 °C koşullarında 2 ay boyunca saklanan liyofilize kontrol materyallerinin stabilite çalışma verileri

İçerik	1.gün (Aktivite)	7.gün (Aktivite)	%PD
CPDA 1/3- CPDA stok	149	123	-17,4
CPDA 1/10- CPDA stok	39	35	-10,3
CPDA 1/20- CPDA stok	19	17	-10,5
CPDA 1/3- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	147	129	-12,2
CPDA 1/10- %1Albumin+%1Gliserol -CPDA stok	50	41	-18,0
CPDA 1/3- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	140	119	-15,0
CPDA 1/10- %1Albumin+%3Gliserol -CPDA stok	37	33	-10,8
CPDA 1/3- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	150	122	-18,7
CPDA 1/10- %1Albumin+5mMGlisin -CPDA stok	45	37	-17,8
CPDA 1/3-%1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	148	122	-17,6
CPDA 1/10- %1Gliserol+5mMGlisin -CPDA stok	40	35	-12,5

5. TARTIŞMA

Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz G6PD aktivite ölçüm kiti, validasyon çalışmaları tamamlandıktan sonra rutin laboratuvarımızda kullanılmaya başlandı. Yaptığımız ön çalışmalarda kullanmakta olduğumuz likit enzim kontrol materyalinin merkezler arasında transferi sırasında sıcaklık değişiminden etkilenecek aktive kaybına uğradığı tespit edildi. Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz G6PD aktivite ölçüm kiti için dış kalite kontrol programına dahil olundu. Sonuçların hedeflenen değere yakın ve zamana göre tutarlı olduğu görüldü. Sonrasında, tez çalışmamızda farklı yöntem ve kimyasal kullanılarak likit enzim, likit tam kan ve liyofilize kontrol materyalleri üzerinde çalışılarak stabilitesi en uzun G6PD kontrol materyalini geliştirmek hedeflendi.

5.1. Likit Tam Kan Kontrol Materyali

Günümüzde G6PD çalışan laboratuvarlar, aktivite ölçümü için EDTA antikoagülanı içeren tüplere alınan numuneleri kullanmaktadırlar. Bu tüplerde aktivite ölçümünün yanı sıra hemogram parametreleri de çalışılabilmektedir. EDTA, kan hücrelerinin iyi korunmasını sağlayan ve G6PD stabilitesi için uygun bir antikoagülandır. Jalil N ve ark., G6PD enzim aktivitesinin +4°C'de 72 saate kadar stabil olduğunu göstermişlerdir [98]. Fakat literatürde 4 saat gibi kısa bir süre stabilite sağlandığını gösteren çalışma da mevcuttur [99]. Çalışmamızda +4°C saklama koşullarında EDTA'lı tüplerde enzim aktivitesinin yaklaşık 3 hafta stabil kaldığı bulunmuştur. Fakat rutin laboratuvar pratiğimizde 1 haftaya kadar stabil kaldığını gözlemlenmiştir. Bu farklılıkların varlığı, bizlere laboratuvar arası farklı saklama, çalışma koşulları ve kullanılan malzemelerin kalitesiyle alakalı olabileceğini düşündürmektedir.

ACD tüpleri, antikoagülan katkı maddesi karışımı olarak belirli oranda trisodyum sitrat, sitrik asit ve dekstroz içermektedir. Bu solüsyonun içindeki dekstroz, hücrelerin metabolize olmasını ve canlı kalmasını sağlayan bir nutrienttir. Bu tüpler, immünohematoloji testlerinde, kan grubu tespitlerinde kullanılmaktadır. CPDA tüpleri içerisindeki karışım sitrik asit, monobazik sodyum fosfat, dekstroz ve adenin içermektedir. İçerisinde bulunan sitrat, kan örneğinin pıhtılaşmasını önler. Fosfat, pH değerini tamponlar. Dekstroz, hücre metabolizmasını korur. Adenin ise depolama sırasında ATP'nin korunmasını destekler [100]. CPDA tüpleri de immünohematoloji

testlerinde, kan grubu tespitlerinde kullanılmaktadır. Bu iki tüp de hücre korunmasını gerektiren durumlarda kullanılabilir. Üniversitemiz bünyesinde ürettiğimiz kitimizin en büyük avantajlarından biri numune hazırlığı (hemolizat oluşturulması) gerektirmeden tam kan numunesiyle çalışılabilmesidir. Bu sebeple stabilizasyonda hücrenin korunması önem taşımaktadır. Çalışmamızda deney setlerimize bu nedenle ACD ve CPDA tüplerine alınan numuneler de eklendi. Stabilite takiplerinde ACD ve CPDA tüplerinin +4°C saklama koşullarında 6-8 hafta arasında stabil kaldığı görüldü. 45°C ve +4°C koşullarında yaptığımız deneyler sonucunda kontrol materyali olarak likit tam kanın kullanılmasının uzun süre depolama ve uzak merkezler arası transport koşullarında bir avantaj sağlamayacağı sonucuna varıldı. Fakat, G6PD enzim aktivitesi çalışmak isteyip hemen çalışamayan ve numunelerin dış merkeze transportunu gerektiren durumlarda ACD ve CPDA içeren tüpler kullanılabilir.

5.2. Likit Enzim Kontrol Materyali

Enzim aktivitesi enzim ve substrat konsantrasyonu, pH, sıcaklık gibi faktörlerden etkilenmektedir. Çalışmamızda iki farklı markanın (Sigma ve Sorachim) liyofilize G6PD enzimi farklı tampon ve kombinasyonlarda çözülerek çalışıldı. İki markanın prospektüsünde de optimum pH 7.8, optimum sıcaklık 50-55°C ve pH stabilitesinin 5-11 arası olduğu belirtilmiştir. Bu bilgiler doğrultusunda, taşıma ve saklama koşullarını öngörerek 45°C inkübasyon ve 4°C saklama koşullarında deneylerimiz planlandı. Hazırladığımız farklı tampon ve kombinasyonlardaki kontrol materyallerinin 45°C ve 4°C’de çalıştığımız sürelerin sonundaki %PD değerleri karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı pozitif yönde korelasyon saptandı ($r=0,891$, $p<0,0001$). Genel olarak bir ürünün raf ömrünü veya belirli koşullara dayanıklılığını belirlemek için laboratuvar koşullarında yaşlandırma testleri kullanılmaktadır. Elde ettiğimiz bu sonuç, sıcaklık inkübasyon deneyleriyle stabilite çalışmalarını kısa sürede sonuçlandırabileceğimizi göstermektedir.

Glisin, en küçük aminoasittir. Asimetrik karbonu ve optik izomeri yoktur. R grubunun yerinde H atomu bulunduğundan proteinlerin hidrofilik ve hidrofobik bölgelerinde yer alabilir [8]. Glisinin pK_A değeri 2.35 ile 9.78 arasındadır ve izoelektrik noktası 6.06’dır. Glisin, protein formülasyonlarında yaygın olarak kullanılan bir stabilizatördür. Bir zwitterion olan glisin hem negatif hem de pozitif yüklü grupları aracılığıyla proteinle etkileşime girme yeteneğine sahiptir ve boyutunun küçük

olmasından dolayı proteinin birden fazla kısmına bağlanması sterik olarak engellenmez [101]. Bu zayıf etkileşimler proteinin şekli, yükü ve potansiyel bölgelerin sayısına göre değişebilmektedir. Konulan konsantrasyon miktarına göre protein stabilizasyonuna etki mekanizmasının farklı olabileceği tahmin edilmektedir. 100 mM'nin altındaki konsantrasyonlarda glisin protein termal stabilitesi üzerindeki etkisinin, peptit omurgası ile etkileşimine atfedilebileceği ileri sürülmektedir [101]. Peptit omurgası ile olan etkileşimlerin veya itmelerin protein stabilizasyonunda önemli bir rol oynadığı iyi bilinmektedir [102]. 100 mM'nin üzerindeki konsantrasyonlarda glisin, tuzlarda görülene benzer şekilde, açılan protein ile yardımcı çözünenler arasındaki su rekabetine bağlı olabileceği öne sürülmektedir [101, 103]. Sonuç olarak glisin enzimlerin yapısını koruyarak termal denatürasyona karşı koruma sağlayabilir. Bunun yanı sıra Tris gibi tamponlarla birlikte kullanıldığında enzimlerin stabilitesini daha geniş bir pH aralığında korumak için etkili bir tampon sistemi oluşturabilir. Bu sebeple deneylerimizde glisin içeren tamponlara yer verildi. Tampon değerlendirilmesi yaptığımız deneylerde hem 45 °C hem 4 °C'de GlisinTris tamponu içinde hazırlanan materyal belirlenen sürelerde stabil olarak kaldı. Fakat ilerleyen deney basamaklarında farklı kimyasal maddeler ekleneceğinden hazırlanan tüm tamponlara yer verildi.

Enzimler üretim, depolama ve endüstrideki uygulamalar sırasında çeşitli denatürasyon reaksiyonlarına uğrarlar. Denatüre edici etki ortadan kaldırılırsa bu durum tersine çevrilebilmektedir. Ancak, denatürasyon geri dönüşü olmayan bir aktivite kaybına veya inaktivasyona da yol açabilmektedir [104]. İn vitro enzim stabilitesinin iki farklı tanımı zamanla ortaya çıkmıştır: termodinamik (konformasyonel) stabilite ve uzun vadeli (kinetik) stabilite. Termodinamik stabilite, katlanmış protein konformasyonunun denatürasyonuna karşı direnciyle ilgilidir. Uzun vadeli stabilite ise geri dönüşümsüz inaktivasyona karşı direnci ölçer [104]. Sıcaklık, pH, kimyasal maddeler, otoliz (proteazlar) veya iyonik kuvvet gibi çeşitli ajanların bir enzimin mekansal konfigürasyonunda ve aktivitesinde değişikliklere sebep olduğu bilinmektedir [105].

Enzim stabilizasyonu üzerinde yapılan çalışmaların çoğu en popüler enzim stabilizasyon yöntemi olan katkı maddelerinin eklenmesi üzerine olmuştur. Katkı maddelerinin kullanılması, depolama süresini artırmak için iyi bir yaklaşımdır. Stabilizasyon malzemelerinden bazıları reaksiyon sistemiyle uyumsuz olması sebebiyle enzimin çalışmasını engelleyebilmektedir. Stabilizasyon için kullanılması

gereken konsantrasyonlar kabul edilebilir olmayabilir veya ekonomik olmayabilir. Bu dezavantajlara rağmen, piyasada bulunan enzimlerin çoğu katkı maddeleri kullanılarak stabilize edilmektedir. Katkı maddeleri ligandlar, tuzlar, polioller ve şekerler, kriyoprotektanlar, polimerler gibi başlıklar altında toplanabilmektedir. Hangi katkı maddesinin kullanılacağına enzimin fizikokimyasal özellikleri ve ihtiyaca göre karar verilmektedir.

Enzim stabilizasyonunda substrat ve kofaktörler de kullanılmaktadır. Bir enzimin substratı, koenzimi veya bağladığı herhangi bir küçük molekülün varlığında stabilitesinin artması, bağlanma açılma dengesinin değişmesi ve enzimin katlanmamış durumlarının konsantrasyonunu azaltması sebebiyle olabilir [106]. Bu bileşikler, enzimatik reaksiyonların doğal akışında olduklarından dolayı önemlidirler [104]. Bu moleküllerin kullanılması stabilizasyona, labilasyona yol açabilir veya hiç etkisi olmayabilir. Yapılan bir çalışmada laktat dehidrojenaz, kofaktörü NAD, NADH tarafından termal denatürasyona karşı stabilize edilirken, substratı pirüvat tarafından destabilize edilmiştir [104]. Başka bir çalışmada G6PD, substratı glukoz-6-fosfat ve kofaktörü NADP tarafından hem termal hem de ultrasonik inaktivasyon koşullarında stabilize edilmiştir [107]. Çalışmamızda bu sebeple farklı konsantrasyonlarda NADP eklenerek deney setleri oluşturuldu. Fakat konsantrasyonun artmasıyla birlikte enzim aktivitesinin ve SL değerinin düştüğü bulundu. 45°C'de GlisinTris tamponunun içine konulan NADP'nin %PD değerini azalttığı görüldü ve bu kombinasyon belirlenen sürede stabil kaldı. 4°C'de de GlisinTris tamponundaki %PD değerleri diğer kombinasyonlara göre düşük bulundu. Diğer kombinasyonlarda stabilizasyona olumlu bir etkisinin olmadığını görülmesi sebebiyle bu bulgunun GlisinTris tamponunun stabilizasyona olan olumlu etkisi olarak yorumlandı.

Bovine serum albumin (BSA)'in, 40°C ile 50°C arasında kısmi açılma ile proteinin ısı denatürasyonunu değiştirebileceği, yüzeydeki apolar kalıntıları ortaya çıkararak geri dönüşümlü protein-protein etkileşimlerini kolaylaştırabileceği bildirilmiştir [108]. Bir çalışmada BSA ile modifiye edilmiş α -amilazın aktivitesi ve termal stabilitesi incelenmiş olup termal inaktivasyonun BSA modifikasyonu ile önemli ölçüde azaldığı bulunmuştur [108]. Başka bir çalışmada BSA'nın ısıtılmış enzim ile hidrofobik etkileşimler yoluyla enzimi stabilize ettiğini ve yüzey hidrofobikliğinin, proteinin stabilizasyonunda ana etken olduğunu göstermişlerdir [109]. Dilüe protein çözeltileri (<1 mg/ml) düşük seviyelerde depolama sırasında kaba bağlanma nedeniyle inaktivasyon ve aktivite kaybına uğrayabilmektedir. Bu nedenle, bu tür protein

çözeltilerini korumak amacıyla "taşıyıcı" veya "doldurucu" protein olarak saflaştırılmış BSA 1–5 mg/ml (%0.1–0.5) eklemek yaygın bir uygulama olarak kullanılmaktadır [110]. Bu sebeple belirlenen sıcaklıklarda hem sadece albumin hem de NADP ile birlikte albumin deney setleri tasarlanarak çalışıldı. Konsantrasyon arttıkça %PD değerine olumlu etkisi olmadı. Bu deney setinde de GlisinTris tamponu ön plana çıktı. NADP ile albumin kombinasyonunda da konsantrasyonların arttıkça %PD değerinin artması ön planda NADP'nin stabiliteye olan olumsuz etkisini düşündürdü.

Antikorlar, reseptörler, hormonlar ve enzimler gibi farklı protein türleri genellikle bir veya daha fazla sistein (Cys) kalıntısı içermektedir. Bu kalıntılar intra- ve intermoleküler disülfid bağlarının oluşumuna dahil olabilir veya serbest tiyoller olarak bulunabilir. Doğal yapıda olmayan intramoleküler disülfid bağlarının oluşumu, protein yanlış katlanmasına ve bunun sonucunda agregasyon ve çökelmeye yol açabilmektedir [111].

İntramoleküler disülfid bağlarının proteinlerin termal stabilitesine katkıda bulunduğu bilinmektedir. *Aspergillus niger* fitazındaki beş disülfid bağının tamamının indirgenmesi, konformasyonel değişiklik ve/veya katlanmanın açılması nedeniyle enzimi inaktive etmektedir [112]. Cys mutasyonu ile bir disülfid bağının tanıtılmasının, bazı proteinlerin fiziksel stabilitesini artırdığı gösterilmiştir. Subtilisin E örneğinde, Gly61Cys ve Ser98Cys mutasyonları ve ardından Cys61-Cys98 disülfid bağının oluşumu, erime sıcaklığında 4.5 °C artış ve yarı ömrü doğal proteinin üç katı olan aktif bir enzim üretilmesini sağlamıştır [113]. Başka bir çalışmada, alkalen fosfataz (AP) içindeki Ser52, Ser53, Ser78, Ser79 ve Ser80, ilgili alanlar mutasyonlara uğratarak yeni Cys kalıntısı ile Cys67 arasında bir disülfid bağı oluşturulmuştur. Tüm disülfid mutantları, doğal AP'den daha iyi termal kararlılığa sahip iken daha düşük enzimatik aktivite göstermişlerdir [114]. Özetle, proteinlere intramoleküler olarak disülfid bağlarının eklenmesi protein stabilitesini artırabilirken, intermoleküler disülfid bağlarının oluşumu bir proteini instabil hale getirebilir [115].

Sisteinlerin oksidasyonunu ve disülfid bağı oluşumunu önleyerek proteini indirgenmiş durumda tutmak için ditiyotritol (DTT) ve β -merkaptoetanol (β -ME) gibi indirgeme ajanları kullanılmaktadır [110]. DTT, moleküler biyolojide bir enzim stabilize edici madde olarak yaygın şekilde kullanılmaktadır. DTT, proteinleri indirgenmiş durumda tutmaya yarayan bir maddedir. SH (tiyol) gruplarının oksidasyonunu önlemek ve disülfidleri ditiyollere indirmek için koruyucu bir madde olarak biyokimyasal

çalışmalarda kullanılmaktadır [116]. β -ME de disülfid bağlarını indirgemek için kullanılmaktadır. Aynı zamanda hidroksil radikallerini temizleyerek biyolojik bir antioksidan görevi görmektedir. Bazı proteinler, β -ME'nin disülfid bağlarını kırma yeteneği aracılığıyla denatüre olabilmektedir. Bu sayede, bazı proteinlerin hem üçüncül yapısı hem de dördüncül yapısı bozulabilmektedir. Proteinlerin yapısını bozma yeteneği nedeniyle, proteinlerin analizlerinde kullanılmaktadır [117].

Etilendiamintetraasetik asit (EDTA), onlarca yıldır proteaz inhibitörü ve metal iyon temizleyici olarak kullanılan bir şelatördür. EDTA, metal-EDTA kompleksleri oluşturmak için kalsiyum, magnezyum, çinko, bakır, demir, manganez gibi iki değerlikli katyonları şelatlar. Antibakteriyel bir madde olarak, dış zardaki kalsiyum ve magnezyum iki değerlikli katyonları uzaklaştırabilir ve zar lipopolisakarit kaybına neden olarak bakterileri bakterisitlere karşı duyarlı hale getirebilmektedir [118]. Ortamdaki serbest radikal reaksiyonlarını ve oksidasyon süreçlerini azaltabilmektedir [119]. EDTA, metal iyonlarının enzimlerin aktif bölgelerine bağlanarak onların yapısını bozabileceği durumlarda metal iyonlarını şelatlayarak enzim inaktivasyonunu önleyebilmektedir. Hem şelatlama özelliği hem de oksidatif strese karşı koruması sebebiyle enzim yapısı ve fonksiyonunu korur. Bu sayede uzun süreklilik veya analiz sırasında enzimlerin aktivitesinin düşmesini engelleyebilir. Bu durum laboratuvar çalışmalarında enzimlerin güvenilir sonuç vermesi açısından önem taşımaktadır. Proteazlar, proteinlerin parçalanmasına sebep olan enzimlerdir. EDTA, metal iyonlarını şelatlayarak proteazların aktivitesini inhibe eder ve proteinlerin yapısını korur.

Glutasyon yapısındaki sisteinin sülfidril grubu ($-SH$), indirgeme ve konjugasyon reaksiyonlarına katılmaktadır. GSH, protein disülfid bağlarının yeniden düzenlenmesinde rol oynamakta ve peroksitleri azaltmaktadır [120]. GSH, antioksidan rolü ve disülfid bağlarının azaltılmasını sağlaması sebebiyle enzimlerin fonksiyonlarını sürdürmesini sağlayabilmektedir.

N-asetil-L-sistein (NAC), doğal amino asit L-sisteinin N-asetillenmiş türevi olan bir N-asetil-L-amino asittir. Antioksidan, antiviral, parasetamol zehirlenmesine karşı antidot, mukolitik vs olarak pratikte kullanımları mevcuttur [121].

İndirgeyici ve antioksidan özellikte olan bu kimyasallarla deneylerimizde kullanılmak üzere 5 farklı kokteyl hazırlanarak tamponlar içerisine eklendi. Sonrasında belirlenen sıcaklıklarda test edildi. Tampon olarak Glisin, Glisin Tris ve Tris tamponları stabiliteye olumlu etkisi açısından ön plana çıktı. Kokteyllerden 2 numaralı kokteylin

stabiliteye olumlu bir etkisi olmadı. Buna içinde bulunan NADP molekülünün sebep olduğu düşünüldü. GlisinTris ve Tris tamponlarında hazırlanmış 1 numaralı kokteylin 45 °C'lik inkübasyonda 24 saat stabil kaldığı görüldü. Yüksek sıcaklıklar, enzim yapısını bozarak aktif bölgelerinde değişikliklere sebep olabilmektedir. Bu değişiklikler serbest oksijen radikallerine karşı daha duyarlı hale gelmesini sağlamaktadır. Bu durum, enzimlerin stabilitesini olumsuz yönde etkileyebilmektedir. Bu sebeple antioksidan kimyasallarla oluşturulmuş kokteyller yüksek sıcaklıklarda ve uzun depolama sürelerinde fayda sağlayabilir.

Enzimlerin ideal olarak çalışabilmesi için optimum pH koşullarını sağlamak gereklidir. Deney verilerimizi değerlendirdiğimizde enzimin pH 8 civarlarında olan Glisin (pH:8.42) ve GlisinTris (pH:8.71) tamponlarında daha stabil çalıştığı gözlemlendi. Yapılan bir çalışmada G6PD'nin optimum pH'sı 8, kararlı olduğu pH 8.5 olarak belirlenmiştir [122]. Antioksidan kimyasallarla oluşturulmuş kokteyller yüksek sıcaklıklarda ve uzun depolama sürelerinde fayda sağlayabilir. Bu sebeple farklı kimyasallar kullanıldığında oluşabilecek pH değişikliklerine karşı tamponlama gücü de önemlidir. Tablo 3.5'te yaptığımız pH çalışmasında GlisinTris ve Tris tamponları oluşturduğumuz kokteyllerde ideal pH'yi korumaktaydı.

Deney sonuçlarımızın pratik uygulamaya yansımaları görmek amacıyla laboratuvarlar arası çalışma planlandı. İlk aşamada hazırlanması kolay ve basit içeriklerin çalışılmasının uygun olacağına karar verildi. Deney sonuçlarımızda özellikle GlisinTris ve Glisin tamponlarının stabiliteye olan olumlu etkisinin görülmesinden yola çıkılarak hazırlanan tampon çeşitleriyle çalışıldı ve deney setlerine kontrol olarak distile suda çözülmüş materyal örnekleri de konuldu. Bu çalışmada da Glisin ve GlisinTris tamponlarında hazırlanmış likit enzim kontrol materyallerinin daha stabil olduğu görüldü.

5.3. Liyofilize Kontrol Materyali

Teorik olarak G6PD enzim aktivitesi normal ve eksik olan bireylerden alınan tam kan örnekleri en iyi kontrol materyalidir. Fakat uzun süreli depolama ve uzak merkezlere transferde stabil değillerdir. Bu sebeple liyofilize kontrol materyali üreterek çalışmak iyi bir alternatiftir. Literatürde Tayvan'da yapılmış bir çalışmada, doğrulama testleri

için eritrositlerden liyofilize kalite kontrol materyalleri ve tarama testleri için tam kandan kurutulmuş kan numuneleri hazırlanarak çok merkezli kalite kontrol programı geliştirilmiştir [123]. Başka bir çalışmada, nitel bir yöntemde kontrol materyali olarak kullanılmak üzere Escherichia coli'den liyofilize insan rekombinant G6PD (r-G6PD) geliştirilmiştir. Sonuçlarda, G6PD aktivitesinin -80°C, 4°C, 30°C ve 45°C'de saklandığında en az 365 gün stabil olduğunu ve 55°C'de saklandığında enzim aktivitesinin yalnızca 28. güne kadar stabil olduğu gösterilmiştir. Dolayısıyla üretilen liyofilize materyalinin kontrol materyali olarak kullanılabilirliği belirtilmiştir [124]. Yine bir tez çalışmasında normal ve eksikliği olan bireylerden alınan eritrositlerden sükröz çözeltisiyle hemolizat oluşturup stabil liyofilize kontrol materyali geliştirilmiştir [125].

Literatürde geliştirilen kontrol materyallerinde hem EDTA'lı hem CPDA'lı tam kan stoklarıyla çalışılmıştır [126]. Çalışmamızda da her iki antikoagülanda toplanan tam kan stoklarıyla çalışıldı. CPDA'lı stoklardan alınan eritrositlerden hazırlanan hemolizatlardan stabilizasyon çalışmalarında daha iyi sonuçlar alındı. Hemolizat oluştururken kullanılan tamponlar ve kimyasallar liyofilizasyon işlemi sırasında ve sonrasında enzimi korumaktadır. Bu sebeple çalışmamızda daha çok bu aşamaya yoğunlaşıldı. Distile su, PBS, sükröz, tris tamponu, stabilize edici solüsyon ve CPDA ile farklı dilüsyonlarda hemolizat oluşturularak liyofilize edildi. Liyofilizasyon sonrası çözüldükten sonraki ilk aktiviteler değerlendirildiğinde PBS, sükröz ve CPDA solüsyonlarında hazırlananlar ön plana çıktı.

Dondurma aşamasında pH değişikliklerini ayarlamak ve korumak ideal bir tampon kullanmakla mümkündür. Bir çalışmada stabiliteyi artırmak için liyofilizasyon aşamasında fosfatlı tampon kullanılarak stabilite sağlanmıştır [127]. Esparaza ve arkadaşları ise yaptıkları çalışmada PBS tuzlarının kek gözenekliliğini iyileştirdiğini ve liyofilize keklerin sulandırma süresini hızlandırdığını bildirmişlerdir [128]. Çalışmamızda PBS tamponu ve içerisine albumin, gliserol ve glisin gibi liyoprotektan maddeler eklenerek farklı hemolizat içerikleri hazırlandı. Liyofilizasyon sonrası distile su, PBS ve CPDA solüsyonlarıyla oda sıcaklığında çözüldü. 1 haftalık takiplerde stabilizasyon sağlanamadı. Bunun yanı sıra numunelerdeki yoğunlaşma sebebiyle cihazın numune pipetleme süreci sırasında sorunlar yaşandı.

Sükröz, çalışmalarda yaygın olarak kullanılan önemli kriyoprotektan ve liyoprotektanlardan biridir. Kriyoprotektan olarak etkisini protein molekülünün içinde bulunduğu çözeltide boşluk oluşturarak donma hasarına karşı koruyarak

göstermektedir [129]. Sükroz, liyofilize edilecek ürünün konsantrasyonunun çok düşük görünmesi durumunda formülasyona hacim katmak için kullanılabilir. Bunun yanı sıra, osmotik basıncı kontrol ederken izotonik bir ortam sağlamak ve liyofilizasyon aşamasında donma-kurutma streslerinden korumaktır. Bu özellikleri sayesinde liyofilizasyon aşamasında molekülleri koruyarak stabilizasyonu sağlamaktadır[130, 131]. Literatürde liyoprotektan olarak kullanılan çalışmalarda farklı konsantrasyonlar üzerinde çalışılmıştır [132, 133]. G6PD kontrol metaryali üzerinde çalışılan bir tezde %5 sükroz çözeltisi içinde hazırlanan hemolizatın liyofilize edilmesiyle enzim stabilizasyonu sağlanmıştır [125]. Çalışmamızda bu bilgi doğrultusunda %5 sükroz çözeltisiyle çalışıldı. Çözeltiye liyoprotektan özellik gösteren gliserol, albumin ve glisin gibi maddeler eklenerek farklı hemolizat içerikleri de hazırlandı. Liyofilizasyon sonrası distile su, sükroz ve CPDA solüsyonlarıyla oda sıcaklığında çözüldü. 1 haftalık takiplerde stabilizasyon sağlanamadı. CPDA solüsyonuyla çözülen numunelerin aktivite düşüş hızının yavaşladığı görüldü.

CPDA solüsyonu sitrat, fosfat, dekstroz ve adenin içermektedir. Sitrat, dondurma aşamasında pH değişikliklerini ayarlamak ve korumak için tampon olarak kullanılabilir. Bir çalışmada sükroz çözeltisine sodyum sitrat eklenmesi sonrası liyofilizasyon yapılması, sükrozdan daha yüksek bir cam geçiş sıcaklığına (Tg) yol açmıştır. Yüksek Tg değerleri, liyofilizasyon sırasında kullanılan malzemenin daha kararlı ve azalmış reaktiviteye sahip olduğunu gösterebilmektedir [134]. Bu durum, materyalin depolama ve taşıma sırasında daha dayanıklı olmasını sağlayabilmektedir. İçinde bulunan fosfat da liyofilizasyon aşamalarında pH değişikliklerini korumak için önemlidir. Solüsyonun içinde bulunan dekstrozun da sükroz gibi görev gördüğünü tahmin etmekteyiz. Çalışmamızda CPDA solüsyonu kullanarak ve gliserol, albumin ve glisin gibi liyoprotektan maddeler de eklenerek çeşitli dilüsyonlarda hemolizat içerikleri oluşturuldu. Liyofilizasyon sonrası distile su ve CPDA solüsyonlarıyla oda sıcaklığında çözüldü. 7 günlük aktivite takiplerinde CPDA kullanılarak çözülen örneklerde stabilite sağlandı. Çalıştığımız diğer deney setlerinde de stabilizasyon sağlanmasa bile liyofilizasyon sonrası CPDA solüsyonuyla çözülen aktivite düşüş hızını yavaşlattığı görüldü. Bu durumun CPDA solüsyonunun tamponlama gücüne bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

Ayrıca eklenen kimyasallardan özellikle gliserol olmak üzere albuminin de stabilizasyona olumlu etkisi gözlemlendi. Gliserol hem liyoprotektan hem de kriyoprotektan olarak görev yapmaktadır. Liyofilizasyon işleminde hem donma hem

de kuruma streslerine karşı koruma sağlayarak stabilizasyona katkıda bulunur. Aynı zamanda osmotik basıncı kontrol eder [95, 135, 136]. Bir çalışmada, gliserol ön işleminin liyofilize eritrositlerin geri kazanımı ve antioksidan enzimlerin aktiviteleri üzerinde faydalı etkileri olduğunu göstermişlerdir [137]. Albuminin de kriyoprotektan veya liyoprotektan olarak kullanılarak proteinlerin stabilitesini arttırdığı çalışmalar mevcuttur [138, 139]. Çalışmamızda hazırlanan liyofilize kontrol materyalleri deney setlerinden bazıları -20°C ve 4°C’de muhafaza edildi. 2 ay muhafaza edildikten sonra çözülen materyallerin stabilite çalışma verilerinde -20 °C koşullarında saklamanın faydalı olacağı görüldü. Bunun yanı sıra her iki koşulda saklanması gerekirse de albumin ve gliserol gibi liyoprotektan maddelerinin stabiliteye olumlu etkisi olacağı gözlemlendi.

Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya Ar-Ge Laboratuvarı ve TÜBİTAK Ulusal Metroloji Enstitüsü’nde liyofilizasyon sonrası materyallerde elde ettiğimiz sonuçlar benzerdi. AR-Ge laboratuvarımızdaki liyofilizatörümüzde dondurma aşaması cihaz dışında yapılmakta, kurutma aşamalarında sıcaklık değişimi yapılamamakta ve basınç değişiklikleri manuel gerçekleştirilmekteydi. İşlem bittikten sonra kapaklar manuel kapatılmaktaydı. TÜBİTAK UME’de çalışılan liyofilizatörde dondurma aşaması liyofilizatörde başlatılarak, işleme başlamadan önce sisteme girilen prosedüre göre basınç değişiklikleri ve raf sıcaklığı otomatik olarak değişmekteydi. Aynı zamanda uzaktan takip sistemi sayesinde aşamaları takip ederek gerekli durumda ek basamak eklenebilmekteydi. İşlem bittikten sonra ise azot atmosferi altında kapaklar kapatılmaktaydı. Stabilize ve standardize kontrol materyalleri üretmek için bahsedilen her aşamanın ideal şekilde takip edilmesi önemlidir. Bu sebeple kullanacak liyofilizatör seçeneklerine dikkat edilmelidir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızda farklı yöntem ve kimyasallar kullanılarak stabilitesi uzun G6PD kontrol materyali geliştirmek hedeflendi. Likit tam kan, likit enzim ve liyofilize kontrol materyalleri üzerine çalışıldı.

Likit tam kan kontrol materyali için planladığımız 45°C ve +4°C koşullarında yaptığımız deneyler sonucunda kontrol materyali olarak likit tam kanın kullanılmasının uzun süre depolama ve uzak merkezler arası transport koşullarında bir avantaj sağlamayacağı sonucuna varıldı. Stabilite takiplerinde ACD ve CPDA tüplerinin +4°C saklama koşullarında 6-8 hafta arasında stabil kaldığı görüldü. G6PD enzim aktivitesi çalışmak isteyip hemen çalışmayan ve numunelerin dış merkeze transportunu gerektiren durumlarda ACD ve CPDA içeren tüpler kullanılabilir.

Likit enzim kontrol materyali için yaptığımız deneyler ve laboratuvarlar arası çalışmada Glisin ve GlisinTris tamponunda çözülen enzim kontrol materyalleri hedeflenen sürelerde stabil kaldı.

Liyofilize kontrol materyalleri, rutin kullanımda uzun süreli depolama ve uzak merkezlere transfer gibi uzun süreli stabilite gerektiren durumlarda avantajlıdır. Çalışmamızda hemolizat örneklerinin liyofilizasyonu üzerine çalışıldı. CPDA solüsyonu ile farklı dilüsyon oranlarında oluşturularak liyofilize edilen ve CPDA ile oda sıcaklığında çözülen kontrol materyallerinde 1 haftalık stabilite elde edildi. Piyasada ticari olarak bulunan G6PD kontrol materyallerinin çözüldükten sonra 1 hafta stabil kaldığı belirtilmektedir. Çalışmamızda minimum olarak hedeflediğimiz çözüldükten sonra 1 haftalık stabilite sağlandı. G6PD enzim aktivitesi eksik ve normal olan bireylerden alınacak kan örnekleriyle ayrı ayrı stok hazırlamadan farklı dilüsyonlarla farklı seviyelerde kontrol materyali hazırlanabilir. Çalışmamızda hazırlanan liyofilize kontrol materyalleri deney setlerinden bazıları -20°C ve 4°C'de muhafaza edildi. 2 ay muhafaza edildikten sonra çözülen materyallerin stabilite çalışma verilerinde -20°C koşullarında saklama koşullarının faydalı olacağı görüldü. Fakat her iki sıcaklık koşullarında da albumin ve gliserol gibi liyoprotektanlar eklenerek stabilitenin arttığı gözlemlendi.

Çalışmamızda G6PD enzimi aktivitesi ölçüm kiti için stabil bir kontrol materyali geliştirilmiştir. Ayrıca tezimiz eritrositlerde çalışılan benzeri enzim parametrelerin kontrol materyallerinin geliştirilmesi konusunda literatüre katkı sağlamıştır. Üniversitemizde üretilen G6PD kiti ve kontrol materyali üretimi konusunda

yaptığımız tez çalışmamız yerli ve milli üretimde, laboratuvarlarda dışa bağımlılığı azaltmada önemli bir adım olacak ve ülkemize büyük katkı sağlayacaktır.



KAYNAKLAR

1. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress*. The EMBO Journal, 1995. 14(21): p. 5209-5215-5215.
2. Derneği, T.H., *Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Enzim Eksikliği Tanı ve Tedavi Kılavuzu*, in *Ulusal Tedavi Kılavuzu*. 2011.
3. Cappellini, M.D. and G. Fiorelli, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Lancet, 2008. 371(9606): p. 64-74.
4. (2002), A.D., *Kanın Yapısı ve Özellikleri In: Onat T., Emerk K., Sözmen E. T. (eds) İnsan Biyokimyası 975-8624-20-02 İstanbul Palme Yayıncılık*
5. Price-Jones, C., *Red cell diameters in one hundred healthy persons and in pernicious anæmia: The effect of liver treatment*. The Journal of Pathology and Bacteriology, 1929. 32(3): p. 479-501.
6. Chen, Y., J. Cai, and J. Zhao, *DISEASED RED BLOOD CELLS STUDIED BY ATOMIC FORCE MICROSCOPY*. International Journal of Nanoscience, 2002. 01(05n06): p. 683-688.
7. Loyola-Leyva, A., et al., *Morphological changes in erythrocytes of people with type 2 diabetes mellitus evaluated with atomic force microscopy: A brief review*. Micron, 2018. 105: p. 11-17.
8. F, G., *Figen Gürdöl Tıbbi Biyokimya Nobel Tıp Kitap Evleri ISBN: 978-605-335-454-3 İstanbul 2019*.
9. Beutler E, W.W., *Williams Hematology: McGraw-Hill; 2001*.
10. van Wijk, R. and W.W. van Solinge, *The energy-less red blood cell is lost: erythrocyte enzyme abnormalities of glycolysis*. Blood, 2005. 106(13): p. 4034-4042.
11. Warburg, O. and W. Christian, *Optischer Nachweis der Hydrierung und Dehydrierung des Pyridins im Gärungs-Co-Ferment*. Biochemische Zeitschrift, 1936. 286: p. 81.
12. Warburg, O., W. Christian, and A. Griese, *Wasserstoffübertragendes Co-Ferment, seine Zusammensetzung und Wirkungsweise*. Biochem. z, 1935. 282: p. 157-205.
13. Gunsalus, I.C., B.L. Horecker, and W.A. Wood, *Pathways of carbohydrate metabolism in microorganisms*. Bacteriol Rev, 1955. 19(2): p. 79-128.
14. Stincone, A., et al., *The return of metabolism: biochemistry and physiology of the pentose phosphate pathway*. Biol Rev Camb Philos Soc, 2015. 90(3): p. 927-63.
15. Thomas, J.H., and Gilham, B., Wills, *Biochemical Basis of Medicine Wright, London, 1983, .297-302*. 1983.
16. Huisjes, R., et al., *Squeezing for Life – Properties of Red Blood Cell Deformability*. Frontiers in Physiology, 2018. 9.
17. Harley, J.D., *Role of Reduced Glutathione in Human Erythrocytes*. Nature, 1965. 206(4988): p. 1054-1055.
18. Jaffé, E.R., *Introduction to discussion of red cell GSH metabolism: The functions of reduced glutathione in human erythrocytes*. Experimental Eye Research, 1971. 11(3): p. 306-309.

19. Yalın E. A., Y.S., Yıldız Ş. M., Yüzbaşıoğlu S., Aksoy K., , *Eritrosit Membran Proteinlerine Serbest Radikallerin Etkisi Cilt:26, Sayı:4.* 2001.
20. Luzzatto, L., C. Nannelli, and R. Notaro, *Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency.* Hematol Oncol Clin North Am, 2016. 30(2): p. 373-93.
21. Battistuzzi, G., et al., *Tissue-specific levels of human glucose-6-phosphate dehydrogenase correlate with methylation of specific sites at the 3' end of the gene.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1985. 82(5): p. 1465-9.
22. Persico, M.G., et al., *Isolation of human glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD) cDNA clones: primary structure of the protein and unusual 5' non-coding region.* Nucleic Acids Res, 1986. 14(6): p. 2511-22.
23. Rattazzi, M.C., *Glucose 6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes: molecular weight determination by gel filtration.* Biochem Biophys Res Commun, 1968. 31(1): p. 16-24.
24. Naylor, C.E., et al., *Glucose 6-phosphate dehydrogenase mutations causing enzyme deficiency in a model of the tertiary structure of the human enzyme.* Blood, 1996. 87(7): p. 2974-82.
25. Au, S.W., et al., *Human glucose-6-phosphate dehydrogenase: the crystal structure reveals a structural NADP(+) molecule and provides insights into enzyme deficiency.* Structure, 2000. 8(3): p. 293-303.
26. Cohen, P. and M.A. Rosemeyer, *Subunit interactions of glucose-6-phosphate dehydrogenase from human erythrocytes.* Eur J Biochem, 1969. 8(1): p. 8-15.
27. Trask, B.J., et al., *Mapping of human chromosome Xq28 by two-color fluorescence in situ hybridization of DNA sequences to interphase cell nuclei.* Am J Hum Genet, 1991. 48(1): p. 1-15.
28. *Standardization of procedures for the study of glucose-6-phosphate dehydrogenase. Report of a WHO Scientific Group.* World Health Organ Tech Rep Ser, 1967. 366: p. 1-53.
29. *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency. WHO Working Group.* Bull World Health Organ, 1989. 67(6): p. 601-11.
30. Warburg, O. and W. Christian, *Über ein neues Oxydationsferment und sein Absorptionsspektrum.* Biochem. Z., 1932. 254: p. 438.
31. Pandolfi, P.P., et al., *Targeted disruption of the housekeeping gene encoding glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD): G6PD is dispensable for pentose synthesis but essential for defense against oxidative stress.* Embo j, 1995. 14(21): p. 5209-15.
32. Fermi, C., *Studio sul favismo.* 1905.
33. Cordes, W., *Zwischenfälle bei der Plasmochinbehandlung.* Arch. Schiffs-u. Tropenhyg, 1928. 32: p. 143-148.
34. Alving, A.S., et al., *Enzymatic deficiency in primaquine-sensitive erythrocytes.* Science, 1956. 124(3220): p. 484-5.
35. Sansone, G. and G. Segni, *[New aspects of the biochemical alterations in the erythrocytes of patients with favism; almost complete absence of glucose-6-phosphate dehydrogenase].* Boll Soc Ital Biol Sper, 1958. 34(7): p. 327-9.
36. Adam, A., *Linkage between deficiency of glucose-6-phosphate dehydrogenase and colour-blindness.* Nature, 1961. 189: p. 686.
37. Phillips, M.A., et al., *Malaria.* Nature Reviews Disease Primers, 2017. 3(1): p. 17050.
38. Cappadoro, M., et al., *Early phagocytosis of glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD)-deficient erythrocytes parasitized by Plasmodium*

- falciparum* may explain malaria protection in G6PD deficiency. *Blood*, 1998. 92(7): p. 2527-34.
39. Fanello, C.I., et al., *High risk of severe anaemia after chlorproguanil-dapsone+artesunate antimalarial treatment in patients with G6PD (A-) deficiency*. *PLoS One*, 2008. 3(12): p. e4031.
 40. Frank, J.E., *Diagnosis and management of G6PD deficiency*. *Am Fam Physician*, 2005. 72(7): p. 1277-82.
 41. Mehta, A., P.J. Mason, and T.J. Vulliamy, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. *Baillieres Best Pract Res Clin Haematol*, 2000. 13(1): p. 21-38.
 42. Tanphaichitr, V.S., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in the newborn: its prevalence and relation to neonatal jaundice*. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 1995. 26 Suppl 1: p. 137-41.
 43. Pinna, A., et al., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and diabetes mellitus with severe retinal complications in a Sardinian population, Italy*. *Int J Med Sci*, 2013. 10(13): p. 1907-13.
 44. Porto, I., A. Leo, and F. Crea, *Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) deficiency in a patient with ST-segment elevation acute myocardial infarction successfully treated by simple thrombectomy*. *J Atheroscler Thromb*, 2011. 18(5): p. 425-30.
 45. Ninfali, P. and N. Bresolin, *Muscle glucose 6-phosphate dehydrogenase (G6PD) deficiency and oxidant stress during physical exercise*. *Cell Biochem Funct*, 1995. 13(4): p. 297-8.
 46. Edwards, C.Q., *Anemia and the liver. Hepatobiliary manifestations of anemia*. *Clin Liver Dis*, 2002. 6(4): p. 891-907, viii.
 47. Siddiqui, T. and A.H. Khan, *Hepatitis A and cytomegalovirus infection precipitating acute hemolysis in glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. *Mil Med*, 1998. 163(6): p. 434-5.
 48. Tugwell, P., *Glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency in Nigerians with jaundice associated with lobar pneumonia*. *Lancet*, 1973. 1(7810): p. 968-9.
 49. Choremis, C., et al., *Viral hepatitis in G.-6-P.D. deficiency*. *Lancet*, 1966. 1(7431): p. 269-70.
 50. Selroos, O., *Reversible renal failure and G.-6-P.D. deficiency*. *Lancet*, 1972. 2(7771): p. 284-5.
 51. Angle, C.R., *Glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and acute renal failure*. *Lancet*, 1972. 2(7768): p. 134.
 52. Kattamis, C.A., M. Kyriazakou, and S. Chaidas, *Favism: clinical and biochemical data*. *J Med Genet*, 1969. 6(1): p. 34-41.
 53. Belsey, M.A., *The epidemiology of favism*. *Bull World Health Organ*, 1973. 48(1): p. 1-13.
 54. Meloni, T., et al., *Favism and hemolytic anemia in glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient subjects in North Sardinia*. *Acta Haematol*, 1983. 70(2): p. 83-90.
 55. Luzzatto, L. and P. Arese, *Favism and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Deficiency*. *N Engl J Med*, 2018. 378(1): p. 60-71.
 56. Fischer, T.M., et al., *Membrane cross bonding in red cells in favic crisis: a missing link in the mechanism of extravascular haemolysis*. *Br J Haematol*, 1985. 59(1): p. 159-69.

57. Meloni, T., G. Forteleoni, and G.F. Meloni, *Marked decline of favism after neonatal glucose-6-phosphate dehydrogenase screening and health education: the northern Sardinian experience*. Acta Haematol, 1992. 87(1-2): p. 29-31.
58. Perkins, R.P., *Hydrops fetalis and stillbirth in a male glucose-6-phosphate dehydrogenase-deficient fetus possibly due to maternal ingestion of sulfisoxazole; a case report*. Am J Obstet Gynecol, 1971. 111(3): p. 379-81.
59. Valaes, T., S.A. Doxiadis, and P. Fessas, *Acute hemolysis due to naphthalene inhalation*. The Journal of Pediatrics, 1963. 63(5): p. 904-915.
60. Kaplan, M., et al., *Gilbert syndrome and glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency: a dose-dependent genetic interaction crucial to neonatal hyperbilirubinemia*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. 94(22): p. 12128-32.
61. *Management of hyperbilirubinemia in the newborn infant 35 or more weeks of gestation*. Pediatrics, 2004. 114(1): p. 297-316.
62. Fiorelli, G., F. Martinez di Montemuros, and M.D. Cappellini, *Chronic non-spherocytic haemolytic disorders associated with glucose-6-phosphate dehydrogenase variants*. Baillieres Best Pract Res Clin Haematol, 2000. 13(1): p. 39-55.
63. Motulsky, A.G. and J.M. Campbell-Kraut, *Population genetics of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency of the red cell*. 1962.
64. Beutler, E., *A series of new screening procedures for pyruvate kinase deficiency, glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and glutathione reductase deficiency*. Blood, 1966. 28 4: p. 553-62.
65. Jalloh, A., et al., *Rapid epidemiologic assessment of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency in malaria-endemic areas in Southeast Asia using a novel diagnostic kit*. Trop Med Int Health, 2004. 9(5): p. 615-23.
66. Tantular, I.S. and F. Kawamoto, *An improved, simple screening method for detection of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. Trop Med Int Health, 2003. 8(6): p. 569-74.
67. Ringelhahn, B., *A simple laboratory procedure for the recognition of A- (African type) G-6PD deficiency in acute haemolytic crisis*. Clinica Chimica Acta, 1972. 36(1): p. 272-274.
68. Newman, T.B. and M.J. Maisels, *Evaluation and treatment of jaundice in the term newborn: a kinder, gentler approach*. Pediatrics, 1992. 89(5 Pt 1): p. 809-18.
69. Hafez, M., et al., *Improved erythrocyte survival with combined vitamin E and selenium therapy in children with glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency and mild chronic hemolysis*. J Pediatr, 1986. 108(4): p. 558-61.
70. Beutler, E., et al., *Prenatal diagnosis of glucose-6-phosphate-dehydrogenase deficiency*. Acta Haematol, 1992. 87(1-2): p. 103-4.
71. Sixma, H.J., et al., *Quality of care from the patients' perspective: from theoretical concept to a new measuring instrument*. Health Expect, 1998. 1(2): p. 82-95.
72. ISO15189:2007, *Medical laboratories particular requirements for quality and competence*. Geneva, International Organization for Standardization. 2007.
73. CLSI.C24-A3, *Statistical quality control for quantitative measurement procedures: principles and definitions, approved guideline—3rd ed*. Wayne, PA, Clinical and Laboratory Standards Institute 2006
74. *Laboratuvar Kalite Yönetim Sistemi El Kitabı*. 2019: Türk Biyokimya Derneği.

75. Henriksen, G.M., et al., *Minimally processed fresh frozen human reference sera: preparation, testing, and application to international external quality assurance*. Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation, 2004. 64(4): p. 293-308.
76. Premachandra, P., et al., *Preparation and stability of low-cost liquid quality-control serum stabilized with ethanediol*. Clin Chem, 1987. 33(6): p. 851-2.
77. Hartmann, A.E., R.D. Juel, and R.N. Barnett, *Long-term stability of a stabilized liquid quality-control serum*. Clin Chem, 1981. 27(8): p. 1448-52.
78. Eckfeldt, J.H. and K.R. Copeland, *Accuracy verification and identification of matrix effects. The College of American Pathologists' Protocol*. Arch Pathol Lab Med, 1993. 117(4): p. 381-6.
79. Adams, G., I. Cook, and K. Ward, *The Principles of Freeze-Drying*. Methods in molecular biology (Clifton, N.J.), 2015. 1257: p. 121-43.
80. Tang, X. and M.J. Pikal, *Design of Freeze-Drying Processes for Pharmaceuticals: Practical Advice*. Pharmaceutical Research, 2004. 21(2): p. 191-200.
81. Carpenter, J.F., et al., *Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice*. Pharm Res, 1997. 14(8): p. 969-75.
82. L, R., *Glimpses into the realm of freeze-drying classical issues and new ventures*. Rey L, May JC. eds. *Freeze Drying/Lyophilisation of Pharmaceutical and Biological Products. Third edition, Informa Healthcare, London. p.1-28. . 2010.*
83. ErgÜN, Z., *Biyolojik Maddelerin Kurutularak Saklanması: Liyofilizasyon*. Etlik Veteriner Mikrobiyoloji Dergisi, 2015. 26(1): p. 35-40.
84. Kumar GP, P.N., Kumari BC, *Fundamentals and Applications of Lyophilization*. Journal of Advanced Pharmaceutical Research. 2(4), 157-169. 2011.
85. Liu, J., et al., *A study of the impact of freezing on the lyophilization of a concentrated formulation with a high fill depth*. Pharm Dev Technol, 2005. 10(2): p. 261-72.
86. G R, N., et al., *Lyophilization/Freeze Drying - An Review*. International Journal of Novel Trends in Pharmaceutical Sciences, 2013. 3(4): p. 87-98.
87. Strickley, R.G., et al., *An unexpected pH effect on the stability of moexipril lyophilized powder*. Pharm Res, 1989. 6(11): p. 971-5.
88. Deck, L.-T., D.R. Ochsenein, and M. Mazzotti, *Stochastic shelf-scale modeling framework for the freezing stage in freeze-drying processes*. International Journal of Pharmaceutics, 2022. 613: p. 121276.
89. Oetjen, G.-W., *Freeze-Drying*, in *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. 2004.
90. Fonte, P., S. Reis, and B. Sarmento, *Facts and evidences on the lyophilization of polymeric nanoparticles for drug delivery*. J Control Release, 2016. 225: p. 75-86.
91. Sadikoglu, H., M. Ozdemir, and M. Şeker, *Freeze-Drying of Pharmaceutical Products: Research and Development Needs*. Drying Technology - DRY TECHNOL, 2006. 24: p. 849-861.
92. Fanguero, J.F., et al., *Design of cationic lipid nanoparticles for ocular delivery: development, characterization and cytotoxicity*. Int J Pharm, 2014. 461(1-2): p. 64-73.
93. Wolkers, W.F. and H. Oldenhof, *Cryopreservation and freeze-drying protocols*. 2015: Springer.

94. Whaley, D., et al., *Cryopreservation: An Overview of Principles and Cell-Specific Considerations*. Cell Transplant, 2021. 30: p. 963689721999617.
95. Pardeshi, S., et al., *Process development and quality attributes for the freeze-drying process in pharmaceuticals, biopharmaceuticals and nanomedicine delivery: a state-of-the-art review*. Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 2023. 9.
96. Gomez-Rioja, R., et al., *Recommendation for the design of stability studies on clinical specimens*. Clin Chem Lab Med, 2023. 61(10): p. 1708-1718.
97. Illana, F.J., et al., *Quality assurance of add-on testing in plasma samples: stability limit for 29 biochemical analytes*. Biochem Med (Zagreb), 2024. 34(2): p. 020704.
98. Jalil, N., et al., *Evaluation of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase stability in stored blood samples*. Excli j, 2016. 15: p. 155-62.
99. Fiogbe, E., et al., *Assessment of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Activity with a Delay*. 2019. 13: p. 135-146.
100. Peck, C.C., G.L. Moore, and R.B. Bolin, *Adenine in blood preservation*. Crit Rev Clin Lab Sci, 1981. 13(3): p. 173-212.
101. Platts, L. and R.J. Falconer, *Controlling protein stability: Mechanisms revealed using formulations of arginine, glycine and guanidinium HCl with three globular proteins*. Int J Pharm, 2015. 486(1-2): p. 131-5.
102. Street, T.O., D.W. Bolen, and G.D. Rose, *A molecular mechanism for osmolyte-induced protein stability*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. 103(38): p. 13997-4002.
103. Bye, J.W. and R.J. Falconer, *Thermal stability of lysozyme as a function of ion concentration: a reappraisal of the relationship between the Hofmeister series and protein stability*. Protein Sci, 2013. 22(11): p. 1563-70.
104. Iyer, P.V. and L. Ananthanarayan, *Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment*. Process Biochemistry, 2008. 43(10): p. 1019-1032.
105. Ladero, M., et al., *Thermal and pH inactivation of an immobilized thermostable β -galactosidase from Thermus sp. strain T2: Comparison to the free enzyme*. Biochemical Engineering Journal, 2006. 31: p. 14-24.
106. Pace, C.N. and T. McGrath, *Substrate stabilization of lysozyme to thermal and guanidine hydrochloride denaturation*. Journal of Biological Chemistry, 1980. 255(9): p. 3862-3865.
107. Karaseva, E.I. and D.I. Metelitsa, *[Stabilization of glucoso-6-phosphate dehydrogenase by its substrate and cofactor in an ultrasonic field]*. Bioorg Khim, 2006. 32(5): p. 485-93.
108. Kishore, V., et al., *Bovine Serum Albumin a Potential Thermostabilizer: a Study on α -Amylase*. Journal of Applied & Environmental Microbiology, 2024. 2(2): p. 37-41.
109. Chang, B.S. and R.R. Mahoney, *Enzyme thermostabilization by bovine serum albumin and other proteins: evidence for hydrophobic interactions*. Biotechnol Appl Biochem, 1995. 22(2): p. 203-14.
110. Silva, C., et al., *Practical insights on enzyme stabilization*. Crit Rev Biotechnol, 2018. 38(3): p. 335-350.
111. Trivedi, M.V., J.S. Laurence, and T.J. Siahaan, *The role of thiols and disulfides on protein stability*. Curr Protein Pept Sci, 2009. 10(6): p. 614-25.

112. Wang, X.Y., F.G. Meng, and H.M. Zhou, *The role of disulfide bonds in the conformational stability and catalytic activity of phytase*. *Biochem Cell Biol*, 2004. 82(2): p. 329-34.
113. Takagi, H., et al., *Enhancement of the thermostability of subtilisin E by introduction of a disulfide bond engineered on the basis of structural comparison with a thermophilic serine protease*. *J Biol Chem*, 1990. 265(12): p. 6874-8.
114. Asgeirsson, B., B.V. Adalbjörnsson, and G.A. Gylfason, *Engineered disulfide bonds increase active-site local stability and reduce catalytic activity of a cold-adapted alkaline phosphatase*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. 1774(6): p. 679-87.
115. Tanaka, A., et al., *Thermal unfolding of mutant forms C509G and C509S of starch binding domain-fragment of Aspergillus niger glucoamylase*. *Netsu Sokutei*, 1999. 26(4): p. 136-140.
116. Lopes de Almeida, J.P. and C. Saldanha, *Dithiothreitol revisited in red cells: a new head for an old hat*. *Clin Hemorheol Microcirc*, 2010. 46(1): p. 51-6.
117. Cormier, E.P. and G.A. Molander, *4.05 - Functions Incorporating Oxygen and Another Chalcogen*, in *Comprehensive Organic Functional Group Transformations II*, A.R. Katritzky and R.J.K. Taylor, Editors. 2005, Elsevier: Oxford. p. 237-269.
118. Umerska, A., et al., *Synergistic Effect of Combinations Containing EDTA and the Antimicrobial Peptide AA230, an Arenicin-3 Derivative, on Gram-Negative Bacteria*. *Biomolecules*, 2018. 8(4).
119. Roussel, A.M., et al., *EDTA chelation therapy, without added vitamin C, decreases oxidative DNA damage and lipid peroxidation*. *Altern Med Rev*, 2009. 14(1): p. 56-61.
120. Forman, H.J., H. Zhang, and A. Rinna, *Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis*. *Molecular Aspects of Medicine*, 2009. 30(1): p. 1-12.
121. Mokhtari, V., et al., *A Review on Various Uses of N-Acetyl Cysteine*. *Cell J*, 2017. 19(1): p. 11-17.
122. Beydemir, S., M. Ciftçi, and O.I. Küfrevioğlu, *Purification and characterization of glucose 6-phosphate dehydrogenase from sheep erythrocytes and inhibitory effects of some antibiotics on enzyme activity*. *J Enzyme Inhib Med Chem*, 2002. 17(4): p. 271-7.
123. Chiang, S.H., M.L. Fan, and K.J. Hsiao, *External quality assurance programme for newborn screening of glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency*. *Ann Acad Med Singap*, 2008. 37(12 Suppl): p. 84-4.
124. Kahn, M., et al., *Recombinant human G6PD for quality control and quality assurance of novel point-of-care diagnostics for G6PD deficiency*. *PLoS One*, 2017. 12(5): p. e0177885.
125. PIENTHAI, N., *Development of Control Material for Diagnosis of G6PD Deficiency*
in *Master of Science in Medical Technology*. 2019 CHIANG MAI UNIVERSITY
126. Paleari, R., A. Muñoz, and A. Mosca, *Towards the development of a certified reference material for hemoglobin A2*. *Clin Chem Lab Med*, 2010. 48(11): p. 1611-8.
127. Meulewaeter, S., et al., *Continuous freeze-drying of messenger RNA lipid nanoparticles enables storage at higher temperatures*. *J Control Release*, 2023. 357: p. 149-160.

128. Esparza, K. and H. Onyuksel, *Development of co-solvent freeze-drying method for the encapsulation of water-insoluble thiostrepton in sterically stabilized micelles*. Int J Pharm, 2019. 556: p. 21-29.
129. Lee, J.C. and S.N. Timasheff, *The stabilization of proteins by sucrose*. J Biol Chem, 1981. 256(14): p. 7193-201.
130. Kannan, V., et al., *Effect of sucrose as a lyoprotectant on the integrity of paclitaxel-loaded liposomes during lyophilization*. J Liposome Res, 2015. 25(4): p. 270-8.
131. Roos, Y. and M. Karel, *Phase Transitions of Amorphous Sucrose and Frozen Sucrose Solutions*. Journal of Food Science, 2006. 56: p. 266-267.
132. Telange, D.R., et al., *Phospholipid complex-loaded self-assembled phytosomal soft nanoparticles: evidence of enhanced solubility, dissolution rate, ex vivo permeability, oral bioavailability, and antioxidant potential of mangiferin*. Drug Deliv Transl Res, 2021. 11(3): p. 1056-1083.
133. Chitkara, D., et al., *Core-shell nanoparticulate formulation of gemcitabine: lyophilization, stability studies, and in vivo evaluation*. Drug Deliv Transl Res, 2014. 4(5-6): p. 439-51.
134. Kets, E.P., et al., *Citrate increases glass transition temperature of vitrified sucrose preparations*. Cryobiology, 2004. 48(1): p. 46-54.
135. Horn, J., J. Schanda, and W. Friess, *Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates*. European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics, 2018. 127: p. 342-354.
136. el Harith, A., et al., *Use of glycerol as an alternative to freeze-drying for long-term preservation of antigen for the direct agglutination test*. Trop Med Int Health, 2003. 8(11): p. 1025-9.
137. Zhou, X.L., et al., *Effects of glycerol pretreatment on recovery and antioxidant enzyme activities of lyophilized red blood cells*. Cryo Letters, 2008. 29(4): p. 285-92.
138. Díaz-Moreno, E., et al., *Evaluation of freeze-drying and cryopreservation protocols for long-term storage of biomaterials based on decellularized intestine*. J Biomed Mater Res B Appl Biomater, 2018. 106(2): p. 488-500.
139. Tsukamoto, M., et al., *Bovine serum albumin as a lyoprotectant for preparation of DNA dry powder formulations using the spray-freeze drying method*. Biol Pharm Bull, 2012. 35(7): p. 1178-81.

EKLER

EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ.....	95
EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU.....	98



EK A: ETİK KURUL KARAR BELGESİ

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 12.05.2023-E.107226

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Tanı Kiti Kontrol Materyalinin Geliştirilmesi ve Stabilizasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	ETİK KURULUN ADI	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Klinik Araştırmalar Etik Kurulu
	AÇIK ADRESİ:	Topkapı Mahallesi Adnan Menderes Bulvarı (Vatan Caddesi) 34093 Fatih/İstanbul
	TELEFON	(0212) 523 22 88 – 3238
	FAKS	(0212) 533 23 26
	E-POSTA	etikkurul@bezmialem.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Doç. Dr. Ömer Faruk ÖZER			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ UZMANLIK ALANI	Biyokimya Anabilim Dalı			
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi			
	VARSA İDARİ SORUMLU UNVANI/ADI/SOYADI	-			
	DESTEKLEYİCİ				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. gibi kaynaklardan destek alanlar için)	-			
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ				
	ARAŞTIRMANIN FAZİ VE TÜRÜ	FAZ 1	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 2	<input type="checkbox"/>		
		FAZ 3	<input type="checkbox"/>		
FAZ 4		<input type="checkbox"/>			
Gözlemsel ilaç çalışması		<input type="checkbox"/>			
Tıbbi cihaz klinik araştırması		<input type="checkbox"/>			
İn vitro tıbbi tanı cihazları ile yapılan performans değerlendirme çalışmaları		<input type="checkbox"/>			
İlaç dışı klinik araştırma		<input checked="" type="checkbox"/>			
Diğer ise belirtiniz					
ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/>	ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>	ULUSAL <input checked="" type="checkbox"/>	ULUSLARARASI <input type="checkbox"/>	

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU			Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA BROŞÜRÜ			Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

Sayfa 1 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSD4M24KN4&eS=107226> adresinden yapılabilir.

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 12.05.2023-E.107226

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Tam Kiti Kontrol Materyalinin Geliştirilmesi ve Stabilizasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

	Belge Adı		Açıklama
DEĞERLENDİRİLEN DİĞER BELGELER	SİGORTA	<input type="checkbox"/>	
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>	01.12.2019 tarihli, 24.04.2023 imza tarihli
	BİYOLOJİK MATERYEL TRANSFER FORMU	<input type="checkbox"/>	
	İLAN	<input type="checkbox"/>	
	YILLIK BİLDİRİM	<input type="checkbox"/>	
	SONUÇ RAPORU	<input type="checkbox"/>	
	GÜVENLİLİK BİLDİRİMLERİ	<input type="checkbox"/>	
	DİĞER:	<input checked="" type="checkbox"/>	Klinik Araştırma Başvuru Formu (01.12.2019) -Sorumlu araştırmacı ve yardımcı araştırmacılara ait özgeçmiş formları - Çalışmanın Helsinki Bildirgesi, İKU/İLU' ya uygun yürütüleceğine dair taahhütname - Araştırma ile ilgili yayınlar
KARAR BİLGİLERİ	Karar No: 08/2	Tarih: 03.05.2023	
	Yukarıda bilgileri verilen başvuru dosyası ile ilgili belgeler; araştırmanın/çalışmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve uygun bulunmuş olup araştırmanın/çalışmanın başvuru dosyasında belirtilen merkezlerde gerçekleştirilmesinde etik ve bilimsel sakınca bulunmadığına toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir. İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik kapsamında yer alan araştırmalar/çalışmalar için Türkiye İlaç ve Tıbbi Cihaz Kurumu'ndan izin alınması gerekmektedir.		

Sayfa 2 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSD4M24KN4&eS=107226> adresinden yapılabilir.

Klinik Araştırmalar Etik Kurul Onayı/Tarih ve Sayı: 12.05.2023-E.107226

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU (2011-KAEK-42) KARAR FORMU

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Tam Kiti Kontrol Materyalinin Geliştirilmesi ve Stabilizasyonu
VARSA ARAŞTIRMANIN PROTOKOL KODU	

BEZMİALEM VAKIF ÜNİVERSİTESİ KLİNİK ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU									
ETİK KURULUN ÇALIŞMA ESASI		İlaç ve Biyolojik Ürünlerin Klinik Araştırmaları Hakkında Yönetmelik, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu							
BAŐKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:		Prof. Dr. Özcan KARAMAN							
Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet		Araştırma ile ilişki		Katılm *		İmza
Prof. Dr. Özcan KARAMAN	İç Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	II <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Selahattin TUĞRUT	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Alper YENİGÜN	Kulak Burun ve Boğaz Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Ali Akçahan GEPĐREMEM	Tıbbi Farmakoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	II <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Atilla AKDEMİR	Farmakoloji	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Eczacılık Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	II <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Emel TORUN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	II <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Ahmet ÖZAYDIN	Tıbbi Genetik	İstanbul Üniversitesi-CerrahpaŐa CerrahpaŐa Tıp Fakültesi	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Meltem BAKKAL	Pedodonti	Bezmialem Vakıf Üniversitesi DiŐ Hekimliği Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Prof. Dr. Gözde ERKANLI ŐENTÜRK	Histoloji ve Embriyoloji	İstanbul Üniversitesi-CerrahpaŐa CerrahpaŐa Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Dr. Öğr. Üyesi Ebru HACIOSMANOĞLU	Biyofizik	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	II <input type="checkbox"/>	
Doç. Dr. Özge PASIN	Biyostatistik ve Tıp BiliŐimi	Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıp Fakültesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	II <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Avukat Meryem FAZIL	Hukuk	Bezmialem Vakıf Üniversitesi	E <input type="checkbox"/>	K <input checked="" type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	
Muhammet Ali ERDOĞAN	Sağlık Meslek Mensubu Olmayan Üye	-	E <input checked="" type="checkbox"/>	K <input type="checkbox"/>	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	E <input checked="" type="checkbox"/>	H <input type="checkbox"/>	

* :Toplantıda Bulunma

Karar: Onaylandı Reddedildi

Sayfa 3 / 3

Etik Kurul Başkanı
Prof. Dr. Özcan KARAMAN

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.Evrak sorgulaması
<https://turkiye.gov.tr/ebd?eK=5394&eD=BSD4M24KN4&eS=107226> adresinden yapılabilir.

EK B: BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	1/3

BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU

“Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Tanı Kiti Kontrol Materyalinin Geliştirilmesi ve Stabilizasyonu” isimli tıbbi araştırmamızda katılımcılar için hazırlanmış Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu aşağıda yer almaktadır;

Araştırmamızın amacı Bezmialem Vakıf Üniversitesi bünyesinde ürettiğimiz Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz Tanı Kiti'nin kontrol materyalinin geliştirilerek hızlı ve doğru tanı, klinik ve tedavi takibi, çeşitli önlemlerin alınması açısından klinik pratikte katkı sağlamayı hedeflemekteyiz.

Araştırma süresi gerekli numune sayısına ulaşım ve verilerin depolanması göz önüne alındığında 1 yıl olarak öngörülmektedir.

Araştırmaya katılması beklenen toplam gönüllü sayısı minimum 25 katılımcı olacak üzere öngörülmektedir.

Araştırmaya katılacak gönüllüler araştırmaya özel farklı bir tedavi almayacaklardır.

Araştırmaya katılacak gönüllülerden rutin kan alma işlemi sırasında alınan kanların yanında araştırmamız için ekstra olarak 5 tüp kan alınacaktır. Bu işlem rutin testler için istenen kan örneklerinin alımı sırasında yapılacaktır. Böylelikle hastaya gereksiz bir invaziv girişim riski ortadan kalkacaktır.

Araştırmamızın deneysel kısmı alınan kan örneklerinin deneysel dizayna uygun olarak Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz enzim aktivitesinin ölçülmesi ve sonuçların değerlendirilmesini kapsamaktadır.

Araştırma süresince gönüllülerin rutin tedavileri dışına çıkılmayacağından ve tedavi protokolü ile araştırma konusunun bir ilgisi bulunmadığından araştırmaya özgü gönüllüler adına bir risk öngörülmemektedir.

Araştırma gönüllü açısından herhangi bir risk teşkil etmediği gibi gönüllünün araştırmaya katılmadığı takdirde alacağı tedavi aynı olup araştırmaya katılım gönüllü açısından bir yarar durumu teşkil etmemektedir. Ancak araştırmanın sonucunda toplanan ve değerlendirilen verilerin gelecekte Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz enzim eksikliği hastalığının hızlı ve doğru tanısında katkı sağlayacağı ön görülmektedir.

Araştırmamızda gönüllülerin tedavi süreçleri takip edilmeyecektir.

Araştırmamız sırasında gönüllünün yaşam kalitesini ya da alacağı tedaviyi etkileyebilecek hiçbir şey yapılmayacak olup gönüllülere verilecek herhangi bir tazminat ya da sigorta öngörülmemektedir.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	2/3

Gönüllüler kendi seçtikleri merkezlerde kendileri için planlanan tedavileri almakta olduklarından ve araştırmamızın bunlarda bir değişiklik yapılmasını gerektirmemesi dolayısıyla gönüllülere araştırma için ek bir hizmet (ulaşım/yemek vs.) verilmeyecektir.

Gönüllülerin istenilen kan örnekleri vermesi dışında araştırmaya özel bir sorumlulukları yoktur. Gönüllülerin başvurdukları polikliniklerde alacakları tedavi bu araştırma kapsamı dışındadır.

Gönüllülerin araştırmaya katılımı tamamen isteğe bağlı olup gönüllüler istedikleri zaman herhangi bir ceza ya da yaptırıma maruz kalmaksızın ve hiçbir hakkını kaybetmeksizin araştırmaya katılımı reddedebilir ya da araştırmadan çekilebilirler.

Gönüllülerin kimliğini açığa çıkarabilecek veriler yalnızca gönüllülerin kayıtlarının düzenli olarak tutulması için kullanılacaktır. Gönüllülerin kimliğini açığa çıkarabilecek bu veriler kamuoyuna duyurulmayacak, araştırmanın sonuçları açıklandığı ve yayınlandığı takdirde de gizli tutulmaya devam edileceklerdir ve herhangi bir ikincil merkezle paylaşılmayacaktır.

İzleyiciler, yoklama yapan kişiler, etik kurul, kurum ve diğer ilgili sağlık otoritelerinin gönüllünün orijinal tıbbi kayıtlarına doğrudan erişebilecek olup bu veriler gizli tutulacaktır. Yazılı bilgilendirilmiş gönüllü olur formunun imzalanmasıyla gönüllü veya kanuni temsilcisi söz konusu erişime izin vermiş olacaktır. Araştırma konusuyla ilgili ve gönüllünün araştırmaya katılmaya devam etme isteğini etkileyebilecek yeni bilgiler elde edildiğinde gönüllü veya kanuni temsilcisi zamanında görevli araştırmacılar tarafından bilgilendirileceklerdir.

Gönüllünün; araştırma, kendi hakları veya araştırmayla ilgili herhangi bir advers olay hakkında daha fazla bilgi temin edebilmesi için temasa geçebileceği kişiler ile bu kişilere ait iletişim bilgisi aşağıda paylaşılmıştır.

Gönüllünün araştırmaya katılımının sona erdirilmesini gerektirecek araştırmaya özgü bir durum bulunmamaktadır.

Çalışma sırasında araştırma ürünleri ve kayıtlarına araştırma görevlileri tarafından erişilebilecektir. Araştırmaya katılan hastalardan rutin testler için istenen kan numunelerinin yanında 5 tüp daha kan alınacaktır. Bu kan örneklerinden Glukoz 6 Fosfat Dehidrojenaz enzim aktivitesi çalışma protokolüne uygun bir şekilde çalışılacaktır. Araştırma süresince toplanan materyaller Bezmialem Vakıf Üniversitesi Tıbbi Biyokimya laboratuvarında analiz edilecektir.

Bilgilendirilmiş gönüllü olur formundaki tüm açıklamaları okudum. Bana yukarıda konusu ve amacı belirtilen araştırma ile ilgili yazılı ve sözlü açıklama aşağıda adı belirtilen hekim tarafından yapıldı.

Doküman No	İlk Yayın Tarihi	Revizyon Tarihi	Revizyon No	Sayfa
KAD-DD-13	01.12.2019		00	3/3

Araştırmaya gönüllü olarak katıldığımı, istediğim zaman gerekçeli veya gerekçesiz olarak araştırmadan ayrılabilceğimi biliyorum ve söz konusu araştırmaya, hiçbir baskı ve zorlama olmaksızın kendi rızamla katılmayı kabul ediyorum.

Gönüllünün ya da Gönüllünün yasal temsilcisinin, ADI/SOYADI/TARİH/İMZA

Araştırma ekibinde yer alan ve bilgilendirmeyi yapan araştırmacı:

Tıpta Uzmanlık Öğrencisi Dr. Tuğçe Yıldız (mail: tyildiz@bezmialem.edu.tr)