T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOTREKSAT DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOGRAFİ KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Firdevs Sak

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

Danışman

Doç. Dr. Sedat Abuşoğlu

KONYA-2020

ÖNSÖZ ve TEŞEKKÜR

Eğitimim boyunca ilminden faydalandığım, insani ve ahlaki değerleri ile de örnek edindiğim, tecrübeleri, yol göstericiliği ve ayrıca tecrübelerinden yararlanırken göstermiş olduğu hoşgörü ve sabırdan dolayı, tez danışmanım Doç. Dr. Sedat ABUŞOĞLU hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları için çok teşekkür ederim.

Tez çalışmamın her anında bilgisine başvurduğum, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ali Ünlü hocama eğitim sürecimdeki katkıları ve tez dönemindeki yardımları, yol göstericiliği için teşekkür ederim.

Eğitimime olan katkılarından, her zaman sağladığı motivasyon ve hoşgörüden dolayı sayın Doç. Dr. Hüsamettin VATANSEV hocama teşekkür ederim.

Bölümümüz hocalarından Prof. Dr. F. Hümeyra Yerlikaya Aydemir, Doç. Dr. Abdullah SİVRİKAYA, Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK ve Doç. Dr. Esma MENEVŞE'ye eğitim sürecimdeki katkılarından dolayı teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan her zaman büyük bir keyif aldığım, çalışkanlığını örnek aldığım, sabrıyla ve desteğiyle her zaman yanımda olan sevgili Dr.Araştırma Görevlisi Duygu Eryavuz Onmaz'a ve desteğini, güvenini her zaman hissettiğim, çalışmaktan büyük keyif aldığım Oğuzhan Tok'a, yardımlarından ve desteklerinden dolayı Karam Mazin Kamil GHARAB ve Mohammed BIK'e teşekkür ederim.

Maddi manevi desteğiyle her zaman yanımda olan, sevgili aileme ve arkadaşlıklarından ve manevi desteklerinden dolayı sevgili Mustafa Bayraktar, Isa Ahmed ve Dr.Sueda Uçar'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR ..... **v**
ÖZET ..... **vi**
SUMMARY ..... **vii**
GİRİŞ **1**
1. ANTİKANSER İLAÇLARIN SINIFLANDIRILMASI VE TEMEL PRENSİPLER **1**
1. 1.ANTİMETABOLİTLER 1
2.FOLAT ANTAGONİSTLERİ **3**
2.1.METOTREKSAT 3
2. 1. 1. METOTREKSAT'IN TARİHİ 3
2. 1. 2. METOTREKSATIN FİZİKOKİMYASAL ÖZELLİKLERİ 3
2. 1. 3. METOTREKSATIN FARMAKOKİNETİĞİ 4
2. 1. 4. METOTREKSATIN ETKİ MEKANİZMASI 5
2. 1. 5. METOTREKSAT İLE İLİŞKİLİ HASTALIKLAR 6
2. 1. 6. METOTREKSAT'IN METABOLİTLERİ 7
2. 1. 7. METOTREKSATIN METABOLİZMASI 9
2. 1. 8. FOLİK ASİT ANTAGONİSTİ OLARAK METOTREKSAT'IN MEKANİZMASI 10
2. 1. 9. METOTREKSATIN YAN ETKİLERİ 10
2. 1. 10. METOTREKSAT TOKSİSİTESİ 11
3. LÖKOVERİN(LV) FOLİNİK ASİT (N5-FORMİL FH4) **12**
4. METOT VALİDASYONU **13**
4. 1. VALİDASYON 13
4. 2. DOĞRULUK 13
4. 3. ANALİTİK ARALIK (LİNEARİTE) 13
4. 4. ANALİTİK ÖLÇÜM LİMİTLERİ 13
4. 4. 1. LİMİT OF DEDECTİON (LOD) 13
4. 4. 2. LİMİT OF QUANTİTATİON (LOQ) 13
4. 5. TEKRARLANABİLİRLİK (KESİNLİK) 13
4. 6. GERİ KAZANIM 14
4. 7. İNTERFERANS (GİRİŞİM) 14
4. 8. TAŞIMA (CARRYOVER) 14
4. 9. MATRİKS ETKİSİ 14

5. GEREÇ VE YÖNTEM 15
5.1. KULLANILAN CİHAZ VE MALZEMELER 15
5.1.1. CİHAZLAR 15
5.1.2. KİMYASALLAR 15
5.2. METOT VE MATERYAL 15
5.2.1. METOT OPTİMİZASYONU 15
3.2.2. LC-MS/MS PARAMETRELERİ 15
5.2.3. AKIŞ GRADİENTİ 17
5.2.4. LC-MS/MS PİKLER 17
5.2.5. ÇALIŞMA PROSEDÜRÜ 18
5.3. ÖN İŞLEMLERDE KULLANILAN ÇÖZELTİLERİN HAZIRLANMASI 18
5. 3.1. STANDARTLARIN HAZIRLANMASI 18
3.3.2. İNTERNAL STANDART HAZIRLAMA PROSEDÜRÜ 18
5.4. METOD VALİDASYONU 18
5.4.1. GERİ KAZANIM 18
5.4.2. TEKRARLANABİLİRLİK 18
5.4.3. LİNEARİTE (DOĞRUSALLIK) ÇALIŞMASI 19
5.4.4. ANALİTİK ÖLÇÜM LİMİTLERİ 20
5.4.5. İNTERFERANS ÇALIŞMASI 20
5.4.6. NUMUNE STABİLİTE ÇALIŞMASI 21
5.4.7. MATRİKS ETKİSİ 21
5.4.8. DONDURMA VE ÇÖZDÜRME ETKİSİNİN BELİRLENMESİ 21
5.4.9. İSTATİKSEL ANALİZ 22
5.4.10. TAŞIMA (CARRYOVER) ÇALIŞMASI 22
6.BULGULAR 23
6.1. LİNEARİTE (DOĞRUSALLIK) ÇALIŞMASI 23
METOTREKSAT İÇİN LİNEARİTE SONUÇLARI ÇİZELGE 2'DE GÖSTERİLMEKTEDİR.. 23
6.2. ANALİTİK ÖLÇÜM LİMİTLERİ 24
6.2. 1. LİMİT OF DETECTİON 24
6.2.3. LİMİT OF QUANTİTATİON 25
6.3. TEKRARLANABİLİRLİK (KESİNLİK) ÇALIŞMASI 25
6.3.1. METOTREKSAT ÇALIŞMA İÇİ ÇALIŞMASI 25
6.3.2. METOTREKSAT GÜN İÇİ ÇALIŞMA ARASI ÇALIŞMASI 27
6.3.3. METOTREKSAT İÇİN GÜNLER ARASI ÇALIŞMASI 28

6.4. GERİ KAZANIM ÇALIŞMASI 30
6.5. İNTERFERANS ÇALIŞMASI 30
6.6. TAŞIMA (CARRYOVER) ÇALIŞMASI 31
6. 7. NUMUNE STABİLİTE ÇALIŞMASI 32
6.8. DONDURMA VE ÇÖZME ETKİSİ ÇALIŞMASI 33
6. 9. MATRİKS ETKİSİ 33
7.TARTIŞMA 34
8. SONUÇ VE ÖNERİLER 37
9. KAYNAKÇA 38
EKLER 41
10. ÖZGEÇMİŞ 42

KISALTMALAR

ALL: Akut Lenfositik Lösemi

AO: Aldehit oksidaz

APL: Akut Promyelositik Lösemi

BOS: Beyin Omurilik Sıvısı

CD: Crohn Hastalığı

CPDG2: Karboksipeptidaz G2

DAMPA: 2,4-diamino-N10-metilpteroik asit

DNA: Deoksiribo Nükleik Asit

dUMP: Deoksiridin Monofosfat

dTMP: Deoksimidin Monofosfat

DHF: Dihidrofolat

DHFR: Dihidrofolat Redüktaz

FDA: U.S. Food and Drug Administration

FTCD: Formimidoiltransferaz siklodeaminaz

GVHD: Graft Versus Host Hastalığı

HDMTX: Yüksek Doz Metotreksat

HPLC: Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

LV: Lökoverin

Mg: Miligram

Ml: Mililitre

MTX: Metotreksat

MTXGlu: Metotreksat Poliglutamatları

Ng: Nanogram

RA: Romatoit Artrit

RNA: Ribo Nükleik Asit

RFC1: İndirgenmiş Folat Taşıyıcısı

TDM: Terapötik İlaç İzleme

THF: Tetrahidrofolat

TK: Timidin Kinaz

SCLC: Küçük Hücreli Akciğer Kanseri

STS: Yumuşak Doku Sarkomu

SLE: Sistemik Lupus Eritematozus

LC-MS/MS: Sıvı Kromatografi Kütle Spektrometre

ÖZET

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

METOTREKSAT DÜZEYLERİNİN SIVI KROMATOGRAFİ KÜTLE SPEKTROMETRİ YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

FİRDEVS SAK
TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ/KONYA-2019

Metotreksat, bir folik asit antagonisti olup, dihidrofolat redüktaz enzimini inhibe eder ve bunun sonucunda DNA ve RNA sentezini inhibe ederek antiproliferatif etki gösteren bir ajandır. Anti proliferatif özelliği sebebiyle yüksek dozlarda kanser tedavisinde kullanılır. Ayrıca antiinflamatuvar etkisinden dolayı romatoid artrit tedavisinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Yüksek doz Metotreksatın toksik etkilere sebep olduğu bilinmektedir. Kanser tedavisinde kullanılan metotreksat; nefrotoksisiteye yol açabilecek yan etkilere sahiptir. Nefrotoksisite glomerüler veya tübüler disfonksiyon, hipertansiyon ve renal endokrin fonksiyonda oluşabilecek bozukluklarla seyredebilir.Metotreksat tayini; dozajı optimize etmeye, toksisite riskini en aza indirmeye ve olası ilaç-ilaç etkileşimlerini araştırmaya yardımcı olmaktadır. Klinikte ilaç düzeyi ölçümünde hassasiyet çok önemli olduğu için kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesinin yüksek olması gerekmektedir. Bu çalışmada kullanmış olduğumuz yöntem Sıvı Kromatografi-Tandem Kütle Spektrometre (LC-MS/MS)' de yeni bir ölçüm metodu geliştirdik. Metot validasyon çalışmamızda Metotreksat için 2500-0,305 ng/ml aralığı lineer bulunarak linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (r2) değeri 1000-0,975 µg/l aralığında 0,998olarak hesaplanmıştır. LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenmiş olan dedeksiyon limiti 9 ng/ml, kantitasyon limiti 19 ng/ml 'dir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada serum Metotreksat tayini yapabilmede ortaya konulacak yeni yöntem için CLSI kuralları çerçevesinde metot validasyonu tamamlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Doz; LC-MS/MS; Metotreksat; Toksisite

SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY

SELÇUK UNIVERSITY HEALTH SCIENCES INSTITUTE

DETERMINATION OF METHOTREXATE LEVELS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY MASS SPECTROMETRY METHOD

FİRDEVS SAK

DEPARTMENT OF MEDICAL BIOCHEMISTRY

MASTER'S THESIS /KONYA-2019

Methotrexate is a folic acid antagonist that inhibits the enzyme dihydrofolate reductase and as a result inhibits DNA and RNA synthesis and exhibits an antiproliferative effect. Due to its anti-proliferative properties, it is used in cancer treatment in high doses. It is also widely used in the treatment of rheumatoid arthritis due to its antiinflammatory effect. High-dose methotrexate is known to cause toxic effects. Methotrexate used in cancer treatment; has side effects that may lead to nephrotoxicity. Nephrotoxicity may present with glomerular or tubular dysfunction, hypertension and impairments in renal endocrine function. Determination of methotrexate; it can help optimize dosage, minimize the risk of toxicity, and investigate potential drug-drug interactions. Since sensitivity is very important in drug level measurement in the clinic, the specificity and sensitivity of the method we use should be high. In this study, we developed a new measurement method in Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometer (LC-MS/MS) In our method validation study, 2500-0,305 ng / ml range was found linear by linear linear graph for Methotrexate and correlation coefficient (r2) value was calculated as 0,998 in the range of 1000-0,975 µg / l. Detection limit determined according to the signal to noise ratio in LC-MS / MS is 9 ng / ml and the quantitation limit is 19 ng / ml. In the study we have conducted, method validation has been completed within the framework of CLSI rules for the new method to be introduced in determining serum methotrexate.

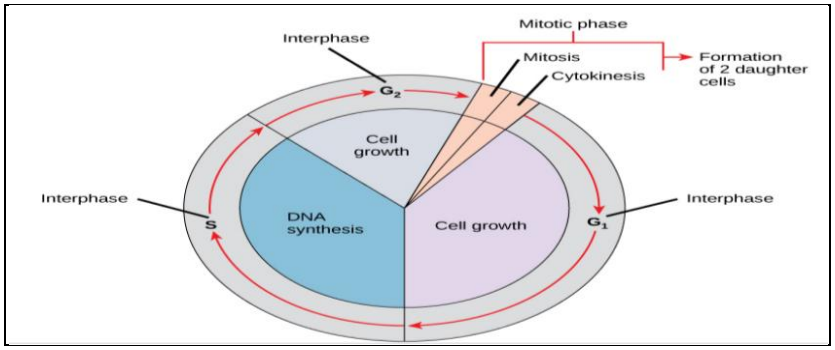
Key Words: Dose; LC-MS/MS; Methotrexate; Toxicity

GİRİŞ

1. ANTİKANSER İLAÇLARIN SINIFLANDIRILMASI VE TEMEL PRENSİPLER

Antikanser ilaçlar; kökenlerine, etki mekanizmalarına, kimyasal yapılarına, hücre döngüsü ve hedefteki potansiyel etkilerine göre sınıflandırılmaktadır. Birçoğu, birden fazla hedefte etki göstermektedir. Kanser ilaçlarının ortak özelliklerinden biri; hücre bölünmesi ve çoğalmasının inhibisyonudur. Bu özellikten yola çıkılarak kanser ilaçları iki sınıfa ayrılmaktadır: hücre döngüsüne spesifik olarak etkili olan ve hücre döngüsüne spesifik olarak etkili olmayan.

Hücre döngüsü temelde dört döneme ayrılmıştır; DNA sentezine hazırlanma dönemi (G1), DNA sentezi olan dönem, mitoza hazırlanma dönemi (G2) ve hücre bölünmesi görülen mitoz dönemidir (Şekil 1). Bu dönemlerde etkili olan bitki alkaloidlerinin S fazında etkili olduğu görülürken, antimetabolitler gibi bazı ilaç gruplarının ise birden fazla dönemde etkili olduğu görülmüştür.(ONAT 2006)



Şekil 2: *Hücre Döngüsü**(Stax)***

1. 1.Antimetabolitler

Antimetabolitlerin yapısı bir hücrenin canlı olması ve bölünmesi için gereken ve doğuştan var olan bileşiklere benzemektedir. Antitümör ajan sınıfındaki önemli hücresel enzimler için subsrat görevi görmesi bu yapısal benzerlik sayesinde olur. En önemli antimetabolitlerin tümör hücrelerine karşı etkin olması, DNA sentezinde olması gereken pürin veya pirimidinin nükleotid sentez yollarının inhibisyonuna dayandığı bilinmektedir. Bu sebeple antimetabolitlerin en etkili olduğu yerler yüksek büyüme fraksiyonuna sahip olan tümörlerdir. Yüksek oranda DNA sentezine uğrayan dokularda, gastrointestinal sistem dokuları ve kemik iliği dokuları, S fazındaki hücrelerin antimetabolitlere karşı hassasiyetinden dolayı toksisite yaygın olarak

görülür. Birçok antimetabolitin bir dizi enzimatik aşamadan geçerek aktif bileşiğe dönüştürülmesi gerekir. Antimetabolitler DNA'nın replikasyonunu ve onarımını iki şekilde inhibe eder. Bunlar; DNA replikasyonunde görevli enzimlerin doğrudan inhibisyonu ile ve antimetabolit veya antimetabolitten elde edilen bir bileşiğin doğrudan DNA'ya dahil edilmesi şeklindedir. Antimetabolitler şu şekilde sınıflandırılabilir:

- ✓ Folat antagonistleri: Metotreksat
- ✓ Pürin antagonistleri: 6-merkaptopürin, fludarabin
- ✓ Pirimidin antagonistleri: 5-fluorourasil (5-FU), kapekitabin, sitarabin, gemsitabin(RAJESH THIRUMARAN 2007)

2.FOLAT ANTAGONİSTLERİ

2.1.Metotreksat

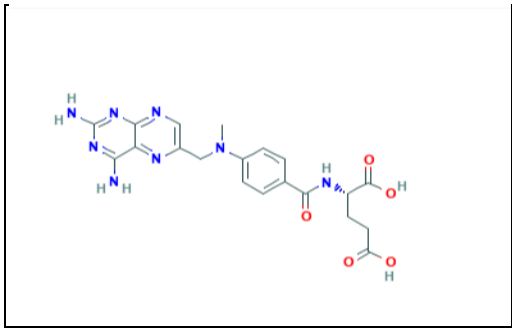
2. 1. 1. Metotreksat'ın Tarihi

1940'larda rasyonel ilaç tasarımı, dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe etmeye yarayan ve bir antifolat ajanı olan Metotreksat'ın (MTX) gelişmesine yol açtı. Metotreksat; başlangıçta lösemi tedavisinde yüksek doz kullanılarak (genellikle 1.000 mg'a kadar tek bir doz olarak) uygulandı, fakat daha sonra enflamatuar artritleri olan hastalar için daha düşük dozlarda (haftada 15–25 mg)kullanımının da etkili olduğu görüldü. Metotreksatın romotoit artrit(RA) tedavisi için kayıtlara geçirilen ilk kullanımı 1951tarihinde idi, fakat yaygın kullanımı; 1980'lerde bu endikasyon sebebiyle lisans almasının ardından gerçekleşmiştir (Brown ve ark 2016). 7 Aralık 1953'te ise FDA onayı almıştır (Drugbank). 1970'li yıllarda, plazmadaki MTX konsantrasyonlarının rutin hale getirilip; izlenmesinden ve farmakokinetik olarak Lökovorin (LV)'nin ayarlanmasından önce, HDTMX infüzyonları ile ilişkili ölüm oranı %4,6 ile %6 oranları arasında değişiyordu (drugbank , Chan ve Cronstein 2013). Günümüzde ise bu hastalıklara ek olarak, düşük doz MTX; jüvenil dermatomiyozit ve lupus gibi otoimmün hastalıkların tedavisi için birinci basamak tedavi olarak görülmektedir (Bulur ve ark 2015).

2. 1. 2. Metotreksatın Fizikokimyasal Özellikleri

Metotreksat'ın; kokusu olmayıp, sarı ila turuncu-kahverengi arası rengi olan kristal tozdur.

IUPAC adı (2 *S*) -2 - [[4 - [(2.4-diaminopteridin-6-il) metil-metilamino] benzoil] amino] pentandioik asit olan Metotreksat'ın molekül ağırlığı 454,4 g / mol ve pKa: 5.5 (Carl A.Burtis 2007)'dir (Şekil 2).



Şekil 2: *MTX'ın yapısal formulü (Pubchem)*

Erime noktası; 365 ila 399 ° F dır. Su , alkol, kloroform , eterde çözünmezken; seyreltik hidroklorik asitte az çözünür; alkali hidroksitlerin ve karbonatların seyreltilmiş solüsyonlarında ise çözünür (Pubchem).

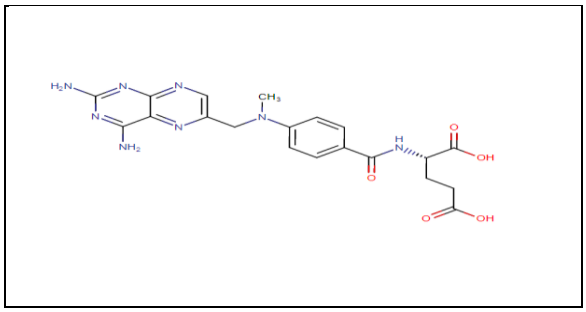
Ticari isimleri; Abitrexate (Teva) / Alltrex (Naprod) / Artrait (TRB) / Atrexel (Schering-Plough) / Bendatrexat (Bendalis) / Carditrex (Cadila) / Dermotrex (Doğu Batı) / Ebetrex (EBEWE) / Emtexate / Ledertrexate (Biodim) / Maxtrex (Pfizer) / Meisusheng (Hospira) / Mexate (Cadila HC) / Rheumatrex (Wyeth KK) / Trexan (Atafarm) / Zexate (Dabur Pharma) olarak geçer (pfizer).

2. 1. 3. Metotreksatın Farmakokinetiği

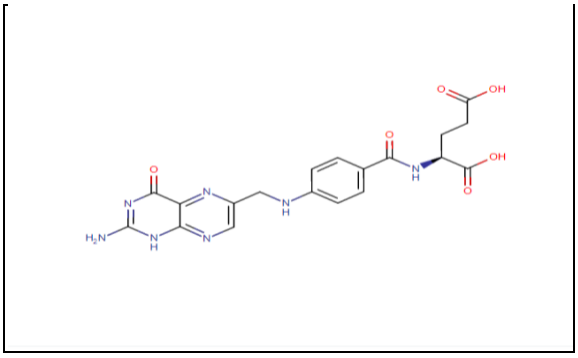
Metotreksat,% 64-90 biyoyararlanıma sahip bir ilaçtır. Düşük doz kullanımı haricinde oral yol ile kullanımı önerilmemektedir (Kayaalp 2002). Metotreksat kullanımı sırasında süt tüketimine ve kafein alımına dikkat edilmelidir. Oral olarak alındığı zaman, metotreksatın gastrointestinal sistem tarafından alınmasına, öncelikle doyurulabilir bir taşıyıcı, indirgenmiş folat taşıyıcısı 1 (RFC1) eşlik eder. RFC1 doygunluğa ulaştığı zaman, oral biyoyararlanım en yüksek doza ulaşır. Parenteral metotreksat uygulamasının, oral uygulamaya göre biyoyararlanımı daha yüksektir. Emilime uğradıktan sonra ise metotreksatın % 10'unun karaciğerde 7-hidroksimetotreksata dönüştüğü görülür. Metotreksat ve 7-hidroksimethotreksat, böbrekler tarafından atılır, ancak küçük bir kısım (% 8,7-26) da safra ile de atılabilir. Metotreksat, plazma proteinlerine % 46,5-54 bağlı olup, yüksek doku dağılımına sahip bir ilaçtır. Ekstravasküler havuzda birikir ve yalnızca diyaliz ile ilaç konsantrasyonunda kalıcı bir düşüşe yol açar (drugbank , Henghe Tian 2007). İn vitro çalışmalarda, plazma albümininden sülfonamidler, salisilatlar, tetrasiklinler, kloramfenikol ve fenitoin gibi çeşitli bileşiklerle etkileşime girebileceği görülmüştür. Metotreksat, hastaya oral veya parenteral olarak verildiği zaman kan-beyin bariyerini geçemez ve terapotik konsantrasyonlara ulaşamaz. İlacın yüksek BOS konsantrasyonlarına intratekal uygulama ile ulaşılabildiğine saptanmıştır (pfizer). Yetişkinlerde; düşük doz metotreksatın yarı ömrü 3-10 saat iken, yüksek doz metotreksatın yarı ömrü 8 ila 15 saat arasındadır. Akut lenfoblastik anemi tedavisi için Metotreksat kullanan pediyatrik hastalarda, 0,7 ila 5,8 saatlik bir terminal yarı ömrü yaşarlar. Juvenil idiyopatik artrit tedavisi için kullanılan pediatrik hastalarda ise, 0,9 ila 2,3 saatlik bir yarı ömre sahiptir ve Metotreksat serumda 24 saat boyunca

saptanamayabilir. Hücreler tarafından alındıktan sonra, bir kısım Metotreksat ve 7-hidroksimethotrexat poliglutamat türevlerine metabolize edilir. Metotreksat poliglutamatları (MTXGlu), uzun süre boyunca karaciğer ve eritrositler de dahil olmak üzere dokularda depolanır. Eritrositlerdeki MTXGlu konsantrasyonu bize (kabaca) ilacın terapötik etkinliği hakkında bilgi verebilir (drugbank , Henghe Tian 2007).

2. 1. 4. Metotreksatın Etki Mekanizması

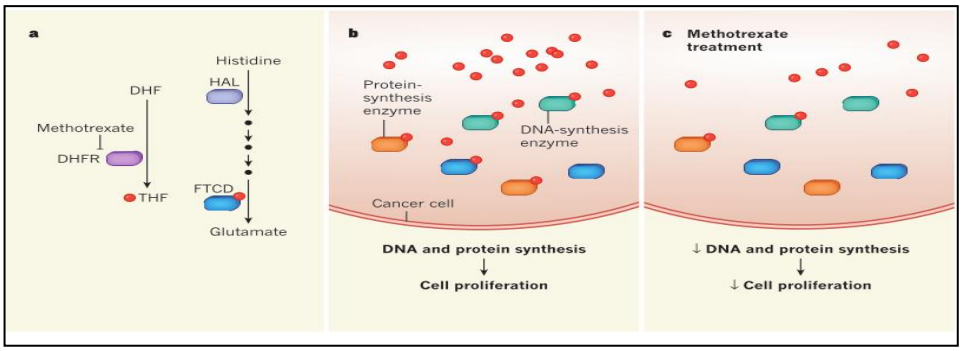


Şekil 3: *Metotreksat'ın yapısal formulü (drugbank)*



Şekil 4: *Folik asit'in yapısal formulü (Drugbank)*

Metotreksat (MTX, 2.4-diamin-N10-metilpteroil-glutamik asit) (Şekil 3), folik asit metabolizmasını engelleyen, antifolat,(folik asidin 4-amino-N10-metil analoğu (Şekil 4)) ve antimetabolit bir ilaçtır. Hücre içine girdikten sonra, Metotreksat poliglutamatlanır, ardından dihidrofolat redüktazı (DHFR) folattan 1000 kat daha büyük bir afinite ile bağlar ve dihidrofolatın tetrahidrofolat'a dönüşümünü (reversible şekilde) engellemiş olur. Tetrahidrofolat; DNA sentezi esnasında görevli olan timidin ve pürin biyosentezi için gereklidir (Brown ve ark 2016). Timidin ve pürin sentezinin gerçekleşmemesi sonucu ise DNA ve RNA'nın sentezini dolayısıyla da ATP üretimini inhibe etmiş olur (Kayaalp 2002). Tetrahidrofolat sentezinin bloklanmasıyla, hücreler bölünemez ve protein sentezi engellenir (Howard ve ark 2016).



Şekil 5: *Metotreksatın Etki Mekanizması*

Şekil 5'te görüldüğü üzere MTX'ın etki mekanizmasına bakacak olursak;

(a)Tetrahidrofolat (THF), hücre çoğalması için gerekli işlemleri katalizleyenler dahil, enzimlerin fonksiyonu için gerekli olan kofaktördür. Enzim dihidrofolat redüktaz (DHFR), dihidrofolattan (DHF) THF üretilmesiyle, bu katalitik reaksiyon, neoplastik ilaç olan Metotreksat tarafından inhibe edilmektedir.

(b)Kanser hücrelerinde, formimidoiltransferaz siklodeaminaz (FTCD) veya hücre çoğalması için ihtiyaç duyulanlar gibi THF'ye bağımlı enzimler için büyük bir THF havuzu bulunmaktadır.

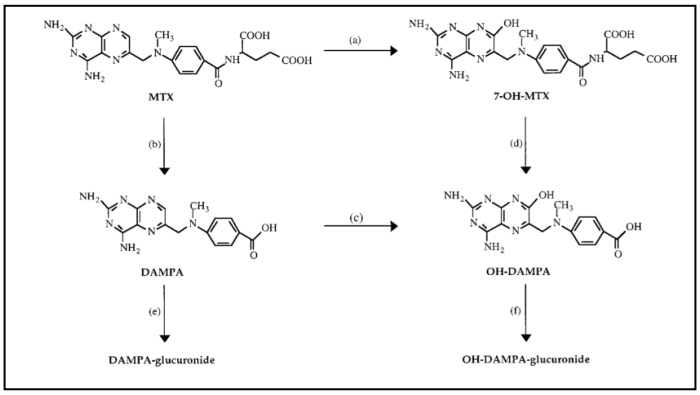
c)Metotreksat ile muamele edilmiş kanser hücrelerinde, THF seviyelerinde görülen bu düşüş, buradaki enzimlerin aktivitesini azaltarak, tümör büyümesini azaltır (Borges ve ark 2018).

2. 1. 5. Metotreksat ile İlişkili Hastalıklar

- ✓ Akut Lenfositik Lösemi (ALL)
- ✓ Akut Promyelositik Lösemi (APL)
- ✓ Mesane Kanserleri
- ✓ Santral Sinir Sistemi Lenfoması
- ✓ Koryokarsinom
- ✓ Meme Kanseri
- ✓ Crohn Hastalığı (CD)
- ✓ Dermatomiyozit
- ✓ Yaygın Skleroz
- ✓ Ekstrauterin Gebelik
- ✓ Graft Versus Host Hastalığı (GVHD)
- ✓ Baş ve Boyun Karsinomu

- ✓ Hydatidiform Mole
- ✓ Küçük Hücreli Akciğer Kanseri (SCLC)
- ✓ Üveit
- ✓ Meningeal lösemi
- ✓ Akciğerin Skuamöz Hücreli Karsinomu
- ✓ Refrakter Takayasu Arteriti
- ✓ Şiddetli Sedef
- ✓ Yumuşak Doku Sarkomu (STS)
- ✓ Osteojenik Sarkom
- ✓ Sistemik Lupus Eritematozus (SLE)
- ✓ Polimiyozit
- ✓ Gelişmiş Alibert-Bazin Sendromu
- ✓ İleri Hodgkin Dışı Lenfoma
- ✓ Lösemik Olmayan Meningeal Kanser
- ✓ Şiddetli, Aktif Romatoid Artrit
- ✓ Aktif Partiküler Jüvenil Romatoid Artrit(drugbank)

2. 1. 6. Metotreksat'ın Metabolitleri

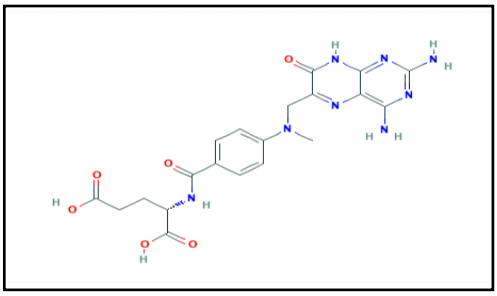


Şekil 6: *AO ve CPDG2 varlığında önerilen MTX metabolik yolakları*

Şekil 6'da görüldüğü üzere MTX, Aldehit oksidaz (AO) ile 7-OH-MTX'e dönüştürdükten sonra, Karboksipeptidaz G2 (CPDG2) ile DAMPA'ya hidrolize edilir. Hidroksi DAMPA (OH-DAMPA), DAMPA'nın AO ile oksidasyonu ve 7-hidroksi metotreksat (7-OH-MTX)'in PDG2 ile hidrolizinden kaynaklanmaktadır. Glukuronil transferazın (GT), DAMPA ve OH-DAMPA'yı glukuronize edilmiş ürünlere dönüştürdüğü görülür (Brigitte C. Widemann). MTX'ın bir kısmı 7-hidroksi metotreksata (7-OH-MTX) dönüştürülür ve geri kalan kısmı ise idrarla atılır. Yaygın

görülen yan etkiler arasında kemik iliği depresyonu ve mukoziti vardır, ancak böbrek tübüllerinde MTX ve 7-OH-MTX çökeltilerinin neden olduğu akut nefrotoksisite görülebilir (Bouquié ve ark 2014). Hastaların şiddetli böbrek fonksiyon bozukluğu olduğu nadir durumlarda, bir MTX kurtarma ajanı, glukarpidaz (karboksipeptidaz G2 veya CPG2), MTX'in 2,4-diamino-N10-metilpteroik asite, MTX'in aktif olmayan ve toksik olmayan bir metaboliti olan, DAMPA'ya hızlı sistemik dönüşümünü tetikleyen ek bir tedavi olarak uygulanabilir (Roberts ve ark 2016).

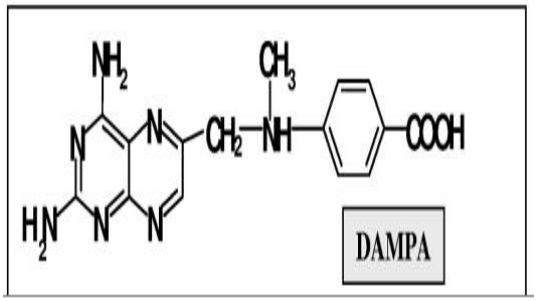
7-Hidroksi Metotreksat (7-OH-MTX)



Şekil 7: *7-hidroksi-metotreksatın (7-OH-MTX) kimyasal yapısı (PUBCHEM)*

7-OH-MTX'ın kimyasal yapısı Şekil 7 de görüldüğü gibidir. MTX'in hücre içi konsantrasyonunu düşürdüğü in vivo olarak kanıtlanmıştır.7-OH-MTX'in birikmiş konsantrasyonu, rekabet etmesi sebebinden dolayı MTX'in farmakokinetiğini de etkileyebildiği görülmüştür. Hücre zarları arasında taşınma ve 7-OH-MTX ile nefrotoksisite ve hepatotoksisite arasındaki ilişki de yapılan çalışmalarda gösterilmiştir (Ren ve ark 2019).

DAMPA (4-amino-4-deoksi-N (10) -metilpteroik asit)



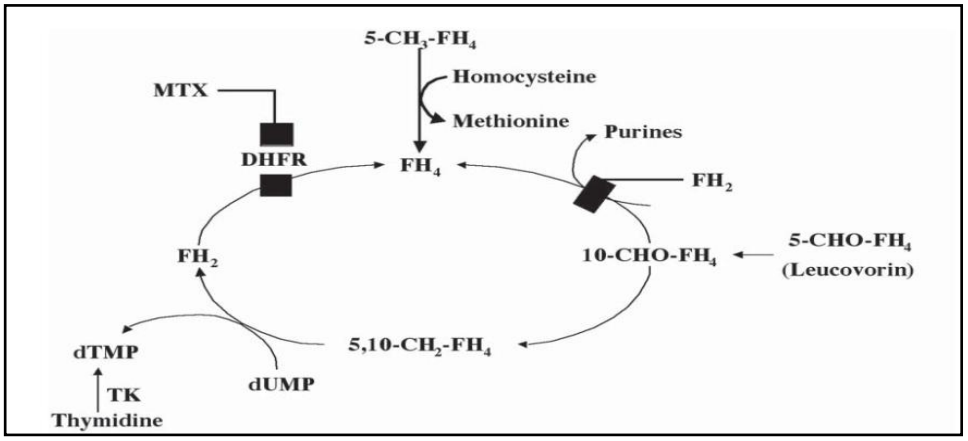
Şekil 8: *DAMPA kimyasal yapısı (Eunice Nduati 2005 September)*

DAMPA'nın kimyasal yapısı Şekil 8'de görüldüğü gibidir. MTX üzerindeki Karboksipeptidaz G2 (CPDG2) etkisinin katabolik ürünü olarak bilinen DAMPA'nın, çoğu MTX testlerinde MTX ile çapraz reaksiyona girdiği bilinmektedir (S Buchen 25

January 2005). DAMPA, idrar ile atılır ve ilacın toplam dozunun% 5'ini oluşturan küçük bir MTX metabolitidir. DAMPA safra yolu vasıtasıyla bağırsak sistemine salgılanır, bakteriyel karboksipeptidazlar tarafından hidrolize edilir ve daha sonra yeniden emilen MTX'ten oluşturulmuştur. MTX'in aktif olmayan bir metaboliti olduğu düşünülmesinin sebebi, MTX'ın hedef enzimi olan dihidrofolat redüktazın etkili bir inhibitörü olmamasıdır. DAMPA'nın çözünürlülüğü, MTX'ın (pH: 7.0: DAMPA 0.85 mg / ml, MTX 9.04mg / ml'de sulu çözünürlük) çözünürlüğüne göre yaklaşık 10 kat daha azdır (Brigitte C. Widemann).

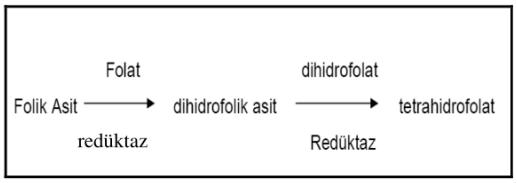
2. 1. 7. Metotreksatın Metabolizması

MTX, indirgenmiş folat taşıyıcısı aracılığıyla hücreye girer ve folipoliglutamat sentetaz tarafından katalizlenen poliglutamasyona uğrar. Poliglutamasyona uğradıktan sonra, MTX uzun bir süre hücrelerde tutulur. Metotreksat ve poliglutamatları, ilk olarak dihidrofolat redüktazın (DHFR) inhibisyonu yoluyla indirgenmiş olan tetrahidrofolat kofaktör hücrelerinin bitirilmesiyle de novo nükleotid sentezini bloke eder (Şekil 9).



Şekil9: *Metotreksatın (MTX) ve kurtarma ajanları olarak bilinen lökovorin ve timidinin etkili olan iyon bölgeleri yukarıdaki şekilde gösterilmiştir. MTX ilk olarak dihidrofolat redüktazı (DHFR) inhibe eder. Bu olay, deoksiridin monofosfattan (dUMP) deoksimidin monofosfat (dTMP) sentezinde gerekli olan ve pürin sentezini inhibe eden dihidrofolatların (FH2) birikiminde gerekli olan indirgenmiş folatların (FH4) tükenmesine sebep olur. MTX kurtarma ajanı lökovorin, aktif metabolit 5-metiltetrahidrofolat (5-CH3-FH4) 'a dönüşümünden sonra indirgenmiş folat havuzunu geri yükler. Timidin, timidin kinaz (TK) ile direk olarak timidin monofosfata dönüştürülür ve bunun sonucunda MTX; de novo yolunun blokajını çevreler (Brigitte C. Widemann 2006).*

2. 1. 8. Folik Asit Antagonisti Olarak Metotreksat'ın Mekanizması



Şekil 10: *Folik Asit Metabolizması*

İnsan vücudunda folik asit sentezlenemediği için diyetle folik asit alımı zorunludur. Dihidrofolat redüktaz DHF'ı folik asite bağlı olan yollarda temel bileşen olarak görev alan THF'ye dönüşümünü gerçekleştirir (Şekil 10). Metotreksatın folik asit antagonisti mekanizması olarak öne sürülmüş iki teori vardır. Bunlardan biri folik asitin azalması teorisidir. Yani; intraselüler folik asit azalmasının sebebinin DHFR'ın blokajına dayandığı söylenir. Bir diğeri ise yarışma teorisidir ki bu teori nükleotid sentezinde görevli olan basamakları MTX'ın doğrudan inhibe ettiğine ve bunun sonucunda DHF birikimine sebep olduğunu savunur (Bruce A. Chabner ve James C. Drake September 1985).

MTX, DHFR'ı inhibe ettiği için THF'ta azalma görülür. MTX poliglutamatlarının; 5,10 metilen THF redüktaz, glisinamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz ve aminoimidazol-karbokzamid-ribozil-5-fosfat formiltransferaz enzimlerini doğrudan inhibe etmesiyle pürin ve pirimidin metabolizmasında inhibisyona sebep olur. Bunun sonucunda ise DNA, RNA sentezi ve enerji üretiminde görevli olan ATP üretimi inhibisyonu olur. Dihidrofolatpoliglutamatlar ve MTX'ın poliglutamat türevleri THF'a dönüşemediğinden dolayı toksik inhibitör metabolitler halinde birikir. Timidilat sentaz ve pürin sentezinde görevli olan transformilaz enzimlerinin inhibisyonunu ise MTX'ın iki tane olan poliglutamat metaboliti tarafından yapıldığı bilinmektedir. Yüksek doz MTX'ın sebep olduğu hücrelerdeki toksik etkileri folinik asit (N5–formiltetrahidrofolat) tarafından antagonize edilir. Bu durumda folik asit THF'a dönüşemez ve antidotal etkinlik gösterememiş olur (YILMAZ 2008).

2. 1. 9. Metotreksatın Yan Etkileri

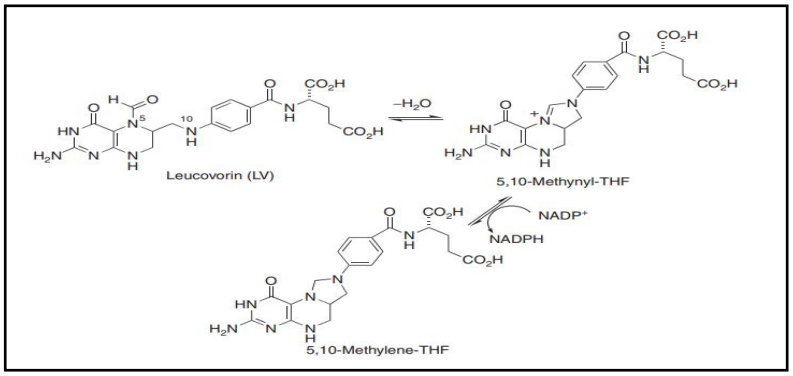
Tedaviye Lökoverin eklenmesi ile; stomatit, miyolesupresyon, bulantı, kusma, diyare ve alopesi görülen yan etkiler bir derece önlenebilir. Bunların yanı sıra

böbrek hasarı, karaciğer fonksiyon bozuklukları, pulmoner ve nörolojik toksisiteler de rastlanılan yan etkiler arasındadır (SÜZER 2005).

2. 1. 10. Metotreksat Toksisitesi

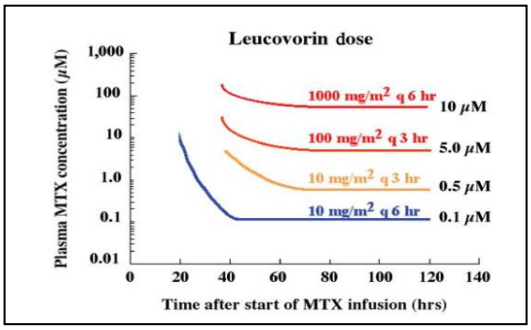
MTX'ın, doğal folat-homosistein döngüsüne müdahalesi ile beraberinde, DHFR(dihidrofolat redüktaz), TYMS(timidilat sentaz), 5,10-metilentetrahidrofolat redüktaz ve purin de novo sentezini içeren folat bağımlı enzimleri ve yolakları inhibe etmesi sonucu olarak ortaya çıkan folat eksikliği ile, DNA sentezinin inhibisyonu, homosistein ve adenosin konsantrasyonlarının artması ve potansiyel olarak yaşamı tehdit edici toksisitelerin ortaya çıkması kaçınılmazdır (Laura B. Ramsey 2017). Yüksek doz Metotreksat (HDMTX), 1-12 g/m2 arasındaki MTX dozu olarak tanımlanmaktadır (Bouquie ve ark 2016). HDMTX toksisitesini önlemenin temel taşları (alkalileştirme, idrar çıkışını sürdürme, serum kreatinin ve plazma MTX konsantrasyonlarını izleme ve farmakokinetik olarak yönlendirilmiş LV kurtarma) aynı zamanda, erken böbrek fonksiyon bozukluğu belirtileri geliştiren hastanın yönetiminin temel taşlarıdır (Chan ve Cronstein 2013). Böbrek yetmezliğinde; MTX'in karboksipeptidaz ile hidrolizi kullanılabilir. Bu uygulamada; 2.4-diamino-N10-metilpteroik asit (DAMPA) ve glutamik aside parçalanarak MTX'in% 95'inden fazlasını etkisiz hale getirilebilir (Bouquie ve ark 2016). Yüksek DAMPA konsantrasyonları renal tübüllerde çökelti oluşturarak daha fazla renal toksisiteye sebep olabilir. Bununla birlikte, CPDG2 ile MTX ile indüklenen nefrotoksisite için tedavi edilen hastalarda, DAMPA plazma konsantrasyonları, DAMPA için renal olmayan bir eliminasyon yolu düşündüren MTX konsantrasyonlarından daha hızlı azalmıştır (Brigitte C. Widemann). Bunun yanısıra MTX toksisitesi varlığında timidin kullanımı önerilir, ancak hızlı klirensinden dolayı sürekli infüzyonla yüksek dozlarda verilmelidir (S Buchen 25 January 2005).

3. LÖKOVERİN(LV) FOLİNİK ASİT (N5-FORMİL FH4)



Şekil 11: *Lökoverinin 5,10-Metilen-THF'ye biyotransformasyonu (Menendez 2008)*

LV (5-formiltetrahidrofolat), dihidrofolat redüktazın sentetik bir substratı şeklinde konak hücreye girer ve burada hücreyi Metototreksat inhibisyonundan kurtarır (Carl A.Burtis 2007). Hücreye indirgenmiş folat taşıyıcı aracılığıyla girdikten sonra aktif metaboliti olan 5-metiltetrahidrofolat (5-mTHF) 'ye dönüştürülür (Chan ve Cronstein 2013) (Şekil 11). Lökovorinin MTX toksisitesini azalttığı ve istemeden uygulanan metotreksat doz aşımı etkilerini önlediği belirtilmektedir (pfizer). Lökoverin verildiği zaman pirimidinlerin tetrahidrofolat bağımlı sentezi düzelir ve böylece tekrardan DNA sentezini başlatmış olur (Carl A.Burtis 2007). Fakat; serum MTX konsantrasyon seviyesi 10-100 mM'den daha yüksek olduğu zamanlarda, yüksek dozda LV'nin MTX'in toksisitesini tamamen tersine çevirme olasılığı görülmemektedir (S Buchen 25 January 2005). Lökovorin yönetimi mümkün olan en kısa sürede başlatılmalıdır. Metotreksat uygulanması ile lökovorinin başlanması gereken zaman aralığı arttırıldıkça, lökovorinin toksisiteye karşı olan etkinliği azalmış olur. Serum metotreksat konsantrasyonunun takip edilmesi, lökovorin ile optimal doz ve tedavi süresinin saptanmasında esas görev alır (pfizer). Şekil 12'de yüksek doz metotreksat (MTX) uygulamasından sonra farmakokinetik olarak yönlendirilmiş lökovorin için bir nomogram örneği verilmiştir.



Şekil 12: *Yüksek doz metotreksat (MTX) uygulamasından sonra farmakokinetik olarak yönlendirilmiş lökovorin için bir nomogram örneği (Chan ve Cronstein 2013)*

4. METOT VALİDASYONU

4. 1. Validasyon

Prosedürlerde yöntem doğrulaması olarak geçmektedir. Yani yöntemin performans özelliklerini ve sınırlamalarını belirleme işleminin yanı sıra bu özelliklerin değişimine sebep olacak etkileri belirleyerek ne ölçüde etkilendiğinin belirlenme işlemidir.(Administration 2014)

4. 2. Doğruluk

Ölçülen değerin gerçek değere yakınlığını bularak bir ölçümün doğruluğu tanımlanmış olur. Hassasiyeti yüksek olan bir yöntemde, bir örnek analiz edilir ve çıkan sonuç gerçek değer ile aynıdır.(Panchumarthy Ravisankar 2015)

4. 3. Analitik aralık (Linearite)

Bir yöntemin doğrusal olması, konsantrasyona karşılık olarak gelen kalibrasyon yanıtının düz bir çizgiye ne kadar yakın olduğunun ölçüsüdür. Doğrusallık, tekli ölçümlerin yapılmasıyla çeşitli analit konsantrasyonlarında değerlendirilir. Daha sonra elde edilen veriler doğrusal en küçük kareler regresyonu kullanılarak işlenir. Doğrusallık hakkında istenilen bilgileri; oluşan eğim, kesişme ve korelasyon katsayısı verir. (Panchumarthy Ravisankar 2015)

4. 4. Analitik Ölçüm Limitleri

4. 4. 1. Limit Of Dedection (LOD)

Analitin hassasiyet ve doğruluğunu (sapma) saptayabilmek amacıyla belirlenmiş seviyelerde nicelendirilebilen en düşük konsantrasyondur. (Jannetto 2017)

4. 4. 2. Limit Of Quantitation (LOQ)

Uygun doğrulukla ve hassasiyetle numunede tahmin edilen en düşük ilaç konsantrasyonudur. (Panchumarthy Ravisankar 2015)

4. 5. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik)

Yapılacak olan testin hassasiyetine dair bilgi elde edebilmek için aynı laboratuvar, operatör ve cihaz gibi benzer test koşullarında birkaç kez endojen analit içeren aynı numune setinin test edilmesini ele alır. (Zhang 2019)

4. 6. Geri Kazanım

Geri kazanım; Analitik işlemin ekstraksiyon etkinliği olarak tanımlanır. Metodun numune ekstraksiyonu ile beraber işlem aşamaları boyunca taşındığı bilinen analitin miktar yüzdesi olarak ifade edilir. (Vinod P. Shah ve ark 2000)

4. 7. İnterferans (Girişim)

Analitin dışında başka bir bileşiğin etkisi sebebiyle ölçülen analit konsantrasyonunda klinik olarak anlamli bias oluşumuna denir. (GHARAB 2018)

4. 8. Taşıma (Carryover)

Taşıyıcı, analitte bulunan izlerin bir sonraki kromotografik enjeksiyona iletildiği olgu olarak tanımlanmıştır. Yani, LC-MS / MS enjeksiyonunun analiti, sonraki enjeksiyonun elüsyon zamanında anormal bir şekilde bulunmasıdır. Genelde bazı kalıntıların sonraki enjeksiyona taşınmadan önceki enjeksiyon yolunda veya üzerinde adsorbe ettirilen otomatik şekilde numune alma bileşenlerinde meydan geldiği görülmüştür. (Louis-Philippe Morin 2012)

4. 9. Matriks Etkisi

Serum ya da plazmada bulunan bileşen ve moleküllerin, yapılması hedeflenen testlerdeki ilgili analizleri (tekrarlanabilirlik, doğrusallık ve doğruluk) tespit edememesi durumudur. (Achi lle Cappi ello 2010)

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Cihaz ve Malzemeler

5.1.1. Cihazlar

- ✓ Tandem MS (Absciex API 3200) (Singapur)
- ✓ HPLC { (Shimadzu UFLC; dgu-20 a3 (degasser), LC-20 ad (A pompası) LC20 ad (B pompası) ve sıl-20 AC HT (oto sampler) (Japonya)
- ✓ Vortex (Dragon lab, Almanya)
- ✓ Santrifüj (Beckman Coulter allegratm x-2212) (kazlauskaite ve ark)
- ✓ Evaporator (Teknosem teb 40-wel wt, Türkiye)
- ✓ Ultrasonik Banyo
- ✓ Ayarlanabilir otomatik pipetler (Brand, Almanya)

5.1.2. Kimyasallar

- ✓ HPLC kolonu (Phenomenex luna 5u c18, 50x4.6mm, part no: 00b-4041e0)
- ✓ Nitrojen tüpü (Habaş)
- ✓ Revatio 20 mg (Sildenafil sitrat tableti)
- ✓ HPLC grade su {chemsolute,(bach no: q2a085192a) almanya) }
- ✓ Formik asit (hcooh) (sigma aldrich, lot no: 81420)
- ✓ AsetoNitril (ACN) (Merk, Almanya)
- ✓ Hidroklorik Asit (HCL) (%37 saflıkta, MERK, Almanya)
- ✓ Metotreksat HPLC grade standart sigmadan alınmıştır. (Cas no:133073-73-1)
- ✓ Calcium Folinate (KOÇAK, 100 mg/10 ml IV/IM)

5.2. Metot ve Materyal

5.2.1. Metot Optimizasyonu

3.2.2. LC-MS/MS Parametreleri

Çalışmamızda kullandığımız LC-MS/MS parametreleri Çizelge 1'de verilmiştir.

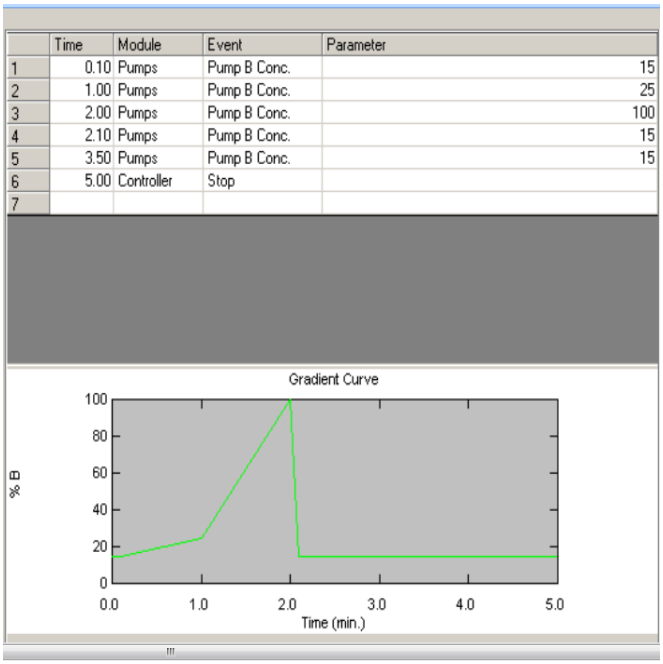
Çizelge 1: LC-MS/MS parametreleri

Declustering potential (dp)	40.000
Entrance potential	7.50
Collision energy (ce)	24.00
Collision cell exit potential (cxp)	4.00
Curtain gas (porter ve ark)	20
Collision gas (cad)	6
Ionspray voltage (ıs)	5500.00
Temperature (tem)	600ºc
Ion source gas1 (gs1)	40.000
Ion source gas2 (gs2)	60.000
Interface heater	ON
Ionisation mode	Elektro sprey iyonizasyon
Ionisation source	Turbo sprey
Collision gas	N2
Dwell time	500.00
Pompa modu	Binary Flow
Total akış	0.8000 mL/min
Enjeksiyon volume	40.00 ul
Analiz süresi	5 dk
Kolon	HPLC kolonu (Phenomenex luna 5u c18, 50x4.6mm)
Mobil faz A	% 0,1'lik formik asit içeren HPLC grade su
Mobil faz B	% 0,1'lik formik asit içeren metanol

Metotreksat standartı %100 metanolde çözdürüldü. Q1 ve Q3 iyonlarının tayini için Absciex API 3200 tandem mass spektrometri cihazındaki autotune algoritması kullanılmıştır. En yüksek intensiteye sahip Q1 ve Q3 iyonları Metotreksat için 475,200 ve 308,300 olarak belirlenmiştir. İnternal standart (Sildenafil) için ise en yüksek intensiteye sahip iyonlar (Q1 ve Q3) 475,200 ve 58,00 olarak belirlenmiştir. Piklerin çıkış süresi ise 2,25 dk'dır.

5.2.3. Akış Gradienti

Çalışmada kullanılan akış gradienti şekil 13'de verilmiştir.

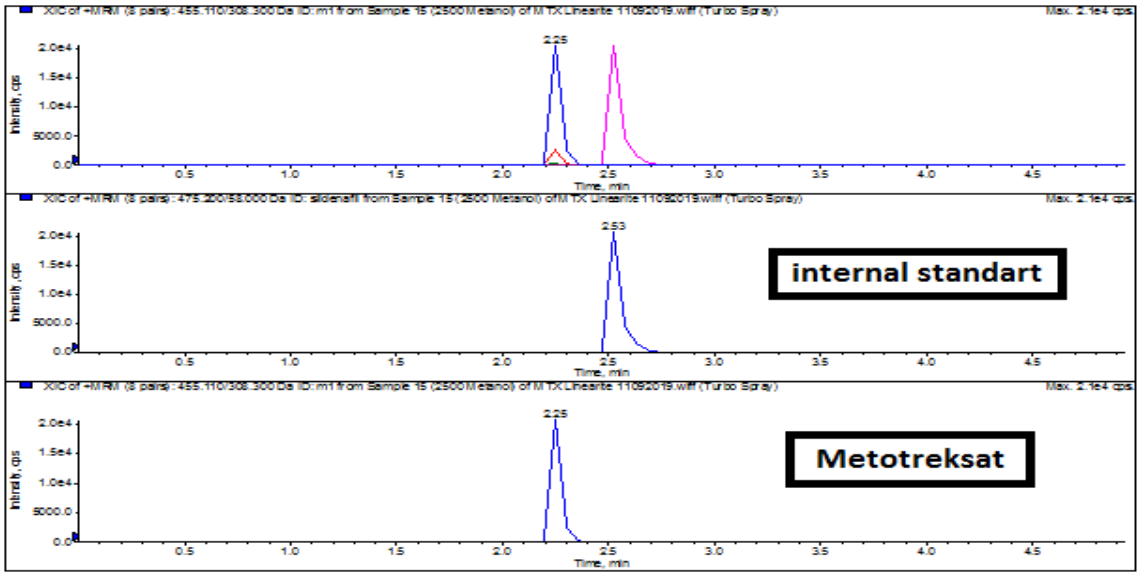


	Time	Module	Event	Parameter
1	0.10	Pumps	Pump B Conc.	15
2	1.00	Pumps	Pump B Conc.	25
3	2.00	Pumps	Pump B Conc.	100
4	2.10	Pumps	Pump B Conc.	15
5	3.50	Pumps	Pump B Conc.	15
6	5.00	Controller	Stop	
7				

Şekil 13: Akış Gradienti

5.2.4. LC-MS/MS Pikler

Çalışmada elde edilen Metotreksat- internal standartlarına ait LC-MS/MS pikleri Şekil 14'de gösterilmiştir.



Şekil 14: Metotreksat ve İnternal Standart Pikleri

5.2.5. Çalışma Prosedürü

250 µl örnek ya da standart alınıp üzerine 60 µl pH'ı 3 olan HCL eklendi. 100 µl internal standart (Sildenafil) eklenerek ardından 500 µl metanolde çöktürüldü. Vortexte 30 sn karıştırıldı ve 15 dk 13.000 rpm' de santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst fazdan 200 µl viallere enjekte edilip viallerin kapakları kapatıldı ve spora yerleştirilerek analiz gerçekleştirildi.

5.3. Ön İşlemlerde Kullanılan Çözeltilerin Hazırlanması

5. 3.1. Standartların Hazırlanması

Çalışmada kullanılan Metotreksat HPLC grade standart sigmadan alınmıştır.
Cas no:133073-73-1
Metotreksat için hazırlanan stoklar:
Stok 1: Tablet halindeki Metotreksat standartı 5000 ng/mL olacak şekilde %100 metanolde (500 ml) çözdürüldü.
Stok 2: Stok 1'den ½ seri dilüsyon yapılarak 2500 ng/ml'lik standart elde edildi.

3.3.2. İnternal Standart Hazırlama Prosedürü

Laboratuvarımızda bulunan sildenafil ana stoktan (40,000 ng/ml) 4 dilüsyon yapılarak 10,000 ng/ml'lik standart elde edildi.

5.4. Metod Validasyonu

5.4.1. Geri Kazanım

Geri elde (recovery) çalışması; Metotreksat için 25000, 3125 ve 390,6 ng/mL'lik, standartlar kullanılarak yapılmıştır. Bu çalışma esnasında şu şekilde ön işlem gerçekleştirilmiştir; her tüp volümü 1000 µl olacak şekilde hazırlandı.

1.tüpe 2500 ng/ml olan standarttan 100 µl alıp, üzerine 900 µl serum havuzundan eklendi. 2.tüpe 312,5 ng/ml olan standarttan 100 µl alıp, üzerine 900 µl serum havuzundan eklendi. 3.tüpe ise 39,06 ng/ml olan standarttan 100 µl alıp, 900 µl serum havuzundan eklendi.

5.4.2. Tekrarlanabilirlik

Tekrarlanabilirlik çalışması CLSI EP5-A protokolüne göre gerçekleştirilmiştir. Bu protokole göre;

- ✓ Matrix ile klinik hasta örnekleri birbirine uyumlu olmalıdır.
- ✓ En az 2 konsantrasyon önerilir.
- ✓ Seçilmiş olan konsantrasyonlar cihazın ölçüm aralığında olmalıdır.
- ✓ 2 konsantrasyondan fazla kullanım olursa; Seçilen değerler tıbbi karar konsantrasyonuna yakın değerler olmalıdır.
- ✓ Çalışma günü 20 gün olmalı ve hergün 2 çalışma yapılması önerilir.

Bu çalışmada serum havuzu ile Metotreksat için 2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml'lik çalışma içi ve gün içi çalışmalar arası 20 ölçüm çift çalışması gerçekleştirilmiştir. Günler arasında ise 5 ölçüm 4 gün çalışılarak kesinlik (tekrarlanabilirlik) çalışması gerçekleştirilmiştir.

5.4.3. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Linearite çalışmaları, metod validasyonu kapsamında gerçekleştirilmiş olup CLSI EP6-A protokolüne göre çalışılmıştır ve doğrusallığı istatistiksel olarak değerlendirmek için yapılan çalışmaları ele alır. Yapılan bu çalışma ile amacımız kalibrasyon grafiği çizmek ve analitik ölçüm aralığını belirlemektir. Bu protokole göre;

- ✓ En az 5 örnek çift olarak çalışılmalıdır.
- ✓ Çalışmanın amacını önerilen örnek ve tekrar sayısı değiştirebilir.
- ✓ Lineer aralığın belirlenmesi için örnekler 9 ila 11 düzey aralığında olmalı ve her örneğin 2 veya 4 tekrarlı çalışılması önerilir.(ilk çalışmada lineer aralığın beklenenden %20-30 daha geniş tutulması önerilir.)
- ✓ Laboratuar içi kurulan yöntemi ve modifiye yöntemi doğrulayabilmek amacıyla 7 ila 9 nokta ve her düzeyde 2 veya 3 tekrar çalışma yapılması önerilir.
- ✓ Son olarak, belirlenen lineer aralığın geçerliliğinin kanıtlanabilmesi için 5 ila 7 örnek ve her düzey için 2 tekrar çalışma önerilir.

Bu protokol doğrultusunda serum ile Metotreksat için 25000 ng/mL'den; 2500; 1250; 625; 312,5; 156.25; 78,125; 39,0625; 19,5; 9,76; 4,88; 2,44; 1,22; 0,6; 0,3 konsantrasyonlar oluşturulacak şekilde seri dilüsyon yapıldı.

5.4.4. Analitik Ölçüm Limitleri

Tüm limitler CLSI EP17 protokolüne göre belirlenmiştir (WESTGARD 2008).

Limit of Detection (LOD)

Kromatografik yöntemlerde bulunan alt limitlerin sinyal/gürültü oranlarına göre belirlenmesi esas alınmıştır. Sinyal/gürültü oranının 3 olarak belirlendiği konsantrasyon değeri dedeksiyon limiti olarak belirlenmiştir.

Limit of Quantitation (LOQ)

Kromatografik yöntemlerde bulunan alt limitlerin sinyal/gürültü oranlarına göre belirlenmesi esas alınmıştır. Sinyal/gürültü oranının 10 olarak belirlendiği konsantrasyon değeri kantitasyon limiti olarak belirlenmiştir.

5.4.5. İnterferans Çalışması

Klinik laboratuarlarda yapılan interferans çalışmaları kapsamında gerçekleştirmiş olduğumuz tüm interferans çalışmaları CLSI EP7-A protokolüne uygun bir şekilde gerçekleştirilmiştir.

Bu protokole uygun olarak Metotreksat için Lökoverin ile interferans çalışması gerçekleştirildi. Lökoverinden 2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml olucak şekilde konsantrasyonlar kullanıldı. Çalışmamızda; Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Biyokimya Laboratuarına rutin tahlil için gelen, işlemi tamamlanmış artakalan numunelerden oluşan hemolizli, lipemili, ikterikli serumlar alındı ve 2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml konsantrasyonlarda olucak şekilde serum havuzu oluşturuldu. İnterferan madde ekleyebilmek için Metotreksatın her düzeyi için dört tane tüp alındı. Yüksek düzeyli olan 1.tüpe 1000 µl interferan madde, 2.tüpe 750 µl interferan madde ve 250 µl saf serum eklendi. 3.tüpe 500 µl interferan maddeyle beraber 500 µl saf serum eklendi. 4.tüpe ise 250 µl interferan madde ve 750 µl saf serum eklendi ve sırasıyla her birine 1000 µl yüksek düzey serum havuzundan eklendi. Daha sonra düşük düzey konsantrasyon için de aynı işlem tekrarlandı. Böylece her iki düzey için (2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml) %100, %75, %50 ve %25'lik konsantrasyonlardaki interferan madde bulunduran tüpler elde edilmiş oldu.

Hazırlanan numuneler cihaza enjekte edildikten sonra ard arda 3 defa okutuldu ve 1.tekrarda interferan konsantrasyonu azalan sırada gerçekleştirilirken, 2.tekrar interferan konsantrasyonu ise artan sırada gerçekleştirilmiştir. 3.tekrar interferan konsantrasyonu ise azalan sırada olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu işlem, tüm konsantrasyonlarda ve interferan maddelerde aynı şekilde tekrarlanmıştır.

5.4.6. Numune Stabilite Çalışması

Numune stabilitesini saptayabilmek için 3 farklı düzeydeki numune aynı gün içerisinde standart ön işlemden geçirilerek çalışıldı. 15, 30 ve 45. Günlerde çalışabilmek adına 250 µl alınarak ependorfa koyup, donduruldu. Her çalışma günü geldiği zaman numuneler standart ön işlemden geçirilerek analizi gerçekleştirildi.

5.4.7. Matriks Etkisi

Metotreksat için matriks etkisi çalışması Chambers ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışma protokolüne uygun olarak gerçekleştirildi. Çalışmamızdaki sonuçları ise bu protokoldeki % matriks etkisi hesaplamasına uygun olarak hesaplandı. Metotreksat için; 2500 ng/ml, 312,5 ng/ml ve 39,06 ng/ml konsantrasyonlar kullanılarak gerçekleştirildi. Serum havuzundan Metotreksat için hazırlanan 3 tüp, numune hazırlama protokolune uygun bir şekilde ön işlemden geçirildi. Ön işlemden geçirilmiş olan 3 tüpe 250 µl ilaç içermeyen serum eklendi. Daha sonra ön işlemlerden geçirilerek azot gazı altında kurutuldu ve 100 µl %50'lik ACN ile çözdürüldü. Son olarak sırasıyla 100 µl 2500, 312,5, 39,06 ng/ml olan Metotreksat standartının eklenmesiyle vortexte karıştırıldı ve viale 100 µl alındı. Cihaza enjekte edilip analizi yapıldı. Ön işlemden geçirilen ve ön işleme uğramayan aynı konsantrasyondaki standartların pik alanları kullanılarak matriks etkisi hesaplaması yapıldı.

5.4.8. Dondurma ve Çözdürme Etkisinin Belirlenmesi

Bu çalışmanın amacı; dondurup ardından çözme işlemlerinin Metotreksat ölçümüne etkisini belirlemektir. Düşük ve yüksek olmak üzere farklı konsantrasyonlarda serum havuzu oluşturuldu ve 4 defa dondurup çözdürme işlemi gerçekleştirilir. Çözülmeye uğramış numuneler ön işlem basamaklarından geçirilerek analizi yapılır ve ölçüm sonuçları kaydedilir.

5.4.9. İstatiksel Analiz

İstatistiksel analiz; EP Evaluator Release 8.0.0.171 Versiyon ve Excel (2007) programları kulanılarak gerçekleştirildi. Uygulanmış olan tüm yöntemlerde numuneler çift çalışılarak ortalamaları alınmıştır. Yöntem karşılaştırmalarında ise LC-MS/MS verilerinin regresyon analizleri gerçekleştirildi.

5.4.10. Taşıma (Carryover) Çalışması

Bu çalışmanın amacı otomatik şekilde çalışılan sistemlerde bir önceki numuneden bir sonraki numuneye herhangi bir aktarım olup olmadığını ve eğer oluyorsa bunun kabul edilebilirliğini göstermektir. Taşıma (Carryover) çalışmasında, cihaza enjekte edilecek yüksek ve düşük konsantrasyondaki numuneler belirli bir sıraya göre yerleştirilerek okutulur. Sıra şu şekilde olmalıdır:

D1-D2-D3-Y1-Y2-D4-Y3-Y4-D5-D6-D7-D8-Y5-Y6-D9-Y7-Y8-D10-Y9Y10-D11

Grup 1: D2-D3-D6-D7-D8

Grup 2: D4-D5-D9-D10-D11

Görüldüğü üzere Grup1'in düşük konsantrasyonlu numunelerden sonra gelen düşük numunelerden oluşurken, Grup 2 ise yüksek konsantrasyonlu numunelerden sonra gelen düşük numunelerdir. Grupların ortalamaları ve standart sapmaları hesaplandıktan sonra grup ortalamaları arasındaki farkın total izin verilen hatadan daha küçük olması halinde taşıma hatasının olmadığı söylenir.

Taşıma çalışmasında Metotreksat için kullanılan konsantrasyonlar;

Düşük konsantrasyon: 39,06 ng/mL

Yüksek konsantrasyon: 2500 ng/mL'dir.

Metotreksat için yukarıda bulunan konsantrasyonlar kullanılarak taşıma (carryover) çalışması için gerekli tüpler standart ön işlemlerden geçirilip, yukarıdaki sıraya göre cihaza enjekte edildi ve analizi yapıldı.

6.BULGULAR

6.1. Linearite (Doğrusallık) Çalışması

Metotreksat için linearite sonuçları Çizelge 2'de gösterilmektedir.

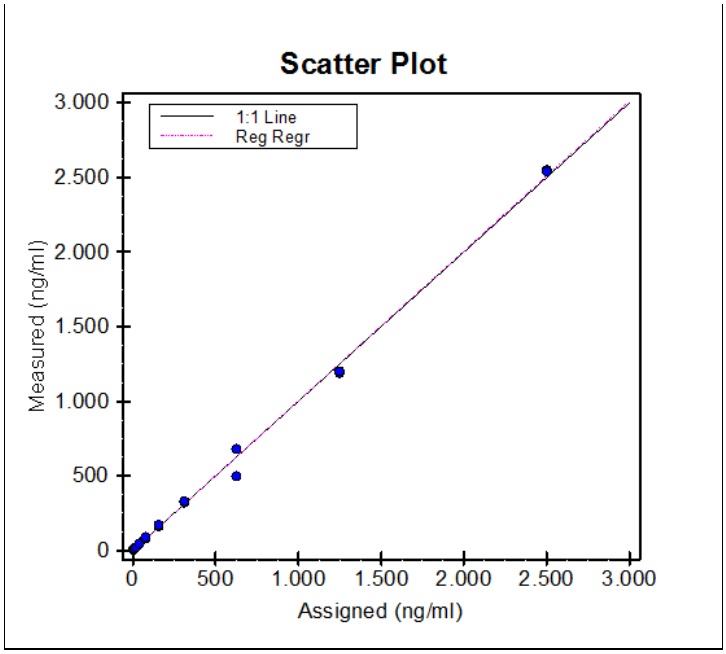
Çizelge 2: Metotreksat linearite verileri.

Dilüsyon No	Metotreksat (ng/mL)	Metotreksat 1. ölçüm (ng/mL)	Metotreksat 2. ölçüm (ng/mL)	Metotreksat 1.ve 2.ölçüm ortalaması	Uygunluk %	
	2500	2550	2540	2545	101,8	
	1250	1190	1200	1195	95,6	
	625	498	680	589	94,24	
	312,5	320	330	325	104	
	156,25	160	170,7	165,35	105,824	
	78,125	80,8	87,8	84,3	107,904	
	39,06	46,9	45,6	46,25	118,40	
	19,53	21,2	21,3	21,25	108,8	
	9,76	11,8	10,9	11,35	116,290	
	4,88	5,3	4,58	4,94	101,22	
	2,44	2,45	3,42	2,93	139	
	1,22	1	1,5	1,25	102,45	
	0,61	0,7	0,6	0,65	106,55	
	0,305	0,3	0,4	0,35	114,75	

Çizelge 2'de Metotreksatın serum ile 2500 ng/ml'den başlayıp 0,305 ng/mL'ye kadar seri dilüsyon ile inilen ölçümler ve ortalamaları görülmektedir. Her birkonsantrasyon çift ölçülerek, ortalamaları alınmıştır. Ölçülen değer beklenen değere bölünüp 100 ile çarpılarak % uygunluğu tespit edilmiştir.

Metotreksatın linearite grafiği ve sonuçların dağılımı Grafik 1'de gösterilmektedir.

Grafik 1: Metotreksatın linearite grafiği ve sonuçların dağılımı

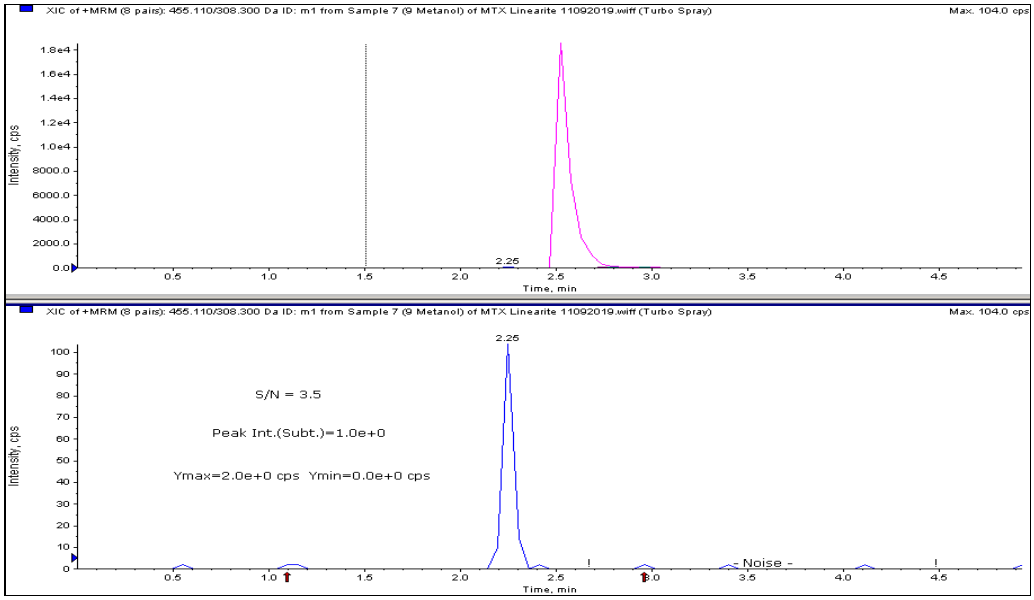


r^2 =0.998 olarak bulundu.

6.2. Analitik Ölçüm Limitleri

6.2. 1. Limit of Detection

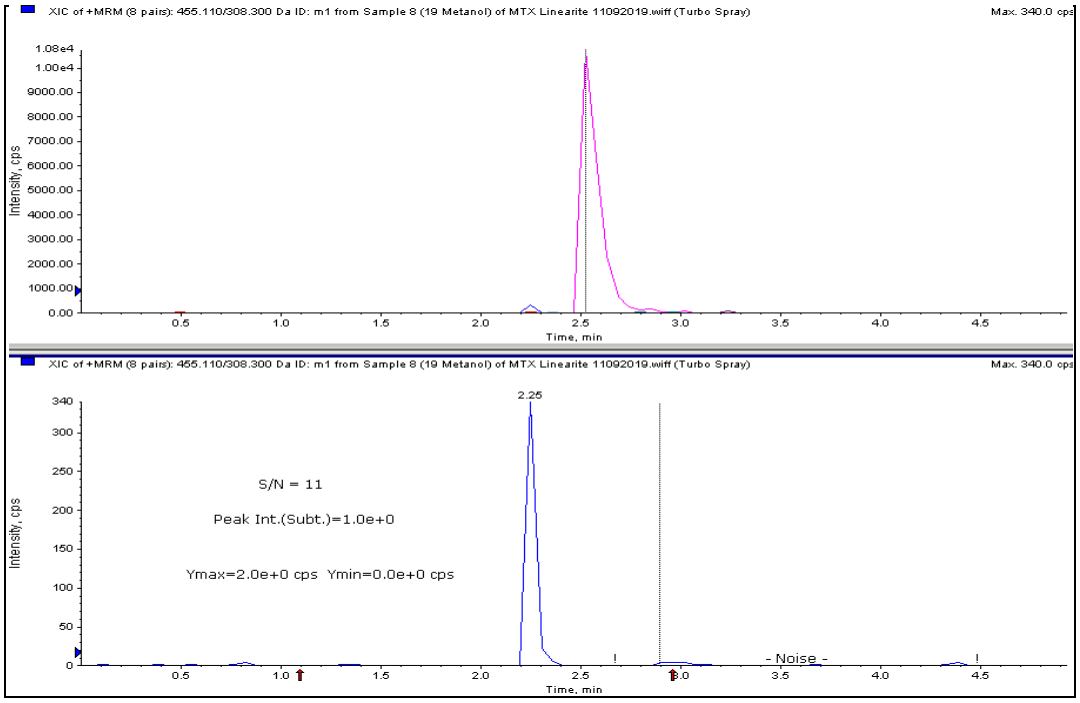
Metotreksat için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOD grafik 2'de gösterilmiştir.



Grafik 2: Metotreksat için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplanan LOD 9 ng/ml olarak tespit edilmiştir.

6.2.3. Limit of Quantitation

Metotreksat için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplayan LOQ grafik 3'de gösterilmiştir.



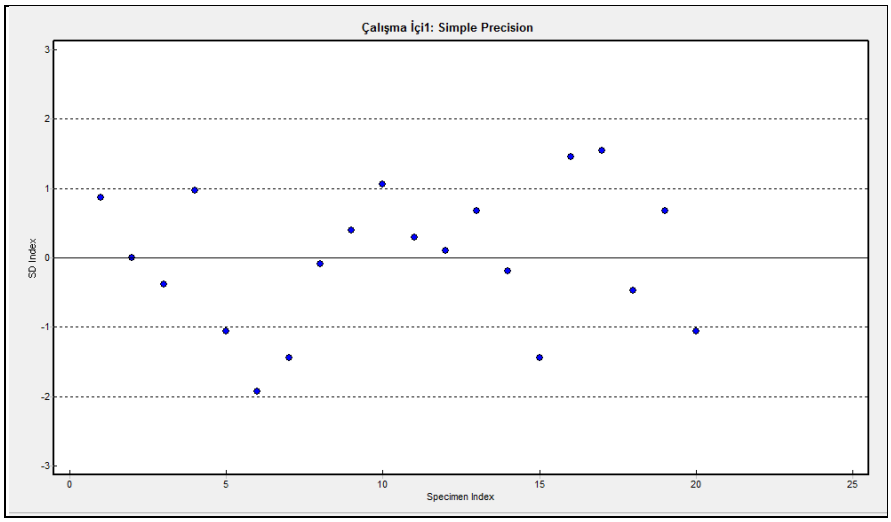
Grafik 3: Metotreksat için LC-MS/MS'te sinyal gürültü oranına göre hesaplanan LOQ 19 ng/ml olarak tespit edilmiştir.

6.3. Tekrarlanabilirlik (Kesinlik) Çalışması

6.3.1. Metotreksat Çalışma İçi Çalışması

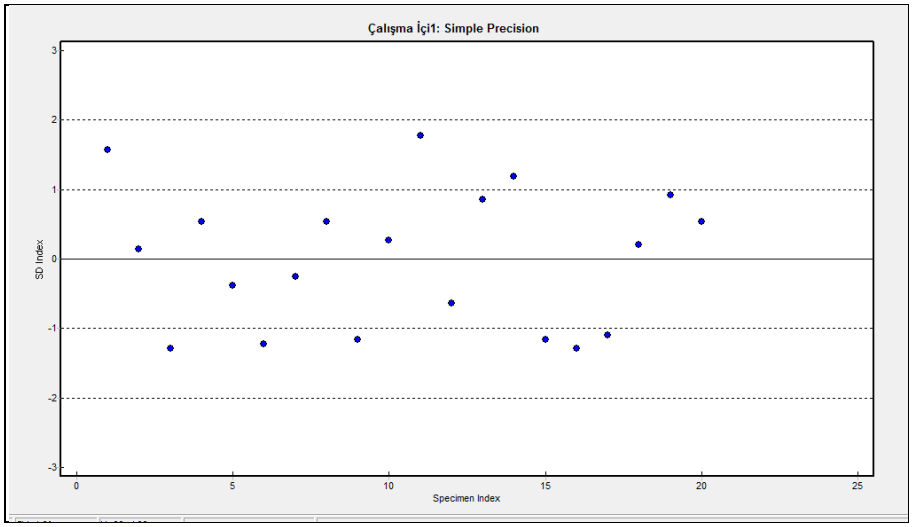
Metotreksat için 2500 ve 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonlar aynı çalışma içinde ardışık olarak 20 defa okutulmuştur.

2500 ng/ml'lik numunenin SD aralığındaki dağılımı grafik 4'de gösterilmektedir.



Grafik 4: 2500 ng/ml Metotreksat çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

39,06 ng/ml'lik Metotreksat konsantrasyonun çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışma sonuçları Çizelge 2'de gösterilmektedir. Aynı numunenin SD aralığındaki dağılımı grafik 5'de gösterilmektedir.



Grafik 5: 39,06 ng/ml Metotreksat çalışma içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı

2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml Metotreksat konsantrasyonlarının çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 3'de verilmektedir.

Çizelge 3: Metotreksat çalışma içi tekrarlanabilirlik sonuçları

Konsantrasyon	Ortalama	SD	%CV
2500 ng/ml	2309,5	103,7	4,5
39,06 ng/ml	33,37	1,53	4,6

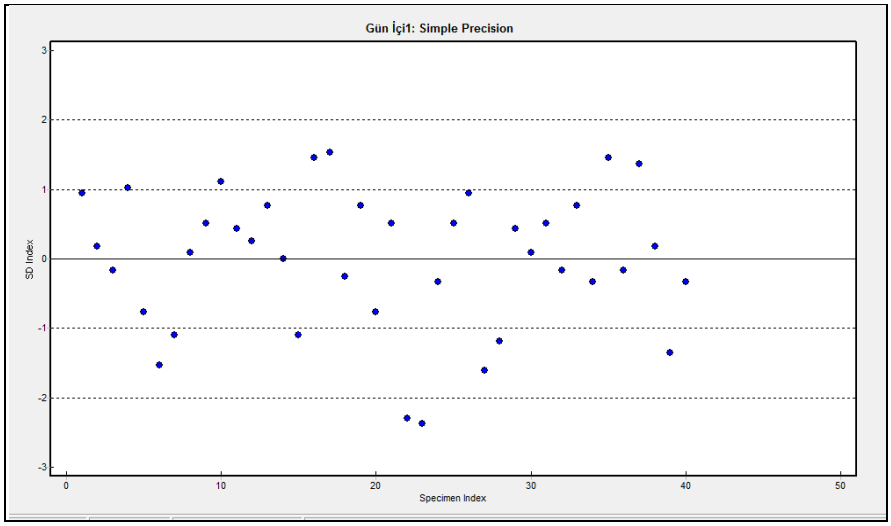
Çalışma içi kesinlik çalışmasında 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 103,7, % CV 4.5, 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD: 1,53, % CV:4,6'dır.

Wesgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre Metotreksat için izin verilen total hata % 25 olarak belirtilmiştir. 2500 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 2500 × 0.25 = 625 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 625 ÷ 4 = 156,25'dir. 103,7<156.25 olduğu için, 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda çalışma içi kesinlik kabul edilebilir düzeyde olduğu görülmektedir.

39,06 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 39,06×0,25=9,765 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 9,765 ÷ 4 = 2.44'dür. 1,53<2,44 olduğu için 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda çalışmalar içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

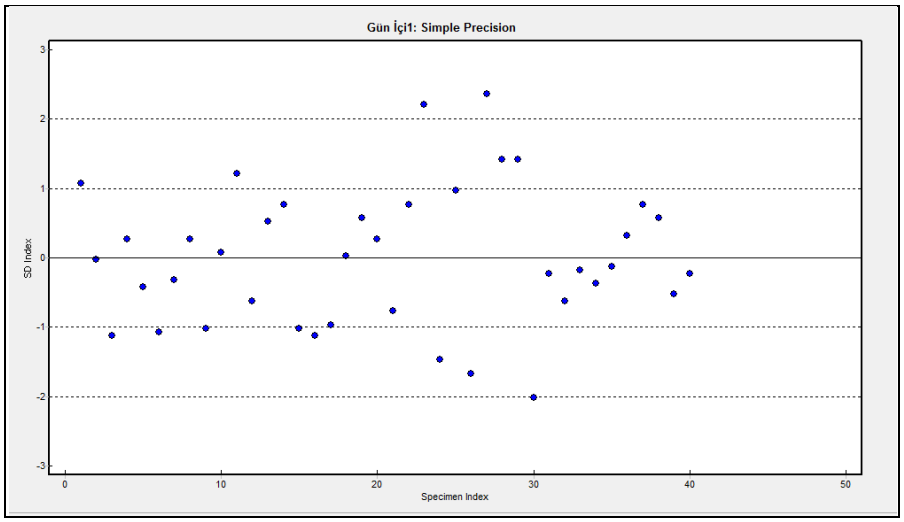
6.3.2. Metotreksat Gün İçi Çalışma Arası Çalışması

Metotreksat için 2500 ve 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonlar sabah ve akşam olmak üzere aynı çalışma içinde ardışık 20'şer defa okutulmuştur. 2500 ng/ml'lik Metotreksat konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik SD aralığındaki dağılımı grafik 6'da gösterilmektedir.



Grafik 6: 2500 ng/ml Metotreksat gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

39,06 ng/ml Metotreksat konsantrasyonun gün içi tekrarlanabilirlik SD aralığındaki dağılımı grafik 7'de gösterilmektedir.



Grafik 7: 39,06 ng/ml Metotreksat gün içi tekrarlanabilirlik SD dağılımı.

2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml Metotreksat konsantrasyonlarının gün içi çalışma arası tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 4'de verilmektedir.

Çizelge 4: Metotreksat gün içi tekrarlanabilirlik sonuçları.

Konstrasyon	Ortalama	SD	%CV
2500 ng/ml	2289,50	117,5	5,1
39,06 ng/ml	33,65	2,01	6,0

Gün içi kesinlik çalışmasında 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 117,5, % CV 5,1, 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD: 2,01, % CV: 6.0'dır.

Westgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre Metotreksat için izin verilen total hata % 25 olarak belirtilmiştir. 2500 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 2500 × 0,25 = 625 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 625 ÷ 4 = 156,25'dir. 117.5<156,25 olduğu için, 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda gün içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

39,06 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 39,06×0,25=9,765 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 9,765 ÷ 4 = 2,44'dür. 2.01<2,44 olduğu için 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda gün içi kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

6.3.3. Metotreksat için Günler Arası Çalışması

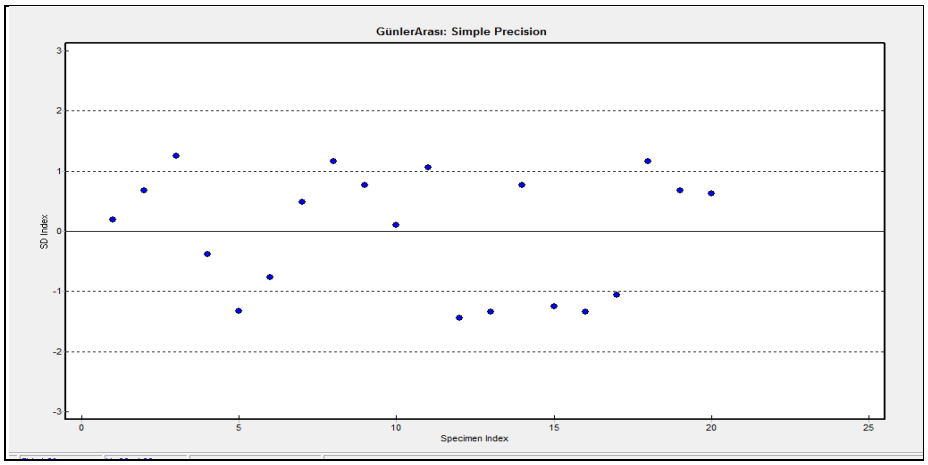
Metotreksat için 2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonlar 4 gün boyunca günde 5 farklı numune birer kez okutularak günler arası tekrarlanabilirlik çalışması gerçekleştirilmiştir.

2500 ng/ml'lik Metotreksat konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaSD aralığındaki dağılımı grafik 8'de gösterilmektedir.

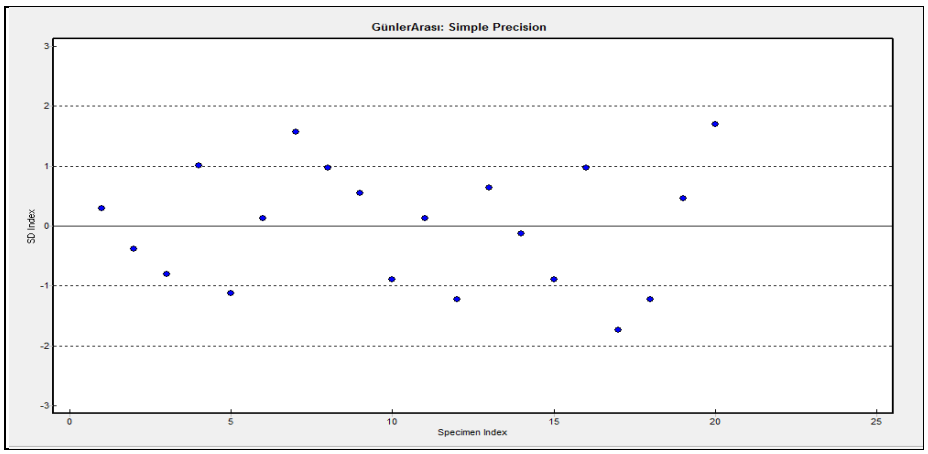
39,06 ng/ml'lik Metotreksat konsantrasyonun günler arası tekrarlanabilirlik çalışma SD aralığındaki dağılımı grafik 9'da gösterilmektedir.

2500 ng/ml ve 39,06 ng/ml'lik Metotreksat konsantrasyonlarının günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları Çizelge 5'de verilmektedir.

Grafik 8: 2500 ng/ml'lik Metotreksat günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.



Grafik 9: 39,06 ng/ml'lik Metotreksat günler arası tekrarlanabilirlik SD dağılımı.



Çizelge 5: Metotreksat günler arası tekrarlanabilirlik sonuçları

Konstrasyon	Ortalama	SD	%CV
2500 ng/ml	2279,85	104,0	4,6
39,06 ng/ml	34,65	1,180	3,4

Günler arası kesinlik çalışmasında 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD değeri 104,0, % CV 4,6, 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda elde edilen SD: 1,180, %CV:3,4'dür.

Westgard'ın websitesinde (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre Metotreksat için izin verilen total hata % 25 olarak verilmiştir. 2500 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi; 2500 × 0,25 = 625 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 325 ÷ 3 = 208,33'tür. 104,0<208,33 olduğu için, 2500 ng/ml'lik konsantrasyonda günler arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

39,06 ng/ml'lik konsantrasyon için izin verilen hata düzeyi 39,06×0.25=9,765 ng/ml'dir. İzin verilen SD: 9,765 ÷ 3 = 3,255'dir. 1,180<3,255 olduğu için 39,06 ng/ml'lik konsantrasyonda günler arası kesinlik kabul edilebilir düzeydedir.

6.4. Geri Kazanım Çalışması

Metotreksat için 2500, 312,5 ve 39,6 ng/ml'lik standartlar ile yaptığımız geri elde çalışmasının verimleri Çizelge 6'da gösterilmektedir. 100'de geri elde edilen oran ise geri elde edilen konsantrasyonun eklenen konsantrasyona oranının 100 ile çarpılması ile hesaplanmıştır.

Çizelge 6: Metotreksat geri elde çalışma verimleri

	Konstrasyon ng/mL	Geri elde edilen ng/mL	% recovery
100 µl Metotreksat (2500 ng/mL'lik) + 900 µl serum	2500	2560	%102
100 µl Metotreksat (312,5 ng/mL'lik) + 900 µl serum	312.5	320	%102
100 µl Metotreksat (39,06 ng/mL'lik) + 900 µl serum	39,06	29	%74

6.5. İnterferans Çalışması

Metotreksatın, hemolizli, ikterikli, lipemili serum ve Calsium Folinat ile yaptığımız interferans çalışma sonuçları Çizelge 7'de gösterilmektedir.

Çizelge 7: Metotreksat'ın; hemolizli, ikterikli, lipemili serum ve Calcium Folinate ile interferans çalışması

Numune numarası	Düşük düzeyler (lipemik) ng/mL	Düşük düzeyler(hemolizli) ng/mL	Düşük düzeyler (ikterik) ng/mL	Düşük düzeyler (Calcium Folinate) ng/mL	Numune numarası	Yüksek düzeyler (lipemik) ng/mL	Yüksek düzeyler (hemolizli) ng/mL	Yüksek düzeyler (ikterik) ng/mL	Yüksek düzeyler (Calcium Folinate) ng/mL
Serum	32	30	25	22	Serum	2500	2350	2410	2380
D1	31	37,3	24,75	15,4	Y1	2208	2520	2473	2150
D1	30	35,8	22,5	20	Y1	2220	2500	2400	2200
D1	28	32	24,6	22,3	Y1	2200	2450	2200	2190
D2	40,15	33,2	29,5	21,65	Y2	2224.1	2547	2477	2373,6
D2	35,5	32,6	31,5	25,3	Y2	2235	2400	2380	2250
D2	36,8	30	33,2	24	Y2	2300	2280	2350	2300
D3	38,2	28,8	26,9	25,2	Y3	2760	2556	2524,1	2936,9
D3	35,6	30,2	28,4	24,8	Y3	2600	2480	2450	2800
D3	30,8	31,6	25,3	29,3	Y3	2550	2400	2490	2650

Düşük ve yüksek serum havuzundaki en yüksek interferan içeren tüp okumalarının ortalaması alınıp % biasları hesaplandı. Lipemik Y3 için %5 , D3 için %9 , hemolizli Y2 için %3 , D2 için %6 İkterik D1 %-4 Y1 %-2 , Calsıyum Folınat D1%-13 Y1%-8 olarak tespit edilmiştir.

6.6. Taşıma (Carryover) Çalışması

Metotreksat için yaptığımız taşıma çalışma verimleri Çizelge 8'de gösterilmektedir.

Çizelge 8: Metotreksat taşıma çalışmasının sonuçları

Carryover Analysis

High-Low Mean	33,12	Error Limit	9,85
Low-Low Mean	35,70	Passes?	Yes
Carryover	-2,58		

Experimental Results

Sample	Result	Low-Low Results	High-Low Results
L1	32,1		
L2	35,2	35,2	
L3	38,1	38,1	
H1	2350		
H2	2020		
L4	30,7		30,7
H3	2010		
H4	2250		
L5	35,6		35,6
L6	30,3	30,3	
L7	38,4	38,4	
L8	36,5	36,5	
H5	2350		
H6	2400		
L9	36,5		36,5
H7	2100		
H8	2150		
L10	29,6		29,6
H9	2340		
H10	2300		
L11	33,2		33,2
Mean		**35,70**	**33,12**
SD		**3,28**	**2,99**

Supporting Data

Units:	MIU/ml
Analyst:	mkf
Expt. Date:	27 Nis 2001
Low Conc:	1
High Conc:	1200
Comment:	

Metotreksat için yapmış olduğumuz taşıma çalışması EP-evaluator release 8 analizi ile değerlendirilip, -2,58 olarak tespit edilmiştir.

6. 7. Numune Stabilite Çalışması

Metotreksat numune stabilitesinin tespiti için yaptığımız çalışmaların sonuçları ve hesaplanan % biaslar Çizelge 9'da gösterilmektedir.

Çizelge 9: Numune stabilite sonuçları ve % biaslar

1.okuma	2.okuma	3.okuma	4.okuma	2. Okumanin % biasi	3. Okumanin % biasi	4. Okumanin % biasi
2300	2100	2100	2000	-9	-9	-13
28,6	27	25,8	24,6	-6	-10	-14

6.8. Dondurma ve Çözme Etkisi Çalışması

Metotreksat için dondurup çözdürmenin etkisini belirlemek için yapmış olduğumuz çalışmanın verimleri ve ölçümlerin arasında ilk ölçüme göre hesaplanan % biaslar Çizelge 10'da gösterilmektedir.

Çizelge 10: Metotreksat dondurma ve çözme etkisi çalışma verimleri ve ölçümlerin arası % biaslar

Verilen konstrasyon	1.okuma	2.donçöz	3.donçöz	4.donçöz
2500 ng/ml	2660	2440	2400	2300
39,06 ng/ml	37	35	33,6	30,8
2500 ng/ml %bias		-7,8	-10	-14
39,06 ng/ml %bias		-5	-9	-17

6. 9. Matriks Etkisi

Metotreksat için yaptığımız matriks etkisi çalışma sonuçları Çizelge 11' de görülmektedir.

Çizelge 11: Metotreksat matriks etkisi çalışma sonuçları

	Pik Alanı	% Matriks Etkisi
Mobil faz + 2500 ng/mL Metotreksat standartı	7,72E X 10^4	%3,10
Serum havuzu + 2500 ng/mL Metotreksat standartı	7,96E X 10^4	
Mobil faz + 312,5 ng/mL Metotreksat standartı	1,06E X 10^4	% -1,88
Serum havuzu + 312,5 ng/mL Metotreksat standartı	1,04E X 10^4	
Mobil faz + 39,06 ng/mL Metotreksat standartı	3,32 X 10^2	%6,9
Serum havuzu + 39,06 ng/mL Metotreksat standartı	3,55 X 10^2	

% Matriks etkisi =(Ekstrakte edilen numunenin pik alanı / Ekstrakte edilmeyen numunenin pik alanı -1)×100

Metotreksat % matriks etkisi yukarıdaki formül kullanılarak hesaplandı.

2500 ng/ml için % matriks etkisi: 7,96 X 10^4/7,72E X 10^4 - 1X 100 = 3,10

312,5 ng/ml için % matriks etkisi: 1,04E X 10^4 /1,06E X 10^4-1 X 100= -1,88

39,06 ng/ml için % matriks etkisi: 3,55 X 10^2 /3,32 X 102^{-1} X 100 = 6,9

7.TARTIŞMA

Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesindeki Hematoloji bölümünün Metotreksat ilaç düzeyi talebi üzerine bu çalışma yapılmıştır. Metotreksat; düzey ölçümü önemli olan ilaç grubuna dahil edilmektedir. Metotreksat'ın yüksek düzeyi ciddi yan etkilere sahip olduğu için serum ilaç düzeyi önem arz etmektedir.

İlaç düzeyi ölçümünde hassasiyet ve doğrusallık son derece önemli olduğu için kullandığımız yöntemin spesifitesi ve sensitivitesi de aynı oranda yüksek olmalıdır. Amacımız; analitik interferansı azaltıp, doğruluğu arttırmak ve analiz süresini kısaltmaktır. Serum Metotreksat düzeyinin ölçümü için sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometre (LC-MS/MS)'de yeni bir ölçüm metodu oluşturarak hastanemizde rutin ölçümlerde kullanmayı hedeflemekteyiz.

Oluşturmuş olduğumuz metod validasyonu CLSI kurallarına uygun olarak gerçekleştirilmiştir. Metanolde çözdürülmüş Metotreksat tableti serum ile seri dilüsyon yapılarak ilaç düzeyi belirlendi.

Metot validasyonu çalışmamızda en yüksek intensiteye sahip olan Q1 ve Q3 iyonları sırayla 455,110 ve 308,300 olarak belirlenmiştir. Ionspray voltage (ıs) 5500,00, sıcaklık 600ºc, total flow 0,8000 mL/dk en yüksek İntensiteyi elde ettiğimiz cihaz parametreleridir.

Metot validasyon çalışmamızda Metotreksat için 2500-0,305 ng/ml aralığı lineer bulunarak linearite grafiği çizilmiş ve korelasyon katsayısı (r^2) değeri 1000-0,975 µg/l aralığında 0,998olarak hesaplanmıştır. LC-MS/MS'de sinyal gürültü oranına göre belirlenmiş olan dedeksiyon limiti 9 ng/ml, kantitasyon limiti 19 ng/ml 'dir.

Tekrarlanabilirlik çalışmasında 2500-39,06 ng/ml konsantrasyona sahip olan serum standartları ile gün içi çalışma içi, gün içi çalışma arası ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmaları yapılmıştır. Çalışma içi tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen % CV'ler sırasıyla 4,5 ve 4,6 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerlere göre tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir. Gün içi çalışma arası tekrarlanabilirlik çalışmasında elde edilen % CV'ler sırasıyla 5,1 ve 6,0 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerlere göre tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir. Günler arası tekrarlanabilirlik çalışmasında ise elde

edilen % CV'ler sırasıyla 4,6 ve 3,4 olarak hesaplanmıştır. Hesaplanan bu değerlere göre tekrarlanabilirlik çalışması kabul edilebilir düzeydedir.

Geri elde (recovery) çalışmasında 2500, 312,5 ve 39,06 ng/ml konsantrasyonlarına sahip olan üç Metotreksat serum standartı kullanılmıştır. Geri elde % değerleri sırasıyla %102, %102, %74 olarak hesaplanmıştır.

Metotreksat için interferans çalışması; lipemik, ikterik, hemolizli serum ve Calsium Folinat ile yapılmıştır. Metotreksat'ın iki farklı düzeyleri 2500 ve 39,06 ng/ml hesaplanan bias değerleri sırasıyla 2500 ng/ml için; %5, % -2, %3, % -8 ve 39,06 ng/ml için %9, % -4, %6, % -13 olarak hesaplanmıştır.

Carryover (Taşıma) çalışmasının sonuçları da tıpkı diğer çalışmalarda olduğu gibi EP-evaluator analiz programı ile değerlendirilmiştir ve çalışma sonucu -2,58 olarak tespit edilmiştir.

Dondurma-çözme etkisini saptayabilmek için 2500-39,06 ng/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonlara sahip çalışmamızda bias ilk ölçüme göre hesaplanmıştır. 2500 ng/ml hesaplanan % biaslar 2.don-çöz analizi için % -7,8, 3. don-çöz analiz için % -10 ve 4. don-çöz analiz için %-14 sonucu elde edilmiştir. 39,06 ng/ml hesaplanan % biaslar ise 2. don-çöz analiz için % -5, 3. don-çöz analiz için % -9 ve 4. don-çöz analiz için % -17 olarak tespit edilmiştir.

Matriks etkisi çalışması için 2500, 312,5 ve 39,06 ng/ml standartları kullanılmıştır. Metotreksat için % matriks etkileri sırasıyla %3,10, % -1,88 ve %6,9 olarak hesaplanmıştır.

Stabilite çalışmasında ise 2500-39,06 ng/ml olmak üzere iki farklı konsantrasyonlara sahip değerlere göre bias ilk ölçüme göre hesaplandı. 2500 ng/ml hesaplanan % biaslar; 2.Okumanin % biası %-9, 3. Okumanin % biası %-9 ve 4. Okumanin % biası % -13 olarak hesaplanmıştır. 39,06 ng/ml hesaplanan % biaslar ise sırasıyla; % -6, % -10 ve % -14 olarak hesaplanmıştır.

LC-MS/MS' de Metotreksat düzey ölçümü daha önce birçok kez yapılmıştır. Bizim çalışmış olduğumuz metodoloji birçok yönden daha fazla avantaja sahiptir.

Regis Bouquie ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmaya göre gün içi ve günler arası CV değerleri < %8,3 olarak hesaplanmıştır (Bouquié ve ark 2014).

Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz gün içi % CV değeri < %6,5 iken, günler arası % CV değeri ise < %5'dir.

Medhat A. Al-Ghobashy ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu çalışmada geri elde (recovery) çalışması sonucu % değer olarak %94.28–104,41 sonucuna ulaşmışlardır (Al-Ghobashy ve ark 2016). Çalışmamızdaki geri elde (recovery) % değer olarak sonuçları ise %102-74 olarak hesaplanmıştır.

Xinxin Ren ve arkadaşlarının 2019 yılında yapmış olduğu çalışmada toplam çalışma süresi 6,5 dk olarak verilmiştir. Çalışmadaki kalibrasyon grafiğinin doğrusal olarak elde edildiği aralık 5-10,000 ng/ml'dir ve r^2 değeri 0,997 olarak verilmiştir. Ayrıca gün içi ve günler arası değerleri < %15 olarak verilmiştir (Ren ve ark 2019). Çalışmamızdaki toplam çalışma süresi ise 5 dk'dır. Bu da; çalışmamızın daha kısa zamanda daha hızlı ve etkili sonuç verdiğini göstermektedir. Çalışmamızdaki kalibrasyon grafiğinin doğrusal olarak elde edildiği aralık 0,305- 2500 ng/ml olarak belirlenmiştir. Elde ettiğimiz r^2 değeri 0,998'dir. Yapmış olduğumuz çalışmada ise gün içi % CV değeri < %6,5 iken, günler arası % CV değeri ise < %5'dir.

Dan Wu ve arkadaşlarının 2014 yılında yaptığı çalışmaya göre 0.05–25,0 μmol/L aralığında kalibrasyon grafiğini doğrusal olarak elde etmişlerdir (Wu ve ark 2015). Çalışmamızdaki kalibrasyon grafiğinin doğrusal olarak elde edildiği aralık 0,305-2500 ng/ml olarak belirlenmiştir.

Emi Sonemoto ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada; numunenin ön işlem aşamasında protein çöktürme işlemi ile beraber azot gazı altında kurutma işlemi gerçekleştirilmiştir (Sonemoto ve ark 2012). Çalışmamızda ön işlem basamağında sadece protein çöktürme işlemi vardır. Bu da; çalışmanın basit, hızlı olmasını ve minumum hataya inmesini sağlar.

Michael S. Roberts ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu çalışmaya göre r^2 değeri 0,997 olarak hesaplanmıştır ve ayrıca toplam çalışma süresinin 7 dk olduğu belirtilmiştir (Roberts ve ark 2016). Çalışmamızda elde etmiş olduğumuz r^2 değeri 0,998 iken toplam çalışma süremiz 5 dk'dır.

Oluşturduğumuz bu metod validasyonu, yapılan diğer metod validasyonlarına göre en uygun doğrulama özelliklerini sağlamıştır.

8. SONUÇ VE ÖNERİLER

Yapılan çalışmada Metotreksat'ın serumdaki miktarını tayin edebilmek için yeni bir metod geliştirildi. Metotreksat; kanser ve romatoit artrit tedavisinde kullanılan ve hastalığın seyri açısından önemli rol oynayan bir ilaçtır.

Tekrarlanabilirlik çalışması için Westgard'ın websitesinde bulunan (https://www.westgard.com/clia.htm) CLIA'ya göre ilaç düzey takibi için izin verilen toplam hata yüzdesi %25 olarak verilmiştir. Bu yüzdeliğe göre yapmış olduğumuz çalışmadan elde edilen sonuçlar izin verilen hata düzeyinin tekrarlanabilirliği kabul edilebilir düzeyde olduğunu kanıtlar niteliktedir. Çalışma sonucunda elde ettiğimiz linearite, taşıma ve tekrarlanabilirlik sonuçlarının analizini yaptığımız EP Evaluator Release 8 programına göre çıkan sonuçlar kabul edilebilir düzeydedir.

Son yıllarda Metotreksat analizi için; temel amacı analitik interferansın azaltılması ve doğruluğun arttırılması olan çalışmalarda LC-MS/MS tabanlı yöntemler tercih edilmektedir. Gerçekleştirmiş olduğumuz çalışmada serum Metotreksat tayini yapabilmede ortaya konulacak yeni yöntem için CLSI kuralları çerçevesinde metot validasyonu tamamlanmıştır. Elimizdeki veriler doğrultusunda LC-MS/MS yönteminin uygulanabilir olduğu sonucuna varılmıştır.

9. KAYNAKÇA

Achi lle Cappi ello GrFn, Pierangel a Palma, and Helga Trufelli, 2010. MATRIX EFFECTS IN LIQUID CHROMATOGRAPHY-MASS SPECTROMETRY. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 33, 1067–81.

Administration OLPFaD, (2014). METHODS, METHOD VERIFICATION AND VALIDATION. Document No.: ORA-LAB.5.4.5 Version No.: 1.7: 1-19.

Al-Ghobashy MA, Hassan SA, Abdelaziz DH, Elhosseiny NM, Sabry NA, Attia AS, El-Sayed MH, 2016. Development and validation of LC-MS/MS assay for the simultaneous determination of methotrexate, 6-mercaptopurine and its active metabolite 6-thioguanine in plasma of children with acute lymphoblastic leukemia: Correlation with genetic polymorphism. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci, 1038, 88-94.

Borges AL, Zhang JY, Rollins MF, Osuna BA, Wiedenheft B, Bondy-Denomy J, 2018. Bacteriophage Cooperation Suppresses CRISPR-Cas3 and Cas9 Immunity. Cell, 174, 4, 917-25 e10.

Bouquié R, Deslandes G, Nieto Bernáldez B, Renaud C, Dailly E, Jolliet P, 2014. A fast LC-MS/MS assay for methotrexate monitoring in plasma: validation, comparison to FPIA and application in the setting of carboxypeptidase therapy. Anal. Methods, 6, 1, 178-86.

Bouquie R, Gregoire M, Hernando H, Azoulay C, Dailly E, Monteil-Ganiere C, Pineau A, Deslandes G, Jolliet P, 2016. Evaluation of a Methotrexate Chemiluminescent Microparticle Immunoassay: Comparison to Fluorescence Polarization Immunoassay and Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry. Am J Clin Pathol, 146, 1, 119-24.

Brigitte C. Widemann ES, Lawrence Anderson, Wanda L. Salzer, Frank M. Balis, Karen S. Monitjo, Cynthia McCully, Mary Hawkins and Peter C. Adamson, Pharmacokinetics and Metabolism of the Methotrexate Metabolite 2,4-Diamino-N 10-methylpteroic Acid. ournal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 294 (3), 894-901.

Brigitte C. Widemann PCA, 2006. Understanding and Managing Methotrexate Nephrotoxicity. The Oncologist Pediatric Oncology, 11, 694–703.

Brown PM, Pratt AG, Isaacs JD, 2016. Mechanism of action of methotrexate in rheumatoid arthritis, and the search for biomarkers. Nat Rev Rheumatol, 12, 12, 731-42.

Bruce A. Chabner CJA, Gregory A. Curt, Neil J. Clendeninn, Jacob Baram, Shoichi Koizumi,, James C. Drake aJJ, September 1985. Polyglutamation of Methotrexate

Is Methotrexate a Prodrug? The Journal of Clinical Investigation, 76 (3), 907-12.

Bulur I, Kaya Erdogan H, Nurhan Saracoglu Z, Arik D, 2015. Methotrexate Treatment in Children with Febrile Ulceronecrotic Mucha-Habermann Disease: Case Report and Literature Review. Case Rep Dermatol Med, 2015, 357973.

Carl A.Burtis ERA, 2007. Tietz Klinik Kimyada Temel İlkeler, ANKARA, Palme Yayıncılık, p. 1091.

Chan ES, Cronstein BN, 2013. Mechanisms of action of methotrexate. Bull Hosp Jt Dis (2013), 71 Suppl 1, S5-8.

DrugBank. Erişim. Erişim adresi, https://www.drugbank.ca/drugs/DB00563.

folıc acıt. Erişim. Erişim adresi, https://www.drugbank.ca/drugs/DB00158.

Eunice Nduati SH, Eddy M. Kamau, and Alexis Nzila, 2005 September. 2,4-Diaminopteridine-Based Compounds as Precursors for De Novo Synthesis of Antifolates: a Novel Class of Antimalarials. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 49 (9), 3652–7.

GHARAB KMK, 2018. Biyolojik Sıvılarda Klozapin Ölçümü İçin LC-MS/MS Yöntem Kurulması, YÜKSEK LİSANS TEZİ, SELÇUK ÜNİVERSİTESİ, SELÇUK ÜNİVERSİTESİ SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ.

Henghe Tian MD, and Bruce N. Cronstein, M.D., 2007. Understanding the Mechanisms of Action of Methotrexate Implications for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. Bulletin of the NYU Hospital for Joint Diseases, 65(3), 168-73.

Howard SC, McCormick J, Pui CH, Buddington RK, Harvey RD, 2016. Preventing and Managing Toxicities of High-Dose Methotrexate. Oncologist, 21, 12, 1471-82.

Jannetto PJ, 2017. THERAPEUTIC DRUG MONITORING USING MASS SPECTROMETRY. In: Mass Spectrometry for the Clinical Laboratory. Eds: Clarke HNaW, p. 165-79.

Kayaalp PDSO, 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmokoloji, Ankara, Hacettepe-Taş Kitapçılık, p.

Laura B. Ramsey FMB, Maureen M. O'Brienb, Kjeld Schmiegelowe, Jennifer L. Pauleyf, Archie Bleyerg, Brigitte C. Widemannh, David Askenazii, Sharon Bergeronj, Anushree Shiralik, Stefan Schwartzl, Alexander A. Vinksa, and Jesper Heldrup, 2017.

Consensus Guideline for Use of Glucarpidase in Patients with High-Dose Methotrexate Induced Acute Kidney Injury and Delayed Methotrexate Clearance. The Oncologıst, 0243.

Louis-Philippe Morin M-PT, Milton Furtado& Fabio Garofolo, 2012. An alternative solution to overcome carryover issues in bioanalysis. Bioanalysis, 4, 2, 133-41.

Menendez CAJC, 2008. Antimetabolites. In: Medicinal Chemistry of Anticancer Drugs. Eds, p. 400.

ONAT T, 2006. İNSAN BİYOKİMYASI, p. 813.

Panchumarthy Ravisankar CNN, D. Pravallika, D. Navya Sri, 2015. A Review on Step-by-Step Analytical Method Validation. IOSR Journal Of Pharmacy, 5, 10, 07-19.

Erişim. Erişim adresi, https://www.pfizermedicalinformation.ca/en-ca/methotrexate#.

PubChem. Erişim. Erişim adresi, National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. Methotrexate, CID=126941, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Methotrexate (accessed on Dec. 1, 2019).

PUBCHEM 7-Hydroxymethotrexate. Erişim. Erişim adresi, National Center for Biotechnology Information. PubChem Database. 7-Hydroxymethotrexate, CID=5484402, https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/7-Hydroxymethotrexate (accessed on Dec. 29, 2019).

RAJESH THIRUMARAN GCP, AND PAUL B. GILMAN, 2007. Cytotoxic Chemotherapy in Clinical Treatment of Cancer. In: Cancer Immunotherapy Immune Suppression and Tumor Growth. Eds: George C. Prendergast EMJ, p. 428.

Ren X, Wang Z, Yun Y, Meng G, Zhang X, Ding H, Xu Y, Bai H, Liu J, Li X, Gao S, Huang L, Chen W, 2019. Simultaneous Quantification of Methotrexate and Its Metabolite 7-Hydroxy-Methotrexate in Human Plasma for Therapeutic Drug Monitoring. Int J Anal Chem, 2019, 1536532.

Roberts MS, Selvo NS, Roberts JK, Daryani VM, Owens TS, Harstead KE, Gajjar A, Stewart CF, 2016. Determination of Methotrexate, 7-Hydroxymethotrexate, and 2,4-Diamino-N(10)-methylpteroic Acid by LC-MS/MS in Plasma and Cerebrospinal Fluid and Application in a Pharmacokinetic Analysis of High-Dose Methotrexate. J Liq Chromatogr Relat Technol, 39, 16, 745-51.

S Buchen DN, RG Melton, C Hasan, A Zoubek, G Henze, U Bode1 and G Fleischhack, 25 January 2005. Carboxypeptidase G2 rescue in patients with methotrexate intoxication and renal failure. British Journal of Cancer (2005), 92, 480 – 7.

Sonemoto E, Kono N, Ikeda R, Wada M, Ueki Y, Nakashima K, 2012. Practical determination of methotrexate in serum of rheumatic patients by LC-MS/MS. Biomed Chromatogr, 26, 11, 1297-300.

The Cell Cycle. OpenStax Biology, Erişim. Erişim adresi, http://cnx.org/contents/185cbf87-c72e-48f5-b51e-f14f21b5eabd@9.17:1/Biology.

SÜZER PDÖ, 2005. Premium Farmakoloji, p.

Vinod P. Shah KKM, John W. A. Findlay HMH, James D. Hulse IJM, Gordon McKay KJM, Rabindra N. Patnaik MLP, Alfred Tonelli CTV, and, Yacobi A, 2000. Bioanalytical Method Validation—A Revisit with a Decade of Progress. Pharmaceutical Research, Workshop/Conference Report, 17 NO:2, 1551-7.

https://www.westgard.com/biodatabase3.htm#1, 2008. Erişim. Erişim adresi, https://www.westgard.com/biodatabase3.htm#1

Wu D, Wang Y, Sun Y, Ouyang N, Qian J, 2015. A simple, rapid and reliable liquid chromatography-mass spectrometry method for determination of methotrexate in human plasma and its application to therapeutic drug monitoring. Biomed Chromatogr, 29, 8, 1197-202.

YILMAZ DO, 2008. PROBİYOTİKLERİN RATLARDA METOTREKSAT TOKSİSİTESİ ÜZERİNE OLAN ETKİLERİ, UZMANLIK TEZİ, SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ.

Zhang SPTY, 2019. Exploratory biomarker assays: key assay parameters to evaluate in the face of evolving biomarker context-of-use. BIOANALYSIS.

EKLER

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI

YEREL ETİK KURULU KARARLARI

Toplantı Sayısı: 2019/06	Toplantı Tarihi : 22.05.2019

Karar Sayısı 2019/128 S.Ü. Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim dalı öğretim üyesi Doç.Dr.Sedat ABUŞOĞLU'nun "Metotreksat düzeylerinin sıvı kromatografi kütle spektrometri yöntemi ile tayini" başlıklı araştırmasının değerlendirilme talebi ile ilgili 03.05.2019 tarihli dilekçesi ve ekleri görüşüldü.

Yapılan inceleme ve görüşmelerden sonra; Doç.Dr.Sedat ABUŞOĞLU'nun "Metotreksat düzeylerinin sıvı kromatografi kütle spektrometri yöntemi ile tayini" adlı araştırmasının kabulüne oy birliği ile karar verildi.
Yardımcı Araştırmacılar: Ali ÜNLÜ, Firdevs SAK.

ASLI GİBİDİR
22/05/2019

S.Selcen ÇELİK
Sekreterya

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Firdevs Sak

Doğum Yeri: Meram / KONYA

Medeni Hali: Bekar

E-posta: firdevssak92@gmail.com

Tel: 05537481729

Eğitim

Lise: Özel Güventaş Lisesi

Lisans: İstanbul Esenyurt Üniversitesi

Yüksek Lisans: Selçuk Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyokimya A.D.

Yabancı Dil

İngilizce

Katıldığı Sempozyum & Kongreler

7.Ulusal Obezite Kongresi

7.Ulusal Sağlıklı Yaşam Sempozyumu

27th BCLF & 30th TBS Congress

Beslenme Akademisi

Bariatrik Cerrahi Diyetisyenliği Kursu

Çocuk Felci Destek Aşılama

Deney Hayvanları Kullanım Sertifikası

Geleneksel Türk Mutfağında Fermente Besinler Sempozyumu

Geriatri Diyetisyenliği Kursu

Gıda İşyeri ve Temizlik Personeline Yönelik Hijyen

Klinik Beslenme Günleri (1-Beslenme ve Moleküler Mekanizmalar)

Kök Hücre Bölge Toplantıları-1

Kronik Hastalıklarda 1.Malnutrisyon Konferansı

Multidisipliner Tedavi Kursu

ProbıoClass-Beslenme&Prebıyotik&Probiyotik Bahar Okulu