

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**KAN BAĞIŞI YAPAN BİREYLERİN SERUM NEOPTERİN
(NP) SEVİYESİNİN ENFEKSİYON HASTALIKLARIYLA
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek KESKİN

Danışman
Doç. Dr. Ali ÜNLÜ

KONYA-2007

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
BİYOKİMYA (TIP) ANABİLİM DALI

**KAN BAĞIŞI YAPAN BİREYLERİN SERUM NEOPTERİN
(NP) SEVİYESİNİN ENFEKSİYON HASTALIKLARIYLA
İLİŞKİSİNİN İNCELENMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Dilek KESKİN

Danışman
Doç.Dr. Ali ÜNLÜ

Tez No:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından BAP-06202009 kodlu proje olarak desdeklenmiştir.

KONYA-2007

İÇİNDEKİLER

KISALTMALAR VE SİMGELER DİZİNİ.....	1
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	III
TABLolar DİZİNİ.....	IV
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. İmmün Sistem	2
2.1.1. İmmün sistemde görevli hücreler.....	2
2.1.1.1. Lenfositler	3
2.1.1.2. Monosit ve makrofajlar	4
2.1.1.3. Antijen sunucu hücreler (APC).....	4
2.1.1.4. İnterferonlar	4
2.2. Pteridinler.....	5
2.2.1. Pteridinlerin yapısı	6
2.2.1.1. Konjuge pteridinler	6
2.2.1.2. Konjuge olmayan pteridinler.....	7
2.3. Neopterin (NP)	7
2.3.1. Neopterin kimyasal özellikleri.....	9
2.3.2. Neopterin biyosentezi.....	10
2.3.3. Tetrahidrobiopterin (BH4).....	11
2.3.4. Neopterin vücuttaki biyokimyasal ve fizyolojik rolü.....	11
2.3.5. Neopterin immünolojik rolü.....	12
2.3.6. Neopterin ve serbest radikaller.....	14
2.3.7. Vücut sıvılarında neopterin.....	15
2.3.7.1. Serumda neopterin.....	16
2.3.7.2. İdrarda neopterin.....	16
2.3.7.3. Beyin omurilik (BOS) sıvısında neopterin.....	17
2.3.7.4. Diğer biyolojik sıvılarda neopterin.....	17
2.4. Neopterin ölçüm teknikleri.....	17
2.4.1. HPLC.....	17
2.4.2. Floresans deteksiyon.....	18
2.4.3. Elektrokimyasal deteksiyon	18
3. MATERYAL VE METOD.....	19
3.1. Materyal	19

3.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasal maddeler	19
3.1.2. Kullanılan çözeltiler.....	20
3.2. Metod.....	20
3.2.1. HPLC sistemi ve gerekli donanımlar.....	20
3.3. Çalışmada örneklerin toplanması.....	21
3.4. Örneklerin hazırlanması.....	21
3.5. Deneyin yapılışı.....	21
3.6. İstatiksel analiz.....	23
4. BULGULAR.....	24
4.1. Serum NP sonuçları.....	29
5.TARTIŞMA	29
6. KAYNAKLAR	31
7. ÖZET.....	40
8 SUMMARY	41
9. ÖZGEÇMİŞ.....	42
10. TEŞEKKÜR	43

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

APC	Antijen sunucu hücreler
BH₄	Tetrahidrobiopterin
BOS	Beyin omurilik sıvısı
ECD	Elektro kimyasal detektör
ELİSA	Enzim linked immüno assay
GCH-I	Güanozin trifosfat siklohidrolaz-I
GTP	Güanozin trifosfat
HCl	Hidroklorik asit
HOCl	Hipokloröz asit
H₂O	Su
H₂O₂	Hidrojen peroksit
H₃PO₄	Ortofoforik asit
IκB	İnhibitör κ B
INF-γ	İnterferon gama
IL	İnterlökin
iNOS	İndüklenebilir nitrik oksit sentaz
KCl	Potasyum klorür
KH₂PO₄	Potasyum dihidrojen fosfat
K₂HPO₄	Dipotasyum hidrojen fosfat
L	Litre
M	Molarite
mg	milligram
mL	Millilitre
μL	Mikrolitre
mM	Millimolar
mm	Millimetre
MPO	Miyeloperoksidaz
MgCl₂.6.H₂O	Magnezyum klorür hegzahidrat
mRNA	“Messenger” (haberci) ribonükleik asit
Na₂EDTA	Disodyum etilendiamin tetraasetik asit
NaCl	Sodyum klorür

NaOH:	Sodyum hidroksit
NF-kB	Nekröz faktör-kB
NH₄Cl:	Amonyum klorür
NH₄HCO₃	Amonyumhidrojen bikarbonat
NaH₂PO₄	Sodyum dihidrojen fosfat
NH₂TP	7,8-dihidroneopterinposfat
nmol	Nanomol
nm:	Nanometre
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NP	Neopterin
PPTS	6-pruvoil tetrahidropterin redüktaz
RIA	Radio immüno assay
ROS	Reaktif oksijen türleri
sIL-R	Soluble interlökin reseptör
sTNF-R	Soluble tümör nekroz faktör reseptör
TCA	Trikloro asetik asit
Th	T hepler
TNF-α	Tümör nekroz faktör
TLC	İnce tabaka kromatografi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil -1 : Pteridin ve pterinin kimyasal yapıları

Şekil-2 : Neopterinin kimyasal yapısı.

Şekil-3 : İnsanda neopterin sentez basamakları

Şekil-4 : İnsanda Hücresel immün yanıt esnasında aktive T lenfositler tarafından INF- γ salınımı ve bunun etkisine bağlı olarak makrofajlardan neopterin üretimin uyarılması.

Şekil-5 : Neopterin standart grafiği

Şekil-6 : kontrol grubundaki neopterin sonuçlarının dağılımı ve bu dağılımın eğrisi

Şekil-7 : HBB + grubunun neopterin değerlerinin dağılımı ve bu dağılımın eğrisi

Şekil-8 : HBC + grubunun neopterin değerlerinin dağılımı ve bu dağılımın eğrisi

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo-1: İnsan dokularında ve vücut sıvılarında saptanan pterinler

Tablo-2 : HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri

Tablo-3 : Kontrol, HBB +, HBC + gruplarının neopterin değerleri dağılımı

Tablo-4 : Kontrol ve HBB + gruplarının neopterin değerleri dağılımı

Tablo-5 : Kontrol ve HBC + gruplarının neopterin değerleri dağılımı

Tablo-6 : HBB + ve HBC + gruplarının neopterin değerleri dağılımı

1.GİRİŞ

NP, insan monosit ve makrofajlarından interferon-gamma aracılığıyla salınan biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmeyen, kendisine özgü reseptörü olmayan pteridin türevi bir maddedir. NP monosit ve makrofajlardan vücut sıvılarına salındığı için bunların aktiviteleriyle ilgili bir belirteçtir. Normal serum NP düzeyi 2,8-10 nmol/L'dir. NP böbreklerden değişmeksizin atılır. NP serum, BOS, sinoviyal sıvı, idrar, pankreatik sıvı gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilir.

Vücut sıvılarındaki NP düzeyi çeşitli enfeksiyonlar, sepsis, otoimmün hastalıklar, maliniteler, çeşitli organ transplantlarının rejeksiyoları gibi monosit ve makrofaj aktivitelerini yoğunlaştıran hastalıklarda artar.

Vücut sıvılarında NP ölçümleri hücrel immün yanıt ve sıklığı hakkında bilgi verir, buda hastalığın tanısının konmasında ve gelişiminin tahmin edilmesinde yardımcı olur.

Kan transfüzyonu hastanelerimizde oldukça yaygın olarak kullanılan önemli bir doku transplantasyonudur. Viral hepatitler en başta olmak üzere bulaşıcı hastalıklarında geçişi kan transfüzyon komplikasyonlarının en önemlilerinden birisidir. Literatürlerde kan transfüzyonları öncesinde bulaşıcı enfeksiyon hastalıklarının taranmasında neopterinin önemli bir marker olabileceği, zaman ve mali kaybı diğer testlere göre en aza indirdiği bu nedenle kan bankalarında uygulanmasının faydalı olabileceğine dair bilgiler mevcuttur. Bu çalışmada hücrel immüitenin göstergesi olan NP düzeyi ile bulaşıcı enfeksiyon hastalıkları arasındaki ilişki olup olmadığı araştırılacaktır. Bulaşıcı hastalık olarak Hepatit B ve Hepatit C grubu alınmıştır.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.İmmün Sistem

Lenfoid organlar ve immün cevapta görevli olan hücrelerin tümüne immün sistem denir. Kemik iliği, dalak, karaciğer, kapsüllü ve kapsülsüz lenf düğümleri ile bu organlarda bulunan lenfositler, tek çekirdekli veya polimorf fagositer hücreler, bağ dokusu histiositleri, seröz sıvı ve alveol makrofajları, sinir sistemi mikrogliaları, langerhans ve kupffer hücrelerinden oluşan sisteme retiküloendotelyal sistem (RES) ya da mononükleer fagositik sistem adı verilir(Junqueia ve ark 1993, Akay ve ark 2001).

İnsan organizmasında sürdürülen immün reaksiyonların amacı; yabancı organizmalardan (bakteri, virüs, mantar, parazit), organizmada mutasyonlar sonucu ortaya çıkan istenmeyen hücrelerden (kanser hücresi) ve mikroorganizmaların toksik etkilerinden korunmak şeklinde özetlenebilir. İmmün sistemin organları primer (timüs ve bursa fabrisius) ve sekonder (lenf nodülleri, dalak, bademcikler ve bağırsaklarla ilgili lenf dokuları) olmak üzere ikiye ayrılır (Baban 1995)

2.1.1. İmmün sistemde görevli hücreler

Omurgalıların immün sisteminde, kan ve dokularda bulunan üç ayrı hücre grubu görev yapmaktadır. Bunlar; lenfositler, monositler ve polimorfo nükleer granülositlerdir. Bu hücrelerin bir kısmı konağa giren antijen özelliğindeki molekülleri fagosite eder. Diğer bir kısmı ise antijenin uyarımı ile farklılaşarak onlara karşı immün cevap ürünleri çıkarmakta ve antijenleri yok etmektedir (Erganiş 1993).

Kemik iliğinde yapılan hücrelerin lenfoid serisinden lenfositler, miyeloid serisinden ise fagositer hücreler gelişmektedir. Yerleşim bölgeleri ve fonksiyonlarına göre lenfositler üç büyük grupta toplanmaktadır. Bunlar; yüzeylerinde antijen tanıyan reseptörleri bulunan ve immün cevap ürünlerinin yapımından sorumlu olan T ve B lenfositler ile diğer matür hücrelerdir. T lenfositler timus kontrolünde olgunlaşırken B lenfositler ise fabrisius keseye eşdeğer organların kontrolünde olgunlaşmaktadır. B tipi lenfositlerin farklılaşmasıyla plazmositler gelişmektedir. T ve B lenfositlerin dışında bir üçüncü grup olan matür lenfositler, ne T ne de B veya null hücreleri

olarak adlandırılan killer hücreleri (K), ile natural killer (NK) hücreleridir (Akay 2001).

2.1.1.1. Lenfositler

Az miktarda sitoplazma ile çevrilmiş, içinde yuvarlak bir nükleus içeren ve aktif morfoloji gösteren hücreler olup fagositoz yaparlar. Membranda taşıdıkları reseptörler aracılığıyla genellikle antijenleri tanırlar. Lenfositler, primer veya merkez lenfoid organlarda oluşuktan sonra, bazıları kan sirkülasyonu yoluyla dalak, lenf düğümleri, tonsiller ve mukoza altı lenfoid dokular gibi sekonder lenfoid dokulara göç ederler. Uyarılan lenfositler blast şekline dönüşürler. Blast şekilleri 15–30 µm çapında, sitoplazması daha geniş, ribozom ve golgi cihazı gibi organelleri olan hücrelerdir. Lenfositler T lenfosit, B lenfosit, T-h lenfosit (T yardımcı) ve T-c (T sitotoksik) lenfositler olmak üzere dörde ayrılır. Kemik iliği lenfoblastları, timus kontrolünde timusun korteks ve medullasında farklılaşarak T lenfositler şeklinde, fabrisius keseye eşdeğer organların kontrolünde farklılaşarak B lenfositler şeklinde olgunlaşmaktadır. Aktif T lenfositler ile plazmositler efektör hücrelerdir. Timüs bezi retiküler yapıya sahiptir. Timüs bezi yokluğunda T lenfositleri oluşmaz ve ağır immün yetmezlik belirtileri ortaya çıkar. Bursa fabrisius insanlarda yoktur ve bu organın insanlardaki karşılığı olarak fetüste karaciğer, erişkinlerde ise kemik iliğidir (Baban 1995).

T lenfositleri; plazmositlerden immünglobülin salgılanmasını düzenlemek, gecikmiş tipteki aşırı duyarlılık reaksiyonlarına aracılık etmek, virüslerle enfekte olmuş hücreleri yok etmek, yabancı dokuları ortadan kaldırmak gibi önemli reaksiyonlardan sorumludurlar. T lenfositleri γ interferon (γ IFN) salınarak aktifleşirler. İmmün sistemde yaptıkları görevler bakımından T lenfositleri düzenleyici T lenfositler ve eylemci T lenfositleri olmak üzere ikiye ayrılır (Zetkova ve ark 2001, Müftüoğlu ve ark 1993).

Düzenleyici T lenfositlerinden bir kısmı aktivatör, diğer bir kısmı ise baskılayıcı etki göstererek immün cevabı kontrol ederler (Müftüoğlu 1993). Eylemci lenfositler hücresel bağışık cevapta doğrudan kendilerinin yer almaları ya da salgıladıkları lenfokin adı verilen maddelerin aracılığı ile etkili olan lenfositlerdir. Etkileri sonucunda içlerinde mikroorganizma taşıyan hücreler, yabancı canlı hücreler ve tümör hücreleri öldürür(Bilgehan 1987, Baban1995).

B lenfositleri ise kemik iliğindeki kök hücrelerden kaynaklanan bir kısım hücrelerin timüse uğramadan gelişimlerini tamamlayıp oluşurlar. En önemli özellikleri üzerlerinde çok sayıda immünglobülin (özellikle IgM) molekülleri taşımalarıdır. Bundan dolayı yüzeyleri T lenfositlerinin tersine düzgün değil pürüzlüdür. Ayrıca insan ve fare lenfoid hücreleri arasında yabancı hücrelere karşı sitotoksik etkinlik göstererek onları eritip öldüren K hücreleri ile NK hücreleri vardır (Erganiş ve ark 1993, Müftüoğlu ve ark 1993, Baban ve ark 1995).

2.1.1.2. Monosit ve makrofajlar

Monositler, kemik iliğinde yapıp dolaşımda 1-3 gün kaldıktan sonra dokulara göç ederek burada doku makrofajlara dönüşürler. Monositler periferik kanda; makrofajlar ise bağ dokusu, karaciğer, akciğer, sinir sistemi, seröz boşluklar, lenfoid organlar, kemik ve eklemlerde bulunmaktadır. İmmün cevapta, monosit ve makrofajların önemli görevleri vardır. Bunlar 0,1µ'dan büyük molekülleri fagositoz yoluyla hücre içine alarak sindirme özelliklerine sahiptirler (Bilgehan ve ark1987). Makrofajlar yerleştikleri dokulara göre dendritik makrofajlar, histiyositler, kupffer hücreleri, dalakta osteoklastlar, eklemlerde A ve M hücreleri gibi isimler alırlar (Zetkova ve ark 2001).

2.1.1.3. Antijen sunucu hücreler (APC)

Antijen sunucu hücreler (Antigen Presenting Cell/s, APC); langerhans hücreleri, B lenfositler, monositler ve makrofajlar ile retiküler dentritik hücrelerinden oluşan immüno-stimülatör kapasiteli heterojen bir gruptur. Kemik iliğinde yapılan bu hücreler deri, lenf düğümleri, dalak ve timusta bulunmaktadır. Bazıları yardımcı T lenfositlere antijeni sunarken, bazıları diğer lökositlerle ilişki kurarlar (Erganiş ve ark1993).

2.1.2. İnterferonlar

İnterferonlar ilk kez 1957 yılında yapılan antiviral deneylerde keşfedilmiştir. İzole edildikleri yerden dolayı interferon adı verilmiştir. İnterferonlar bulundukları organ ve hücrelere göre; lökosit INF, fibroblast INF ve immün INF olmak üzere üçe ayrılır. İnterferonlar doğal proteinler, glikoproteinler ve peptitlerden sentezlenirler. Ayrıca hücre içinden makrofajlar, monositler, T lenfositler, glia ve nöronlardan üretilir (www.en.wikipedia.org/wiki/Interferon).

İnterferonlar, bir virus yapım önleyicisi olan ve antikorlarla nötralize edilmeyen proteinlerdir. İnterferon yapımı, hücrenin yabancı nükleik asit alış verişine karşı silahlanma olayıdır. Üç tip interferon tanımlanmıştır.

- Lökositler tarafından salınan 18–20 kD molekül ağırlığında interferon alfa (INF- α)
- Fibroblastlar tarafından salgılanan 23 kD molekül ağırlığında interferon beta ya da interferon tip 1
- T lenfositleri tarafından yapılan 20–25 kD molekül ağırlığında olan interferon gamma (INF- γ) veya tip II interferondur.

Tip II yani IFN- γ interferonlar, immün interferon olup makrofajları, NK hücreleri, Tc ve B lenfositleri aktive eden immünomodülatörlerdir (Bilgehan ve ark 1987). İnterferon- α , protein bağışıklık modülü antiproliferatif ve antiviral özelliktedir. İnterferon- α bağışıklık sistemini dengelemede naturel killer hücreler ile birlikte önemli rol oynar. Silli lökim hücreleri, AIDS kaposisi, sarkoma, genital siğiller, kronik hepatit B ve C tedavisinde kullanılır. İnterferon- β , düzenli bir bağışıklık sitokininidir. Önemli bir antiviral stokin olup natural killer hücrelerinden stimüle edilen bir üründür İnterferon- γ ise supernatant insan lenfositleri ile mitojen stimüle olup antiviral bir aktivite de INF- α dan birkaç yıl sonra bulunmuştur. Moleküler yapısı bulunan ilk yapı INF- γ dır(Junquera ve ark 1993, Akay ve ark 2001, Baban ve ark 1995).

2.2. Pteridinler

Pteridinler ilk kez 1889'da biyolojik bir materyalden izole edilmiştir . Pteridinlerle ilgili çalışmalara bu tarihte başlanmış, ilk defa böcekler ve aşağı omurgalıların pigmenti olarak tanımlanmışlardır (Yeğen 2004, Haavik ve ark 1989, Müler ve ark 1991). Ayrıca pteridinler birçok enzim katalizli reaksiyonlarda kofaktör olarak görev yapmaktadır özellikle tetrahidrofolat ve tetrahidromethanopterin tek karbon fragmentlerin transferinde, molibdopterin ksantin dehidrogenaz gibi çeşitli redoks reaksiyonlarında kofaktör olarak görev yapmaktadır (Baracher ve ark 1998). Pteridinlerle ilgili üç önemli bulgu bu bileşiklere karşı ilgiyi artırmıştır:

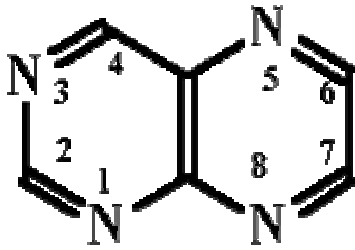
1. Tetrahidrobiopterin (BH_4), aromatik hidroksilazların kofaktörü olduğunun anlaşılması

2. BH_4 metabolizmadaki konjental bozuklukların hiperfenilalaninemiye yol açabileceğinin saptanması.

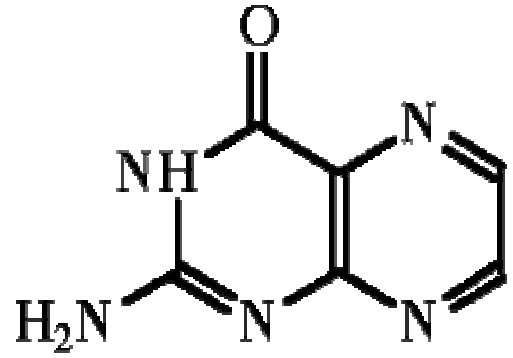
3. Malignentili ve enfeksiyon hastalığı olan bireylerde, idrar pterinlerdeki (özelikle neopterin) değişikliğin bulunması (Hyland ve Howells 1988).

2.2.1. Pteridinlerin Yapısı

Pterinler, pteridin olarak bilinen bileşiklerin bir gurubudur. Pteridinler, pirazino [2,3,d] primidin yapısındadırlar. Pteridin halkasının ikinci konumunda amino dördüncü konumunda okso grubu bulunduğunda yapı pterin adını almaktadır(Watcherbve ark 1989). Pterin ve pteridinlerin kimyasal yapıları şekil 1’de gösterilmektedir.



Pteridin
(Pirazino [2,3-d]pirimidin)



Pterin
(2-amino4-oksopteridin)

Şekil-1: Pteridin ve pterinin kimyasal yapıları

Pteridinler, altıncı karbon atomundaki yan zincir ve oksidasyon durumuna göre Tetrahidro formu, Dihidro formu ve Okside formu olarak üçe ayrılır

Ayrıca, konjuge ve konjuge olmayan pteridinler olarak iki gruba ayrılır (Watcher ve ark 1989).

2.2.1.1.Konjuge pteridinler

Bu gruptaki pteridinler, p-amino benzenil glutamatlara bağlanmış folatlar olarak bilinirler. Örneğin folik asitte, 6-hidroksi metil pteridin, p-amino benzoik asit ve glutamik asit olmak üzere üç kısımdan oluşmuştur (Watcher ve ark 1989).

Konjuge pteridinler, tiamin sentezi, amino asitlerin metabolizması, pürin ve primidin sentezinde tek karbon atomu transferi reaksiyonlarında kofaktör olarak önemli rol oynamaktadırlar (Nichol ve ark 1985).

2.1.3. Konjuge olmayan pteridinler

Pterinler olarak bilinen bu grup, pteridin molekülünün altıncı konumdaki karbon basit bir hidroksil alkil grubu içermektedir. İnsan dokularında ve vücut sıvılarında saptanan pterinler tablo-1’de gösterilmiştir (Hyland ve ark 1988).

Tablo-1: İnsan doku ve vücut sıvılarında saptanan pterinler

Bileşik	Yan zincir
Biopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₃
7,8-Dihidrobiopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₃
Tetrahidrobiopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₃
Neopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₂ OH
7,8-Dihidroneopterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₂ OH
Sepiapterin	C-6-CHOH-CHOH-CH ₃
İzosepiapterin	C-7-CHOH-CHOH-CH ₃
Ksantopterin	C-6-OH
İzoksantopterin	C-7-OH
6-Karboksipterin	C-6-COOH

2.2. Neopterin (NP)

Neopterin (NP) 1963 yılında, arıların larvalarında ilk olarak bulunmuştur (Trgan ve ark 2001). İnsanlarda 1967 yılında idrarda NP saptanmıştır (Sakuari ve ark 1967, Hyland ve ark 1988, Beigel 2005). Sonraki yıllarda atipik fenilketonürlü çocukların idrarlarında yüksek konsantrasyonlarda NP bulunmuştur (Fredikson ve ark 1987). 1979 yılında malign ve enfeksiyonlu hastaların idrarlarında bol miktarda NP atılımı bildirilmiştir. 1982 ve 1983 yıllarında antijenik sitümülasyonlardaki kültüre edilmiş insan periferik kan mononükleer hücrelerinin süpernatantlarında NP biriktiği gözlenmiştir (Fuchs ve ark 1993).

Bu çalışmaların sonucunda interferon gamanın (INF- γ) insan makrofajlarında *in vitro* olarak büyük miktarda NP üretimine ve salınımına yol açtığı gözlenmiştir. Diğer interferonların daha az ve diğer sitokinli sitmlasyonların *in vitro* olarak NP salınımına çok daha az neden oldukları bildirilmiştir (Fuchs ve ark 1989, Engin ve ark 2005). Tümör nekroz faktör alfanın (TNF- α), INF- γ gibi etkiye sahip olmadığı, ama INF- γ tarafından salınan NP oluşumuna sinerjik amplifiye ettiği bildirilmiştir (Fuchs ve ark 1993).

Daha sonraları çok sayıda klinik ve deneysel çalışmalar, klinik tıpta NP'nin potansiyel değerini araştırmaya rehberlik etmiştir. Günümüze kadar NP biyosentezinin, hcressel immün sistem aktivasyonu ile yakından ilişkili olduğunu gösteren destekleyici *in vitro* ve *in vivo* olarak çeşitli araştırmalar yapılmıştır(Fuchs ve ark 1988, Hausen ve ark 1989).insanda temel neopterin kaynağı monosit ve makrofajlardır.ayrıca mikrogliya hücreleri ve santral sinir sisiteminden de NP salınır (Murr ve ark 2005, Zimmerman ve ark 2005).

Neopterin, insan monosit ve makrofajlarından interferon-gama aracılığı ile salınmış biyolojik fonksiyonu tam olarak anlaşılmamış, kendine özgü bir reseptörü olmayan, pteridin türevi bir maddedir (Widner ve ark 2002, Durukan ve ark 2004, Zimmerman ve ark 2005). Vücut sıvılarındaki neopterin düzeyi çeşitli enfeksiyonlar, sepsis, otoimmun hastalıklar maliniteler, allgraf reddi sarkoidoz, tberkiloz, multiplisiklerozun aktivasyonu kronik arter hastalığı ,miyokard enfarks, viral enfeksiyonlar, HIV enfeksiyonu, prostat kanseri, hepataseller kanser, gastrointestinal kanser, akciğer kanseri, SARS, hepetitC, çocukların merkezi sinir sistemi hastalıkları, böbrek, karaciğer, kalp, pankreas, kemik iliği transplantasyonlarının rejeksiyonu gibi durumlarda artmaktadır, NP günümüzde hcressel bağışıklık sisteminin bir aktivasyonun biyokimyasal göstergesi olarak kabul edilmektedir, (Bozkurt ve ark 2002, Kılıç ve ark 2002, Kökçam ve ark 2002, Razumovitch ve ark 2003, Ayata ve ark 2004, Akbulut ve ark 2005, Schroecksnadel ve ark 2005)

Aktif durumdaki yardımcı_T lenfosit hücrelerinden salınan interferon-gamma, makrofajların NP üretilip vücut sıvılarına bırakmalarına yol açmaktadır. NP konsatrasyonları ile bu hücrelerin hidrojen peroksit üretimi arasında yakın ilişki bulunmaktadır, (Zevetkova ve ark 2001) böylece NP seviyesi ile bağışıklık

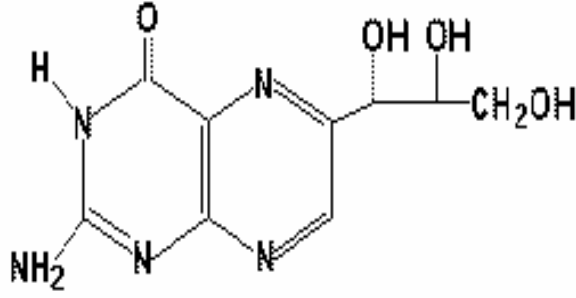
sisteminin aktivasyonu sonucu oluşan oksidatif stres değerlendirebilmektedir. NP seviyesinin T hücre poliferasyonundan 3 gün antikor üretiminden de 1 hafta önce yükseldiği bilinmektedir. NP bu özelliği ile hem hücresel bağışıklık yanıtının değerlendirilmesine yardımcı olmakta, hemde bağışıklık sistemi ile ilgili hastalıkların tanı ve takibinde kullanılabilmektedir (Durukan ve ark 2004). Günümüzde NP ölçümü ile ilgili çeşitli teknikler kullanılmakta bunlar ELİSA, RIA, HPLC olarak ifade edilebilir (Altındağ ve ark 1995, Alrashed ve ark 2002, Zangerle ve ark 2002, Soos ve ark 2003, Pichler 2004, Kiepiela ve ark 2005). Pratik ve duyarlı olması nedeniyle NP ölçümlerinde floresan dedektörlü, yüksekbasıncılı sıvı kromatografisi tercih edilir (Kılıç ve ark 2002, Bayram ve ark 2004, Engin ve ark 2005, Walsh ve ark 2005).

NP vücutta serum, beyin omurilik sıvısı, sinovyal sıvı, idrar, pankreatik sıvı, semen ve tükürükte tespit edilmiştir (Widner ve ark 2002, Wirleitner ve ark 2003, Ormazabal ve ark 2005). Damar dışına çıkmadan ve böbreklerden değişime uğramadan atıldığından idrar NP seviyesi ile dolaylı olarak interferon-gama seviyesi değerlendirilir, (Yeğen ve ark 2004, www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53) NP gebelik süresi ile artar ve son 3 ayda pik yapar, yenidoğanlarda NP konsantrasyonları maternal seviyeden 3 kat daha yüksektir çünkü gebelik boyunca monosit /makrofaj aktivasyonunda bir artış belirir (Yeğen ve ark 2004, Lercher-Hammerer ve ark 2005).

2.3.1.Neopterinin kimyasal özellikleri

NP düşük molekül ağırlıklı (253,32 gr/mol) 2 amino-4 hidroksi-[1',2',3'-trihidroksil propil) pteridin kimyasal formülüyle bilinen bir pirazinopirimidin bileşiğidir (Caksen ve ark 1998, Widner ve ark 2002). Kimyasal yapısı şekil-2'de gösterilmiştir. D-eritro, L-eritro, D-threo ve L-threo olmak üzere dört izomeri vardır. Nötral yada alkali ortamda güçlü floresans asidik ortamda zayıf floresans vermektedir (Budavari ve ark 1976, Fuchs ve ark 1992).

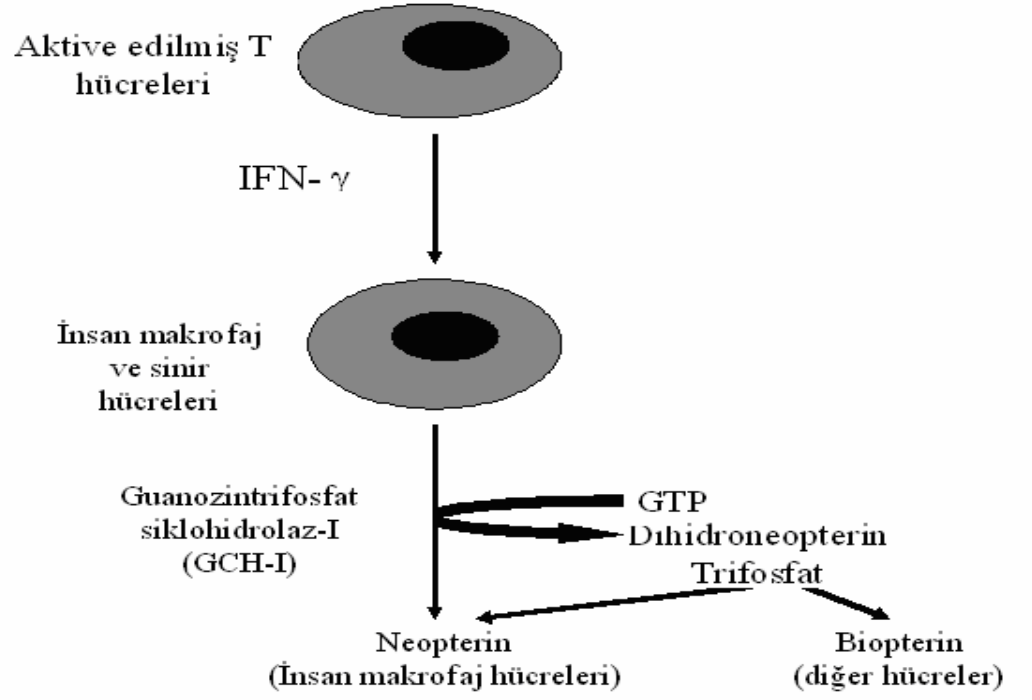
NP'nin D-izomeri sadece insan ve primatlarda bulunmakta ve metabolizmada önemli rol oynamaktadır (Abate ve ark 1989). Sıçan, kobay ve hamsterlarda ise NP'e rastlanmamıştır (Fukushima ve ark 1980).



Şekil-2: Neopterinin kimyasal yapısı

2.3.2. Neopterinin biyosentezi

NP, GTP-siklohidrolaz I (GCH-I) enzim vasıtasıyla GTP'den aktive olmuş monosit ve makrofajlardan üretilir. GCH-I pteridin biyosentezinde anahtar rol oynayan bir enzimdir. (GCH-I) enzimin aktivitesi büyük oranda IFN-gama az derecede diğer sitokinler ve IFN-gama tarafından düzenlenir, IFN-gama aktif-HELPER-Tlenfosit tip-1 (Th-1) hücreleri tarafından salınır (Altındağ ve ark 1995, Widner ve ark 2002, Razumovitch ve ark 2003). Bu hücreler NP üretimin en güçlü indükleyicileridir. GTP önce ara bir ürün olan 7,8-dihidroneopterin trifosfata (NH₂TP) dönüşür (Widner ve ark 2002). NP pirizino-primidin bileşiği olup düşük molekül ağırlıklı 2-amino-4hidroksipterindir. NH₂TP fostaz enzim aracılığıyla 7,8-dihidroneopterine ve NP'e dönüşür. NH₂TP aynı zamanda 6-piruvoil tetrahydropterin sentaz (PTPS) ve sepiapterin redüktaz enzimleri vasıtasıyla 5,6,7,8-tetrahydrobiopterine (BH₄) dönüşür. BH₄'de dihydropteridin redüktaz enzim varlığında son ürün olan biopterini meydana getirir (Werner ve ark 1992). Şekil-3 de NP'nin sentez basamakları görülmektedir.



Şekil-3: İnsanda neopterin sentez basamakları

2.3.3. Tetrahidrobiopterin (BH₄)

BH₄, GTP-siklohidroksilaz-I enzimin inhibitörüdür. BH₄ memelilerde aromatik monooksijenaz olan fenilalanin-4, tirozin-3 ve triptofan-5 monooksijenazların ve NO sentetazın kofaktörü olarak fonksiyon görmektedir. Triptofan, fenilalanin, tirozin hidroksilasyonu yapan aminoasit monooksijenazlar dopamin, norepinefrin, serotonin gibi nörotransmitterlerin biyosentezini düzenler. BH₄ biyosentezi ve tekrar oluşumundaki bir engel fenilalanin birikimine ve nörotransmitter oluşumun azalmasına yol açar. Bu da nörolojik hastalıkla sonuçlanır (Engin ve ark 2005, Lercher-Hammerer ve ark 2005).

2.3.4. Neopterinin vücuttaki biyokimyasal ve fizyolojik rolü

Vücuttaki biyokimyasal ve fizyolojik rolü henüz tam olarak açıklanamamıştır. Sitokinler tarafından stimüle olan makrofajlar H₂O₂, süperoksit, hidroksil radikalleri, reaktif oksijenmetabolitleri üretirler. NP oksijen radikallerin biyokimyasal yollarını etkileyebildiği ve makrofajlardaki nitrik oksidin sitotoksik

etkilerinin yerini de alabilir (Hyland ve ark 1988, www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53).

2.3.5. Neopterinin immünolojik rolü

Molekülleri tanıma yeteneğinde olan canlının immün sistemi, patojenlere karşı sistemin oluşturduğu bütün reaksiyonlardır. Konak organizmaya giren yabancı patojenler, antijen sunucu hücreler (antigen presenting cells, APC) tarafından karşılanmakta ve T/B lenfositlere sunulmaktadır. Timusa bağımlı antijenler ile karşılaşan APC hücreleri, antijeni Th (T helper) lenfositlere sunarken, IL-1 salarak da bu lenfositlerin çoğalmalarına ve lenfokin salgılamalarına yol açmaktadır. Timusa bağımsız antijenler doğrudan B lenfositlere sunulmaktadır. APC tarafından uyarılan Th lenfokinler, T/B lenfositleri farklılaştırmakta ve immün cevap ürünlerinin açığa çıkmasını sağlamaktadır (Erganiş ve İstanbulluoğlu 1993, Müftüoğlu ve ark 1993).

NP düzeyinin ölçülmesi hücresel immün aktivasyon direncin belirlemesini sağlamaktadır. Çeşitli hastalıklarda NP konsantrasyonları tespit edilmiş ve sTNF-R ve sIL-2R ve INF- γ gibi diğer sitokin immün aktivasyon gibi belirteçlerin konsantrasyonları ile korrele olduğu bulunmuştur (Widner ve ark 2000). Malign hastalıklı ve viral enfeksiyonlu hastaların vücut sıvılarında artmış NP konsantrasyonlarının bulunması, immün sistem bağlantılı pteridin sentezinin incelenmeye başlamasına yol açmıştır. Periferik kan hücrelerinin kullanılması ile aktive olmuş T lenfositlerden türetilen INF- γ sitümülasyonlu makrofajlardan NP sentezi olduğu gözlenmiştir (Werner ve ark 1991).

Malign ve viral hastalıklı bireylerde artmış üriner NP atılımı gözlenmiştir. Bu durum hücre büyümesi ile NP oluşumunun birlikte olduğu hipotezini ortaya çıkmasına yol açmıştır. Bu hipotez belli bakteri ve mikroorganizmaların proliferasyonunun, belirli bazı pteridinlerin oluşumundaki artış ile birlikte olduğunu gösteren *in vitro* çalışmalarla desteklenmiştir. Ancak benign tümörlerdeki çalışmalarda normal NP düzeyleri bulunmuştur. Bu durum NP yüksekliğinin kaynak olarak malign hücreler veya virüslerle enfekte hücrelerden ziyade konakçının cevabı ile ilişkili olduğu görüşünü ortaya koymuştur (Conard ve ark 1984).

Alloantijenler, viral yolla yada kimyasal olarak modifiye edilmiş otologus hücreler ve mitojenik lektinlerin uyarılması ile indüklenen insan periferik kan mononükleer hücrelerden *in vitro* olarak NP salınımı olduğu gözlenmiştir. *In vitro*

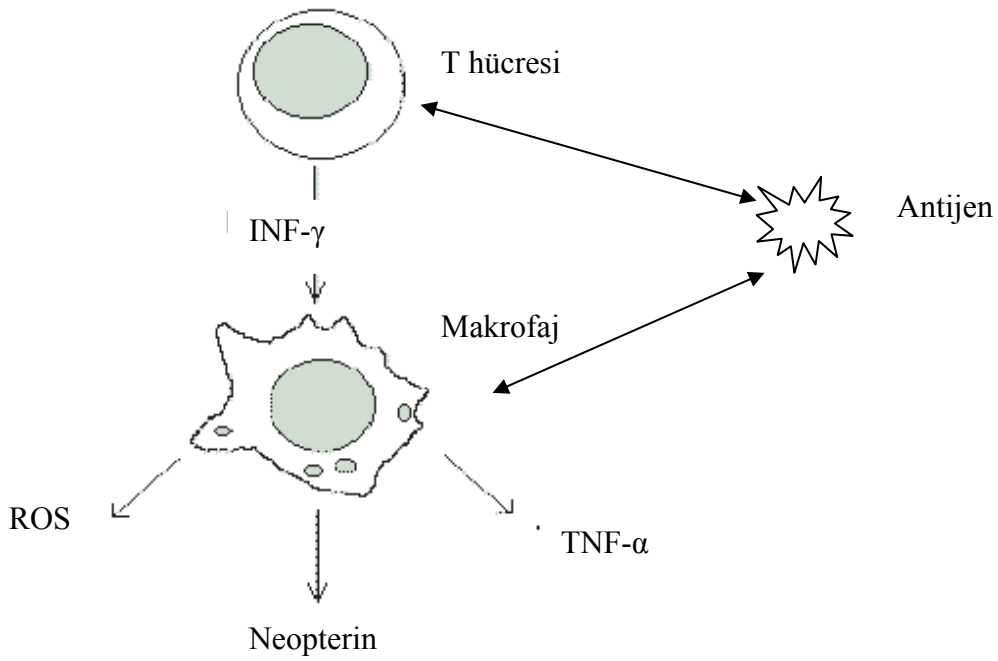
alışmalar zenginleştirilmiş periferik kan lenfositlerin mitojenler ve allojenlerle uyarılması ilk olarak 1981 yılında yapılmıştır. Daha sonra transplantasyon sonrası dönemde hastaların idrar NP düzeylerinde artış olduğu, artmış NP konsantrasyonlarla ilişkili olarak da red olayı gözlenmiştir. Böylece hem *in vitro* hem de *in vivo* veriler, hastalarda NP oluşumunun hcressel immün aktivasyonu ile oluştuğunu göstermiştir (Huber ve ark 1984).

Neopterin düzeyi, hcressel immün sistemin aktivasyonu saptamak için kullanılabilir. Hcressel immün sistem, özelikle viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, diğer inflamatuvar hastalıklar, trasplant reddi ve kanser gibi yaygın birçok hastalık türünün sebebi ve gelişiminde merkezi bir faktördür. Son alışma bulguları, redoks duyarlı metabolik yollarda NP türevlerinin muhtemel bir etkisini göstermiştir. Bu nedenle NP miktarlarında, hcressel immün cevap sırasında artış görülür. Yine NP oksidatif stresin faydalı bir belirteci olarak kullanılabilir (aksen ve ark 1998).

T lenfositler, yabancı hücreleri ve değişmiş gerçek hücre yapılarıyla karşılaştırıldıklarında farklı mediatörler veya lenfokinler salarlar. Bunlardan INF-, insan makrofajlarından NPretimini ve salınmasını şekil-4 de grldğu gibi uyarır. Başlıca aktive T-lenfositler tarafındanretilen INF-, NP sentezi için anahtar uyarıcıdır (Nichol ve ark 1985).

NP seviyesi, immünolojik uyarıya hızlı yanıt verir. INF-, aktif T helper lenfosit tip 1 ve natural killer hücreleri tarafından salınır. Salınan INF- makrofajları aktive ederek GTP-biopterin sentez yolundaki GCH-1 enzimi uyararak yüksek miktarda NPretimine yol açmaktadır (Horak ve ark 1998, Widner ve ark 1998). Bu yüzden INF- NPretiminin en güçlü indkleyicilerindendir. Vücut sıvılarında artmış NP konsantrasyonları, artmış INF- stmlasyonu belirtir. INF- Th1 hücreler tarafından salındığından NP hücre aracılı immün yanıt belirteci olabilir (Vrecko ve ark 1997, Müler ve ark 1998).

Malign hastalıklar ve viral enfeksiyonlu hastaların serum ve idrarında artmış NP konsantrasyonları hücre aracılı immünite için diagnostik ve prognostik kriter olarak kullanılabilir (Kılıç ve ark 1998).



Şekil 4: Hücresel immün yanıt esnasında aktive T lenfositler tarafından INF- γ salınımı ve bunun etkisine bağlı olarak makrofajlardan NP üretimin uyarılması.

2.3.7. Neopterin ve serbest radikaller

Yapılan çalışmalarda makrofajların sitotoksik mekanizmaları ve NP oluşumu arasında muhtemel bir ilişkinin olduğu bulunmuştur. NP üretimi, reaktif oksijen bileşiklerini serbestleştirmek için monosit/makrofajların kapasitesi ile yakından ilişkilidir (Nathan ve ark 1986).

Sitokinler tarafından sitümüle olmuş makrofajlardan hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksit, hidroksil ve diğer reaktif oksijen radikallerini oluşturduğu saptanmıştır. Makrofajlardan salınan MPO, H_2O_2 ve klorür reaktanlarını, hipokloröz asit (HOCl) veya kloramin gibi mikroorganizmalar için yüksek derecede toksik etkiye sahip bileşiklere dönüştürür (Weiss ve ark 1993).

İnterferon- γ ile uyarılmış makrofajlar reaktif oksijen üretimi yanı sıra iki pteridin sekresyonunuda yaparlar. Bunlar redükleyici olmayan NP ve redükleyici olan 7,8-dihidroneopterin. Bu iki bileşik serbest radikaller oluşumuna aracılık ederler. Redükleyici pteridinler serbest radikal temizleyicisi olarak davrandıkları gözlenmiştir. NP'nin redükte formu olan 7,8-dihidroneopterin, INF- γ aktivasyonu sonrasında insan makrofajlarında NP'e göre 1/2 oranında üretildiği bulunmuştur

(Wachter ve ark 1992). 7,8-dihidroneopterinin mikromollar konsantrasyonlarının, 2,2'-azobis (amido propan) hidroklorid, H_2O_2 ve HOCl'nin indüklediği kırmızı kan hücrelerin hemolizini inhibe ettiği gözlenmiştir (Gieseg ve ark 2001).

Tetrahidrobiopterin oksijen varlığında otoksidasyon bir eğilim göstererek süperoksit radikallerin oluşumuna yol açtığı belirlenmiştir. 7,8-dihidroneopterin stabilitesi fazla olmasına karşın, oksijene olan afinitesinden dolayı yüksek miktarlarının apoptosisi indükleyebildiği belirlenmiştir (Oetl ve ark 1999). 7,8-dihidroneopterin özellikle demir iyonları varlığında radikal oksijen türlerini oluşumu güçlendirdiği gözlenmiştir (Berdowska ve ark 2001).

Neopterinin radikal temizleyicisi olmadığı süperoksit radikallerin kaynağı olan ksantin oksidazın nonkompetatif inhibitörü olarak davrandığı, kloramin ve H_2O_2 gibi bileşiklerin toksik etkilerini artırdığı bulunmuştur (Weiss ve ark 1993).

Monosit/makrofaj ve nötrofillerden reaktif oksijen türlerin (ROS) salınımı için INF- γ güçlü indükleyicidir. INF- γ aktivasyonlu makrofajlar ile NP ve ROS arasında yakın bir korelasyon gözlenmiştir. Bu yüzden hücrelerin oksidatif potansiyeli hücre aracılı immün sistemin aktivasyon durumu ile yakın bir ilişkidir. Bundan dolayı NP üretimi, immünolojik olarak uyarılmış oksidatif stresin büyüklüğünün indirek bir ölçümü olarak da yorumlanabilir (Reibnegger ve ark 1991). Kemilüminesans çalışmalarda, NP'nin H_2O_2 , kloramin, peroksinitrit gibi çeşitli reaktif maddelerin etkilerini güçlü bir şekilde artırdığı gözlenmiştir (Weiss ve ark 1993, Wede ve ark 1995). NP'nin aktive olmuş makrofajların sitotoksik etki fonksiyonlarının endojen düzenleyicisi olarak etki ettiğini gösterilmiştir (Fuchs ve ark 1997).

2.3.8. Vücut sıvılarında neopterin

NP vücut sıvılarında stabil olup immün yanıt süresince tespit edilebilir. Bundan dolayı NP seviyelerini ölçmek zor değildir. NP düşük moleküler ağırlığından dolayı başlangıçtaki yapısı değişmeksizin böbreklerden atılır. NP kleransı inülin kleransından daha yüksektir. Çünkü NP glomüler filtrasyon yanında tübüler sekresyonla da böbreklerden atılır. Serum NP konsantrasyonlardaki değişiklikler idrar NP konsantrasyonlarında paralel bir değişikliğe neden olduğu bildirilmiştir. İdrar NP ve serum NP düzeyleri arasında pozitif bir korelasyon gözlenmiştir (Putzki ve ark 1987, Denz ve ark 1990). NP ışığa ve yüksek sıcaklığa duyarlı olduğundan saklama ve taşınma esnasında direkt güneş ışığından korunmalıdır. Ayrıca tekrar

çözme dondurma durumlarında mevcut NP miktarlarında azalma görülmüştür. NP serum, BOS, sinoviyal sıvı, idrar, pankreatik sıvı ve plazma gibi çeşitli vücut sıvılarında ölçüm yapılabilir (Berdowska ve ark 2001).

2.3.8.1. Serumda neopterin

Sağlıklı erişkin bireylerde serum NP düzeyleri 10 nmol/L üst limit olarak kabul edilmektedir. Serum NP konsantrasyonları yaşa bağımlı olup, yaşlı ve çocuklarda daha yüksek genç olmakla bir ilişkisinin bulunmadığı ve cinsiyete bağlı olmadığı bildirilmiştir (Werner ve ark 1987, Diamondstone ve ark 1994, Ledochowski ve ark 1999, Oetl ve ark 1999).

Fetal serum NP düzeyleri kordosentez tarafından belirlenir gebelik yaşı ile birlikte NP düzeyleri artmakta ve son trimesterde pik yapar. Yeni doğanlarda serum NP düzeyleri, 8maternal serum düzeylerinden üç kat daha yüksek olduğu gözlenmiştir. Çünkü gebelik boyunca monosit/makrofaj aktivasyonunda artış olur. Fetal ve maternal serum NP düzeyleri önemli bir korelasyon gözlenmemiştir. Normal gebelikte maternal serum NP düzeyinde çok az bir artış olmakta fakat bu artış fetal değerlere ulaşılmayacak kadar azdır. Çünkü fetal kompartman maternal metabolizmasından izoledir. Maternal serum NP düzeyleri 6-12 ay sonra normal değerlere ulaşır (Radunovic ve ark 1999, Burns ve ark 1999, <http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon>). Alınan venöz kan örneklerinden plazma veya serum ayrımı esnasında NP kaybı olmadığı tahmin edilmektedir. Serum ve plazma NP düzeyleri karanlık bir yerde oda ısısında üç güne kadar stabildir. Daha uzun bir süre için saklanılacaksa -20 °C’de üç aya kadar, -80 °C’de ise bir yıla kadar dayanıklıdır (Wacher ve ark, www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53).

2.3.8.2. İdrarda neopterin

Günlük NP atılımında çok önemli bir değişiklik olmadığı için sonuçların idrar kreatinin derişimleri açısından açıklanması şartıyla rastgele idrar örnekleri kullanılabilir. İdrar NP düzeyleri kreatinin düzeylerine göre belirlenir (Bichler ve ark 1983). İdrar NP normal değerleri 50-250 umol NP/mol kreatinin’dir (Müler ve ark 1991). Ortalama NP/kreatinin oranının erkeklerde kadınlara göre daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu farkın erkeklerde kreatinin düzeylerinin kadınlara kıyasla daha yüksek olmasından kaynaklandığı bildirilmiştir (Wacher ve ark 1989).

İdrar örneklerin çalışılmadan önce toplanması ve saklanması çok önemlidir. Bundan dolayı idrarı en iyi koruma yöntemi askorbik asit bulunan bir kaba boşaltarak toplamaktır. Eğer idrar küçük çocuklardan toplanacaksa askorbik asit doğrudan idrar toplama torbasına konularak çıkarılmalı ve idrar ışık geçirmeyen bir kaba aktarılarak en kısa zamanda çabucak dondurulmalıdır. Bu şekilde toplanan idrar örnekleri -20 °C birkaç ay -80 °C'de ise daha uzun süre stabil kalır (Watcher ve ark 1989).

2.3.8.3. Beyin omurilik sıvısında (BOS) neopterin

BOS NP düzeyleri cinsiyete göre fark bulunmamaktadır. Sağlıklı yetişkin bireylerde BOS NP düzeyleri $4,2 \pm 1,0$ nmol/L'dir(58). Beyin omurilik sıvısı (BOS) örneklerin yanlış toplanması, saklanması ve işlenmesi mevcut NP konsantrasyonlarında daha düşük ölçümlere neden olmaktadır. İçinde 1 mg/ml ditioeritritol (DTE) ve 1 mg/ml asetilen triamin penta asetik asit bulunan tüplere BOS örnekleri alınmak suretiyle bu problemin üstesinden gelinebilmektedir. Bu şekilde toplanan BOS dondurularak bir yıldan daha fazla stabil kalmakta ve çözündükten iki saat sonra da oda ısısında stabil kalır (Lang ve ark 1984, www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=53).

2.3.8.4. Diğer biyolojik sıvılarda neopterin

NP serum, idrar ve BOS vücut sıvıları dışında sinoviyal sıvı, pankreatik sıvı ve saliva da saptanabilir (Berdowska ve ark 2001). Lokal makrofaj aktivasyonun bir göstergesi olarak NP diğer vücut sıvılarında bulunmaktadır. Romatoid artiritli hastaların eklem sıvısında, pankreas graft rejeksiyonunda pankreatik sıvıda, hamilelikte amniyotik sıvıda NP düzeylerine bakılmıştır (Brattstrom ve ark 1989)

2.4. Neopterin ölçüm teknikleri

Vücut sıvılarında NP düzeyleri ELİSA, RIA, elektroforez, GC-MS, kolon ve kağıt kromatografisi, ince Tabaka Kromatografisi, HPLC-floresans veya elektrokimyasal detektörleriyle belirlenebilir (Tilg ve ark 1987, Hyland ve ark 1988, William ve ark 1998).

2.4.1. HPLC

HPLC 1970'lerin ortalarında keşfedildi ve kolon dolgu materyallerinin ve de on-line detektörlerin geliştirilerek kullanılmaya başlamasıyla hızlı bir şekilde

gelişmiştir. Günümüz klinik laboratuvarlarında pterinlerin kromatografik analizi hemen hemen tümüyle HPLC tekniklerine dayanmakta ve çalışmaların pek çoğu çeşitli hastalıklarda NP ve biopterin ölçülmesini gerekli kılmaktadır. Floresans veya (elektro kimyasal detektör (ECD) ile bu pterinler katyon değişimi, ters-faz veya ters-faz iyon çifti kromatografisi ile ayrıştırılmaktadır (Fuchs ve ark 1992).

2.4.2. Floresans deteksiyon

Floresans tespit yöntemi, biyolojik numunelerdeki pterinlerin ölçülmesi için gerekli hassasiyete ve seçicilik özeliğine sahiptir. Burada sadece oksitli pterinler, hepsi olmasa da bir çoğu floresans verir ve indirgenmiş olan formlarında endojen olarak var olmaları bir sorun oluşturur. İndirgenmiş olan pterinler bu açıdan analiz öncesinde kimyasal olarak okside forma dönüştürülmeleri gerekmektedir (Fuchs ve ark 1992, Altındağ ve ark 1995). Asidik ve alkali koşullarında pterinlerin iyotla farklı şekilde oksitlendiği bir metot kullanılarak biopterinin üç oksidasyon durumu olan biyopterin, dihidrobiopterin ve tetrahidrobiopterin'i ölçülmesi mümkün olmaktadır (Fuchs ve ark 1992).

2.4.3.Elektrokimyasal deteksiyon

Floresans tesbiti indirgenmiş olan pterinlerin doğrudan ölçümüne imkan vermez, indirgenmiş pterin konsantrasyonlarının tahminin başarıyla yapılması için farklı oksidasyon işlemi kullanılır. Elektrokimyasal tesbit metodu, biyolojik numunelerdeki oksitlenmiş ve azalmış olan endojen pterinlerin doğrudan analiz metodudur (Fuchs ve ark 1992, Altındağ ve ark 1995).

3.MATERYAL VE METOD

3.1. Materyal

Bu çalışmada Mayıs 2006 ile Ağustos 2006 tarihleri arasında Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kan Bankasına ve Merkez Mikrobiyoloji Laboratuvarına gelen bireylerin kan örneklerinden randomize seçilen 138 serumda NP düzeylerine bakıldı. Alınan örneklerde rutin laboratuvarlarında Hepatit B, C ve HIV markırlarına bakılmıştır. Çalışmamızda alınan kanlarda HIV pozitif hastalara rastlanmadığından örnekler kontrol (Hepatit markırları negatif), Hepatit B pozitif ve Hepatit C pozitif olgular olarak sınıflandırıldı. Kontrol grubu 66, Hepatit B grubu 42, Hepatit C grubu 30 kişiden oluşmuştur. Kontrol grubu herhangi bir bilinen hastalığı olmayan ve sağlıklı görünümde olan ve kan bankasında kan bağıışı yapan bireylerden oluşmuştur. Bu gruplar için ayrı ayrı NP düzeyleri ölçüldü.

3.1.1. Kullanılan cihaz ve kimyasal maddeler

Neopterin	Sigma (ABD)
Potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4)	Sigma (ABD)
Dipotasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4)	Merck (Almanya)
Ortofosforik asit (H_3PO_4)	Riedel da Haen (Almanya)
Metanol	Merck (Almanya)
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi (HPLC)	Agilent 1100 series (Almanya)
Floresans detektör	
Otomatik örnekleme sistemi (ChromSystems programmable autosampler CLC 200)	
Pompa	
Mikroişlemci	
Kromatografi programı (HP ChemStation for LC)	

Kolon

Analitik kolon (Analytical Column): C₁₈ hidrokarbon zincirine bağı silika içeren, partikül büyüklüğü 5µm olan, 4.6 x 250 mm boyutlarındaki Allsphase ODS-2 reverse-Phase kolonu (HICHRON, Waters Spherisorb, U.K).

Vorteks (Heidolph REAX top)

Santrifüjler

Su arıtma cihazı (Mini Pure)

Değişik hacimlerde otomatik pipetler (Medisis)

Teraziler

Hassas terazi (SHIMADZU, Japonya)

Tek kefe terazi (SCALTEC, Almanya)

Scheicher and Schuell örnek süzme filtresi (selüloz asetat 0,45 µm)

Ph metre (inoLab pH 720, Almanya)

Derin dondurucu (Jouan , Danimarka)

3.1.2. Kullanılan çözeltiler

1) Mobil faz için kullanılan fosfat tamponu stok çözeltisi:

102.1 g KH₂PO₄ ve 43.6 g K₂HPO₄ tartılarak bir miktar distile suda çözüldükten sonra son hacim 1000 mL'ye tamamlandı ve çalışılincaya kadar 4 °C'de buzdolabında saklandı.

2) Mobil faz için kullanılan fosfat tamponu çalışma çözeltisi (0.015 mol/L):

Stok çözeltinin 15 ml'sine 950 ml distile su ilave edildi. pH'ı 6.4'e konsantre H₃PO₄ ile ayarlandıktan sonra distile su ile son hacim 1 L'ye tamamlandı. 0.20 µm'lik mikrofiltreden süzüldü. Çalışma çözeltisi her gün taze olarak hazırlandı.

3) Neopterin standardı stok çözeltisi (0.039 mmol/L):

10 mg neopterin 1000 ml degaze edilmiş distile suda, ışıktan korunarak çözüldü. Çalışma yapılarına kadar -80 °C'de muhafaza edildi.

4) Neopterin standart çözeltileri :

Neopterin stok çözeltisinden seri dilüsyonlar yapılarak 500, 250, 125, 62.5, 31.125, 15.56 nmol/l'ük neopterin standart çözeltileri ışıktan korunarak hazırlandı. Kahverengi ependorf tüplere konulan örnekler çalışma yapılana kadar -20 °C saklandı.

3.2. Metod

3.2.1. HPLC sistemi ve gerekli donanımlar

Neopterin ölçümü için gerekli olan minimum HPLC sistemi izokratik pompa, enjeksiyon valfi, seperasyon kolonu, florometrik detektörüdür. Floresans ölçümü 353 nm eksitasyon ve 438 nm emisyon dalga boylarında yapıldı. Neopterin tayini Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya laboratuvarında bulunan HPLC cihazında gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışmada örneklerin toplanması

Selçuk Üniversitesi Meram Tıp.fakültesi kan bankasına kan bağışı yapmak üzere gelen bireylerden sağlıklı olanlar kontrol grubunu bulaşıcı enfeksiyon hastalığı taşıyıcıları ve hastaları hasta grubunu oluşturmuş ve örnekler alınmıştır.

3.4. Örneklerin hazırlanması

Serum neopterin ölçümü için düz tüplere alınan kanlar santrifüj edildi. Serumlar düz tüplere ayrıldı ve ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyolara sarıldı ve serumu ayrılarak kahverengi ependoflara alınarak -20 C'de çalışma saatine kadar saklandı, çalışma sırasında serumdaki proteinleri deproteinize etmek için 0,5ml serum üzerine 0,1ml 2 mol/l TCA ilave edilerek vortekslendi ve 10,000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant NP ölçümü için kullanıldı.

3.5. Deneyin yapılışı

Serum neopterin ölçümü için düz tüplere alınan kanlar ışıktan korumak amacıyla alüminyum folyoya sarıldı. Serumları ayrılarak kahverengi ependorf tüplere konup hemen çalışıldı. Analiz sonucunda Şekil 3.3. de görülen standart grafik tablosundan sonuçlar belirlendi. Bunu sonuçları elde etmek için HPLC

cihazında alan olarak elde ettiğimiz sonuçları Excel Programına girip ve standart grafiğimiz üzerinden elde ettiğimiz sonuçları formülize ederek hesaplandı. Eğer analiz hemen yapılmayacaksa -20°C 'de çalışma saatine kadar deepfreeze saklanmalıdır. Çalışma sırasında serumdaki proteinleri deproteinize etmek için 0,5ml serum üzerine 0,1ml 2 mol/l TCA ilave edilerek vortekslendi ve 10,000 devirde 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant NP ölçümü için kullanıldı.

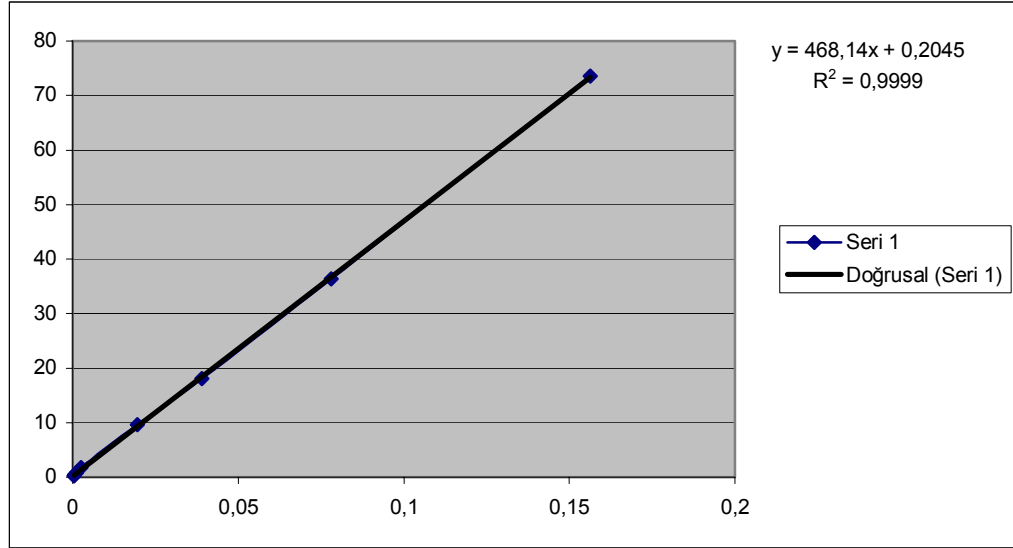
Tablo 2: HPLC sistemine ait çalışma koşulları ve sistem parametreleri

Çalışma koşulu	Sistem parametreleri
HPLC modeli	Agilent 1100
Dedektör	Floresans dedektör
Mobil faz	Ph 6.4, 0.015 mol/L fosfat tampon
Analitik kolon	4.6x250 mm, allsphere ODS-2 C18 5 μm reverse-phase kolon
Koruyucu kolon	Spherisorb ODS-2, C18 5 μm reverse-phase cartridge
Kolon sıcaklığı	25 C
Dalga boyu	353 nm eksitasyon ve 438 nm emisyon
Akım hızı	0.8 mL/dakika
Çalışma süresi	20 dk
Örnek hacmi	20 μl
Ayırım (elution)	Ters faz iyon değişimi

NP ölçümü için kullandığımız HPLC nin çalışma koşulları ve parametreleri tablo-2 de verilmiştir. Neopterin konsantrasyonlarının değerlendirilmesi için seri olarak hazırlanmış olan standartlar ile yapılan çalışma sonucunda elde edilen pik alanları hesaplandı. Şekil 4'de çizilen kalibrasyon eğrisi ve elde edilen regresyon denklemi kullanılarak çalışma örneklerine ait NP konsantrasyonları hesaplandı.

Sekiz değişik konsantrasyonda hazırlanan NP standartlarıyla yapılan ölçümlerde elde edilen regresyon grafiği ve denklemi şekil 2'de gösterilmiştir.

Regresyon grafiğinde de görüldüğü gibi konsantrasyon ile pik alanı arasında yüksek derecede korelasyon saptanmıştır.



Şekil-4: NP standart grafiği

3.6. İstatistiksel analizler

İstatistiksel analizler için SPSS 13 (Statistical Package for Social Sciences version) paket programı kullanıldı. Serum neopterin değerlerinin normal dağılım gösterip göstermedikleri Kolmogorov-Smirnov testi ile incelenmiş, test sonucuna göre serum neopterin kontrol ve hepatit B pozitif olgu değerlerinin normal dağılım gösterdikleri, hepatit C değerlerinin ise normal dağılım göstermediği bulunmuştur. Bu sonuçlara göre kontrol ve hepatit B pozitif olguların neopterin değerleri bakımından grup 1 ve grup 2'nin karşılaştırılması için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Independent t testi ve hepatit C neopterin değerleri için bağımsız iki grup karşılaştırma testlerinden Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. Sonuçlar için $p < 0.05$ anlamlılık değeri olarak belirlendi.

4. BULGULAR

Hastanemize ait kan bankasına, kan bağışında bulunan kişiler ve merkez mikrobiyoloji laboratuvarına baş vuran kişilerden (hepatit B pozitif ve hepatit C pozitif) kan örnekleri toplandı.

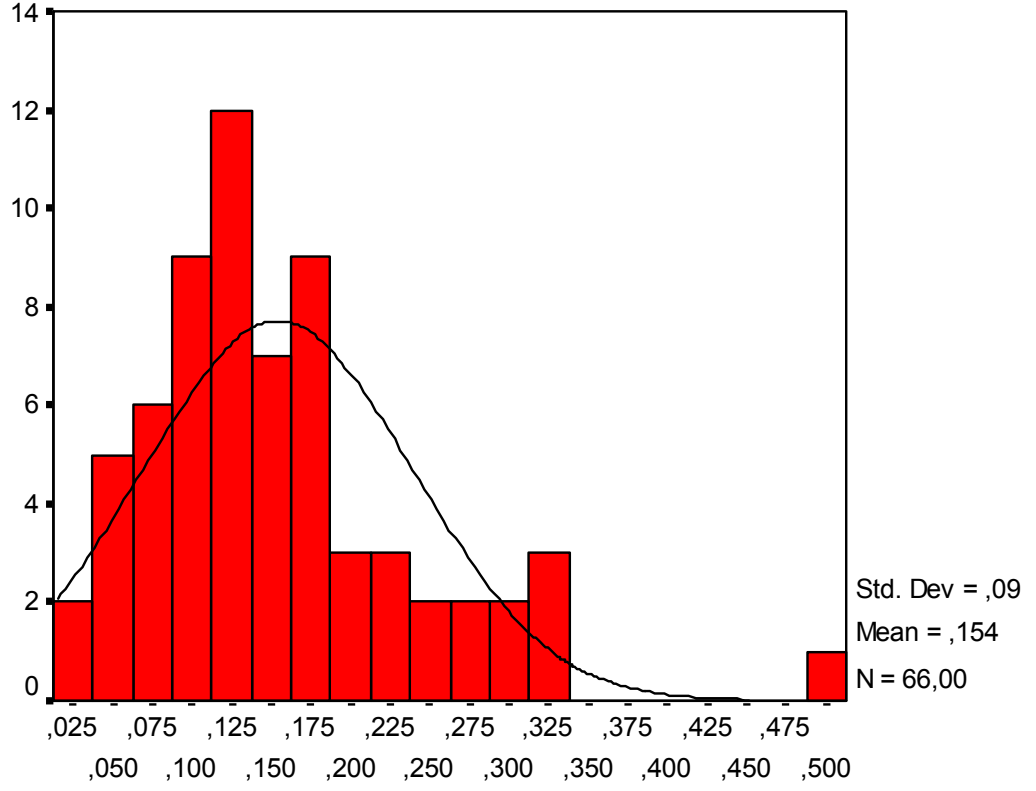
4.1. Serum neopterin sonuçları

Kontrol, hepatit B pozitif ve Hepatit C pozitif serum NP düzeyleri aritmetik ortalaması, standart sapmaları ve minimum maksimum değerleri tablo-3 de verilmektedir. Kontrol grubu ile viral hepatitli hastalar incelendiğinde her iki grup arasında da önemli bir farka rastlanmamıştır. Hepatit B grubu en düşük neopterin seviyelerine sahip iken Hepatit C grubu en yüksek neopterin değerlerine sahip grup olarak görülmektedir.

Tablo-4 : Kontrol grubu, HBS+, HCV+, ve toplam hepatit bireylerinin NP dağılımı

	N	Minimum	Maximum	Ortalama μmol/l	Std. Sapma
KONTROL	66	0,0183	0,4925	0,1541	0,0851
Hepatit Total	72	0,0147	4,67	0,446	0,0952
HBB	40	,0147	0,28	0,1091	0,066
HBC	32	0,02	4,67	0,8684	0.1319

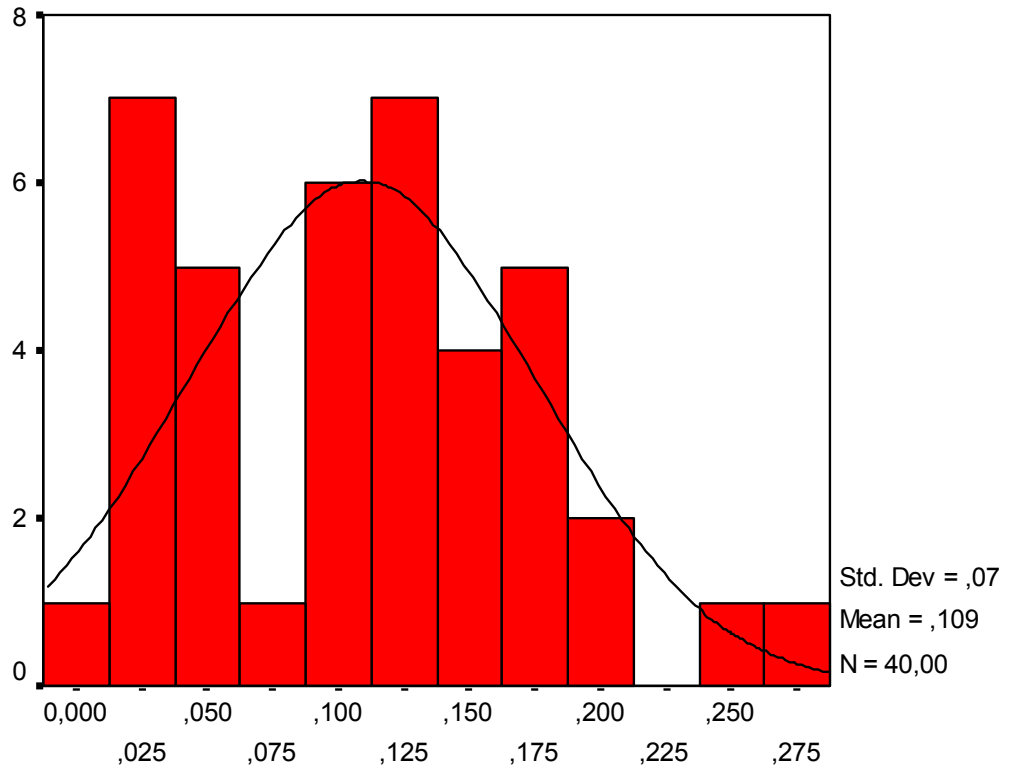
Kontrol grubu (grup 1) ndaki neopterin sonuçlarının dağılımı ve bu dağılımın eğrisi şekil-5’de gösterilmektedir.



KONTROL

Şekil-5 : kontrol grubunun NP değerleri ve bu dağılımın eğrisi

Hepatit B pozitif hasta grubundaki NP sonuçlarının dağılımı ve bu dağılımın eğrisi şekil-6 da gösterilmektedir.



HBB

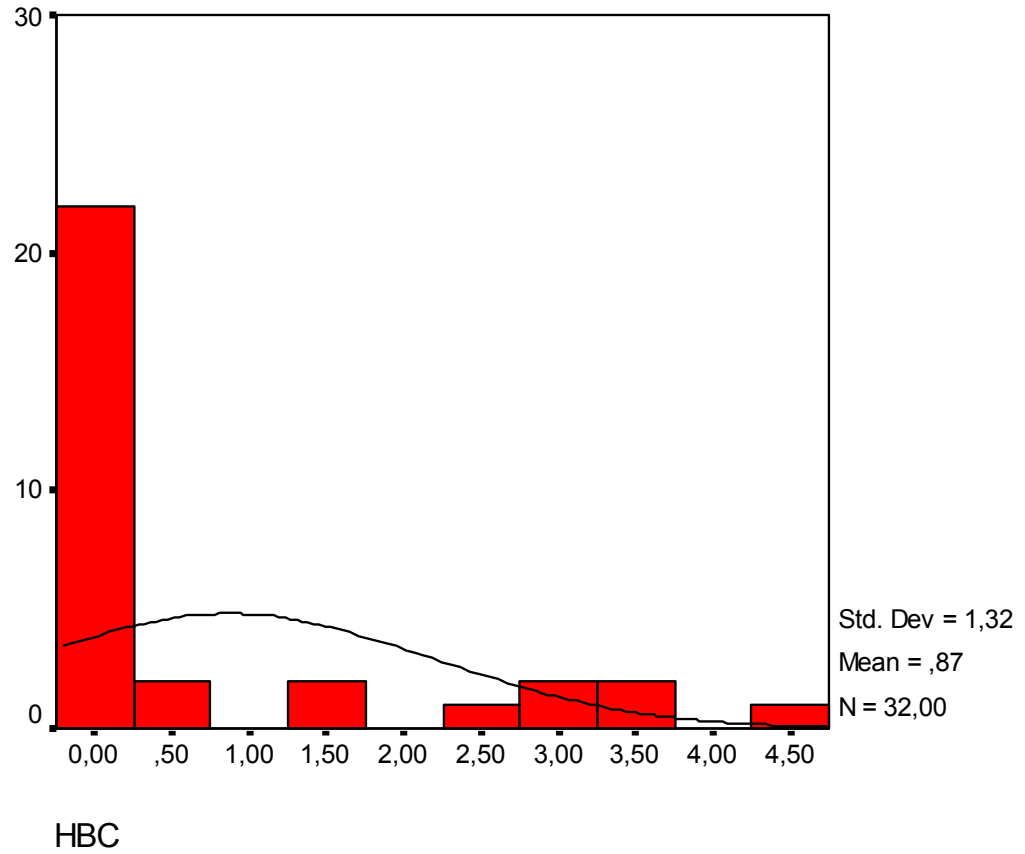
Şekil-6 : HBB + grubunun NP değerleri ve bu dağılımın eğrisi

Kontrol ve HBB+ olgular arasında serum NP değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur (p:0.005,tablo-4). HBB + olgulardaki NP düzeyleri kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı derecede düşüklük saptanmıştır.

Tablo-4: HBB + hastalardaki NP değerleri

Grup	n	Ortalama	Std. Deviation	p
Kontrol	66	0.154	0.08	0.005
Hepatit B pozitif	40	0.109	0.066	

HBC + hasta grubundaki NP sonuçlarının dağılımı ve bu dağılımın eğrisi şekil-7 de görülmektedir.



Şekil-7: HBC + hasta grubu ve bu grubun NP sonuçları ve dağılımın eğrisi

Kontrol ve HBC + grupları arasında serum NP değerleri arasında istatistiksel anlamlı bir fark bulunmuştur (p:0.005 tablo-5).

Tablo-5: HBC hastalardaki NP dağılımı

	Median	1-3 çeyrek	Minimum	Maksimum	P
Kontrol	0.1347	0.096-0.1876	0.02	0.49	
HBC	0.185	0.101-1.281	0.02	4.67	0.028

HBB+ ve HBC+ arasında serum NP değerleri arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p:0.005, tablo-6)

Tablo-6: HBC ve HBB grupları arasındaki NP dağılımı

	Median	1-3 çeyrek	Minimum	Maksimum	P
HBB	0.1123	0.044-0.154	0.01	0.28	
HBC	0.185	0.101-1.281	0.02	4.67	0.000

5. TARTIŞMA

NP, GTP'den sentezlenen bir pteridin bileşigidir. NP insan monosit/makrofajlarının INF- γ ile uyarılması sonucu salınan bir metabolittir. INF- γ T hücrelerinin uyarılma derecesine bağılı olarak salınır. Bu nedenle biyolojik fonksiyonu tam olarak bilinmemesine rağmen, NP'in uyarılmış hücrel immün yanıtın biyokimyasal bir belirteci olarak kabul edilmektedir (Huber ve ark 1984, Bozkurt ve ark 2002).

GTP siklohidrolaz-I enzim aracılığı ile GTP'den 7,8-dihidroneopterin trifosfat, daha sonra NP oluşmaktadır. Ayrıca NP'nin yanında BH₄'de oluşmaktadır. Bilindiğı gibi BH₄ tirozin hidroksilaz, fenilalanin hidroksilaz, triptofan-5- hidroksilaz ve nitrik oksit sentaz gibi enzimlerin kofaktörüdür. İnsan monosit ve makrofaj kültürlerinde yapılan in vitro ve in vivo çalışmalarda INF- γ sitümülasyonlu deneylerde ortamda çok miktarda NP ve reaktif oksijen türlerinin biriktiğı gözlenmiştir. Ayrıca NP ve 7,8- dihidroneopterin ksantin oksidazı inhibe ettiğı gözlenmiştir (Reibnegger ve ark 1991, Berdowska ve ark 2001).

Çeşitli kanser hastalarının idrarlarında NP artışının gözlenmesi immünolojik aktivasyon belirteci olarak NP'e ayrı bir önem verilmesine yol açmıştır. Bununla birlikte araştırmalar daha genişletilerek enfeksiyon, otoimmün, koroner arter hastalıkları, kalp ve böbrek yetmezliğı gibi farklı hasta gruplarında çalışmalar yapılmaya başlanmış ve artmış idrar ve serum NP düzeyleri gözlenmiştir (58,65). Bu gelişmelerin neticesinde hem biopterin hemde NP'nin ölçümü çeşitli klinik durumların değerlendirilmesinde kullanım alanı bulmuştur (Cornard ve ark 1984, Berdowska ve ark 2001).

Çalışmamızda kontrol ve hepatit B li olgularda normal dağılım gösteren NP bulgularına rastlarken hepatit C'li olgularda oldukça dağınık dağılım gösteren NP bulgularına rastladık. Hepatit C grubuna ait NP değerleri Hepatit B ve kontrol grubuna göre oldukça anlamlı derecede yüksek çıktı. Kaleli ve arkadaşları (2006) yaptıkları çalışmada çalışmamıza benzer olarak nonreplikatif hepatit B olgularında neopterin düzeylerini kontrol grubu ile benzer olduğunu göstermişlerdir. Farklılığın sadece replikatif hepatit b olgularında olduklarını göstermişlerdir. Buna karşılık Kılıç ve arkadaşları (2002) yaptıkları çalışmada nonreplikatif hepatit B olgularında

neopterin düzeylerinin kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek olduğunu bulmuşlardır.

Grüngrief ve arkadaşları (1999) hepatit C olgularında kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek oranda neopterin düzeylerini saptamışlardır. Buna karşılık aynı grup interferon tedavisine verilen cevap ile neopterin düzeyleri arasında herhangi bir fark bulamamışlardır. Bizim çalışmamızda da hepatit C olgularının neopterin düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı derecede yüksek bulunmuştur. Yalnız belirgin hasta gruplarında bunun yüksek bulunması yüksek olan hastaların daha geniş boyutlu taranmasını gerektirmektedir.

Çalışmamız sonuçları ışığında kan merkezinden alınan kan örneklerinde sadece NP değerlerine bakılarak viral enfeksiyon taramanın oldukça riskli olabileceğini göstermektedir. Kronik viral hepatit B taşıyıcıları kontrol değerlerine çok yakın değerler verebilmektedir. Çalışmamızda replikative hepatit b bulguları bulunmadığından bu gruptaki değerleri değerlendiremedik. Yine literatürde hepatit B taşıyıcı olgularda hastalık süresinin neopterin düzeylerine olan etkisine rastlamadık. Hastalığı taşıma periyodunun neopterin düzeyine olan artırıcı, azaltıcı etkileri konusunda herhangi bir bilgiye rastlayamadık.

Çalışmamıza dahil edilen hastaların farklı kurumlar tarafından takip ve tedavilerinin gerçekleştirilmesi de hastaların hastalığının hangi boyutlarda olduğu konusunda bilgi edinemedik. Yine hastaların almış olduğu medikal tedavi hakkında da daha detaylı bilgilere ulaşamadık. Bu nedenle herhangi bir medikasyonun neopterin düzeylerine olan etkisini değerlendiremedik.

Bununla birlikte hepatit c olgularında oldukça yüksek değerlerde neopterin düzeylerine rastlanması bu hastalarda NP'nin hastalığın taranmasında, prognozunda kullanılabilecek muhtemel bir markır olabileceğini göstermektedir. Biz hastalarla ilgili gerekli detaylara ulaşamadığımızdan yüksek NP değerlerinin herhangi bir akut enfeksiyonun varlığını ya da enfeksiyonun ilerlemesi ile ilgili bir nedene mi bağlı olduğunu değerlendiremedik. Böyle bir değerlendirme yapabilmek için daha detaylı ve hasta sayısı daha çok olabilen çalışmaya ihtiyaç vardır. Hasta takipli yapılabilecek olan daha uzun süreli bir çalışma ile neopterin-hepatit c virüs enfeksiyonu arasındaki ilişki net şekilde ortaya konabilir.

6. KAYNAKLAR

- Abate G, Camella P, Marfella A (1989)** *Prognostic Relavance of Urinary Neopterin in NonHodgkin's Lymphomas Cancer*, 1989,63,484-489.
- Akay MT (2001)** *Genel Histoloji*, Palme Yayıncılık, Ankara.
- Akbulut H, Bulut S, Berilgen M, Kansız, F (2005)** *Serum neopterin levels in the patients of multiple sclerosis*, Türkiye Klinikleri J. Med.,2005, 25, 178-182.
- Alrashed M, Abugoush M, Akgül EÖ, Erbil K, Boyunağa H, Almarafı A, Akman Ş, Kutluay T (2002)** *Serum ve idrar neopterin düzeylerinin yüksek basınçlı sıvı kromatografisi ile saptanması ve klinik uygulaması*, Gülhane Tıp Dergisi, 2002, 44 (3): 273-277
- Altındağ Z, Şahin G, Kansu E, Duru S (1995)** *Urinary neopterin levels in patient with leukemia*, New Journal of Medicine, 29-32.
- Altindag ZZ, Sahin G, Inanici F, Hascelik Z (1998)** *Urinary neopterin excretion and dihydropteridine reductase activity in rheumatoid arthritis*. Rheumatol Int, 1998;18(3):107-111.
- Ayata A, Genç H, Sütçü R (2004)** *Çocukluk çağı enfeksiyonlarının tanı ve takibinde prokalsitonin, neopterin ve C-reaktif proteinin rolü*, Tıp Araştırmaları Dergisi, 2 (1): 11-17.
- Baban N (1995)** *Klinik Biyokimya I. Bölüm Biyokimyaya Giriş ve İmmünoloji, İ. Ü.*
- Bayram M, Bayram O, Boyunaga H, Ozer G (2004)** *A research on the level of urine neopterin to see if it may provide a vital clue for a provisional diagnosis of breast cancer in menopausal women*, Maturitas 48, 432-437
- Beigel J (2005)** *The emerging utility of neopterin?*, Clinical Immunology 116: 1-2
- Berdowska A, Zwirska-Korczala K (2001)** *Neopterin measurement in clinical diagnosis*. Journal of Clinical Pharmacy & Therapeutics, 26(5):319-329.
- Bichler A, Fuchs D, Hausen A, Hetzel H, Reibnegger G, Wachter H (1983)** *Measurement of urinary neopterin in normal pregnant and non-pregnant*

women and in women with bening and malign genital tract neoplasma. Arch. Gynecol, 233(2):121-130.

Bilgehan H (1987) *Temel Mikrobiyoloji ve Başışıklık Bilimi*, Barış Yayınları, İzmir

Bozkurt E, Gödekmerdan A, Elbasan Z, Alp N (2002) *Akut koroner sendromlu hastalarda yeni bir inflamasyon göstergesi olan serum neopterin seviyeleri*, Türk Kardiyoloji Derneği Araştırması, 30: 473-477.

Bracher A, Eisenreich W, Schramek N, Ritz H, Gotze E, Herrmann A, Gutlich M, Bacher A (1998) *Biosynthesis of pteridines. NMR studies on the reaction mechanisms of GTP cyclohydrolase I, pyruvoyltetrahydropterin synthase, and sepiapterin reductase*. J Biol Chem, 1998;273(43):28132-28141

Brattstrom C, Tyden G, Reinolt FP, Bohman SO, Borgstrom A, Backman L, Bolinder J, Groth CG (1989) *Markers for pancreas-graft rejection in humans*. Diabetes, 38(1):57-62.

Budavari S, O'Neil MJ, Smith A, Heckelman PE (1976) *The Merck Indeks 9th Ed.* Merck & Co. Inc. Rahway NJ,161-840

Burns DN, Nourjah P, Wright DJ (1999) *Changes in immune activation markers during pregnancy and postpartum* Journal of Reproductive Immunology, 42:147-165

Conard F, Bodner E, Fuchs D (1984) *Determination of neopterin a marker of cellular immunity in gastrointestinal and pancreatic carcinoma*. In : Pflleiderer W, Wachter H, Curtius HC. Biochemical and Clinical Aspects of Pterdines, 357-366

Çaksen H, Üstündağ HB, Çiftçi A (1998) *Neopterin ve klinik tanıdaki önemi*, Türk klinikleri pediatri, 7:206-213

Denz H, Fuchs D, Huber H, Nachbaur D, Reibnegger G, Thaler J, Werner ER, Wachter H (1990) *Correlation between neopterin, interferon gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders*. Eur J Haematol, 44(3):186-189.

- Diamondstone L, Tollerud DJ, Fuchs D (1994)** *Factors influencing serum neopterin and β_2 -microglobulin levels in a healthy diverse population.* Journal of Clinical Immunology, 14:368-374.
- Duch DS, Bowers SW, Woolf JH, Nichol CA (1984)** *Biopterin cofactor biosynthesis: GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin tissues and body fluids of mamalian species.* Life Sci, 35(18):1895-1901
- Durukan HA, Hürmeriç V, Akgül EÖ, Erdem Ü, Kılıç S, Erbil K, Bayraktar Z (2004)** *Üveitli olgularda idrar neopterin seviyesi ile hastalık aktivitesi arasındaki ilişkinin değerlendirilmesi,* Medikal Network Oftalmoloji, 11 (3), 238-242.
- Engin AB, Ergun MA, Yurtcu E, Kan D, Sahin G (2005)** *Effect of ionizing radiation on the pteridine metabolic pathway and evaluation of its cytotoxicity in exposed hospital staff,* Mutation Research, 585, 184-192
- Eigel J (2005)** *The emerging utility of neopterin?*, Clinical Immunology 116: 1-2
- Erganiş O, İstanbulluoğlu E (1993)** *İmmünoloji, Mimoza Yayınları, Konya*
- Fredrikson S, Link H, Eneroty P (1987)** *CSF neopterin as marker of disease activity in multiple sclerosis.* Acta Neurol Scand, 75(5):352-355.
- Fuchs D, Weiss G, Wachter H (1993)** *Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions.* Int Arch Allergy Immunol, 101(1):1-6.
- Fuchs D, Kalkovsky M, Reibnegger G (1989)** *Endogenous release of interferon-gama and diminished response of periferal blood mononuclear cells to antigenic stimulation.* Immunol Lett, 23(2):103-108.
- Fuchs D, Hausen A, Reibnegger G, Werner ER, Dierich PM (1988)** *Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity:application in HIV infection* Immunology Today, 9(5):50-155.
- Fuchs D, Weiss G, Reibnegger G, Wachter H (1992)** *The role of neopterin as a monitor of cellular immune activation in transplantation, inflammatory, infectus and malignant disease.* Critical Reviwes in Clinical Laboratory Sciences, 29(3,4):307-341

- Fuchs D, Wede I, Baier BG, Wachter H (1997)** *Scandalios J, Ed. Reactive oxygen and apoptosis, Oxidative stress and the molecular biology of antioxidant defenses.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 139-167
- Fuchs D, Werner ER, Wachter H (1992)** *Soluble products of immune activation, neopterin* In, Rose R.R, deMacario EC, Fahey JL, Friedman H, Penn GM. *Manual of clinical laboratory immunology.* 4nd Ed. Washington, D.D, American Society for Microbiology, 251-255.
- Fukushima T, Nixon JC (1980)** *Analysis of reduced forms of biopterin in biological tissues and fluids,* Anal. Biochem, 102(1):176-188.
- Giese SP, Whybrow J, Glubb D, Rait C (2001)** *Protection of U937 cells from free radical damage by the macrophage synthesized antioxidant 7,8-dihydroneopterin,* Free Radical Res, 35:311-318
- Grüngreiff K, Reinhold D, Ansorge S (1999)** *Serum concentrations of sIL-2R, IL-6, TGF- β 1, neopterin, and zinc in chronic hepatitis C patients treated with interferon-alpha,* Cytokine 11:1076-1080.
- Haavik J (1989)** *From butterflies to neurobiology and the diagnosis of AIDS, The 100th anniversary of the discovery of pteridines.* Tidsskrift for den Norske Laegeforening, 109:1986-1989.
- Hausen A, Fuchs D, Reibnegger G, Werner ER, Wachter H (1989)** *Neopterin in clinical use.* Pteridines, 1:3-10.
- Horak E, Gassner I, Sölder B, Wachter H, Fuchs D (1998)** *Neopterin levels and pulmonary tuberculosis in infants.* Lung, 76:337-344.
- Huber C, Batchelor JR, Fuchs D, Hausen A, Lang A, Niederwieser D, Reibnegger G, Swetly P, Troppmair J, Wachter H (1984)** *Immune response-associated production of neopterin. release from macrophages primarily under control of interferon-gamma.* Journal of Experimental Medicine, 160:310-316.
- Hyland K, Howells DW (1988)** *Analysis and clinical significance of pteridins,* Journal of Chromatography, 429:95-121.

Junqueria, LC, Carneiro J, Kelley RO (1993) *Temel Histoloji Editör, Aytekin Y, Solakoğlu S, Barış Kitabevi, İstanbul*

Kaleli I, Demir M, Cevahir N, Yilmaz M, Demir S (2006) *Serum neopterin levels in patients with replicative and nonreplicative HBV carriers, BMC Infect Dis. 31;6:157.*

Kiliç D, Boyunağa H, Kaygusuz S, Akgül ÖE, Rashed El, Kenar L, Erbil K, Kutluay T (2002) *Neopterin levels in nonreplicative HBV carriers, Hepatology Research 24, 18-22.*

Kökçam I, Nazıroğlu M (2002) *Effects of vitamin E supplementation on blood antioxidants levels in patients with Behçet's disease, Clinical Biochemistry, 35, 633-639.*

Kiepiela P, Smith AN, Rosenberg E (2005) *Laboratory markers associated with progression of HIV infection, Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology 19 (2), 243-254*

Lang A, Niederwieser D, Huber C (1984) *Treatment with human recombinant interferon alpha-2 induces increase of in vivo neopterin excretion, In, Pfleiderer W, Watchter H, Curtius HC Eds , Biochemical and Clinical Aspects of Pteridines, Berlin-New York : Walter de Gruyter, 251-254.*

Lercher-Hammerer A, Puschendorf B (2005) *Possible placental exchange of neopterin as indicated by significant correlations in matched maternal neonatal blood samples at delivery, Clinica Chimica Acta*

Ledochowski M, Murr C, Widner B, Fuchs D (1999) *Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. Clinica Chimica Acta, 282:115-123.*

Maximilian L, Murr C, Widner B, Fuchs D (2001) *Inverse relationship between neopterin and immunoglobulin E. Clinical immunology, 1:104-108*

Mehta PD, Patrick BA, Dalton A, Patel B, Mehta SP, Pirttila T, Coyle PK (2005) *Increased serum neopterin levels in adults with Down syndrome, Journal of Neuroimmunology, 164, 129-133*

- Murr C, Schröcksnadel K, Schönitzer D, Fuchs D, Schennach H (2005)** *Neopterin concentrations in blood donors differ between AB0 blood group phenotypes*, Clinical Biochemistry 38: 916-919.
- Müftüoğlu E, Bolaman Z, Bilgir O, Ertop Ş (1993)** *İmmünoloji, Saray Medikal Yayıncılık, İzmir*
- Müller MM , Curtius HC, Herold M, Huber C (1991)** *Neopterin in clinical practice*. Clinica Chimica Acta, 201:1-16
- Müller TF, Vogl M, Neumann MC, Lange H, Grimm M, Müller MM (1998)** *Noninvasive monitoring using serum amyloid A and serum neopterin in cardiac transplantation*. Clinica Chimica Acta, 276:63-74.
- Nathan CF, Gresser J (1986)** *Peroxide and pteridine, a hypothesis of the regulation of macrophage antimicrobial activity by interferon gama*, In, Gresser I, Vilcek J, ed. Interferon, Academic Pres, London, 125-143
- Nichol CA, Smith GK, Duch DS (1985)** *Biosynthesis and metabolism of tetrahydrobiopterin and molybdopterin*, Ann Rev, Biochem, 54:729-764.
- Oetl K, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Grammer T, Fuchs D, Reibnegger G (1999)** *Formation of oxygen radicals in solutions of 7,8-dihydroneopterin*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 264:262-267.
- Ormazabal A, Cazorla A, Fernandez Y, Alvarez E, Campistol J, Artuch R (2005)** *HPLC with electrochemical and florescence detection procuderer for the diagnosis of inborn errors of biogenic amines and pterins*, Journal of Neuroscience Methods 142, 153-158,.
- Özbal Y** *Temel immünoloji*. 2. baskı. İstanbul, Nobel tıp AŞ, 2000.
- Pichler R, Berg J, Maschek W, Schimetta W, Steinwender C, Hofmann R, Leisch F (2004)** *Proinflammatory parameters as CRP and IL-6 do not discriminate between post-PCI cardiac patients with and without exercise-induced ischemia as indicated by TI-201 myocardial scintigraphy*, Cardiovascular Pathology, 13, 299-305
- Putzki H, Aschern F, Henkel E, Heymann H (1897)** *Neopterin A tumor marker in colorectal carcinoma, Dis, Colon, Rectum*, 30: CJ879-883

- Radunovic N, Kuczynski E, Rebarber A, Nastic D, Lockwood (1999)** *Neopterin concentrations in fetal and maternal blood: a marker of cell-mediated immune activation.* American Journal of Obstetrics and Gynecology, 181:170-173.
- Razumovitch JA, Semenkova GN, Fuchs D, Cherenkevich SN (2003)** *Influence of neopterin on the generation of reactive oxygen species in human neutrophils,* FEBS LETTERS, 549, 83-86,.
- Razumovitch JA, Fuchs D, Semenkova GN, Cherenkevich SN (2004)** *Influence of neopterin on generation of reactive species by myeloperoxidase in human neutrophils,* Biochimica et Biophysica 1672, 46-50.
- Reibnegger G, Aichberger C, Fuchs D (1991)** *Posttransplant neopterin excretion in renal allograft recipients a reliable diagnostic aid for acute rejection and a predictive marker of long-term graft survival,* Transplantation, 52:58-63
- Rieder J, Lirk P, Hoffman G (2003)** *Neopterin as a potential modulator of tumor cell growth and proliferation,* Medical Hypotheses, 60: 531-534.
- Sakuari A, Goto M (1967)** *Neopterin isolation from human urine,* Journal Biochemistry, 61(1):142-145.
- Schroecksnadel K, Winkler C, Fuith LC, Fuchs D (2005)** *Tryptophan degradation in patients with gynecological cancer correlates with immune activation,* Cancer Letters 223, 323-329.
- Soos JM, Polsky RM, Keegan SP, Bugelski P and Herzyk DJ (2003)** *Identification of natural antibodies to interleukin-18 in the sera of normal humans and three nonhuman primate species,* 109, 188-196
- Tilg H, Margreiter R, Scriba M (1987)** *Clinical presentation of CMV infection in solid organ transplant recipients and its impact on graft rejection and neopterin excretion* Clinical Transplantation, 48:37-43.
- Turgan N, Habif S, Parildar Z, Ozmen D, Mutaf I, Erdener D, Bayindir O (2001)** *Association between homocysteine and neopterin in healthy subjects measured by a simple HPLC-fluorometric method* Clin Biochem, 34(4):271-275

- Vrecko K, Staedtler P, Mischak I, Maresch L, Reibnegger G (1997)** *Periodontitis and concentrations of the cellular immune activation marker neopterin in saliva and urine* Clinica Chimica Acta, 268:31-40
- Yeğen A (2004)** *Aktif akciğer tüberkülozlu ve sekel akciğer tüberkülozu ayırımında neopterinin yeri (Uzmanlık Tezi)*, T.C. Sağlık Bakanlığı Yedikule Göğüs Hastalıkları ve Göğüs Cerrahisi Eğitim ve Araştırma Hastanesi 6. Klinik, İstanbul.
- Zangerle R, Widner B, Quirchmair G, Neurauder G, Sarcletti M and Fuchs D (2002)** *Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection*, Clinical Immunology, 104 (3): 242-247.
- Zimmerman AW, Jyonouchi H, Comi AM, Connors SL, Milstien S, Varsou A and Heyes MP (2005)** *Cerebrospinal fluid and serum markers of inflammation in autism*, Pediatric Neurology 33 (3): 195-201.
- Zvetkova E, Wirleitner B, Tram NT, Schennach H, Fuchs D (2001)** *Aqueous extracts of Crinum latifolium (L.) and Camellia sinensis show immunomodulatory properties in human peripheral blood mononuclear cells*, International Immunopharmacology 1, 2143- 2150,.
- Walsh DS, Thavichaigarn P, Pattanapanyasat K, Siritongtaworn P, Kongcharoen P, Tongtawe P, Yongvanitvhit K, Jiarakul N, Dheeradhada, C, Pearce FJ, Wiesmann WP and Webster HK (2005)** *Characterization of circulating monocytes expressing HLA-DR or CD71 and related soluble factors for 2 weeks after severe, non-thermal injury*, Journal of Surgical Research, XX
- Watcher H, Fuchs D, Hausen A (1989)** *Neopterin as a marker for activated cell-mediated immunity: immunologic basis and clinical application*, Adv. Clin. Chem., 27: 81-14160
- Wachter H, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger R, Weiss G, Werner ER, Werner-Felmayer G (1992)** *Neopterin: Biochemistry-Methods-Clinical Application.* , Walter De Gruyter, Berlin.
- Wede I, Baier BG, Wachter H, Fuchs D (1995)** *Effects of neopterin and 7,8-dihydroneopterin on luminaol-dependent chemiluminescence induced by*

reactive intermediates formed from hydrogen peroxide, chloramine-T, hypochloride and nitrite. Pteridines, 6:35.

Weiss G, Fuchs D, Hausen A (1993) *Neopterin modulates toxicity mediated by reactive oxygen and chloride species. FEBS Letters, 321:89-92.*

Werner ER, Bichler A, Daxenbichler G (1987) *Determination of neopterin in serum and urine. Clinical Chemistry, 33:62-66.*

Werner ER, Werner-Felmayer G, Fuchs D, Hausen A, Reibnegger R, Yim JJ, Wachter H (1991) *Biochemistry and function of pteridine synthesis in human and murine macrophages Pathobiology, 59(4):276-279.*

Widner B, Bitterlich GB, Wede I, Wirleitner B, Wachter H, Fuchs D (1998) *Neopterin: indicator of oxidative stress and part of the cytotoxic armature of activated macrophages in humans. Pteridin, 9:91-102.*

Widner B, Wirleitner B, Baier-Bitterlich G, Weiss G, Fuchs D (2000) *Cellular immune activation, neopterin production, tryptophan degradation and the development of immunodeficiency Arch Immunol Ther Exp, 48(4):251-258.*

Widner B, Laich A, Sperner-Unterveger B, Ledochowski M. and Fuchs D (2002) *Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression-What is the link?, Brain, Behavior and Immunity 16, 590-595*

William J, Saad N, Salib M (1998) *The acute effect of intravenously administered recombinant human erythropoietin on the immune response of uremic patients maintained on regular hemodialysis, Artificial Organs, 22:192-196.*

Wirleitner B, Obermoser G, Böck G, Neurauter G, Schennach H, Sepp N, Fuchs D (2003) *Induction of apoptosis in human blood T cells by 7,8-dihydroneopterin, the difference between healthy controls and patients with systemic lupus erythematosus, Clinical Immunology 107, 152-159.*

<http://en.wikipedia.org/wiki/Interferon>

www.neopterin.net/index.php?ContentCategoryId=536.

7. ÖZET

S.Ü.Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Biyokimya (Tıp) Anabilim Dalı

Yüksek Lisans Tezi

KONYA-2007

Dilek KESKİN

Tez Danışmanı:Doç. Dr. Ali ÜNLÜ

Neopterin (NP) düşük molekül ağırlıklı (253) 2-amino-4-hidroksi-(1',2',3'-trihidroksi propil) pterindir. NP INF- γ ve az derecede diğer sitokinler, endotoksinler ve INF- α tarafından GTP siklohidroksilaz-1 aracılığıyla monosit/makrofajlarda üretilir. Bu hücreler NP üretiminin en güçlü indükleyicileridir. NP konsantrasyonları vücut sıvılarında INF- γ varlığını belirtir. Neredeyse tüm insan hücrelerinde GTP' den tetrahidrobiopterin (BH₄) üretilir tek istisna, monosit ve makrofajlarda 6-pirovoil tetrahidropterin sentetazın eksikliğinde 7,8 dihidroneopterin trifosfatın hidroliz ve oksidasyonun bir sonucu olarak NP oluşur. Bu çalışmanın amacı hücrel imünite göstergesi olan NP düzeylerinin bulaşıcı hastalıklarla ilişkisin incelenmesi.

Bu amaçla Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Kan Bankası ve Mikrobiyoloji laboratuvarlarına gelen hastalardan seçilen 138 serum örneğinde NP düzeyleri ve hepatit B, hepatit C, markırları bakılmıştır.NP düzeyleri HPLC cihazında floresans detektör kullanılarak, enfeksiyon hastalıkları markerleri ise mikrobiyoloji laboratuvarlarında çalışılmıştır. Çalışmamızda neopterin düzeyi kontrol grubu ile hepatit B olguları arasında önemli bir farklılığa rastlanmadı. Buna karşılık hepatit c grubu sonuçları hem hepatit b den hemde kontrol grubundan anlamlı dercede yüksek oranda bulundu. Sonuç olarak kan donörlerinde sadece neopterin taramasının oldukça riskli olabileceği ancak diğer viral tarama markırlarının yanı sıra faydalı olabilecektir.

8. SUMMARY

Selcuk University
Graduate School of Health Sciences
Department of Biochemistry (Medicine)
Master of Sciences Thesis
KONYA – 2007

Dilek KESKİN

Tez Danışmanı: Doç.Dr. Ali ÜNLÜ

Neopterin (NP) is a pterin that has low weighted molecule (253) 2-amino4-hydroxy (1',2',3'-trihidroksi propil). NP is produced by INF- γ and slight amount of other sythocins, endotoxin and INF- α by means of GTP syklohydrolase in monocyte/macrophage. These cells are the most influential stimulants of NP production. NP concentration indicates the presence of INF- γ in the body fluids. In almost all of the human cells tetrahydrobiopterin (BH₄) is produced from GTP. But the only exception is the occurance of NP as a result of 7,8 dihidroneopterin trifosfat hydroxylase and oxidation in the monocyte and macrophage and in cessation, of deficiency in 6-pirovoil tetrahydropterin sentetase. The aim of this study is tonexamine the relation between neopterin levels, which is an indicator of cellular immunity and blood transfusion-related diaseases.

Fort his purpose the neopterin levels and the hepatitis B, hepatitis C markers of 138 serum examples, selected from the patients who came to mikrobiology laboratory and blood bank of Meram Medicine Faculty of Selcuk University, are examined. The neopterin levels are studied by usig fluorescence dedector in the HPLC equipment, the markers of infectious patients in the mikrobiology laborotary. Hepatitis B patients results showed similar neopterin levels when compared to control groups. Hepatitis C patients showed higher neopterin level when compared to the control and hepatitis C. As a conclusion, neopterin measurements may be helpfull when used in addition to the serological markers.

9. ÖZGEÇMİŞ

1981 yılında İskenderun’da doğdu. İlk ve orta öğrenimini İskenderun’da tamamladı. Lisans eğitimini Akdeniz Üniversitesi Akseki Sağlık Yüksek Okulu’nda 2003 yılında tamamladı. 2004 yılı ocak ayı içersinde Başkent Üniversitesi Ankara Hastanesi’nde hemşire olarak göreve başladı. 2004 yılı eylül döneminde Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı. Aynı yıl kasım ayında Başkent Üniversitesi Konya Hastanesinde hemşirelik görevine geçti. 2007 yılı ağustos döneminde Özel Antalya Anadolu Hastanesinde hemşirelik görevine başladı. Halen özel Antalya Anadolu Hastanesinde görevine devam etmektedir.

10. TEŞEKKÜR

Bu tez çalışmasını yapmama vesile olan ve çalışmamın her basamağında yardımını, bilgisini, ve hoş görüşünü esirgemeyen danışman hocam Doç. Dr. Ali ÜNLÜ'e, çalışmalar boyunca her konuda yol gösteren Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. İdris MEHMETOĞLU, destegini her zaman hissettiğim Prof.Dr.Ali Muhtar TİFTİK'e yüksek lisans eğitimim boyunca her zaman yardımını aldığım değerli arkadaşım, doktora öğrencisi Sedat ABUŞOĞLU'na ve diğer tüm öğretim üyeleri ve personele ayrıca her zaman bana destek olan aileme teşekkürü bir borç bilirim.