



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü



**GAUCHER HASTALIĞININ
TANISI VE ŞİDDETİNİN GÖSTERGESİ OLARAK
PTERİDİN METABOLİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Yüksek Lisans Tezi

Melisa Rabia VURAL

TIBBİ BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

İzmir
2021

T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü

**GAUCHER HASTALIĞININ TANISI VE
ŞİDDETİNİN GÖSTERGESİ OLARAK PTERİDİN
METABOLİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Melisa Rabia VURAL

Danışman(lar)
PROF DR. ESER YILDIRIM SÖZMEN

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Tezli Yüksek Lisans

İzmir
2021

Tez Değerlendirme Kurulu Üyeleri

Başkan : Prof.Dr. Eser YILDIRIM
SÖZMEN

(Danışman)

Üye : Prof.Dr. Mahmut ÇOKER

Üye : Prof.Dr. Şadiye Canan
ÇOKER

Yüksek Lisans Tezinin kabul edildiği tarih:

I. Önsöz

Bu tez çalışmasına Gaucher hastalığının tanısında ve tedavisinin izlenmesinde pterin metabolitleri düzeylerinin olası yararının araştırılmasını amaçlayarak başladık.

Çalışmamın oluşumu, planlanması ve yürütülmesinde değerli danışmanım Prof. Dr. Eser Yıldırım Sözmen'in öneri ve görüşleri sayesinde çokça deneyim kazandım. Elde ettiğimiz verilerin ve yaptığımız çıkarımların bundan sonra bu alanda yapılacak olan akademik çalışmalar için katkı oluşturmasını temenni etmekteyim.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D.'nda yüksek lisans eğitimim süresince birlikte çalışmaktan onur duyduğum, bilgi, birikim ve tecrübeleriyle bana yol gösteren, hoşgörü ve sabırla bana her konuda destek olan tez danışmanım, değerli hocam Prof. Dr. Eser Yıldırım Sözmen'e,

E.Ü.T.F. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Metabolizma A.D. öğretim üyeleri Prof. Dr. Mahmut Çoker ve Doç. Dr. Sema Kalkan Uçar'a,

Tez süreci boyunca deneyimlerini paylaşmaktan çekinmeyen ve bana yardımcı olan, görüşlerinden yararlandığım değerli arkadaşım Öğr. Gör. Dr. Erhan CANBAY'a, hasta örneklerinin toplanması ve hasta verilerine ulaşılmasında yardımlarını esirgemeyen metabolizma polikliniğinin kıymetli uzman doktorlarına,

Tez çalışmamın örnek toplama ve laboratuvar aşamalarında bana yardımını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini benimle paylaşan metabolizma laboratuvarı çalışanlarına,

Yüksek lisans eğitimim boyunca birlikte çalışmaktan keyif duyduğum, asistan, doktora ve yüksek lisans öğrencisi arkadaşlarıma,

Eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen, bana her zaman kendimi şanslı hissettiren değerli aileme,

Sonsuz sevgi, saygı ve minnetlerimi sunarım.

İzmir, 1.02.2021

Melisa Rabia VURAL

II. Özet

GAUCHER HASTALIĞININ TANISI VE ŞİDDETİNİN GÖSTERGESİ

OLARAK PTERİDİN METABOLİTLERİNİN ARAŞTIRILMASI

Bu projenin amacı Gaucher hastalığının tanısında ve tedavisinin izlenmesinde pteridin metabolitleri düzeylerinin olası yararının araştırılmasıdır. Pteridinler ve türevleri, çeşitli vitamin ve kofaktörlerin metabolizmasında ara ürünler olarak işlev görür ve hastalıklarla ilgileri, hastalık biyobelirteçleri olarak rollerini incelemek için yeni araştırmalara ilham vermiştir. Bu amaçla lizozomal Gaucher tanısı ile EÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Metabolizma BD polikliniğinde izlenmekte olan, 14 hasta çalışmaya alınmıştır. Hastalardan rutin izleme için kan örneği alınırken bu araştırma için de örnek toplanmış ve çalışılmıştır. Kanda ve İdrarda pterin metabolitleri neopterin düzeyleri ise LC MS MS temelli yöntemle belirlenmiştir. LC ve MS/MS koşullarının optimizasyonları sonucu elde edilen temsili kromatogramlarda pikler simetrik, gürültü ve kuyruklanma yok denecek kadar az ve sinyal/gürültü oranı ise yüksek tespit edilmiştir. Her bir metabolit için elde edilen doğrusal tayin aralığı grafiklerinin R^2 değerleri $\geq 0,995$ olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik bulgularında ise gerek gün içi gerekse de günler arası yüksek seviye için %CV değerleri %15'in altındadır. İdrar Neopterin düzeyleri hem ELISA kit hem de LC MS/MS yöntemleri ile belirlenmiştir. Kullanılan iki yöntemin karşılaştırmasında her iki yöntemin korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Gaucher hastalarının kitotriozidaz enzim aktiviteleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hastaların Kitotriozidaz düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$). Hastaların idrarında Neopterin düzeyleri sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulunurken ($P=0.07$) Tetrahidrobiopterin düzeyleri düşük ($p=0.043$) olarak bulunmuştur. Dihidropterin ve 7-biopterin (primapterin) düzeyleri de hastalarda yüksek bulunmuştur ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildir. Neopterin/Tetrahidrobiopterin oranına bakıldığında hastalarda bu oran, sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p=0.000$). ROC eğrisi çizildiğinde, tek başına Neopterin hastalık göstergesi olarak yeterli hassasiyete sahip değilken, Neopterin/BH₄ oranının kitotriozidaz ile benzer spesifisite ve sensitivite gösterdiği belirlenmiştir. Korelasyon analizinde; sağlıklı kişilerde kitotriozidaz aktivitesi pterin metabolitleri ile herhangi bir korelasyon göstermezken hastalarda

kitotriozidaz aktivitesi idrar neopterin ($p=0.018$, $r=0.622$) ve 7-biopterin ($p=0.018$, $r=0.622$) düzeyleri ile pozitif korelasyon göstermiştir. Gaucher hastalarında idrarda oldukça yüksek değerde neopterin düzeylerine rastlanması bu hastalarda NP'nin hastalığın taranmasında, prognozunda kullanılabilir muhtemel bir belirteç olabileceğini göstermektedir. Neopterin düzeylerinin yüksek, BH₄ düzeylerinin düşük olması makrofaj aktivasyon göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Bu çalışmada elde edilen en önemli bulgu Gaucher hastalarının idrarında Neopterin/BH₄ oranının anlamlı olarak yüksek bulunması ve Kitotriozidaza eşdeğer bir sensitivite göstermesidir. Neopterin, BH₄ düzeylerinin idrarda LC MS/MS ile belirlenmesinin, özellikle kitotriozidazı genetik olarak düşük olan hastalarda yararlı olacağını göstermektedir. İdrar örneğinin non-invaziv olarak elde edilebilir olması, LC MS/MS ile hızlı sonuç verilebilmesi ve testin doğruluk ve kesinliğinin gösterilmiş olması nedeniyle Neopterin/BH₄ oranının önemli bir gösterge olarak klinikte kullanılabilirliğini düşünüyoruz.

Anahtar Kelimeler; Gaucher Hastalığı; Pteridin; LC-MS/MS; Kitotriozidaz

III. Abstract

THE RESEARCH OF PTERIDIN METABOLITES AS DIAGNOSIS OF GAUCHER'S DISEASE AND INDICATOR OF INTENSITY

The aim of this project is to investigate the potential benefit of levels of pteridine metabolites in the diagnosis and monitoring of Gaucher's disease. Pteridines and their derivatives function as intermediates in the metabolism of various vitamins and cofactors, and their relevance to disease has inspired new research to study their role as disease biomarkers. For this purpose 14 patients with a diagnosis of lysosomal Gaucher who were being followed up in the polyclinic of Ege University Faculty of Medicine Child Health and Diseases Department of Metabolism were included in the study. While blood samples were taken from patients for routine monitoring samples were also collected and studied for this study. Pterine metabolites and neopterin levels in blood and urine were determined by the LC MS/ MS-based method. Representative chromatograms obtained as a result of optimization of LC and MS/MS conditions, the peaks were symmetrical, noise and tailing were almost nonexistent, and signal/noise ratio was high. The R^2 values of the linear range graphs obtained for each metabolite were found to be 0.995. In the repeatability findings; CV% values are below 15% for high level both within day and between days. Urine Neopterin levels were determined with both ELISA kit and LC MS/MS methods. In the comparison of the two methods, both methods showed positive correlation. When the chitotriosidase enzyme activities of Gaucher patients were compared with the control group, CHIT levels of the patients were found significantly higher ($p < 0.001$) than those of control group. While Neopterin levels were found to be higher in the urine of the patients compared to the healthy individuals, the tetrahydrobiopterin levels were found to be low. Dihydropteridine and 7-biopterin (primaapterin) levels were also found higher in patients but this elevation was not statistically significant. Considering the neopterin/tetrahydrobiopterin ratio, this ratio was found to be significantly higher in patients compared to healthy individuals. When the ROC curve was drawn, it was determined that Neopterin alone did not have sufficient sensitivity as a disease indicator while the Neopterin/ BH_4 ratio showed similar specificity and sensitivity with chitotrioidase. Chitotriosidase activity in healthy individuals did not show any correlation with pterin metabolites while chitotriosidase activity in patients was

positively correlated with urinary neopterin ($p = 0.018$, $r = 0.622$) and 7-biopterin ($p = 0.018$, $r = 0.622$) levels. High levels of neopterin in the urine of Gaucher patients indicate that NP may be a reliable marker that can be used in screening and prognosis of the disease in these patients. High neopterin levels and low BH₄ levels were evaluated as macrophage activation indicators. The most important finding obtained in this study is that the Neopterin/BH₄ ratio was found to be significantly high in the urine of Gaucher patients and showed a sensitivity equivalent to Chitotriosidase. Our data suggests that the determination of BH₄ and Neopterin levels in urine by LC MS/MS will be particularly useful in patients with genetically low chitotriosidase. We think that the Neopterin/BH₄ ratio can be used in the clinic as an important indicator because the urine sample can be obtained non-invasively, the results can be obtained quickly with LC MS / MS and the accuracy and precision of the demonstrated test.

Keywords; Gaucher Disease; Pteridine; LC-MS/MS; Chitotriosidase

İçindekiler

I. Önsöz	I
II. Özet.....	II
III. Abstract	IV
IV. Tablolar Dizini	VIII
V. Şekiller Dizini	IX
VI. Grafikler Dizin	X
VII. Kısaltma Listesi	XI
1. Giriş.....	1
1.1. Araştırmanın Problemi.....	1
1.2. Araştırmanın Sorusu	1
1.3. Araştırmanın Hipotezleri	1
1.4. Araştırmanın Varsayımları.....	1
1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları	2
1.6. Araştırmanın Amacı	2
2. Genel Bilgiler	3
2.1. GAUCHER HASTALIĞI.....	3
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ.....	3
2.1.2. PATOGENEZ.....	3
2.1.3. KLİNİK BULGULAR	4
2.1.4. TANI.....	4
2.2. PTERİNLER	5
2.2.1. D-(+)-Neopterin	6
2.2.2. Tetrahidrobiyopterin	6
2.2.3. 7,8-Dihidrobiyopterin	6
2.2.4. 6,7-Dimetilpterin	7
2.2.5. 7-Biopterin (L-primapterin).....	7
2.3. PTERİN METABOLİZMASI.....	8
3. Gereç ve Yöntem	9
3.1. Hasta Seçimi	9
3.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması.....	9
3.3. Materyal	10

3.3.1. Cihazlar,Alet ve Ekipmanlar	10
3.3.2. Kimyasallar.....	10
3.3.3. Kitler.....	11
3.4. Biyokimyasal testler	11
3.4.1. Kitotriozidaz enzim aktivitesi Ölçümü	11
3.4.2. Plazma Neopterin Düzeylerinin Ölçülmesi.....	11
3.4.3. ELISA Prosedürü.....	12
3.5. LC MS MS ile Pterinlerin Ölçüm Yöntemi	13
3.5.1. UPLC Şartları	14
3.5.2. MS MS Şartları	15
3.6. İdrar için örnek hazırlama protokolü	16
3.7. Plazma için örnek hazırlama protokolü.....	17
3.8. İstatistiksel Analiz	18
4. Bulgular	19
4.1. LC MS/MS Bulguları.....	19
4.2. LC MS MS Yöntem Validasyon Bulguları	20
4.3. Sonuçlar	24
4.4. Hasta ve Kontrollerin Plazma Kitotriozidaz Enzim Aktiviteleri	25
4.5. Hasta ve Kontrollerin kan-üre kreatinin, HB, Hematokrit İstatistik Sonuçları	26
5. Tartışma.....	30
6. Sonuç ve Öneriler.....	37
7. Kaynaklar	40
8. Ekler	50
8.1. Etik Kurul Onay Belgesi.....	50
8.2. 6-12 Yaş Hasta Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	52
8.3. 12-18 Yaş Hasta Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu	54
8.4. Hasta Rapor Formu	58
9. Teşekkür	59
10. Özgeçmiş	60

IV. Tablolar Dizini

Tablo 1. Yönteme ilişkin UPLC şartları.....	14
Tablo 2. Yöntemin MS MS parametreleri.....	15
Tablo 3. Pteridin metabolitleri ve internal standarda ilişkin MRM parametreleri	16
Tablo 4. Biyopterin metabolitleri için LC MS/MS yöntem validasyon sonuçları	22
Tablo 5- Kanda ve idrarda pterin metabolitleri sonuçları	24
Tablo 6. SPSS CHIT istatistik sonuçları	25
Tablo 7. Hasta ve kontrollerin genel laboratuvar sonuçları	26
Tablo 8. SPSS CRP istatistik sonuçları	26
Tablo 9. ROC Eğrisi altındaki alan	28



V. Şekiller Dizini

Şekil 1. Neopterin ve Tetrahidrobiyopterin	6
Şekil 2. Dihidrobiyopterin ve 6,7- Dimetilpterin.....	7
Şekil 3. 7-Biyopterin (L-primapterin).....	7
Şekil 4. GTP ve folik asitten konjuge olmayan pteridinlerin oluştuğu metabolik yol (Burton, Shi, & Ma, 2016).	8
Şekil 5. Biyopteridin ve internal standardın mobil faz çözgen matriksinde temsili kromatogramları. Biyopteridinlerin konsantrasyonu 100 nM, internal standardın konsantrasyonu ise 20 ng/ml'dir.	19



VI. Grafikler Dizin

Grafik 1. ELISA çalışma-standart grafiği	13
Grafik 2. Mobil faz çözüen matriksinde BH2, BH4, 7-Biopterin ve Neopterin metabolitlerine ilişkin LC MS/MS yöntemi ile elde edilen doğrusal tayin aralığı grafikleri.....	21
Grafik 3. İdrar Neopterin düzeyleri; LC MS/MS ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması	23
Grafik 4. İdrarda pterin metabolitleri sonuçları (LC MS/MS).....	25
Grafik 5. Kontrol grubu ve Gaucher hastalarında Neopterin/Tetrahydrobiopterin oranını gösteren kutu grafiği	27
Grafik 6. Duyarlılık değerlerine karşılık gelen 1-Seçicilik değerleriyle çizilen ROC eğrisi.....	28

VII. Kısaltma Listesi

LDH	:	Lizozomal depo hastalıkları
GD	:	Gaucher disease/ hastalığı
GD1	:	Gaucher disease/ hastalığı Tip 1
GD2	:	Gaucher disease/ hastalığı Tip 2
GD3	:	Gaucher disease/ hastalığı Tip 3
BH ₄	:	Tetrahidrobiyopterin
BH ₂	:	Dihidrobiyopterin
CHIT	:	Kitotriozidaz
AJ	:	Aşkenazi Yahudi
GTP	:	Guanozin trifosfat
GTPCH1	:	Guanozin trifosfat siklohidrolaz I
PTPS	:	6- pürivol-tetrahidropterin sentaz
SR	:	sepiapterin redüktaz
GCH	:	GTP siklohidrolaz
DTT	:	Dithiothreitol
DTE	:	Dithioerythritol
IS	:	İnternal Standart
HPLC	:	High Performance Liquid Chromatography/ Yüksek performanslı sıvı kromatografisi

LC-MS/MS : Liquid Chromatography with tandem mass spectrometry/
Sıvı kromatografi-Kütle Spektrometresi

CREA : Kreatinin



1. Giriş

Lizozomal depo hastalıkları (LDH) en az 50 farklı genetik hastalık grubunu kapsar. Dünya genelinde LDH sıklığının 1/40,000–1/100,000,000 arasında olduğu tahmin edilmektedir. (Deegan vd., 2005) Lizozomal enzimleri kodlayan genlerdeki bir mutasyon sonucu enzim proteinleri veya ilişkili kofaktörlerinde oluşan bozukluğa bağlı olarak lizozomal depo hastalıkları gelişir. Lizozomal enzimler pek çok biyomolekülün yıkımında görev yaparlar. Lizozomal Depo Hastalıklarında ise yıkılamayan moleküller lizozomlar içerisinde birikmeye başlar ve hücreler şişer. Böylece hücre fonksiyonları bozularak hücre ölümü gerçekleşir.

Gaucher hastalığı, β -glukoserebrosidaz aktivitesindeki eksikliğe bağlı gelişen otozomal resesif geçişli bir hastalıktır. (E Beutler, Grabowski, Scriver, Hill, & 1995, y.y.)

Enzim katalizinde bir kofaktör olan 5,6,7,8 tetrahidrobiopterin (BH₄) pek çok metabolik olayda görev almaktadır. (Allegrı vd., 2012). Th1 tipi sitokin IFN gama ile uyarılan monosit kaynaklı makrofajlar pteridin metabolitleri ve neopterin sentez eder. Viral enfeksiyonlar, maligniteler gibi pek çok hastalıkta gösterilmiş olan neopterin konsantrasyonu artışının hücresele immun aktivasyon göstergesi olduğu öne sürülmüştür. (Capuron vd., 2014)

Bu projede BH₄ metabolizmasında anahtar moleküller olan 6 Neopterin, BH₄- (5,6,7,8-tetrahidrobiopterin), BH₂ (7,8-dihidrobiopterin), L-primapterin, düzeyleri altın standart yöntem olan LC MS/MS tekniğı ile belirlenmiştir. Yapılan çalışmalar ışığında Gaucher hastalığı olan bireylerde Neopterin ve pteridin metabolitlerinin hastalığın tanısı, şiddeti ve hastaların tedavisinin izlenmesinde kitotriozidaz enzimine göre üstünlüğü olup olmadığı araştırılmıştır.

Bu bağlamda örnek grubu EÜTF Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları AD Metabolizma BD polikliniğinde izlenmekte olan Gaucher hastalarını kapsamaktadır.

1.1. Araştırmanın Problemi

Gaucher hastalığı lizozomal depo hastalıkları içinde en sık rastlanan hastalık grubudur. Yapılan çalışmalarda Gaucher hastalığında glikoserebrozid birikimi sonucu aktive olan makrofajlardan bazı sitokinlerin salındığı gösterilmiştir.

Hastalığın tanısında enzim düzeyi belirlenmesi altın standart olmasına karşın hastalığın farklı genetik mutasyonlarla oluşan farklı tiplerinde enzim düzeylerinin farklı olması ve enzim replasman tedavisinde enzim düzeylerinin değişmesi nedeniyle hastalığın tanısı ve tedavisi için başka belirteçlere gereksinim vardır. Bu çalışmada, hastalık sürecinde makrofaj aktivasyonu olması nedeniyle makrofaj aktivasyonu belirteci olarak başka immün hastalıkların tanısı ve izleminde kullanılmış olan bazı göstergeler ilk kez Gaucher hastalarında incelenmiştir. Bu metabolitlerin hastalığın tanısında yararlı bulunması, farklı genetik mutasyonlar nedeniyle tanıda sorun yaşanan hastaların daha kolay bir şekilde tanınması sağlayacaktır. Ayrıca bu göstergelerin enzim replasman tedavisinin izlenmesinde kullanılması mümkündür.

1.2. Araştırmanın Sorusu

Neopterin ve pteridin metabolitlerinin Gaucher hastalığının tanısı, şiddetinin belirlenmesi ve hastaların tedavisinin izlenmesinde kitotriozidaz enzimine göre üstünlüğü var mıdır?

1.3. Araştırmanın Hipotezleri

Gaucher hastalarında makrofaj aktivasyonu olduğu ve buna bağlı bazı inflamatuvar moleküllerin miktarının arttığı gösterilmiştir. Bu hastalıkların izlenmesinde lökosit ve inflamasyon göstergeleri yararlı olabilir. Kitotriozidaz aktivitesi inflamasyon göstergesi olarak rutinde ölçülmektedir. Ancak kitotriozidazın genetik eksikliği olan hastalarda bu enzim ölçülmesi anlamsız olmaktadır. Pterin metabolitleri inflamatuvar hastalıklarda arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle Gaucher hastalığında da gösterge olarak kullanılabilir.

1.4. Araştırmanın Varsayımları

Gaucher hastalığı tanısında enzim aktivitesi tayini altın standart olmakla birlikte tedavide kullanılan enzimler nedeniyle tedavinin izlenmesinde kullanılmamaktadır. Gaucher hastalarında makrofaj aktivasyon göstergesi olarak ölçülen Kitotriozidaz enzimi de mutasyonlar nedeniyle bazı hastalarda düşük olarak bulunmaktadır. Bu nedenle inflamasyon belirteci olarak başka hastalıklarda gösterilmiş olan Neopterin bu çalışmada belirlenmiştir. Neopterin düzeyinin kanda ve idrarda ölçülmesi ile hastaların izlenebileceği düşünülmüştür.

Ayrıca Neopterinin sentezlendiği metabolik yolda yer alan diğer metabolitler ve tetrahidrobiopterin düzeyleri de belirlenerek hastalığın tedavisinin izlenmesinde yeni belirteç olarak değeri araştırılmıştır

1.5. Araştırmanın Sınırlılıkları

Gaucher hasta sayısının azlığı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmemizi engellemiştir. Hastalarımızın hemen hepsi Gaucher Tip 1 olduğu için tipler arasında pterin düzeyleri açasından bir fark olup olmadığı gösterilememiştir. Hastalarımızın hepsinin enzim replasman tedavisi almakta olması da hastalığın ilk tanısında pteridin metabolitlerinin rolünü tartışmamıza engel olmuştur.

1.6. Araştırmanın Amacı

LDH hastalıklarının tanısında enzim tayini altın standart olarak kabul edilmektedir. Ancak enzim replasman tedavisinin izlenmesinde enzim aktivitesi ölçümü yapılması tam olarak bilgi veremeyeceği için özellikle Gaucher hastalığının LDH tanı ve izlemlerinde kitotriozidaz (CHIT) aktivitesi ölçümü günümüzde sık kullanılan bir yöntemdir. Ancak beyaz ırkta toplumun yaklaşık %6'sında bir mutasyon sonucu kitotriozidaz aktivitesinin hiç bulunmaması bu enzimin kullanımını kısıtlamaktadır. Bu projenin amacı Gaucher hastalığı tanısı ve tedavinin izlenmesinde kitotriozidaz yerine ve/veya birlikte kullanılabilir yeni belirteçler olan neopterin ve pteridin metabolitlerinin araştırılmasıdır.

2. Genel Bilgiler

En yaygın lizozomal depo hastalıklarından biri olan Gaucher hastalığı (GD), GBA1 geni tarafından kodlanan lizozomal enzim β -glukoserebrosidaz (betaglukosidaz) (EC 3.2.1.45) (GCCase) enziminin aktivitesindeki eksikliğe bağlı gelişir. Hastalık otozomal resesif geçişlidir. (E Beutler vd., y.y.), (Mistry vd., 2011).

Bu enzim eksikliğinde glukoserebrozid yıkılamaz ve bazı dokularda, karaciğerde, kemik iliğinde, akciğerlerde, genellikle dalakta hücrelerin lizozomlarında glukosilseramid birikimi olur (Boven vd., 2004). Hücrelerde lipid birikmesiyle makrofajların histolojik, morfolojik görünümü değişir. Hücre buruşturulmuş ipek görüntüsü alır ve “Gaucher hücresi” olarak adlandırılır. (Ernest Beutler, 2007), (Mankin, Rosenthal, & Xavier, 2001), (Reuser & Drost, 2006)

Gaucher hücreleri ile makrofajlar, katepsin ve benzer lizozomal proteazları aşırı eksprese ederler. Hastalıkta proinflamatuvar sitokin artışı görülür; TNF α , MIP-1 α , MIP-1 β , IL-4 düzeylerinde artış meydana gelir. Antiinflamatuvar sitokin miktarlarında ise (IL-10 ve IL-13) azalma görülür (Gervas-Arruga vd., 2015).

2.1. GAUCHER HASTALIĞI

2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ

GD'in yaygın çeşidi Tip 1 GD (GD1) olup Amerika Birleşik Devletleri, Avrupa ve İsrail'de görülür ve Aşkenazi-Yahudi toplumunda daha sıklıkla görülmektedir. Tip 2 GD (GD2) tüm etnik tiplerde görülebilmektedir. Genel popülasyonda GD'in standart doğum insidansının 100.000'de 0.7 ile 1.8 arasında olduğu öngörülmektedir (Nalysnyk, Rotella, Simeone, Hamed, & Weinreb, 2017). AJ popülasyonundaki GD prevalansının 850'de 1 (118/100 000) olduğu tahmin edilmektedir. Yahudi olmayan nüfusta ise 1-2/100 000 kabul edilir (Mistry vd., 2011), (Horowitz vd., 1998), (Meikle, Hopwood, Clague, & Carey, 1999). GD2 (akut nöronopatik GD), prevalansı 1/150.000 ve Tip 3 GD (GD3, subakut veya kronik nöronopatik GD), 1/200.000 olarak tahmin edilmektedir (Sidransky, 1997). GD3 Prevalansı, daha uzun sağkalım nedeniyle GD2'den fazladır (Tylki-Szymańska, Vellodi, El-Beshlawy, Cole, & Kolodny, 2010).

2.1.2. PATOGENEZ

Non nöropatik ve nöropatik hastalıklar içinde GD'in üç tipinin ağır etkilenen bebeklerden başlayıp akut ve kronik nöropatik belirtilere ve Parkinson hastalığı

belirtilerine kadar devam eden bir spektrumu temsil ettiği düşünülmektedir (Goker-Alpan vd., 2003). GD'in klinik belirtileri dalak, karaciğer, kemik iliği, kemik, diğer dokular ve organlarda lipid yüklü makrofajların birikmesinden kaynaklanır. Makrofajlarda patolojik lipid birikimi, karaciğer ve dalaktaki ek doku kitlesinin yüzde ikisinden daha azını oluşturur (Cox, 2001).

2.1.3. KLİNİK BULGULAR

GD, hemen hemen tüm hastalarda viseral organları, kemik iliğini ve kemikleri etkiler. Hastalığın şiddeti perinatal ölümcül bulgular ile asemptomatik arasında değişebilir ve her yaşta ortaya çıkabilir. GD klinik özellikleri ve seyri ile ayırt edilen üç klinik tipe ayrılmıştır (Goker-Alpan vd., 2003).

Tip 1 (GD1) monozygotik ikizleri olan kardeşler arasında bile, belirtiler şiddet ve progresyondaki değişkenlik ile karakterizedir. (Grabowski vd., 2004b), (Fairley vd., 2008). Semptomatik hastalarda viseral tutulum, kemik hastalığı ve kanama görülür. Büyümede gecikmeyle pubertal gecikme görülür. GD1 için başlangıç yaşı değişkendir. Bazı hastalar 12- 24 ay arasında yaşarken, diğerlerinde geç yetişkinliğe kadar klinik belirtiler yoktur. Bu genotipli bazı kişiler yaşamları boyunca asemptomatik kalabilmektedir (Balwani, Fuerstman, Kornreich, Edelmann, & Desnick, 2010).

Tip 2 (GD2) GD'in akut, nöronopatik formudur. Erken başlangıçlı, tipik olarak doğumdan sonraki ilk yılda görülür (Gupta, Oppenheim, Kauvar, Tayebi, & Sidransky, 2011a). Viseral tutulum yaygın ve şiddetlidir. Bebekler klinik olarak kollodyon bebek olarak da bilinen konjenital iktiyoz ile başvurabilirler (Finn, Zhang, Chen, & Scott, 2000), (Gupta, Oppenheim, Kauvar, Tayebi, & Sidransky, 2011b).

Tip 3 (GD3) GD'in subakut veya kronik nöronopatik şeklidir. GD3'lü kişiler iki yaşından önce yavaş bir hastalık ilerlemesi ile başlayabilir. Bu nedenle GD2 ve GD3 arasındaki ayırım genellikle zordur. Bunun bir hastalık belirtisi yelpazesi olduğunu destekleyen belirgin örtüşme olmasına rağmen, GD3'ün üç formu tanınmıştır ancak bazı yazarlar GD3'ün alt sınıflamasını ortadan kaldırmayı önermiştir. (Cox & Schofield, 1997), (Harris, Taylor, & Vellodi, 1999), (Abrahamov vd., 1995).

2.1.4. TANI

GD tanısı, GD ile tutarlı klinik özelliklere sahip bir hastada, genellikle periferik lökositlerde, azalmış glukoserebrosidaz aktivitesinin bulunmasıyla konur. (Wenger,

Clark, Sattler, & Wharton, 1978). Enzim aktivitesi, monositlerden lenfositlere ve granülositlere doğru azalan her beyaz hücre tipinde değişiklik gösterir. Mutasyon analizi, tanının doğrulanmasını sağlar, genetik danışmanlık ile tanı konulmamış aile üyeleri ve heterozigot taşıyıcılar belirlenir. Genotipin belirlenmesi prognozun belirlenmesine yardımcı olur (Grabowski vd., 2004a).

Gaucher hastalarının plazmalarında normalden fazla artan (100- 1000 kat) kitinaz aktivitesi saptanmıştır. Bu enzime, sentetik substrat olan kitotriozu da hidroliz etmesi sebebiyle "kitotriozidaz" adı verilmiştir. (Hollak, Van Weely, Van Oers, & Aerts, 1994) Kitotriozidaz, kitinaz enzim sınıfında yer almaktadır. [EC 3.2.1.14]. Bu enzim; Gaucher hastalığı gibi lizozomal depo hastalıklarında, doku makrofajlarında, nötrofil öncü hücrelerinde, demir ve glikojen birikmesi gibi durumlarda normalden fazla sentezlenir ve salınır (Renkema, Boot, Muijsers, Donker-Koopman, & Aerts, 1995). Kitotriozidaz, GD'de ayırıcı tanı ve enzim replasman tedavisinin etkinliğinin araştırmalarında biyobelirteç olarak kullanılmaktadır (Malaguarnera, 2006). Fakat beyaz ırk içindeki populasyonların %6'sına yakın bir oranda plazma kitotriozidaz aktivitesinin hiç bulunmadığı gözlemlenmiştir (Deegan vd., 2005).

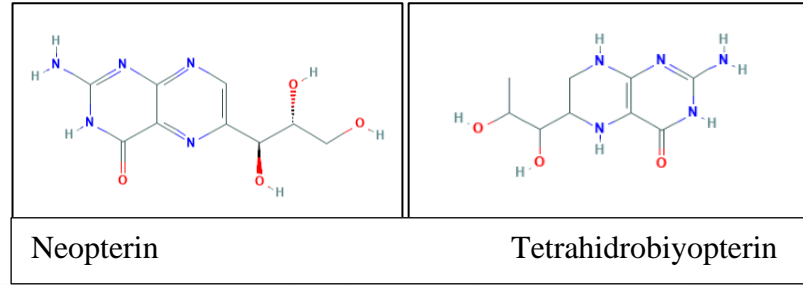
2.2. PTERİNLER

Pterinler biyolojik olarak aktif heterosiklik bileşikler olup 2-amino-4-hidroksipiridin çekirdeğinden oluşmaktadır. (Basu & Burgmayer, 2011), (Cabrerizo vd., 2005), (Tomšíková, Tomšík, Solich, & Nováková, 2013). 1889'da keşfedilmiş olan bu moleküller iltihaplanma, oksidatif stres ve aromatik amino asit hidroksilasyonuna dahil oldukları için biyobelirteç olarak kullanılmıştır. Pteridin halkasının ikinci konumunda amino grubu, dördüncü konumunda okzo bulunduğu bu yapıya "pterin" adı verilmektedir. (Wachter, Fuchs, Hausen, Reibnegger, & Werner, 1989), (Gieseg, Baxter-Parker, & Lindsay, 2018), (Fitzpatrick, 1999), (Nature & 1889, y.y.), (Fuchs, Weiss, & Wachter, 1993). Pteridinler, altıncı karbon atomundaki yan zincir ve oksidasyon durumuna göre Tetrahidro, Dihidro ve Okside formu olarak üçe ayrılır. Hemen her türlü canlı organizmadan çeşitli pterin türevleri izole edilmiştir.

Doğada, pterinler iki ana sınıfta ortaya çıkar: "konjuge" pterinler, nispeten karmaşık yan zincirler (folik asit ve türevleri) ve "unkonjuge" pterinler ise daha basit yan zincir yapıları ile karakterize edilir.

2.2.1. D-(+)-Neopterin

Bu bileşik Pteridin sınıfına ait olup GTP'den sentezlenir. 2-amino-6-(1,2',3'trihidroksipropil)-1H-pteridin-4-on şeklinde isimlendirilir. Neopterinin molekül yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 1) .



Şekil 1. Neopterin ve Tetrahydrobiopterin

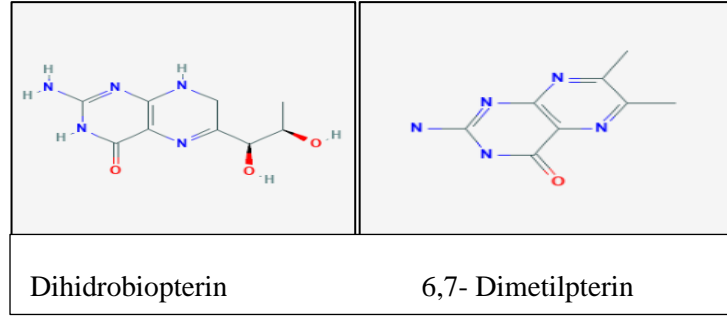
Neopterin türevleri aktive makrofajlardan oksidatif patlama ile üretilen reaktif oksijen türlerinin oluşumunu arttırmaktadır ve sitotoksitelerini etkilemektedir. (Murr, Widner, Wirleitner, & Fuchs, 2005) Nitrik oksit sentezini arttırmaktadır (Pourakbari vd., y.y.). Redoksa duyarlı transkripsiyon faktörlerini aktive ederek çeşitli hücre serilerinde apoptozisi uyarmaktadır (Mahmoud, El-Gendi, & Ahmed, 2005).

2.2.2. Tetrahydrobiopterin

Pterin sınıfına ait, GTP'den sentezlenen 2-amino-6-(1,2-dihydroxypropyl)-5,6,7,8-tetrahydro-3H-pteridin-4-one bileşiğidir. Tetrahydrobiopterin (BH₄) molekül yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil 1). BH₄, tirozin-3-hidroksilaz (EC 1.14.23), triptofan-5-hidroksilaz (EC 1.14.16.5) enzimlerinin kofaktörüdür. Aromatik amino asitlerin hidroksilasyonuna ek olarak, arjininden nitrik oksit sentezini sağlayan, nitrik oksit sentaz (EC 1.1.4.23) ve plazmalojenlerin peroksizomlarda eter bağlarının oksidasyonunda görev alan gliseril eter monooksijenaz (EC 1.14.16.5) enzimlerinin de kofaktörü olarak görev alır (Thöny, Auerbach, & Blau, 2000) . Biyojenik aminlerin sentezinde de rol oynadığından BH₄ eksikliğinde bu nörotransmitterlerin oluşumu bozulur, bulgular nörotransmitterlerin eksikliği sonucu ortaya çıkar.

2.2.3. 7,8-Dihydrobiopterin

IUPAC adı 2-amino-6-[(1S,2R)-1,2-dihydroxypropyl]-7,8-dihydro-3H-pteridin-4-one olan 7,8-Dihydrobiopterin'in molekül yapısı şekilde gösterilmiştir. (Şekil.2)



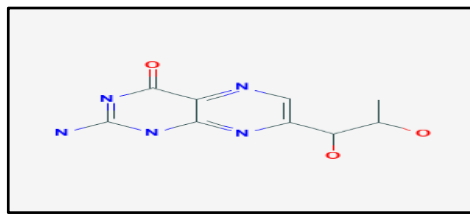
Şekil 2. Dihydrobiopterin ve 6,7- Dimetilpterin

2.2.4. 6,7-Dimetilpterin

Kararsız kinoid 6,7-dihidrobiopterin ile 7,8-dihidrobiopterin enzimatik olmayan yeniden düzenlenmesi tetrahidrobiopterinin dihidrofolat redüktaz yoluyla 6,8-dihidrobiopterinden yeniden üretilebildiği durumlarda meydana gelebilir, molekül yapısı şekilde gösterilmiştir (Şekil.2).

2.2.5. 7-Biopterin (L-primapterin)

Primapterin, sırasıyla 2. 4. ve 7. konumlarda amino, okso ve 1,2-dihidroksipropil ikame edicilerinden oluşan pterin içeren biopterin sınıfının bir üyesidir. Metabolit görevi görür. IUPAC adlandırması 2-amino-7-(1,2-dihydroxypropyl)-3H-pteridin-4-one olan bu bileşiğin molekül yapısı şekilde gösterilmiştir. (Şekil.3)



Şekil 3. 7-Biopterin (L-primapterin)

Neopterin ve BH_4 , immün sistem aktivasyonu ve oksidatif durumdaki değişiklikleri ve monoamin nörotransmitter sentezindeki ve nitrik oksit eksikliklerini değerlendirmek için kullanılır. Neopterin, interferon- γ ve dolaylı olarak tümör nekroz faktörü- α ile uyarılmasının ardından, guanozin trifosfattan, aktive edilmiş makrofajlar ve dendritik hücreler tarafından sentezlenmektedir. (Murr vd., 2005). Neopterin, yüksek floresan doğası gereği immün aktivasyonun güçlü ve önemli bir belirteçidir.

3. Gereç ve Yöntem

Kesitsel nitelikte olan bu çalışma Gaucher hastalığı olan bireylerde pterin metabolitlerinin düzeylerinin tanı koymada yararının olup olmadığı ve hastaların tedavisinin izlenmesinde kitotriozidaz enzimine göre üstünlüğünün olup olmadığının araştırılması amacıyla yapılmıştır.

Pteridin metabolitlerinin inflamatuvar hastalıklarda arttığı gösterilmiştir. Bu nedenle Gaucher hastalığında da gösterge olarak kullanılabileceğini düşündüğümüz bu metabolitleri LC MS/MS temelli yöntemle belirledik.

3.1. Hasta Seçimi

Projenin kabul edilmesinden itibaren Temmuz 2019 – Haziran 2020 tarihleri arasında bir yıl boyunca Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları, Metabolizma Polikliniğine başvuran Gaucher tanılı hastalar (n=14) seçildi. Hastaların demografik verileri (yaş, cinsiyet, klinik bulgular) poliklinik kaydı sırasında alındı. Kontrol grubu olarak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Polikliniklerine başvuran benzer yaş ve cinsiyetteki 25 sağlıklı birey seçildi.

Hem sağlıklı hem de hasta grubu için çalışmaya katılmayı kabul etmemek çalışmaya alınmama nedeni olarak belirlendi. Böbrek yetmezliği ve kronik inflamatuvar bir hastalığı bulunanlar çalışmaya dahil edilmedi. Diyabet, kronik böbrek yetmezliği gibi sürekli tedavi gerektiren hastalığı olanlar ve kanser hastaları çalışma dışında tutuldu.

Tüm katılımcılara ve çocuk hastalar için velilerine bilgilendirilmiş gönüllü onam formu imzalatıldı.

3.2. Örneklerin Alınması ve Saklanması

Hasta ve kontrol grubundan pterin metabolitleri düzeylerinin bakılabilmesi için rutin biyokimya testlerinde kullanılan tüplere 2 ml plazma ve serum örneği, 10 cc idrar örneği alındı. Örnekler alındıktan en geç 30 dk sonra Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Laboratuvarına soğuk zincir kurallarına uyularak getirilerek 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra örnekler ayrıldı ve ependorf tüplerine koyularak Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarında -20°C de derin dondurucuda saklandı. Hastalara rutin yapılan biyokimyasal testlerinin sonuçları da poliklinik kayıtlarından alındı.

3.3. Materyal

3.3.1. Cihazlar,Alet ve Ekipmanlar

- LC sistemi Acquity UPLC I Class (Waters, USA)
- MS MS sistemi Xevo TQD (Waters, USA)
- HPLC kolonu, Atlantis T3 (1.8 µm çap, 2.1x50 mm)
- Varioskan fluorometre Thermo Fisher Scientific
- Santrifüj soğutmalı Nüve/NF400R
- Santrifüj cihazı Universal 16R
- Su banyosu Memmert 767
- Vortex
- -86 °C derin dondurucu, DF 590 Nüve
- -20, +4 °C buzdolabı Regal
- Ayarlanabilir otomatik pipetler, Eppendorf 0.5-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL
- Hassas tartı, Scaltec SBC31
- Falkon tüpü, İsolab
- Eppendorf tüpü, 2 mL
- 0,45 mikrometre Milipore filtre

3.3.2. Kimyasallar

- 7,8-Dihydro-L-biopterin, Sigma Aldrich Katalog No: 37272-10MG
- (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin Dihydrochloride 5mg, ≥99% (Cayman) Katalog No: 81880
- 6,7-Dimethylpterin 1gr (Santa Cruz) Katalog No: sc-229928
- 7-Biopterin 1mg (Santa Cruz) Katalog No: SC-476443
- D-Neopterin [D-erythro-Neopterin] 100mg,≥98% Sigma Aldrich Katalog No: N3386-100MG
- Manganese oxide, Sigma Aldrich Katalog No: 377201-500G
- MS grade ACN, Carlo Erba
- MS grade formik asit, Lichrosolv
- MS grade metanol, Lichrosolv
- MS grade su, Carlo Erba

- Formik asit (HCOOH)
- DL-Ditiyoeritrol (DTT), 1 gr, %99, Sigma Aldrich Katalog no: D0632

3.3.3. **Kitler**

1) Human Neopterin ELISA Kit (Sunred, Katalog No: 201-12-5580)

Kanda ve idrarda Neopterin düzeyi belirlemek için kullanıldı.

2) Creatinine Kit Kinetic method (Biolabo, Katalog No: 80107)

İdrarda kreatinin kantitatif tayini için kullanıldı. Kreatinin, alkali ortamda pikrik asit ile sarı/kırmızı renkli madde oluşturması esasına dayanan Jaffe yöntemi uygulandı.

3.4. **Biyokimyasal testler**

3.4.1. **Kitotriozidaz enzim aktivitesi Ölçümü**

- Hasta ve kontrol plazma örnekleri sitrat/fosfat tamponda dilüe edildi.
- 20 µl 4-MU-C3 (4-methylumbelliferyl β-d-N,N',N''-triacetylchitotrioside) (19 mmol/L) ile distile su ve 20 µl asetat tampon (0.5 mmol/L, pH 5.0) karıştırıldı.
- 37 °C de 30 dk inkübe edildi.
- 300 µl karbonat/bikarbonat tampon (0.5 mmol/L, pH 10.7) eklendi.
- Eksitasyon 365 nm, emisyon 460 nmde fluorometrede okuma yapıldı.

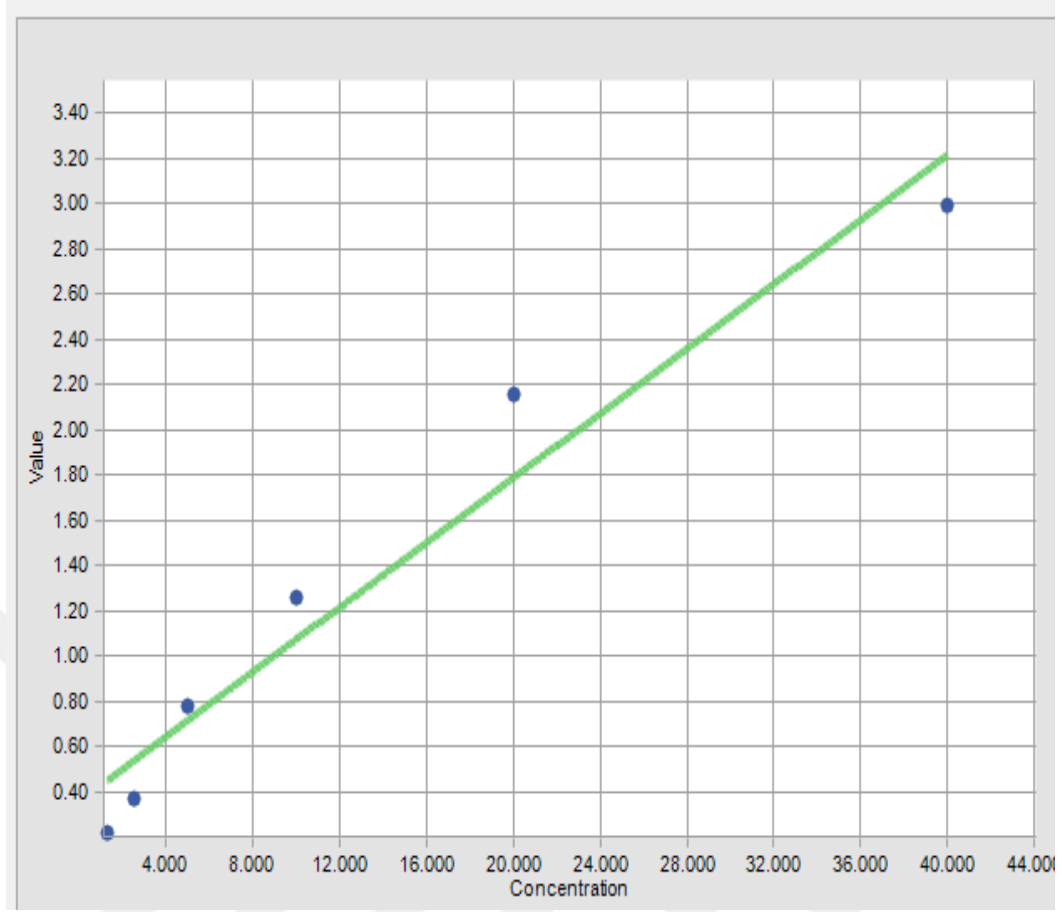
3.4.2. **Plazma Neopterin Düzeylerinin Ölçülmesi**

Örneklerin plazma neopterin düzeylerinin ölçülmesi için Human Neopterin ELISA Kiti kullanıldı. (SunRed Biotechnology Company, Katolog No: 201-12-5580) Kit içeriği : 96 kuyucuklu mikropalak, 40nmol/L standart, Str-HRP- Conjugate Reagent, 30X yıkama solüsyonu, Biotinli Neopterin Antibody, Kromojen A solüsyonu, Kromojen B solüsyonu, Stop solüsyonu, Standart dilüent.

Bu kitin çalışma prensibi kantitatif sandviç enzim immüno analiz prensibine dayanmaktadır.

3.4.3. ELISA Prosedürü

- Örnekler çalışılmadan önce 2-8 °C'de bekletildi.
- Çalışılmaya hazır 40 µl örnekler, 40 µl kontrol ve 50 µl standart kuyucuklara ekildi.
- 10 µl biotin her kuyucuğa eklendi.
- 50 µl Str + HRP konjugatı kuyucuklara eklendi.
- Oda ısısında 1 saat inkübasyona bırakıldı.
- İnkübasyon sonrasında 5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı.
- Her bir kuyucuğa 50 µl Chromogen A ve B eklendi.
- 10 dakika oda ısısında inkübe edildi.
- Daha her kuyucuğa 50 µl stop solüsyonu eklendi.
- Stop solüsyonu eklendikten sonra 450 nm'de mikroplak okuyucuda okutuldu.
- Standartlara göre kalibrasyon grafiği çizildi. (Grafik 1).



Grafik 1. ELISA çalışma-standart grafiği

3.5. LC MS MS ile Pterinlerin Ölçüm Yöntemi

7-Biopterin, 6-Neopterin, BH₂, BH₄ ve 6,7-Dimetilpterin (Internal Standart) biyopterin metabolitlerinin LC MS MS yöntemi ile ölçümünde LC sistemi olarak Acquity UPLC I Class (Waters, USA) ve MS MS sistemi olarak da Xevo TQD (Waters, USA) kullanılmıştır.

Çalışılan LC MS MS yönteminin UPLC ve MS MS koşulları Tablo 1 ve Tablo 2’de verilmiştir.

3.5.1. UPLC Şartları

UPLC şartları optimizasyon denemeleri sonucu elde edilen sonuçlar Tablo 1’de gösterilmiştir.

Tablo 1. Yönteme ilişkin UPLC şartları

Sistem	Acquity UPLC I Class
Kolon	Acquity UPLC BEH Phenyl, 2,1 mm x 50 mm, 1,7 µm
Kolon Sıcaklığı	30°C
Enjeksiyon hacmi	5 µl
Akış Hızı	0,4 ml/dakika
Mobile Faz A	%0,1 Su içinde formik asit
Mobile Faz B	%0,1 Asetonitril içinde formik asit
Akış programı	İzokratik 50:50 A:B
Ölçüm süresi	3 dakika

3.5.2. MS MS Şartları

Gerçekleştirdiğimiz deneme çalışmaları sonucunda en yüksek intensiteye sahip pikleri elde ettiğimiz LC-MS/MS parametreleri Tablo 2 ve Tablo 3'te verilmiştir.

Tablo 2. Yöntemin MS MS parametreleri

Sistem	Xevo TQD
İyonizasyon modu	ES (+)
Kapiller voltajı	3.08 kV
Kaynak Sıcaklığı	150 °C
Desolvasyon Sıcaklığı	350 °C
Cone Gas akış hızı	40 L/hr
Desolvation Gas akış hızı	900 L/hr

Tablo 3. Pteridin metabolitleri ve internal standarda ilişkin MRM parametreleri

İnternal Standart (IS): 6-7 Dimetil pterin, BH₂ : Dihidrobiopterin, BH₄: Tetrahidrobiopterin

Bileşik	MRM Değerleri	Cone (V)	Collision enerji (V)
6,7-DMP (IS)	191,97>105,93	42	28
7-Biopterin	238,00>177,84	40	18
BH₂	240,00>163,07	30	20
BH₄	241,85>165,95	40	18
6-Neopterin	253,92>206,00	36	16

3.6. İdrar için örnek hazırlama protokolü

İdrarda pteridin metabolitlerinin tayininde Giron ve arkadaşlarının (Jiménez Girón, Martín-Tornero, Hurtado Sánchez, Durán Merás, & Espinosa Mansilla, 2012) yöntemi kullanılmıştır. Yöntemin performansını test etmek amacıyla geri elde, tekrarlanabilirlik ve tayin aralığı denemeleri yapılmıştır.

Bu yönteme göre örnek hazırlama protokolü şöyledir:

- Hasta ve sağlıklı kişilerden random idrar alınır. Hemen çalışılmayacaksa -20 °C’de derin dondurucuda saklanır.
- Çalışmanın olduğu gün idrar örnekleri derin dondurucudan çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenir.
- Oda sıcaklığına gelen idrar örnekleri öncelikle 10 000 g’de 5 dakika santrifüjlenir.

- Santrifüjlenen idrarlar 0,2 mikronluk filtrelerden geçirilir.
- Filtre edilmiş idrar örneğinden 100 µl bir ependorf tüpüne ilave edilir.
- Üzerine 100 µl %1'lik DTT, 20 µl internal standart (1µg/ml) eklenir ve ultra saf su ile 1 ml'ye tamamlanır.
- Elde edilen son karışımdan 200 µl LC MS/MS plağına ekilir.
- Cihazda okuma yapılır.

3.7. Plazma için örnek hazırlama protokolü

Metabolitlerin idrar tayininde kullanılan yöntem bazı değişiklikler yapılarak plazma için de uygulanmıştır. Bu yöntemde göre örnek hazırlama protokolü şöyledir:

- Hasta ve sağlıklı kişilerden EDTA'lı tüpte kan alınır.
- 3000 rpm'de 10 dakika santrifüjlenerek plazma elde edilir.
- Çalışma gününe kadar -20 derecede saklanır.
- Çalışmanın olduğu gün plazma örnekleri derin dondurucudan çıkarılır ve oda sıcaklığına gelmesi beklenir.
- Plazma örneğinden 100 µl bir ependorf tüpüne ilave edilir.
- Üzerine 100 µl %1'lik DTT, 20 µl internal standart (1µg/ml) ve 400 µl asetronitril eklenir.
- 10000 g'de 10 dakika santrifüjlenir.
- Süpernatant üzerine 480 µl ultra saf su eklenir.
- Elde edilen son karışımdan 200 µl LC MS MS plağına ekilir.
- Cihazda okuma yapılır

Biyopterin metabolitleri idrar ve plazma matrikslerinde yoğun bir şekilde baskılandığından elde edilen pik cevapları oldukça gürültülü ve zayıftır. Bu yöntemde bunun üstesinden gelinbilmesi için örnekler yöntemde göre 10 kat seyreltilerek çalışılmıştır.

İdrar biyopterin seviyeleri yüksek olduğundan bu çalışmada kullanılan yöntemle idrarda tayin yapılabılmış fakat plazma biyopterin seviyeleri tayin limitlerin altında olduğundan LC MS/MS yöntemiyle plazma biyopterin seviyeleri ölçülemediğiştir.

3.8. İstatistiksel Analiz

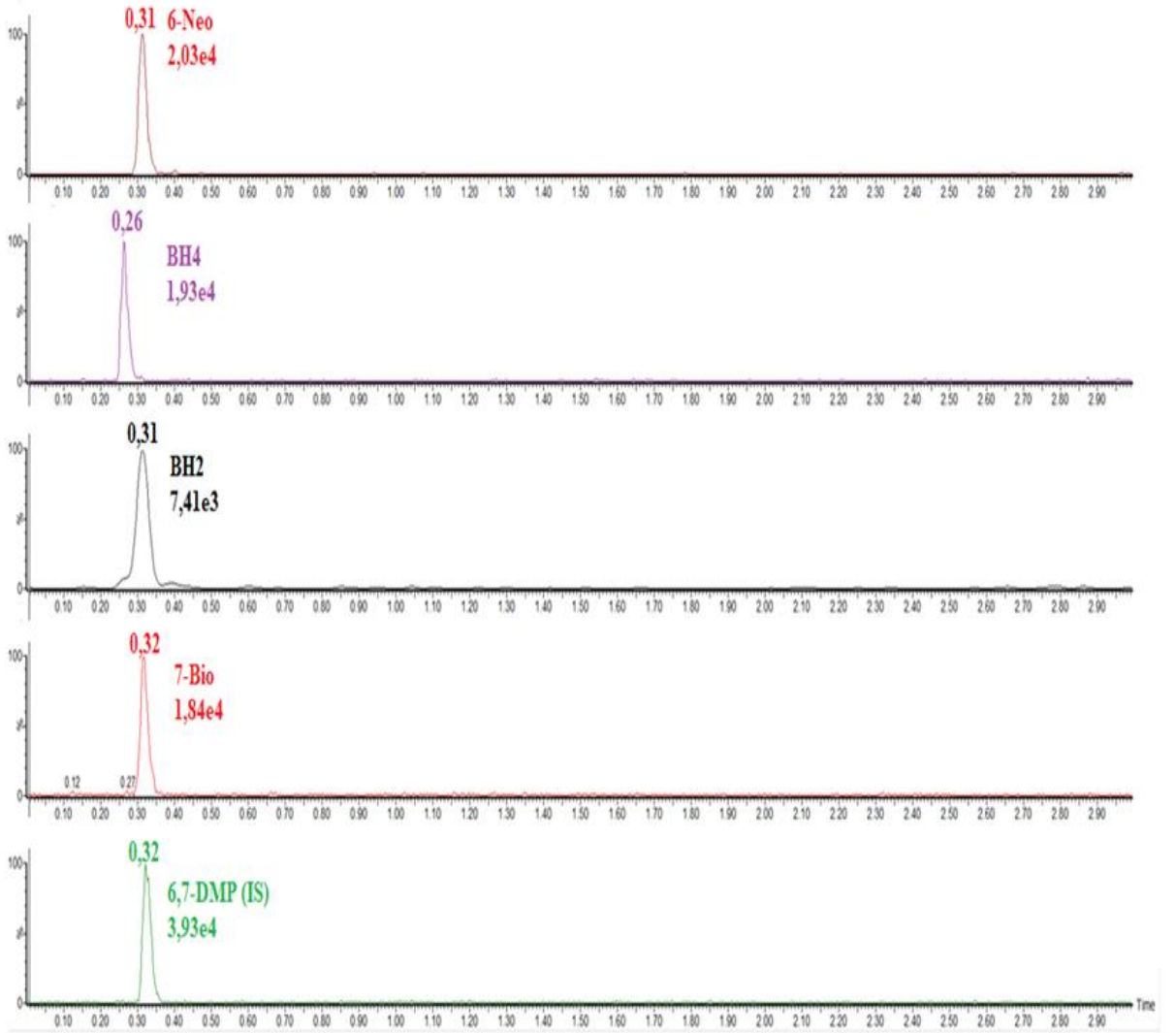
Verilerin istatistiksel analizlerinde Excel (2016) ve SPSS 22.0 programı kullanılmıştır.

Parametrik dağılım gösteren testlerin analizinde independent simple t testi uygulanırken, non-parametrik dağılım gösteren testlerin analizi için Mann-Whitney U testi kullanıldı. İkili karşılaştırmalar Mann-Whitney U testi ile yapılmıştır. Korelasyon analizi için Pearson korelasyon testi kullanılmıştır.

4. Bulgular

Laboratuvar sonuçları ve poliklinik muayeneleri ile teşhisleri kesinleştirilmiş 14 kişilik Gaucher hasta grubu ve herhangi bir rahatsızlığı bulunmayan 25 kontrol grubundan oluşan numunelerin ölçülmesiyle elde edilen sonuçlar Waters Masslynx 4.0 software yazılımı kullanılarak değerlendirilmiştir. SPSS 22.0 programında istatistikleri yapılarak karşılaştırılmıştır.

4.1. LC MS/MS Bulguları



Şekil 5. Biyopteridin ve internal standardın mobil faz çözgen matriksinde temsili kromatogramları. Biyopteridinlerin konsantrasyonu 100 nM, internal standardın konsantrasyonu ise 20 ng/ml'dir.

LC ve MS/MS koşullarının optimizasyonları sonucu elde edilen temsili kromatogramlar Şekil 5'te gösterilmiştir.

Şekil 5'te görüleceği üzere pikler simetrik, gürültü ve kuyruklanma yok denecek kadar az ve sinyal/gürültü oranı ise yüksektir.

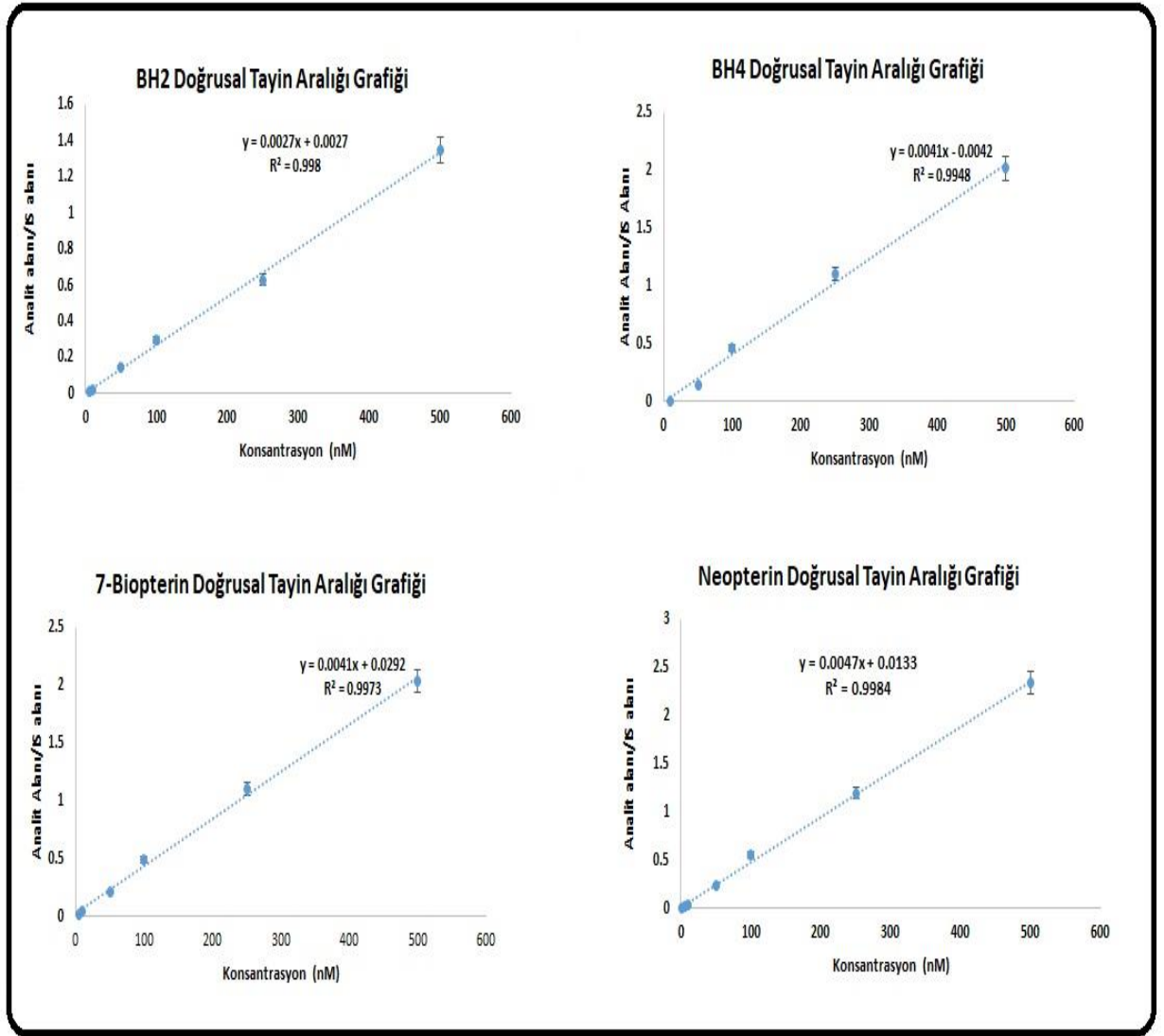
4.2. LC MS MS Yöntem Validasyon Bulguları

Modifiye ettiğimiz LC MS/MS yönteminin validasyon çalışmalarına ilişkin bulgular Tablo 4'te özetlenmiştir. Grafik 2'de ise her bir metabolite ilişkin doğrusal tayin aralığı grafiği yer almaktadır. Yöntem validasyon kurallarına göre bir yöntemin geçerli olabilmesi için doğrusal tayin aralığı grafiğinin R^2 değeri $\geq 0,985$; gün içi ve günler arası tekrarlanabilirliğin ≤ 15 olması gerekmektedir.

Grafik 2'de görüldüğü üzere her bir metabolit için elde edilen doğrusal tayin aralığı grafiklerinin R^2 değerleri $\geq 0,995$ olarak bulunmuştur. Tekrarlanabilirlik bulgularında ise gerek gün içi gerekse de günler arası yüksek seviye için %CV değerleri %15'in altındadır.

Ancak düşük seviye için %CV değerleri 7-biopterin, 6-Neopterin ve BH2 için %15'in biraz üzerindedir. % geri elde genel olarak %70-125 arasında ve kabul edilebilirdir. Yöntemde kullanılan internal standart pterin metabolizmasının geçici olarak oluşan bir ara ürünüdür.

LC MS/MS yöntemlerinde genellikle ilgili metabolitlerin stabil izotoplarının internal standart olarak kullanılması kesin ve doğru sonuçlar için gereklidir. Bu yöntemde nispeten düşük çıkan % geri elde sonuçlarının nedeni de yöntemde kullanılan internal standartın her bir metabolitin stabil izotop olmamasıdır.



Grafik 2. Mobil faz çözgen matriksinde BH2, BH4, 7-Biopterin ve Neopterin metabolitlerine ilişkin LC MS/MS yöntemi ile elde edilen doğrusal tayin aralığı grafikleri.

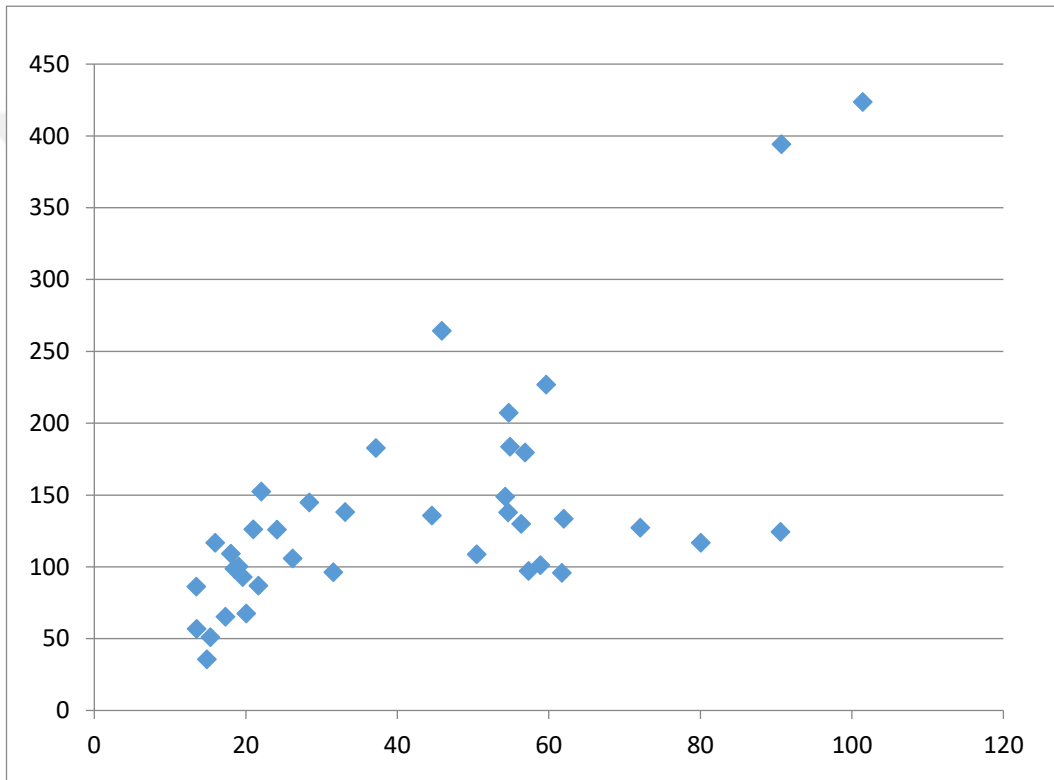
BH2: dihidroneopterin, BH4: tetrahidrobiyopterin, 7- Biopterin: L-primapterin

Tablo 4. Biopterin metabolitleri için LC MS/MS yöntem validasyon sonuçlarıBH₂: dihidroneopterin, BH₄: tetrahidrobiyopterin, 7- Biopterin: L-primapterin 6-Neo: D-(+)- Neopterin

Analit		Gün İçi Tekrarlanabilirlik (%VK)(n=10)	Günler arası tekrarlanabilirlik (n=5)	% Geri elde	Tayin Aralığı
7-Bio	Düşük seviye (10 nM)	13,45	17,52	124,76	5-500 nM
	Yüksek seviye (200 nM)	10,88	13,51	81,169	
BH₂	Düşük seviye (10 nM)	15,43	18,62	114	5-500 nM
	Yüksek seviye (200 nM)	5,89	7,62	94	
BH₄	Düşük seviye (20 nM)	2,24	5,65	50,21	10-500 nM
	Yüksek seviye (200 nM)	2,86	4,88	76,18	
6-Neo	Düşük seviye (10 nM)	11,09	15,21	70,37	1-500 nM
	Yüksek seviye (200 nM)	6,84	8,12	76,97	

Metod validasyon parametrelerinin Excel (2016) ve SPSS (22.0) programları kullanılarak istatistiksel analizleri yapılmıştır. Gruplar arası farkın anlamlılık araştırması için Mann-Whitney U testi kullanılmıştır.

İdrar Neopterin düzeyleri hem ELISA kit hem de LC MS/MS yöntemleri ile belirlenmiştir. **Kullanılan iki yöntemin karşılaştırmasında her iki yöntemin korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Grafik-3, $p<0.01$, $r=0.708$).**



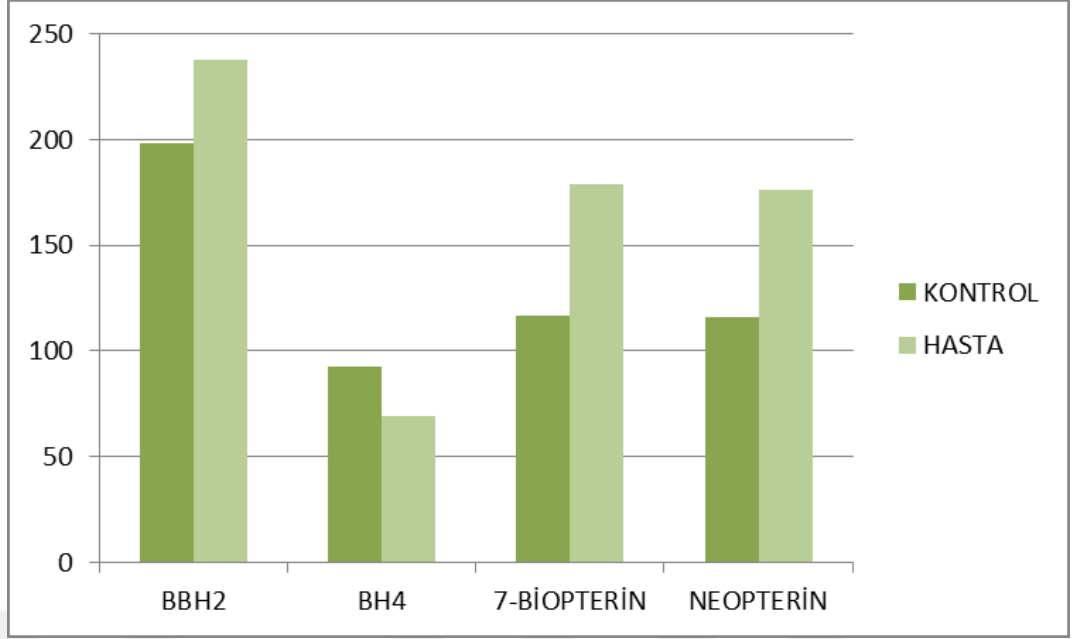
Grafik 3. İdrar Neopterin düzeyleri; LC MS/MS ve ELISA sonuçlarının karşılaştırılması

4.3. Sonuçlar

Hasta ve kontrol grubuna ait değerler Tablo-5'te verilmiştir.

Tablo 5- Kanda ve idrarda pterin metabolitleri sonuçları

	Grup	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata
Yaş	Kontrol	35.88	14.383	2.877
	Hasta	35.07	18.487	4.941
Plazma Neopterin (ELISA)	Kontrol	58.83	37.34	7.622
	Hasta	53.13	39.95	10.67
İdrar Kreatinin (mM)	Kontrol	7.153	4.82	.964
	Hasta	9.89	5.25	1.40
BH₂ (mmol/mol CREA)	Kontrol	197.92	140.89	28.178
	Hasta	237.70	142.06	37.968
BH₄ (mmol/mol CREA)	Kontrol	92.71	40.36	8.072
	Hasta	69.156	58.343	15.592
7- Biopterin (mmol/mol CREA)	Kontrol	116.62	42.016	8.403
	Hasta	178.73	116.71	31.194
LCMS'Neopterin (mmol/mol CREA)	Kontrol	116.18	40.92	8.18
	Hasta	176.25	112.84	30.16



Grafik 4. İdrarda pterin metabolitleri sonuçları (LC MS/MS)

4.4. Hasta ve Kontrollerin Plazma Kitotriozidaz Enzim Aktiviteleri

Gaucher hastalarının kitotriozidaz (CHIT) enzim aktiviteleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında istatistiksel olarak hastaların CHIT düzeyleri anlamlı olarak daha yüksek bulunmuştur ($p < 0,001$).

Tablo 6. SPSS CHIT istatistik sonuçları

	Grup	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata
Kitotriozidaz	Kontrol	33.58	14.90	2.98
	Hasta	985.40	630.40	168.48

4.5. Hasta ve Kontrollerin kan-üre kreatinin, HB, Hematokrit İstatistik Sonuçları

Tablo 7. Hasta ve kontrollerin genel laboratuvar sonuçları

	Grup	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata
Yaş	Kontrol	35.88	14.38	2.87
	Hasta	35.07	18.48	4.94
Kan Üre	Kontrol	22.93	6.77	1.749
	Hasta	26.35	7.44	1.99
Kan Kreatinin	Kontrol	.701	.21	.055
	Hasta	.604	.19	.053
Hb	Kontrol	13.28	1.6	.403
	Hasta	13.22	1.10	.295
Hematokrit	Kontrol	39.61	4.55	1.13
	Hasta	39.65	3.26	.872

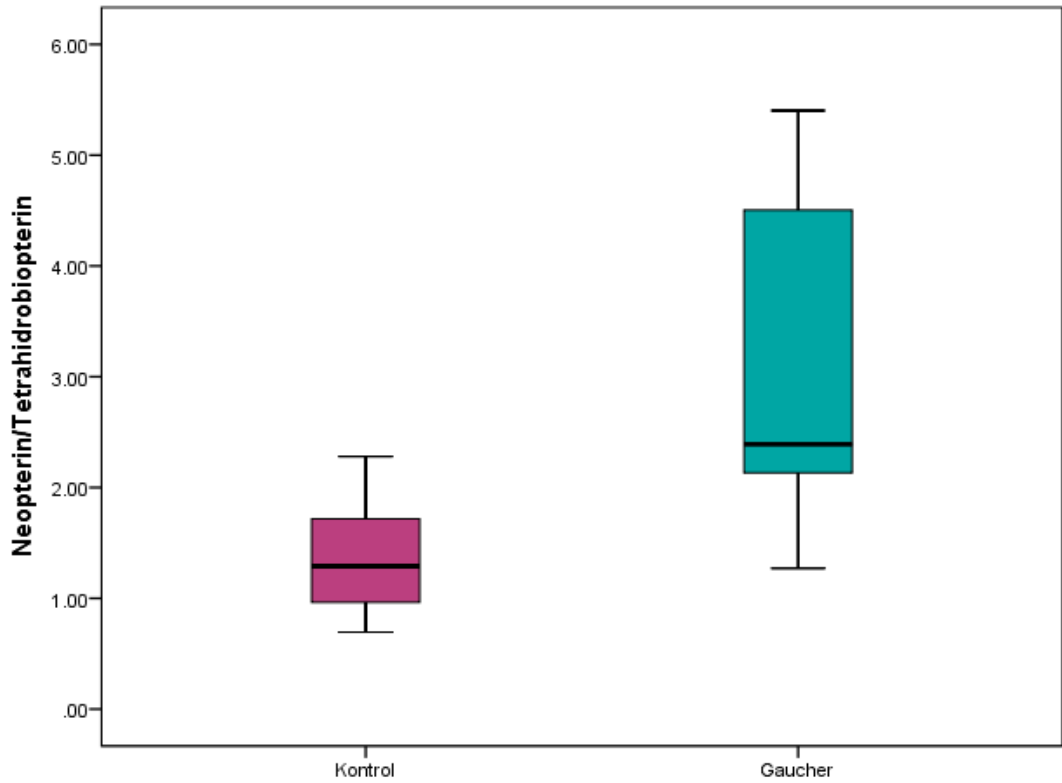
Tablo 8. SPSS CRP istatistik sonuçları

	Grup	Ortalama	Std. Sapma	Std. Hata
CRP	Kontrol	2.52	3.01	1.06
	Hasta	1.84	1.50	.61

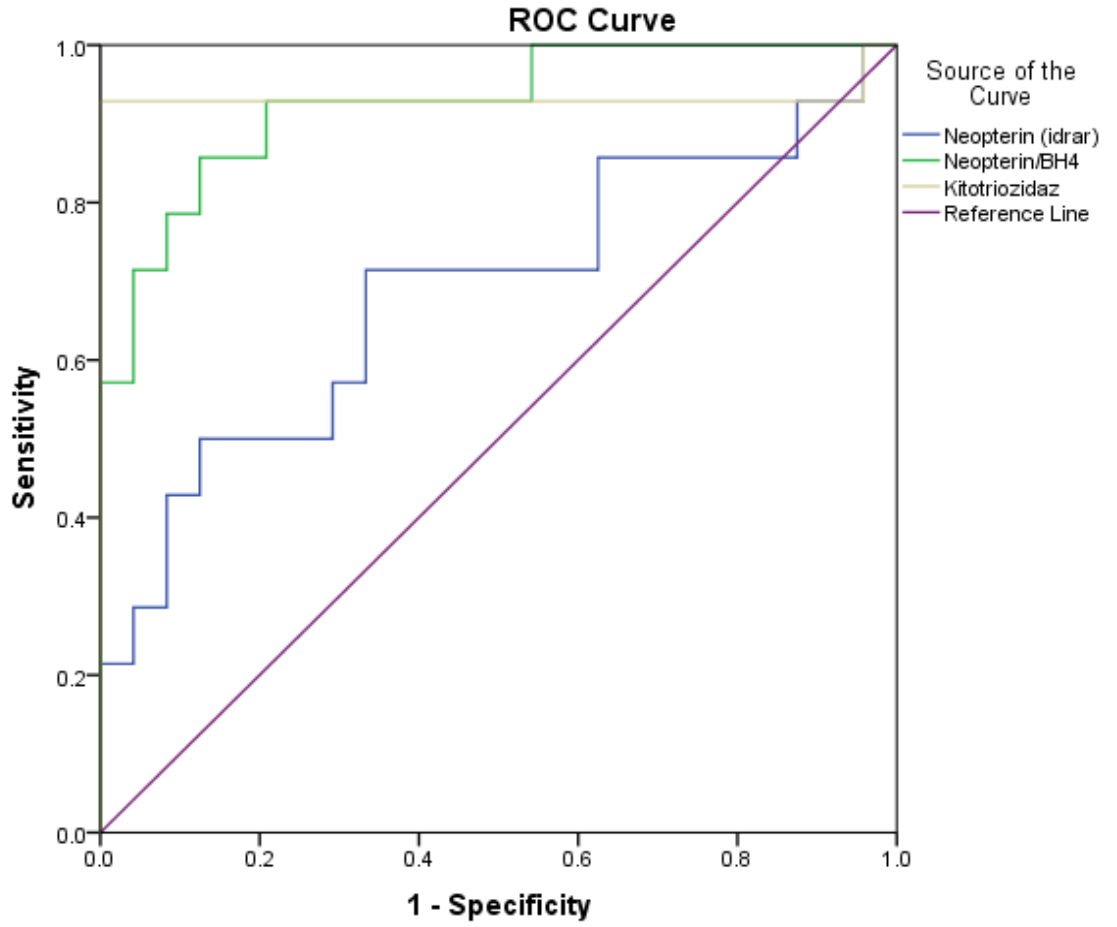
Hastaların idrarında Neopterin düzeyleri sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulunurken ($p=0.02$) Tetrahidrobiopterin düzeyleri düşük ($p=0.043$) olarak bulundu. 7-biopterin (primapterin) ve Dihidropterin düzeyi de hasta idrarlarında sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulundu, ancak bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Neopterin/Tetrahidrobiopterin oranına bakıldığında hastalarda bu oran (2.97 ± 1.33) sağlıklı kişilere (1.43 ± 0.58) göre anlamlı olarak daha yüksekti ($p=0.000$).

ROC eğrisi çizildiğinde, tek başına Neopterin ($AUC=0.688$) hastalık göstergesi olarak yeterli hassasiyete sahip değilken, Neopterin/BH4 oranının ($AUC=0.926$) kitotrioidaz ($AUC=0.932$) ile benzer spesifisite ve sensitivite gösterdiği belirlendi.



Grafik 5. Kontrol grubu ve Gaucher hastalarında Neopterin/Tetrahidrobiopterin oranını gösteren kutu grafiği



Grafik 6. Duyarlılık değerlerine karşılık gelen 1-Seçicilik değerleriyle çizilen ROC eğrisi

Tablo 9. ROC Eğrisi altındaki alan

Test Sonuç Değişkenleri	Alan
İdrar Neopterin (Mmol/Mol CREA)	.688
Neopterin/BH4	.926
Kitotriozidaz	.932

Korelasyon analizinde; sağlıklı kişilerde kitotriozidaz aktivitesi pterin metabolitleri ile herhangi bir korelasyon göstermezken hastalarda kitotriozidaz aktivitesi idrar neopterin ($p=0.018$, $r=0.622$) ve 7-biopterin ($p=0.018$, $r=0.622$) düzeyleri ile pozitif korelasyon gösterdi.

Çalışmamızda Neopterin idrar ve serum düzeyleri ile yaş arasında bir korelasyon bulunmamıştır.

SPSS'te yapılan korelasyon analizinde ELISA idrar ve serum neopterinini ölçümleri açısından (-) korelasyon bulunmuştur fakat bu zayıf bir korelasyondur.



5. Tartışma

Pteridinler ve bunların türevleri, hücre metabolizması sürecinde önemli kofaktörlerdir. Biyolojik sıvılardaki bu bileşiklerin miktarının, viral enfeksiyonlar, otoimmün hastalıklar, kronik hastalıklar ve farklı kanser türleri gibi çeşitli bozuklukların bir sonucu olarak modifiye edildiği bulunmuştur (Murr vd., 2005). Bu açıdan pteridinler potansiyel biyobelirteçler olarak düşünülebilir. Biyolojik sıvılarda pteridinlerin bazal seviyeleri hakkında çalışmalar yapılmıştır (Girgin vd., 2012) (Hyland vd., 1993).

Bu düzeylerdeki değişiklikler, birkaç hastalığın varlığının sonucu olarak tanımlanmıştır. Bu hastalıklardan biri de çalışmamızın konusu olan Gaucher hastalığıdır. Gaucher hastalığında fizyolojik cevabın kapsamlı bir şekilde anlaşılmasını sağlayan birkaç hücre tipinde (monositler, makrofajlar) sentezlenir.

Konsantrasyonları plazma, serum, CSF, tükürük ve idrar gibi çeşitli biyolojik sıvılarda LC-MS/MS, ELISA, RIA, GC-MS, kolon, kağıt ve ince Tabaka Kromatografileri, ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi dahil olmak üzere ticari olarak temin edilebilen kitlerle kolayca ölçülebilir (Neumann vd., 1998), (William vd., 1998). Doğal floresansları ve yüksek absorpsiyonları nedeniyle, pterinler nanomol konsantrasyonlarında ölçülebilir.

Gaucher hastalığında Glikosilseramid birikiminin makrofaj aktivasyonu ve metabolik değişiklikler ile karakterize edilen sistemik bir enflamatuvar reaksiyonu başlatan tetikleyici olduğu düşünülmektedir. (Castaneda, Lim, Cooper, & Pearce, 2008), (Kacher & Futerman, 2006). Bu nedenle, bu çalışmada hastalık şiddetinin klinik izlenmesini kronik bağışıklık aktivasyonu ile aydınlatılmak için biyokimyasal bir belirteç olarak neopterin metaboliti araştırıldı. Neopterin ve Makrofaj aktivasyonu ilişkisi ile ilgili birçok çalışma yapılmış olup pteridin metabolitlerinin miktarının Gaucher hücrelerinin birikimini ve kalıcı aktivasyonunu yansıtabileceğini düşündürmüştür.

Casal ve ark. Tip 1 Gaucher hastalarında neopterin ve diğer makrofaj aktivasyon belirteçlerinin serum düzeylerinde artış olduğunu bildirmiştir. (Casal, Lacerda, Pérez, ..., & 2002, y.y.)

Bu tez çalışmasında Gaucher hastalarında pteridin metabolitlerinin düzeylerini belirlemeyi ve kitotriozidaz ile karşılaştırmayı amaçladık.

Çalışmanın ilk aşamasında, pteridin metabolitlerini LC MS/MS ile belirlemek için yöntem geliştirilmiştir. LC MS/MS temelli yöntemde serum neopterin miktarı kullandığımız cihaz için LOD değerinin altında kaldığından dolayı neopterin düzeyini bu yöntemle saptayamadık. Serum neopterinini ölçümü için kantitatif sandviç enzim immüno analiz prensibine dayalı ticari kit kullandık.

İdrar için ortalama geri kazanım değerleri %81 - %99 aralığında değişmekte idi. Bu maddeler için matriks etkisi ve proses etkinliği değerleri de ölçülmüştür. Gün içi ve günler arası tekrarlanabilirlik çalışmalarında CV değerleri %15'den küçük bulunmuştur. Tüm validasyon sonuçları literatür ve uluslar arası kabul kriterleri ile uyumludur.

Sağlıklı ve erişkin bireylerde serum neopterin düzeylerinin üst limiti 10 nmol/L kabul edilmektedir. Serum neopterin konsantrasyonlarının yaşa bağımlı olup, cinsiyete bağlı olmadığı kabul edilmektedir. (Werner vd., 1987), (Ledochowski, Murr, Widner, & Fuchs, 1999), (Oettl vd., 1999) Bizim çalışmamızda Neopterin idrar ve serum düzeyleri ile yaş arasında bir korelasyon bulunmamıştır.

Pterinler konjuge pteridinler ve konjuge olmayan pteridinler olmak üzere 2 grupta incelenir. Konjuge pteridinler, para-amino benzenil glutamatlara bağlanmış folatlar olarak bilinirler. Örneğin folik asit, 6-hidroksi metil pteridin, p-amino benzoik asit ve glutamik asit olmak üzere üç kısımdan oluşmuştur (Fischer, Thöny, & Leimkühler, 2010). Konjuge pteridinler, tiamin sentezi, amino asitlerin metabolizması, pürin ve primidin sentezinde tek karbon atomu transferi reaksiyonlarında kofaktör olarak önemli rol oynamaktadırlar.

Konjuge olmayan Pterinler ise pteridin molekülünün altıncı konumundaki karbonunda basit bir hidroksil alkil grubu içermektedir. Pteridinler birçok enzim katalizli reaksiyonlarda kofaktör olarak görev yapmaktadır; tetrahidrofolat ve tetrahidromethanopterin tek karbon yapıların transferinde, molibdopterin ksantin dehidrogenaz gibi çeşitli redoks reaksiyonlarında kofaktör olarak görev yapmaktadır. (Daubner & Fitzpatrick, 2013). Konjuge olmayan pteridinler ve bunların türevleri, çeşitli vitamin ve kofaktörlerin metabolizmasında ara maddeler olarak işlev görür ve

bu pteridinlerin biyolojik konsantrasyonlarının çeşitli patofizyolojik süreçlerle değiştiği gösterilmiştir. Serum, beyin omurilik sıvısı ve idrar dahil olmak üzere farklı biyolojik sıvılarda değişmiş pteridin seviyeleri bildirilmiştir (Martín Tornero, Durán Merás, & Espinosa-Mansilla, 2014), (Fredrikson, Link, & Eneroth, 1987), (Gamagedara, Gibbons, & Ma, 2011), (Ma & Burton, 2013).

Biz çalışmamızda konjuge olmayan pterin sınıfına dahil olan BH₄, BH₂, neopterin, 7- biopterin metabolitlerini kullandık.

İdrar pteridinlerinin kontrolü için çok sayıda çalışma mevcut olmasına rağmen, bu analitlerin serum, plazma, diğer biyolojik sıvılardaki varlığını araştıran çalışmalar görece azdır. Mevcut birkaç veri neopterin veya biopterin metabolitleri ile ilgilidir fakat serumdaki pteridin paterni üzerine kapsamlı bir çalışma bulunamamıştır. Biyolojik sıvıların analizinde kullanılan kromatografik tekniklerde kaydedilen ilerlemeler, pteridin paternlerinin daha iyi anlaşılması ve patolojik olarak değerlendirilebilmeleri açısından önemlidir.

Çalışmamız için ana problem; serumdaki bu bileşiklerin düşük miktarları ve yüksek protein içeriği olmuştur.

İndirgenmiş pteridinler, dihidro ve tetrahidropteridinler çözeltide düşük kararlılık gösterir ve asitlik, oksijen, ışık gibi ortam koşullarına büyük ölçüde bağlıdır. Nötr pH'da indirgenmiş formlar, floresan formlara yol açan moleküler oksijen ile kolayca oksitlenir. Bu nedenle, örneğin, dihidropteridinlerin standart çözeltisinde, her zaman kayda değer miktarda oksitlenmiş pteridin bulunur. Biyolojik sıvılarda pteridinler, indirgenmiş ve oksitlenmiş formların bir karışımı olarak bulunur. Serum pteridin paterninin oluşturulması, mevcut tüm pteridin formlarının tanımlanmasını içerir, ancak azaltılmış formların doğal oksidasyon durumlarında tutulması çok zordur (Fekkes & Voskuilen-Kooijman, 2007).

Literatürde Pteridinlerin analizinde askorbik asit, DTE ve DTT gibi koruma ajanı kullanılmıştır, DTT bunlar arasında en çok tavsiye edilenidir (Fekkes & Voskuilen-Kooijman, 2007). Numune toplama, DTT veya benzeri reaktifler içeren tüplerde yapılmalıdır. Güneş ışığından korunmak da gereklidir. Çalışmamızda BH₄ ve BH₂'nin standart çözeltilerini hazırlamak için % 0.1 DTT kullanılmıştır (Fekkes & Voskuilen-Kooijman, 2007), (Fiege vd., y.y.).

Serumda numune hazırlarken HPLC yöntemlerinin uygulanmasından önce, proteinlerin ortadan kaldırılması ve pteridinik indirgenmiş formların oksidasyonunu önlemek gereklidir. Trikloroasetik asit veya perklorik asit gibi çeşitli kimyasal reaktifler kullanılarak çökeltme işlemi yapılmalıdır.

Tetrahydrobiopterin eksikliği, GTPCH'deki veya dihidrobiopterini geri dönüştüren enzimlerdeki mutasyonlardan kaynaklanabilir. Pterin sentez enzimlerinin eksiklikleri, idrardaki pterin türlerinin kantifikasyonu ile tespit edilir. İnterferon α ve γ , lipopolisakkaritler monosit kaynaklı makrofaj GTPCH1'in aktivitesini düzenlemektedir (Troppmair vd., 1988). GTPCH1, GTP'yi 7,8-dihidroneopterin-trifosfata metabolize eder, daha sonra spesifik olmayan fosfatazlarla fosforilasyondan sonra 7,8-dihidroneopterine dönüştürülür (Müller, Curtius, Herold, & Huber, 1991). 7,8-Dihidroneopterin sentezi primer makrofajlarda meydana gelir, çünkü 6 piruvil tetrahydropterin sentaz ekspresyonu interferon- γ ile artmaz. Böylece, GTPCH1 yolu ile GTP metabolizmasının ana ürünü insanlarda makrofaj aktivasyonu sırasında sitozolik 7,8-dihidroneopterin olur (Schoedon et al., 1987), (Werner vd., 1990).

Enzim katalizinde bir kofaktör olan 5,6,7,8 tetrahydrobiopterin pek çok metabolik olayda görev almaktadır. Th1 tipi sitokin IFN γ ile uyarılan monosit kaynaklı makrofajlar pteridin metabolitleri ve neopterin sentez edip salınmasına neden olmaktadır. Viral enfeksiyonlar, maligniteler, romatoid artrit gibi pek çok hastalıkta gösterilmiş olan neopterin konsantrasyonu artışının hücrel immun aktivasyon göstergesi olduğu öne sürülmüştür. Proinflamatuvar immun yanıt sırasında salınan IFN γ GTP siklohidrolaz enzimini indüklemektedir. GTP siklohidrolaz (GCH) enzimi serotonin, noradrenalin gibi monoaminlerin sentezi için gereklidir ayrıca GTP den 5,6,7,8 tetrahydrobiopterin (BH₄) dönüşümünü başlatmaktadır. Makrofajlarda dihidroneopterin trifosfattan BH₄ dönüşümünü sağlayan pyruvoyl tetrahydropterin sentaz enzimi eksiktir. Bu yüzden IFN γ ile makrofaj stimule edilince GTP siklohidrolaz (GCH) uyarılır ve artan miktarda neopterin salınır (Allegrı vd., 2012).

Neopterin yalnızca insan ve primatların biyolojik sıvılarında saptanmıştır (Duch, Bowers, Woolf, & Nichol, 1984). Hücre içinde D-7,8-dihidroneopterin trifosfat aktifken D-7,8-dihidroneopterin türevleri ise vücut sıvılarında baskındır. Invitro ve invivo çalışmalarda γ -interferonun stimülasyonu ile makrofajların aynı oranda neopterin ve 7,8-dihidroneopterin ürettiği belirlenmiştir (Fuchs vd., 1989).

Neopterin, dihidroneopterin trifosfatın oksidatif bir ürünüdür, biopterin ise BH_2 ve BH_4 'ün oksidatif bir ürünüdür. BH_4 eksikliği genellikle vücut sıvılarında, özellikle idrarda neopterin ve biopterin ölçülerek konulmaktadır (Bjelakovic, Jevtovic-Stoimenov, Stojanovic, & Bjelakovic, y.y.).

6-piruviltetrahidropterin sentaz (6-PTS) eksikliği neopterin yüksek seviyelerde ve biopterin düşük seviyelerde olmasına sebep olur sepiapterin redüktaz (SPT) eksikliğinde hem neopterin hem de biopterin normal düzey gösterir ve dihidropterin redüktaz eksikliği biopterin artışına ve normal neopterin düzeylerine sebep olduğu bilinmektedir (Cañada-Cañada, Espinosa-Mansilla, Muñoz de la Peña, & Mancha de Llanos, 2009).

Neopterin, malign ve inflamatuvar hastalıkların tanısında yararlı bir belirteç olarak öne sürülmüştür. (Müller vd., 1991). Vücut sıvılarında neopterin seviyelerini immün yanıt süresince ölçmek zor değildir (Putzki, Aschern, Henkel, & Heymann, 1987).

Düşük molekül ağırlığı, neopterin yapısı değişmeden böbreklerden atılımını sağlar (Denz vd., 1990). İdrar, diğer örneklerle karşılaştırıldığında klinisyenlere ve araştırmacılara çeşitli avantajlar sunmaktadır.

Doku ve serum örnekleri invaziv prosedürler kullanılarak örneklenmelidir ve karmaşık örnek matrisleri ve örnek hazırlama, ayırma teknikleri gerektiren analitik zorluklar ortaya koyabilmektedir. Solunan nefes, dışkı, tükürük ve idrar gibi noninvaziv olarak örneklenebilen alternatif örnek tipleri önerilmektedir.

Pteridinlerin öncelikle idrarla atıldığı göz önüne alındığında, pteridin biyobelirteçleri için en yüksek uygulanabilirliğe sahip örnek olarak idrar seçilmiştir. Günlük neopterin atılımında çok önemli bir değişiklik olmadığı için sonuçlar kreatinin değerleri de hesaba katılarak hesaplanabilir.

İdrar neopterin değerleri 50-250 umol NP/mol kreatinin olarak hesaplanmıştır. (Müller vd., 1991) Neopterin/kreatinin oranının ortalaması erkeklerde kadınlara göre daha düşük ölçülmüştür. Bunun nedeni erkeklerin kreatinin düzeyinin kadınlardan daha yüksek olmasıdır (Wachter vd., 1989).

Biz çalışmamızda, SPSS'te yapılan korelasyon analizinde ELISA idrar ve serum neopterin ölçümleri açısından (-) korelasyonu bulduk ancak bu zayıf bir korelasyon idi.

Çalışmamızda idrar neopterin düzeyleri ELISA ve LC MS/MS temelli yöntemle ölçülmüştür. **Kullanılan iki yöntemin karşılaştırmasında bu iki yöntemin korelasyon gösterdiği bulunmuştur (Grafik-, $p<0.01$, $r=0.708$).**

Giskeødegård ve ark. sirkadiyen ritmlere neden olan uyku yoksunluğunun, primer ve sekonder metabolit sentezini ve idrara atılmasını etkilediğini göstermiştir (Giskeødegård, Davies, Revell, Keun, & Skene, 2015). Burton ve ark. örnek toplama süresinin sirkadiyen ritimler ve folat takviyesinin idrar pteridin düzeyleri üzerindeki etkilerini araştırmıştır. Gün boyunca idrar 6-biopterin, pterin, neopterin seviyelerinde, sabah meydana gelen en yüksek ve en tutarlı seviyelerde önemli değişiklikler bildirilmiştir (Burton vd., 2016).

Ayrıca, aynı birey için idrar pteridinlerinin gün içi ve günler arası değişimi önemlidir. Böylece, üriner pteridin atılımındaki doğal varyasyonlar, hastalık biyobelirteçleri olarak klinik önemlerinin yorumlanmasında potansiyel karıştırıcı faktörler olarak akılda tutulmalıdır.

Kitotriozidaz enzim aktivitesi ölçümü Gaucher hastalığının tanısı için yapılan en yaygın testlerden biridir. Hastaların plazma CHIT enzim aktiviteleri, sağlıklı kontrollerden yaklaşık 100-1000 kat yüksektir (Cha, Park, & Lee, 1993), (Allegrı vd., 2012).

Sonuçlarımız hastalarda kitotriozidaz aktivitesindeki belirgin artışı ve bu biyobelirtecin hasta ve kontrol grupları arasında daha iyi bir ayırım kapasitesine sahip olduğunu göstermektedir. Fakat kitotriozidazın çalışmamızın hipotezlerinden biri olan en büyük dezavantajı, beyaz ırklarda CHIT enziminin üretimini engelleyen genetik varyanta sahip hastaların varlığıdır. Bu da Gaucher hastalığı için alternatif bir biyobelirtecin varlığını gerekli kılmaktadır.

Çalışmamızda Gaucher hastalarının CHIT enzim aktiviteleri kontrol grubu ile karşılaştırıldığında anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. Gaucher hastalarında plazma Neopterin düzeyleri kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır.

Serum örneklerinin matrislerinin karmaşıklığı ve pteridin analizinde gerekli olan yüksek hassasiyet ve seçicilik, yeni analiz yöntemleri olarak kromatografik sistemlere bağlı spektrofotometrik teknikleri, belirlemeyi gerektirmektedir.

Korelasyon analizinde kitotriozidaz ve LC MS/MS idrar 7-biopterin ve neopterin arasında (+) korelasyon bulunmuştur.($r=0.622$)

Hastaların idrarında Neopterin düzeyleri sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulunurken ($P=0.07$) Tetrahidrobiopterin düzeyleri düşük ($p=0.043$) olarak bulunmuştur.

GTPCH1 yolu ile GTP metabolizmasının ana ürünü insanlarda makrofaj aktivasyonu sırasında sitozolik 7,8-dihidroneopterin olur (Schoedon et al., 1987), (Werner vd., 1990). Th1 tipi sitokin IFN γ ile uyarılan monosit kaynaklı makrofajlar, pteridin metabolitleri ve neopterin sentez edip salgımlmaktadır. Proinflamatuvar immün yanıt sırasında salınan IFN γ GTP siklohidrolaz enzimini indüklemektedir. GTP siklohidrolaz (GCH) enzimi GTP den 5,6,7,8 tetrahidrobiopterin (BH $_4$) dönüşümünü başlatır. Makrofajlarda dihidroneopterin trifosfattan BH $_4$ dönüşümünü sağlayan piruvil tetrahidropterin sentaz enzimi eksik olduğu için makrofaj stimülasyonu ile GTP siklohidrolaz (GCH) uyarılır ve artan miktarda neopterin salınır (Allegrı vd., 2012) ancak BH $_4$ oluşmaz.

Çalışmamızda hastalarda BH $_4$ düzeylerinin düşük ve Neopterin düzeylerinin yüksek olmasının nedeni makrofaj aktivasyonu ile Neopterin düzeyindeki artış olabilir. Bu nedenle Neopterin/BH $_4$ oranına baktığımızda bu oran hastalarda belirgin olarak yüksek bulunmuştur. ROC eğrisi ile değerlendirdiğimizde Neopterin/BH $_4$ oranı, kitotriozidaz ile benzer sensivite gösterdiği için Gaucher hastalarında kitotriozidaz ile birlikte kullanılabilir bir gösterge olabilir düşünülmüştür.

Çalışmanın sınırlılıkları:

Gaucher hasta sayısının azlığı istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde etmemizi engellemiştir. Hastalarımızın hemen hepsi Gaucher Tip1 olduğu için tipler arasında pteridin düzeyleri açısından bir fark olup olmadığı gösterilememiştir. Hastalarımızın hepsinin enzim replasman tedavisi almakta olması da hastalığın ilk tanısında pteridin metabolitlerinin rolünü tartışmamıza engel olmuştur.

6. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamızın amacı, Gaucher hastalarında, hastalığın tanısı ve izleminde kitotriozidaz enzim aktivitesinin düşük olduğu hastalarda kullanılabilecek yeni bir gösterge araştırmaktır. Gaucher hastalığı olan bireylerde Neopterin ve pteridin metabolitlerinin hastalığın tanısı, şiddeti ve hastaların tedavisinin izlenmesinde kitotriozidaz enzimine göre üstünlüğü olup olmadığı araştırmayı amaçladık.

Bu tez çalışmasında laboratuvarımızda ilk defa pteridin metabolitlerini LC MS/MS yöntemi ile ölçmeyi başardık. Geliştirdiğimiz yöntem idrarda pteridin metabolitlerinin ölçümünü başarılı bir şekilde yaparken plazma düzeyleri ölçüm limiti altında kaldığı için LC MS/MS ile belirlenmesi mümkün olmamıştır.

İdrarda pteridin türevlerinin kantitatif tayini için çeşitli analitik teknikler geliştirilmiş ve daha önce tartışıldığı gibi klinik çalışmalara uygulanmıştır. Bununla birlikte, analitik teknikler, oksidatif ön işlemler ve diğer numune hazırlama yöntemlerindeki farklılıklar ve ayrıca idrar konsantrasyonu seyreltmesindeki ayarlamalar, idrarda değişken pteridin türevleri seviyelerine neden olabilmektedir. Bazı klinik çalışmalar benzer niceliksel yöntemler kullanarak benzer referans aralıkları bildirmiş olsa da, çalışmalarda genellikle bildirilen referans aralıkları önemli ölçüde farklılık göstermektedir.

Teknik standardizasyonlar klinik çalışmalarda daha iyi doğruluk ve tekrarlanabilirlik sağlayacaktır. Bizim geliştirdiğimiz yöntemde tekrarlanabilirlik çalışmamızın sonuçları %2-18 arasında değişmekte olup sonuçlarımızın kesinliğini göstermektedir. ELISA yönteminin; uygulama zorlukları, özellikle interferans sebebiyle selektivitesinin düşük olması, aynı örnekten yapılan analizlerde farklı sonuçlar elde edilmesi, tek seferde sadece bir analitin tayin edilebilmesi LC-MS/MS'e göre dezavantaj sağlamaktadır. Yüksek sensitive ve spesifite ile daha doğru hasta sonuçları verebilmek için LC-MS/MS kullanımını önermekteyiz.

Çalışmamızda Gaucher hastalarının kanında Neopterin düzeyi ve kitotriozidaz aktiviteleri ve idrarda Neopterin yanı sıra BH4, 7,8 dihidriopterin ve primapterin düzeyleri belirlenmiş ve hastalığın tanısındaki değeri araştırılmıştır.

Bir depolama hücresi biyobelirteci olarak, plazma neopterin konsantrasyonu, Gaucher hücrelerinin birikimini ve aktivasyonunu yansıtabilir ve bu kompleks bozukluktaki kronik bağışıklık aktivasyonunun derecesi hakkında değerli bilgiler sağlayabilir.

Çalışmamızda edindiğimiz veriler sonucu hastaların idrarında Neopterin düzeylerini sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulduk. Gaucher hastalarında idrarda oldukça yüksek değerlerde neopterin düzeylerine rastlanması bu hastalarda Neopterin hastalığın taranmasında, prognozunda kullanılabilecek muhtemel bir belireç olabileceğini göstermektedir.

BH₄ düzeyleri düşük bulunurken Neopterin/Tetrahydrobiopterin oranına bakıldığında hastalarda bu oran sağlıklı kişilere göre anlamlı olarak daha yüksekti. Neopterin düzeylerinin yüksek BH₄ düzeylerinin düşük olması makrofaj aktivasyon göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen en önemli bulgu Gaucher hastalarının idrarında Neopterin/BH₄ oranının anlamlı olarak yüksek bulunması ve Kitotriozidaza eş değer bir sensitivite göstermesidir. ROC eğrisi çizildiğinde, tek başına Neopterin hastalık göstergesi olarak yeterli hassasiyete sahip değilken, Neopterin/BH₄ oranının kitotrioidaz ile benzer spesifisite ve sensitivite gösterdiği belirlendi. Gaucher hastalığının tipleri açısından bir değerlendirme yapmak için hasta sayısının daha fazla olduğu bir çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Çalışmamızda 7-biopterin (primapterin) ve Dihidropterin düzeylerini de hasta idrarlarında sağlıklı kişilere göre daha yüksek bulduk fakat bu yükseklik istatistiksel olarak anlamlı değildi.

Pteridin metabolitlerinin tek tek Gaucher hastalığının tanı ve teşhisinde CHIT enzim aktivisine göre üstünlüğü bulunamamıştır. Fakat idrardaki Neopterin/BH₄ oranı özellikle kitotriosidaz eksikliği olan hastalarda, Gaucher hastalığı için güvenilir bir biyobelirteç olarak kabul edilebilir. Neopterin ve BH₄ ölçümünün bir avantajı, idrar örneğinde çalışılması ve hızlı sonuç vermesidir.

Sonuç olarak, çalışmamız Gaucher hastalarında hastalığın tanısı ve izleminde Neopterin ve BH₄ düzeylerinin idrarda LC MS/MS ile belirlenmesinin özellikle

kitotriozidazı genetik olarak düşük olan hastalarda yararlı olacağını göstermiştir. İdrar örneğinin non-invaziv olarak elde edilebilir olması, LC MS/MS ile hızlı sonuç verilebilmesi ve testin doğruluk ve kesinliğinin gösterilmiş olması nedeniyle Neopterin/BH₄ oranının önemli bir gösterge olarak klinikte kullanılabileceğini düşünüyoruz.



7. Kaynaklar

- Abrahamov, A., Elstein, D., Zimran, A., Farber, B., Glaser, Y., Gross-Tsur, V., ... Tafakjdi, M. (1995). Gaucher's disease variant characterised by progressive calcification of heart valves and unique genotype. *The Lancet*, *346*(8981), 1000–1003. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(95\)91688-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(95)91688-1)
- Allegri, G., Costa Netto, H. J. B., Ferreira Gomes, L. N. L., Costa De Oliveira, M. L., Scalco, F. B., & De Aquino Neto, F. R. (2012). Determination of six pterins in urine by LC-MS/MS. *Bioanalysis*, *4*(14), 1739–1746. <https://doi.org/10.4155/bio.12.131>
- Balwani, M., Fuerstman, L., Kornreich, R., Edelmann, L., & Desnick, R. J. (2010). Type 1 Gaucher disease: significant disease manifestations in “asymptomatic” homozygotes. *Archives of internal medicine*, *170*(16), 1463–1469. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2010.302>
- Basu, P., & Burgmayer, S. J. N. (2011, Mayıs). Pterin chemistry and its relationship to the molybdenum cofactor. *Coordination Chemistry Reviews*. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2011.02.010>
- Beutler, E., Grabowski, G., Scriver, C., Hill, A. B.-N. Y. M. G., & 1995, undefined. (y.y.). Gaucher disease. *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*.
- Beutler, Ernest. (2007). Gaucher disease: multiple lessons from a single gene disorder. *Acta Paediatrica*, *95*, 103–109. <https://doi.org/10.1111/j.1651-2227.2006.tb02398.x>
- Bjelakovic, G. M., Jevtovic-Stoimenov, T., Stojanovic, I., & Bjelakovic, B. (y.y.). *PTERIDINES-METABOLIC FUNCTIONS AND CLINICAL DISORDERS The influence of galectin-3 on myocardial remodeling and early clinical outcome in patients with acute myocardial infarction View project TNF alpha and human disease View project*. Tarihinde adresinden erişildi <https://www.researchgate.net/publication/42368648>
- Boven, L. A., van Meurs, M., Boot, R. G., Mehta, A., Boon, L., Aerts, J. M., & Laman, J. D. (2004). Gaucher Cells Demonstrate a Distinct Macrophage Phenotype and Resemble Alternatively Activated Macrophages. *American Journal of Clinical Pathology*, *122*(3), 359–369. <https://doi.org/10.1309/BG5VA8JRDQH1M7HN>

- Burton, C., Shi, H., & Ma, Y. (2016). Daily variation and effect of dietary folate on urinary pteridines. *Metabolomics*, *12*(5), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s11306-016-1019-4>
- Cabrerizo, F. M., Petroselli, G., Lorente, C., Capparelli, A. L., Thomas, A. H., Braun, A. M., & Oliveros, E. (2005). Substituent Effects on the Photophysical Properties of Pterin Derivatives in Acidic and Alkaline Aqueous Solutions. *Photochemistry and Photobiology*, *81*(5), 1234. <https://doi.org/10.1562/2005-05-10-ra-522>
- Cañada-Cañada, F., Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., & Mancha de Llanos, A. (2009). Determination of marker pteridins and biopterin reduced forms, tetrahydrobiopterin and dihydrobiopterin, in human urine, using a post-column photoinduced fluorescence liquid chromatographic derivatization method. *Analytica Chimica Acta*, *648*(1), 113–122. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.06.045>
- Capuron, L., Geisler, S., Kurz, K., Leblhuber, F., Sperner-Unterweger, B., & Fuchs, D. (2014). Activated Immune System and Inflammation in Healthy Ageing: Relevance for Tryptophan and Neopterin Metabolism. *Current Pharmaceutical Design*, *20*(38), 6048–6057. <https://doi.org/10.2174/1381612820666140317110217>
- Casal, J., Lacerda, L., Pérez, L., ... R. P.-C. C. and, & 2002, undefined. (y.y.). Relationships between serum markers of monocyte/macrophage activation in type 1 Gaucher's disease. *degruyter.com*. Tarihinde adresinden erişildi <https://www.degruyter.com/view/journals/cclm/40/1/article-p52.xml>
- Castaneda, J. A., Lim, M. J., Cooper, J. D., & Pearce, D. A. (2008, Şubat). Immune system irregularities in lysosomal storage disorders. *Acta Neuropathologica*. *Acta Neuropathol.* <https://doi.org/10.1007/s00401-007-0296-4>
- Cha, K. W., Park, S., & Lee, Y. (1993). *Capillary Electrophoretic Separation of Pteridine Compounds*. *degruyter.com* (C. 4). Tarihinde adresinden erişildi <https://www.degruyter.com/downloadpdf/j/pteridines.1993.4.issue-4/pteridines.1993.4.4.210/pteridines.1993.4.4.210.xml>
- Cox, T. M. (2001). Gaucher disease: understanding the molecular pathogenesis of sphingolipidoses. *Journal of inherited metabolic disease*, *24 Suppl 2*, 106–121;

discussion 87-8. <https://doi.org/10.1023/A:1012496514170>

Cox, T. M., & Schofield, J. P. (1997). Gaucher's disease: Clinical features and natural history. *Bailliere's Clinical Haematology*, *10*(4), 657–689. [https://doi.org/10.1016/S0950-3536\(97\)80033-9](https://doi.org/10.1016/S0950-3536(97)80033-9)

Daubner, S. C., & Fitzpatrick, P. F. (2013). Pteridines. *Encyclopedia of Biological Chemistry: Second Edition*, 666–669. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-378630-2.00023-2>

De Rosa, S., Cirillo, P., Pacileo, M., Petrillo, G., D'Ascoli, G.-L., Maresca, F., ... Chiariello, M. (2011). Neopterin: From Forgotten Biomarker to Leading Actor in Cardiovascular Pathophysiology. *Current Vascular Pharmacology*, *9*(2), 188–199. <https://doi.org/10.2174/157016111794519372>

Deegan, P. B., Moran, M. T., McFarlane, I., Schofield, J. P., Boot, R. G., Aerts, J. M. F. G., & Cox, T. M. (2005). Clinical evaluation of chemokine and enzymatic biomarkers of Gaucher disease. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, *35*(2), 259–267. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2005.05.005>

Denz, H., Fuchs, D., Huber, H., Nachbaur, D., Reibnegger, G., Thaler, J., ... Wachter, H. (1990). Correlation between neopterin, interferon-gamma and haemoglobin in patients with haematological disorders. *European Journal of Haematology*, *44*(3), 186–189. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0609.1990.tb00374.x>

Duch, D. S., Bowers, S. W., Woolf, J. H., & Nichol, C. A. (1984). Biopterin cofactor biosynthesis: GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin in tissues and body fluids of mammalian species. *Life Sciences*, *35*(18), 1895–1901. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(84\)90541-1](https://doi.org/10.1016/0024-3205(84)90541-1)

Fairley, C., Zimran, A., Phillips, M., Cizmarik, M., Yee, J., Weinreb, N., & Packman, S. (2008). Phenotypic heterogeneity of N370S homozygotes with type I Gaucher disease: an analysis of 798 patients from the ICGG Gaucher Registry. *Journal of inherited metabolic disease*, *31*(6), 738–744. <https://doi.org/10.1007/s10545-008-0868-z>

Fekkes, D., & Voskuilen-Kooijman, A. (2007). Quantitation of total biopterin and tetrahydrobiopterin in plasma. *Clinical Biochemistry*, *40*(5–6), 411–413. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2006.12.001>

- Fiege, B., Ballhausen, D., Kierat, L., Leimbacher, W., Goriounov, D., Schircks, B., ... Blau, N. (y.y.). Plasma tetrahydrobiopterin and its pharmacokinetic following oral administration. *Elsevier*. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2003.09.014>
- Finn, L. S., Zhang, M., Chen, S. H., & Scott, C. R. (2000). Severe type II Gaucher disease with ichthyosis, arthrogyrosis and neuronal apoptosis: molecular and pathological analyses. *American journal of medical genetics*, *91*(3), 222–226. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10756347>
- Fischer, M., Thöny, B., & Leimkühler, S. (2010). The biosynthesis of folate and pterins and their enzymology. İçinde *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and Biology* (C. 7, ss. 599–648). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/b978-008045382-8.00150-7>
- Fitzpatrick, P. F. (1999). Tetrahydropterin-Dependent Amino Acid Hydroxylases. *Annual Review of Biochemistry*, *68*(1), 355–381. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.68.1.355>
- Fredrikson, S., Link, H., & Eneroth, P. (1987). CSF neopterin as marker of disease activity in multiple sclerosis. *Acta Neurologica Scandinavica*, *75*(5), 352–355. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1987.tb05458.x>
- Fuchs, D., Milstien, S., Krämer, A., Reibnegger, G., Werner, E. R., Goedert, J. J., ... Wachter, H. (1989). Urinary neopterin concentrations vs total neopterins for clinical utility. *Clinical chemistry*, *35*(12), 2305–2307. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2591046>
- Fuchs, D., Weiss, G., & Wachter, H. (1993). Neopterin, biochemistry and clinical use as a marker for cellular immune reactions. *International Archives of Allergy and Immunology*. <https://doi.org/10.1159/000236491>
- Gamagedara, S., Gibbons, S., & Ma, Y. (2011). Investigation of urinary pteridine levels as potential biomarkers for noninvasive diagnosis of cancer. *Clinica Chimica Acta*, *412*(1–2), 120–128. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2010.09.015>
- Gervas-Arruga, J., Cebolla, J. J., de Blas, I., Roca, M., Pocovi, M., & Giraldo, P. (2015). The Influence of Genetic Variability and Proinflammatory Status on the Development of Bone Disease in Patients with Gaucher Disease. *PLOS ONE*, *10*(5), e0126153. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126153>

- Gieseg, S. P., Baxter-Parker, G., & Lindsay, A. (2018, Temmuz 1). Neopterin, inflammation, and oxidative stress: What could we be missing? *Antioxidants*. MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/antiox7070080>
- Girgin, G., Baydar, T., Fuchs, D., Sahin, G., Özmert, E., & Yurdakök, K. (2012). Evaluation of serum and urinary levels of some pteridine pathway components in healthy Turkish children. *Pteridines*, 23(3), 90–95. <https://doi.org/10.1515/pteridines.2012.23.1.90>
- Giskeødegård, G. F., Davies, S. K., Revell, V. L., Keun, H., & Skene, D. J. (2015). Diurnal rhythms in the human urine metabolome during sleep and total sleep deprivation. *Scientific Reports*, 5(1), 14843. <https://doi.org/10.1038/srep14843>
- Goker-Alpan, O., Schiffmann, R., Park, J. K., Stubblefield, B. K., Tayebi, N., & Sidransky, E. (2003). Phenotypic continuum in neuronopathic Gaucher disease: An intermediate phenotype between type 2 and type 3. *Journal of Pediatrics*, 143(2), 273–276. [https://doi.org/10.1067/S0022-3476\(03\)00302-0](https://doi.org/10.1067/S0022-3476(03)00302-0)
- Grabowski, G. A., Andria, G., Baldellou, A., Campbell, P. E., Charrow, J., Cohen, I. J., ... Vellodi, A. (2004a). Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements. *European journal of pediatrics*, 163(2), 58–66. <https://doi.org/10.1007/s00431-003-1362-0>
- Grabowski, G. A., Andria, G., Baldellou, A., Campbell, P. E., Charrow, J., Cohen, I. J., ... Vellodi, A. (2004b). Pediatric non-neuronopathic Gaucher disease: Presentation, diagnosis and assessment. Consensus statements. İçinde *European Journal of Pediatrics* (C. 163, ss. 58–66). <https://doi.org/10.1007/s00431-003-1362-0>
- Gupta, N., Oppenheim, I. M., Kauvar, E. F., Tayebi, N., & Sidransky, E. (2011a). Type 2 Gaucher disease: phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood cells, molecules & diseases*, 46(1), 75–84. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.08.012>
- Gupta, N., Oppenheim, I. M., Kauvar, E. F., Tayebi, N., & Sidransky, E. (2011b, Ocak 15). Type 2 Gaucher disease: Phenotypic variation and genotypic heterogeneity. *Blood Cells, Molecules, and Diseases*. <https://doi.org/10.1016/j.bcmd.2010.08.012>

- Harris, C. M., Taylor, D. S., & Vellodi, A. (1999). Ocular motor abnormalities in Gaucher disease. *Neuropediatrics*, *30*(6), 289–293. <https://doi.org/10.1055/s-2007-973507>
- Hausen, A., Fuchs, D., Reibnegger, G., Werner, E. R., & Wachter, H. (1989). Neopterin in clinical use. *Pteridines*, *1*(1), 3–16. <https://doi.org/10.1515/pteridines.1989.1.1.3>
- Hollak, C. E. M., Van Weely, S., Van Oers, M. H. J., & Aerts, J. M. F. G. (1994). Marked elevation of plasma chitotriosidase activity. A novel hallmark of Gaucher disease. *Journal of Clinical Investigation*, *93*(3), 1288–1292. <https://doi.org/10.1172/JCI117084>
- Horowitz, M., Pasmanik-Chor, M., Borochowitz, Z., Falik-Zaccai, T., Heldmann, K., Carmi, R., ... Eyal, N. (1998). Prevalence of glucocerebrosidase mutations in the Israeli Ashkenazi Jewish population. *Human Mutation*, *12*(4), 240–244. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)12:4<240::AID-HUMU4>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)12:4<240::AID-HUMU4>3.0.CO;2-J)
- Hyland, K., Surtees, R. A. H., Heales, S. J. R., Bowron, A., Howells, D. W., & Smith, I. (1993). Cerebrospinal fluid concentrations of pterins and metabolites of serotonin and dopamine in a pediatric reference population. *Pediatric Research*, *34*(1), 10–14. <https://doi.org/10.1203/00006450-199307000-00003>
- János, B. (2017). A tetrahidrobiopterin (BH4)-deficiencia diagnosztikája és kezelése. *Orvosi Hetilap*, *158*(48), 1897–1902. <https://doi.org/10.1556/650.2017.30895>
- Jiménez Girón, A., Martín-Tornero, E., Hurtado Sánchez, M. C., Durán Merás, I., & Espinosa Mansilla, A. (2012). A simple HPLC-ESI-MS method for the direct determination of ten pteridinic biomarkers in human urine. *Talanta*, *101*, 465–472. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2012.09.061>
- Kacher, Y., & Futerman, A. H. (2006, Ekim 9). Genetic diseases of sphingolipid metabolism: Pathological mechanisms and therapeutic options. *FEBS Letters*. FEBS Lett. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2006.08.041>
- Ledochowski, M., Murr, C., Widner, B., & Fuchs, D. (1999). Association between insulin resistance, body mass and neopterin concentrations. *Clinica Chimica Acta*, *282*(1–2), 115–123. [https://doi.org/10.1016/S0009-8981\(99\)00019-4](https://doi.org/10.1016/S0009-8981(99)00019-4)

- Ma, Y., & Burton, C. (2013, Ekim). Pteridine detection in urine: the future of cancer diagnostics? *Biomarkers in Medicine*. <https://doi.org/10.2217/bmm.13.88>
- Mahmoud, R. A. K., El-Gendi, H. I., & Ahmed, H. H. (2005). Serum neopterin, tumor necrosis factor- α and soluble tumor necrosis factor receptor II (p75) levels and disease activity in Egyptian female patients with systemic lupus erythematosus. *Clinical Biochemistry*, 38(2), 134–141. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2004.11.002>
- Malaguarnera, L. (2006, Aralık). Chitotriosidase: The yin and yang. *Cellular and Molecular Life Sciences*. <https://doi.org/10.1007/s00018-006-6269-2>
- Mankin, H. J., Rosenthal, D. I., & Xavier, R. (2001). Gaucher disease. New approaches to an ancient disease. *The Journal of bone and joint surgery. American volume*, 83-A(5), 748–762. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11379747>
- Martín Tornero, E., Durán Merás, I., & Espinosa-Mansilla, A. (2014). HPLC determination of serum pteridine pattern as biomarkers. *Talanta*, 128, 319–326. <https://doi.org/10.1016/j.talanta.2014.04.052>
- Meikle, P. J., Hopwood, J. J., Clague, A. E., & Carey, W. F. (1999). Prevalence of lysosomal storage disorders. *Journal of the American Medical Association*, 281(3), 249–254. <https://doi.org/10.1001/jama.281.3.249>
- Mistry, P. K., Cappellini, M. D., Lukina, E., Özsan, H., Mach Pascual, S., Rosenbaum, H., ... Massenkeil, G. (2011). A reappraisal of Gaucher disease-diagnosis and disease management algorithms. *American Journal of Hematology*, 86(1), 110–115. <https://doi.org/10.1002/ajh.21888>
- Müller, M. M., Curtius, H. C., Herold, M., & Huber, C. H. (1991, Eylül 14). Neopterin in clinical practice. *Clinica Chimica Acta*. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(91\)90019-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(91)90019-9)
- Murr, C., Widner, B., Wirleitner, B., & Fuchs, D. (2005). Neopterin as a Marker for Immune System Activation. *Current Drug Metabolism*, 3(2), 175–187. <https://doi.org/10.2174/1389200024605082>
- Nalysnyk, L., Rotella, P., Simeone, J. C., Hamed, A., & Weinreb, N. (2017). Gaucher disease epidemiology and natural history: a comprehensive review of the

literature. *Hematology*, 22(2), 65–73.
<https://doi.org/10.1080/10245332.2016.1240391>

Nature, F. H.-, & 1889, undefined. (y.y.). Note on a yellow pigment in butterflies.

Neumann, M. C., Sprenger, H., Grebe, S. O., Gemsa, D., Reibnegger, G., Lange, H., & Müller, T. F. (1998). Neopterin, serum amyloid A, and cytokine monitoring after renal transplantation. *Pteridines*. International Society of Pteridinology. <https://doi.org/10.1515/pteridines.1998.9.2.113>

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(1), 262–267. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1520>

Pourakbari, B., Mamishi, S., Zafari, J., Khaikah, H., Ashtiani, M. H., Abedini, M., ... Rad, S. S. (y.y.). Evaluation of procalcitonin and neopterin level in serum of patients with acute bacterial infection. *The Brazilian journal of infectious diseases : an official publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases*, 14(3), 252–255. Tarihinde adresinden erişildi <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20835508>

Putzki, H., Aschern, F., Henkel, E., & Heymann, H. (1987). Neopterin - A tumor marker in colorectal carcinoma? *Diseases of the Colon & Rectum*, 30(11), 879–883. <https://doi.org/10.1007/BF02555429>

Renkema, G. H., Boot, R. G., Muijsers, A. O., Donker-Koopman, W. E., & Aerts, J. M. F. G. (1995). Purification and characterization of human chitotriosidase, a novel member of the chitinase family of proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(5), 2198–2202. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.5.2198>

Reuser, A. J. J., & Drost, M. R. (2006). Lysosomal dysfunction, cellular pathology and clinical symptoms: Basic principles. İçinde *Acta Paediatrica, International Journal of Paediatrics* (C. 95, ss. 77–82). <https://doi.org/10.1080/08035320600618957>

SCHOEDON, G., TROPPEMAYR, J., FONTANA, A., HUBER, C., CURTIUS, H. -C, & NIEDERWIESER, A. (1987). Biosynthesis and metabolism of pterins in peripheral blood mononuclear cells and leukemia lines of man and mouse.

- European Journal of Biochemistry*, 166(2), 303–310.
<https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1987.tb13515.x>
- Sidransky, E. (1997). New perspectives in type 2 Gaucher disease. *Advances in pediatrics*, 44, 73–107. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9265968>
- Thöny, B., Auerbach, G., & Blau, N. (2000, Nisan 1). Tetrahydrobiopterin biosynthesis, regeneration and functions. *Biochemical Journal*.
<https://doi.org/10.1042/0264-6021:3470001>
- Tomšíková, H., Tomšík, P., Solich, P., & Nováková, L. (2013, Eylül). Determination of pteridines in biological samples with an emphasis on their stability. *Bioanalysis*. <https://doi.org/10.4155/bio.13.194>
- Troppmair, J., Nachbaur, K., Herold, M., Aulitzky, W., Tilg, H., Gastl, G., ... Mull, B. (1988). In-vitro and in-vivo studies on the induction of neopterin biosynthesis by cytokines, alloantigens and lipopolysaccharide (LPS). *Clinical and experimental immunology*, 74(3), 392–397. Tarihinde adresinden erişildi
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3148378>
- Tylki-Szymańska, A., Vellodi, A., El-Beshlawy, A., Cole, J. A., & Kolodny, E. (2010). Neuronopathic Gaucher disease: Demographic and clinical features of 131 patients enrolled in the International Collaborative Gaucher Group Neurological Outcomes Subregistry. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(4), 339–346.
<https://doi.org/10.1007/s10545-009-9009-6>
- Wachter, H., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., & Werner, E. R. (1989). Neopterin as Marker for Activation of Cellular Immunity: Immunologic Basis and Clinical Application. *Advances in Clinical Chemistry*, 27(C), 81–141.
[https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60182-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60182-1)
- Wenger, D. A., Clark, C., Sattler, M., & Wharton, C. (1978). Synthetic substrate β -glucosidase activity in leukocytes: A reproducible method for the identification of patients and carriers of Gaucher's disease. *Clinical Genetics*, 13(2), 145–153.
<https://doi.org/10.1111/j.1399-0004.1978.tb04242.x>
- Werner, E. R., Bichler, A., Daxenbichler, G., Fuchs, D., Fuith, L. C., Hausen, A., ... Wachter, H. (1987). Determination of neopterin in serum and urine. *Clinical*

Chemistry, 33(1), 62–66. <https://doi.org/10.1093/clinchem/33.1.62>

Werner, E. R., Werner-Felmayer, G., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Yim, J. J., ... Wachter, H. (1990). Tetrahydrobiopterin biosynthetic activities in human macrophages, fibroblasts, THP-1, and T 24 cells. GTP-cyclohydrolase I is stimulated by interferon- γ , and 6-pyruvoyl tetrahydropterin synthase and sepiapterin reductase are constitutively present. *Journal of Biological Chemistry*, 265(6), 3189–3192.

William, J., Saad, N., Salib, M., Riad, H., Mahran, K. S., Iskander, I., ... Barsoum, R. (1998). The acute effect of intravenously administered recombinant human erythropoietin on the immune response of uremic patients maintained on regular hemodialysis. *Artificial Organs*, 22(3), 192–196. <https://doi.org/10.1046/j.1525-1594.1998.06041.x>

8. Ekler

8.1. Etik Kurul Onay Belgesi

T.C. EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat. Erzene Ankara Cad. 35100 Bornova / İZMİR Tel:0 232 390 4219 - 373 78 81 Fax: 0232 390 21 34 e-mail: aetik@mail.ege.edu.tr www.aek.med.ege.edu.tr						
ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ						
BAŞVURU BİLGİLERİ	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gaucher Hastalığının Tanısı ve Şiddetinin Göstergesi Olarak Pteridin Metabolitlerinin Araştırılması				
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU					
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UNVANI/ADI/SOYADI	Prof. Dr. Eser SÖZMEN				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACI UZMANLIK ALANI	Klinik Biyokimya				
	KOORDİNATÖR/SORUMLU ARAŞTIRMACININ BULUNDUĞU MERKEZ	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Klinik Biyokimya Bilim Dalı				
	DESTEKLEYİCİ	Bilimsel Araştırmalar Proje Fonu				
	PROJE YÜRÜTÜCÜSÜ UNVANI/ADI/SOYADI (TÜBİTAK vb. kaynaklardan destek alanlar için)					
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ					
DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi				
	ARAŞTIRMA BAŞVURU FORMU					
	BİLGİLENDİRME FORMU					
	VERİ İZLEME FORMU/ ANKET	<input type="checkbox"/>				
	ARAŞTIRMA BÜTÇESİ	<input checked="" type="checkbox"/>				
	DİĞER	<input type="checkbox"/>				
KARAR BİLGİLERİ	Karar Nu: 19-1.1T/34	Tarih: 23.01.2019				
	Yukarıda başvuru bilgileri verilen araştırma başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gereke, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak Kurulumuzca incelenmiş, araştırma giderlerinin gönüllüye ve/veya bağlı bulunduğu sosyal güvenlik kurumuna ödetilmediği koşullarda araştırmaya başlanmasının etik açıdan uygun bulunduğuna toplantıya katılan etik kurul üye tam sayısının salt çoğunluğu ile karar verilmiştir.					
EGE ÜNİVERSİTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU						
CALIŞMA-ESASI						
Ege Üniversitesi Tıbbi Araştırmalar Etik Kurul Yönergesi, İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu						
BAŞKANIN UNVANI / ADI / SOYADI:						
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU						
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyelği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU Başkan	Halk Sağlığı AD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Halk Sağlığı AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç.Dr. Şafak DAĞHAN Başkan Yardımcısı	Halk Sağlığı Hemşireliği AD.	Ege Üniversitesi Hemşirelik Fakültesi Halk Sağlığı Hemşireliği AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Sadık AKŞİT Üye	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Aliye MANDIRACIOĞLU	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi				Sayfa 1/2	



T.C.
EGE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ TIBBİ ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2.Kat., Erzene Ankara.Cad. 35100 Bornova / İZMİR
Tel:0 232 390 4219 - 373.78 81 Fax: 0232 390 21 34
e-mail: aetikk@mail.ege.edu.tr- www.aek.med.ege.edu.tr



ARAŞTIRMA BAŞVURUSU ONAY BELGESİ

ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Gaucher Hastalığının Tanısı ve Şiddetinin Göstergesi Olarak Pteridin Metabolitlerinin Araştırılması
ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	

KARAR BİLGİLERİ		Karar Nu : 19-1.1T/34				
Unvanı / Adı / Soyadı EK Üyeliği	Uzmanlık Dalı	Kurumu	Cinsiyeti	İlişki (*)	Katılım (**)	İmza
Prof. Dr. Ayhan DÖNMEZ Üye	İç Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Murat ULUKUŞ Üye	Kadın Hastalıkları ve Doğum	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Kadın Hastalıkları ve Doğum Anabilim Dalı	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Ceyda KABAROĞLU Üye	Klinik Biyokimya BD.	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya AD. Klinik Biyokimya BD.	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Özen Önen SERTÖZ Raportör Üye	Ruh Sağlığı ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Ruh Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. Günay YETİK ANACAK Üye	Farmakoloji	Ege Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Prof. Dr. H. Oya TÜRKÖĞLU ÇAKAL Üye	Periodontoloji	Ege Üniversitesi Diş Hek. Fakültesi Periodontoloji AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input checked="" type="checkbox"/> E <input type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Recı MESERİ Üye	Beslenme ve Diyetetik AD	Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Fakültesi Beslenme ve Diyetetik AD	K	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	
Doç. Dr. Tahir ATİK Üye	Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları	Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı Ve Hastalıkları AD Çocuk Genetik BD.	E	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	<input type="checkbox"/> E <input checked="" type="checkbox"/> H	

* Araştırma ile İlişki
** Toplantıda Bulunma

Etik Kurul Başkanının Unvanı/Adı/Soyadı: Prof. Dr. Alpa	Araştırma Başvurusu Onay Belgesi	Belge Kodu	Rev. Tarihi / No.su:	Sayfa
		22	28.09.2011/05	2/2

8.2. 6-12 Yaş Hasta Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmanın amacı doğuştan olan bazı hastalıkların tanınması ve tedavinin takibinde bazı maddelerin (proteinler) düzeylerini ölçmenin yararının araştırılmasıdır.

NEDEN BEN SEÇİLDİM

Doğuştan vücudunuzda bazı moleküller eksik olduğu ya da iyi çalışmadığı için bu çalışmaya seçildiniz.

KATILIRSAM BANA NE OLACAK

Bu araştırmadan tıbbi olarak bir yarar sağlamayacaksınız. Ama bu çalışmanın sonuçları ilerideki yaşantınızda size ve başka hastaların yararına kullanılabilecektir.

NE YAPMAM GEREKECEK

Yapılan rutin kontroller sırasında alınan kan örnekleri yanında yanında 2 tüp (toplamda 1 tatlı kaşığı kadar) kan alımı yapılacaktır. Bu kan örnekleri alınması için yeniden iğne batırılmayacak ve örnekler sadece bu araştırma için kullanılacaktır. Ayrıca iki tatlı kaşığı kadar idrar örneği alınacaktır. Araştırma ile ilgili olarak ikinci örneklem gerekirse yeniden kan alımı gerekecektir. Bu koşula uymak istemezseniz çalışma dışında tutulacaksınız.

KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR

Bu araştırmada tek bir kez örnek alınacak olup bir daha kontrole gelmeniz gerekmemektedir.

KATILMAMIN OLASI ZARAR YA DA RİSKLERİ NELER

Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde iltihap ya da küçük bir kan toplanması olabilir. Zaten başka bir nedenle kan örneği alınacağı sırada fazladan 2 tüp kan örneği alınacağı için bu örnek alımı sizin için fazladan bir risk oluşturmayacaktır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.

UYGULANACAK TEDAVİLERİN KATILIMCILAR ÜZERİNE NE GİBİ YAN ETKİLERİ OLUR

Çalışma için herhangi bir tedavi gerekmediği için herhangi bir yan etki sorunu olmayacaktır.

VÜCUDUMDAN ALINAN ÖRNEKLERLE NE YAPILACAK

Kan ve idrar örneklerinde hastalığa ait bazı proteinlerin ve moleküllerin düzeyleri ölçülecektir.

ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MI

Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size, ailenize veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.
ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE BİR ÖDEME YAPILACAK MI
Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.
ARAŞTIRMAYA KATILDIĞIM GİZLİ TUTULACAK MI
Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlsa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.
ÇALIŞMAYA KATILMAZSAM NE OLACAK?
Çalışmaya katılıp katılmamak konusunda özgürsünüz. Katılmayı kabul etmeseniz bile hastalığınızın takibi ve tedavinizde bir değişiklik olmayacaktır.
ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIZ
Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklar için no.lu telefondan Prof. Dr. Eser Y. SÖZMEN.'e başvurabilirsiniz.
Çalışmaya katılma onayı
Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren iki sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyorum ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.
Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		

ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İmzası
ADI & SOYADI		
TARİH		
GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

8.3. 12-18 Yaş Hasta Gönüllüler İçin Bilgilendirilmiş Gönüllü Olur Formu

LÜTFEN DİKKATLİCE OKUYUNUZ !!!

Bu çalışmaya katılmak üzere davet edilmiş bulunmaktasınız. Bu çalışmada yer almayı kabul etmeden önce çalışmanın ne amaçla yapılmak istendiğini anlamanız ve kararınızı bu bilgilendirme sonrası özgürce vermeniz gerekmektedir. Size özel hazırlanmış bu bilgilendirmeyi lütfen dikkatlice okuyunuz, sorularınıza açık yanıtlar isteyiniz.

ÇALIŞMANIN AMACI NEDİR?

Bu çalışmanın amacı doğuştan olan bazı hastalıkların tanınması ve tedavinin takibinde bazı maddeleri (Pterinler) kanda ve idrarda ölçerek bu maddelerin hastaların tanısında ve tedavisinin izlenmesinde yararı olup olmayacağını araştırılmasıdır.

NEDEN BEN SEÇİLDİM

Vücudunuzda hücrede bulunan bazı enzimler doğuştan eksik olduğu ya da görevini tam yapamadığı için bazı moleküllerin hücrelerde birikmesi nedeniyle Gaucher hastalığı oluşmaktadır. Sizde doğuştan bu hastalığa sahip olduğunuz için bu çalışmaya seçildiniz.

KATILIRSAM BANA NE OLACAK

Bu araştırmadan hemen tıbbi olarak bir yarar sağlamanız beklenmemektedir. Ancak bu çalışmanın sonuçları ilerideki yaşantınızda sizin hastalığınızın izlenmesinde kullanılabilecek veya başka hastaların tanısı için kullanılabilecektir.

NE YAPMAM GEREKECEK
Yapılan rutin kontroller sırasında alınan kan örnekleri yanında 2 tüp (toplamda 1 tatlı kaşığı kadar) kan alımı yapılacaktır. Bu kan örnekleri alınması için yeniden iğne batırılmayacak ve örnekler sadece bu araştırma için kullanılacaktır. Ayrıca iki tatlı kaşığı kadar idrar örneği alınacaktır. Araştırma ile ilgili olarak ikinci örneklem gerekirse yeniden kan alımı gerekecektir. Bu koşula uymak istemezseniz çalışma dışında tutulacaksınız.
KATILIMIM NE KADAR SÜRECEKTİR
Bu araştırmada tek bir kez örnek alınacak olup bir daha kontrole gelmeniz gerekmemektedir.
KATILMAMIN OLASI ZARAR YA DA RİSKLERİ NELER
Kan alma işlemi ile ilgili riskler arasında bayılma, ağrı ve/veya morarma sayılabilir. Ender durumlarda iğne deliğinin yerinde iltihap ya da küçük bir kan toplanması olabilir. Zaten başka bir nedenle kan örneği alınacağı sırada fazladan 2 tüp kan örneği alınacağı için bu örnek alımı sizin için fazladan bir risk oluşturmayacaktır. Olası bir soruna karşı gerekli tedbirler tarafımızdan alınacaktır.
UYGULANACAK TEDAVİLERİN KATILIMCILAR ÜZERİNE NE GİBİ YAN ETKİLERİ OLUR
Çalışma için herhangi bir tedavi gerekmediği için herhangi bir yan etki sorunu olmayacaktır.
VÜCUDUMDAN ALINAN ÖRNEKLERLE NE YAPILACAK
Kan ve idrar örneklerinde hastalığa ait bazı proteinlerin ve moleküllerin düzeyleri ölçülecektir.
ÇALIŞMA KAPSAMINDAKİ GİDERLER KARŞILANACAK MI
Yapılacak her tür tetkik, fizik muayene ve diğer araştırma masrafları size veya güvencesi altında bulunduğunuz resmi ya da özel hiçbir kurum veya kuruluşa ödetilmeyecektir.
ÇALIŞMAYA KATILMAM NEDENİYLE BİR ÖDEME YAPILACAK MI
Bu araştırmada yer almanız nedeniyle size hiçbir ödeme yapılmayacaktır.
ARAŞTIRMAYA KATILDIĞIM GİZLİ TUTULACAK MI

Size ait tüm tıbbi ve kimlik bilgileriniz gizli tutulacaktır ve araştırma yayınlansa bile kimlik bilgileriniz verilmeyecektir, ancak araştırmanın izleyicileri, yoklama yapanlar, etik kurullar ve resmi makamlar gerektiğinde tıbbi bilgilerinize ulaşabilir. Siz de istediğinizde kendinize ait tıbbi bilgilere ulaşabilirsiniz.
ÇALIŞMAYA KATILMAZSAM NE OLACAK?
Çalışmaya katılıp katılmamak konusunda özgürsünüz. Katılmayı kabul etmeseniz bile hastalığınızın takibi ve tedavinizde bir değişiklik olmayacaktır.
ARAŞTIRMA SÜRESİNCE ÇIKABİLECEK SORUNLAR İÇİN KİMİ ARAMALIYIZ
Araştırma hakkında ek bilgiler almak için ya da çalışma ile ilgili herhangi bir sorun, istenmeyen etki ya da diğer rahatsızlıklar için _____ no.lu telefondan Prof. Dr. Eser Y. SÖZMEN.'e başvurabilirsiniz.
Çalışmaya katılma onayı
Yukarıda yer alan ve araştırmaya başlanmadan önce gönüllüye verilmesi gereken bilgileri gösteren iki sayfalık metni okudum ve sözlü olarak dinledim. Aklıma gelen tüm soruları araştırmacıya sordum, yazılı ve sözlü olarak bana yapılan tüm açıklamaları ayrıntılılarıyla anlamış bulunmaktayım. Çalışmaya katılmayı isteyip istemediğime karar vermem için bana yeterli zaman tanındı. Bu koşullar altında, bana ait tıbbi bilgilerin gözden geçirilmesi, transfer edilmesi ve işlenmesi konusunda araştırma yürütücüsüne yetki veriyor ve söz konusu araştırmaya ilişkin bana yapılan katılım davetini hiçbir zorlama ve baskı olmaksızın büyük bir gönüllülük içerisinde kabul ediyorum. Bu formu imzalamakla yerel yasaların bana sağladığı hakları kaybetmeyeceğimi biliyorum.
Bu formun imzalı ve tarihli bir kopyası bana verildi.

GÖNÜLLÜNÜN		İMZASI
ADI & SOYADI		
ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
Velayet veya vesayet altında bulunanlar için veli veya vasinin		İMZASI
ADI & SOYADI		

ADRESİ		
TEL. & FAKS		
TARİH		
ARAŞTIRMA EKİBİNDE YER ALAN VE YETKİN BİR ARAŞTIRMACININ		İmzası
ADI & SOYADI		
TARİH		
GEREKTİĞİ DURUMLARDA TANIK		İMZASI
ADI & SOYADI		
GÖREVİ		
TARİH		

8.4. Hasta Rapor Formu

Gaucher Hastalığının Tanısı Ve Şiddetinin Göstergesi Olarak Pteridin
Metabolitlerinin Araştırılması

Hasta Rapor Formu

Tarih:../../.....

Protokol No:	Doğum tarihi:
Adı-Soyadı:	Yaşı:
Adres-Tel:	
Fizik Muayene:	
Ağ:	
Boy:	
TA:	
Hepatomegali :	
Splenomegali:	
Kemik tutulumu:	
Klinik Tanısı (Gaucher tipi):	
Genetik sonucu (Varsa):	
Laboratuvar:	
Hb:	
Htc:	
Glikoserebrozidaz aktivitesi (rutin bakılan):	
Kitotriozidaz aktivitesi (rutin bakılan):	
(6R)-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4)	
Pterin (PT)	
6,7-dimethylpterin (6,7-DMPT)	
6-Biopterin	
7-biopterin (L-Primapterin)	
6-neopterin (D-(+)-Neopterin)	
7-neopterin (Sepiaptrin)	

9. Teşekkür

Tez çalışmamın yapılabilmesi için gerekli maddi desteği sağlayan TYL-2019-20414 nolu BAP projesi kapsamında projeyi destekleyen Ege Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine,

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya A.D. öğretim üyeleri; Prof. Dr. Gülinnaz ERCAN, Prof. Dr. Ferhan SAĞIN, Prof. Dr. Hakan Aydın, Prof. Dr. Yasemin AKÇAY, Prof. Dr. Handan Ak, Doç. Dr. Mert ÖZGÖNÜL, Doç. Dr. Ebru SEZER'e,

teşekkürlerimi sunarım.

İzmir, 1.02.2021

Melisa Rabia VURAL

10. Özgeçmiş

ADI SOYADI:	Melisa Rabia VURAL
Doğum Yılı:	07.09.1993
Telefon :	
e-posta :	

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite Yüksek Lisans	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Ege Üniversitesi	Sağlık Bilimleri Enstitüsü	Tıbbi Biyokimya ABD.	2018-

Ülke	Üniversite Lisans	Fakülte/Ensti tü	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Erzurum Teknik Üniversitesi	Fen Fakültesi	Moleküler Biyoloji ve Genetik	2012 - 2016

Ülke	LİSE	Öğrenim Alanı	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Salihli Anadolu Öğretmen Lisesi	Sayısal, MF	2007 - 2011